



HAL
open science

Implication de la protéine adaptatrice CKIP-1 dans le remodelage du cytosquelette d'actine et des membranes dans le muscle strié squelettique

Alexandre Guiraud

► **To cite this version:**

Alexandre Guiraud. Implication de la protéine adaptatrice CKIP-1 dans le remodelage du cytosquelette d'actine et des membranes dans le muscle strié squelettique. Biologie cellulaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2011. Français. NNT : 2011ENSL0637 . tel-00769406

HAL Id: tel-00769406

<https://theses.hal.science/tel-00769406>

Submitted on 1 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée en vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lyon – École Normale Supérieure de Lyon

Spécialité : Sciences de la Vie

Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule

École Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cognitive

par Alexandre GUIRAUD

Titre :

Implication de la protéine adaptatrice CKIP-1 dans le remodelage du cytosquelette d'actine et des membranes dans le muscle strié squelettique

Thèse soutenue oralement le 26 septembre 2011 devant le jury composé de :

Monsieur Bruno ALLARD, rapporteur

Madame Isabelle MARTY, rapporteur

Monsieur Etienne MOREL, examinateur

Madame Evelyne GOILLOT, encadrante de la thèse

Monsieur Laurent SCHAEFFER, directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer tous mes remerciements aux membres du jury, le Dr Isabelle Marty, le Pr Bruno Allard et le Dr Etienne Morel, pour avoir accepté de lire, d'évaluer et de discuter mon travail.

Merci au Dr Marie Vandromme et au Dr Valérie Castellani d'avoir suivi mon travail grâce à leur participation aux comités de suivi de thèse.

Je tiens à remercier Laurent et Evelyne pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe en Master puis pour ma thèse. Merci à Laurent pour son humour qui permet à l'équipe de travailler dans la bonne humeur ! Et merci de m'avoir accepté en thèse malgré mes refus de participer aux entraînements d'hapkido ! Merci à Evelyne pour les récits de ses péripéties de PCR, de cavalière et autres, qu'elle a l'art de rendre très drôles ! Mais surtout, surtout, merci à Evelyne pour sa confiance, son encadrement et ses conseils tout au long de ma thèse.

Merci aux membres passés et actuels de l'équipe différenciation neuromusculaire pour leur bonne humeur et leur gentillesse au quotidien, et pour leur grande tolérance vis-à-vis de mes fausses notes et mauvaises blagues ! L'avantage de travailler au sein d'une équipe aussi nombreuse, c'est qu'on ne s'ennuie jamais !

Un merci tout particulier aux étudiants et post-doc qui se sont succédés au sein du bureau des *CKIPUN'S*. Merci notamment à (par ordre d'apparition !) Caroline, Fanny, Pierre, Gérard et Anne-Sophie pour leur bonne humeur, leur gentillesse, leur humour et ce goût certain pour le sarcasme et l'ironie sans lesquels ces quatre années auraient été beaucoup plus ternes ! Je remercie spécialement Gérard pour sa discrétion et la faculté qu'il avait de se faire oublier... un peu trop peut-être.

Je souhaite également remercier les membres du PLATIM pour leur aide technique et les membres du Centre Technologique des Microstructures pour leurs locaux et leur matériel. Merci à Dominique pour les nombreuses heures passées à l'ultramicrotome et face à l'écran du CM120.

Merci aux membres du PBES pour l'attention quotidienne qu'ils apportent à nos animaux. Merci aux membres des services communs des laboratoires de biologie de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon qui ont contribué à ce travail, notamment les membres de la laverie (merci à Christian pour son « Bonjour » inimitable, et à Djamel pour sa gentillesse), les membres des milieux communs et les membres du service gestion.

Merci aux membres du RDP pour leur accueil au sein de la salle conviviale et leurs cure-dents !

Je tiens à remercier la FRM, le LBMC et l'ENS de Lyon pour le financement de ma quatrième année de thèse.

Merci également aux équipes enseignantes de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon et de l'Université Claude Bernard Lyon 1 grâce à qui mon monitorat a été une expérience vraiment enrichissante.

Je voudrais dire un immense merci à mes amis et à ma famille qui ont toujours été là pour moi. Un merci tout particulier à mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et sans qui nombre d'objectifs n'auraient jamais été atteints. Merci à Camille pour la correction des fautes de frappe et autres coquilles. Merci à toi Aurélie, pour ta présence et ton soutien au quotidien. Merci aussi pour tes talents de mise en page et ton addiction pour les listes (!) sans lesquels ce manuscrit ne serait pas ce qu'il est. Merci surtout d'être toi.

Enfin, merci à toutes celles et à tous ceux qui m'ont aidé au cours de ces dernières années et que je n'ai pas cités ici.

Sommaire

	Pages
Liste des abréviations	11
Liste des figures	15
Introduction	17
<u>I/ Organisation du tissu musculaire strié squelettique</u>	<u>21</u>
I.A/ Les différents niveaux d'organisation du muscle strié squelettique	21
I.B/ Les constituants de la cellule musculaire squelettique et leurs rôles	21
I.B.1/ Le sarcomère : unité structurale contractile des myofibrilles	21
I.B.1.a/ Les filaments fins d'actine et leurs protéines associées	23
I.B.1.b/ Les filaments épais de myosine et leurs protéines associées	25
I.B.1.c/ Les protéines géantes des troisième et quatrième systèmes filamenteux	27
I.B.1.c.i/ Le troisième système filamenteux : les filaments de titine	27
I.B.1.c.ii/ Le quatrième système filamenteux : les filaments de nébuline	29
I.B.1.d/ La strie Z	29
I.B.1.e/ La ligne M	30
I.B.2/ Le cytosquelette non sarcomérique	31
I.B.2.a/ Les filaments intermédiaires	31
I.B.2.b/ Les microtubules	32
I.B.2.c/ L'actine non sarcomérique et les protéines associées	32
I.B.3/ Les structures membranaires spécifiques de la cellule musculaire striée squelettique	33
I.B.3.a/ Les zones d'interaction entre le sarcolemme et le cytosquelette	33
I.B.3.a.i/ Les costamères	33
I.B.3.a.ii/ La jonction myotendineuse	36
I.B.3.b/ La jonction neuromusculaire	37
I.B.3.c/ La triade	37
I.B.3.c.i/ Localisation et structure de la triade	37
I.B.3.c.ii/ Tubule T et DHPR	39

I.B.3.c.iii/ Réticulum sarcoplasmique, RyR1, SERCA, calséquestrine, triadine, junctine	41
I.C/ Implication des éléments du cytosquelette et des structures membranaires dans la contraction des sarcomères et son déclenchement	43
I.C.1/ Le mécanisme de contraction	43
I.C.2/ Le déclenchement de la contraction	45
<u>II/ Remodelage de la membrane et du cytosquelette d'actine au cours de la myogenèse embryonnaire</u>	<u>47</u>
II.A/ Les principales étapes de la myogenèse	47
II.B/ La migration des précurseurs myogéniques jusqu'au site du futur muscle	49
II.B.1/ Le cytosquelette d'actine et la migration des myoblastes <i>in vitro</i>	49
II.B.1.a/ Les structures mises en place par le cytosquelette d'actine permettant la migration <i>in vitro</i>	52
II.B.1.b/ Les régulateurs du cytosquelette d'actine impliqués dans la migration <i>in vitro</i>	52
II.B.1.b.i/ Les Rho GTPases, déclencheurs de la polymérisation de l'actine	52
II.B.1.b.ii/ Autres facteurs de régulation de l'actine impliqués dans l'extension des lamellipodes et filopodes	56
II.B.2/ Les GTPases et la migration des précurseurs myogéniques <i>in vivo</i>	59
II.C/ La fusion des myoblastes en myotubes	59
II.C.1/ La migration des myoblastes à la recherche d'un partenaire de fusion	61
II.C.2/ La reconnaissance et l'adhérence des membranes	61
II.C.3/ La réorganisation du cytosquelette d'actine au cours de la fusion	62
II.C.3.a/ Le remodelage du cytosquelette d'actine est nécessaire à la fusion	62
II.C.3.b/ Les modifications morphologiques et structurales associées à la fusion	63
II.C.3.b.i/ Les modifications morphologiques et structurales précédant la fusion	63
II.C.3.b.ii/ Les modifications structurales au site de fusion	65
II.C.3.c/ Les régulateurs du cytosquelette d'actine au cours de la fusion	65
II.C.3.c.i/ Les Rho GTPases	66
II.C.3.c.ii/ Les régulateurs des Rho GTPases	67
II.C.3.c.iii/ Les effecteurs des Rho GTPases	68
II.C.4/ Le trafic et le remodelage de membrane au site de fusion	68
II.C.4.a/ Trafic, remodelage de membrane et régulateurs du cytosquelette d'actine	69

II.C.4.b/ Trafic membranaire au site de fusion et régulation par les ferlines	70
II.D/ La myofibrillogenèse	71
II.D.1/ Observations et modèles proposés	71
II.D.1.a/ Le modèle de l'assemblage de sous-unités indépendantes	73
II.D.1.b/ Le modèle de la prémyofibrille	73
II.D.2/ Le rôle des protéines géantes	74
II.D.2.a/ La titine	74
II.D.2.b/ La nébuline	75
II.D.2.c/ L'obscurine	76
II.D.3/ Le rôle des intégrines	77
II.E/ La biogenèse des structures membranaires internes du muscle : tubules-T, réticulum sarcoplasmique et triades	78
II.E.1/ Les étapes de la formation des triades	78
II.E.1.a/ Le modèle de l'association indépendante	79
II.E.1.b/ Le modèle de l'association progressive	79
II.E.1.c/ Le modèle actuel	79
II.E.2/ Les protéines impliquées dans la formation du réseau membranaire	81
II.E.2.a/ La mise en place du réticulum sarcoplasmique	83
II.E.2.a.i/ Ankyrine 1.5 et obscurine	83
II.E.2.a.ii/ Rôles de l'ankyrine 1.5 et de l'obscurine dans l'organisation du réseau membranaire	83
II.E.2.b/ L'élongation des tubules T	85
II.E.2.b.i/ La cavéoline 3	85
II.E.2.b.ii/ L'amphiphysine II	87
II.E.2.b.iii/ La dynamine 2	91
II.E.2.b.iv/ La myotubularine	95
II.E.2.c/ L'établissement des jonctions entre le réticulum sarcoplasmique et la membrane plasmique et la mise en place des triades	97
II.E.2.c.i/ DHPR et RyR1	97
II.E.2.c.ii/ Mitsugumine 29	99
II.E.2.c.iii/ Junctophilines	101
II.E.2.c.iv/ Importance de l'innervation pour la maturation des triades	103
II.E.2.d/ Triadine, junctine et calséquestrine	105
II.E.2.d.i/ Triadine, junctine, calséquestrine : trois membres du complexe de relargage du calcium	105
II.E.2.d.ii/ Rôles de la triadine, de la junctine et de la calséquestrine dans la mise en place des triades	106

II.F/ La formation de la jonction neuromusculaire	108
II.F.1/ L'initiation de la formation de la jonction neuromusculaire	108
II.F.2/ Le remodelage de la membrane et du cytosquelette d'actine lors de la formation de la jonction neuromusculaire	109
II.F.2.a/ L'agrégation des récepteurs à acétylcholine	109
II.F.2.a.i/ Les récepteurs à acétylcholine sont présents dans des rafts	109
II.F.2.a.ii/ L'agrégation des récepteurs à acétylcholine implique des mouvements de membrane régulés par le cytosquelette d'actine	111
II.F.2.b/ La formation des replis de la membrane post-synaptiques	112
<u>III/ Remodelage de la membrane et du cytosquelette d'actine dans le muscle adulte</u>	<u>114</u>
III.A/ Le maintien des éléments contractiles du cytosquelette	114
III.A.1/ La longueur des filaments fins d'actine	114
III.A.1.a/ Les filaments d'actine polymérisent et dépolymérisent par leurs deux extrémités	114
III.A.1.b/ La dynamique des filaments d'actine dépend de la contractilité	115
III.A.2/ Le maintien des myofibrilles	116
III.B/ Le maintien du sarcolemme et des structures associées	116
III.B.1/ Origines des lésions membranaires : l'apport de l'étude des dystrophies	117
III.B.1.a/ Les gènes impliqués dans les dystrophies causées par des défauts de connections à la matrice extracellulaire	117
III.B.1.b/ La principale cause des dystrophies causées par des défauts de connections à la matrice extracellulaire : la fragilité membranaire	118
III.B.2/ Comblent les lésions membranaires : réparation et régénération	118
III.B.2.a/ Réparation et dysferline	120
III.B.2.a.i/ L'apport des dysferlinopathies	120
III.B.2.a.ii/ Le mécanisme de réparation des membranes par la dysferline	121
III.B.2.a.iii/ Les interacteurs de la dysferline	122
III.B.2.b/ Régénération et cellules satellites	124
III.C/ Le maintien du réseau membranaire interne	125
III.C.1/ Le rôle des myofibrilles	125
III.C.2/ Le rôle de l'innervation	127
III.C.3/ Les effets de l'exercice	127

<u>IV/ La protéine adaptatrice CKIP-1, une protéine aux multiples fonctions</u>	131
IV.A/ Les domaines et sites consensus de CKIP-1 et son patron d'expression	131
IV.A.1/ Les domaines et sites consensus de CKIP-1	131
IV.A.2/ Le patron d'expression de <i>CKIP-1</i>	132
IV.B/ CKIP-1 et la signalisation intracellulaire	132
IV.B.1/ CKIP-1, un régulateur non enzymatique de kinases	132
IV.B.1.a/ Identification de CKIP-1 comme régulateur non-enzymatique de CK2	132
IV.B.1.b/ Régulation de la localisation de CKIP-1	133
IV.B.2/ CKIP-1 et la régulation de l'apoptose et de la croissance tumorale	135
IV.B.2.a/ CKIP-1 et régulation de l'apoptose	135
IV.B.2.b/ CKIP-1 et régulation de la croissance tumorale	137
IV.B.3/ Régulation de la différenciation musculaire	139
IV.B.4/ Régulation du catabolisme protéique et étude des souris <i>Ckip-1^{-/-}</i>	140
IV.C/ CKIP-1 et la régulation du cytosquelette d'actine	141
Objectifs de la thèse et stratégies expérimentales	146
Résultats et discussion	149
<u>I/ Mise en évidence d'une interaction entre CKIP-1 et le complexe Arp2/3, et implication dans la myogenèse du poisson zèbre</u>	<u>150</u>
<u>II/ Détermination du patron d'expression des protéines CKIP-1 au cours de la différenciation musculaire et mise en évidence de l'implication de CKIP-1 dans le remodelage des membranes <i>in vivo</i>.</u>	<u>195</u>
<u>III/ Preuves supplémentaires en faveur d'un rôle de CKIP-1 dans le remodelage des membranes des cellules musculaires</u>	<u>262</u>
Discussion générale et perspectives	270

Matériel et méthodes	295
<u>I/ Lignée cellulaire, conditions de culture</u>	<u>296</u>
<u>II/ Construction des vecteurs d'expression, shRNA, siRNA et transfection</u>	<u>296</u>
II.A/ Réalisation des constructions	296
II.B/ shRNA	301
II.C/ siRNA	302
II.D/ Transfection	302
<u>III/ Extraction d'ARN et RT-PCR</u>	<u>303</u>
<u>IV/ Animaux, électroporation <i>in vivo</i> et injection de la cardiotoxine</u>	<u>304</u>
<u>V/ Immunofluorescence</u>	<u>305</u>
V.A/ Immunofluorescence sur cellules en culture	305
V.B/ Immunofluorescence sur coupes congelées de muscles	305
<u>VI/ Internalisation de la transferrine</u>	<u>306</u>
<u>VII/ Immuno-blot</u>	<u>307</u>
VII.A/ Préparation des extraits protéiques de cellules en culture	307
VII.B/ Préparation des extraits protéiques de tissu de souris	307
VII.C/ Western blot	307
<u>VIII/ Expériences de fractionnement</u>	<u>308</u>
VIII.A/ Fractionnement sub-cellulaire de cellules en culture	308
VIII.B/ Fractionnement sub-cellulaire de tissu musculaire	308
VIII.C/ Purification des myofibrilles d'un tissu musculaire	309
<u>IX/ Co-immunoprecipitation</u>	<u>309</u>
<u>X/ Déphosphorylation</u>	<u>310</u>
<u>XI/ Analyses ultrastructurales</u>	<u>310</u>
<u>XII/ Anticorps</u>	<u>311</u>
Références	313

Liste des abréviations

AChR	<u>acetylcholine receptor</u>
ADF	<u>actin-depolymerizing factor</u>
ADN	<u>acide désoxyribonucléique</u>
ADNc	<u>acide désoxyribonucléique complémentaire</u>
ADP	<u>adénosine diphosphate</u>
ALP	<u>α-actinin associated LIM protein</u>
AMP	<u>adenosine monophosphate</u>
AP2	<u>adaptor protein 2</u>
Arc35p	<u>actin-related protein 2/3 complex subunit 35 kD</u>
Arp2/3	<u>actin-related protein 2/3</u>
ARPC 1-5	<u>actin-related protein 2/3 complex subunit 1-5</u>
ATM	<u>ataxia-telangiectasia mutated</u>
ATP	<u>adénosine triphosphate</u>
BAR	<u>BIN/amphiphysin/Rvs</u>
BDMA	<u>benzyl dimethylamine</u>
BMD	<u>Becker muscular dystrophy</u>
BMP-2	<u>bone morphogenetic protein-2</u>
BSA	<u>bovine serum albumin</u>
Cap1	<u>adenylate cyclase-associated protein 1</u>
CapZIP	<u>CapZ-interacting protein</u>
CARMIL	<u>CP, Arp2/3, myosin I linker</u>
CC/PDZ-BS	<u>coiled-coil / PSD-95/Dlg/ZO-1-binding site</u>
CD2	<u>cluster of differentiation 2</u>
CD2AP	<u>CD2-associated protein</u>
CDK	<u>cyclin-dependent kinase</u>
CHX	<u>cycloheximide</u>
CK2	<u>casein kinase 2</u>
CKIP-1	<u>CK2 interacting protein-1</u>
CMD	<u>congenital muscular dystrophy</u>
CNM	<u>centronuclear myopathy</u>
co-AP	<u>co-affinity purification</u>
CP	<u>capping protein</u>
CP α	<u>capping protein α</u>
CP β	<u>capping protein β</u>
CRU	<u>calcium release unit</u>
CSQ1	<u>calsequestrin 1</u>
DAPI	<u>4',6'-diamidino-2-phenylindole</u>
DDSA	<u>dodecanyl succinic anhydride</u>
DGC	<u>dystrophin-glycoprotein complex</u>
DHPR	<u>dihydropyridine receptor</u>
DMD	<u>Duchenne muscular dystrophy</u>
DMEM	<u>Dulbecco's modified Eagle medium</u>
DRF	<u>diaphanous-related formin</u>
DTT	<u>dithiothreitol</u>
EH-myomesin	<u>embryonic heart-myomesin</u>
EHD2	<u>Eps15 homology domain 2</u>
ES cell	<u>embryonic stem cell</u>
FAK	<u>focal adhesion kinase</u>

FATZ	<u>γ</u> -filamin/ABP-L, <u>α</u> -actinin and telethonin binding protein of the <u>Z</u> -disc
FHOD3	<u>formin</u> <u>homology</u> <u>domain</u> -containing protein- <u>3</u>
FRAP	<u>fluorescence</u> <u>recovery</u> <u>after</u> photobleaching
GAP	<u>GTPase</u> - <u>activating</u> protein
GAPDH	<u>glyceraldehyde</u> 3- <u>phosphate</u> <u>dehydrogenase</u>
GDP	<u>guanosine</u> <u>diphosphate</u>
GEF	<u>guanine</u> nucleotide- <u>exchange</u> <u>factor</u>
GFP	<u>green</u> <u>fluorescent</u> <u>protein</u>
GRAM	<u>glucosyltransferase</u> , <u>Rab</u> -like GTPase <u>activators</u> and <u>myotubularins</u>
GTP	<u>guanosine</u> <u>triphosphate</u>
GTPase	<u>guanosine</u> <u>triphosphatase</u>
HA	<u>hémagglutinine</u>
HGF	<u>hepatocyte</u> <u>growth</u> <u>factor</u>
HRP	<u>horseradish</u> <u>peroxidase</u>
HAS	<u>human</u> <u>α</u> - <u>skeletal</u> <u>actin</u>
IFN γ	<u>interféron</u> <u>γ</u>
IFP35	<u>interféron</u> -induced protein <u>35</u> kD
IGF	<u>insulin</u> -like <u>growth</u> <u>factor</u>
IL2	<u>interleukine</u> <u>2</u>
IRSp53	<u>insulin</u> <u>receptor</u> tyrosine kinase <u>substrate</u> <u>p53</u>
JP-1 à 4	<u>junctional</u> <u>philin</u> <u>1</u> à <u>4</u>
KI	<u>knock</u> <u>in</u>
KO	<u>knock</u> <u>out</u>
LAMP1	<u>lysosomal</u> - <u>associated</u> <u>membrane</u> <u>protein</u> <u>1</u>
LGMD	<u>limb</u> <u>girdle</u> <u>muscular</u> <u>dystrophy</u>
LIM	<u>Lin</u> -11, <u>ISL</u> -1, <u>mec</u> -3
LIMK	<u>LIM</u> <u>kinase</u>
Lrp4	<u>low</u> -density lipoprotein <u>receptor</u> -related <u>protein</u> <u>4</u>
LZ	<u>leucin</u> <u>zipper</u>
MAPK	<u>mitogen</u> - <u>activated</u> <u>protein</u> <u>kinase</u>
<i>mdx</i>	<u>X</u> -linked <u>muscular</u> <u>dystrophy</u>
MG29	<u>mitsugumin</u> <u>29</u>
MHC	<u>myosin</u> <u>heavy</u> <u>chain</u>
MLC	<u>myosin</u> <u>light</u> <u>chain</u>
MLC1f	<u>myosin</u> <u>light</u> <u>chain</u> <u>1f</u>
MLP	<u>muscle</u> <u>LIM</u> <u>protein</u>
MORN	<u>membrane</u> <u>occupation</u> and <u>recognition</u> <u>nexus</u>
MTM1	<u>myotubular</u> <u>myopathy</u> <u>1</u> appelée maintenant myotubularine 1
MuRF-1	<u>muscle</u> -specific <u>RING</u> <u>finger</u> <u>1</u>
MuSK	<u>muscle</u> <u>specific</u> <u>kinase</u>
MyBP-C	<u>myosin</u> <u>binding</u> <u>protein</u> <u>C</u>
MyBP-H	<u>myosin</u> <u>binding</u> <u>protein</u> <u>H</u>
N-WASP	<u>neural</u> - <u>WASP</u>
naSMF	<u>nascent</u> <u>striated</u> <u>myofibril</u>
NBR1	<u>neighbor</u> of <u>BRCA1</u> <u>gene</u> <u>1</u>
NGS	<u>normal</u> <u>goat</u> <u>serum</u>
NID	<u>Nmi</u> - <u>IFP35</u> <u>homology</u> <u>domain</u>
NM MyHC IIA	<u>non</u> <u>muscle</u> <u>myosin</u> <u>heavy</u> <u>chain</u> <u>IIA</u>
NM MyHC IIB	<u>non</u> <u>muscle</u> <u>myosin</u> <u>heavy</u> <u>chain</u> <u>IIB</u>
NMA	<u>methyl</u> -5- <u>norbornene</u> -2,3- <u>dicarboxylic</u> <u>anhydride</u>

Nmi	<u>N</u> -Myc interacting protein
NPF	<u>n</u> ucleation <u>p</u> romoting <u>f</u> actor
NSMF	<u>n</u> on striated <u>m</u> yofibril
PAK	<u>p</u> 21- <u>a</u> ctivated <u>k</u> inase
PBMC	<u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ell
PBS	<u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PFA	<u>p</u> araformaldehyde
PH	<u>p</u> leckstrin <u>h</u> omology
PI3-K	<u>p</u> hosphatidylinositol <u>3</u> - <u>k</u> inase
PI(3)P	<u>p</u> hosphatidylinositol <u>3</u> -monophosphate
PI(3,5)P ₂	<u>p</u> hosphatidylinositol <u>3,5</u> -bisphosphate
PI(4,5)P ₂	<u>p</u> hosphatidylinositol <u>4,5</u> -bisphosphate
PVDF	<u>p</u> olyvinylidene fluoride
RMD	<u>r</u> ippling <u>m</u> uscle <u>d</u> isease
RNAi	<u>r</u> ibonucleic acid interference
RyR	<u>r</u> yanodine receptor
SAP	<u>s</u> hrimp alkaline phosphatase
SDS-PAGE	<u>s</u> odium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SERCA	<u>s</u> arco/endoplasmique reticulum <u>C</u> a ²⁺ - <u>A</u> TPase
SFLS	<u>s</u> tress fiberlike structure
SH3	<u>S</u> rc homology <u>3</u>
shRNA	<u>s</u> hort hairpin ribonucleic acid
siRNA	<u>s</u> mall interfering ribonucleic acid
SMF	<u>s</u> triated myofiber
Smurf1	<u>S</u> mad ubiquitylation regulatory factor <u>1</u>
SSC	<u>s</u> aline sodium citrate
TBST	<u>T</u> ris-buffered saline, 0,02% <u>T</u> ween20
TGF-β	<u>t</u> ransforming growth factor-β
TMD	<u>t</u> ibial muscular dystrophy
TNF	<u>t</u> umor necrosis factor
Trisk	<u>t</u> riadin skeletal
tubule T	<u>t</u> ubule transverse
WASHCAP	<u>W</u> ASH and capping protein-associated protein
WASP	<u>W</u> iskott-Aldrich syndrome proteins
WAVE	<u>W</u> ASP family <u>V</u> erprolin-homologous proteins
WGA-TRITC	<u>w</u> heat germ agglutinin – tetramethylrhodamine isothiocyanate
XLCNM	<u>X</u> -linked centronuclear myopathy
Z-LAC	<u>Z</u> -line adjacent cytoskeleton
Z-VEID-FMK	<u>N</u> -benzyloxycarbonyl- <u>VEID</u> -fluoromethyl ketone

Liste des figures

	Pages
Introduction	17
Figure 1 : Les différents niveaux d'organisation du muscle strié squelettique	20
Figure 2 : Ultrastructure de la cellule musculaire	22
Figure 3 : Le muscle squelettique est strié	24
Figure 4 : L'organisation des protéines sarcomériques	26
Figure 5 : Le mécanisme moléculaire de la contraction	28
Figure 6 : Les costamères : lien entre le sarcolemme et le cytosquelette	34
Figure 7 : Le réseau membranaire interne de la cellule du muscle strié squelettique	38
Figure 8 : Organisation des molécules de RyR et DHPR au sein des triades	40
Figure 9 : Organisation et fonctionnement de la triade	42
Figure 10 : Contraction des sarcomères	44
Figure 11 : Myogenèse embryonnaire : formation et devenir des précurseurs myogéniques	48
Figure 12 : Les protrusions membranaires impliquées dans la migration	50
Figure 13 : La formation des protrusions membranaires par les GTPases Rho	53
Figure 14 : Structure du complexe de nucléation de l'actine Arp2/3	54
Figure 15 : Les étapes de la fusion étudiées <i>in vitro</i>	60
Figure 16 : Le cytosquelette d'actine et le trafic membranaire lors de l'étape de fusion	64
Figure 17 : La myofibrillogenèse : le modèle de la prémyofibrille	72
Figure 18 : Les modèles expliquant la formation des triades	80
Figure 19 : Evolution de l'organisation des structures membranaires internes au cours de la myogenèse	82
Figure 20 : Cavéolinopathies et Cavéoline 3	84
Figure 21 : Myopathie centronucléaire et amphiphysine 2/BIN 1	88
Figure 22 : Myopathie centronucléaire et dynamine 2	92
Figure 23 : Myopathie centronucléaire et MTM1	94
Figure 24 : Identification, localisation et structure des mitsugumines	98
Figure 25 : Rôles des mitsugumines dans la mise en place des triades	100
Figure 26 : Désorganisation des triades : pentades et heptades	104
Figure 27 : Agrégation des récepteurs à acétylcholine (AChR)	110
Figure 28 : Dysferlinopathie et dysferline	119
Figure 29 : Modèle de réparation des lésions membranaires du muscle strié squelettique par la dysferline	123
Figure 30 : Effet de la taille des sarcomères sur la position des triades	126
Figure 31 : Organisation du gène <i>CKIP-1</i> et prédiction <i>in silico</i> des domaines et sites spécifiques de la protéine CKIP-1	130
Figure 32 : Les différents domaines établis de CKIP-1	134

Figure 33 : Rôle de CKIP-1 dans la régulation de c-Jun/AP-1 et de l'apoptose	136
Figure 34 : Rôle putatif de CKIP-1 dans la régulation de l'apoptose induite par des dommages à l'ADN	138
Figure 35 : Rôle de CKIP-1 sur le cytosquelette d'actine et la morphologie cellulaire	142

Discussion générale et perspectives

Figure 36 : Rôles de CKIP-1 dans le muscle strié squelettique	294
---	-----

Introduction

NON LIBRE DE DROIT

Figure 1 : Les différents niveaux d'organisation du muscle strié squelettique.

Les muscles striés squelettiques sont reliés aux os du squelette par des tendons. Chaque muscle peut être divisé en plusieurs faisceaux qui correspondent à des groupes de cellules ou fibres musculaires entourés par du tissu conjonctif. La fibre musculaire est une cellule allongée plurinucléée : elle contient de très nombreux noyaux repoussés sous la membrane plasmique par les nombreux éléments contractiles en forme de cylindres appelés myofibrilles. Chaque myofibrille correspond à la succession de l'unité structurale contractile du muscle : le sarcomère. Celui-ci est formé par un assemblage hautement organisé principalement composé de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine. Modifié d'après (Sadava et al.).

I/ Organisation du tissu musculaire strié squelettique

Le tissu musculaire strié squelettique est constitué par un ensemble de muscles qui recouvrent le squelette osseux et s'y attachent par des tendons. Les muscles squelettiques remplissent des fonctions variées au sein de l'organisme : ils assurent la production de mouvements, le maintien de la posture, la stabilisation des articulations, le dégagement de chaleur, la protection des tissus sous-jacents et ils participent à la régulation du métabolisme glucidique.

I.A/ Les différents niveaux d'organisation du muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique peut être divisé en plusieurs faisceaux qui correspondent à un assemblage de cellules ou fibres musculaires (Figure 1). La fibre musculaire est une cellule allongée et multinucléée renfermant un grand nombre de cylindres, les myofibrilles, qui sont emballées dans un réseau complexe de membranes (Figure 2). Les myofibrilles sont constituées par la succession d'éléments identiques : les sarcomères. C'est la répétition de ces éléments qui donne au muscle squelettique son aspect strié. Enfin, chaque sarcomère est constitué par un enchevêtrement de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine appelés les myofilaments. Le but de cette partie sera de comprendre l'importance de l'organisation tridimensionnelle des éléments du cytosquelette et des structures membranaires de la cellule musculaire squelettique vis à vis de la réalisation de son activité contractile.

I.B/ Les constituants de la cellule musculaire squelettique et leurs rôles

I.B.1/ Le sarcomère : unité structurale contractile des myofibrilles

Observées en microscopie optique, les myofibrilles présentent une alternance de bandes claires, nommées bandes I (pour isotrope), et de bandes sombres, nommées bandes A (pour anisotrope) (Figure 3.A). Les bandes I sont traversées en leur centre par une ligne sombre : la strie Z (pour *Zwischenscheibe*, qui signifie « disque intermédiaire » en allemand).

NON LIBRE DE DROIT

Figure 2 : Ultrastructure de la cellule musculaire.

Une partie d'une fibre de muscle strié squelettique est schématisée sur cette figure. La cellule musculaire est délimitée par la membrane plasmique ou sarcolemme. La majorité de l'espace intracellulaire est occupée par les myofibrilles constituées par une succession de sarcomères. Ces myofibrilles sont emballées par un système membranaire composé de réticulum sarcoplasmique et de tubules transverses qui entrent en contact au niveau de triades. Les autres organites occupent les espaces entre les myofibrilles (cas des mitochondries) ou sont repoussés à la périphérie de la cellule sous le sarcolemme (cas des noyaux, non représentés ici). Modifié d'après (Marieb).

Un sarcomère est délimité par deux stries Z. Il est donc composé par une bande A centrale flanquée de deux demi-bandes I. L'observation des sarcomères en microscopie électronique à transmission a révélé la présence d'une bande plus claire au centre de la bande A : c'est la zone H (pour *heller*, « plus clair ») (Figure 3.B). Enfin, au centre de la zone H, se trouve une ligne plus sombre : c'est la ligne M (pour *Mittelscheibe*, « disque du milieu »). Cette succession de bandes claires et sombres est due à l'organisation tridimensionnelle des éléments constitutifs des myofibrilles.

I.B.1.a/ Les filaments fins d'actine et leurs protéines associées

La protéine la plus abondante du muscle squelettique est l'actine, plus précisément l'isoforme alpha. Dans le muscle, l' α -actine est organisée en filaments fins qui sont ancrés à la ligne Z, couvrent la totalité de la demi bande I, et s'étendent vers le milieu du sarcomère sur une partie de la bande A où ils forment des interdigitations avec les filaments épais. Les filaments d'actine s'arrêtent à la limite de la zone H (Figure 4). Dans les filaments fins, les monomères d'actine G (globulaire) sont structurés en une double hélice α associée sur toute sa longueur à des protéines régulatrices : la tropomyosine et les troponines.

La tropomyosine et le complexe des troponines (troponines C, I et T) régulent la contraction musculaire en contrôlant la liaison entre les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine de manière dépendante du calcium. En absence de calcium, la tropomyosine localisée dans les sillons des filaments fins bloque l'accès des têtes de myosine à leurs sites de liaison présents sur l'actine. En revanche, la fixation de calcium sur la troponine C diminue l'affinité de la troponine I (inhibitrice) pour l'actine et de la troponine T pour la tropomyosine ce qui déclenche un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine. Ce changement de conformation aboutit au déplacement de la tropomyosine rendant ainsi accessibles les sites de liaison actine-myosine. L'interaction actine-myosine active la fonction ATPase de la myosine ce qui déclenche *in fine* le glissement des filaments fins sur les filaments épais à l'origine de la force de contraction (Clark et al., 2002).

La régularité de la striation des myofibrilles est en partie due au fait que la longueur des filaments fins d'actine est constante et uniforme ($\sim 1\mu\text{m}$) : elle est donc hautement régulée. Les filaments d'actine sont des structures polarisées qui présentent une extrémité (-) appelée extrémité pointue, et une extrémité (+) appelée extrémité barbue (cette nomenclature est due à

NON LIBRE DE DROIT

Figure 3 : Le muscle squelettique est strié.

(A) Observation au microscope optique d'une coupe longitudinale de muscle squelettique de singe (*Pan troglodytes*) colorée à l'hématoxyline – éosine. La coloration fait apparaître une succession de bandes sombres, les bandes A, et de bandes claires, les bandes I, qui sont traversées en leur centre par une ligne plus sombre, la strie Z. (B) Observation au microscope électronique à transmission d'une coupe longitudinale de muscle squelettique de grenouille (*Rana pipiens*). La succession de bandes A et I et de stries Z est retrouvée. Une bande plus claire, la zone H, est présente au centre de la bande I. Cette zone H est traversée en son centre par une ligne sombre, la ligne M, qui définit le centre du sarcomère, alors que les stries Z constituent les bornes du sarcomère. Les barres d'échelle représentent 5 μm en (A) et 500 nm en (B). Réalisé d'après (A bank of digital resources for teaching biology, The Titin/Telethonin Complex).

l'aspect des extrémités des filaments observés en microscopie électronique (Huxley, 1963)). La variation de longueur des filaments d'actine F (filamenteuse) s'effectue par ajout ou retrait de monomères d'actine G à leurs extrémités. L'élongation et le raccourcissement des filaments d'actine peuvent être bloqués par la fixation de protéines qui coiffent l'extrémité des filaments. Dans le sarcomère, l'extrémité barbue localisée à la strie Z est coiffée par CapZ, un hétérodimère composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . L'extrémité pointue est quant à elle coiffée par la tropomoduline, dont l'activité de coiffe dépend de son interaction avec la tropomyosine (Weber et al., 1994).

I.B.1.b/ Les filaments épais de myosine et leurs protéines associées

Les filaments épais s'étendent sur la totalité de la bande A, de part et d'autre de la ligne M (Figure 4). Des centaines de molécules de myosine composent ces filaments épais. Chaque molécule de myosine est constituée par deux chaînes lourdes (MHC, *myosin heavy chain*) et quatre chaînes légères (MLC, *myosin light chain*). Cet hétérohexamère est séparé en trois régions fonctionnelles : la tige, le cou et la tête. La tige est constituée par les régions C-terminales des deux chaînes lourdes, tandis que leurs régions N-terminales associées à quatre chaînes légères constituent la tête de myosine qui contient le domaine catalytique ATPase et le site de liaison à l'actine. Entre la tige et la tête, la région du cou permet la rotation de la tête de myosine. Ainsi, après hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate), la tête qui interagit avec l'actine subit une rotation qui provoque le glissement du filament d'actine vers la ligne M (Figure 5). La myosine est donc le moteur moléculaire à l'origine de la force de contraction (Vale and Milligan, 2000).

D'autres protéines entrent dans la composition des filaments épais. Les protéines C et H de liaison à la myosine (MyBP-C et MyBP-H, *myosin binding proteins-C* et *-H*) et l'adénosine monophosphate désaminase sont associées à la myosine le long de la tige. Ces protéines semblent jouer un rôle dans l'assemblage des filaments épais et surtout dans la régulation de la contraction musculaire (Gilbert et al., 1996; Stelzer et al., 2006).

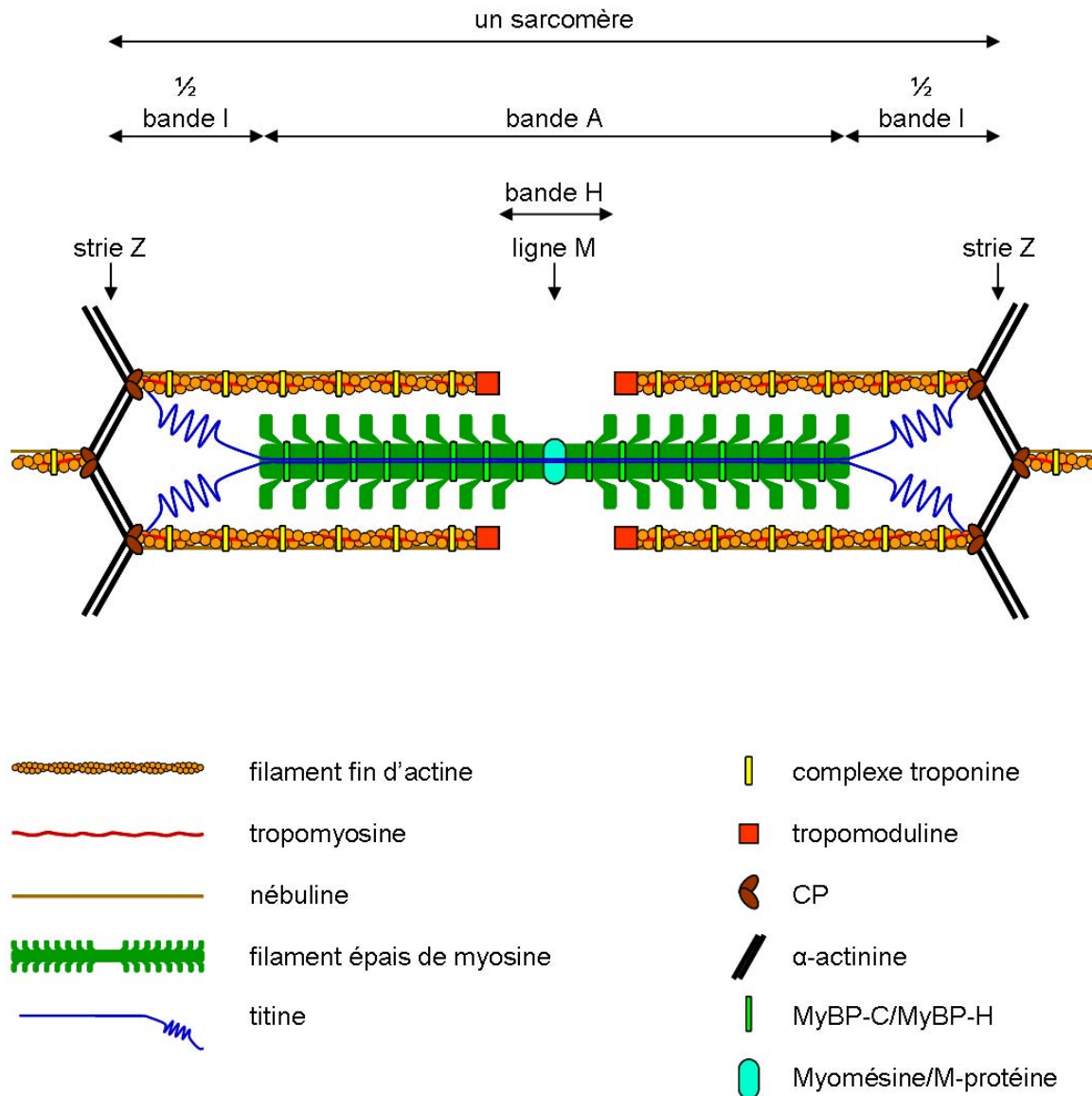


Figure 4 : L'organisation des protéines sarcomériques.

Un sarcomère, dont une représentation schématique simplifiée est représentée ici, est un réseau hautement organisé de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine. Les filaments d'actine sont associés les uns aux autres par l' α -actinine au niveau des stries Z qui délimitent les sarcomères. Les filaments de myosine sont associés entre eux par les protéines de la ligne M située au centre du sarcomère. De la strie Z à la ligne M, le sarcomère est composé successivement d'une demi-bande I composé majoritairement de filaments d'actine, puis d'une demi-bande A dont la majeure partie est composée par la superposition de filaments d'actine et de myosine. Enfin, l'extrémité de la demi-bande A située à proximité de la ligne M est formée par une demi-bande H qui n'est constituée que de filaments de myosine. Outre l'actine et la myosine, des protéines régulatrices s'associent également aux filaments fins (tropomyosine, troponines, tropomoduline, CP, ...) et aux filaments épais (MyBP-C, MyBP-H, ...). Enfin, des protéines dites géantes comme la titine et la nébuline traversent la (quasi) totalité du sarcomère.

I.B.1.c/ Les protéines géantes des troisième et quatrième systèmes filamenteux

Les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine constituent respectivement les premier et second systèmes filamenteux du muscle strié squelettique. Il existe deux autres assemblages de protéines en filaments : le troisième système filamenteux composé de titine et le quatrième système filamenteux composé de nébuline.

I.B.1.c.i/ Le troisième système filamenteux : les filaments de titine

La titine est la plus grande protéine connue à ce jour (~4,2 MDa chez l'homme). Elle s'étend sur un demi sarcomère, de la strie Z à la ligne M en passant par la demi bande I et la demi bande A (Figure 4). Les régions N-terminales et C-terminales des molécules de titine de demi sarcomères adjacents se chevauchent à la strie Z et la ligne M, respectivement. L'ensemble des molécules de titine constitue donc un système filamenteux continu couvrant toute la longueur de la myofibrille. Les différentes parties de la titine définies par leur position le long du sarcomère assurent des fonctions différentes.

L'expression de fragments tronqués de titine *in vitro* et/ou *in vivo* a montré l'importance des régions N-terminale et C-terminale de la protéine dans la formation et/ou le maintien des sarcomères (Musa et al., 2006; Peckham et al., 1997; Weinert et al., 2006). De même la région de la titine localisée à la bande A interagit avec les constituants des filaments épais (myosine, MyBP-C, AMP désaminase) et serait impliquée dans l'assemblage et l'organisation de ces filaments (Person et al., 2000; Soteriou et al., 1993). La région de la titine localisée à la bande I est, quant à elle, composée d'une succession de domaines élastiques jouant le rôle de ressorts qui maintiennent un chevauchement minimum des filaments fins et épais lorsque le muscle est relâché ou étiré. Cette force passive exercée par la titine est régulée au cours du développement et en situation pathologique par des épissages alternatifs affectant cette région élastique (Ottenheijm et al., 2009; Wu et al., 2002). Enfin, la mise en évidence d'un domaine kinase dans la région C-terminale de la titine et l'identification de NBR1 (*neighbor of BRCA1 gene 1*) et p62 (deux protéines impliquées dans la dégradation des protéines par la voie ubiquitine/protéasome) comme des substrats de la titine suggèrent une implication de cette dernière dans le catabolisme protéique (Lange et al., 2005). En résumé, les fonctions remplies par les différentes parties de la titine soulignent son implication centrale dans la mise en place et le maintien de la structure et de l'intégrité des sarcomères.

NON LIBRE DE DROIT

Figure 5 : Le mécanisme moléculaire de la contraction.

(1) La myosine musculaire est un dimère constitué par deux têtes identiques (comportant chacune un site catalytique (bleu)) reliées à la partie centrale du filament épais (en haut) par un domaine *coiled-coil* (tige grise en diagonale). Le lien entre la tête catalytique et le domaine *coiled-coil* est assuré par une région qui joue le rôle de levier (en jaune dans sa conformation « pré-mouvement »). (2) L'une des deux têtes de myosine se fixe sur un site de liaison présent sur l'actine (vert). Les deux têtes de myosine agissent indépendamment l'une de l'autre et une seule tête se lie à l'actine à la fois. (3) La fixation de la tête de myosine sur l'actine provoque le relargage du phosphate inorganique du site actif. Le levier pivote alors jusqu'à sa position post-mouvement (rouge). Ce mouvement du levier déplace la tête de myosine et donc le filament d'actine de 10 nm. (4) Une fois le mouvement du levier achevé, l'ADP se dissocie du site actif où il est remplacé par une molécule d'ATP. Ceci induit la dissociation de la tête de myosine et du filament d'actine, puis l'hydrolyse de l'ATP provoque le retour du levier à sa conformation initiale (jaune, étape 1). Barre d'échelle, 6 nm. Tiré de (Vale and Milligan, 2000).

I.B.1.c.ii/ Le quatrième système filamentaire : les filaments de nébuline

La nébuline est une autre protéine géante (~900 kDa chez l'homme) qui s'étend de la strie Z à l'extrémité pointue des filaments fins d'actine (Figure 4). La nébuline aurait une fonction centrale au sein des sarcomères puisqu'elle est supposée régler la taille des filaments fins d'actine. En effet, la taille des différentes isoformes de nébuline et la taille des filaments fins d'actine sont corrélées dans les différents muscles étudiés au sein de différentes espèces mais aussi au cours du développement (Kruger et al., 1991; Labeit et al., 1991). De plus, lors de la myofibrillogenèse, la nébuline est assemblée avant que les filaments d'actine atteignent leur taille finale, ce qui est cohérent avec le rôle de « patron » proposé pour la nébuline. Enfin, la nébuline interagit par sa région centrale avec l'actine, la tropomyosine, la troponine, et par ses extrémités N-terminale et C-terminale avec les protéines de coiffe tropomoduline et CapZ, respectivement (McElhinny et al., 2001; Pappas et al., 2008; Wang et al., 1996; Witt et al., 2006). Il apparaît donc très probable que la nébuline agisse de concert avec les protéines de coiffe pour dicter et maintenir la longueur des filaments fins d'actine. Cependant ce modèle qui laisse croire à des filaments d'actine très statiques ne doit pas masquer le fait que des monomères d'actine sont en permanence ajoutés et retirés aux extrémités des filaments fins (Littlefield et al., 2001).

I.B.1.d/ La strie Z

Un sarcomère est délimité par deux stries Z qui servent de point d'ancrage aux filaments d'actine, de titine et de nébuline (Figure 4). La strie Z constitue donc l'ossature centrale assurant l'organisation et le maintien de la structure des sarcomères. Le principal composant de la strie Z est l' α -actinine (isoformes 2 et 3) qui est organisée en plusieurs couches d'homodimères antiparallèles permettant d'associer étroitement les filaments d'actine, de titine et de nébuline à leurs homologues des sarcomères adjacents. L' α -actinine interagit avec d'autres protéines qui participent à la stabilisation de la strie Z (MLP (*muscle LIM protein*), myopalladine, ALP (*α -actinin associated LIM protein*)) ou plus généralement du sarcomère (CapZ, filamine, téléthonine) renforçant ainsi ses fonctions mécaniques. Ainsi, les stries Z constituent des structures compactes permettant la transmission, aux sarcomères voisins, de la force de contraction générée à l'intérieur du sarcomère.

En outre, parmi les protéines présentes à la strie Z, certaines sont capables de lier des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire. C'est le cas notamment des protéines Enigma et FATZ (*γ-filamin/ABP-L*, *α-actinin* and *telethonin binding protein of the Z-disc*) qui interagissent avec le récepteur à l'insuline, la tyrosine kinase Ret, la protéine kinase C, et la calcineurine. D'autres, comme la protéine MLP, sont même capables de faire la navette entre la strie Z et le noyau. La strie Z constitue donc non seulement un site d'ancrage du cytosquelette mais aussi un centre de transduction du signal capable de lier les fonctions nucléaires aux voies de signalisation des myofibrilles (Clark et al., 2002; Frank et al., 2006).

I.B.1.e/ La ligne M

La ligne M est une zone dense aux électrons située au milieu de la bande A qui servirait d'ancrage aux filaments épais (Figure 4). En effet, cette zone correspond à une succession de 3 à 5 ponts moléculaires reliant entre eux les filaments de myosine d'un sarcomère. La ligne M constitue donc pour les filaments épais l'équivalent structural de la strie Z pour les filaments fins (Agarkova and Perriard, 2005).

Tout comme pour la strie Z, deux types de composants sont retrouvés à la ligne M : des protéines structurales et des protéines impliquées dans la signalisation. Trois principales protéines sont impliquées dans la structure de la ligne M : la myoméline, la M-protéine et l'obscurine, qui ont toutes la propriété d'interagir avec la myosine et la titine. La myoméline est exprimée dans tous les muscles striés et ses molécules s'organisent en homodimères antiparallèles capables de créer des ponts entre les filaments épais. Contrairement à la myoméline, chez la souris, la M-protéine n'est pas exprimée dans le cœur embryonnaire et les fibres lentes où elle est remplacée par une isoforme de la myoméline, la EH-myoméline (*embryonic heart-myomesin*) (Agarkova et al., 2000). Ceci confirme le rôle central joué par la myoméline dans la structure de la ligne M. Enfin l'obscurine (la troisième protéine géante du muscle) semble nécessaire à l'assemblage des myosines et de la ligne M (Ackermann et al., 2009).

Outre ces protéines structurales, trois protéines impliquées dans la signalisation ont été localisées à la ligne M : la E3 ubiquitine-ligase MuRF-1 (*muscle-specific RING finger 1*), la protéase calpaïne3/p94, et la MM créatine kinase. Cependant, ces protéines ne sont pas localisées en permanence à la ligne M, et il semblerait que leur délocalisation du cytoplasme à

la ligne M puisse être un moyen d'inhiber leur activité enzymatique (Hayashi et al., 2008; Mrosek et al., 2007).

I.B.2/ Le cytosquelette non sarcomérique

Bien que les sarcomères constituent l'immense majorité du cytosquelette des cellules musculaires, d'autres éléments du cytosquelette participent à l'organisation intracellulaire.

I.B.2.a/ Les filaments intermédiaires

La cellule du muscle squelettique contient de nombreuses protéines des filaments intermédiaires mais la desmine est la plus abondante. Celle-ci est principalement localisée autour des myofibrilles à la strie Z. L'étude des souris *Desmine*^{-/-} a montré que la desmine n'est pas indispensable à la mise en place du muscle, mais contribue à maintenir son intégrité et l'alignement des myofibrilles. Elle réalise en effet des ponts entre les stries Z de myofibrilles adjacentes et participe à la liaison de l'appareil contractile au sarcolemme ainsi qu'aux différents organites de la cellule. Ceci permet de conserver la position relative des éléments du muscle malgré les contractions (Li et al., 1997; Shah et al., 2002).

D'autres protéines des filaments intermédiaires pourraient jouer des rôles semblables à ceux de la desmine. En effet, la synemine (ou desmusline), la paranemine, la syncoiline, les cytokératines et la vimentine sont toutes localisées aux stries Z et/ou aux costamères (voir I.B.3.a.i). Seule la nestine présente une localisation différente, puisqu'elle est retrouvée à la jonction neuromusculaire et à la jonction myotendineuse (voir I.B.3.a.ii et I.B.3.b). Cependant cette localisation de la nestine reste cohérente avec un rôle d'ancrage des myofibrilles à la membrane (Capetanaki et al., 2007).

Enfin des protéines des filaments intermédiaires sont spécifiquement associées à l'enveloppe nucléaire interne (lamine A, B, C, émerine). Des mutations dans les gènes codant pour ces protéines sont à l'origine de myopathies qui pourraient être dues à une mauvaise localisation des noyaux, ou à une plus grande sensibilité des noyaux (et de leur enveloppe) au stress mécanique dû à la contraction (Morris, 2001).

I.B.2.b/ Les microtubules

Les microtubules sont des polymères de sous-unités hétérodimériques de tubuline α et β . Dans le muscle squelettique, les microtubules sont localisés autour des myofibrilles à la jonction entre la bande A et la bande I, et sont aussi associés au sarcolemme, à l'appareil de Golgi et aux noyaux (Boudriau et al., 1993). Le rôle du cytosquelette de tubuline dans le muscle mature a été peu étudié. Cependant l'importance de la dynamique des microtubules dans le muscle squelettique a été mise en évidence par le fait que des patients atteints de cancer traités à la colchicine (un inhibiteur de la polymérisation des microtubules) ont développé des myopathies caractérisées par une destructuration des myofibrilles et une perturbation du trafic vésiculaire. Ces observations suggèrent que, dans les muscles squelettiques, les microtubules participent au trafic des vésicules intracellulaires, mais aussi au maintien de l'organisation des myofibrilles (Fernandez et al., 2002).

I.B.2.c/ L'actine non sarcomérique et les protéines associées

Dans la cellule musculaire, le cytosquelette d'actine et ses protéines associées sont connus pour entrer dans la composition des sarcomères (voir I.B.1.a). Cependant, plusieurs isoformes de ces différentes protéines sont exprimées dans le muscle, et certaines ont été retrouvées en dehors des sarcomères. Ces isoformes sont donc dites « non sarcomériques » ou, de manière abusive, « non musculaires » (Kee et al., 2009).

Bien qu'elles ne fassent pas partie intégrante des sarcomères, les isoformes non sarcomériques du cytosquelette d'actine présentent une localisation précise au sein de la cellule du muscle squelettique. Ainsi la γ -actine, les tropomyosines 4 et 5NM1, l' α -actinine 1, la spectrine, l'ankyrine, les chaînes lourdes de myosines non musculaires IIA et B (NM MyHC IIA et B, *non-muscle myosin heavy chain IIA and B*) ont toutes été localisées de part et d'autre de la strie Z, dans une région appelée Z-LAC (*Z-line adjacent cytoskeleton*) (Amsili et al., 2008; Bennett et al., 2004; Flucher et al., 1990; Kee et al., 2004; Takeda et al., 2000; Vlahovich et al., 2009; Vlahovich et al., 2008). Cette région correspond à la localisation des triades (structures membranaires qui seront décrites dans le paragraphe I.B.3.c). La présence de tous les composants majeurs du cytosquelette d'actine au Z-LAC semble prouver l'existence d'un cytosquelette d'actine fonctionnel qui pourrait participer au maintien de l'intégrité structurale de la strie Z, ou à l'organisation et/ou au maintien des triades. Le fait que

les souris KO (*knockout*) pour la γ -actine ne présentent pas de défaut sarcomérique mais des noyaux centraux orientés plutôt vers la seconde hypothèse (Sonnemann et al., 2006). En effet, la présence de noyaux centraux est caractéristique des myopathies centronucléaires (CNM, *centronuclear myopathies*). Les gènes mutés dans les CNM ont des rôles dans le trafic vésiculaire, la structure et la fonction de la membrane (myotubularine, dynamine 2, amphiphysine 2, récepteur à la ryanodine) suggérant qu'une perturbation de la fonction membranaire est la cause des CNM (Jungbluth et al., 2008). Ainsi, un défaut de l'organisation et/ou du fonctionnement des triades pourrait être à l'origine du phénotype observé dans les souris KO pour la γ -actine.

La spectrine et l'ankyrine ont également été localisées aux costamères avec la γ -actine, et à la jonction neuromusculaire avec la β -actine (voir I.B.3.a.i et I.B.3.b pour la description de ces structures) suggérant un rôle potentiel du cytosquelette d'actine non sarcomérique dans la fixation de la cellule musculaire aux structures environnantes (Kee et al., 2009).

I.B.3/ Les structures membranaires spécifiques de la cellule musculaire striée squelettique

La membrane plasmique de la cellule musculaire striée, ou sarcolemme, n'est pas qu'une simple frontière délimitant la cellule ; elle présente des adaptations assurant d'une part l'ancrage de la cellule dans son environnement et d'autre part la réponse de la cellule aux stimuli extérieurs.

I.B.3.a/ Les zones d'interaction entre le sarcolemme et le cytosquelette

Chaque cellule musculaire est entourée d'une lame basale qui sépare la cellule du tissu conjonctif qui l'emballer. Cette lame basale, riche en protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine), fournit des points d'attaches à la fibre musculaire.

I.B.3.a.i/ Les costamères

Les myofibrilles sont liées à la membrane plasmique et à la lame basale sous-jacente par des complexes protéiques localisés à la périphérie de la cellule, alignés avec les stries Z et les lignes M. Ces complexes protéiques ont été nommés costamères (Figure 6). Ils permettent

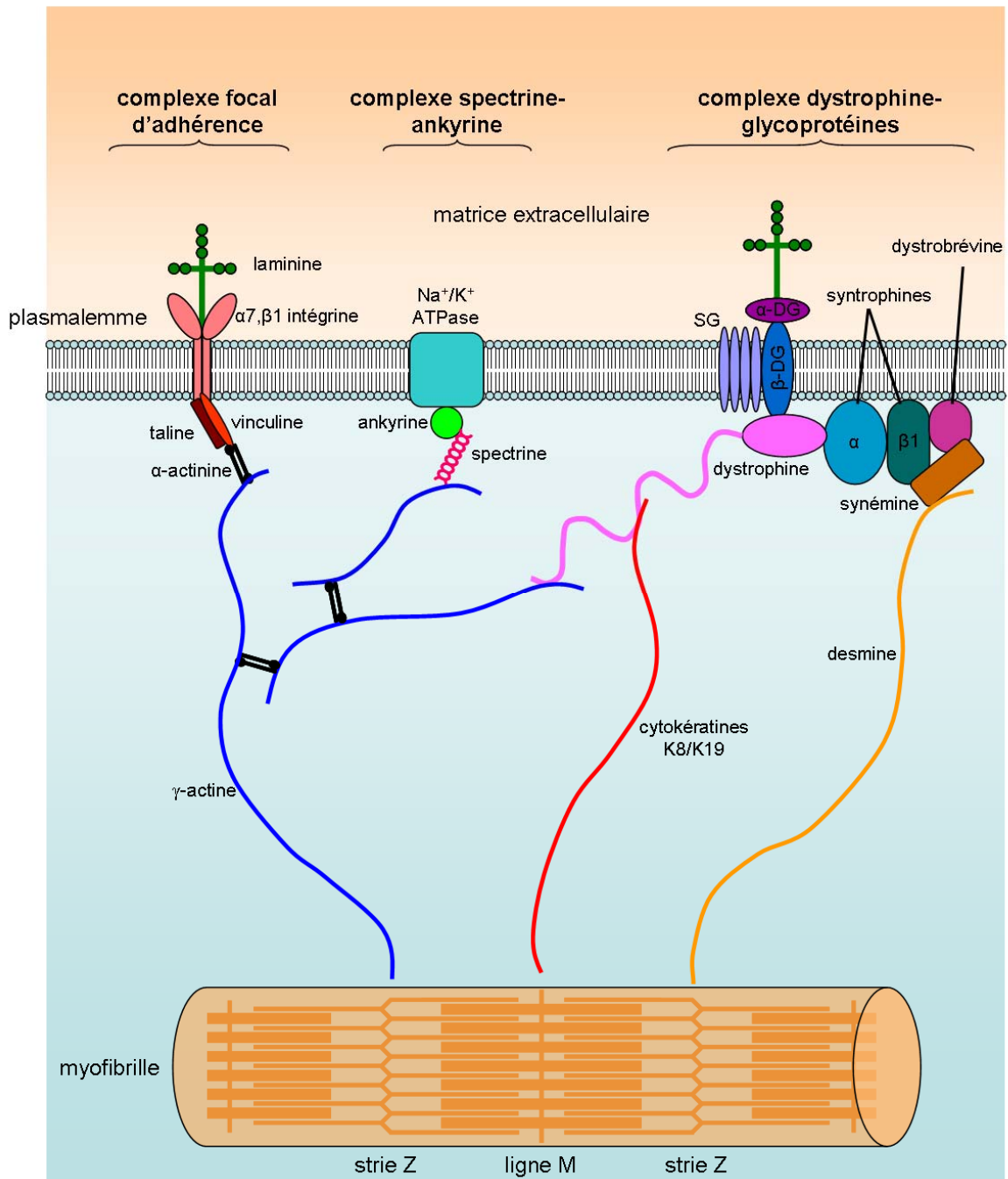


Figure 6 : Les costamères : lien entre le sarcolemme et le cytosquelette.

Les trois principaux complexes constituant les costamères sont représentés : les complexes focaux d'adhérence, les complexes basés sur le couple spectrine - ankyrine, et les complexes dystrophine-glycoprotéines. Les complexes focaux d'adhérence permettent de relier les laminines de la matrice extracellulaire aux protéines de la strie Z via les intégrines et un complexe vinculine – taline – α -actinine – γ -actine. Les complexes basés sur le couple spectrine – ankyrine permettent de relier les pompes et canaux transmembranaires aux protéines de la strie Z via la γ -actine. Enfin, la dystrophine lie d'un côté le complexe des sarcoglycanes et α/β -dystroglycanes qui interagissent avec les laminines, et de l'autre les protéines de la strie Z via la γ -actine et les protéines de la ligne M via un complexe α -syntrophine – α -dystrobrevine – synémine / desmine. Réalisé d'après (Clark et al., 2002).

de transmettre latéralement la force de contraction des sarcomères à la lame basale et aux cellules musculaires voisines ; et ils assurent le maintien de l'intégrité structurale du sarcolemme en répartissant équitablement le stress mécanique subit par la membrane lors de la contraction (Craig and Pardo, 1983; Pardo et al., 1983; Porter et al., 1992). Trois principaux complexes constituent les costamères : le complexe focal d'adhérence, le complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC, *dystrophin glycoprotein complex*), et le complexe basé sur la spectrine.

Les complexes focaux d'adhérence sont centrés sur un hétérodimère d'intégrines (Figure 6). Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui lient la laminine par leur domaine extracellulaire et un complexe vinculine-taline- α -actinine par leur domaine intracellulaire. Ce complexe est lui-même associé à la γ -actine costamérique qui se lie à la strie Z des sarcomères.

La dystrophine est le constituant central des complexes dystrophine-glycoprotéines qui comportent les sarcoglycanes et les α/β -dystroglycanes capables de lier la laminine par leur domaine extracellulaire (Figure 6). La dystrophine se lie au domaine intracellulaire des β -dystroglycanes et crée le lien avec les myofibrilles au niveau de leurs stries Z via la γ -actine costamérique ou un complexe α -syntrophine- α -dystrobrevine-synemine/desmine, et au niveau de leurs lignes M via les cytokératines K8/K19.

Enfin, la spectrine complexée à l'ankyrine relie des protéines transmembranaires comme la pompe Na^+/K^+ ATPase à la γ -actine costamérique (Figure 6). Ainsi, l'association des trois complexes décrits ci-dessus crée un lien stable entre la matrice extracellulaire, le sarcolemme et l'appareil contractile.

L'importance structurale des costamères est mise en évidence par le fait qu'en absence de dystrophine ou d'intégrine, les cellules musculaires subissent, respectivement, des dommages membranaires et une perturbation de l'organisation sarcomérique (Perkins et al., 2010; Petrof et al., 1993). Ainsi des mutations dans les composants du DGC causent des dystrophies musculaires (dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker, myopathies des ceintures de type 2C, 2D, 2E et 2F), et des mutations dans l'intégrine $\alpha 7$ ou la laminine causent des myopathies congénitales (Emery, 2002).

En outre, les costamères occupent une position idéale au sein de la fibre musculaire pour jouer le rôle de senseur du stress mécanique et activer, en réponse à ce stress, des voies

de signalisation intracellulaire comme celle déclenchée par FAK (*focal adhesion kinase*), un effecteur des intégrines. En effet, l'étirement du muscle provoque la phosphorylation de FAK qui induit l'expression des gènes associés à l'hypertrophie (Kovacic-Milivojevic et al., 2001). Les costamères permettent donc à la fibre de s'adapter au stress mécanique qu'elle subit.

I.B.3.a.ii/ La jonction myotendineuse

La jonction myotendineuse correspond à la zone de contact entre l'extrémité des fibres musculaires et les tendons. C'est au niveau de cette jonction que se concentre la force de contraction générée par l'ensemble des sarcomères de la cellule ; le sarcolemme y est donc soumis à un stress mécanique intense. Cependant, à l'extrémité des fibres, le sarcolemme forme de nombreux replis qui s'étendent parallèlement à l'axe principal de la cellule. La membrane établit ainsi des interdigitations avec les fibres de collagène du tendon. Ceci permet d'augmenter l'aire de la membrane à la jonction myotendineuse ce qui diminue la tension subie par unité de surface.

De nombreux composants du complexe dystrophine-glycoprotéine sont retrouvés à la jonction myotendineuse : la dystrophine, l'utrophine, la syntrophine, le sarcospane. De même, on y trouve des intégrines, la vunculine, la taline, la FAK, ce qui suggère la présence de complexes focaux d'adhérence. L'étude des défauts observés à la jonction myotendineuse dans les souris *Dystrophine*^{-/-} (*mdx*), *Utrophine*^{-/-} (*utr*^{-/-}), *Intégrine* $\alpha 7$ ^{-/-} ($\alpha 7$ ^{-/-}), *mdx/utr*^{-/-}, *mdx/α7*^{-/-}, *utr*^{-/-}/ $\alpha 7$ ^{-/-} a permis de montrer que ces trois protéines agissent de concert pour maintenir l'intégrité structurale et fonctionnelle de la jonction myotendineuse. De plus, les défauts induits par l'absence d'une ou deux de ces protéines peuvent être en partie compensés par la surexpression de la troisième ce qui confirme le caractère coopératif liant les complexes présents à la jonction myotendineuse (Welsch et al., 2009).

Les costamères et la jonction myotendineuse constituent donc des zones spécialisées de la membrane plasmique caractérisées par la présence de complexes protéiques et de voies de signalisation communs, qui assurent (1) la fixation de la cellule musculaire à son environnement, (2) la protection du sarcolemme vis à vis du stress mécanique lié à la contraction, et (3) la capacité de sentir les forces de tension subies, offrant ainsi à la cellule la possibilité de s'y adapter.

I.B.3.b/ La jonction neuromusculaire

La jonction neuromusculaire est une synapse chimique permettant la communication entre un motoneurone et une fibre musculaire. Cette communication passe par la libération par la terminaison axonale du motoneurone d'un neurotransmetteur, l'acétylcholine, qui se fixe sur son récepteur, situé dans la membrane de la cellule musculaire.

De nombreuses protéines sont concentrées à la région post-synaptique, notamment des canaux ioniques chimio- et voltage-dépendants dont la localisation est organisée. Au niveau de la jonction neuromusculaire, le sarcolemme présente en effet de très nombreux replis qui assurent la ségrégation des canaux ioniques : les récepteurs à acétylcholine (canaux sodiques chimio-dépendants) sont concentrés aux sommets des replis, près de la terminaison axonale, tandis que les canaux sodiques voltage-dépendants sont localisés dans les creux des replis. Cette organisation particulière des canaux ioniques permet la réception rapide du signal chimique neuronal par les récepteurs à acétylcholine dont l'ouverture provoque une dépolarisation de la membrane perçue par les canaux sodiques voltage-dépendants qui génèrent alors un potentiel d'action (Burden, 2002).

Outre les canaux ioniques, le sarcolemme post-synaptique est également riche en intégrines et en complexes dystrophine-glycoprotéine qui assurent la fixation de la membrane à la matrice extracellulaire. Le rôle de la jonction neuromusculaire est donc double puisqu'elle permet d'une part la stabilisation mécanique du contact avec le motoneurone, et d'autre part la réception et la transduction du signal émis par le motoneurone. Ce signal transduit à la jonction neuromusculaire est ensuite perçu au niveau des triades.

I.B.3.c/ La triade

I.B.3.c.i/ Localisation et structure de la triade

Dans la cellule musculaire striée squelettique, les myofibrilles sont emballées individuellement par un réseau membranaire organisé composé de tubules de membrane plasmique et de réticulum sarcoplasmique. De part et d'autre de la strie Z, à la jonction entre la bande A et la bande I des sarcomères, un tubule de membrane plasmique est associé à deux citernes de réticulum sarcoplasmique. Cette structure composée de trois éléments porte le nom de triade ; elle joue un rôle majeur dans le couplage excitation-contraction (Figure 7).

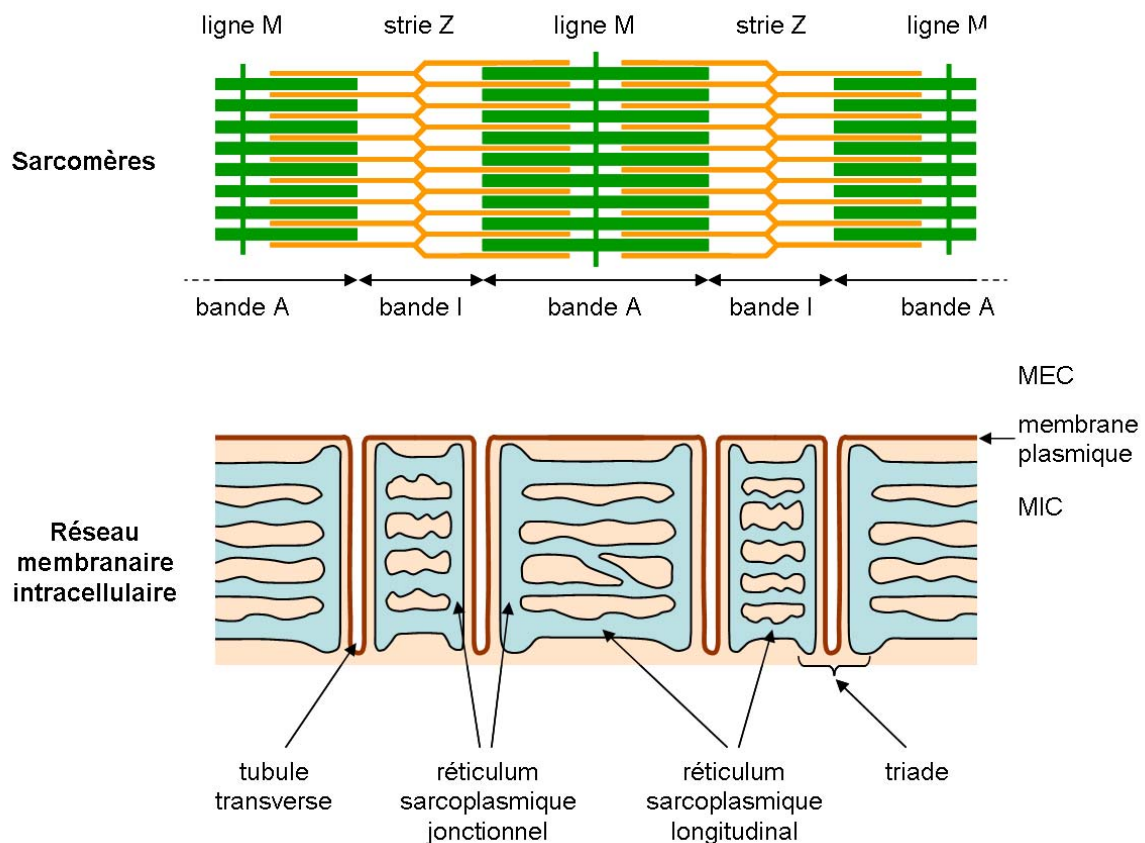


Figure 7 : Le réseau membranaire interne de la cellule du muscle strié squelettique.

Les myofibrilles sont emballées par du réticulum sarcoplasmique et des tubules T. Le réticulum sarcoplasmique est composé de deux types de domaines membranaires aux morphologies distinctes : le réticulum sarcoplasmique longitudinal et le réticulum sarcoplasmique jonctionnel. Le réticulum sarcoplasmique longitudinal est composé de tubules de réticulum localisés au centre des bandes A et I. Le réticulum sarcoplasmique jonctionnel est formé par la coalescence des tubules du réticulum sarcoplasmique longitudinal. Ces tubules fusionnent en une citerne terminale qui est accolée au tubule T à la jonction bande A – bande I. Chaque tubule T est associé à deux citernes terminales de réticulum sarcoplasmique formant ainsi une triade. Réalisé d’après (Rossi et al., 2008).

I.B.3.c.ii/ Tubule T et DHPR

Le sarcolemme forme des invaginations réparties régulièrement le long de la fibre musculaire. Ces invaginations, orientées transversalement à l'axe majoritaire de la cellule musculaire, sont appelées tubules T (tubules transverses). Ils entourent les myofibrilles à la jonction bande A-bande I. Les tubules T permettent l'acheminement de la dépolarisation membranaire de surface jusqu'aux sites du couplage excitation-contraction. L'analyse biochimique d'extraits protéiques de tubules T a mis en évidence la présence d'une grande quantité de DHPR (*dihydropyridine receptor*). DHPR est une molécule transmembranaire constituée de cinq sous-unités : α_1 , α_2 , β , γ et δ . La localisation des molécules de DHPR au sein de la membrane des tubules T est organisée : elles sont associées par groupe de quatre, formant ainsi des tétrades (Franzini-Armstrong and Jorgensen, 1994) (Figure 8). L'étude des souris dysgéniques, mutants naturels paralysés n'exprimant pas la sous-unité α_1 de DHPR, a permis de prouver que DHPR constitue le senseur du voltage intervenant dans le couplage excitation-contraction (Beam et al., 1986; Knudson et al., 1989; Tanabe et al., 1988). En effet, DHPR est un canal calcique voltage-dépendant de type L (ce qui signifie que son activation est longue). La sous-unité α_1 de DHPR occupe un rôle central dans le fonctionnement de DHPR puisqu'elle constitue la portion de la protéine formant le canal ionique.

Afin d'identifier les fonctions des autres sous-unités, des lignées de souris KO pour les sous-unités β_1 , $\alpha_2\delta_1$ et γ_1 ont été générées. Les souris et les poissons zèbres KO pour la sous-unité β_1 présentent, comme les souris dysgéniques, une perte du couplage excitation-contraction (Gregg et al., 1996; Schredelseker et al., 2005). Dans les deux espèces, l'absence de la sous-unité β_1 provoque des défauts du trafic de DHPR α_{1S} vers les tubules T. De plus, chez les poissons zèbres mutants, les sous-unités DHPR α_{1S} qui parviennent aux tubules T ne sont pas organisées en tétrades. Enfin, la perte des sous-unités $\alpha_2\delta_1$ ou γ_1 perturbe plus ou moins drastiquement les courants calciques passant par DHPR sans influencer sur sa localisation ou son organisation en tétrades (Gach et al., 2008; Melzer et al., 2006). Ces études ont donc permis d'établir les fonctions de chaque sous-unité : la sous-unité DHPR α_{1S} constitue le canal ionique, la sous-unité DHPR β_1 assure le ciblage et l'organisation de DHPR aux tubules T, DHPR $\alpha_2\delta_1$ et DHPR γ_1 régulent les courants ioniques traversant DHPR, peut-être en modifiant l'ouverture du canal.

NON LIBRE DE DROIT

Figure 8 : Organisation des molécules de RyR et DHPR au sein des triades.

(A) Triade observée en microscopie électronique à transmission. L'espace entre le tubule T et les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique est occupé par des structures denses aux électrons nommées « pieds » (flèches). (A') Schéma d'interprétation de la zone entourée par le cadre rouge en (A). Les « pieds » sont en fait constitués par le domaine cytoplasmique des molécules de RyR. RS, réticulum sarcoplasmique ; RyR en gris ; DHPR en violet. (B) Cryofracture réalisée au niveau de la membrane d'un tubule T. Les molécules de DHPR mises en évidence présentent une organisation en tétrade. (B') Modèle du couplage physique entre DHPR et RyR basé sur les études de cryofracture : les molécules de RyR (gris) sont alignées dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (gris) et les molécules de DHPR (violet) forment des tétrades qui s'associent avec des molécules de RyR régulièrement alternées. La vue est présentée depuis la lumière du tubule T (la membrane du tubule T n'est pas représentée). (C) Quatre molécules de DHPR (violet) sont associées à une molécule de RyR (gris). Vue de côté (à gauche) et vue depuis la lumière du tubule T (à droite). Les barres d'échelle représentent 250 nm en (A), 100 nm en (B), 10 nm en (B') et (C'). A, B, B', C tirés de, et A' réalisé d'après (Di Biase and Franzini-Armstrong, 2005; Franzini-Armstrong and Jorgensen, 1994; Serysheva, 2004).

I.B.3.c.iii/ Réticulum sarcoplasmique, RyR1, SERCA, calséquestrine, triadine, junctine

Le réticulum sarcoplasmique est une forme spécialisée du réticulum endoplasmique lisse dédiée au stockage et au relargage du calcium (Ca^{2+}) lors de la contraction musculaire. Le réticulum sarcoplasmique peut être divisé en deux domaines se distinguant par leur structure et leur fonction : le réticulum sarcoplasmique longitudinal et le réticulum sarcoplasmique jonctionnel (Figure 7).

Le réticulum sarcoplasmique longitudinal représente la majeure partie du réticulum sarcoplasmique. Il est constitué d'un ensemble de tubules interconnectés formant un réseau membranaire autour de chaque myofibrille au niveau des bandes A et I des sarcomères. La membrane du réticulum sarcoplasmique longitudinal est enrichie en SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*), une pompe à calcium dépendante de l'ATP qui permet la translocation du calcium cytosolique dans le réticulum. Le réticulum sarcoplasmique longitudinal est donc spécialisé dans le captage du calcium cytosolique permettant par la suite son stockage au sein de l'organite.

A la jonction entre la bande A et la bande I, les tubules du réticulum sarcoplasmique longitudinal fusionnent en un réservoir appelé citerne terminale. L'ensemble des citernes terminales constituent le réticulum sarcoplasmique jonctionnel. Ce domaine du réticulum sarcoplasmique est qualifié de jonctionnel car il est apposé à un autre système membranaire : les tubules-T du sarcolemme. L'espace entre le tubule-T et la membrane du réticulum sarcoplasmique jonctionnel est maintenu constant (de 10 à 15 nm) par des structures appelées « pieds ». Leur observation en microscopie électronique montre que chaque « pied » jonctionnel est constitué de quatre grosses sous-unités qui entourent une zone centrale moins dense. Les « pieds » adjacents sont juxtaposés les uns aux autres en un réseau organisé (Franzini-Armstrong and Jorgensen, 1994) (Figure 8). L'étude des souris dyspédiques, qui présentent une absence de « pieds » jonctionnels, a révélé que ces « pieds » sont des récepteurs de la ryanodine (RyR1, *ryanodine receptor 1*) (Buck et al., 1997). Ceux-ci sont enchâssés dans la membrane du réticulum sarcoplasmique jonctionnel, traversent l'espace qui sépare le réticulum sarcoplasmique du tubule-T et se combinent aux DHPR du tubule-T (Marty et al., 1994). Chaque molécule de récepteur de la ryanodine est liée à quatre récepteurs de la dihydropyridine (une sous-unité de RyR1 est associée à une molécule de DHPR) provoquant ainsi leur organisation en tétrade (Protasi et al., 1998). L'association entre DHPR et RyR1 est

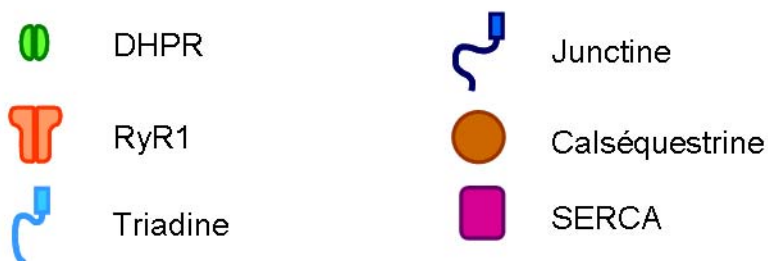
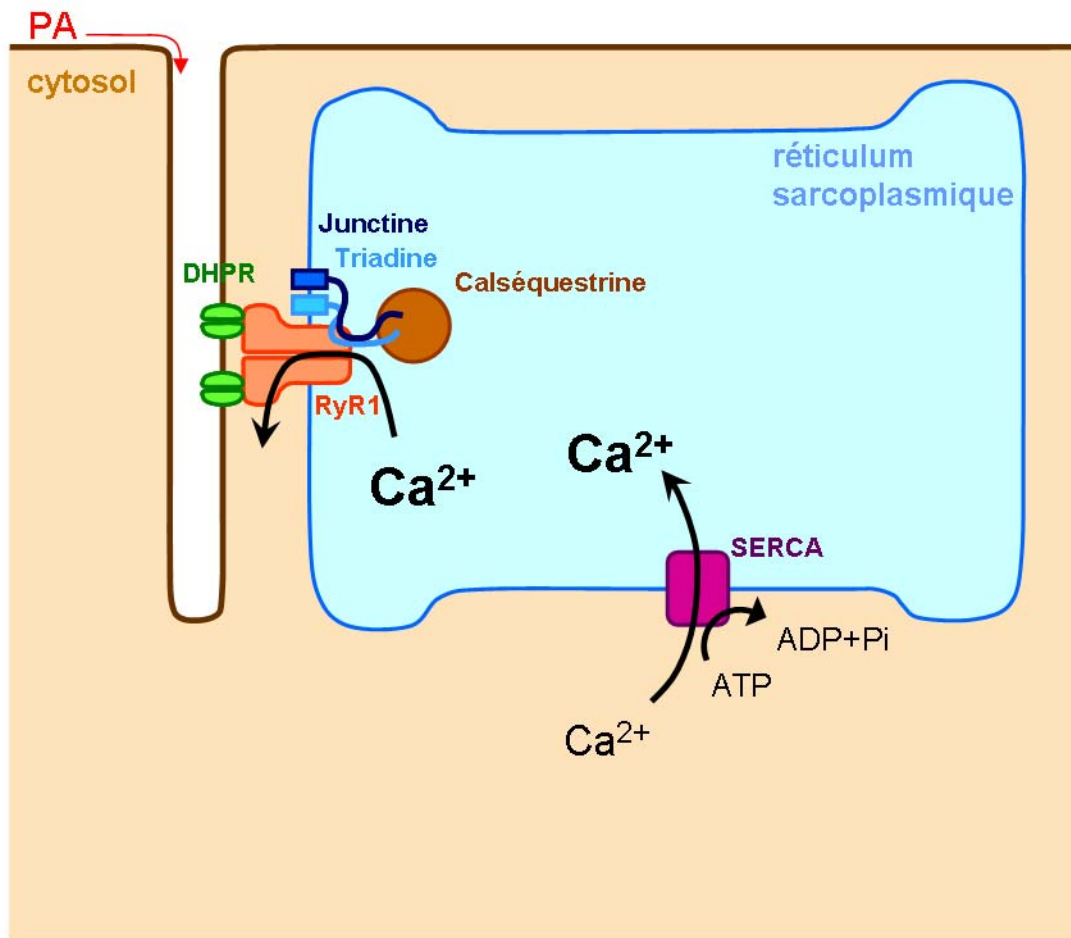


Figure 9 : Organisation et fonctionnement de la triade.

La propagation de potentiels d'action le long du tubule T provoque une modification de la conformation des canaux DHPR du sarcolemme. Ce changement de conformation induit l'ouverture des canaux RyR situés dans la membrane du réticulum sarcoplasmique et donc le relargage de calcium dans le cytosol. Une forte concentration en calcium est maintenue dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique grâce à la présence de la protéine de stockage du calcium, la calséquestrine, qui est maintenue en place par la triadine et la junctine. La hausse de concentration en calcium dans le cytosol déclenche le mécanisme de contraction des sarcomères. A la fin de la période d'excitation, le calcium est réabsorbé par le réticulum sarcoplasmique grâce à la protéine SERCA qui est une pompe à calcium dépendante de l'ATP.

telle que l'ouverture du premier induit un changement de conformation du second et donc son ouverture, permettant le relargage du calcium du réticulum sarcoplasmique. Ce relargage est d'autant plus efficace que la lumière des citernes terminales est riche en calséquestrine, une protéine qui lie le calcium et augmente donc la quantité de calcium relargable à proximité du récepteur à la ryanodine. La calséquestrine est maintenue dans les citernes terminales parce qu'elle interagit avec la triadine et la junctine. Ces dernières sont deux protéines transmembranaires du réticulum sarcoplasmique jonctionnel dont la portion lumenale lie d'une part la portion lumenale de RyR1 et d'autre part la calsequestrine (Zhang et al., 1997) (Figure 9).

L'intrication des tubules-T et du réticulum sarcoplasmique au niveau des triades permet une parfaite coopération entre ces deux compartiments. Cette coopération assure de manière quasi simultanée la traduction d'un potentiel d'action se propageant à la surface de la membrane plasmique en un relargage de calcium par le réticulum sarcoplasmique à l'origine de la contraction : c'est le couplage excitation-contraction.

I.C/ Implication des éléments du cytosquelette et des structures membranaires dans la contraction des sarcomères et son déclenchement

I.C.1/ Le mécanisme de contraction

La contraction est déclenchée par une élévation de la concentration en calcium cytosolique. Les ions calcium se fixent alors sur la sous-unité C du complexe de la troponine ce qui induit un changement de conformation qui provoque un déplacement de la tropomyosine sur le filament d'actine. Les sites de liaison à la myosine sur l'actine sont alors démasqués permettant la fixation des têtes de myosine sur les filaments fins d'actine. A ce stade, le site catalytique des têtes de myosine est lié à une molécule d'ADP (adénosine diphosphate) et une molécule de phosphate inorganique. La fixation de la tête de myosine sur l'actine par des liaisons fortes provoque le relargage du phosphate inorganique du site actif. La tête de myosine pivote alors sur son axe provoquant un déplacement du filament fin par rapport au filament épais de ~10 nm en direction de la ligne M. L'ADP se dissocie alors du

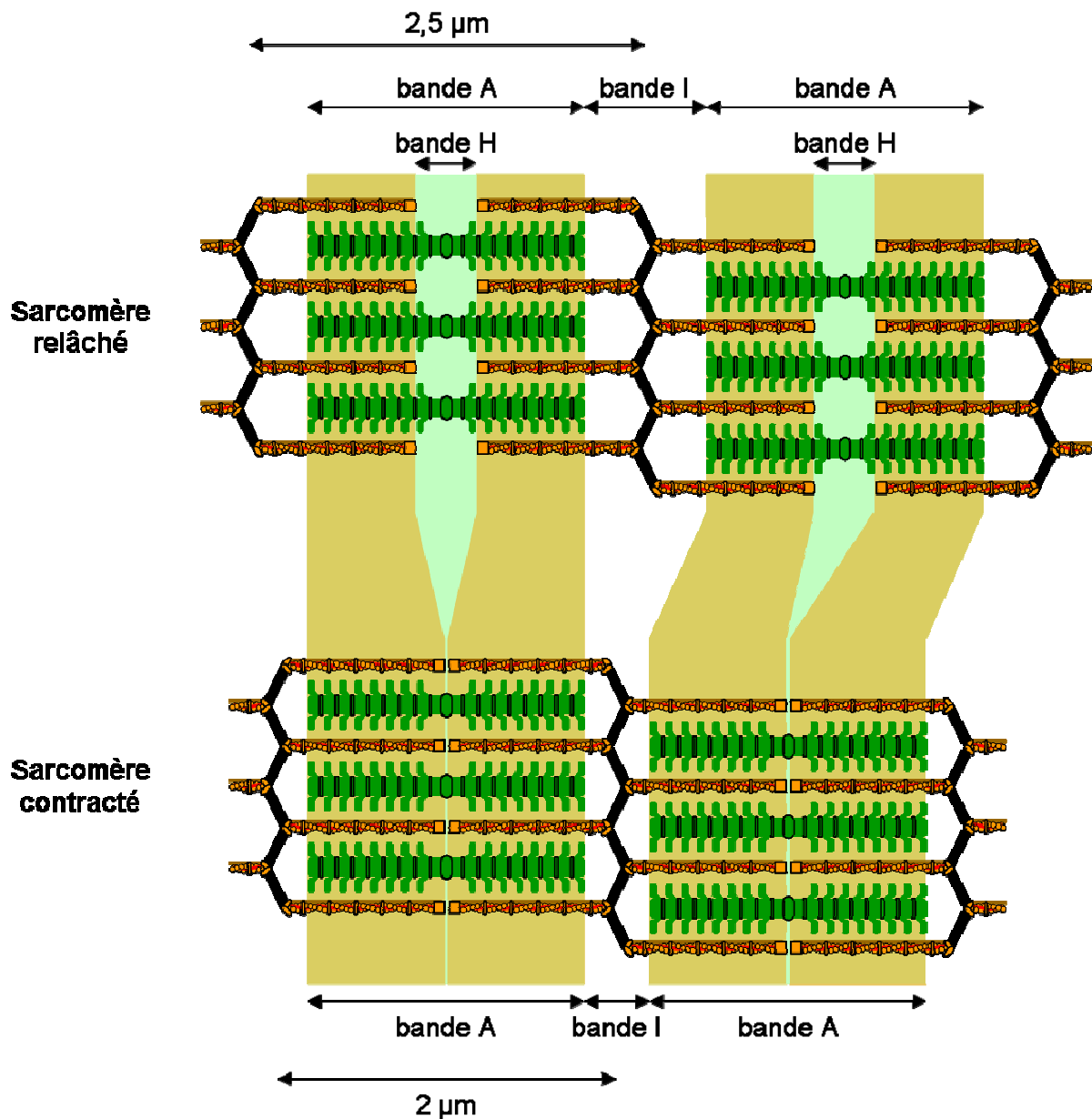


Figure 10 : Contraction des sarcomères.

Les deux stries Z d'un sarcomère relâché sont distantes de $\sim 2,5 \mu\text{m}$. Cette valeur n'est plus que de $\sim 2 \mu\text{m}$ dans un sarcomère contracté. La contraction des sarcomères se traduit par une disparition des bandes H et un rétrécissement des bandes I, tandis que la taille des bandes A reste constante. Ces modifications de l'aspect des sarcomères sont dues à un glissement des filaments fins d'actine sur les filaments épais de myosine en direction de la ligne M.

site actif où il est remplacé par une molécule d'ATP dont l'hydrolyse aboutit au retour de la tête de myosine à son état initial. Le cycle peut alors recommencer tant que le calcium est présent et tant que de l'ATP est disponible. Ceci provoque la contraction des sarcomères qui passent d'une longueur de $\sim 2,5 \mu\text{m}$ à une longueur de $\sim 2 \mu\text{m}$ (Figure 10). Ce raccourcissement des sarcomères entraîne un raccourcissement des myofibrilles et donc de la cellule. La position relative des cellules est maintenue pendant la contraction grâce aux costamères. Cette contraction est transmise aux tendons via les jonctions myotendineuses. La traction exercée sur les tendons permet alors la mise en mouvement des os autour d'une articulation (Vale and Milligan, 2000).

I.C.2/ Le déclenchement de la contraction

La contraction des sarcomères est déclenchée par une élévation de la concentration cytosolique de calcium. Cet événement est l'étape finale d'une succession d'événements initiée par le relargage d'acétylcholine par le motoneurone innervant la fibre musculaire.

Le motoneurone activé libère de grandes quantités d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire. Ce neurotransmetteur se fixe alors sur les récepteurs à acétylcholine présents sur le sarcolemme post-synaptique ce qui déclenche leur ouverture et l'entrée de sodium dans le cytosol. Ce flux entrant d'ions sodium provoque une dépolarisation de la membrane qui active des canaux sodiques voltage-dépendants dont l'ouverture génère des potentiels d'action. Ces potentiels d'action se propagent le long du sarcolemme et « pénètrent au cœur de la fibre » par l'intermédiaire des tubules-T. Dans la membrane des tubules-T, l'arrivée des potentiels d'action provoque une modification de la conformation des molécules de DHPR. Les molécules de DHPR des tubules-T sont étroitement associées aux molécules de RyR1 du réticulum sarcoplasmique au niveau des triades. Ainsi le changement de conformation des molécules de DHPR provoque un changement de conformation des molécules de RyR1 qui s'ouvrent et permettent alors le relargage dans le cytosol des ions calcium stockés dans le réticulum sarcoplasmique. Ces ions calcium se fixent alors sur la sous-unité C du complexe troponine ce qui constitue l'évènement déclencheur de la contraction des sarcomères (voir I.B.1.a et I.B.3.c).

La première partie a permis de montrer que les structures impliquant le cytosquelette d'actine et les structures membranaires de la fibre musculaire sont indispensables à la contraction du muscle. Les parties suivantes sont consacrées à l'étude des remodelages du cytosquelette d'actine et de la membrane qui participent à la mise en place et au maintien de ces structures au cours de la myogenèse et dans le muscle mature.

II/ Remodelage de la membrane et du cytosquelette d'actine au cours de la myogenèse embryonnaire

II.A/ Les principales étapes de la myogenèse

Chez les mammifères, les muscles squelettiques se forment dans l'embryon à partir de cellules précurseurs mésodermiques présentes dans les somites. Les somites sont des segments de mésoderme (un des trois feuilletts embryonnaires issus de la gastrulation) qui se forment par paires de part et d'autre du tube neural et de la notochorde pendant l'embryogenèse. Les somites sont divisés en une région ventrale, le sclérotome, qui sera à l'origine des os et du cartilage, et une région dorsale, le dermomyotome qui sera à l'origine du derme et de la musculature (Figure 11). Le dermomyotome est lui-même subdivisé en une zone épaxiale, proche du tube neural, et une zone hypaxiale, éloignée du tube neural. Une partie des cellules de la zone épaxiale se regroupent dans une masse musculaire sous le dermomyotome. Cette masse constitue le myotome et formera les muscles profonds du dos et les muscles du tronc. Dans le même temps, des cellules progénitrices quittent le dermomyotome hypaxial pour rejoindre les bourgeons de membres dont elles formeront les muscles.

Les cellules du dermomyotome reçoivent des signaux du tube neural, de la notochorde et de l'ectoderme dorsal qui provoquent leur transformation en précurseurs myogéniques aptes à quitter les somites et à coloniser le corps pour former les futurs muscles squelettiques. La **migration** est déclenchée et dirigée par un signal extracellulaire, le HGF (*hepatocyte growth factor*), émis par des cellules mésodermiques non somitiques. Ce signal est perçu par les précurseurs myogéniques via leur récepteur à tyrosine kinase, c-met, présent à leur membrane. Après avoir migré jusqu'à leur destination, les précurseurs myogéniques sont déterminés en myoblastes. Les myoblastes sortent ensuite du cycle cellulaire et se différencient en myocytes. L'ensemble de ces étapes est réalisé par l'expression et l'activation successives des facteurs de transcription spécifiques de la lignée myogénique tels que Pax3, Pax7, Myf5, MyoD, Mrf4, myogénine. Les myocytes peuvent ensuite **fusionner** en myotubes. Chez les mammifères, le développement des myotubes est divisé en deux étapes : la myogenèse primaire (jusqu'au jour embryonnaire 14,5 chez la souris), au cours de laquelle se forment des fibres embryonnaires

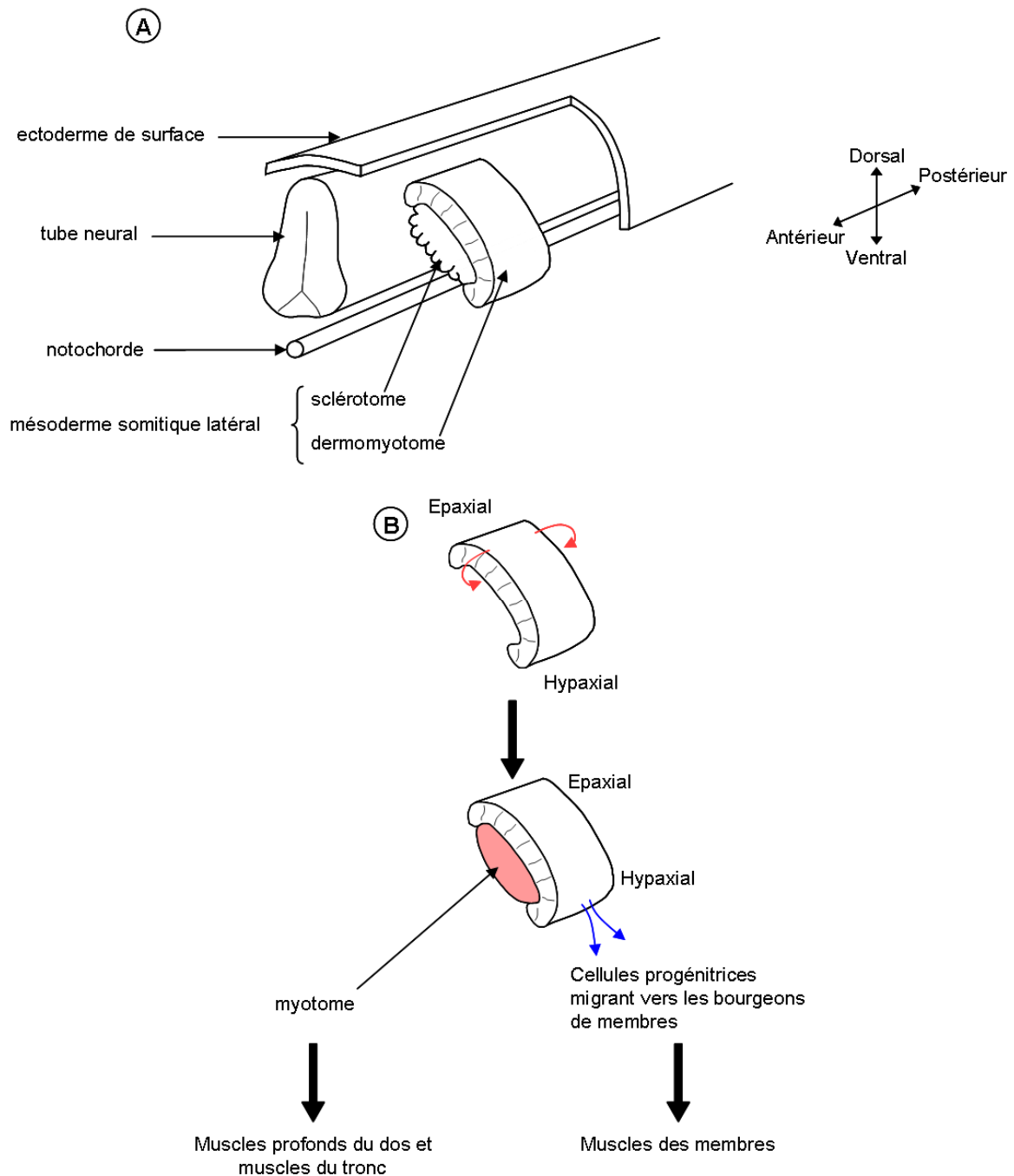


Figure 11 : Myogenèse embryonnaire : formation et devenir des précurseurs myogéniques.

(A) Avant le début de la myogenèse (vers E8.0 chez la souris), les somites sont réparties le long du tube neural et sont divisées en une région ventrale, le sclérotome, et une région dorsale, le dermomyotome. **(B)** Evolution des composants musculaires du dermomyotome (le sclérotome n'est plus représenté). Lorsque la myogenèse est initiée, les cellules du dermomyotome épaxial migrent sous le dermomyotome où elles forment le myotome. Le myotome sera à l'origine des muscles profonds du dos et des muscles du tronc. Parallèlement les cellules du dermomyotome hypaxial quittent le dermomyotome et migrent vers les bourgeons des membres. Ces cellules formeront les muscles des membres. Réalisé d'après (Buckingham et al., 2003; Grefte et al., 2007).

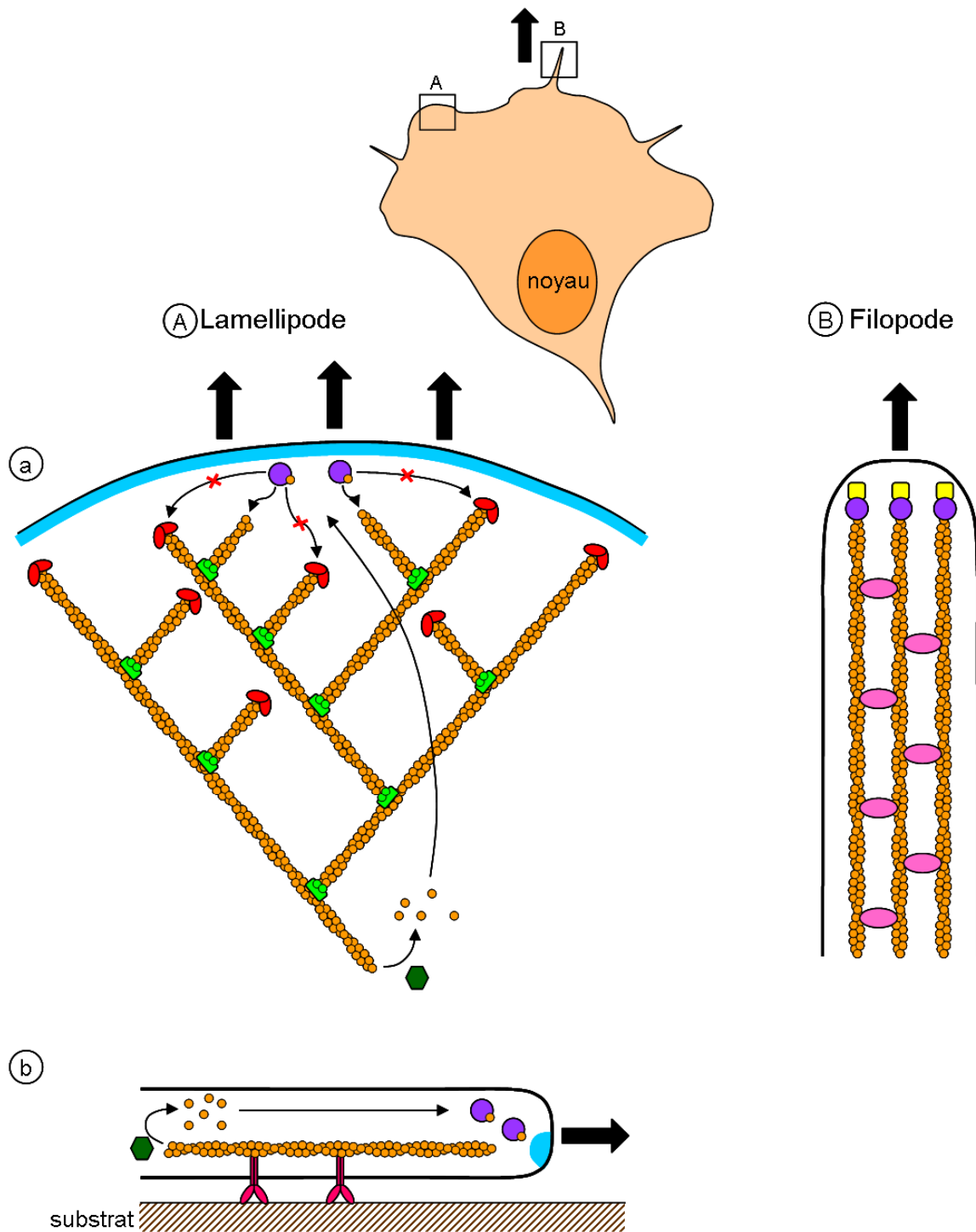
primaires, et la myogenèse secondaire (jusqu'à la naissance) au cours de laquelle se forment des fibres supplémentaires, les fibres fœtales secondaires. Chacune de ces étapes peut elle-même être divisée en deux phases : la première phase consiste en la formation de myotubes naissants par fusion de quelques myoblastes, tandis qu'au cours de la deuxième phase, des fusions additionnelles de myoblastes provoquent une augmentation de la taille des myotubes qui commencent à exprimer les protéines contractiles. L'ensemble de ces protéines contractiles s'associent alors et s'organisent en une succession de sarcomères formant les myofibrilles : c'est la **myofibrillogenèse**. Parallèlement à la myofibrillogenèse, les structures membranaires des cellules musculaires se développent et se différencient, et des motoneurones établissent des contacts avec le muscle : c'est la **biogenèse des triades** et la **mise en place de la jonction neuromusculaire**. Le muscle est alors fonctionnel (Buckingham et al., 2003).

II.B/ La migration des précurseurs myogéniques jusqu'au site du futur muscle

Les précurseurs musculaires sont produits dans les somites ; or, des muscles squelettiques sont présents dans tout le corps (tronc, cou, tête, membres...), parfois dans des sites éloignés des somites. La migration des précurseurs myogéniques est donc une étape indispensable à leur dispersion dans le corps.

II.B.1/ Le cytosquelette d'actine et la migration des myoblastes *in vitro*

Le cytosquelette d'actine joue un rôle majeur dans la migration des myoblastes. En effet, le traitement de myoblastes avec de la latrunculine A ou de la cytochalasine D, deux inhibiteurs du remodelage de l'actine se liant respectivement aux monomères d'actine et aux filaments d'actine, empêche leur migration (Constantin et al., 1995; Sanger and Holtzer, 1972).















- | | | | |
|---|-------------------|---|---------------------------------|
|  | filament d'actine |  | membrane plasmique |
|  | monomère d'actine |  | zone riche en NPF (N-WASP/WAVE) |
|  | complexe Arp2/3 |  | complexe focal d'adhérence |
|  | CP |  | Dia2 |
|  | ADF/cofiline |  | fascin, IRSp53 |
|  | profiline |  | sens du mouvement |

Figure 12 : Les protrusions membranaires impliquées dans la migration.

Une cellule en migration présente deux types de protrusions membranaires : des lamellipodes (**A**) et des filopodes (**B**). (**A**) Un lamellipode est soutenu par un réseau d'actine branché obtenu par l'action simultanée du complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 activé par WAVE et des protéines de coiffe CP (a). La force protrusive est maintenue par l'ancrage régulier du cytosquelette d'actine au substrat (b) et par le recyclage des monomères d'actine de l'arrière vers l'avant du réseau d'actine grâce à l'action conjuguée de facteurs de dépolymérisation (ADF/cofiline) et de recrutement (profiline) : c'est le modèle du tapis roulant. Les protéines CP présentes à l'avant du lamellipode coiffent les filaments d'actine les plus anciens et favorisent ainsi la polymérisation des derniers filaments d'actine mis en place : c'est le modèle de l'entonnoir. (**B**) Un filopode est soutenu par un réseau de filaments d'actine organisés en faisceau par la fascine et IRSp53. La polymérisation des filaments d'actine est réalisée par le facteur de nucléation de l'actine Dia2 fourni en monomères d'actine par la profiline. Réalisé d'après (Le Clainche and Carlier, 2008).

II.B.1.a/ Les structures mises en place par le cytosquelette d'actine permettant la migration *in vitro*

L'étude des structures cellulaires impliquées dans le déplacement des cellules a mis en évidence l'importance des lamellipodes et des filopodes. Ces deux structures correspondent à des déformations de la membrane plasmique provoquées par un remodelage du cytosquelette d'actine sous-jacent. Les lamellipodes sont de larges protrusions membranaires aplaties qui contiennent un réseau de filaments d'actine branchés. Ils sont trouvés à l'avant des cellules en migration (Figure 12). Les filopodes, quant à eux, sont des protrusions membranaires en forme de doigts qui contiennent des faisceaux de filaments d'actine parallèles (Figure 12).

II.B.1.b/ Les régulateurs du cytosquelette d'actine impliqués dans la migration *in vitro*

II.B.1.b.i/ Les Rho GTPases, déclencheurs de la polymérisation de l'actine

–Cas des lamellipodes

Les Rho GTPases (*guanosine triphosphatases*) Rac1 et Cdc42 sont activées à l'avant des cellules en migration et leur inhibition réduit la taille des lamellipodes (Kurokawa et al., 2004; Nobes and Hall, 1995). Rac1 et Cdc42 appartiennent à la famille des Rho GTPases. Les Rho GTPases sont des « interrupteurs » moléculaires qui contrôlent une grande variété de voies de signalisation en lien avec la régulation du cytosquelette d'actine, la polarité cellulaire, la dynamique des microtubules, le transport de membrane et l'activité de facteurs de transcription. Les Rho GTPases oscillent entre un état inactif, lié au guanosine diphosphate (GDP), et un état actif, lié au guanosine triphosphate (GTP) (Hall, 2005) (Figure 13).

L'effet des Rho GTPases sur le cytosquelette d'actine s'explique par le fait qu'elles sont capables d'activer deux types de molécules qui stimulent la polymérisation de l'actine : les protéines WASP/WAVE et les DRFs. Les protéines WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome proteins*) et WAVE (*WASP family Verprolin-homologous proteins*) sont des facteurs favorisant la nucléation de l'actine (NPF, *nucleation promoting factor*). Elles induisent la polymérisation de l'actine en liant et en activant le complexe Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*) (Figure 14) qui se fixe sur le côté des filaments d'actine existant et provoque la polymérisation d'un nouveau filament d'actine générant ainsi un réseau d'actine branché (Rouiller et al., 2008). Cdc42 interagit directement avec WASP et N-WASP (*Neural-WASP*, qui est ubiquitaire alors que WASP est spécifique des cellules hématopoïétiques) et stimule leur fonction activatrice du complexe

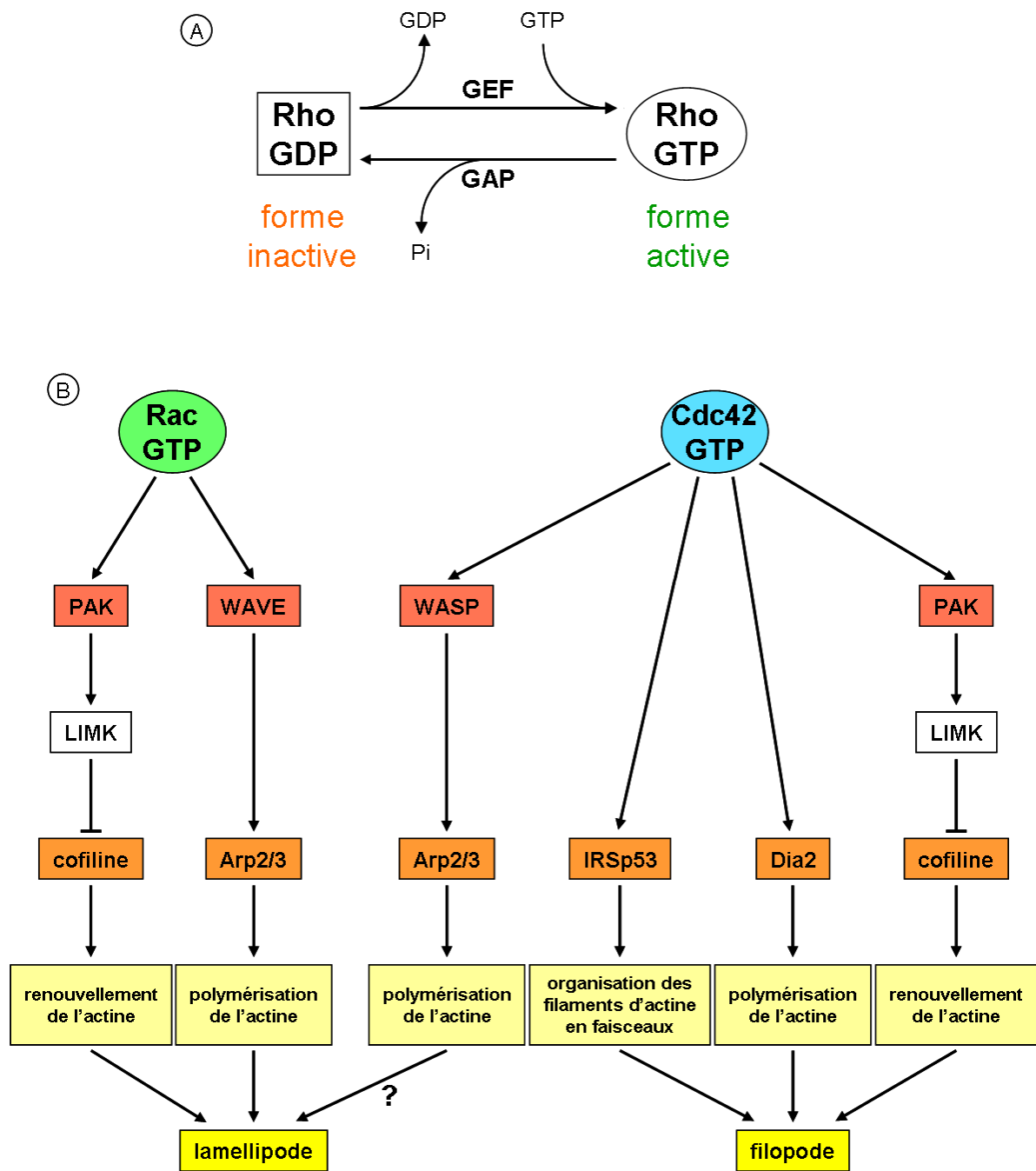


Figure 13 : La formation des protrusions membranaires par les GTPases Rho.

(A) Les GTPases Rho existent sous deux formes : une forme active liée au GTP et une forme passive liée au GDP. La transition d'une forme à l'autre est facilitée par des GEF et des GAP.

(B) Voies de signalisation initiées par les GTPases Rac et Cdc42, déclenchant les remodelages du cytosquelette d'actine aboutissant à la formation de lamellipodes ou de filopodes. Réalisé d'après (Heasman and Ridley, 2008; Ridley, 2006).

NON LIBRE DE DROIT

Figure 14 : Structure du complexe de nucléation de l'actine Arp2/3.

Les sept sous-unités du complexe Arp2/3 sont représentées : Arp2 (*actin-related protein 2*), Arp3 (*actin-related protein 3*), ARPC1 (*actin-related protein 2/3 complex subunit 1*), ARPC2, ARPC3, ARPC4, ARPC5. Le complexe Arp2/3 est représenté en place : il est fixé sur le côté d'un filament mère d'actine (*mother filament*) et à la base d'un filament fille d'actine (*daughter filament*). L'extrémité barbue de chaque filament est indiquée ((+) *barbed end*) et le sens d'élongation des filaments est représenté par une flèche. Les sous-domaines 1 à 4 du monomère d'actine (*Actin*) et de Arp2, ainsi que les sous-domaines 2 et 4 de Arp3 sont numérotés. Dans sa forme activée, Arp2 se rapproche d'Arp3 et les deux sous-unités adoptent une conformation semblable à un dimère d'actine G au sein d'un filament d'actine. Arp2 et Arp3 servent ainsi d'éléments de base pour la polymérisation du filament fille. Tiré de (Boczkowska et al., 2008).

Arp2/3. Rac1, quant à elle, active indirectement WAVE en liant une des protéines du complexe multi-protéique dont WAVE fait partie. Outre les protéines WASP et WAVE, les Rho GTPases activent également les DRFs (*Diaphanous-related formins*). Il existe trois DRFs, Dia1, Dia2 et Dia3, qui stimulent la nucléation et l'extension de filaments d'actine non banchés, c'est-à-dire parallèles. Elles se lient à l'extrémité barbue des filaments d'actine et empêchent la fixation des protéines de coiffe (*capping proteins*) qui sont normalement responsables de l'arrêt de la polymérisation. Cdc42 active Dia2 et Dia3, tandis que Rac1 n'active aucune DRF (Ridley, 2006).

L'injection de formes mutantes constitutivement activées de Rac1 et Cdc42 *in vitro* induit la formation de lamellipodes et de filopodes, respectivement (Nobes and Hall, 1995). Ceci suggère que Rac1 est la Rho GTPase spécifique des lamellipodes. Cependant, dans les lamellipodes, sont présentes non seulement les protéines WAVE activées par Rac1, mais aussi les protéines WASP activées par Cdc42. La nécessité de WAVE dans la formation des lamellipodes a été clairement démontrée (Miki et al., 1998), en revanche l'implication de WASP est plus controversée puisque des fibroblastes issus de souris KO pour N-WASP et des cellules HeLa dépourvues de WASP et N-WASP forment toujours des lamellipodes (Innocenti et al., 2005; Snapper et al., 2001). Ces résultats montrent que Rac1 et WAVE sont nécessaires et suffisants à la formation des lamellipodes, alors que Cdc42 et WASP ne sont pas indispensables (Figure 13). Etant donné le rôle de N-WASP dans l'exocytose (Symons and Rusk, 2003), il a été suggéré qu'il pourrait participer indirectement au fonctionnement des lamellipodes en stimulant l'ajout de protéines et de membrane nécessaires à l'extension membranaire à l'avant de la cellule.

–Cas des filopodes

L'injection d'une forme mutante de Cdc42 constitutivement activée induit la formation de filopodes *in vitro* (Nobes and Hall, 1995). Mais des fibroblastes *Cdc42^{-/-}* sont toujours capables de former des filopodes ce qui montre que Cdc42 est suffisant mais pas nécessaire à la mise en place des filopodes (Czuchra et al., 2005). Ceci peut s'expliquer par le fait que d'autres GTPases telles que Rho/Rif peuvent compenser l'absence de Cdc42 (Pellegrin and Mellor, 2005). Quoi qu'il en soit, si Cdc42 a un rôle dans la formation des filopodes, ce n'est pas *via* l'activation de N-WASP et Arp2/3 et ceci pour trois raisons : (1) les fibroblastes KO pour N-WASP étendent des filopodes en réponse à Cdc42 (Lommel et al., 2001), (2) Arp2/3

n'est pas présent dans les filopodes et son inhibition n'empêche par leur formation (Steffen et al., 2006; Svitkina et al., 2003), (3) l'organisation parallèle des filaments d'actine dans les filopodes n'est pas compatible avec le réseau d'actine branché formé par Arp2/3. Cependant, une autre protéine capable d'induire la polymérisation de l'actine a été trouvée dans les filopodes : il s'agit de la DRF Dia2 (Pellegrin and Mellor, 2005). L'expression d'une forme constitutivement active de Dia2 provoque la formation de filopodes, tandis que son inhibition bloque la réorganisation du cytosquelette d'actine et la formation des filopodes en réponse à Cdc42. Dia2 est donc le facteur de nucléation de l'actine nécessaire et suffisant à la mise en place des filopodes (Figures 12 et 13). Dia 2 est activée par Cdc42 mais aussi par Rif/Rho ce qui confirme la possibilité de compensation de l'absence de Cdc42 par Rif/Rho dans les fibroblastes *Cdc42^{-/-}*.

II.B.1.b.ii/ Autres facteurs de régulation de l'actine impliqués dans l'extension des lamellipodes et filopodes

L'extension des lamellipodes et des filopodes requiert l'activité de polymérisation du complexe Arp2/3 et de Dia2, respectivement. Or la polymérisation d'actine par Arp2/3 et Dia2 nécessite la présence d'une concentration suffisante de monomères d'actine G.

–Cas des lamellipodes

Dans les lamellipodes, l'action coordonnée de trois facteurs favorise la présence d'actine G à l'avant de la cellule. Ces facteurs sont ADF (*actin-depolymerizing factor*), la profiline et les protéines de coiffe.

ADF/cofiline

ADF, également appelé cofiline, est retrouvé dans la totalité du lamellipode à l'exception de son extrémité (Svitkina and Borisy, 1999). *In vitro*, ADF augmente la vitesse de dépolymérisation de l'extrémité pointue des filaments d'actine ce qui accroît la concentration en actine G disponible. En accord avec ses fonctions biochimiques, l'inhibition d'ADF par RNAi (*ribonucleic acid interference*) dans des cellules S2 de drosophile augmente la taille des lamellipodes et ralentit la progression du réseau d'actine au sein des lamellipodes

(Iwasa and Mullins, 2007). La dépolymérisation par ADF de l'extrémité pointue des filaments d'actine situés à l'arrière des lamellipodes permet le recyclage de monomères d'actine vers l'avant du lamellipode. Cependant cette dépolymérisation des éléments du réseau d'actine soutenant le lamellipode n'entraîne pas sa rétractation puisque des complexes focaux d'adhérence se forment régulièrement sous le cytosquelette d'actine du lamellipode en extension (Figure 12) (Le Clainche and Carlier, 2008). Ceci permet d'ancrer le lamellipode au substrat et de maintenir la force protrusive du cytosquelette malgré la dépolymérisation de ses constituants les plus postérieurs.

L'activité d'ADF est régulée par sa phosphorylation. La kinase LIM (LIMK, LIM kinase) phosphoryle ADF et l'inactive. LIMK est elle-même activée par Rac1 et Cdc42 via la kinase PAK (*p21-activated kinase*) (Figure 13) (Edwards et al., 1999). Ceci explique pourquoi l'extrémité antérieure des lamellipodes, où sont présentes Rac1 et Cdc42, est dépourvue d'ADF active.

Profiline

La profiline est une protéine qui lie les monomères d'actine. Le complexe profiline-actine se forme exclusivement à l'extrémité barbue des filaments d'actine, si bien que la profiline permet de recruter les monomères d'actine G de manière polarisée (Yarmola and Bubb, 2006). L'action combinée d'ADF et de la profiline permet d'une part, la libération de monomères d'actine G par dépolymérisation dans la région postérieure du lamellipode et d'autre part, le recyclage de ces monomères d'actine G à l'avant du lamellipode pour la polymérisation des nouveaux filaments : c'est le modèle du tapis-roulant (Figure 12).

Protéines de coiffe

Le coiffage des extrémités barbues des filaments d'actine est également requis pour la formation des lamellipodes. En effet, l'inhibition des CP (*capping proteins*) par siRNA (*small interfering ribonucleic acid*) abolit la formation de lamellipodes (Iwasa and Mullins, 2007). Les protéines CP se lient aux filaments d'actine à proximité de la membrane et se dissocient du réseau d'actine peu de temps après et à une faible distance de la membrane. La fixation des protéines CP pourrait jouer deux rôles. Tout d'abord la fixation de CP à l'extrémité de certains

filaments d'actine permettrait de réserver les monomères d'actine G pour les nouveaux filaments d'actine qui se forment juste sous la membrane (Nicholson-Dykstra et al., 2005). C'est le modèle de l'entonnoir (Figure 12). De plus, l'activité de coiffe de CP permettrait de conserver des filaments d'actine courts et ainsi d'augmenter le branchement de filaments ce qui renforcerait le réseau de cytosquelette d'actine. Cette hypothèse est étayée par le fait que dans les mélanomes de souris, l'inhibition de la formation des lamellipodes par des siRNA dirigés contre CP est associée à une augmentation de la formation des filopodes. La perte de CP fragiliserait donc le réseau de filaments d'actine branchés au profit d'un réseau de filaments d'actine parallèles (Mejillano et al., 2004).

–Cas des filopodes

Profiline

La profiline est également présente à l'extrémité des filopodes et elle y joue le même rôle que dans les lamellipodes.

IRSp53

IRSp53 (*insulin receptor tyrosine kinase substrate p53*) jouerait un rôle clé dans l'organisation du cytosquelette d'actine au sein des filopodes. En effet, IRSp53 provoque l'assemblage des filaments d'actine en faisceaux parallèles *in vitro* et l'inhibition de son expression par siRNA abolit la formation des filopodes induite par Cdc42 (Disanza et al., 2006). La capacité d'IRSp53 à organiser les filaments d'actine en faisceaux parallèles est donc nécessaire à la mise en place des filopodes par Cdc42 (Figures 12 et 13).

Les études *in vitro* ont permis de disséquer les facteurs et mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des protrusions membranaires nécessaires à la migration des cellules. Cependant, les études menées *in vivo* sur la migration des précurseurs myogéniques ont fourni des résultats qui ne sont pas complètement en accord avec les données *in vitro*.

II.B.2/ Les GTPases et la migration des précurseurs myogéniques *in vivo*

Etant donné le rôle central joué par les GTPases Rac et Cdc42, et par leurs cibles WAVE et N-WASP dans la migration cellulaire *in vitro*, leur rôle dans la migration des précurseurs myogéniques a été examiné *in vivo* chez la souris par l'intermédiaire de KO conditionnels pour Rac1 et Cdc42. En effet, les KO constitutifs sont létaux avant E9,5 et E7,5, respectivement, c'est à dire avant la migration des précurseurs myogéniques (Chen et al., 2000; Sugihara et al., 1998). Dans les KO conditionnels, les allèles de Rac1 et Cdc42 sont flanqués par des séquences flox, et l'expression de la recombinase Cre est sous le contrôle des éléments régulateurs Lbx1 qui sont activés lors de la migration des précurseurs myogéniques. Ainsi la recombinaison est déclenchée dans les précurseurs myogéniques en cours de migration. Etonnamment, à E11,5, le nombre et la position des précurseurs myogéniques dans les bourgeons de membres des deux types de souris KO sont identiques à ceux observés dans les souris sauvages. Les activités de Rac1 et de Cdc42 ne semblent donc pas nécessaires à la migration des précurseurs myogéniques *in vivo* (Vasyutina et al., 2009). Ceci peut s'expliquer par le fait que les autres GTPases compensent l'absence de la GTPase manquante. Par exemple, les GTPases Rif/RhoF, RhoD, et Wrch1 induisent la formation de filopodes et peuvent donc se substituer à Cdc42 dans les cellules *Cdc42*^{-/-} qui sont ainsi toujours capables de former des filopodes (Aspenstrom et al., 2004; Czuchra et al., 2005; Ellis and Mellor, 2000; Pellegrin and Mellor, 2005). Etant donné le nombre important des membres de la famille des Rho GTPases, il apparaît difficile de tester leur implication dans la migration des précurseurs myogéniques, à moins de réaliser des doubles, triples voire quadruples KO conditionnels.

II.C/ La fusion des myoblastes en myotubes

L'une des étapes clés pour l'obtention de myofibres syncytiales est la fusion des myoblastes mononuclés, soit entre eux soit avec des myotubes naissants, pour former des myotubes multinuclés (voir II.A). La fusion, qui débute à E11 chez la souris, est une succession organisée d'évènements pouvant être divisée en quatre phases : (1) la migration des myoblastes à la recherche d'un partenaire de fusion, (2) la reconnaissance et l'adhérence des membranes des deux partenaires, (3) la réorganisation du cytosquelette assurant des modifications morphologiques et structurales des cellules, (4) la fusion des deux membranes plasmiques (Figure 15).

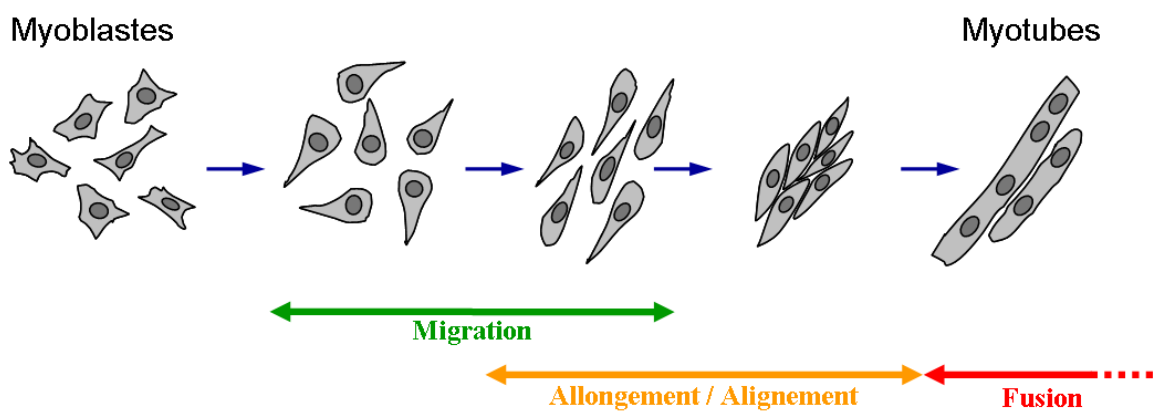


Figure 15 : Les étapes de la fusion étudiables *in vitro*.

La différenciation des myoblastes *in vitro* récapitule les modifications morphologiques qui accompagnent le processus de fusion : les myoblastes migrent à la recherche de leur partenaire de fusion, puis ils s'allongent, s'alignent et s'accolent les uns aux autres pour finalement fusionner en des myotubes plurinucléés.

II.C.1/ La migration des myoblastes à la recherche d'un partenaire de fusion

Afin que les myoblastes puissent fusionner, il ne suffit pas qu'ils se trouvent dans la même région du corps (par exemple au niveau des bourgeons de membres), il faut qu'ils soient suffisamment proches pour pouvoir entrer en contact. Une nouvelle phase de migration permettant le rapprochement des myoblastes est donc nécessaire. L'importance de cette phase est démontrée par le fait qu'une inhibition de la migration des myoblastes en cours de différenciation conduit à des défauts de fusion et à la formation de myofibres contenant peu de noyaux (Bae et al., 2008; Jansen and Pavlath, 2006). Cependant, Bondesen *et al.* ont montré, au contraire, que l'inhibition de la migration des myoblastes est associée à une augmentation de la fusion (Bondesen et al., 2007). Ces données, quoique apparemment opposées, peuvent être réconciliées si l'on sépare l'étape de rapprochement des myoblastes en deux phases. Une première phase de recherche du partenaire pendant laquelle les myoblastes doivent être très mobiles. Au cours de cette phase, les myoblastes migrent en direction de chémoattractants (émis par d'autres cellules musculaires) qu'ils perçoivent notamment grâce au récepteur du mannose et à la sialomucine membranaire CD164 (Bae et al., 2008; Jansen and Pavlath, 2006). Puis, lorsque les cellules sont proches, débute une seconde phase au cours de laquelle la proximité du partenaire induit un ralentissement des myoblastes. En effet, les myoblastes sécrètent la prostaglandine PGI₂ et expriment son récepteur. PGI₂ est une molécule de signalisation qui agit de manière paracrine en provoquant une inhibition de la migration des myoblastes. Ainsi, lorsque deux myoblastes se rapprochent, ils perçoivent le PGI₂ émis par leur partenaire ; cela provoque leur ralentissement et permet l'établissement de contacts stables entre les deux cellules (Bondesen et al., 2007).

II.C.2/ La reconnaissance et l'adhérence des membranes

De nombreuses études *in vitro* ont montré l'implication des cadhérines dans les étapes de reconnaissance et d'adhérence des myoblastes préalables à leur fusion (Charrasse et al., 2007; Charrasse et al., 2006; Comunale et al., 2007). Cependant, les cellules des muscles squelettiques des souris KO pour la M-cadhérine ou la N-cadhérine fusionnent normalement (Hollnagel et al., 2002; Radice et al., 1997). Ceci peut s'expliquer soit par une compensation de la M-cadhérine par la N-cadhérine et *vice versa*, soit par l'intervention d'autres gènes dans le processus de reconnaissance/adhérence. En effet, d'autres études suggèrent l'intervention

des intégrines et d'autres protéines membranaires comme la cavéoline 3 (Brzoska et al., 2006; Galbiati et al., 1999; Rosen et al., 1992).

Enfin, une étude récente a révélé que la néphrine est impliquée dans l'étape de reconnaissance/adhérence. La néphrine est une protéine présente à la surface des cellules. Dans le muscle squelettique, la néphrine est exprimée au cours des périodes de fusion ; et l'inhibition de son expression dans les myoblastes est associée à des défauts de fusion *in vitro* et *in vivo*. En effet, des expériences de co-cultures de myotubes naissant sauvages ou KO pour la néphrine avec des myoblastes KO pour la néphrine ou sauvages montrent que la présence de la néphrine est asymétriquement requise : elle est nécessaire à la surface des myoblastes mais elle ne l'est pas à la membrane des myotubes (Sohn et al., 2009).

II.C.3/ La réorganisation du cytosquelette d'actine au cours de la fusion

II.C.3.a/ Le remodelage du cytosquelette d'actine est nécessaire à la fusion

Des études récentes menées *in vitro* ont montré que les myoblastes sont le théâtre de remodelage intense de la membrane plasmique et du cytosquelette d'actine sous-jacent lors de l'étape de fusion des membranes (Duan and Gallagher, 2009; Nowak et al., 2009). Afin de tester la nécessité du remodelage du cytosquelette d'actine, Nowak *et al.* ont traité des myoblastes C2C12 avec de la latrunculine A ou de la cytochalasine D (des inhibiteurs du cytosquelette d'actine, voir II.B.1) (Nowak et al., 2009). Cependant, étant donné que le cytosquelette d'actine est indispensable à l'étape de migration qui précède la mise en contact des membranes des myoblastes, les auteurs ont laissé les myoblastes arriver à confluence avant de les passer en milieu de différenciation contenant les drogues. Ceci permet de tester la nécessité du remodelage du cytosquelette d'actine spécifiquement pendant l'étape de fusion. L'inhibition pharmacologique du remodelage du cytosquelette d'actine dans des myoblastes sur le point de fusionner bloque la fusion (Nowak et al., 2009). Cette étape clé de la myogenèse nécessite donc une réorganisation du cytosquelette d'actine.

II.C.3.b/ Les modifications morphologiques et structurales associées à la fusion

II.C.3.b.i/ Les modifications morphologiques et structurales précédant la fusion

La compréhension du rôle exercé par le cytosquelette d'actine au cours de la fusion implique l'identification des modifications morphologiques que son remodelage permet. De ce point de vue, les observations réalisées *in vitro* semblent se scinder en deux catégories. D'après certaines études, les myoblastes fusionnent par leurs extrémités au niveau de lamellipodes ou de filopodes que les cellules étendent les unes vers les autres (Abramovici and Gee, 2007; Comunale et al., 2007). Au contraire d'autres études, nombreuses, soutiennent que les myoblastes s'allongent parallèlement les uns aux autres et s'alignent. Leurs membranes peuvent alors s'accoler et fusionner par leur plus grand côté (Doherty et al., 2005; Duan and Gallagher, 2009; Fortier et al., 2008; Nowak et al., 2009; Ohtake et al., 2006; Vasyutina et al., 2009). Cependant, l'observation des cellules alignées réalisée en microscopie confocale, microscopie électronique à balayage et microscopie à force atomique a révélé, là aussi, la présence de filopodes établissant des contacts entre les cellules accolées (Kim et al., 2008; Stadler et al., 2010). Ces différences de morphologie des cellules observées au moment de la fusion peuvent s'expliquer par la différence de densité des cellules. En effet, la fusion des myoblastes via des lamellipodes est observée sur des cellules espacées, tandis que la fusion entre myoblastes allongés s'opère entre cellules confluentes. Il est difficile de savoir quel cas est le plus représentatif du déroulement de la fusion *in vivo* puisque les études structurales de cette étape de la myogenèse dans un organisme de mammifère sont rares voire inexistantes. De plus, les analyses *in vitro* de la fusion des myoblastes, comme celles mentionnées ci-dessus, ont été menées sur des monocouches de cellules. Les myoblastes cultivés dans un environnement à deux dimensions sont soumis à des contraintes spatiales totalement différentes de celles rencontrées *in vivo*, puisque dans un organisme, les myoblastes évoluent dans un environnement à trois dimensions. L'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* doit donc se faire avec beaucoup de prudence. Néanmoins, des différenciations de myoblastes dans des matrices en trois dimensions ont été réalisées récemment (Park et al., 2008; Serena et al., 2008). Les analyses ultrastructurales de la fusion qui pourront être effectuées dans ces conditions apporteront des données correspondant mieux à la fusion *in vivo*.

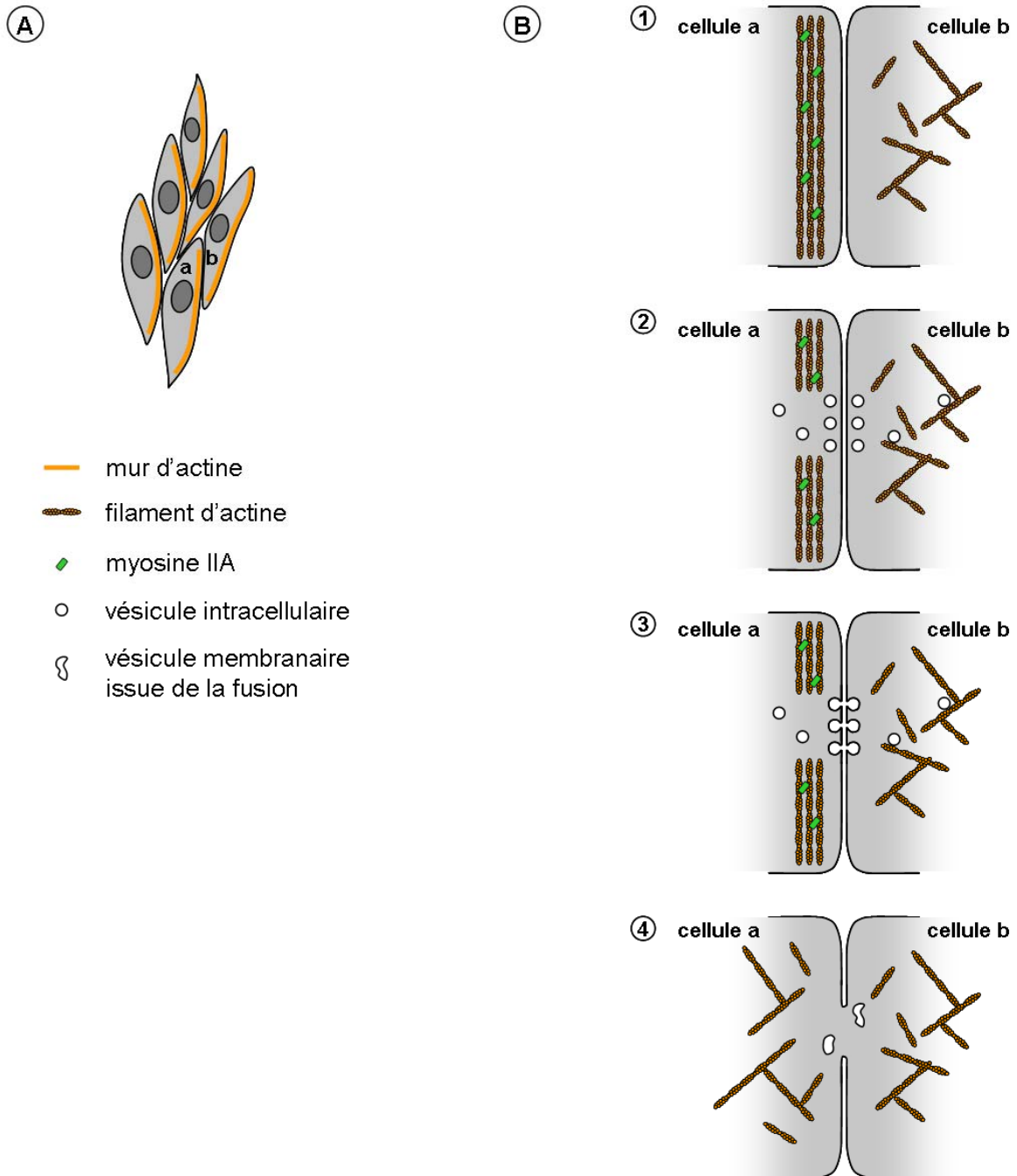


Figure 16 : Le cytosquelette d'actine et le trafic membranaire lors de l'étape de fusion.

(A) Les myoblastes alignés présentent une organisation asymétrique de leur cytosquelette d'actine : un côté de la cellule est occupé par un cytosquelette cortical habituel tandis que le côté opposé est occupé par une accumulation de filaments d'actine parallèles formant un mur d'actine. (B) Le mur d'actine n'est présent que dans l'un des deux myoblastes accolés (1). Puis des interruptions apparaissent dans ce mur d'actine et des vésicules s'y accumulent ainsi que dans le myoblaste adjacent (2). Ces vésicules fusionnent avec leurs membranes plasmiques respectives (3) qui finissent par coalescer et disparaître tandis que le mur d'actine se désorganise (4). Réalisé d'après (Duan and Gallagher, 2009).

II.C.3.b.ii/ Les modifications structurales au site de fusion

Les étapes de la fusion et l'implication du cytosquelette d'actine ont été étudiées en détail en microscopie optique et surtout électronique dans un autre organisme modèle, la drosophile. La formation des myotubes suit la même succession d'évènements que chez les mammifères : migration, reconnaissance cellule-cellule, adhérence, alignement et enfin fusion des membranes. Récemment, une structure spéciale d'actine, appelée le « foyer », a été identifiée au site de fusion par des techniques d'imageries sur échantillons fixés et en time-lapse. Cette accumulation de F-actine, dont la taille est en moyenne de 1,9 μm , se désintègre juste avant la fusion des membranes. La formation puis la dissolution du « foyer » sont indispensables à la fusion des myoblastes (Richardson et al., 2007). Une telle structure n'a jamais été mise en évidence dans les myoblastes de vertébrés. Cependant, l'existence de structures riches en actine polymérisée a été plusieurs fois décrite (Duan and Gallagher, 2009; Lipton, 1977; Vasyutina et al., 2009). La description précise de ces structures riches en F-actine au site de fusion des myoblastes de vertébrés a récemment été réalisée à l'aide d'observations de microscopie optique et électronique de myoblastes C2C12 en cours de fusion. Les myoblastes allongés et accolés les uns aux autres présentent un mur d'actine qui longe la membrane plasmique (Figure 16 A). Ce mur d'actine est composé de filaments d'actine alignés parallèlement à la membrane et qui s'étendent d'un bout à l'autre de la cellule. Cette organisation particulière des filaments d'actine semble jouer un rôle important dans la fusion puisque l'inhibition de l'activité motrice de la myosine non musculaire IIA (NMMyIIA) empêche la formation de ce mur d'actine corticale et inhibe la fusion (Duan and Gallagher, 2009). Les structures formées par le cytosquelette d'actine dans les myoblastes C2C12 jouent donc un rôle central dans l'étape finale de la fusion, comme c'est le cas chez la drosophile.

II.C.3.c/ Les régulateurs du cytosquelette d'actine au cours de la fusion

Le cytosquelette d'actine intervient dans toutes les étapes qui précèdent et accompagnent la fusion. C'est pourquoi les régulateurs du cytosquelette d'actine ont été étudiés en détail au cours de la différenciation.

II.C.3.c.i/ Les Rho GTPases

L'importance de Rac1 pour la fusion des myoblastes a été démontrée *in vitro*. Le traitement de myoblastes C2C12 avec un inhibiteur spécifique de Rac1 après l'initiation de la différenciation (afin de ne pas interférer avec les premières étapes de la différenciation) a conduit à une réduction drastique de la capacité des myoblastes à fusionner (Charrasse et al., 2007). *In vivo*, l'analyse des muscles des KO conditionnels Rac1 a mis en évidence des myofibres courtes et fines dans les membres suggérant un défaut de fusion. Des myoblastes primaires issus de ces souris présentent en effet des défauts de fusion. Ils sont capables de recruter les marqueurs précoces de l'adhérence, α - et β -caténine, tandis que l'accumulation de F-actine, de vinculine et de Arp2/3 au site de fusion est réduite voire absente (Vasyutina et al., 2009). Ceci est cohérent avec le rôle joué par Rac1 dans la stimulation de la polymérisation de l'actine par activation d'Arp2/3.

Le rôle de la Rho GTPase Cdc42 dans la fusion a également été étudié *in vivo* à l'aide d'un KO conditionnel. Ces souris présentent elles aussi des altérations de leur musculature caractéristiques de défauts de fusion. Comme les myoblastes KO pour Rac1, les myoblastes primaires issus des souris KO pour Cdc42 sont capables de recruter l' α - et la β -caténine, mais pas la F-actine ni la vinculine. En revanche, contrairement aux résultats obtenus avec les myoblastes KO pour Rac1, l'absence de Cdc42 n'empêche pas le recrutement d'Arp2/3 aux sites de fusion (Vasyutina et al., 2009). L'action de Rac1 et de Cdc42 au cours de la fusion n'est donc pas redondante.

Enfin des études *in vitro* sur des myoblastes C2C12 ont montré que l'activité de RhoA, bien que nécessaire à l'initiation de la différenciation, constitue un inhibiteur de la fusion. Après avoir été activée, RhoA doit donc être inactivée afin de permettre la fusion (Charrasse et al., 2006; Fortier et al., 2008). Tout comme Rac1 et Cdc42 (voir II.B.1.b.i), RhoA est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. L'injection d'une forme mutante constitutivement activée de RhoA dans des fibroblastes stimule la formation des fibres de stress qui sont de longs faisceaux d'actine qui traversent la cellule et sont ancrés aux molécules d'intégrines des sites focaux d'adhérence (Ridley and Hall, 1992). La formation de fibres de stress conduit à des cellules moins étendues.

L'ensemble de ces données montrent que les Rho GTPases sont des régulateurs clés de la différenciation musculaire en général, et de la fusion des myoblastes en particulier. Leur

activité varie au cours de la différenciation et de la fusion selon une séquence qui, si elle est perturbée, provoque des défauts de la formation des myotubes.

II.C.3.c.ii/ Les régulateurs des Rho GTPases

Le passage des Rho GTPases d'une forme inactive (liée au GDP), à une forme active (liée au GTP) et inversement, est finement régulée par des GEF et des GAP. Les GEF (*guanine nucleotide-exchange factors*) favorisent le passage de la forme inactive à la forme active en stimulant le remplacement du GDP par du GTP. En revanche, les GAP (*GTPase-activating proteins*) favorisent le passage de l'état actif à l'état inactif en stimulant l'activité GTPase intrinsèque des Rho GTPases (Figure 13).

Au cours de ces dernières années, le rôle des GEF dans la myogenèse a été recherché *in vitro* et *in vivo*. Des données récentes ont établi que Dock1 (ou Dock180), un GEF qui active Rac1, est impliqué dans la fusion des myoblastes *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Laurin et al., 2008; Pajcini et al., 2008). Les embryons KO pour Dock1 présentent une réduction drastique de tous leurs tissus musculaires squelettiques et des fibres mononucléées caractéristiques d'un défaut de fusion au cours de la myogenèse primaire (Laurin et al., 2008). De même l'inhibition de Dock1 par siRNA dans des myoblastes C2C12 provoque une baisse des indices de fusion (ratio entre le nombre de noyaux dans des myocytes contenant deux noyaux ou plus, et le nombre total de noyaux). De plus ces myoblastes sont incapables de fusionner *in vivo* avec des myofibres du muscle tibial antérieur (Pajcini et al., 2008). Ces résultats démontrent une implication de Dock1 dans les deux phases de la myogenèse primaire : la fusion des myoblastes entre eux et la fusion des myoblastes avec les myotubes.

Un autre GEF, Trio, a également été impliqué dans la fusion des myoblastes de mammifères (Charrasse et al., 2007; O'Brien et al., 2000). Trio est capable d'activer les Rho GTPases Rac1 et RhoA/G. L'inhibition de l'expression de Trio par siRNA dans des myoblastes C2C12 empêche l'activation de Rac1 et la fusion (Charrasse et al., 2007). Les embryons KO pour Trio présentent quant à eux des défauts de musculature imputés à des anomalies de l'alignement ou de la fusion des myoblastes lors de la myogenèse secondaire (O'Brien et al., 2000). Les déficiences de fusion observées dans les deux KO de GEF confirment le rôle central des Rho GTPases, notamment de Rac1, dans ce processus. Cependant, les défauts musculaires des souris KO pour Dock1 et des souris KO pour Trio

sont différents ce qui suggère que les fonctions de ces deux GEF ne sont pas redondantes. Ceci peut s'expliquer par le fait que (1) Trio est capable d'activer Rac1 mais aussi RhoA, alors que Dock1 est spécifique de Rac1, et (2) l'activation de Rac1 est déclenchée par des GEF différents au cours des myogenèses primaire et secondaires.

II.C.3.c.iii/ Les effecteurs des Rho GTPases

Parmi les effecteurs des Rho GTPases impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine, les facteurs favorisant la nucléation de l'actine, SCAR/WAVE et WASP, ont été impliqués dans la régulation de Arp2/3 au cours de la fusion. Les complexes SCAR et WASP sont tous deux recrutés aux sites de fusion où ils activent Arp2/3 ce qui provoque le branchement de l'actine. L'inhibition de SCAR ou WASP aboutit à des déficits de fusion des myoblastes de drosophile (Massarwa et al., 2007; Richardson et al., 2007).

Une étude récente a montré l'importance de Nap1, une sous-unité du complexe WAVE, dans la fusion des myoblastes de souris *in vitro* (Nowak et al., 2009). En effet des lignées de myoblastes C2C12 transfectées de manière stable avec un shRNA contre Nap1 sont incapables de former des myotubes plurinucléés. Ceci est spécifiquement dû à un défaut au cours de la fusion, puisque ces myoblastes sont capables de migrer normalement, de s'allonger et d'établir des contacts via les N-cadhérines le long de leurs membranes accolées.

Le cytosquelette d'actine, les Rho GTPases et les NPF apparaissent donc comme des acteurs indispensables à la réalisation des modifications morphologiques qui sous-tendent le processus de fusion.

II.C.4/ Le trafic et le remodelage de membrane au site de fusion

L'analyse ultrastructurale de l'étape finale de la fusion chez la drosophile *in vivo* et dans les myoblastes de souris *in vitro* a révélé de grandes similarités entre les deux espèces concernant les structures membranaires mises en jeu.

II.C.4.a/ Trafic, remodelage de membrane et régulateurs du cytosquelette d'actine

L'étude des étapes de fusion en microscopie électronique a mis en évidence que suite à la réorganisation du cytosquelette qui aboutit à l'alignement et à l'accolement des partenaires de fusion, des paires de vésicules s'alignent de part et d'autre des deux membranes plasmiques juxtaposées (Doberstein et al., 1997; Duan and Gallagher, 2009). Dans les myoblastes C2C12, l'appariement des vésicules s'opère au niveau des interruptions du mur d'actine longeant la membrane plasmique (voir II.C.3.b) (Duan and Gallagher, 2009) (Figure 16 B). Dans les myoblastes de drosophile, ces vésicules, qui seraient issues du bourgeonnement de l'appareil de Golgi, sont délimitées par une membrane dont la face cytoplasmique est dense aux électrons (Kim et al., 2007). Ces vésicules appariées denses aux électrons ont été nommées « complexes de pré-fusion ». Les deux vésicules d'une même paire fusionnent ensuite simultanément avec leur membrane plasmique respective (Figure 16 B).

A proximité des complexes de pré-fusion, ont été observées des accumulations de matériel dense aux électrons le long de la face cytoplasmique des membranes plasmiques juxtaposées (Doberstein et al., 1997; Gildor et al., 2009; Kim et al., 2007). Ces plaques denses aux électrons, qui ont également été décrites dans des myoblastes de rats et de poulets (Rash and Fambrough, 1973), pourraient être le résultat de la fusion des vésicules denses aux électrons avec la membrane plasmique. La formation des complexes de pré-fusion et leur transformation en plaques est une étape indispensable à la fusion des cellules puisqu'en leur absence, les myoblastes restent accolés mais ne fusionnent pas (Kim et al., 2007).

Simultanément à la fusion des vésicules des complexes de pré-fusion, des « pores de fusion » apparaissent entre les cellules (Doberstein et al., 1997; Duan and Gallagher, 2009) (Figure 16 B). Ces pores de fusion correspondent à des zones de communication entre les deux cytoplasmes qui vont ensuite s'étendre latéralement. Les forces nécessaires à l'ouverture et à l'élargissement des pores de fusion sont fournies par le cytosquelette d'actine. En effet, l'absence des NPF WAVE et WASP inhibe respectivement la formation et l'extension du pore (Gildor et al., 2009; Massarwa et al., 2007). Conformément à ces résultats obtenus chez la drosophile, la fusion des myoblastes C2C12 est inhibée en absence de WASP (Kim et al., 2007). Cependant, l'inhibition de WASP étant initiée avant le passage des myoblastes en milieu de différenciation, il est impossible de savoir si le défaut de fusion observé est effectivement dû à un problème lors de la fusion des membranes, ou à une déficience lors de l'étape de rapprochement des partenaires de fusion.

II.C.4.b/ Trafic membranaire au site de fusion et régulation par les ferlines

Les protéines de la famille des ferlines ont été impliquées dans la fusion des myoblastes par le groupe de Elizabeth M. McNally (Davis et al., 2002; Doherty et al., 2005; Doherty et al., 2008; Posey et al., 2011). Les ferlines possèdent cinq, six ou sept domaines C2 qui permettent des interactions protéine-protéine mais aussi protéine-membrane par l'intermédiaire desquelles elles interviennent dans le trafic intracellulaire en régulant les étapes de fusion des vésicules. L'expression des ferlines est régulée au cours de la myogenèse. Ainsi, la myoferline est majoritairement exprimée dans les myoblastes mononucléés en début de différenciation dans lesquels elle est localisée aux sites de fusion membranaire. En revanche, Fer1L5 et la dysferline sont exprimées dans les myotubes naissant (contenant deux à quatre noyaux) et les myotubes matures (contenant plus de cinq noyaux), respectivement (Davis et al., 2002; Posey et al., 2011). L'absence de la myoferline *in vitro* et *in vivo* conduit à la formation de plus petits myotubes ce qui suggère un rôle pour la myoferline dans la fusion des myoblastes avec les myotubes (Doherty et al., 2005). Récemment, il a été montré que la myoferline interagit avec EHD2 (*Eps15 homology domain 2*) tandis que Fer1L5 interagit avec EHD1 et EHD2. Les protéines EHD régulent l'endocytose des récepteurs membranaires et leur recyclage à la membrane. L'expression d'un mutant dominant négatif de EHD2 ou l'inhibition de l'expression de EHD1 et/ou EHD2 par siRNA empêchent la fusion et provoquent la séquestration de la myoferline et de Fer1L5 dans des agrégats périnucléaires entravant ainsi leur retour à la membrane plasmique (Doherty et al., 2008; Posey et al., 2011). La myoferline et Fer1L5 pourraient intervenir dans le recyclage de récepteurs impliqués dans la propagation des signaux extracellulaires de la fusion ou dans le ciblage à la membrane des vésicules formant le complexe de préfusion. Quoi qu'il en soit, ces résultats démontrent l'importance du trafic vésiculaire dans le bon déroulement de la fusion des myoblastes.

Les étapes menant à la formation d'un myotube plurinucléé (migration des myoblastes à la recherche d'un partenaire de fusion, reconnaissance et adhérence des membranes des deux partenaires, réorganisation du cytosquelette, fusion des deux membranes plasmiques) nécessitent (1) un remodelage important du cytosquelette d'actine déclenché par l'intervention successive de ses différents régulateurs ce qui permet l'entrée en contact des myoblastes, leur alignement puis la fusion de leur membrane et (2) un trafic vésiculaire ciblé permettant

l'apport et le renouvellement aux sites de fusion de composants indispensables à son bon déroulement.

II.D/ La myofibrillogenèse

Les myoblastes qui fusionnent en myotubes commencent à produire les protéines myofibrillaires. Ces protéines s'accumulent dans le cytoplasme puis s'associent pour former les éléments contractiles du muscle réunis en myofibrilles : c'est la myofibrillogenèse qui débute au jour embryonnaire 14 chez la souris (Takekura et al., 2001). L'organisation du cytosquelette contractile en myofibrilles est identique dans les muscles striés squelettiques et le muscle strié cardiaque, si bien que les deux types de cellules musculaires ont été largement utilisés pour étudier la myofibrillogenèse.

II.D.1/ Observations et modèles proposés

Dès le début du 20^{ème} siècle, l'observation en microscopie optique de muscle de truite en développement par Heidenhaim a révélé l'existence d'assemblages cytosquelettiques non striés situés près de la membrane plasmique (Heidenhaim, 1913). Ces structures ressemblent à des fibres de stress : en effet, elles présentent la même succession irrégulière d' α -actinine et de myosine II non musculaire (myosine non sarcomérique) le long de filaments de F-actine. Mais à la différence des fibres de stress conventionnelles, elles sont constituées d' α -actinine et d'actine sarcomériques. Ces structures ressemblant à des fibres de stress ont depuis été observées dans d'autres espèces de vertébrés également à la périphérie des fibres en cours de différenciation (Sanger et al., 2010). Il est généralement accepté que la myofibrillogenèse est initiée à la périphérie de la cellule par la mise en place de ces associations de protéines puis progresse vers le centre de la cellule musculaire. En revanche, il existe actuellement deux modèles principaux pour expliquer la transformation de ces « fibres de stress » en myofibrilles matures : le modèle de l'« assemblage de sous-unités indépendantes » et le modèle de la prémyofibrille.

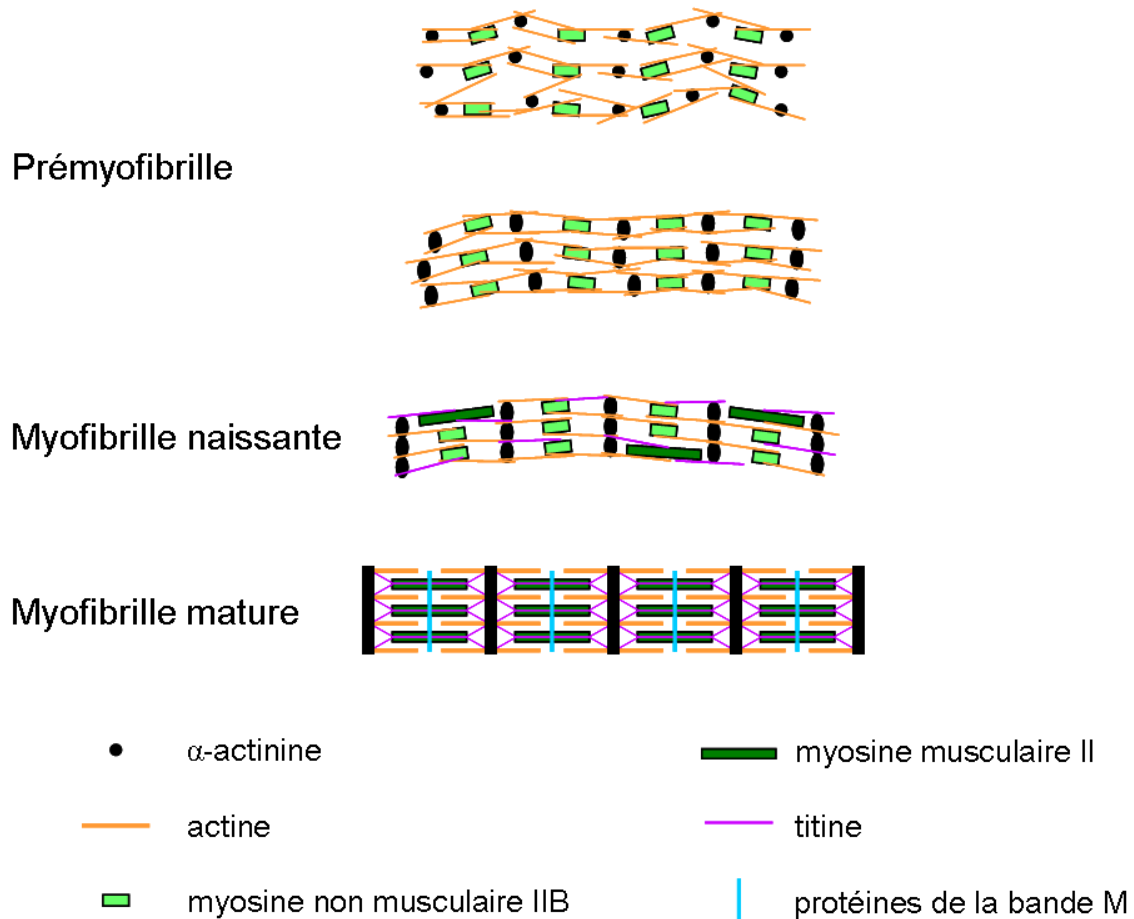


Figure 17 : La myofibrillogenèse : le modèle de la prémiofibrille.

Dès l'initiation de la myofibrillogenèse, les trois composants majeurs des sarcomères sont présents : l'α-actinine organisés en corps Z, l'actine organisée en filaments fins et la myosine non musculaire IIB organisée en filaments épais. Ces trois éléments se succèdent de manière alternée au sien de prémiofibrilles. Puis, la titine s'associe à ces éléments tandis que la myosine musculaire II remplace progressivement la myosine non musculaire IIB. Les structures obtenues sont des myofibrilles naissantes qui deviendront des myofibrilles matures lorsque la myosine non musculaire IIB aura été complètement éliminée et lorsque les protéines de la bande M se seront organisées sur les filaments épais. Réalisé d'après (Sanger et al., 2005).

II.D.1.a/ Le modèle de l'assemblage de sous-unités indépendantes

Holzer *et al.* soutiennent que lors de la myofibrillogenèse précoce, les filaments fins et épais s'assemblent de manière indépendante le long de structures ressemblant à des fibres de stress (SFLS, *stress fiberlike structures*), qui se transforment en myofibrilles non striées (NSMF, *non striated myofibrils*). Celles-ci deviennent des myofibrilles striées naissantes (naSMF, *nascent striated myofibrils*) qui se développent finalement en myofibrilles matures striées (SMF, *striated myofibrils*). Ce modèle repose sur l'observation, en microscopie électronique, de faisceaux de myosine d'une part, et de corps I-Z-I (filaments fins d'actine réunis par des polymères d' α -actinine) d'autre part, isolés dans le cytoplasme au début de la myofibrillogenèse. La principale caractéristique de ce modèle est le fait que les précurseurs des filaments fins et épais se forment séparément, puis ne se réunissent qu'au cours des étapes ultérieures de la myofibrillogenèse (Holtzer et al., 1997).

II.D.1.b/ Le modèle de la prémyofibrille

Ce modèle, défendu par Sanger *et al.*, soutient au contraire que les premières structures formées au cours de la myogenèse comportent les trois éléments majeurs qui constitueront les myofibrilles : des corps Z contenant de l' α -actinine et des filaments fins d'actine qui forment des interdigitations avec des filaments épais de myosine II non musculaire (Figure 17). Ce modèle repose sur l'observation, dès l'initiation de la myofibrillogenèse d'une alternance des marquages F-actine/ α -actinine d'une part, et myosine II non musculaire d'autre part le long de structures communes (Du et al., 2003; Du et al., 2008). Ces structures, nommées prémyofibrilles, se transforment en myofibrilles naissantes lorsque la titine et la myosine II musculaire viennent s'y associer. Puis l'incorporation des protéines de la bande M couplée à l'élimination de la myosine II non musculaire et à la transformation des corps Z alignés en stries Z aboutissent à la formation de myofibrilles matures. Ce modèle est étayé par des observations faites sur cellules vivantes exprimant ou injectées avec des protéines sarcomériques fusionnées à des molécules fluorescentes. Ces études montrent que les myofibrilles ne s'allongent pas par l'ajout répété de sarcomères, comme le suggère le premier modèle, mais par l'ajout de prémyofibrilles complètes qui s'alignent et fusionnent avec les myofibrilles déjà formées (Dabiri et al., 1997). Ce modèle soutient donc que les éléments des myofibrilles en formation s'associent en une structure commune dès les étapes les plus précoces de la myofibrillogenèse.

Ces deux modèles donnent des informations descriptives sur la succession des évènements qui aboutit à la formation des myofibrilles, mais ils n'apportent pas d'explication quant aux mécanismes et aux facteurs qui interviennent dans l'assemblage régulier des filaments fins et épais dans les sarcomères.

II.D.2/ Le rôle des protéines géantes

L'organisation et l'arrangement des myofibrilles sont tels que de nombreuses études supposent l'existence de « patrons moléculaires » qui gouverneraient l'assemblage des myofibrilles. Les protéines musculaires géantes, la titine, la nébuline et l'obscurine, ont des propriétés qui font d'elles de bons candidats pour remplir ce rôle : leur taille énorme, leur localisation particulière dans les sarcomères, leur incorporation très précoce dans les structures myofibrillaires primitives, la multiplicité et la diversité de leurs partenaires protéiques, la présence de domaines impliqués dans la signalisation le long de leur séquence et leur capacité à répondre à des stimuli de stress (voir I.B.1.c et I.B.1.e).

II.D.2.a/ La titine

L'élimination de portions de la titine *in vitro* et *in vivo* a permis de mieux étudier la contribution de la protéine à la myofibrillogenèse. Ainsi, les effets de la perte du domaine C-terminal de la titine ont été étudiés. Cette région qui est localisée à la bande M contient notamment le domaine kinase et le domaine M10 d'interaction avec l'obscurine. Des mutations dans cette région sont associées à des myopathies (TMD, *tibial muscular dystrophy* ; LGMD, *limb girdle muscular dystrophy*) (Pernigo et al., 2010). *In vitro*, l'expression de titine dépourvue de sa région C-terminale dans des myotubes et des cardiomyocytes perturbe l'organisation de la ligne M et de la strie Z et l'assemblage des filaments épais de myosine (Miller et al., 2003; Musa et al., 2006). Ceci suggère un rôle central pour la titine dans les étapes d'assemblage des différents constituants des myofibrilles puisque la délétion d'une région de la titine interagissant avec une structure spécifique des sarcomères affecte également l'organisation d'autres structures.

Cependant l'étude de souris exprimant des molécules de titine dépourvues de leur région C-terminale montre que la titine n'est pas nécessaire à l'assemblage initial des

sarcomères puisque les premières myofibrilles formées dans le muscle cardiaque présentent un alignement et un espacement normal des stries Z et des lignes M. En revanche, à partir de E9,5, les sarcomères des souris KO n'augmentent plus en largeur et finissent par se dissocier. La titine interviendrait donc plutôt dans la croissance en largeur et la stabilisation des myofibrilles (Weinert et al., 2006). Ces résultats *in vivo* sont en désaccord avec les résultats *in vitro* qui suggéraient que la titine pouvait être une molécule servant de modèle pour l'assemblage des sarcomères lors de la myofibrillogenèse précoce. La titine ne serait pas indispensable lors des premières étapes de la formation des myofibrilles mais serait impliquée dans leur maturation et leur maintien.

II.D.2.b/ La nébuline

Compte tenu de sa localisation, la nébuline pourrait servir de « molécule étalon » pour la formation et l'organisation des filaments fins d'actine. En effet, la taille des différentes isoformes de nébuline et la taille des filaments fins d'actine sont corrélées dans les différents muscles étudiés au sein de différentes espèces mais aussi au cours du développement (Kruger et al., 1991; Labeit et al., 1991).

Les souris KO pour la nébuline possèdent des sarcomères organisés normalement mais dont les filaments fins sont de longueur variable. En outre, l'alignement des stries Z des myofibrilles est perturbée (Bang et al., 2006; Witt et al., 2006). Ces résultats *in vivo* confirment l'importance de la nébuline dans la détermination de la longueur des filaments et le maintien de la structure générale des myofibrilles ; en revanche, ils excluent une implication éventuelle de la nébuline dans la mise en place des filaments fins d'actine au sein des sarcomères puisque des myofibrilles sont présentes malgré son absence.

En outre, la nébuline est absente du muscle cardiaque. Or la longueur des filaments fins des cardiomyocytes est tout aussi régulée que la longueur des filaments fins des myofibres squelettiques. Ceci prouve qu'il existe nécessairement un autre mécanisme moléculaire permettant le contrôle de la taille des filaments fins dans le cœur.

II.D.2.c/ L'obscurine

Contrairement aux deux autres protéines géantes, l'obscurine ne s'étend pas le long des sarcomères mais elle entoure les myofibrilles à la ligne M et dans une moindre mesure à la strie Z. La surexpression de fragments de l'obscurine ou son inhibition par siRNA dans des myotubes *in vitro* ont montré son implication dans l'assemblage des bandes A et M, et dans l'incorporation de la titine à la strie Z (Ackermann et al., 2009; Bowman et al., 2008; Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2006).

In vivo, le KO de l'obscurine dans la souris et l'inhibition de son expression par morpholino chez le poisson-zèbre n'ont pas d'effet sur la structure des sarcomères. En revanche, la baisse du niveau d'expression de l'obscurine chez le poisson-zèbre provoque des défauts d'alignement des stries Z des myofibrilles. Ce défaut n'est pas retrouvé dans les muscles de la souris KO (Lange et al., 2009; Raeker et al., 2006). Il semble donc qu'*in vivo*, l'obscurine ne soit pas impliquée dans la myofibrillogenèse précoce mais dans le maintien des interactions entre les myofibrilles. L'obscurine pourrait former une sorte d'anneau autour des myofibrilles à la ligne M et à la la strie Z, et l'association des anneaux d'obscurine de myofibrilles adjacentes permettrait de maintenir l'alignement de l'appareil contractile.

Les études menées sur les rôles des trois protéines géantes dans la myofibrillogenèse présentent toutes des divergences selon qu'elles ont été menées *in vitro* ou *in vivo*. Les études *in vitro* soutiennent que la titine, la nébuline et l'obscurine sont impliquées dans la formation et la mise en place des myofibrilles, tandis que les études *in vivo* apportent des arguments qui défendent une implication des protéines géantes dans la maturation et/ou le maintien des structures de l'appareil contractile. Cette opposition constante entre les résultats *in vitro* et les résultats *in vivo* tend à remettre en cause l'utilisation des lignées cellulaires cardiaques et squelettiques pour l'étude de la myofibrillogenèse. Une explication possible aux différences observées pourrait être que l'environnement cellulaire joue un rôle important dans la myofibrillogenèse.

II.D.3/ Le rôle des intégrines

La myofibrillogenèse est initiée à la périphérie des cellules musculaires par la mise en place de « fibres de stress » spécifiques du muscle (voir II.D.1). Cette localisation particulière de l'initiation de la myofibrillogenèse à proximité de la membrane plasmique suggère que cette dernière pourrait jouer un rôle dans le déclenchement de la formation des sarcomères. La mise en place de ces « fibres de stress » est concomitante à l'accumulation périodique le long de la membrane plasmique d'intégrines, de vinculines et de talines qui colocalisent alors avec l' α -actinine des « fibres de stress » (Fujita et al., 2007; Tokuyasu, 1989). L'intégrine, la vinculine et la taline sont les composants des futurs costamères tandis que l' α -actinine va constituer les corps Z qui fusionneront ensuite en stries Z. Il est donc tentant de proposer que ces accumulations périodiques de ces protéines constituent les prémices de l'assemblage des costamères avec les myofibrilles.

Plusieurs arguments tendent à montrer que ces sites d'adhérence constitués d'intégrines pourraient servir de point de départ pour l'assemblage des sarcomères. En effet, les muscles d'embryons de souris KO pour l'intégrine $\beta 1$ et de souris KO pour les protéines taline1 et taline2 présentent des défauts d'organisation des sarcomères. Ceux-ci se réduisent à des accumulations de matériel filamentueux non strié ou dont les stries Z sont incomplètement assemblées (Conti et al., 2009; Schwander et al., 2003). De plus, la myofibrillogenèse des myotubes C2C12 peut être régulée *in vitro* en modulant l'interaction entre l'intégrine et la matrice extracellulaire. En effet, la culture des myotubes sur du collagène IV intact accélère la myofibrillogenèse, tandis que l'utilisation de peptides RGD libres l'inhibe. Les peptides RGD constituent des sites de liaison reconnus par les intégrines qui empêchent la fixation des intégrines sur la matrice extracellulaire en saturant leurs domaines extracellulaires (Fujita et al., 2007). L'ensemble de ces données suggèrent fortement que les intégrines et leurs protéines associées jouent un rôle majeur dans l'initiation de la myofibrillogenèse.

L'implication des sites d'adhérence à intégrines dans le déclenchement de la myofibrillogenèse démontre que l'environnement de la cellule, notamment la matrice extracellulaire, est un élément clé du processus d'assemblage de l'appareil contractile. Ceci permettrait d'expliquer les divergences de résultats obtenus sur le rôle des protéines géantes dans la myofibrillogenèse (voir II.D.2), entre des cellules se différenciant *in vitro* et *in vivo*. En effet, une boîte de pétri constitue un espace à deux dimensions dans lequel seule une face

de la cellule est au contact de la matrice extracellulaire ; en revanche, les cellules se différenciant dans un organisme sont dans un espace à trois dimensions et sont entourées de matrice extracellulaire. L'apparente incohérence des résultats obtenus sur l'implication des protéines géantes dans la myofibrillogenèse pourrait donc s'expliquer par des différences dans l'environnement cellulaire.

II.E/ La biogenèse des structures membranaires internes du muscle : tubules-T, réticulum sarcoplasmique et triades

Dans le muscle adulte, les myofibrilles sont emballées dans un réseau complexe de membranes constituées de tubules-T et de réticulum sarcoplasmique. Le développement de ce réseau membranaire est initié au jour embryonnaire 15 chez la souris, soit quasi simultanément à l'initiation de la myofibrillogenèse (Takekura et al., 2001). Cependant, alors que la mise en place des myofibrilles est achevée à la naissance, la structure mature du réseau de membranes musculaires internes n'est obtenue qu'environ trois semaines après la naissance (Franzini-Armstrong, 1991). Au cours de cette période, les structures membranaires internes se développent, se différencient, s'associent et s'alignent avec les sarcomères qu'elles entourent.

II.E.1/ Les étapes de la formation des triades

L'une des étapes cruciales dans la mise en place des structures membranaires internes du muscle strié squelettique est la formation de jonctions entre la membrane plasmique des tubules T et le réticulum sarcoplasmique. Ces jonctions sont également appelées unités de relargage du calcium (CRU, *calcium release unit*). Jusqu'au milieu des années 1990, deux principaux modèles s'opposaient pour expliquer la formation des CRU : le modèle de l'association indépendante et le modèle de l'association progressive.

II.E.1.a/ Le modèle de l'association indépendante

Le premier modèle, basé sur des immunomarquages et des observations en microscopie optique, soutenait que les CRU se forment à l'intérieur du myotube, indépendamment de tout contact avec la membrane plasmique. Des vésicules intracellulaires isolées portant des molécules de DHPR s'associeraient avec le réticulum sarcoplasmique jonctionnel dans le cytoplasme, formant ainsi des précurseurs de triades. Puis ces précurseurs de triades fusionneraient avec des tubules T en cours d'élongation depuis la membrane plasmique, ce qui aboutirait à la formation de triades fonctionnelles en communication avec le sarcolemme (Flucher et al., 1991; Yuan et al., 1991) (Figure 18).

II.E.1.b/ Le modèle de l'association progressive

Le second modèle, fondé sur des observations de microscopie électronique, soutenait au contraire que les CRU se forment à partir de tubules T en continuité avec la membrane plasmique. Les tubules T s'étendraient depuis la membrane plasmique et formeraient des CRU lors de leur rencontre avec le réticulum sarcoplasmique. L'élongation des tubules T pourraient se faire soit par la seule invagination du sarcolemme, soit par invagination du sarcolemme couplée à la fusion de vésicules intracellulaires à l'extrémité du tubule en formation (Franzini-Armstrong, 1991) (Figure 18).

II.E.1.c/ Le modèle actuel

Des études plus récentes ont permis de disséquer la succession d'évènements aboutissant à la formation et à la localisation correcte des triades au sein de la myofibre, en associant des analyses de microscopie optique et de microscopie électronique (Flucher et al., 1993; Takekura et al., 2001; Takekura et al., 1993). Dès le jour embryonnaire 14 (E14) chez la souris, alors qu'aucun tubule T n'est visible, des couplages périphériques se forment : il s'agit de CRU entre le réticulum sarcoplasmique et le sarcolemme entourant la fibre. A E15, le marquage de la surface membranaire avec le marqueur lipidique fluorescent DiIC₁₆ permet de mettre en évidence les premières invaginations tubulaires courtes partant du sarcolemme (Figure 19). Parallèlement, la proportion de CRU périphériques diminue tandis que des CRU internes apparaissent essentiellement sous forme de diades (association entre un tubule T et

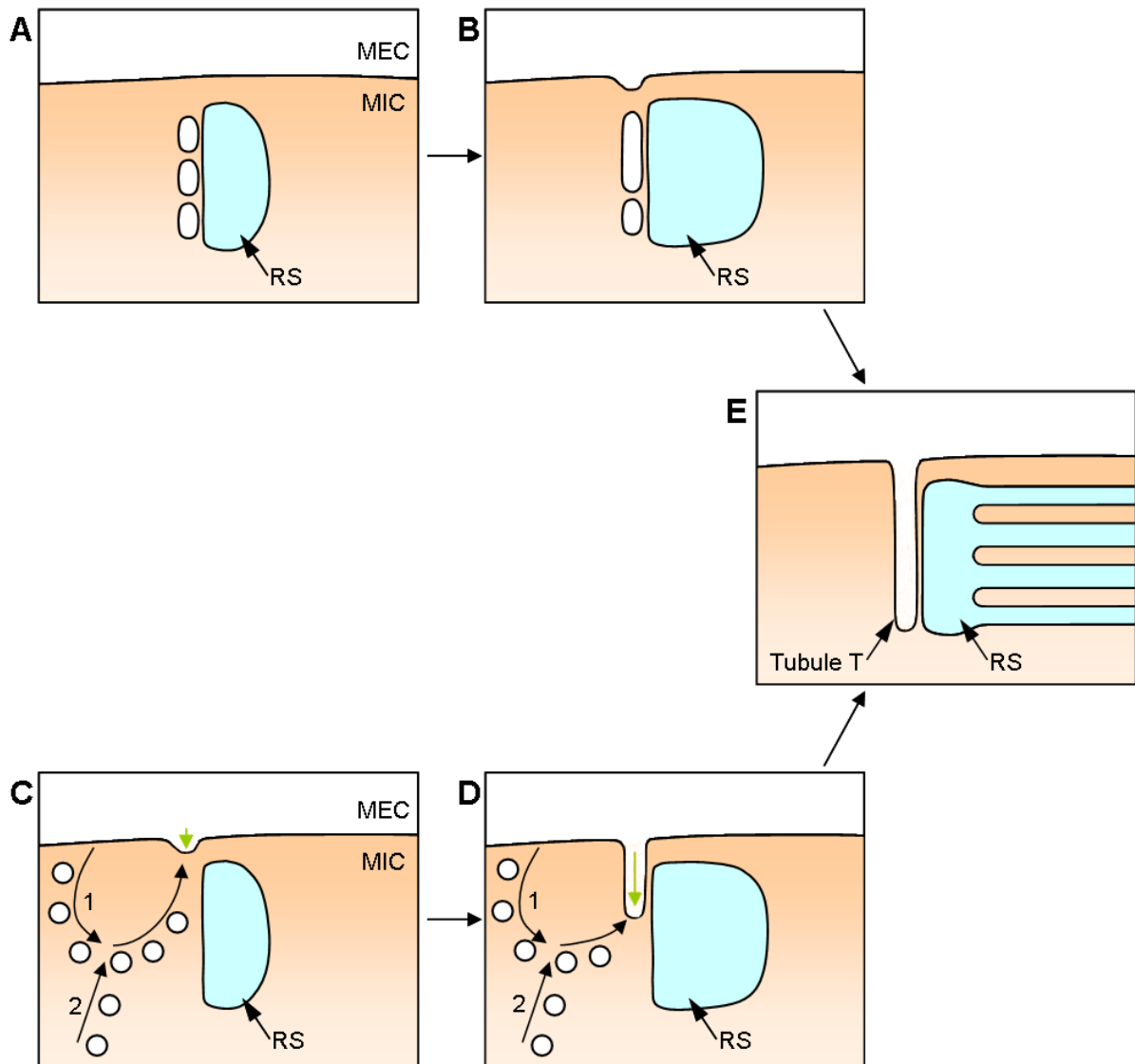


Figure 18 : Les modèles expliquant la formation des triades.

(A, B, E) Modèle de l'association indépendante. Au sein de la cellule musculaire, des CRU s'établissent entre le réticulum sarcoplasmique (RS) et des vésicules intracellulaires indépendamment de tout contact avec la membrane plasmique (A). Puis ces vésicules fusionnent entre elles (B) et avec la membrane plasmique pour former des tubules T associés au réticulum sarcoplasmique (E). (C, D, E) Le modèle de l'association progressive. Des tubules T naissant se forment par invagination de la membrane plasmique (C). L'élargissement des tubules T s'effectue par fusions de vésicules d'endocytose (1) ou d'exocytose (2) avec l'extrémité du tubule. Des CRU s'établissent progressivement entre le réticulum sarcoplasmique et les tubules T au cours de leur élargissement (D). MIC, milieu intracellulaire ; MEC, milieu extracellulaire. Réalisé d'après (Flucher et al., 1991; Franzini-Armstrong, 1991; Yuan et al., 1991).

une citerne terminale de réticulum sarcoplasmique). Entre E16 et E18, les tubules T s'allongent : ils pénètrent plus profondément au cœur de la fibre et commencent à former un réseau anastomosé qui entoure les myofibrilles. A ce stade, l'orientation des tubules T est majoritairement longitudinale. Simultanément, les CRU périphériques disparaissent tandis que les CRU internes se multiplient et s'alignent progressivement à la limite bande A - bande I tout en conservant une orientation longitudinale. Ces CRU internes passent progressivement de l'état de diade à celui de triade. A ce stade, le réticulum sarcoplasmique longitudinal, localisé par un immunomarquage contre SERCA, est déjà bien aligné à la bande A. Après E18, on assiste progressivement à la rotation des triades qui passent d'une orientation longitudinale à une orientation transversale. Parallèlement, les tubules T perdent peu à peu leur orientation longitudinale pour acquérir une orientation transversale caractéristique du muscle mature. Cette réorientation, qui ne s'achève que trois semaines après la naissance, est probablement obtenue par une résorption des portions longitudinales du réseau anastomosé de tubules T.

II.E.2/ Les protéines impliquées dans la formation du réseau membranaire

La formation du réseau membranaire du muscle squelettique est un processus complexe qui nécessite des déformations de membranes, la mise en place de zones de contacts organisées entre deux systèmes membranaires, et l'établissement d'interaction entre des structures membranaires et le cytosquelette. Les protéines impliquées dans ce processus ont été identifiées de trois manières distinctes. Certaines protéines étaient connues pour avoir des propriétés supposées nécessaires à la mise en place du réseau membranaire. On a alors cherché à savoir si elles y participaient (ex : la cavéoline 3). Le deuxième groupe de protéines est constitué par des protéines impliquées dans des myopathies et dont l'étude a révélé qu'elles pouvaient intervenir dans l'établissement du réseau membranaire (ex : la myotubularine). Enfin, le dernier groupe de protéines est constitué de protéines qui étaient auparavant inconnues mais dont la localisation à la triade a motivé l'étude (ex : les Mitsugumines).

Dans cette partie, les protéines ont été classées en fonction de l'étape de la mise en place du réseau membranaire au cours de laquelle elles interviennent. Ce classement n'est pas parfait puisque certaines protéines interviennent dans plusieurs étapes.

NON LIBRE DE DROIT

Figure 19 : Evolution de l'organisation des structures membranaires internes au cours de la myogenèse.

(A-C) Organisation des tubules T. Photographies de microscopie confocale de fibres musculaires de diaphragme de souris dont le plasmalemme a été marqué avec du DilC16. Les premiers tubules T sont détectés à E15 sous la forme d'invaginations courtes. Puis le réseau de tubules T se développe et les tubules T pénètrent jusqu'au coeur de la fibre. A la naissance, le réseau est encore plus dense mais il est encore majoritairement orienté longitudinalement. (D-F) Changement de l'orientation des triades. Photographies de microscopie électronique à transmission de triades de diaphragme de souris à E16. Sur les trois photographies, les myofibrilles sont orientées horizontalement. Les triades passent d'une orientation majoritairement longitudinale à E16, à une orientation complètement transversale dans le muscle adulte. Dès E16, des triades orientées obliquement (E) ou transversalement (F) peuvent être observées. (G) Tableau récapitulatif des modifications de l'organisation des structures membranaires internes du muscle au cours du développement embryonnaire et post-embryonnaire. Les barres d'échelle représentent 5 μm en (A), (B), (C) et 0,2 μm en (D), (E), (F). Tiré de (Takekura et al., 2001).

II.E.2.a/ La mise en place du réticulum sarcoplasmique

II.E.2.a.i/ Ankyrine 1.5 et obscurine

Au cours de la myogenèse, le premier signe d'organisation du réseau membranaire qui enveloppe les myofibrilles est l'alignement du réticulum sarcoplasmique longitudinal avec la bande A et la strie Z. Cet alignement est visible dès E14 alors que les tubules T ne sont pas encore formés (Flucher et al., 1993). L'établissement d'un alignement précis entre le réticulum sarcoplasmique longitudinal et les myofibrilles implique l'intervention de molécules permettant des interactions entre ces deux entités. Deux protéines semblent jouer ce rôle : l'ankyrine 1.5 et l'obscurine.

La famille des ankyrines contient de nombreux représentants impliqués dans l'organisation de domaines membranaires spécifiques en permettant des interactions entre des protéines membranaires et le cytosquelette sous-membranaire. Parmi les isoformes d'ankyrine spécifiques du muscle, certaines codées par le gène *Ank1* (ANK1.5, ANK1.6, ANK1.7) sont sélectivement associées à la membrane du réticulum sarcoplasmique par un domaine hydrophobe situé dans la région N-terminale (Zhou et al., 1997).

L'obscurine est une RhoGEF géante associée aux sarcomères au niveau de la ligne M et de la strie Z, et qui a été impliquée dans la myofibrillogenèse (voir II.D.2.c). Elle serait donc un organisateur des myofibrilles.

II.E.2.a.ii/ Rôles de l'ankyrine 1.5 et de l'obscurine dans l'organisation du réseau membranaire

Dans le muscle strié squelettique, l'ankyrine 1.5 et l'obscurine sont localisées autour des myofibrilles à la ligne M et à la strie Z (Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2003). L'alignement des deux protéines sur les sarcomères a lieu à E14 et l'ankyrine 1.5 est la première protéine du réticulum sarcoplasmique à présenter une organisation striée. Elle sera ensuite rejointe par SERCA et RyR1 (Giacomello and Sorrentino, 2009). Cette succession

NON LIBRE DE DROIT

Figure 20 : Cavéolinopathies et Cavéoline 3.

(A) Cliché de microscopie électronique à transmission de muscle squelettique d'un patient souffrant de LGMD1C montrant des structures en nid d'abeille (pointes de flèche) typiques d'une prolifération anormale du système des tubules T. (B) Cliché de microscopie électronique à transmission de tubules T de souris sauvage (wt) et KO pour la cavéoline-3 (Cav-3 KO) marqués au ferricyanure de potassium. (C,D) Immunomarquages de la cavéoline 3 sur une coupe transversale de muscle squelettique humain (C) et sur une coupe longitudinale d'EDL de rat (D). La cavéoline 3 est majoritairement présente à la périphérie des fibres mais un marquage est aussi détecté à l'intérieur des fibres, le long des tubules T situés de part et d'autre des stries Z marquées par l'actine (rouge). (E) Schéma de l'organisation de la cavéoline 3. La cavéoline 3 forme des homodimères via un domaine d'oligomérisation (vert clair et foncé) et s'associe à la membrane par un domaine transmembranaire (rouge), deux domaines d'interaction avec la membrane (vert foncé et bleu) et trois groupes palmitoyles (marron). La cavéoline 3 est associée à des domaines membranaires enrichis en cholestérol et sphingomyéline (gris clair). Les barres d'échelle représentent 1 μm en (A), 40 μm en (C) et 4 μm en (D). Tiré de (Galbiati et al., 2001; Hnasko and Lisanti, 2003; Minetti et al., 2002; Murphy et al., 2009).

d'évènements suggère que l'ankyrine 1.5 pourrait jouer un rôle d'organisateur du réticulum sarcoplasmique au sein des myofibrilles.

La région cytosolique de l'ankyrine 1.5 interagit avec l'extrémité C-terminale de l'obscurine ce qui crée un lien moléculaire entre le réticulum sarcoplasmique longitudinal et l'appareil contractile (Armani et al., 2006; Bagnato et al., 2003; Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2003). En effet, en absence d'obscurine, l'ankyrine 1.5 n'est plus organisée en stries transversales dans les myotubes ; elle est au contraire associée à des structures orientées longitudinalement (Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2006). Ceci confirme l'importance du lien entre l'obscurine et l'ankyrine 1.5 pour la bonne localisation du réticulum sarcoplasmique au sein des fibres musculaires. Cependant, étant donné que d'autres éléments des sarcomères sont délocalisés quand le niveau d'obscurine est réduit, on ne sait pas pour l'instant si la désorganisation du réticulum sarcoplasmique est une conséquence directe ou secondaire de l'absence d'obscurine.

II.E.2.b/ L'élongation des tubules T

II.E.2.b.i/ La cavéoline 3

–La cavéoline 3 et les cavéoles

Bien qu'en continuité avec la membrane plasmique, les tubules T ont une composition protéique et lipidique unique : ils sont notamment enrichis en cholestérol (Roseblatt et al., 1981). Leur nature biochimique est similaire à celle des cavéoles qui sont de petites invaginations sphériques de la membrane plasmique dont le diamètre varie entre 40 et 100 nm. Les cavéoles participent au trafic membranaire, au tri et au transport des protéines, et à la transduction de signaux. La face cytoplasmique des cavéoles est recouverte de petites protéines, les cavéolines. Celles-ci sont associées à la membrane par un domaine transmembranaire central, deux domaines cytoplasmiques d'attachement à la membrane situés de part et d'autre, et trois groupes palmitoyles (Figure 20). Il existe trois cavéolines : la cavéoline 1 et la cavéoline 2 dont l'expression est ubiquitaire et la cavéoline 3 qui est exprimée dans les muscles squelettiques, cardiaques et lisses, mais aussi dans les cellules gliales et les nerfs périphériques peu après la naissance (Gazzerro et al., 2010).

–Les rôles de la cavéoline 3 dans le muscle

Des mutations dans le gène codant pour la cavéoline 3 causent quatre maladies musculaires distinctes : (1) la dystrophie musculaire des ceintures LGMD1C (*limb girdle muscular dystrophy 1C*) (caractérisée par une faiblesse et une atrophie spécifiques des muscles des ceintures), (2) la RMD (*rippling muscle disease*) (caractérisée par une sensibilité musculaire accrue et/ou des contractions musculaires électriquement silencieuses), (3) l'hypercaséine kinasémie (caractérisée par une concentration accrue de caséine kinase dans le sérum en l'absence de signe clinique de maladie musculaire), et (4) des myopathies distales (caractérisées par une faiblesse et une atrophie spécifiques des muscles distaux) (Gazzerro et al., 2010). L'observation en microscopie électronique de muscles de patients atteints de LGMD1C a mis en évidence des structures vacuolaires associées à des structures en nid d'abeille caractéristiques d'une prolifération anormale des tubules T (Minetti et al., 2002) (Figure 20). Ces observations, associées aux propriétés de la cavéoline 3 suggèrent que la cavéoline 3 pourrait intervenir dans la formation des tubules T.

Dans le muscle adulte, la cavéoline 3 est localisée le long des tubules T et elle est enrichie au niveau du cou des tubules, c'est à dire la zone où les tubules entrent en contact avec le sarcolemme périphérique (Murphy et al., 2009; Ralston and Ploug, 1999) (Figure 20). Des études *in vitro* semblent plaider en faveur d'un rôle de la cavéoline 3 dans la formation des tubules T. Tout d'abord, l'observation de myoblastes en différenciation a montré que la cavéoline 3 s'associe avec les tubules T dès leur formation (Hernandez-Deviez et al., 2006; Parton et al., 1997). En revanche, un mutant de cavéoline 3 associé avec la LGMD1C reste accumulé dans l'appareil de Golgi (Galbiati et al., 1999). On peut donc supposer que la cavéoline 3 pourrait permettre l'élongation des tubules T par fusion de cavéoles à l'extrémité des tubules T naissants. Ceci est cohérent avec le fait que le traitement des myoblastes en différenciation par de l'amphotéricine B (une drogue qui supprime les cavéoles en liant le cholestérol) provoque une dissociation de la cavéoline 3, mais aussi de DHPR, des tubules en formation ainsi qu'une réduction drastique de la taille des tubules en formation ou déjà formés (Parton et al., 1997). Ainsi, la cavéoline 3 pourrait être impliquée non seulement dans la formation des tubules T mais aussi dans leur maintien ainsi que dans l'ancrage de DHPR aux tubules. Ce rôle d'ancrage des constituants de la triade a également été suggéré par Couchoux *et al.* et Vassilopoulos *et al.* (Couchoux et al., 2007; Vassilopoulos et al., 2010). Les premiers ont montré que les défauts de conductance des canaux DHPR mesurés dans des myotubes surexprimant le mutant de cavéoline 3 associé à la LGMD1C peuvent s'expliquer par une

perte de la localisation de DHPR aux tubules T. Vassilopoulos *et al.* ont quant à eux mis en évidence une interaction entre la cavéoline 3 et le domaine transmembranaire de RyR1. Ces deux études apportent des preuves en faveur d'une implication de la cavéoline 3 dans le recrutement ou le maintien des éléments du complexe de relargage du calcium au niveau des triades.

Le rôle de la cavéoline 3 a également été étudié *in vivo* par des techniques d'inactivation de gène. Ainsi, l'inhibition de l'expression de la cavéoline 3 par injection de morpholino oligonucléotides chez le poisson zèbre provoque des défauts de fusion des cellules musculaires, une désorganisation des myofibrilles mais aussi des défauts des membranes internes. Notamment, les marquages au rouge de ruthénium ne montrent pas de membrane invaginée au sein des fibres musculaires, autrement dit, il semble que les tubules T ne se sont pas formés. Ces défauts se traduisent par des embryons dont les mouvements sont ralentis ou complètement désordonnés (Nixon *et al.*, 2005). Chez la souris, le KO de la cavéoline 3 induit un léger phénotype myopathique similaire à celui observé chez les patients LGMD1C. En outre, ces souris présentent des anomalies dans l'organisation des tubules T qui sont dilatés et orientés longitudinalement (Figure 20). Cette orientation particulière des tubules T est caractéristique des muscles en cours de différenciation. Ce défaut du système membranaire interne pourrait donc être dû à un défaut de maturation des tubules T (Galbiati *et al.*, 2001).

L'ensemble des études menées sur la cavéoline 3 semblent converger vers un rôle concernant le système des tubules T même si plusieurs fonctions restent envisagées : formation des tubules T, maturation des tubules T, ancrage des canaux ioniques de la triade ou encore maintien des tubules T. Les différentes mutations impliquées dans les quatre myopathies associées à la cavéoline 3 pourraient ainsi affecter différemment ces fonctions ce qui permettrait d'expliquer les différents phénotypes observés.

II.E.2.b.ii/ L'amphiphysine II

–L'amphiphysine II, une protéine à domaine BAR impliquée dans la tubulation de membrane

L'une des premières étapes lors de la formation des tubules T est le développement d'invaginations tubulaires courtes issues de la membrane plasmique (voir II.E.1.c). De telles

NON LIBRE DE DROIT

Figure 21 : Myopathie centronucléaire et amphiphysine 2/BIN 1.

(A) Noyaux centraux observés sur une coupe transversale de muscle squelettique d'un patient porteur d'une mutation dans l'amphiphysine 2 (coloration à l'hématoxyline/éosine). (B) Immunomarquage de BIN1 (vert) et DHPR α (rouge) sur une coupe transversale de muscle squelettique humain montrant la localisation de BIN1 à la triade. (C) Schéma de la structure protéique de l'isoforme musculaire (iso8) de BIN1. BIN1 iso8 présente une hélice amphipathique en N-terminal (N), un domaine BIN1/Amphiphysin/Rvs167 (BAR), un domaine de liaison aux phosphoinositides (PI), un domaine de liaison à Myc (Myc-binding domain, MBD) et un domaine SH3 (Src homology 3, SH3). (D) La surexpression de BIN1 iso8 dans des cellules COS-1 provoque des tubulations de la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule. Les barres d'échelle représentent 20 μm en (A), 10 μm en (B), 10 μm en (D). A, B et D tirés de, et C réalisé d'après (Nicot et al., 2007; Toussaint et al., 2010).

déformations de la membrane peuvent être initiées par des protéines à domaine BAR (BIN/Amphiphysin/Rvs) qui sont capables de se lier aux bicouches lipidiques et d'induire leur courbure. Parmi les protéines à domaine BAR, les amphiphysines ont été impliquées dans les processus d'endocytose. Les amphiphysines possèdent, en C-terminal, un domaine SH3 (Src homology 3) de liaison protéique et, en N-terminal, un domaine BAR précédé d'une hélice amphipathique (Figure 21). Cette hélice s'insère dans la membrane et provoque ainsi sa courbure. De plus les domaines BAR s'associent en homodimères ayant la forme de banane et sont ainsi capables de détecter et d'entretenir la courbure de la membrane (Zimmerberg and McLaughlin, 2004). Il existe deux amphiphysines chez les mammifères : l'amphiphysine I et l'amphiphysine II ou BIN1. L'amphiphysine I est ubiquitaire mais elle est enrichie dans le cerveau où elle est associée aux vésicules synaptiques. Le gène *Bin1* code pour au moins dix isoformes différentes issues d'épissages alternatifs. *Bin1* est exprimé de manière ubiquitaire mais son expression est majoritaire dans le muscle squelettique et le cerveau. Contrairement à l'amphiphysine I, BIN1 ne possède pas de domaine de liaison à la clathrine et à AP2 (adaptator protein 2) suggérant des fonctions différentes de celles assignées à l'amphiphysine I dans l'endocytose. Il existe deux isoformes de BIN1 spécifiques du muscle squelettique qui ont la particularité d'inclure l'exon 11 codant pour un domaine PI de liaison aux phosphoinositides (Butler et al., 1997; Nicot et al., 2007; Ramjaun and McPherson, 1998; Toussaint et al., 2010) (Figure 21).

–Rôles de l'amphiphysine II dans le muscle squelettique

L'expression de l'amphiphysine II est induite au cours de la différenciation des cellules musculaires au sein desquelles la protéine est localisée sur les tubules T en cours de formation. Dans le muscle adulte de souris, l'amphiphysine II est également associée au réseau de tubules T (Butler et al., 1997; Lee et al., 2002; Razzaq et al., 2001) (Figure 21). Chez la drosophile, l'amphiphysine (il n'y a qu'une amphiphysine chez les diptères) est également localisée aux tubules T et les drosophiles KO pour l'amphiphysine sont incapables de voler et présentent une désorganisation et une réduction du réseau des tubules T (Razzaq et al., 2001). Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer ce phénotype. Soit l'amphiphysine est impliquée dans la formation ou la stabilisation des tubules T, soit elle intervient dans la localisation des tubules T par rapport aux sarcomères via ses interactions avec le cytosquelette. Les études menées *in vitro* fournissent une partie de la réponse. En effet, la surexpression de l'isoforme spécifique du muscle squelettique dans des cellules non

musculaires provoque la formation d'invaginations tubulaires de la membrane plasmique (Lee et al., 2002; Nicot et al., 2007) (Figure 21). Ces résultats suggèrent fortement une implication de l'amphiphysine II dans la formation des tubules T.

L'étude des souris KO pour l'amphiphysine II confirme, dans une certaine mesure, ces résultats. L'inactivation du gène *Bin1* cause une létalité périnatale due à une cardiomyopathie hypertrophique associée à une importante désorganisation des myofibrilles. En revanche, les muscles squelettiques ne présentent pas d'atteinte majeure si ce n'est une délocalisation des tubules T aux stries Z (Muller et al., 2003). Il est à noter cependant que ce KO est un KO total et que les isoformes de BIN1 exprimées dans le cœur sont différentes des isoformes exprimées dans le muscle squelettique. Les isoformes cardiaques de BIN1 sont par exemple dépourvues du domaine PI d'interaction aux phosphoinositides. Or ce domaine est nécessaire au ciblage de la protéine à la membrane et à l'activité de tubulation *in vitro* et il est indispensable à la bonne organisation des tubules T *in vivo* (Fugier et al., 2011; Lee et al., 2002; Nicot et al., 2007). Il est donc clair que les isoformes cardiaques et squelettiques peuvent remplir des fonctions différentes. La génération d'une lignée de souris KO conditionnelle spécifique du muscle squelettique permettrait de mieux étudier le rôle de BIN1 sur la formation ou le maintien des tubules T.

Chez l'homme, des mutations dans le gène *Bin1* ont été associées à une forme autosomale récessive de myopathies centronucléaires (CNM, *centronuclear myopathies*) (Nicot et al., 2007) (Figure 21). Les myopathies centronucléaires sont des maladies neuromusculaires présentant les caractéristiques cliniques d'une myopathie congénitale associées à la présence de nombreux noyaux centraux au sein des fibres musculaires. Les trois mutations identifiées dans le gène *Bin1* sont deux mutations faux sens affectant l'hélice amphipathique et le domaine BAR (mutations K35N et D151N) et une mutation non sens qui tronque la partie C-terminale du domaine SH3 (mutation K575X). Ces trois mutations affectent directement ou indirectement la propriété de tubulation de BIN1. Les deux mutations faux sens bloquent la tubulation des membranes, tandis que la mutation non sens empêche le recrutement de la dynamine 2 par BIN1 sur les tubules. De manière intéressante, le gène *Dynamine 2* fait partie des gènes impliqués dans les CNM (voir II.E.2.b.iii). Il n'est pas aisé d'établir un lien direct entre la tubulation des membranes et une délocalisation des noyaux, mais il s'avère que la perte des capacités de tubulation de BIN1 est associée au déclenchement de CNM. De plus, ce lien est confirmé par une étude récente qui a mis en évidence que les différentes formes de CNM (liées à l'X, autosomale dominante, autosomale récessive) sont

toutes caractérisées par des défauts de localisation de BIN1 et d'organisation des triades (Toussaint et al., 2010). BIN1 pourrait être impliqué dans (1) la formation ou la stabilisation des tubules T par ses capacités à induire et à maintenir les courbures de membranes, (2) la localisation des tubules T par ses capacités à interagir avec la tubuline ou le cytosquelette d'actine ((Hong et al., 2010; Meunier et al., 2009); Gomes E, données non publiées), ou (3) la localisation de certains composants essentiels aux tubules T comme le montre une étude récente menée sur des cardiomyocytes (Hong et al., 2010).

II.E.2.b.iii/ La dynamine 2

–La dynamine 2, une GTPase impliquée dans le trafic vésiculaire

Les dynamines sont des grosses GTPases capables de déformer les membranes. Chez les mammifères, il existe trois dynamines qui partagent la même structure protéique : un domaine GTPase en N-terminal, un domaine central, un domaine PH (*pleckstrin homology*), un domaine de régulation de l'activité GTPase et un domaine C-terminal riche en prolines (Figure 22). Parmi les dynamines, la dynamine 2 a été impliquée dans l'endocytose à la membrane plasmique (clathrine dépendante et indépendante), le trafic membranaire depuis les endosomes et l'appareil de Golgi, l'exocytose, la formation de fibres de stress, l'assemblage de l'interface entre la membrane et l'actine, et la cohésion des centrosomes. Le rôle le mieux décrit de la dynamine 2 est son rôle dans le trafic intracellulaire. En effet, la dynamine 2 est recrutée par les PI(4,5)P2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) et des protéines à domaine BAR (Amphiphysine 1, Amphiphysine 2) en des sites où la membrane est courbée. La dynamine 2 s'oligomérisse alors en formant une hélice au niveau du cou de la vésicule en formation. L'hydrolyse du GTP provoque une constriction du cou de la vésicule qui est finalement séparée de sa membrane d'origine (Durieux et al., 2010a). L'inhibition de l'activité de la dynamine par des inhibiteurs chimiques, comme le dynasore, provoque la formation de tubules à partir de la membrane plasmique et de compartiments membranaires intracellulaires (Derivery et al., 2009).

–Rôles de la dynamine 2 dans le muscle

L'inhibition de la dynamine induit la formation de tubules à partir des différents compartiments membranaires des cellules. Il est donc tentant de supposer qu'une inhibition de

NON LIBRE DE DROIT

Figure 22 : Myopathie centronucléaire et dynamine 2.

(A) Noyaux centraux observés sur une coupe transversale de muscle squelettique d'un patient porteur d'une mutation dans la dynamine 2 (coloration à l'hématoxyline/éosine). (B) Immunomarquage de la dynamine 2 (DNM2, vert) et RyR1 (rouge) sur une coupe transversale de muscle squelettique humain montrant la localisation de DNM2 à la bande I. (C) Schéma de la structure protéique de la dynamine 2. DNM2 présente un domaine GTPase (GTPase), un domaine central (Middle), un domaine PH (PH), un domaine de régulation de l'activité GTPase (GED, *GTPase effector domain*) et un domaine riche en prolines (PRD, *proline-rich domain*). Les barres d'échelle représentent 20 μm en (A) et 10 μm en (B). A et B tirés de, et C réalisé d'après (Durieux et al., 2010b; Toussaint et al., 2010).

la dynamine spécifiquement à la membrane plasmique lors de la différenciation des myotubes pourrait participer à la formation des tubules T.

Dans le muscle adulte de souris, la dynamine 2 est localisée à la bande I (Durieux et al., 2010b) (Figure 22). Des mutations dans le gène codant pour la dynamine 2 ont été identifiées dans des familles affectées par des formes autosomiques dominantes de myopathies centronucléaires. Les quatre mutations, E368Q, R369Q, R369W, R465W, sont toutes localisées dans le domaine central de la protéine (Bitoun et al., 2005). L'activité GTPase de la dynamine induit une modification de la conformation de ce domaine associée à une constriction des structures lipidiques (Chen et al., 2004). En outre, le domaine central est indispensable à la localisation de la dynamine aux centrosomes où elle assure leur cohésion (Thompson et al., 2004). Les dynamines 2 portant les mutations R369W et R465W sont en effet moins bien recrutées aux centrosomes que la dynamine 2 sauvage. Ce défaut de localisation pourrait avoir un impact sur la fonction des centrosomes et donc expliquer la mauvaise localisation des noyaux dans les fibres musculaires des patients (Bitoun et al., 2005). Les biopsies musculaires des patients porteurs de l'une ou l'autre de ces deux mutations sont caractérisées par une perte de l'organisation transversale des triades au profit d'une distribution longitudinale ce qui montre que ces mutations pourraient affecter la formation ou la maturation des triades (Toussaint et al., 2010). Malheureusement, l'effet de ces mutations sur les capacités de la dynamine 2 à déformer les membranes n'a pas été étudié. Il serait par exemple intéressant de réaliser des tests de tubulation *in vitro* en coexprimant, dans des myoblastes C21C2, l'amphiphysine sauvage et les dynamines 2 mutées.

Récemment, une lignée KI (*knockin*) de souris exprimant le mutant DNM2 R465W a été générée (Durieux et al., 2010b). Ces souris développent une myopathie à partir de l'âge de 2 mois, mais aucun noyau central n'est observé même dans des souris âgées de 8 mois alors que dans d'autres modèles murins de CNM, les fibres centronucléées apparaissent avant la 4ème semaine (voir II.E.2.b.iv) (Al-Qusairi et al., 2009; Buj-Bello et al., 2008). Les souris mutées sur la dynamine 2 ne présentent pas non plus de défaut d'organisation des triades. Ces résultats sont en désaccord avec les observations faites sur les patients portant la même mutation (Toussaint et al., 2010). Cette lignée de souris KI ne reproduit donc pas l'ensemble des caractéristiques de la myopathie humaine correspondante et l'absence de défauts triadiques n'est donc peut-être pas pertinente.

NON LIBRE DE DROIT

Figure 23 : Myopathie centronucléaire et MTM1.

(A,B) Effets de la diminution de l'expression de MTM1. (A) Noyaux centraux observés sur une coupe transversale de muscle squelettique d'un patient porteur d'une mutation dans MTM1 (coloration à l'hématoxyline/éosine). (B) Tubules T longitudinaux (flèches) marqués au ferricyanure de potassium sur une coupe longitudinale de muscle tibial antérieur de souris KO pour *Mtm1* de 5 semaines observés en microscopie électronique à transmission. (C,D) Immunomarquages montrant la localisation de MTM1 endogène et surexprimée aux triades. (C) Immunomarquage de MTM1 (rouge) et RyR1 (vert) sur une coupe longitudinale de muscle squelettique de souris sauvage. Le marquage de la ligne M en (C) est un marquage aspécifique. (D) Immunomarquage de MTM1 (vert) et de l' α -actinine (rouge) sur une coupe longitudinale de muscle squelettique de souris sauvage injectée avec un vecteur AAV (adeno-associated virus) codant pour MTM1. (E) Schéma de la structure protéique de MTM1. MTM1 présente un domaine GRAM (Glucosyltransferase, Rab-like GTPase Activator and Myotubularins), un domaine RID (Rac-Induced recruitment Domain), un domaine phosphatase (PTP), un domaine SID (SET-interacting domain) et un domaine CC/PDZ-B (Coiled-Coil / PSD-95/Dlg/ZO-1-Binding Site). Les barres d'échelle représentent 20 μ m en (A), 5 μ m en (C) et (D). A, B, C et D tirés de, et E réalisé d'après (Al-Qusairi et al., 2009; Buj-Bello et al., 2008; Toussaint et al., 2010).

II.E.2.b.iv/ La myotubularine

- MTM1, une phosphatase impliquée dans le trafic membranaire

MTM1 appartient à la famille des myotubularines qui sont des phosphatases dont seules certaines ont une activité catalytique. Les myotubularines catalytiquement actives (MTM1, MTMR2, MTMR3, MTMR4, MTMR6 et MTMR7) déphosphorylent les phosphatidylinositol en position 3 des phosphatidylinositol 3-monophosphate (PI(3)P) et des phosphatidylinositol 3,5-biphosphate (PI(3,5)P₂). En plus de leur domaine phosphatase qui occupe une position centrale, les myotubularines possèdent en N-terminal un domaine GRAM (*glucosyltransferase, Rab-like GTPase activators and myotubularins*) de liaison aux phosphoinositides et en C-terminal un domaine CC/PDZ-BS (*coiled-coil / PSD-95/Dlg/ZO-1-binding site*) de liaison protéine-protéine (Laporte et al., 2003) (Figure 23). MTM1 a été impliquée dans le trafic vésiculaire via la régulation des phosphoinositides. En effet, MTM1 est présente sur les endosomes précoces et tardifs et sa surexpression bloque le trafic des endosomes tardifs aux lysosomes alors que la surexpression de mutants dépourvus d'activité phosphatase n'a pas d'effet (Cao et al., 2007; Tsujita et al., 2004). De plus, le ciblage artificiel de MTM1 sur les endosomes précoces induit une perte des PI(3)P et provoque la tubulation des endosomes (Fili et al., 2006). Ceci suggère que MTM1 est capable de remodeler la membrane des endosomes probablement par son action sur les phosphoinositides. MTM1 a également été impliquée dans le remodelage de la membrane plasmique. En effet, MTM1 est recrutée au niveau des replis membranaires induits par Rac1, et sa surexpression provoque la formation de larges projections membranaires et de filopodes (Kim et al., 2002; Laporte et al., 2002). MTM1 est donc capable de réguler le trafic intracellulaire et de remodeler la membrane plasmique et des endosomes probablement en régulant la quantité de PI(3)P et de PI(3,5)P₂.

–Rôles de MTM1 dans le muscle

De nombreuses mutations dans le gène codant pour MTM1 ont été identifiées chez des patients atteints de myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM, *X-linked centronuclear myopathy*) (Laporte et al., 1996) (Figure 23). Ces mutations se répartissent le long de toute la séquence du gène et provoquent, dans la majorité des cas, une diminution voire une absence de la protéine dans les lignées cellulaires de patients (Laporte et al., 2001). Une lignée de souris KO pour MTM1 a été générée et récapitule les phénotypes observés chez

les patients (noyaux centraux, fibres atrophiées, faiblesse musculaire, ...) (Buj-Bello et al., 2002). Ces souris meurent entre la 6ème et la 14ème semaine après la naissance. Elles développent une myopathie généralisée et progressive à partir de quatre semaines alors que les muscles apparaissent normaux à la naissance. Cette observation montre que le phénotype observé n'est pas dû à un défaut de myogenèse mais à un défaut de maintien des structures musculaires.

Dans le muscle squelettique de poisson zèbre, MTM1 est localisée à la triade (Dowling et al., 2009). En revanche, la localisation de MTM1 dans le muscle squelettique de souris est moins claire puisque deux études ayant cherché à localiser MTM1 endogène ou surexprimée apportent deux résultats différents. La première montre que MTM1 colocalise avec les marqueurs de la triade de part et d'autre de la strie Z, tandis qu'une étude plus récente a mis en évidence une colocalisation de MTM1 avec la desmine à la strie Z (Buj-Bello et al., 2008; Hnia et al., 2011). L'inadéquation entre ces résultats paraît difficile à expliquer puisque les deux études ont été menées sur les mêmes lignées de souris et avec les mêmes anticorps. De plus, le fait que MTM1 colocalise avec DHPR dans le poisson zèbre ne permet pas de discriminer entre une localisation à la triade ou à la strie Z, puisque chez le poisson zèbre, les triades sont localisées à la strie Z.

La localisation de MTM1 dans le muscle squelettique n'est donc pas clairement établie, en revanche l'inhibition de son expression provoque une désorganisation des triades chez le poisson zèbre et la souris (Al-Qusairi et al., 2009; Dowling et al., 2009). Dans les souris KO pour MTM1, les triades sont moins nombreuses et de nombreux tubules T sont orientés longitudinalement (Figure 23). Ces défauts d'orientation des triades sont également observés chez les patients présentant une mutation dans *MTM1* (Toussaint et al., 2010). Ces défauts d'organisation des triades apparaissent précocement au cours de la pathogenèse puisqu'ils sont observés dans des souris KO de deux semaines soit avant l'apparition des symptômes cliniques de faiblesse musculaire et surtout avant l'achèvement de la maturation des triades (Al-Qusairi et al., 2009). En effet, le passage d'une orientation longitudinale à une orientation transversale des tubules T n'est achevé que trois semaines après la naissance. D'après ces résultats, on peut penser que MTM1 intervient dans la maturation des triades.

D'un point de vue physiologique, la déstructuration des triades est associée à des déficits du couplage excitation-contraction chez la souris et le poisson zèbre suggérant que les dysfonctionnements des triades pourraient être à l'origine des défaillances musculaires

causées par l'absence de MTM1 (Al-Qusairi et al., 2009; Dowling et al., 2009). Enfin, la surexpression de MTM1 dans des souris sauvages provoque d'une part l'apparition de vacuoles contenant des marqueurs du sarcolemme et des tubules T, et d'autre part la formation d'accumulations de saccules membranaires organisés en nid d'abeilles qui sont caractéristiques d'une prolifération anormale des tubules T (Buj-Bello et al., 2008). Les effets de la surexpression de MTM1 laissent penser à une implication de MTM1 dans l'homéostasie de la membrane plasmique et l'organisation des tubules T à la triade. L'ensemble de ces résultats, notamment la précocité d'apparition des défauts d'organisation des triades chez les souris KO, suggère que MTM1 est impliquée dans la maturation des tubules T peut-être via sa capacité à remodeler la membrane plasmique et les membranes intracellulaires.

II.E.2.c/ L'établissement des jonctions entre le réticulum sarcoplasmique et la membrane plasmique et la mise en place des triades

II.E.2.c.i/ DHPR et RyR1

DHPR et RyR1 sont les principaux composants du complexe de relargage du calcium des triades. Compte tenu de leur étroite apposition au sein des triades (Figure 8), il a été supposé que DHPR et RyR1 pouvaient intervenir dans l'établissement de la jonction entre les membranes du tubule T et du réticulum sarcoplasmique jonctionnel.

Les rôles de DHPR et RyR1 dans la mise en place des triades ont été recherchés via l'étude des souris dysgéniques et dyspédiques. Les souris dysgéniques présentent une mutation ponctuelle spontanée dans le gène codant pour $DHPR\alpha_1$ qui aboutit à une réduction drastique de la quantité de $DHPR\alpha_1$ produite (Knudson et al., 1989) (voir I.B.3.c.ii). Les souris dyspédiques sont KO pour RyR1 et sont donc dépourvues de « pied » jonctionnel entre les tubules T et les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (Buck et al., 1997) (voir I.B.3.c.iii). Enfin, une lignée de souris double KO pour $DHPR\alpha_1$ et $RyR1$ a été générée. Ces trois lignées de souris meurent à la naissance du fait d'une perte totale du couplage excitation-contraction. L'étude du réseau membranaire interne des muscles des souris dysgéniques, dyspédiques et double KO a montré que ces trois lignées présentent, comme les souris sauvages, des triades (Felder et al., 2002). Ceci prouve que la présence des protéines DHPR et RyR1 n'est pas nécessaire à la jonction entre le tubule T et le réticulum sarcoplasmique. Ces résultats sont cohérents avec l'observation de Takehura *et al.* qui avait remarqué que

NON LIBRE DE DROIT

Figure 24 : Identification, localisation et structure des mitsugumines.

(A) Méthode utilisée pour identifier de nouvelles protéines présentes à la triade. (B) Immunomarquage de la mitsugumine 29 (MG29), de la junctophiline 1 (JP-1) et de la junctophiline 2 (JP-2) sur des coupes longitudinales de muscle squelettique de souris. Les marquages en « doubles bandes » obtenus sont caractéristiques de marquage de protéines des triades. Barres d'échelle : 10 μm . (C) Schéma de la structure protéique des mitsugumines. MG29 possède quatre domaines transmembranaires et ses extrémités N-terminale et C-terminale sont localisées dans le cytosol. JP-1 et JP-2 possèdent un domaine transmembranaire dans leur région C-terminale et des motifs MORN (*membrane occupation and recognition nexus*) de liaison aux membranes dans leur région N-terminale. A et B tirés de, et C réalisé d'après (Ito et al., 2001; Komazaki et al., 1999; Weisleder et al., 2008).

l'amarrage des deux systèmes membranaires précède l'incorporation de RyR1 à la triade (Takekura et al., 2001). En revanche le maintien de la distance entre la membrane du tubule T et la membrane du réticulum sarcoplasmique à une valeur de 10-12 nm est bien dû à RyR1. En effet, les triades des souris dyspédiques et double KO présentent un espace restreint (inférieur à 10 nm) entre les tubules T et le réticulum sarcoplasmique et aucun « pied » n'est visible dans cet espace intermembranaire. Ceci prouve, en outre, que l'ancrage du domaine cytoplasmique de RyR1 aux tubules T ne fait pas intervenir DHPR α_1 (Felder et al., 2002).

L'étude des souris mutantes ou KO pour DHPR et RyR1 permet donc de prouver que ces deux protéines n'interviennent ni dans la formation ou la maturation des tubules T et du réticulum sarcoplasmique, ni même dans l'établissement des premières jonctions qui sont à l'origine des triades. Il existe donc un autre composé qui intervient pour mettre en place la jonction entre le tubule T et le réticulum sarcoplasmique.

II.E.2.c.ii/ Mitsugumine 29

–Identification de la mitsugumine 29

Afin de mieux comprendre les mécanismes et protéines impliqués dans la mise en place de la triade, Takeshima *et al.* ont entrepris d'identifier les protéines qui y sont présentes en développant une banque d'anticorps monoclonaux dirigés contre des fractions membranaires enrichies en triades ou tubules T seuls (Takeshima et al., 1998) (Figure 24). Ils ont ainsi mis en évidence la mitsugumin 29 (MG29). MG29 est un membre de la famille des synaptophysines qui sont des protéines à quatre domaines transmembranaires impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique (Figure 24).

–Rôles de la mitsugumine 29 dans le muscle squelettique

Les souris KO pour MG29 sont viables, cependant l'étude ultrastructurale de leurs muscles a mis en évidence une dilatation des tubules T, un réticulum sarcoplasmique faiblement développé et des triades partiellement désorganisées (Komazaki et al., 2001; Nishi et al., 1999).

Au cours de la myogenèse, MG29 est d'abord retrouvée associée au réticulum sarcoplasmique puis elle se concentre au niveau des triades (Komazaki et al., 1999). Dans le

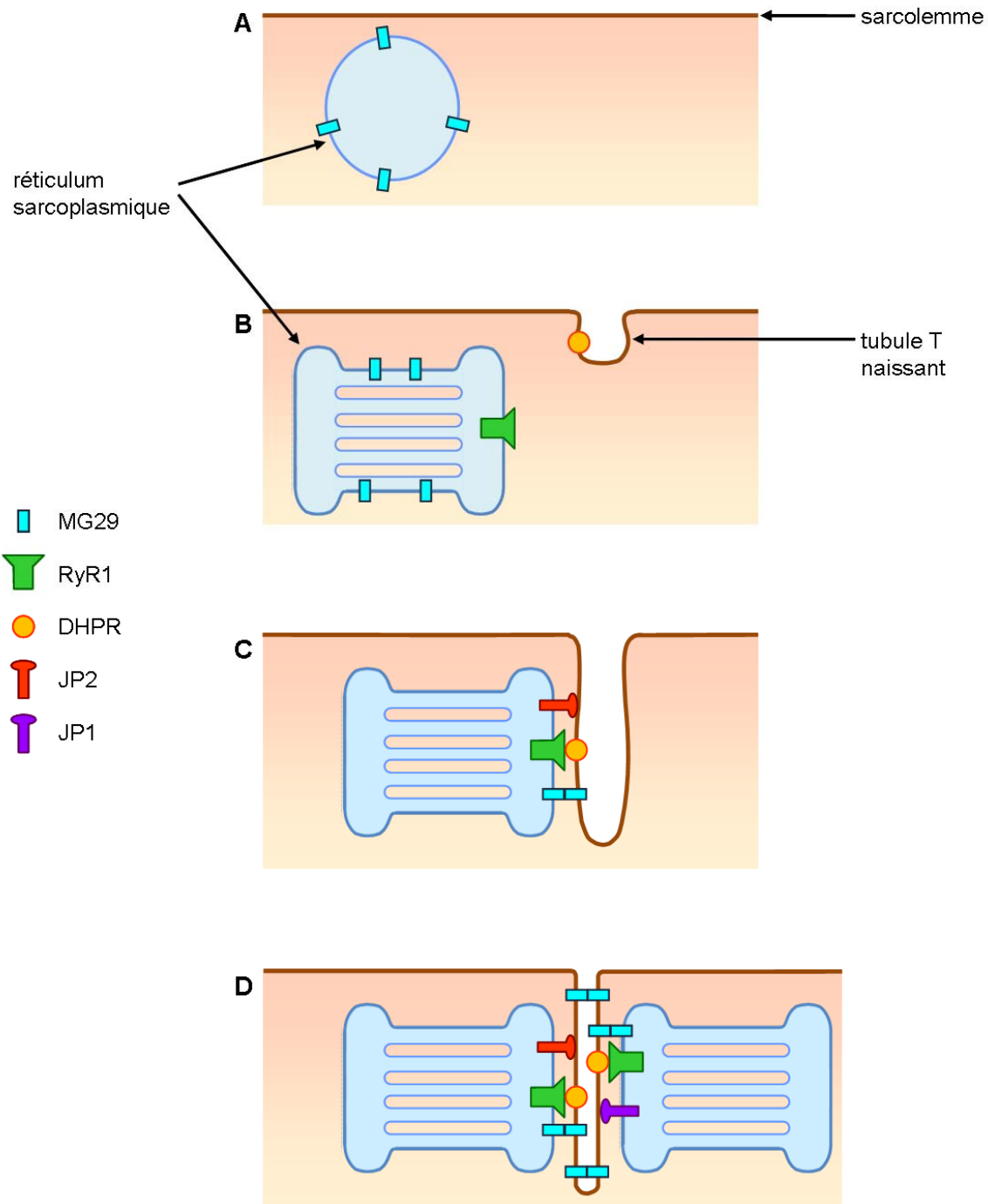


Figure 25 : Rôles des mitsugumines dans la mise en place des triades.

MG29 est la première mitsugumine à être exprimée au cours de l'embryogenèse (A). Elle est associée au réticulum sarcoplasmique et provoque sa tubulation (B). MG29 se concentre ensuite au réticulum sarcoplasmique jonctionnel et aux tubules T où elle participerait au renforcement des triades (C). Dans le muscle mature, MG29 assure également le maintien de la structure des tubules T (D). Les junctophilines 2 puis 1 sont également présentes dans la membrane du réticulum sarcoplasmique jonctionnel où elles établissent des interactions avec la membrane des tubules T permettant la formation de diades et de triades, respectivement (C, D). Réalisé d'après (Brandt et al., 2001; Ito et al., 2001; Komazaki et al., 2002; Komazaki et al., 1999; Komazaki et al., 2001; Nishi et al., 1999; Takeshima et al., 2000; Takeshima et al., 1998).

muscle adulte, il a même été isolé dans les tubules T. MG29 est donc présente dans les deux composants des triades. Dans les membranes, MG29 s'assemble en hexamères ; et deux hexamères implantés dans deux membranes accolées peuvent se dimériser en dodécamères (Brandt et al., 2001). Ces propriétés font de MG29 un candidat potentiel pour la mise en place de la jonction entre les tubules T et le réticulum sarcoplasmique lors de la formation des triades, même s'il n'y a pour l'instant pas de preuve de la présence de MG29 sur les tubules T au cours de la myogenèse embryonnaire. Brandt *et al* proposent également que la formation de dodécamères réunissant des hexamères de MG29 diamétralement opposés au sein d'un tubule T permettrait de maintenir la forme de l'invagination (Brandt et al., 2001) (Figure 25). Cette hypothèse, fondée sur des observations en microscopie électronique de tubules T isolés, est en accord avec le fait que (1) les tubules T sont beaucoup plus larges dans le muscle cardiaque, où MG29 n'est pas exprimée, et (2) les tubules T des souris KO pour MG29 sont dilatés (Nishi et al., 1999).

Enfin, la surexpression de MG29 dans des cellules embryonnaires d'amphibien provoque l'élongation de tubules à partir du réticulum endoplasmique lisse (Komazaki et al., 1999). Ceci est cohérent avec les défauts de développement du réticulum sarcoplasmique observés dans les souris KO. MG29 pourrait donc intervenir tout d'abord dans le développement du réticulum sarcoplasmique, puis dans la mise en place des jonctions qui unissent le réticulum sarcoplasmique aux tubules T au sein des triades et enfin dans le maintien des triades via son rôle structural au sein des tubules T (Figure 25).

II.E.2.c.iii/ Junctophilines

–Identification des junctophilines

De la même manière qu'ils avaient identifié la mitsugumine 29, Takeshima *et al.* ont mis en évidence la présence de la junctophiline 1 (ou mitsugumine 72) à la triade (Takeshima et al., 2000). La famille des junctophilines comprend quatre représentants chez les mammifères : la junctophiline 1 (JP-1) exprimée dans le muscle squelettique, la junctophiline 2 (JP-2) exprimée dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque et les junctophilines 3 et 4 (JP-3 et JP-4) exprimées dans le cerveau. JP-1 et JP-2 sont ancrées dans la membrane du réticulum sarcoplasmique jonctionnel par un domaine transmembranaire situé en C-terminal et elles interagissent avec la membrane plasmique via huit motifs MORN (*m*embrane *o*ccupation and *r*ecognition *n*exus) de liaison aux lipides (Figure 24). Les junctophilines

peuvent donc constituer un pont moléculaire entre le réticulum sarcoplasmique jonctionnel et la membrane des tubules T.

–Rôles des junctophilines dans le muscle squelettique

Les souris KO pour JP-1 et pour JP-2 présentent des défauts dans la formation de leurs triades et meurent à la naissance et à E11,5, respectivement (Ito et al., 2001; Komazaki et al., 2002; Takeshima et al., 2000).

La létalité embryonnaire des souris KO pour JP-2 s'explique par un déficit cardiaque lié à l'absence de formation de couplages périphériques lors du développement des cardiomyocytes (Takeshima et al., 2000). Les couplages périphériques sont les premières jonctions mises en place entre la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique, puis elles sont remplacées par des diades. Ces diades constituent les jonctions matures du muscle cardiaque, alors qu'elles ne sont qu'une étape vers la formation des triades dans le muscle squelettique (voir II.E.1.c) (Figure 25). JP-2 interviendrait donc dans les étapes précoces de la formation des diades dans le cœur. La structure des triades des muscles squelettiques en absence de JP-2 n'a pu être étudiée puisque la mort des souris KO intervient avant le développement des muscles squelettiques.

Les souris KO pour JP-1 meurent peu après la naissance à cause de défauts de fonctionnement de leurs muscles squelettiques liés à des déficits de couplage excitation-contraction (Ito et al., 2001). Chez ces souris, la formation des diades semble normale mais le nombre de triades est réduit. Ces données suggèrent que JP-1 est nécessaire à l'étape de maturation des diades en triades dans le muscle squelettique.

Ainsi, les junctophilines musculaires (JP-1 et JP-2) agiraient de manière séquentielle au cours de la myogenèse : JP-2 permettrait la formation des couplages périphériques, puis JP-1 transformerait les diades en triades. Cette séquence d'évènements est en accord avec le patron d'expression des deux protéines. En effet, dans le muscle squelettique qui présente des triades, JP-2 est exprimée dès E14 (début de la formation des couplages périphériques) alors que JP-1 n'est exprimée qu'à partir de E17 (début de la formation des triades) (voir II.E.1.c). En revanche, dans le muscle cardiaque qui présente des diades, JP-2 est la seule junctophiline à être exprimée et ce, depuis E9,5 (Ito et al., 2001; Komazaki et al., 2002; Takeshima et al., 2000). JP-1 est donc spécifiquement exprimée dans les muscles présentant des triades, et elle

est nécessaire à la maturation des diades en triades. Cependant, JP-1 n'est pas suffisante à la réalisation de ce processus puisque sa surexpression dans le muscle cardiaque ne suffit pas à transformer les diades en triades (Komazaki et al., 2003).

Enfin, des expériences d'expression ectopique dans des cellules embryonnaires d'amphibiens confirment le rôle central joué par les junctophilines dans la mise en place des triades. La surexpression de JP-1 dans ces cellules induit la formation de complexes jonctionnels entre la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique (Takeshima et al., 2000). JP-1 est donc suffisante pour former des jonctions entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Cependant, le fait que sa surexpression dans le muscle cardiaque ne suffise pas à transformer des diades en triades prouve que ce processus nécessite plus que l'établissement d'un simple contact entre la membrane plasmique du tubule T et la membrane du réticulum sarcoplasmique. Il serait intéressant de savoir si JP-2 possède les mêmes capacités puisque c'est elle qui est supposée établir les couplages périphériques dans les muscles cardiaques et squelettiques. En outre, la réalisation d'un KO de JP-2 spécifique du muscle squelettique et d'un double KO JP2 spécifique du muscle squelettique et JP1 permettrait de confirmer l'action séquentielle des junctophilines dans la mise en place des triades du muscle strié squelettique (Figure 25).

II.E.2.c.iv/ Importance de l'innervation pour la maturation des triades

La modification des constituants internes de la cellule musculaire du fait de mutations n'est pas la seule raison pouvant provoquer des défauts d'organisation du réseau membranaire interne. En effet, une étude a démontré l'importance de l'innervation sur l'étape de maturation post-natale des triades (Takekura and Kasuga, 1999). Les auteurs ont comparé l'organisation du réticulum sarcoplasmique et des tubules T dans des muscles de rats contrôles de 7 jours et des muscles de rats de 7 jours ayant subi une dénervation à la naissance. La dénervation provoque une augmentation de la présence des tubules T longitudinaux et une mauvaise orientation des triades. Ces caractères sont typiques d'un défaut de maturation post-natale des triades (voir II.E.1.c). En outre les muscles dénervés présentent des pentades et des heptades, c'est à dire un empilement de trois ou quatre citernes de réticulum sarcoplasmique entre lesquels s'intercalent deux ou trois tubules T (Figure 26). Ces structures ne traduisent pas un problème de maturation, mais plutôt une conséquence annexe de la dénervation. Les pentades

NON LIBRE DE DROIT

Figure 26 : Désorganisation des triades : pentades et heptades.

(A) Une pentade est l'apposition de trois citernes terminales de réticulum sarcoplasmique (RS) entre lesquelles s'intercalent deux tubules T (TT). (A') Schématisation d'une pentade. RyR, récepteur à la ryanodine. (B,C) Dans les muscles rapides des souris KO pour la calséquestrine 1 (*CSI*^{-/-} EDL, B) et les muscles de souris sauvages dénervés à la naissance (C), certaines des triades sont remplacées par des pentades (flèches). Des triades mal orientées sont également retrouvées dans les muscles rapides des souris KO pour la calséquestrine 1 (doubles flèches). En C, les tubules T ont été marqués au ferricyanure de potassium. Barre d'échelle : 0,25 μ m. A, B et C tirés de, et A' réalisé d'après (Paolini et al., 2007; Takekura and Kasuga, 1999).

et heptades pourraient être considérées comme une tentative de compensation de l'absence d'excitation par une augmentation de la surface des unités de relargage du calcium.

Ces résultats démontrent que des facteurs externes sont indispensables à la maturation des triades. Cependant, cette étude ne permet pas de savoir si les défauts de maturation observés sont dus à l'absence d'activité électrique ou à l'absence des facteurs neuronaux libérés par le motoneurone.

II.E.2.d/ Triadine, junctine et calséquestrine

II.E.2.d.i/ Triadine, junctine, calséquestrine : trois membres du complexe de relargage du calcium

Le canal calcique RyR1 n'est pas isolé dans la membrane du réticulum sarcoplasmique jonctionnel. Il est au centre d'un complexe quaternaire de signalisation du calcium composé de la triadine, la junctine et la calséquestrine (Zhang et al., 1997).

Il existe trois isoformes de la triadine qui diffèrent par la longueur de leur extrémité C-terminale : Trisk (*triadin skeletal*) 95 et Trisk 51 qui sont localisées exclusivement à la triade, Trisk 49 qui est présente dans le réticulum sarcoplasmique longitudinal à proximité de la triade et Trisk 32 qui est présente dans tout le réticulum sarcoplasmique (Marty, 2004; Marty et al., 2009; Vassilopoulos et al., 2005). Ces quatre isoformes présentent une structure et des propriétés communes avec une autre protéine de la triade, la junctine. Les triadines et la junctine sont constituées par une région N-terminale cytoplasmique courte, une région transmembranaire qui traverse la membrane du réticulum sarcoplasmique et une région C-terminale intraluménale qui interagit avec RyR1 et la calséquestrine. Du fait de ces interactions, les triadines et la junctine sont considérées comme des protéines d'ancrage permettant la localisation de la calséquestrine dans le réticulum sarcoplasmique jonctionnel. Cependant, les études menées *in vitro* puis *in vivo* montrent que ces deux protéines n'ont pas qu'un rôle structural. En effet, les résultats de ces études, bien que parfois en désaccord, convergent tous vers une implication de la triadine et de la junctine dans l'homéostasie calcique (Oddoux et al., 2009; Shen et al., 2007; Wang et al., 2009). Par exemple, la surexpression ou l'inhibition de l'expression de Trisk 95 *in vitro* bloquent le relargage du calcium induit par la dépolarisation, alors que les deux lignées de souris KO pour la triadine sont déficientes dans le stockage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique mais ne

présentent pas de défaut majeur du couplage excitation-contraction (Oddoux et al., 2009; Rezgui et al., 2005; Shen et al., 2007; Wang et al., 2009).

II.E.2.d.ii/ Rôles de la triadine, de la junctine et de la calséquestrine dans la mise en place des triades

Il avait été montré initialement que Trisk 95 interagissait avec DHPR via son domaine cytoplasmique, et avec RyR1 via son domaine intralumenal, ce qui faisait d'elle un bon candidat soit pour la mise en place soit pour le renforcement de la structure de la triade (Kim et al., 1990). Mais seule l'interaction avec RyR1 a, par la suite, été confirmée, et il a de plus été démontré que DHPR n'est pas nécessaire à la formation de jonction entre la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique (Felder et al., 2002; Guo and Campbell, 1995). Ces deux données s'opposent à un rôle de la triadine dans la mise en place des triades, en créant un lien moléculaire entre DHPR et RyR1.

Récemment des lignées de souris KO pour la triadine (deux lignées), la junctine et l'isoforme de la calséquestrine spécifique du muscle squelettique (CSQ1, calséquestrin 1) ont été générées (Oddoux et al., 2009; Paolini et al., 2007; Shen et al., 2007; Yuan et al., 2007). Seule la souris KO pour la junctine meurt prématurément du fait d'un déficit cardiaque, alors que les trois autres lignées sont viables, fertiles et ont une espérance de vie normale. Cependant, toutes ces lignées présentent des défauts de l'homéostasie calcique musculaire. Du point de vue ultrastructural, les deux lignées KO pour la triadine et la lignée KO pour la calséquestrine (l'ultrastructure musculaire de la lignée KO pour la junctine n'a pas été étudiée) présentent des similarités remarquables : des anomalies de l'organisation des triades sont observées dans les muscles à contraction rapide tels que l'EDL, mais pas dans les muscles à contraction lente tels que le soléaire (Oddoux et al., 2009; Paolini et al., 2007; Shen et al., 2007). L'absence de triadine se traduit par une mauvaise orientation des triades, tandis que l'absence de la calséquestrine 1 provoque non seulement des défauts d'orientation des triades, mais aussi la formation de pentades, d'heptades ou de nonades (voir II.E.2.c.iv pour la définition de ces structures) (Figure 26). Les auteurs suggèrent que les modifications des triades des souris *CSQ1*^{-/-} peuvent être considérées comme une tentative de compensation de la plus faible quantité de calcium à relarguer par une augmentation des unités de relargage du calcium. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que de telles structures sont également retrouvées après dénervation (voir II.E.2.c.iv) (Figure 26). De plus, ils expliquent la

différence entre muscles lents et muscles rapides par le fait que les premiers expriment également la calséquestrine 2 qui pourrait compenser l'absence de la calséquestrine 1 (Oddoux et al., 2009; Paolini et al., 2007; Shen et al., 2007). Il serait intéressant d'observer la structure des triades de souris *CSQI*^{-/-} plus jeunes afin de vérifier si ce phénotype s'aggrave avec l'âge. Ceci permettrait de distinguer entre un rôle dans la mise en place et un rôle dans le maintien de la structure des triades. Dans le cas des souris KO pour la triadine, les défauts de triades observés peuvent s'expliquer par une implication de la triadine dans la réorientation finale des triades, même s'il est difficile d'expliquer la différence entre les deux types de muscles.

Quoiqu'il en soit, ces résultats apportent un degré de complexité supplémentaire dans la compréhension des mécanismes qui régissent la mise en place et/ou le maintien des triades, puisque le métabolisme de la cellule musculaire semble également y jouer un rôle.

La mise en place du réseau membranaire des cellules musculaires fait donc intervenir un grand nombre de protéines. Ces protéines aux fonctions diverses permettent la localisation de certains composants membranaires par rapport aux myofibrilles, la déformation de la membrane plasmique et du réticulum sarcoplasmique, l'établissement de jonctions entre ces deux membranes, ou encore la maturation de ces jonctions en des triades correctement orientées. Cependant, dans la majorité des cas, le mécanisme d'action de ces protéines reste mal connu. En effet, l'identification d'un rôle précis pour chaque protéine intervenant est compliqué par le fait que la mise en place du réseau membranaire nécessite de nombreuses interactions entre les participants et le développement en parallèle de nombreuses structures. De nombreuses études seront encore nécessaires pour clarifier le déroulement de ce processus. Une étape en particulier a été assez peu étudiée : l'alignement des tubules T à la jonction entre la bande A et la bande I. Des études comparatives avec le muscle cardiaque, dans lequel les tubules T sont localisés à la strie Z, seraient certainement très informatives pour essayer de mieux comprendre cette étape.

II.F/ La formation de la jonction neuromusculaire

Les fibres multinuclées des muscles squelettiques se forment par fusions de myoblastes à partir de E11 chez la souris. Peu après, à E12-E13, des motoneurones se développent dans le muscle en construction et s'associent en un nerf moteur. Chez les mammifères, ce nerf s'étend dans la région centrale du muscle, perpendiculairement à l'axe des myotubes. Les axones des motoneurones se ramifient et contactent les fibres musculaires dans une zone adjacente au nerf moteur. Ce contact entre les axones et leur fibre musculaire cible initie une succession d'évènements qui aboutit à la formation d'une zone de communication étroite entre le nerf et la cellule musculaire : la jonction neuromusculaire.

Au cours de cette partie, seules les étapes concernant la mise en place de l'élément post-synaptique (musculaire) seront décrites.

II.F.1/ L'initiation de la formation de la jonction neuromusculaire

L'élément post-synaptique de la jonction neuromusculaire est une structure organisée caractérisée par des replis du sarcolemme au sommet desquels se concentre un grand nombre de récepteurs à acétylcholine (AChR, *acetylcholine receptor*). Avant l'innervation, les AChRs sont répartis de manière diffuse en petits groupes à la membrane des fibres, même s'il semble qu'ils soient un peu plus concentrés dans la région médiane des cellules où le neurone moteur va s'étendre. C'est le « pré-patterning » : la position des futures jonctions neuromusculaires semble pré-établie dans le muscle avant tout contact avec le nerf. Une fois que l'innervation a eu lieu, les AChRs sont trouvés à la jonction neuromusculaire à des concentrations mille fois supérieures à celles des régions extra-synaptiques. De très nombreuses études ont été menées sur la jonction neuromusculaire afin d'identifier les voies et molécules de signalisation impliquées dans le processus d'agrégation des AChRs à la membrane post-synaptique. Trois composants majeurs ont été mis en évidence : l'agrine, son récepteur MuSK (*muscle specific kinase*) et son co-récepteur Lrp4 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 4*). Les souris *agrine*^{-/-}, *MuSK*^{-/-}, *Lrp4*^{-/-} présentent toutes des défauts de la jonction neuromusculaire caractérisés par un déficit d'agrégation des AChRs (DeChiara et al., 1996; Gautam et al., 1996; Weatherbee et al., 2006). MuSK est un récepteur tyrosine kinase situé dans la membrane plasmique de la cellule musculaire, où il est associé à une autre protéine

transmembranaire, Lrp4. L'agrine, un héparane-sulfate protéoglycane sécrété par le motoneurone, se fixe sur MuSK/Lrp4 et active MuSK. L'activation de MuSK provoque alors l'agrégation des AChRs à la jonction neuromusculaire selon des mécanismes qui impliquent le remodelage du cytosquelette d'actine et des membranes.

II.F.2/ Le remodelage de la membrane et du cytosquelette d'actine lors de la formation de la jonction neuromusculaire

II.F.2.a/ L'agrégation des récepteurs à acétylcholine

L'agrégation des récepteurs à acétylcholine est considérée comme l'étape critique nécessaire à l'obtention d'une jonction neuromusculaire fonctionnelle. C'est donc souvent ce processus qui est observé pour juger de la mise en place correcte d'une synapse. Il est possible de simuler la formation d'une jonction neuromusculaire *in vitro* en traitant des myotubes avec de l'agrine ou avec des billes de latex recouvertes de pléiotrophine (un héparane-sulfate protéoglycane) (Peng et al., 1995).

II.F.2.a.i/ Les récepteurs à acétylcholine sont présents dans des rafts

Les rafts lipidiques sont des domaines membranaires ordonnés enrichis en cholestérol et sphingolipides qui se déplacent à l'intérieur des membranes cellulaires. De par leur nature et leur structure, ils incorporent ou excluent sélectivement des protéines. Les rafts sont, par conséquent, supposés jouer le rôle de plateforme membranaire servant au transport et au tri des membranes et à l'assemblage de complexes de signalisation (Ikonen, 2001).

Le fractionnement cellulaire de myotubes en culture a montré que les AChRs sont présents dans des rafts lipidiques (Cartaud et al., 2011; Pato et al., 2008; Stetzkowski-Marden et al., 2006). Cette association n'est pas dépendante de l'agrine ce qui prouve que les AChRs sont constitutivement associés aux rafts, qu'ils soient isolés à la membrane plasmique avant le contact avec le motoneurone ou concentrés à la jonction neuromusculaire. De plus, la destruction des rafts par un traitement à la méthylcyclodextrine, qui supprime le cholestérol, empêche la formation d'agrégats d'AChRs et provoque la dispersion des agrégats existants (Stetzkowski-Marden et al., 2006). Ces résultats montrent que les rafts jouent un rôle central dans l'assemblage des jonctions neuromusculaires en constituant des plateformes d'ancrage

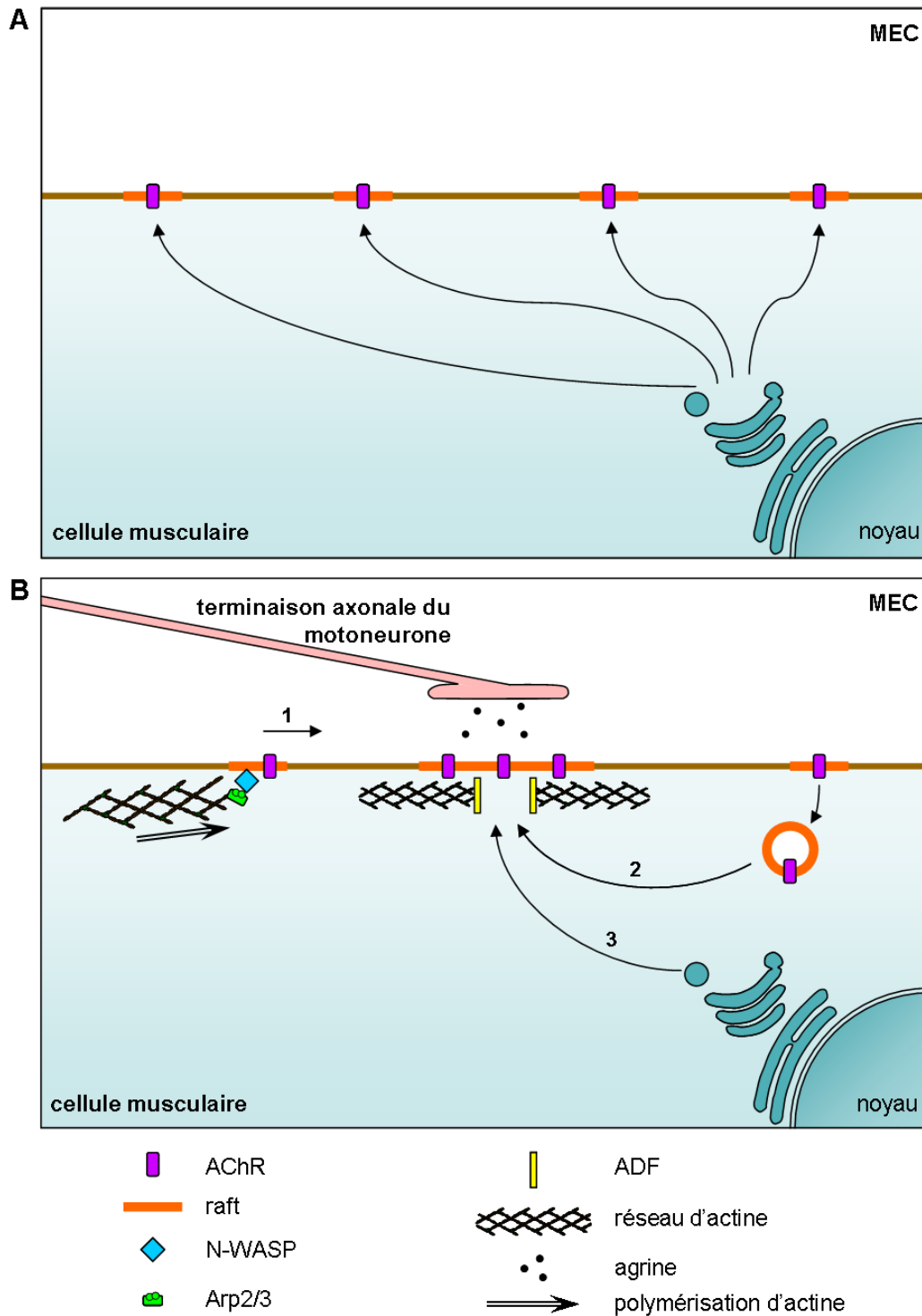


Figure 27 : Agrégation des récepteurs à acétylcholine (AChR).

(A) Avant le contact avec le motoneurone, les AChR sont associés à des rafts dispersés à la membrane plasmique. (B) La libération d'agrine par la terminaison axonale du motoneurone induit le recrutement de N-WASP et Arp2/3 par les rafts ce qui stimule la polymérisation d'actine et permet la coalescence des rafts (1). ADF est activée par l'agrine à l'aplomb de la terminaison axonale ce qui provoque localement la dépolymérisation du réseau d'actine corticale permettant l'exocytose ciblée d'AChR recyclés (2) ou nouvellement synthétisés (3). Réalisé d'après (Cartaud et al., 2011; Lee et al., 2009; Pato et al., 2008; Stetzkowski-Marden et al., 2006).

pour les AChRs. Ces plateformes seraient capables de se déplacer en réponse à une stimulation par l'agrine.

II.F.2.a.ii/ L'agrégation des récepteurs à acétylcholine implique des mouvements de membrane régulés par le cytosquelette d'actine

–Cytosquelette d'actine et jonction neuromusculaire

Plusieurs éléments du cytosquelette d'actine sont enrichis à la jonction neuromusculaire : l'actine F, la cortactine, le complexe Arp2/3 (Bloch, 1986; Dai et al., 2000; Madhavan et al., 2009; Peng et al., 1997). A la jonction neuromusculaire, le cytosquelette d'actine est en constant remaniement et il joue un rôle moteur dans l'agrégation des AChRs. En effet, des inhibiteurs chimiques de la polymérisation de l'actine, des mutants dominants négatifs de Rac et Cdc42, des siRNAs contre la cortactine ou des mutants non fonctionnels de la cortactine inhibent l'agrégation des AChRs induite par l'agrine (Dai et al., 2000; Madhavan et al., 2009; Weston et al., 2000).

–Coalescence de rafts lipidiques

Deux études récentes ont permis de faire un lien entre, d'une part, la nécessité de la polymérisation de l'actine pour agréger les AChRs et, d'autre part, l'hypothèse selon laquelle les rafts portant des AChRs peuvent se déplacer et se réunir pour permettre l'accumulation d'AChRs. L'équipe de Jean Cartaud a tout d'abord démontré, par une étude en microscopie électronique, que l'agrine provoque la coalescence de rafts enrichis en AchRs (Cartaud et al., 2011; Pato et al., 2008). Cette coalescence est corrélée à une réorganisation du cytosquelette cortical et à un recrutement transitoire par les rafts du complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 et de son activateur N-WASP. Ceci suggère que l'agrine provoque le déplacement des rafts porteurs d'AChRs en stimulant des activateurs de la polymérisation de l'actine. Ceci est confirmé par le fait que l'inhibition de l'activité de N-WASP bloque l'agrégation des AChRs induite par l'agrine (Cartaud et al., 2011). Etant donné que l'agrine active les GTPases Rac et Cdc42 via la voie PI3K (*phosphoinositol 3-kinase*), une hypothèse attirante est que PI3K activée par l'agrine, active les GTPases Rac et Cdc42 qui à leur tour stimulent Arp2/3 par l'intermédiaire des NPFs N-WASP et WAVE (Nizhynska et al., 2007). La polymérisation de l'actine serait alors le moteur nécessaire au déplacement et à la coalescence des rafts enrichis en AChRs (Figure 27).

–Trafic vésiculaire vers la jonction neuromusculaire

Une autre manière d'obtenir une accumulation d'AChRs à la jonction neuromusculaire est la mise en place d'un trafic vésiculaire ciblé vers le point de contact avec la terminaison axonale. L'existence d'un tel trafic a été démontré *in vivo* et il s'avère que ce transport vésiculaire vers la jonction neuromusculaire n'est observable que si l'intégrité du motoneurone est préservée (Miana-Mena et al., 2002). Cette étude a apporté la preuve que du transport vésiculaire vers la jonction neuromusculaire existe cependant elle n'a apporté aucune précision quant à la nature des protéines susceptibles d'être transportées. Plus récemment, il a été montré que le cytosquelette d'actine régule le trafic vésiculaire à la synapse. En effet, l'activité du facteur de dépolymérisation de l'actine ADF/cofiline permet l'insertion de nouvelles molécules d'AChRs à la jonction neuromusculaire par exocytose de vésicules intracellulaires (Lee et al., 2009). Les auteurs suggèrent que ce processus pourrait intervenir lors de la synaptogenèse. Suite au signal synaptogénique, les petits groupes d'AChRs dispersés à la surface de la membrane seraient endocytés puis transportés, avec les AChRs nouvellement synthétisés, vers la région post-synaptique en formation (Figure 27).

Il est probable que les deux processus (la coalescence de rafts et le trafic vésiculaire ciblé) participent de concert à la formation de l'élément post-synaptique. Si tel est le cas, cela implique une fine régulation spatiotemporelle du cytosquelette d'actine puisque la coalescence des rafts implique la polymérisation de filaments d'actine à proximité des rafts en déplacement, tandis que l'exocytose de vésicules requiert l'activité d'un facteur de dépolymérisation de l'actine sous la synapse en formation.

II.F.2.b/ La formation des replis de la membrane post-synaptiques

Hormis la forte concentration en canaux ioniques, la membrane post-synaptique de la jonction neuromusculaire est également caractérisée par la présence de nombreux replis. Les AChRs ne sont présents qu'aux sommets de ces replis, si bien que le marquage des AChRs donne à l'élément post-synaptique un aspect de bretzel. La manière dont se forment ces replis est peu connue et peu étudiée. Une étude récente a mis en évidence l'existence de structures ressemblant à des podosomes au sein de la plaque motrice de jonctions neuromusculaires en formation *in vitro* (Proszynski et al., 2009). Les podosomes sont des protrusions

membranaires riches en actine qui sont capables de remodeler/dégrader la matrice extracellulaire et qui sont supposées intervenir dans la migration cellulaire. Les structures observées dans la plaque motrice présentent toutes les caractéristiques des podosomes conventionnels si bien qu'elles ont été baptisées « podosomes synaptiques ». La membrane de ces podosomes synaptiques est totalement dépourvue d'AChRs. Ainsi, la formation des podosomes s'accompagne d'une exclusion des AChRs de certaines zones de la plaque motrice. De plus, les podosomes sont capables de se déplacer au sein de la plaque motrice. Les auteurs suggèrent donc qu'au cours de leur déplacement, les podosomes synaptiques remodelent la matrice extracellulaire et excluent les AChRs de certaines zones de la membrane ce qui aboutirait à une jonction neuromusculaire en forme de bretzel. Il reste maintenant à vérifier si ces podosomes synaptiques sont également présents *in vivo* et s'ils remplissent les mêmes fonctions.

La myogenèse embryonnaire est un processus complexe basé sur des modifications morphologiques des cellules et de leurs structures internes via un remodelage du cytosquelette d'actine et des membranes. Ces transformations impliquent donc l'intervention coordonnée et spatiotemporellement contrôlée de facteurs régulant l'organisation du cytosquelette d'actine et l'homéostasie membranaire.

III/ Remodelage de la membrane et du cytosquelette d'actine dans le muscle adulte

A la naissance ou peu après, les muscles striés squelettiques ont achevé leur maturation et présentent toutes les caractéristiques structurales et fonctionnelles des muscles adultes. Comme dans tous les organes, les composants cellulaires vont par la suite être progressivement renouvelés tout au long de la vie du muscle. Mais le muscle strié squelettique présente en plus la particularité d'être en permanence soumis à des contraintes mécaniques liées à la succession des phases de contraction et d'étirement. Ces contraintes mécaniques sont perçues par les myofibrilles mais aussi par le réseau membranaire qui les entoure et notamment par la membrane plasmique qui est de fait sujette à de nombreuses réparations.

III.A/ Le maintien des éléments contractiles du cytosquelette

III.A.1/ La longueur des filaments fins d'actine

III.A.1.a/ Les filaments d'actine polymérisent et dépolymérisent par leurs deux extrémités

Pendant longtemps, les filaments d'actine dans les myofibrilles matures ont été considérés comme des structures très stables. Le taux d'échange entre les monomères d'actine des myofibrilles et des molécules d'actine G libres dans le sarcoplasme était par exemple supposé être de l'ordre de quelques heures (Martonosi et al., 1960). Des études plus récentes ont montré au contraire que les filaments d'actine sarcomériques de cardiomyocytes *in vitro* sont capables d'incorporer de l'actine G exogène en quelques minutes sans que l'organisation globale des myofibrilles ne soit altérée (Littlefield et al., 2001). Le même genre d'étude menée *in vivo* chez le poisson zèbre avec de l'actine taggée avec la GFP (*green fluorescent protein*) confirme ces résultats (Sanger et al., 2009). Des observations plus précises ont permis de montrer que l'incorporation de monomères d'actine G a lieu à l'extrémité barbue mais aussi à l'extrémité pointue des filaments d'actine sarcomériques (Littlefield et al., 2001). Ceci prouve que les extrémités des filaments fins d'actine peuvent polymériser et dépolymériser malgré la présence de CapZ et de la tropomoduline qui coiffent les extrémités barbues et pointues,

respectivement. Mais ce qui est encore plus étonnant c'est que, contrairement à ce qu'il se passe dans les structures d'actine non musculaires, le renouvellement de l'actine est plus important à l'extrémité pointue qu'à l'extrémité barbue. En effet, lorsque l'incorporation d'actine G est spécifiquement bloquée à l'extrémité barbue par la cytochalasine D, la taille des filaments d'actine est maintenue au bout d'une heure de traitement. En revanche, lorsque l'incorporation d'actine G est spécifiquement bloquée à l'extrémité pointue par une surexpression de tropomoduline, la taille des filaments d'actine est diminuée d'environ 10 % (Littlefield et al., 2001). Par conséquent, la régulation de l'actine à l'extrémité pointue des filaments est considérée comme un mécanisme important pour maintenir constante la taille des filaments d'actine sarcomériques.

III.A.1.b/ La dynamique des filaments d'actine dépend de la contractilité

Des études de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que les filaments d'actine sarcomériques récupèrent effectivement la fluorescence après photoblanchiment, mais cette récupération ne dépasse pas la valeur de 50-60 % (Hasebe-Kishi and Shimada, 2000; Sanger et al., 2009). Ceci confirme le renouvellement des monomères d'actine au sein des filaments fins, mais le fait que la récupération ne dépasse pas 60 % suggère la présence de deux populations de filaments d'actine : des filaments d'actine dynamiques qui récupèrent leur fluorescence rapidement et des filaments d'actine plus stables qui ne récupèrent pas ou très lentement leur fluorescence. Une autre étude de FRAP menée sur des cardiomyocytes a en outre mis en évidence que la récupération de la fluorescence par la population de filaments d'actine dynamiques dépend de la capacité des cellules à se contracter. En effet, la récupération de la fluorescence a lieu dans les cardiomyocytes qui se contractent mais pas dans ceux qui ont arrêtés de se contracter (soit naturellement soit après ajout d'un inhibiteur de contraction) (Skwarek-Maruszewska et al., 2009). La signification de ce processus reste pour l'instant mal comprise, mais on peut imaginer qu'il permettrait d'éliminer les myofibrilles endommagées qui ne sont plus aptes à se contracter.

III.A.2/ Le maintien des myofibrilles

L'inutilisation d'un muscle conduit à une réduction de son volume : c'est l'atrophie musculaire. A l'échelle cellulaire, cette atrophie se traduit par une réduction du diamètre des fibres qui s'accompagne d'une baisse du nombre de myofibrilles au sein des cellules. La section du nerf moteur innervant un muscle conduit également à une atrophie musculaire avec réduction de la taille des fibres. Cependant, alors que l'immobilité d'un muscle conduit à une perte d'une partie des myofibrilles, la dénervation s'accompagne en plus d'une désorganisation des myofibrilles restantes (Takekura et al., 1996a). En effet, alors que la structure des myofibrilles n'est pas affectée par 4 semaines d'immobilisation, la dénervation provoque une perte de l'alignement des myofibrilles qui s'aggrave avec le temps. Ceci suggère que les structures qui lient les myofibrilles adjacentes telles que la desmine ou l'obscurine sont perdues suite à la dénervation ce qui n'est pas le cas lors d'une immobilisation. Cette différence peut s'expliquer par le fait que l'immobilisation bloque l'activité musculaire volontaire, mais, contrairement à la dénervation, elle n'interrompt ni l'activité nerveuse réflexe ni la libération de facteurs par la terminaison nerveuse (notamment les facteurs neurotrophiques).

Dans des cultures de cardiomyocytes, l'inhibition chimique des canaux calcium bloque l'entrée de calcium et empêche la contraction des cellules. Cette inhibition des canaux calcium, même prolongée (72h), n'affecte pas la structure des myofibrilles (Horackova et al., 2000). Il semble donc que l'activité électrique ne soit pas requise pour le maintien de l'organisation sarcomérique. Ceci suggère que la persistance de la structure des myofibrilles dépend de facteurs chimiques libérés par le muscle, plutôt que de la stimulation électrique du muscle par le nerf.

III.B/ Le maintien du sarcolemme et des structures associées

A chaque contraction, le sarcolemme est contraint d'accommoder sa forme en raison de la réduction de longueur de la fibre. Il forme alors des replis le long de la cellule. L'ancrage du sarcolemme à la matrice extracellulaire et au cytosquelette interne via des costamères régulièrement répartis le long de la fibre permet de répartir équitablement les contraintes mécaniques subies par la membrane sur toute la longueur de la cellule musculaire (voir I.B.3.a.i).

III.B.1/ Origines des lésions membranaires : l'apport de l'étude des dystrophies

Les dystrophies musculaires sont des troubles musculaires héréditaires caractérisés par une atrophie et une faiblesse progressives des muscles. Une partie de ces dystrophies est due à des mutations dans les gènes codant pour les composants des costamères.

III.B.1.a/ Les gènes impliqués dans les dystrophies causées par des défauts de connections à la matrice extracellulaire

La dystrophie musculaire la plus fréquente est la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD, *Duchenne muscular dystrophy*) avec une incidence de 300 sur 1000000 de naissances de garçons (Emery, 2002). Elle se caractérise par des difficultés motrices à partir de l'âge de 6 ans. Puis la faiblesse musculaire progresse jusqu'à la mort des patients qui survient vers l'âge de 20 ans des suites de déficits cardiorespiratoires. Le gène responsable de la DMD a été localisé sur le chromosome X, il code pour la dystrophine. Les mutations causant la DMD aboutissent à une absence de production de dystrophine. La dystrophie musculaire de Becker (BMD, *Becker muscular dystrophy*), une dystrophie au phénotype plus modéré, est également due à des mutations dans la dystrophine, mais ces mutations conduisent à la production d'une protéine partiellement fonctionnelle.

La dystrophine appartient au complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC) (voir I.B.3.a) qui est l'un des complexes présents aux costamères et qui assure le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette sarcomérique en passant par le sarcolemme. De nombreuses autres protéines, dont les sarcoglycanes, interviennent dans le DGC (Figure 6). Des mutations causant une perte de fonction de l' α -sarcoglycane, du β -sarcoglycane, du γ -sarcoglycane et du δ -sarcoglycane sont associées à des dystrophies musculaires des ceintures (LGMD, *limb girdle muscular dystrophy*) : LGMD2D, 2E, 2D, 2F, respectivement (Emery, 2002).

Les costamères sont également composés de complexes focaux d'adhérence dont la clé de voûte est l'intégrine $\alpha 7$ qui se lie à la laminine extracellulaire comme le DGC. Des mutations dans les gènes codant pour l'intégrine $\alpha 7$ et la laminine causent des dystrophies musculaires congénitales (CMD, *congenital muscular dystrophy*). Ceci indique que des défauts dans ces protéines sont responsables de déficits musculaires qui apparaissent au cours du développement, ce qui suggère une implication dans la mise en place des muscles (voir

II.D.3). Dans cette partie consacrée au maintien de la structure du muscle adulte, je ne m'intéresserai donc qu'aux dystrophies mentionnées plus haut et à leurs causes.

III.B.1.b/ La principale cause des dystrophies causées par des défauts de connections à la matrice extracellulaire : la fragilité membranaire

Les formes sévères de dystrophies comme la DMD (voir III.B.1.a) peuvent être mise en évidence précocement par la présence de taux élevés d'enzymes intramusculaires, telles que la créatine kinase, dans le sérum des patients (Ebashi et al., 1959). En outre des marquages histochimiques montrent la présence à l'intérieur des cellules musculaires de quantités anormalement élevées de colorants imperméables aux membranes (Petrof et al., 1993). Ces observations suggèrent un dysfonctionnement de la membrane plasmique. En effet, des analyses de microscopie électronique ont révélé de nombreuses lésions dans la membrane des cellules musculaires dystrophiques (Wakayama et al., 1983). De plus, le taux sérique de créatine kinase des patients DMD n'est pas constant : il augmente après une activité physique et diminue après une période de repos (Ozawa et al., 1999). Ainsi, la désorganisation des costamères serait à l'origine d'une plus grande sensibilité du sarcolemme vis à vis des blessures causées par les contractions. Ceci a été confirmé par l'analyse des tests de sensibilité au stress mécanique induit par des contractions excentriques. Ce type de protocole consiste à déclencher des contractions sur un muscle étiré ce qui induit un stress majeur sur la membrane des cellules musculaires. Lorsqu'ils sont soumis à des contractions excentriques, les muscles des souris *mdx* (*X-linked muscular dystrophy*, le modèle murin de la DMD) présentent une plus grande quantité de lésions membranaires que les muscles des souris sauvages (Petrof et al., 1993). Ces résultats montrent que la bonne organisation des costamères, et donc le lien entre cytosquelette interne et matrice extracellulaire, sont indispensables au maintien de l'intégrité structurale des cellules musculaires et notamment de leur membrane au cours des cycles de contraction-étirement.

III.B.2/ Comblent les lésions membranaires : réparation et régénération

La présence de mutations dans les composants des costamères provoque l'exacerbation d'un phénomène qui se produit aussi, mais avec une intensité moindre, dans les muscles sains : la formation de lésions membranaires en réponse au stress induit par la contraction (Petrof et al., 1993).

NON LIBRE DE DROIT

Figure 28 : Dysferlinopathie et dysferline

(A) Cliché de microscopie électronique à transmission d'un muscle squelettique de patient souffrant de dysferlinopathie. De très nombreuses vésicules intracellulaires sont accumulées sous une zone où le plasmalemme est interrompu. Barre d'échelle : 1 μ m. (B) Immunomarquage de la dysferline sur une coupe transversale de muscle squelettique de patient contrôle. (C) Schéma de la structure protéique de la dysferline. La dysferline présente un domaine transmembranaire (TM) en C-terminal, des domaines FerA, FerB, DysFN et DysFC, et sept domaines C2 (C2A, C2B, C2C, C2D, C2E, C2F, C2G). A et B tirés de, et C réalisé d'après (Anderson et al., 1999; Selcen et al., 2001).

Or la rupture de l'intégrité du sarcolemme constitue un danger pour la cellule puisque cela perturbe l'homéostasie cellulaire en offrant une porte de sortie à des composés cellulaires indispensables, et une porte d'entrée à des facteurs extracellulaires nocifs. Dans le muscle, il existe deux types de réponses à ces lésions membranaires qui sont déclenchées en fonction de l'intensité des dommages subis.

III.B.2.a/ Réparation et dysferline

III.B.2.a.i/ L'apport des dysferlinopathies

La première réponse intracellulaire déclenchée suite à un dommage membranaire est l'activation du système de réparation auquel participe la dysferline. La dysferline est une protéine homologue de la protéine FER1 de *Caenorhabditis elegans* qui est nécessaire à la fusion de vésicules intracellulaires à la membrane plasmique des spermatozoïdes (Achanzar and Ward, 1997). Dans le muscle squelettique, la dysferline est localisée à la membrane plasmique (Anderson et al., 1999). En effet, la dysferline possède un domaine transmembranaire en C-terminal et plusieurs domaines C2 dont le premier lie les phospholipides de manière dépendante du calcium (Figure 28) (Davis et al., 2002). Ces domaines sont trouvés dans de nombreuses protéines associées aux membranes, dont les protéines impliquées dans les événements de fusion membranaire comme les synaptotagmines. Des mutations dans la séquence codante de la dysferline provoquent deux formes distinctes de dystrophies musculaires nommées dysferlinopathies : la dystrophie musculaire des ceintures de type 2B (LGMD2B, *limb girdle muscular dystrophy 2B*) et la myopathie de Miyoshi (Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998). La LGMD2B est caractérisée par la faiblesse des muscles proximaux, tandis que la myopathie de Miyoshi affecte d'abord le gastrocnemius puis la musculature distale. Les muscles des patients porteurs de mutations dans la dysferline et des souris KO pour la dysferline sont caractérisés par des discontinuités membranaires associées à des accumulations sous-membranaires de vésicules (Figure 28) (Bansal et al., 2003; Selcen et al., 2001). Ce phénotype suggère que l'absence de la dysferline provoque un défaut de fusion des vésicules.

III.B.2.a.ii/ Le mécanisme de réparation des membranes par la dysferline

Les mécanismes impliqués dans la réparation des membranes par la dysferline sont étudiés à l'aide de modèles *in vitro* de blessures membranaires. Les cellules peuvent être blessées par égratignure (à l'aide d'un scalpel par exemple), par étirement (en les cultivant sur un substrat extensible), par microperforation (à l'aide de microseringues), par irradiation laser et plus rarement par électroporation ou sonoporation (aux ultrasons). Puis le bon déroulement de la réparation membranaire peut être évalué grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents imperméables aux membranes (Bansal et al., 2003; Belete et al., 2010). De même le temps nécessaire à la réparation membranaire peut être déterminé en détectant l'arrêt de l'entrée des marqueurs fluorescents dans la cellule blessée. L'utilisation de ces techniques a démontré l'implication de la dysferline dans ce processus. En effet, la réparation de la membrane est achevée en quelques secondes dans les fibres contrôles, alors qu'elle est inexistante dans les fibres KO pour la dysferline (Bansal et al., 2003).

La réparation de la membrane par la dysferline est dépendante du calcium. En effet, des fibres blessées en présence d'EGTA, un chélateur des ions calcium, sont incapables de réparer leurs lésions membranaires (Bansal et al., 2003). Ceci est cohérent avec les études *in vitro* qui ont montré que le premier domaine C2 de la dysferline est capable de lier les phosphoinositides membranaires exclusivement en présence de calcium. Cette interaction entre la dysferline et les phosphoinositides est indispensable à la fonction de la dysferline. En effet, la mutation V67D située dans le premier domaine C2 de la dysferline empêche la liaison aux phosphoinositides et cette mutation est associée à la LGMD2B (Davis et al., 2002).

Enfin plusieurs études ont montré que la formation d'une blessure membranaire est rapidement suivie par l'accumulation de vésicules intracellulaires sous la blessure (Cai et al., 2009; Klinge et al., 2007; Miyake and McNeil, 1995). Ces vésicules seraient notamment des lysosomes puisque la portion lumenale du marqueur des lysosomes LAMP1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*) est retrouvée à la surface des cellules musculaires ayant réparé une lésion membranaire (Lennon et al., 2003). L'exocytose de ces vésicules intracellulaires a lieu en même temps que le recrutement de la dysferline au site de la blessure (Klinge et al., 2007).

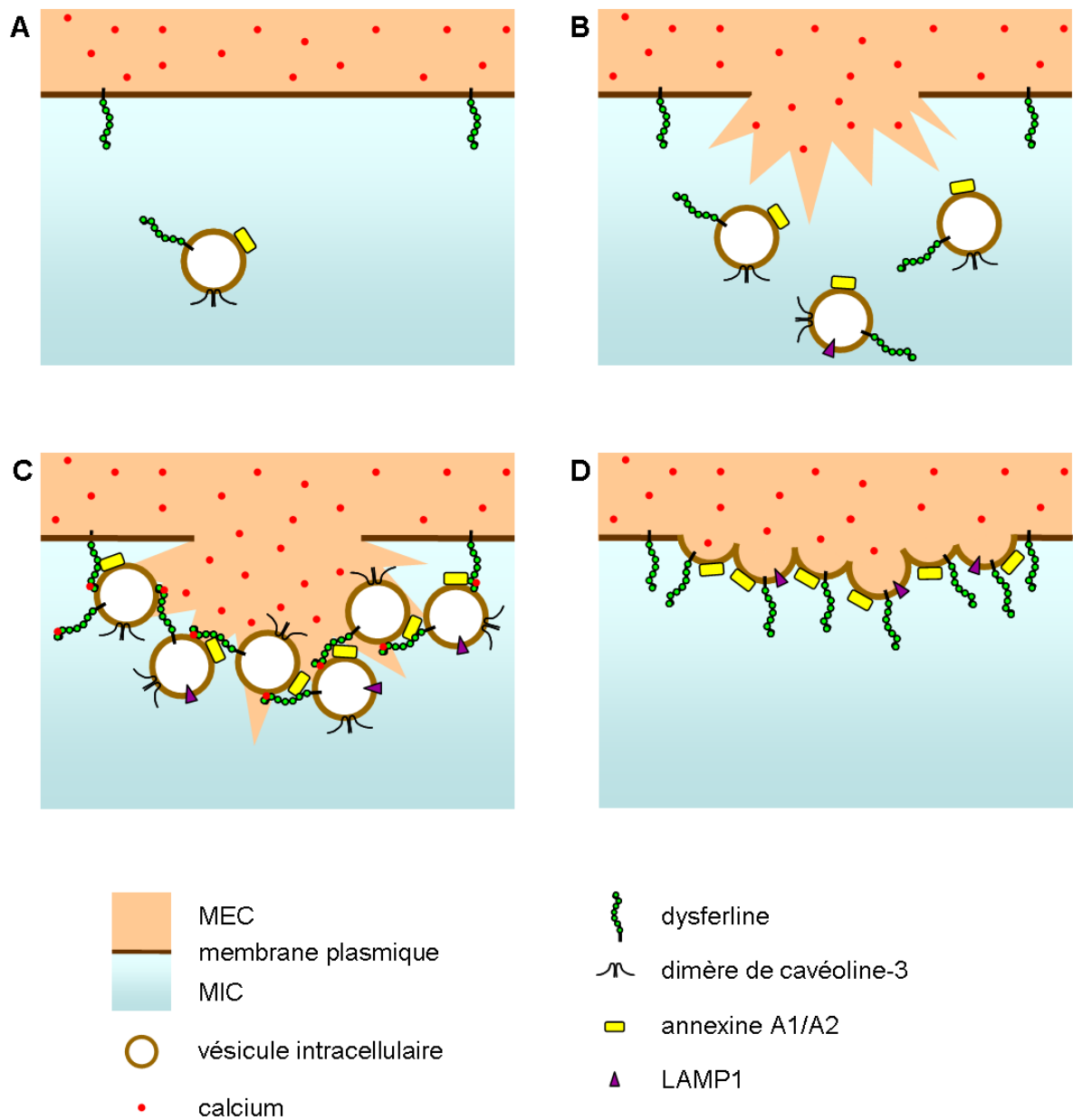
L'ensemble de ces résultats démontre de manière indiscutable l'implication de la dysferline dans le processus de réparation des lésions membranaires. Un modèle peut même

être évoqué : la rupture de l'intégrité de la membrane plasmique permet un afflux de calcium extracellulaire dans la cellule déclenchant l'exocytose de vésicules intracellulaires (dont des lysosomes) vers le site de la blessure. La hausse de la concentration en calcium provoque la fixation de la dysferline sur ces vésicules. La dysferline stimule alors la fusion des vésicules avec la membrane plasmique ce qui aboutit à la réparation de la lésion (Figure 29).

III.B.2.a.iii/ Les interacteurs de la dysferline

La mise en évidence de nouveaux interacteurs de la dysferline a permis de compléter le modèle précédemment évoqué (voir III.B.2.a.ii). La dysferline interagit avec les annexines A1 et A2 (Lennon et al., 2003). Les annexines sont des protéines capables de lier le cytosquelette d'actine et sont impliquées dans le trafic intracellulaire. L'interaction de la dysferline avec les annexines A1 et A2 est augmentée en présence de calcium. De plus, l'annexine A1 est recrutée au site de blessure membranaire et son inhibition (par un anticorps, un peptide compétiteur ou un mutant dominant négatif) empêche la réparation de la blessure (McNeil et al., 2006). L'annexine A1 joue donc un rôle essentiel au cours de la réparation. La dysferline interagit également avec AHNAK, une protéine géante qui peut former un complexe associé à la membrane plasmique comprenant l'annexine A2, S100A10 et l'actine. AHNAK a de plus été trouvée associée aux enlargeosomes, qui sont une autre source de membrane interne pour la réparation (Cerny et al., 2004). Ceci suggère que la dysferline, les annexines A1 et A2 et AHNAK pourraient agir de concert dans le transport des vésicules jusqu'au site de la blessure.

La dysferline interagit également avec la cavéoline 3 et celle-ci est nécessaire au transport de la dysferline vers les sites de lésions membranaires (Cai et al., 2009; Hernandez-Deviez et al., 2006). En effet, en absence de cavéoline 3 ou en présence de cavéoline 3 mutée qui s'accumule dans l'appareil de Golgi (mutant P104L qui cause la LGMD1C) (Galbiati et al., 1999), la dysferline reste accumulée dans l'appareil de Golgi et n'est pas recrutée sur le site de la blessure. Le transport de la dysferline vers les sites de réparation pourrait donc se faire via des cavéoles. Cependant, la présence des cavéoles parmi les vésicules exocytées suite à la blessure n'a jamais été testée. De manière intéressante, les patients atteints de DMD et les souris *mdx* présentent des niveaux protéiques élevés de cavéoline 3. Ceci pourrait être le signe d'un effet compensatoire visant à augmenter le transport de la dysferline vers les nombreux sites de lésions des membranes (Vaghy et al., 1998).



Enfin, la dysferline interagit avec la calpaïne 3 qui est une protéase dépendante du calcium (Huang et al., 2005). Parmi les cibles de la calpaïne 3, se trouvent notamment AHNAK et les annexines. Le clivage de l'annexine A1 par la calpaïne augmente son affinité pour les phospholipides. Ainsi, la calpaïne 3 pourrait être recrutée par la dystrophine sur les sites de réparation où elle pourrait alors réguler la fixation de l'annexine A1 aux membranes avec des conséquences actuellement peu claires.

La dysferline assure donc la réparation de lésions membranaires restreintes en permettant la fusion de vésicules intracellulaires qui vont combler la blessure. Cependant, si la lésion est trop importante, un autre mécanisme se met alors en action.

III.B.2.b/ Régénération et cellules satellites

Dans le muscle adulte, des cellules quiescentes sont associées aux fibres musculaires. Ces cellules, appelées cellules satellites, sont issues des précurseurs myogéniques qui ont colonisé le corps lors de la myogenèse embryonnaire. Mais contrairement aux myoblastes qui se sont différenciés pour constituer des fibres musculaires, ces cellules sont restées quiescentes à proximité des cellules musculaires.

Les cellules satellites assurent deux rôles principaux : (1) elles assurent la croissance post-natale du muscle en se transformant en myoblastes qui sont alors capables de fusionner avec les myofibres existantes ; (2) elles interviennent lors de la régénération musculaire qui est déclenchée lorsque le muscle subit une ou des blessures importantes. En réponse à une blessure, les cellules satellites sont activées. Elles commencent alors à proliférer. Une partie des cellules filles obtenues servent à maintenir le stock de cellules satellites, tandis que les autres sortent du cycle cellulaire, se différencient et fusionnent avec la myofibre lésée. Alternativement, les cellules satellites peuvent également fusionner entre elles et former ainsi de nouvelles myofibres. Les mécanismes de remodelage du cytosquelette et des membranes impliqués dans les étapes de fusion des cellules satellites sont communs avec ceux rencontrés lors de la myogenèse embryonnaire (voir II.C). La différence entre ces deux processus de fusion tient essentiellement au niveau des signaux de recrutement et d'activation. En effet, certains sont communs comme le HGF, et d'autres sont propres à la régénération. C'est le cas

notamment du TNF libéré par les cellules inflammatoires qui apparaissent lors de la dégénérescence du muscle (Karalaki et al., 2009).

III.C/ Le maintien du réseau membranaire interne

III.C.1/ Le rôle des myofibrilles

Dans le muscle strié squelettique adulte de mammifères, les triades sont alignées à la jonction bande A – bande I. Cette localisation des triades suggère qu'elles sont ancrées sur les myofibrilles. Cependant le mode d'ancrage reste sujet à débat. En effet, l'étude de fibres musculaires de rat isolées chimiquement a montré que la position des triades dépend de la longueur des sarcomères (Takekura et al., 1996b). En effet, cette étude montre que la distance entre les triades et leur strie Z adjacente varie proportionnellement à la longueur du sarcomère (Figure 30A, colonne de gauche). En outre, l'élimination sélective des filaments épais de myosine d'un muscle adulte au repos par incubation des fibres dans une solution de force osmotique élevée cause un rapprochement entre triades et stries Z. Et surtout, lorsque les filaments épais sont absents, la distance entre les triades et leur strie Z adjacente reste constante quel que soit l'état d'étirement des sarcomères (Figure 30A, colonne de droite). Ces résultats suggèrent que, dans le muscle adulte, les triades sont ancrées aux filaments épais et aux stries Z par des structures élastiques susceptibles d'être étirées et comprimées au gré des variations de longueur des sarcomères (Figure 30B). Par contre, l'orientation des triades n'est pas affectée par l'absence des filaments épais suggérant que le maintien de leur direction dans le muscle adulte est dépendant d'un autre système d'ancrage.

Une autre étude réalisée sur des préparations de muscles entiers a montré, au contraire, que la distance entre les triades et la strie Z adjacente ne dépend pas de la longueur des sarcomères (Brown et al., 1998). Les auteurs suggèrent que la position des triades est déterminée par l'ancrage du réticulum sarcoplasmique à la strie Z. Ils expliquent les divergences entre leurs résultats et les résultats de Takekura *et al.* par le fait que ces derniers ont travaillé sur des fibres musculaires isolées chimiquement et dans une gamme de longueurs de sarcomères dont les valeurs extrêmes ne sont pas physiologiques. Ceci aurait pu modifier les propriétés mécaniques des structures sarcomériques et membranaires de la cellule musculaire.

Le système d'ancrage des triades n'a donc pas encore été clairement identifié. Cependant, les deux études précitées s'accordent sur le fait que la strie Z semble jouer un rôle central.

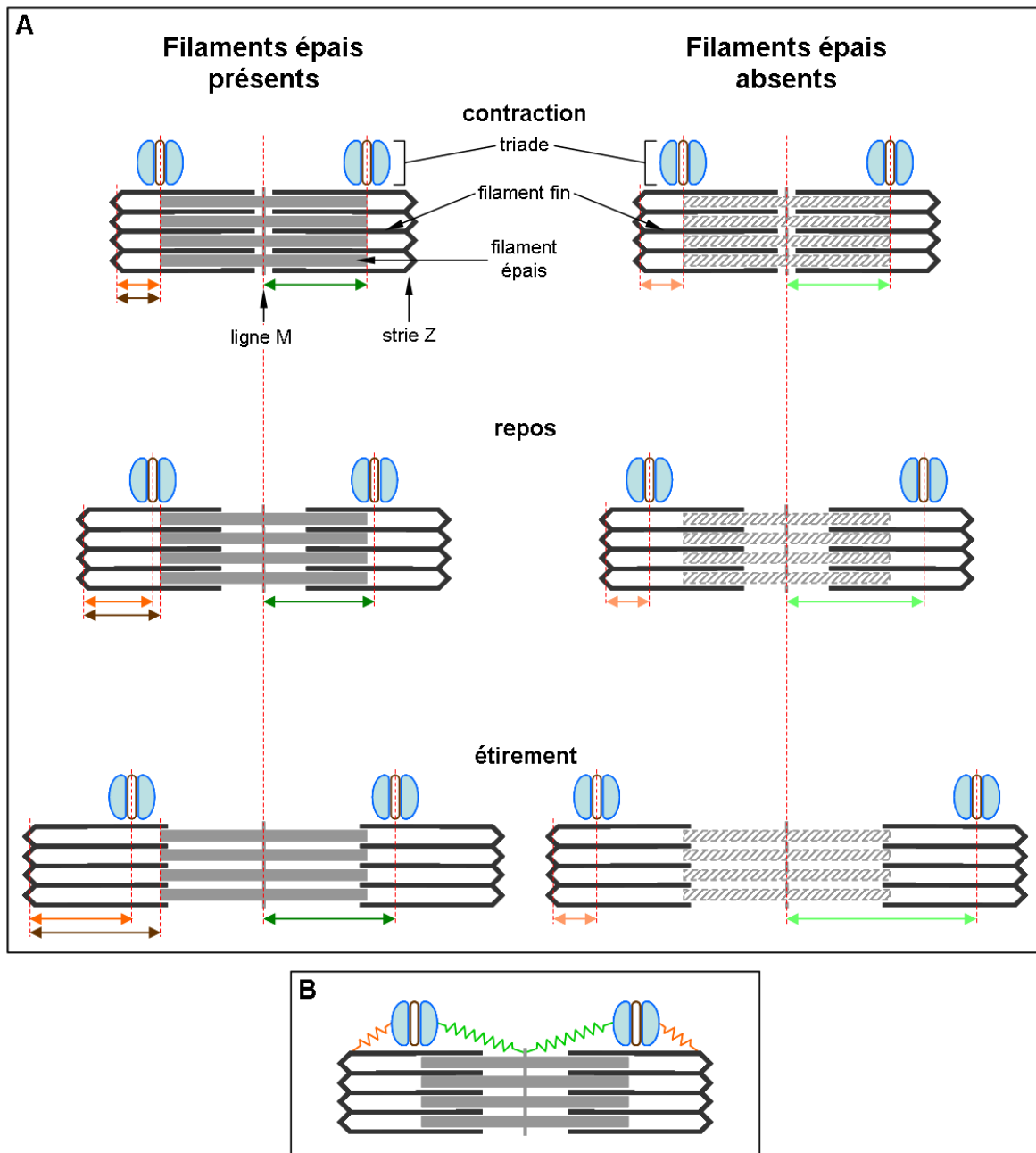


Figure 30 : Effet de la taille des sarcomères sur la position des triades.

(A) Effet de l'état de contraction des sarcomères et de l'absence des filaments épais sur la position des triades. Les sarcomères avec (colonne de gauche) ou sans filaments épais (colonne de droite) sont présentés soit contractés (en haut), soit au repos (au centre), soit étirés (en bas). Dans chaque cas, la distance entre la triade et la strie Z est représentée par une flèche orange et la distance entre la triade et la ligne M est représentée par une flèche verte. En présence des filaments épais, la distance entre la strie Z et la triade augmente avec l'allongement des sarcomères. Cependant cette distance augmente moins vite que la distance entre la strie Z et la jonction bande A – bande I (flèches marrons). En absence de filaments épais, la distance entre la strie Z et la triade reste constante quelle que soit la longueur du sarcomère. Ceci suggère l'existence de structures élastiques reliant la triade à la strie Z d'une part et aux filaments épais (peut-être à la ligne M) d'autre part, comme représenté sur le modèle (B). (B) Modèle suggérant l'existence de structures élastiques reliant la triade à la strie Z et aux filaments épais (peut-être à la ligne M). Réalisé d'après (Takekura et al., 1996b).

III.C.2/ Le rôle de l'innervation

L'influence de l'innervation sur le réseau membranaire interne des muscles squelettiques a été étudiée par le biais d'expérience de dénervation. L'observation de muscles 1, 2, 3 et 4 semaines après dénervation montre une désorganisation des membranes internes caractérisée par une augmentation de la présence de tubules T et de triades orientées longitudinalement, et l'apparition de pentades et d'heptades (empilement de trois ou quatre citernes terminales de réticulum sarcoplasmique entre lesquelles s'intercalent deux ou trois tubules T) (Takekura et al., 1996a). Ces caractéristiques phénotypiques s'aggravent au cours du temps suivant la dénervation. Cependant l'apparition de tubules T et de triades orientées longitudinalement peut être une conséquence secondaire de la perte de l'alignement des myofibrilles consécutive à la dénervation (voir III.A.2). Les tubules T longitudinaux pourraient simplement être des parties de tubules T étendues entre des portions de tubules T transverses qui ne sont plus alignées. Par contre, l'apparition des pentades et des heptades semble difficilement explicable par la désorganisation des myofibrilles. Ces structures sont également observées lors d'une dénervation transitoire obtenue par congélation du nerf moteur en le mettant au contact d'une tige métallique refroidie dans l'azote liquide (Takekura et al., 2003). Or, de manière très intéressante, les pentades et heptades qui sont formées suite à la dénervation, disparaissent lors de la réinnervation du muscle. Ces empilements de triades sont donc bien des structures spécifiquement induites par la dénervation. De plus, DHPR et RyR1 sont bien présents dans les heptades et les pentades ce qui accrédite l'hypothèse qui consiste à interpréter ces structures comme une compensation de l'absence de signal électrique par une augmentation de l'étendue des unités de relargage du calcium.

III.C.3/ Les effets de l'exercice

L'inutilisation forcée du muscle induit des modifications de la structure du réseau membranaire interne (voir III.C.2), mais sa contraction répétée a également des effets. L'induction d'une fatigue musculaire chez la grenouille par stimulations électriques répétées conduit à des modifications de l'ultrastructure des triades : le diamètre des tubules T est augmenté de 35 % (Usher-Smith et al., 2007). Cette augmentation est homogène sur toute la longueur des tubules T. D'autres études ont montré que la fatigue musculaire obtenue par une stimulation téτανique des muscles pendant quelques minutes provoque des vacuolisations ponctuelles des tubules T qui apparaissent entre 5 et 10 min après l'arrêt des stimulations

tétaniques. Ces vacuolisations correspondent au gonflement des tubules T en certains points, de telle sorte que ces zones renflées ressemblent à des vacuoles. Cette altération de la morphologie des tubules T est réversible puisqu'elle disparaît après 2 ou 3 h lorsque le muscle est placé au repos (Krotenko and Lucy, 2001; Lannergren et al., 2002). Le gonflement des tubules T s'expliquerait par un déséquilibre entre l'entrée de fluide dans leur lumière et la sortie des fluides vers le milieu extracellulaire par leur ouverture. Le responsable de ce déséquilibre serait l'acide lactique. En effet, une activité musculaire intense s'accompagne d'une augmentation du métabolisme des cellules musculaires qui provoque notamment une accumulation intracellulaire d'acide lactique. Cet acide lactique est, par la suite, exporté de manière active par des transporteurs de la membrane plasmique. Les tubules T représentent une très grande part de la membrane plasmique de la cellule musculaire, si bien qu'une grande quantité d'acide lactique est exportée dans la lumière des tubules T. L'acide lactique étant une molécule osmotiquement active, son afflux dans les tubules T s'accompagne d'un afflux d'eau qui provoque le gonflement des tubules T.

La vacuolisation des tubules T n'a été observée que chez la grenouille ; il reste maintenant à savoir si un tel processus se rencontre dans d'autres espèces et notamment chez les mammifères.

Le remodelage du cytosquelette d'actine et des membranes au cours de la myogenèse est réalisé par des facteurs internes aux cellules musculaires et à leurs motoneurones. Après la naissance, les muscles sont davantage sollicités. Leur mise en action a un double effet : un effet global de maintien de l'organisation cellulaire (régulation de la longueur des filaments fins, entretien des myofibrilles, maintien des triades) et un effet spatialement restreint d'altération de certains composants (lésions du plasmalemme et vacuolisation des tubules T). Soit cette altération des composants cellulaires est réversible, soit elle nécessite l'intervention de système de réparation. C'est notamment le cas des lésions membranaires qui peuvent être réparées par apport de membrane d'origine intracellulaire via la dysferline ou extracellulaire via les cellules satellites.

Nous avons vu au cours de ce qui précède que le remodelage du cytosquelette d'actine et le remodelage des membranes sont des processus fondamentaux nécessaires à la formation des muscles striés squelettiques puis au maintien de leur intégrité lors de leur fonctionnement.

Au laboratoire, la protéine CKIP-1 (*casein kinase 2 interacting protein-1*) a été identifiée comme l'un des facteurs impliqués dans la différenciation des cellules musculaires *in vitro*.

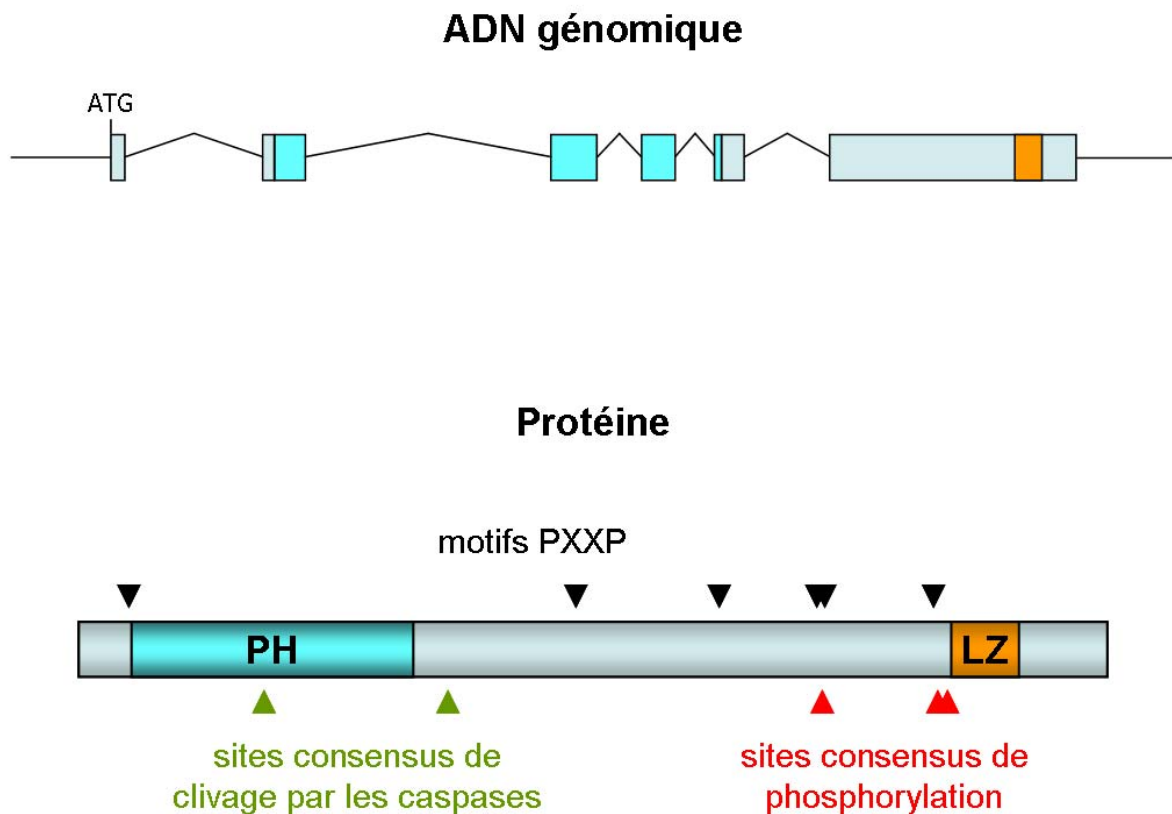


Figure 31 : Organisation du gène *CKIP-1* et prédiction *in silico* des domaines et sites spécifiques de la protéine *CKIP-1*.

(A) Le gène *CKIP-1* est composé de 6 exons. (B) L'étude *in silico* de la séquence protéique de *CKIP-1* traduite à partir de la séquence du cDNA permet de prédire la présence d'un domaine PH (Pleckstrin Homology) dans la région N-terminale de la protéine et un domaine LZ (Leucine Zipper) dans la région C-terminale. Six motifs PXXP d'interaction avec les protéines à domaine SH3 sont également répartis le long de la séquence protéique ainsi que 3 sites consensus de phosphorylation, un site consensus de clivage par la caspase 3 et un site consensus de clivage par la caspase 6. Réalisé d'après (Bosc et al., 2000; Zhang et al., 2005).

IV/ La protéine adaptatrice CKIP-1, une protéine aux multiples fonctions

IV.A/ Les domaines et sites consensus de CKIP-1 et son patron d'expression

IV.A.1/ Les domaines et sites consensus de CKIP-1

CKIP-1 a été identifiée en 2000 lors d'un crible double-hybride en levure mené à partir d'une banque d'ADNc (acide désoxyribonucléique complémentaire) issus de lymphocytes B humains dans le but d'isoler des interacteurs de la caséine kinase 2 (CK2) (Bosc et al., 2000). Ce crible double-hybride a révélé l'existence d'une protéine qui lie CK2 et qui a donc été nommée CKIP-1 (*casein kinase 2 interacting protein-1*). Le cadre ouvert de lecture de *CKIP-1* humain compte 1230 paires de bases et code pour une protéine de 409 acides aminés avec une masse moléculaire théorique de 46237 Da.

L'analyse de la séquence protéique de CKIP-1 obtenue par traduction *in silico* de la séquence nucléotidique de *CKIP-1* a révélé la présence d'un domaine leucine zipper (LZ) potentiel dans la région C-terminale de la protéine (acides aminés 347 à 373) (Figure 31). Ce domaine permettrait la liaison de CKIP-1 à d'autres protéines possédant des domaines leucine zipper. Un domaine PH (*pleckstrin homology*) putatif a également été mis en évidence dans la partie N-terminale entre les résidus 21 et 132. Ce type de domaine est connu pour permettre des liaisons protéine-protéine et des liaisons avec des phospholipides (Bosc et al., 2000; Litchfield et al., 2001).

L'analyse fine de la séquence protéique de CKIP-1 traduite *in silico* a révélé la présence de motifs P-X-X-P aux positions 19, 197, 255, 294, 297, 340 (positions du premier résidu proline) (Figure 31). Les motifs P-X-X-P sont des sites de liaisons protéiques de type SH3 (*Src homology 3*) comme ceux trouvés en C-terminal de l'amphiphysine 2. Trois sites de phosphorylation putatifs sont également présents dans la séquence de CKIP-1 (Figure 31). Le motif S³⁴⁶ESE est conforme au site consensus des substrats de CK2, SXX(D/E). Les motifs PPT²⁹⁶P et PRS³⁴²P sont conformes au site PX(S/T)P de phosphorylation par les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) ou les CDK (*cyclin-dependent kinase*). Enfin, la séquence de CKIP-1 contient de nombreux sites qui sont prédits comme étant des sites potentiels de clivage par les caspases. Notamment, les sites DLSD⁷⁴ et VEED¹⁴⁷ se conforment parfaitement aux séquences consensus reconnues par la caspase-3 (DXXD) et la caspase-6

((V/I/L)EXD), respectivement (Bosc et al., 2000; Litchfield et al., 2001; Zhang et al., 2005) (Figure 31).

IV.A.2/ Le patron d'expression de *CKIP-1*

Le patron d'expression de *CKIP-1* a été déterminé par Northern Blot sur des extraits de tissus humains. L'expression de *CKIP-1* est ubiquitaire mais inégale entre les différents tissus testés : c'est dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque que *CKIP-1* est le plus exprimé (Bosc et al., 2000; Zhang et al., 2007).

IV.B/ *CKIP-1* et la signalisation intracellulaire

IV.B.1/ *CKIP-1*, un régulateur non enzymatique de kinases

IV.B.1.a/ Identification de *CKIP-1* comme régulateur non-enzymatique de *CK2*

La caséine kinase 2 est une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle un large panel de protéines localisées dans le noyau, le cytoplasme et à la membrane plasmique. Elle est impliquée dans une grande variété de processus cellulaires comme la transcription, la traduction, la morphogenèse et la progression du cycle cellulaire. *CK2* est une enzyme tétramérique composée de deux sous-unités catalytiques (*CK2 α* et *CK2 α'*) et deux sous-unités régulatrices (*CK2 β*). Bien qu'elles ne présentent pas de différence de propriétés catalytiques, il semble qu'il y ait une spécialisation de fonction entre *CK2 α* et *CK2 α'* . Afin d'essayer d'expliquer cette spécialisation, l'équipe de David W. Litchfield a recherché des interacteurs spécifiques de l'une ou l'autre des deux sous-unités catalytiques (Bosc et al., 2000). Ils ont identifié une protéine, *CKIP-1*, qui interagit avec *CK2 α* mais pas avec *CK2 α'* .

CKIP-1 est localisée dans le noyau et à la membrane plasmique et sa localisation membranaire est dépendante de la présence du domaine PH (Bosc et al., 2000; Litchfield et al., 2001; Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004; Zhang et al., 2006). En effet il permet la liaison de *CKIP-1* aux phosphoinositides (Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004). *CKIP-1* n'a pas d'effet sur les propriétés catalytiques de *CK2*, de plus *CKIP-1* n'est pas phosphorylée efficacement par *CK2* (Bosc et al., 2000; Litchfield et al., 2001). En revanche, *CKIP-1* est capable de

recruter CK2 à la membrane plasmique par l'intermédiaire de son domaine PH (Olsten et al., 2004) (Figure 32). CKIP-1 est donc capable de modifier la localisation intracellulaire de CK2 et donc les substrats qu'elle est susceptible de phosphoryler. Par conséquent, CKIP-1 joue le rôle de régulateur non enzymatique de CK2.

IV.B.1.b/ Régulation de la localisation de CKIP-1

Les études menées sur la régulation de CK2 montrent que la localisation de CKIP-1 et sa régulation sont primordiales pour assurer la régulation de la kinase.

Selon les lignées cellulaires, CKIP-1 est soit exclusivement à la membrane plasmique soit à la membrane plasmique et dans le noyau. De plus, au sein même d'une population de cellules, la localisation de CKIP-1 n'est pas homogène (Bosc et al., 2000; Litchfield et al., 2001; Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004). Ceci suggère que sa localisation est dynamique et peut-être régulée. En effet, une modification des conditions de culture, comme une privation en facteurs sériques, provoque une délocalisation de CKIP-1 vers le noyau, tandis qu'une stimulation des cellules par l'insuline provoque sa translocation à la membrane (Safi et al., 2004; Xi et al., 2010).

Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de la localisation de CKIP-1 au sein des cellules, les différents groupes travaillant sur CKIP-1 ont tenté d'identifier les domaines de la protéine impliqués dans sa localisation. Le premier domaine dont la fonction a été clairement identifiée est le domaine PH. Celui-ci est nécessaire à la localisation membranaire de CKIP-1 puisqu'il permet la liaison aux phosphoinositides (Bosc et al., 2000; Litchfield et al., 2001; Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004; Zhang et al., 2006). Au sein du domaine PH, trois résidus ont un rôle primordial dans la fixation à la membrane : la lysine K42, l'arginine R44 et le tryptophane W123. En effet, les mutations K42C et R44C réduisent la liaison de CKIP-1 aux phosphoinositides et perturbent sa localisation membranaire, tandis que la mutation W123A abolit complètement la liaison aux phosphoinositides et la localisation membranaire (Olsten et al., 2004). Il a également été montré que le domaine PH est nécessaire pour la localisation de CKIP-1 dans le noyau. En effet, un mutant de CKIP-1 dépourvu de domaine PH n'est pas relocalisé vers le noyau lors d'une privation de sérum (Xi et al., 2010). La réalisation de mutations ponctuelles au sein du domaine PH a permis d'identifier un motif de localisation nucléaire entre les acides aminés 82 et 90. Enfin, l'analyse

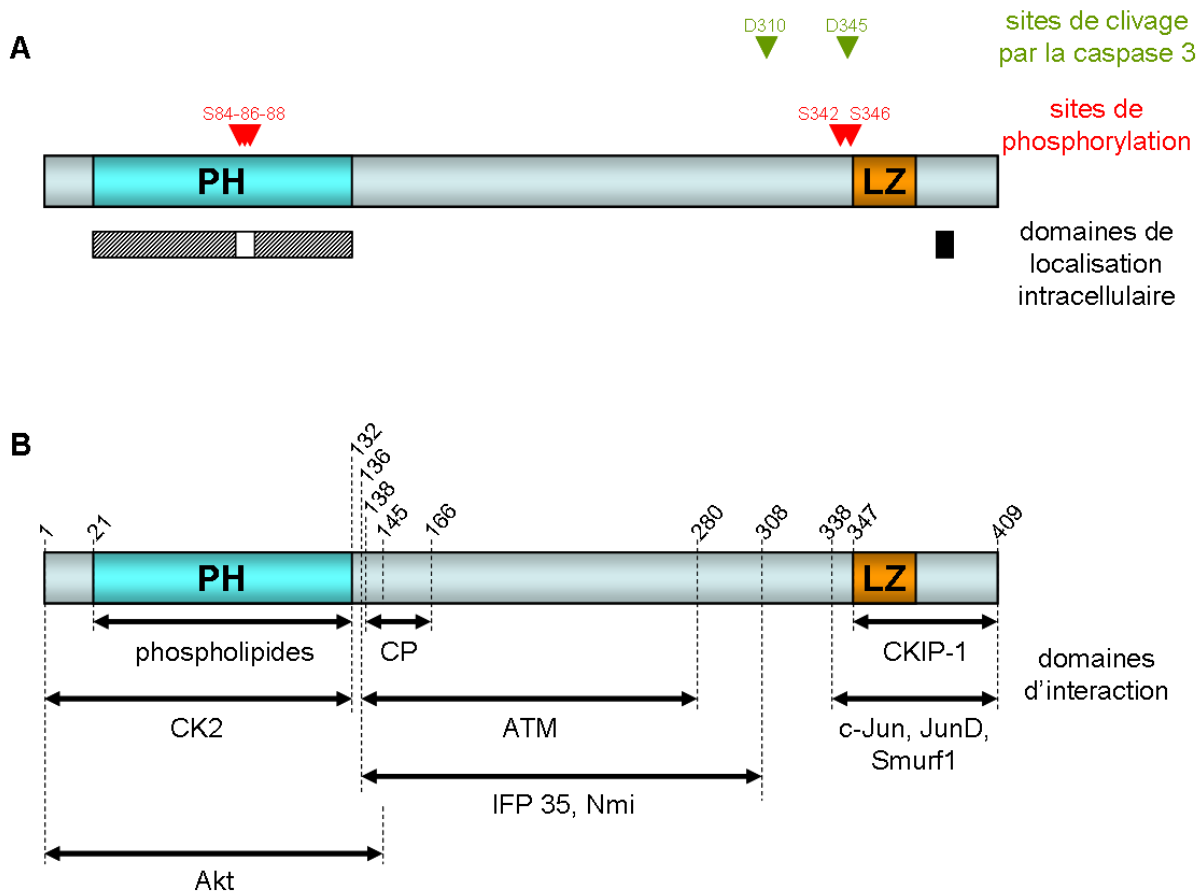


Figure 32 : Les différents domaines établis de CKIP-1.

(A) Sites de modifications post-traductionnelles et domaines de localisation intracellulaire. Les études menées sur CKIP-1 ont mis en évidence cinq sites de phosphorylation, deux sites de clivages par la caspase 3 et de 3 domaines de localisation intracellulaire. Les sérines 346 et 342 sont phosphorylées séquentiellement par CK2 et GSK3. Les sérines 84, 86 et 88 sont également phosphorylables mais la kinase impliquée n'a pas été identifiée. Deux sites de clivage par la caspase 3 ont été identifiés dans la région C-terminale : la caspase 3 clive CKIP-1 après les aspartates 310 et 345. Enfin, le domaine PH (rectangle rayé) permet la localisation de CKIP-1 à la membrane plasmique et les aa 82 à 90 (rectangle blanc) constituent un motif de localisation nucléaire tandis que les aa 382 à 389 (rectangle noir) forment un domaine inhibiteur de la localisation nucléaire. (B) Domaines d'interaction. De nombreux domaines d'interaction ont été mis en évidence au sein de CKIP-1. La région N-terminale qui comprend le domaine PH permet des interactions avec les phospholipides (aa 21 à 132) et avec les kinases CK2 (aa 1 à 132) et Akt (aa 1 à 145). La région C-terminale qui inclut le domaine LZ permet l'homodimérisation de CKIP-1 (aa 347 à 409) et des interactions avec c-Jun, JunD et Smurf1 (aa 338 à 409). Enfin la région centrale de CKIP-1 permet des interactions avec les protéines CP (aa 138 à 166), avec ATM (aa 136 à 280) et avec IFP35 et Nmi (aa 136 à 308). Réalisé d'après (Hernandez-Valladares et al., 2010; Lu et al., 2008; Olsten et al., 2004; Tokuda et al., 2007; Xi et al., 2010; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2005).

de la localisation intracellulaire de différents mutants de CKIP-1 correspondant à des délétions de différents domaines a mis en évidence la présence d'une région inhibitrice de la localisation nucléaire entre les résidus 382 et 389. La localisation intracellulaire de CKIP-1 est donc expliquée par trois domaines : le domaine PH permet la liaison de CKIP-1 à la membrane plasmique, les résidus 82 à 90 constituent un signal de localisation nucléaire et les acides aminés 382 à 389 forment un domaine inhibiteur de la localisation nucléaire (Figure 32). La régulation de la localisation intracellulaire de CKIP-1 pourrait donc être réalisée par le masquage de l'un ou l'autre de ces trois domaines soit par des modifications de conformation de la protéine soit par des interactions avec d'autres protéines.

IV.B.2/ CKIP-1 et la régulation de l'apoptose et de la croissance tumorale

IV.B.2.a/ CKIP-1 et régulation de l'apoptose

Une étude récente a montré l'implication de CKIP-1 dans la régulation de l'apoptose *in vitro* (Zhang et al., 2005). Au cours de l'apoptose déclenchée par un traitement TNF/CHX (*tumor necrosis factor/cycloheximide*), CKIP-1 est clivée par la caspase 3 au niveau du site de clivage non canonique RIQD³¹⁰ (Figure 32). Ce clivage libère un fragment C-terminal (acides aminés 311 à 409) d'environ 15 kDa dans le cytoplasme. Ce fragment, qui contient le domaine leucine zipper putatif (acides aminés 347 à 373), a alors une double fonction. D'une part, il stimule l'activité de la caspase 3 formant ainsi une boucle de rétroaction positive. D'autre part, il pénètre dans le noyau où il interagit avec c-Jun. Cette interaction provoque l'inhibition de l'activité du facteur de transcription oncogénique c-Jun/AP-1 et donc l'activation de l'apoptose. En accord avec ces résultats, l'inhibition de l'expression de CKIP-1 par siRNA diminue la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par le traitement TNF/CHX. Ces résultats montrent que CKIP-1 est un activateur de l'apoptose qui agit par inhibition de c-jun/AP-1 après un clivage par la caspase 3 et une relocalisation dans le noyau (Figure 33). On peut noter que le mécanisme de transport du fragment C-terminal dans le noyau n'a pas été examiné. Il fait certainement intervenir un transporteur. En effet, ce fragment C-terminal correspond aux résidus 311 à 409 de CKIP-1 ; il ne contient donc pas le motif de localisation nucléaire (acides aminés 82 à 90) mais contient le signal d'inhibition de la localisation nucléaire (acides aminés 382 à 389) (voir IV.B.1.b). L'hypothèse de l'existence de tels transporteurs ouvre de nouvelles possibilités de régulation de la localisation de CKIP-1.

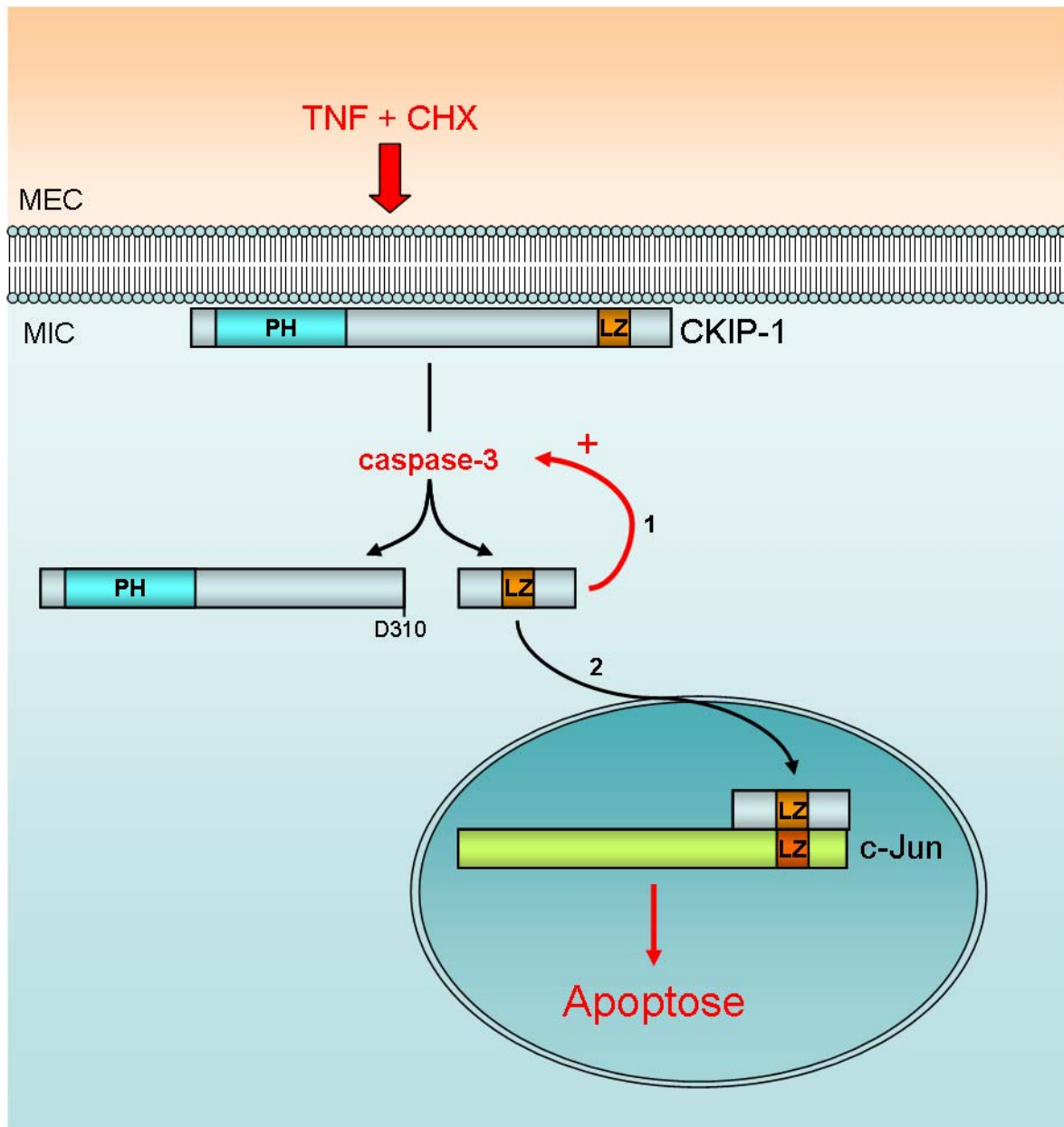


Figure 33 : Rôle de CKIP-1 dans la régulation de c-Jun/AP-1 et de l'apoptose.

En réponse à des signaux apoptotiques extracellulaires, la caspase 3 est activée et clive CKIP-1 après l'aspartate D310. Le fragment C-terminal obtenu comprend le domaine LZ (Leucine Zipper). Il active à son tour la caspase 3, formant ainsi un rétrocontrôle positif (1), et pénètre dans le noyau où il interagit avec le domaine LZ de c-Jun (2). Cette interaction inhibe l'activité du facteur de transcription c-Jun/AP-1 ce qui favorise l'apoptose. MEC, milieu extracellulaire ; MIC, milieu intracellulaire. Réalisé d'après (Zhang et al., 2005).

Une autre étude, également menée par le groupe de F. He, a montré que CKIP-1 est impliquée dans la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN (acide désoxyribonucléique) médiée par ATM *in vitro* (Zhang et al., 2006). ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) est une kinase de la famille PI3K activée lorsque l'ADN est endommagé, par exemple par des radiations. ATM phosphoryle alors des substrats nucléaires impliqués dans la réparation de l'ADN et le passage des points de contrôle du cycle cellulaire. Lorsque l'apoptose est induite *in vitro* par une forte dose de cycloheximide (CHX), CKIP-1 provoque une augmentation de la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 et retarde sa dégradation par le protéasome. Cet effet est dépendant d'ATM puisque l'utilisation de cellules présentant une mutation dans ATM inhibe l'effet protecteur de CKIP-1 sur p53. Ces résultats suggèrent que CKIP-1 est capable d'activer la phosphorylation de p53 par ATM. Cet éventuel effet activateur de CKIP-1 sur ATM n'a pas été clairement établi, cependant les auteurs ont montré que le domaine central de CKIP-1 (acides aminés 136 à 280) interagit avec le domaine PI3K d'ATM (acides aminés 2667 à 3056) (Figure 32). Par cette interaction, CKIP-1 recrute à la membrane plasmique une partie des protéines ATM localisées dans le noyau. Les molécules d'ATM relocalisées à la membrane plasmique sont des kinases actives. CKIP-1 est donc capable de modifier la localisation intracellulaire d'ATM et donc les substrats qu'elle est susceptible de phosphoryler. L'ensemble de ces résultats permet de proposer un mécanisme par lequel CKIP-1 interviendrait dans l'apoptose dépendante d'ATM (Figure 34). Suite à des signaux apoptotiques tels que des dommages à l'ADN, ATM est activée et recrutée à la membrane plasmique par CKIP-1. Cette relocalisation permet à ATM d'avoir accès aux molécules de p53 qui ont été exclues du noyau pour être dirigées vers la dégradation par le protéasome. ATM phosphoryle donc p53 sur la sérine 15. Ainsi protégé de la dégradation, p53 s'accumule dans la cellule et active le déclenchement de l'apoptose.

IV.B.2.b/ CKIP-1 et régulation de la croissance tumorale

Deux autres études ont démontré un rôle de CKIP-1 dans la régulation de la croissance tumorale (Tokuda et al., 2007; Zhang et al., 2007). Zhang *et al.* ont identifié deux nouveaux interacteurs de CKIP-1 : IFP35 (*interferon-induced protein 35 kD*) et Nmi (*N-Myc interacting protein*) qui sont des protéines présentant une structure commune avec deux domaines NID (*Nmi-IFP35 homology domain*) mais dont les propriétés sont encore mal définies. CKIP-1 interagit avec IFP35 et Nmi par son domaine central (acides aminés 136 à 308) (Figure 32).

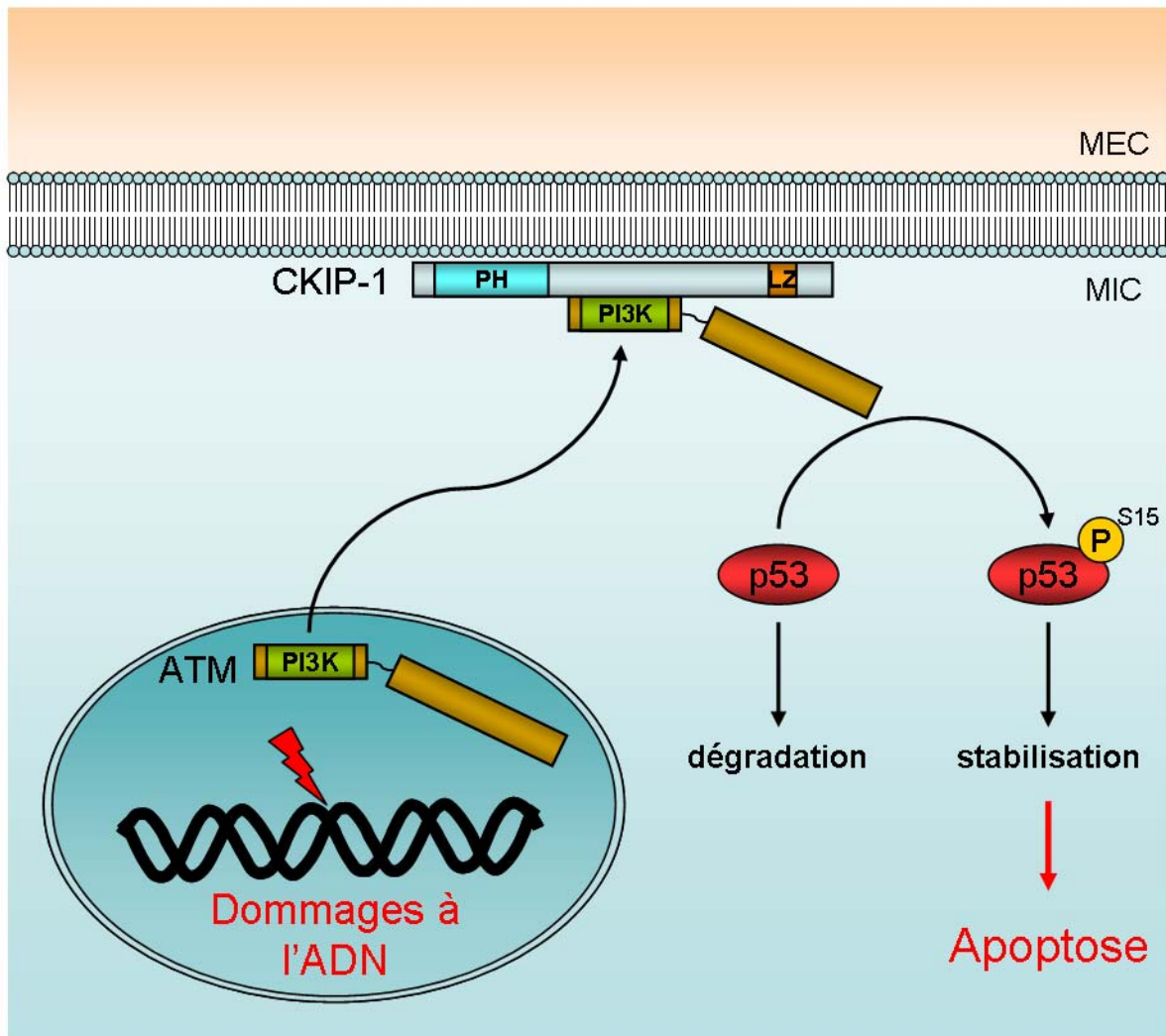


Figure 34 : Rôle putatif de CKIP-1 dans la régulation de l'apoptose induite par des dommages à l'ADN.

La survenue de dommages à l'ADN induit l'activation d'ATM. Une partie des molécules d'ATM activées sont recrutées par CKIP-1 qui est localisée à la membrane plasmique via son domaine PH. L'interaction entre CKIP-1 et ATM fait intervenir le domaine central de CKIP-1 et le domaine PI3K d'ATM. Les kinases ATM ainsi recrutées à la membrane plasmique phosphorylent les molécules cytoplasmiques de p53 sur leur sérine 15 ce qui assure leur stabilisation en les protégeant de la dégradation par le protéasome. L'accumulation de p53 qui en résulte est responsable du déclenchement de l'apoptose. MEC, milieu extracellulaire ; MIC, milieu intracellulaire. Réalisé d'après (Zhang et al., 2006).

L'expression d'IFP35 et de Nmi est induite par un traitement à l'IFN γ (interféron γ) et l'IL2 (interleukine 2) ce qui est également le cas de CKIP-1. L'expression des trois protéines est donc induite par le même signal extracellulaire, cependant leurs effets intracellulaires divergent. En effet, contrairement à IFP35, CKIP-1 et Nmi inhibent la survie cellulaire et la croissance des cellules tumorales *in vitro* en inhibant l'activation d'Akt (Tokuda et al., 2007; Zhang et al., 2007). Cet effet inhibiteur est également vérifié *in vivo*, puisque l'expression stable de CKIP-1 dans des xénogreffes de cellules tumorales diminue la croissance de la tumeur dans des souris *nude* et ceci est corrélé à une inhibition de la phosphorylation d'Akt (Tokuda et al., 2007). Tokuda *et al.* ont exploré les mécanismes moléculaires de cette inhibition. Celle-ci repose sur une interaction directe entre les domaines PH d'Akt et de CKIP-1 (Figure 32). Mais, contrairement à la régulation de CK2 (voir IV.B.1.a et IV.B.2.a), l'inhibition d'Akt ne repose pas sur une simple séquestration à la membrane plasmique. En effet, un mutant de CKIP-1 incapable de lier les phosphoinositides (mutation W123A, voir IV.B.1.b) est toujours apte à inhiber Akt. En revanche, la délétion du domaine LZ de CKIP-1 abolit son pouvoir inhibiteur. Ces résultats montrent que CKIP-1 est capable d'inhiber Akt, sans se lier à la membrane mais en réalisant des homodimères.

CKIP-1 constitue donc un régulateur potentiel de la survie cellulaire et de la croissance tumorale. En effet, CKIP-1 est à la fois un facteur pro-apoptotique qui stimule l'activité de la caspase-3, inhibe l'activité c-Jun/AP1 et protège p53 de la dégradation, et un suppresseur de tumeur qui inhibe la kinase Akt. Ces données sont confirmées par le fait que l'expression de CKIP-1 est en moyenne plus faible dans des résections de tissus tumoraux que dans des résections de tissus sains (Tokuda et al., 2007).

IV.B.3/ Régulation de la différenciation musculaire

CKIP-1 a également été impliquée dans le contrôle de la différenciation musculaire régulée par PI3K (Safi et al., 2004). La différenciation musculaire peut être étudiée *in vitro* notamment à l'aide de la lignée cellulaire de myoblastes C2C12 qui est dérivée de cellules satellites de souris. La différenciation des myoblastes C2C12 peut être provoquée par un abaissement de la concentration en facteurs sériques du milieu de culture. Ceci déclenche alors l'expression et l'activation successives des facteurs de transcription spécifiques de la

lignée myogénique couplées aux modifications morphologiques caractéristiques de l'activation des cellules satellites : les myoblastes se divisent puis sortent du cycle cellulaire, s'allongent, s'alignent et fusionnent pour former des myotubes plurinucléés (voir II). La modulation de l'expression de CKIP-1 permet de réguler la différenciation musculaire *in vitro*. Ainsi, la surexpression de CKIP-1 stimule la phase de prolifération des myoblastes et leur fusion en myotubes, tandis que l'inhibition de son expression par siRNA abolit la phase proliférative et retarde l'expression de la myogénine. Les effets de CKIP-1 sur la différenciation sont semblables aux effets des IGF (*insulin-like growth factor*) qui activent la voie PI3K/Akt et le traitement des myoblastes avec des inhibiteurs de la voie PI3K abolit les effets stimulateurs de CKIP-1 sur les myoblastes. CKIP-1 apparaît donc comme un activateur de la voie de signalisation PI3K lors de la différenciation musculaire.

Ces résultats semblent en opposition avec les données précédemment citées. Tout d'abord CKIP-1 stimule ici la prolifération alors qu'il était précédemment présenté comme un inhibiteur de la croissance cellulaire. De plus, il active la voie PI3K dans les myoblastes, alors qu'il est capable d'inhiber Akt dans les cellules tumorales (Safi et al., 2004; Tokuda et al., 2007; Zhang et al., 2007). L'ensemble de ces résultats confirme le rôle de CKIP-1 dans la régulation des voies de signalisation intracellulaire, mais cela suggère également que la fonction activatrice ou inhibitrice de CKIP-1 dépend du type de cellule (cellules tumorales ou myoblastes en différenciation) et de l'environnement cellulaire.

IV.B.4/ Régulation du catabolisme protéique et étude des souris *Ckip-1*^{-/-}

CKIP-1 a enfin été impliquée dans la régulation de l'ubiquitylation des protéines *in vivo* (Lu et al., 2008). L'intervention de CKIP-1 dans ce processus a été suggérée par la découverte d'une interaction spécifique entre CKIP-1 et Smurf1 (*Smad ubiquitylation regulatory factor 1*) au cours d'une cartographie à haut débit du réseau de signalisation dynamique TGF- β (*transforming growth factor- β*) (Barrios-Rodiles et al., 2005). Smurf1 est une E3 ubiquitine ligase, c'est-à-dire qu'il transfère des groupements ubiquitine sur les protéines à éliminer. Il constitue ainsi un effecteur final de la cascade enzymatique contrôlant l'ubiquitylation. Smurf1 intervient notamment dans l'homéostasie osseuse en inhibant l'activité ostéoblastique. CKIP-1 lie Smurf1 par son domaine C-terminal (LZ) ce qui renforce la liaison de Smurf1 à ses substrats et stimule son activité E3 ubiquitine ligase *in vitro* (Figure 32). La réalité de cette régulation de Smurf1 par CKIP-1 a été vérifiée *in vivo* grâce à l'étude

d'une lignée de souris KO pour CKIP-1. Les souris *Ckip-1*^{-/-} naissent en bonne santé, selon des ratios mendéliens et ne présentent ni défaut de croissance ni problème de fertilité (Lu et al., 2008). Ceci suggère que CKIP-1 n'est pas nécessaire au développement embryonnaire. En revanche, l'examen approfondi des souris *Ckip-1*^{-/-} a révélé qu'elles présentaient un accroissement anormal de la masse osseuse qui s'aggrave avec l'âge. Cette ostéogenèse accélérée est due à l'activation spécifique des ostéoblastes, qui est couplée à une suractivation des cibles physiologiques de Smurf1 impliquées dans le contrôle de l'activité ostéoblastique. L'étude des souris *Ckip-1*^{-/-} confirme que CKIP-1 régule l'homéostasie osseuse *in vivo* en activant la E3 ubiquitine ligase Smurf1.

L'ensemble de ces résultats montre que CKIP-1 est capable de réguler une grande variété de processus cellulaires en agissant sur certains des composants des voies de signalisation qui les gouvernent. CKIP-1 est ainsi impliquée dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, la croissance tumorale, la différenciation musculaire, le catabolisme protéique et l'homéostasie osseuse en agissant sur les voies de signalisation des enzymes CK2, ATM, Akt, PI3K et Smurf1. La multiplicité des interacteurs de CKIP-1 s'explique en partie par la présence de deux domaines d'interaction protéine-protéine (PH et LZ) connus pour permettre une grande variété de liaisons protéiques au sein des cellules. L'étude de CKIP-1 est donc compliquée par le fait qu'elle est susceptible d'interagir avec de nombreux facteurs et d'agir sur de nombreuses voies de signalisation. En outre, l'effet de CKIP-1 peut varier selon le type de cellule et l'environnement.

IV.C/ CKIP-1 et la régulation du cytosquelette d'actine

Après avoir identifié CKIP-1 comme un interacteur de CK2, le groupe de David W. Litchfield a recherché les fonctions de CKIP-1 en générant une lignée cellulaire d'ostéosarcome humain exprimant CKIP-1 sous la dépendance d'un promoteur inductible à la tétracycline (Canton et al., 2005). La surexpression de CKIP-1 provoque une augmentation du périmètre des cellules et une augmentation de la quantité d'actine F. En revanche, l'inhibition de son expression par shRNA est associée à une diminution du périmètre cellulaire. Ces modifications de morphologie s'expliquent par le fait que CKIP-1 interagit

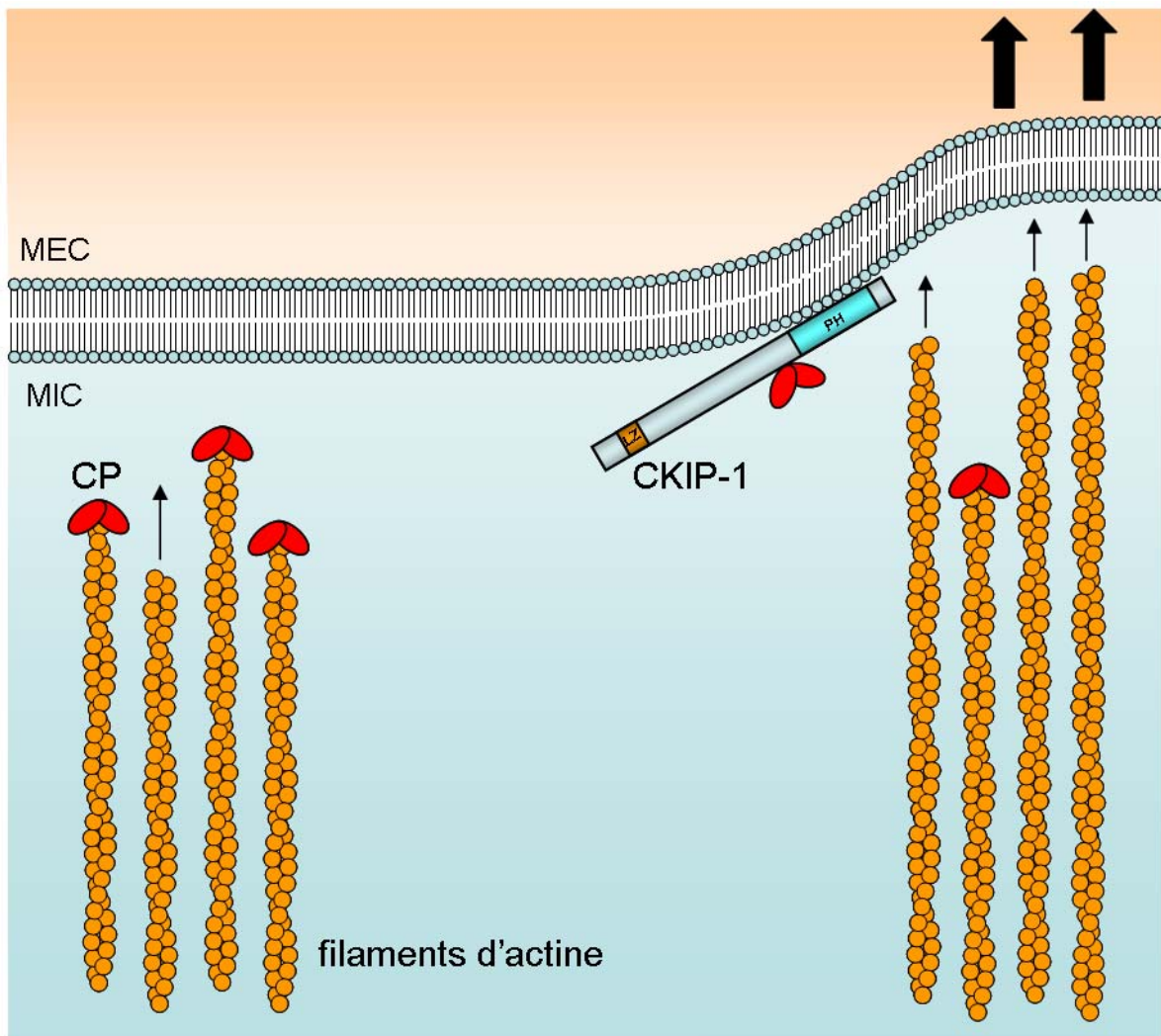


Figure 35 : Rôle de CKIP-1 sur le cytosquelette d'actine et la morphologie cellulaire.

CKIP-1 lie les protéines CP par un domaine d'interaction situé en aval du domaine PH. En conditions physiologiques (partie gauche de la figure), CKIP-1 est présente en faible quantité et CP peut se lier à l'extrémité barbue des filaments d'actine et empêcher leur élongation. Lorsque CKIP-1 est surexprimée (partie droite de la figure), elle séquestre CP à la membrane plasmique et inhibe sa fonction de coiffage des filaments d'actine. La polymérisation de l'actine est donc augmentée (flèches fines) et provoque l'extension du périmètre de la cellule (flèches épaisses). MEC, milieu extracellulaire ; MIC, milieu intracellulaire. Réalisé d'après (Canton et al., 2005; Canton et al., 2006).

avec les protéines CP $\alpha\beta$ (*capping protein α and β*) et inhibe leur activité *in vitro*. Les protéines CP forment un hétérodimère qui se fixe à l'extrémité barbue des filaments d'actine et empêchent l'ajout ou la perte de molécules d'actine G à cette extrémité. Des comarquages de CKIP-1 et CP suggèrent que l'interaction entre les deux protéines a lieu à la membrane plasmique. CKIP-1 serait donc capable de moduler l'activité des protéines CP à la périphérie des cellules. Ainsi, les auteurs proposent que l'interaction entre CP et CKIP-1 à la membrane plasmique inhibe la liaison de CP à l'extrémité barbue des filaments d'actine, ce qui conduit à une augmentation de la polymérisation de l'actine à la membrane et aux changements morphologiques observés (Figure 35).

L'analyse de différents mutants de délétion et la comparaison des séquences de protéines connues pour lier et inhiber les protéines CP (CKIP-1, CARMIL (*CP Arp2/3 myosin I linker*), CD2AP (*CD2-associated protein*) et son homologue CIN85, CapZIP (*CapZ-interacting protein*) et WASHCAP (*WASH and capping protein-associated protein*)) ont permis d'identifier un « motif de liaison aux protéines CP » du type LXHXTXXRPK(6X)P (où X correspond à n'importe quel acide aminé) (Bruck et al., 2006). Ce motif est localisé entre les acides aminés 150 et 166 de CKIP-1, c'est-à-dire dans la région centrale qui suit le domaine PH. La comparaison structurale et fonctionnelle de ce motif et de ses régions adjacentes dans les protéines précédemment citées a révélé l'existence de deux domaines d'interaction successifs : un premier domaine de liaison à CP α (acides aminés 138 à 144 de CKIP-1) et un second domaine de liaison à CP β (acides aminés 150 à 166) (Hernandez-Deviez et al., 2006; Hernandez-Valladares et al., 2010) (Figure 32). Enfin, la réalisation de mutations ponctuelles au sein de ces domaines a permis de mettre en évidence que les arginines 155 et 157 de CKIP-1 sont indispensables pour la liaison aux protéines CP. La mutation de ces deux arginines en alanines abolit l'interaction entre CKIP-1 et CP, supprime les propriétés inhibitrices de CKIP-1 sur CP et annule les effets de CKIP-1 sur la morphologie cellulaire. Ceci démontre que les modifications morphologiques induites par CKIP-1 sont bien dues à sa capacité à inhiber l'activité des protéines CP en les séquestrant (Canton et al., 2006).

La manière dont CKIP-1 inhibe l'activité des protéines CP n'est pas encore parfaitement établie mais de plus en plus de preuves suggèrent que CKIP-1 agirait en inhibiteur allostérique. En effet, l'étude structurale du complexe formé par CARMIL et CP montre que CARMIL se fixe sur un domaine de CP éloigné du site de liaison à l'actine. Il n'entre donc pas en compétition avec l'actine pour la fixation à CP. En revanche, la fixation

de CARMIL provoque une modification de la conformation de l'hétérodimère de protéines CP. Ce changement de conformation entraîne une chute de l'affinité de CP pour l'actine et donc une perte de son activité de coiffe (Hernandez-Deviez et al., 2006; Hernandez-Valladares et al., 2010; Takeda et al., 2010). La forte identité de séquence entre les domaines de liaison à CP de CARMIL et de CKIP-1 suggère que CKIP-1 pourrait inhiber les protéines CP en agissant d'une manière analogue à CARMIL.

CKIP-1 est donc non seulement capable de contrôler des processus tels que la croissance tumorale et l'homéostasie osseuse en régulant des voies enzymatiques, mais il est aussi capable de participer à l'organisation du cytosquelette d'actine en interagissant avec les protéines CP. Pas moins de dix interacteurs de CKIP-1 ont déjà été identifiés : CK2 α , ATM, c-jun, JunD, IFP35, Nmi, Akt, Smurf1, CP α , CP β . Ces interactions impliquent non seulement les domaines PH (CK2 α , Akt) et LZ (c-jun, JunD, Smurf1) mais aussi la région centrale de CKIP-1 (ATM, IFP35, Nmi, CP α , CP β). Le fait que toutes les régions de CKIP-1 sont susceptibles d'être impliquées dans des interactions protéiques permet d'imaginer que d'autres interacteurs sont encore à identifier.

Il a été montré au laboratoire que CKIP-1 intervient dans la régulation de la différenciation musculaire *in vitro* (Safi et al., 2004). En effet, sa surexpression induit la formation de plus gros myotubes tandis que l'inhibition de son expression ralentit la différenciation des myoblastes C2C12. CKIP-1 a en outre été impliquée dans la régulation de la morphologie des cellules et plus généralement dans la régulation du cytosquelette d'actine en interagissant avec les protéines de coiffe CP α et β (Canton et al., 2005; Canton et al., 2006). En effet, CKIP-1 favorise le remodelage des filaments d'actine en inhibant la fixation des protéines CP à l'extrémité barbue des filaments d'actine. Enfin, les données présentées au début de cette introduction montrent que le remodelage du cytosquelette d'actine constitue un processus central dans la mise en place et le maintien du muscle strié squelettique. La réorganisation du cytosquelette d'actine intervient notamment lors des étapes de migration et de fusion des myoblastes, lors de la mise en place des myofibrilles et au cours de la

régénération musculaire. Compte tenu de l'implication de CKIP-1 dans la régulation de la différenciation musculaire et du cytosquelette d'actine d'une part, et l'importance du remodelage du cytosquelette d'actine dans la mise en place et le maintien des muscles striés squelettiques d'autre part, mon projet de thèse a consisté en l'étude des éventuels rôles de CKIP-1 dans la régulation du cytosquelette d'actine au cours de la différenciation musculaire et dans le muscle squelettique mature.

Objectifs de la thèse et stratégies expérimentales

L'objectif de ma thèse était d'étudier l'éventuelle implication de CKIP-1 dans la régulation du cytosquelette d'actine au cours de la différenciation musculaire et dans le muscle mature. Dans ce but, j'ai mené en parallèle des études *in vitro* sur les myoblastes C2C12 et *in vivo* sur les muscles squelettiques de souris.

Je me suis tout d'abord attaché à l'étude des domaines de CKIP-1 impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine. En effet, avant mon arrivée un nouvel interacteur de CKIP-1 avait été identifié au laboratoire lors d'un crible double-hybride en levures réalisé pour l'établissement de la cartographie de l'interactome de la voie phosphatidylinositol 3-kinase-mammalian target of rapamycin (PI3K-mTOR). Ce crible double-hybride a révélé une interaction directe entre CKIP-1 et la sous-unité ARPC1A du complexe de nucléation de l'actine Arp2/3. Afin d'étudier les implications fonctionnelles de cette nouvelle interaction, nous avons décidé de générer différentes constructions de CKIP-1 tronquées afin de tester leur capacité à interagir avec ARPC1A (et les protéines CP) et à modifier la morphologie des myoblastes C2C12. Cette caractérisation de l'interaction entre CKIP-1 et ARPC1A et de ses conséquences est incluse dans une étude portant sur l'implication de CKIP-1 dans la myogenèse du poisson zèbre, en particulier dans l'étape de fusion des myoblastes.

Avant le début de mon projet une isoforme plus courte de CKIP-1 avait été identifiée au laboratoire. Cette isoforme, nommée CKIP-1p28, est issue d'une initiation alternative de la traduction. Afin de tester l'implication de la régulation du cytosquelette d'actine par CKIP-1 au cours de la différenciation musculaire, nous avons décidé de suivre les variations des différentes formes des protéines CKIP-1 dans les myoblastes C2C12 en différenciation et dans les muscles de souris en formation, et de tester leurs effets sur le remodelage de l'actine. L'étude de l'effet de ces différentes formes sur la différenciation a ensuite consisté à analyser les conséquences des variations artificielles de leur expression (par shRNA ou surexpression) sur la capacité des myoblastes à migrer et à fusionner.

Pour compléter l'étude *in vitro* des protéines CKIP-1, nous avons décidé d'analyser les protéines CKIP-1 dans le muscle squelettique de souris. L'étude du rôle des protéines CKIP-1 dans le muscle adulte a nécessité dans un premier temps l'identification et la détermination de

la localisation intracellulaire des formes de CKIP-1 présentes dans le muscle mature. Ensuite, la détermination des fonctions de ces formes de CKIP-1 a été réalisée par des expériences de surexpression par la technique d'électroporation *in vivo* de vecteurs d'expression dans le muscle. L'effet de ces surexpressions a été analysé grâce à des observations en microscopie confocale et électronique.

L'ensemble de cette démarche et de ces approches ont permis d'aboutir aux résultats présentés dans les pages suivantes.

Résultats et discussion

I/ Mise en évidence d'une interaction entre CKIP-1 et le complexe Arp2/3, et implication dans la myogenèse du poisson zèbre

Préalablement à mon arrivée dans le laboratoire, CKIP-1 avait été identifiée comme une protéine intervenant dans la différenciation des myoblastes C2C12. Il avait notamment été montré que la surexpression de CKIP-1 induit la formation de myotubes contenant plus de noyaux que les myotubes non transfectés. Nous avons donc décidé d'examiner le rôle de CKIP-1 dans la formation des fibres musculaires *in vivo*. Pour cela nous avons choisi d'utiliser comme modèle le poisson zèbre *Danio rerio*. Celui-ci est transparent et présente un développement embryonnaire externe ce qui en fait un bon modèle pour l'étude de la myogenèse embryonnaire. La musculature du poisson zèbre se développe à partir de deux lignées cellulaires de précurseurs musculaires présentes dans les somites. Les fibres lentes formées à partir des cellules adaxiales, situées à proximité de la notochorde, migrent à travers le myotome latéral jusqu'à sa périphérie où elles forment la couche superficielle de fibres lentes mononuclées. Le reste du somite est occupé par les précurseurs des fibres rapides dont la différenciation en muscles rapides est déclenchée par le passage des fibres lentes au cours de leur migration radiale. La formation des fibres rapides s'opère par allongement puis fusion des précurseurs musculaires rapides.

Au cours de cette étude, nous avons cloné le gène *ckip-1* du poisson zèbre, puis inhibé son expression par injection de morpholino oligonucléotides antisens. L'inhibition de l'expression de *ckip-1* dans des embryons de poisson zèbre bloque l'élongation et la fusion des précurseurs de fibres rapides. La recherche de partenaires de CKIP-1 impliqués dans la régulation du cytosquelette a permis d'identifier la sous-unité ARPC1 du complexe de nucléation de l'actine Arp2/3. Nous montrons ici que CKIP-1, par l'intermédiaire de la liaison de son domaine PH aux phosphatidylinositols membranaires, régule la morphologie cellulaire en recrutant le complexe Arp2/3 à la membrane. Ces résultats établissent clairement que CKIP-1 est un régulateur du cytosquelette d'actine et suggèrent qu'elle agit en coordonnant les activités de Arp2/3. De plus cette étude fournit des arguments fonctionnels *in vivo* qui soutiennent cette hypothèse.

Cet article est actuellement soumis pour publication.

Ma contribution à cet article

Au sein de cette étude, j'ai participé à l'étude *in vitro* des propriétés de CKIP-1. J'ai généré les constructions codant pour les formes tronquées de CKIP-1 et je les ai utilisées dans les expériences de co-immunoprécipitation et d'immunofluorescence afin de déterminer la localisation du domaine de CKIP-1 impliqué dans l'interaction avec ARPC1 et d'identifier les domaines de CKIP-1 nécessaires à son action sur la morphologie des cellules.

CKIP-1 IS INVOLVED IN ZEBRAFISH MUSCLE FIBRE FORMATION THROUGH ACTIN CYTOSKELETAL ORGANIZATION

Dominique Baas ^{1*}, Sabine Caussanel-Boude ^{1,2*}, Alexandre Guiraud ^{1*}, Frederico Calhabeu ^{1,3*}, Emilie Delaune-Henry ¹, Fanny Pilot ^{1,4}, Emilie Chopin ^{1,5}, Irma Machuca-Gayet ⁶, Aurélia Vernay ¹, Stéphanie Bertrand ⁷, Jean-François Rual ⁸, Pierre Jurdic ⁶, David E. Hill ⁸, Marc Vidal ⁸, Laurent Schaeffer ^{1**} and Evelyne Goillot ^{1**}.

1: Equipe Différenciation Neuromusculaire, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 5239 /ENS Lyon, Université de Lyon, IFR128 Biosciences Lyon-Gerland, 46, allée d'Italie 69364 LYON cedex 07, France.

2: present address: Faculté de médecine Lyon-RTH Laennec de l'Université Claude Bernard Lyon 1

3: present address: Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, King's College London, Guy's Campus, London, United Kingdom.

4: present address : UMR 955 INRA-ENVA de Génétique Moléculaire et Cellulaire, 7, avenue Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France

5: present address : Equipe Contrôle de l'Expression Génétique et Oncogénèse Virale. Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 5239 /ENS Lyon, Université de Lyon, IFR128 Biosciences Lyon-Gerland, 46, allée d'Italie 69364 LYON cedex 07, France.

6: Équipe biologie cellulaire et physiopathologie osseuse, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL) UMR 5242 CNRS - ENS Lyon - INRA 1288 - UCB Lyon 1, 46, allée d'Italie 69364 LYON cedex 07, France.

7: CNRS UMR 7628, UPMC Université Paris 06, Observatoire océanographique, F-66651 Banyuls-sur-Mer, France.

8: Center for Cancer Systems Biology and Department of Cancer Biology, Dana-Farber Cancer Institute and Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

Contact: Correspondence should be addressed to E.G. (e-mail: Evelyne.Goillot@ens-lyon.fr; Tel.: 33-472-72-81-24; Fax: 33-472-72-80-80)

* and ** : These authors contributed equally to this work.

Short title: CKIP-1 and actin dynamics

SUMMARY

Multinucleated muscle fibres arise by fusion of precursor cells, myoblasts. We previously implicated CKIP-1 in *in vitro* C2C12 myoblast fusion. Here we explore the role of CKIP-1 in zebrafish muscle development. Within developing somites, Ckip-1 expression localized to membranes of myoblasts of the fast-twitch lineage. Unlike wild-type myoblasts that form spatially arrayed multinucleated fast myofibers, Ckip-1 deficient myoblasts showed a drastic reduction in fusion capacity.

In cells, CKIP-1 concentrates with actin in membrane protrusions and increases lamellipodia size whereas its depletion abolishes cellular protrusions. We find that CKIP-1 directly interacts with actin nucleation factor Arp2/3 ARPC1A subunit and regulates cell morphology through membrane recruitment of Arp2/3. Consistent with this, Ckip-1 downregulation in zebrafish embryos impairs Arp2/3 localization in muscle precursor cells. Our results establish CKIP-1 as a regulator of cortical actin that recruits the Arp2/3 complex at the plasma membrane essential for fast muscle precursor elongation and fusion.

KEY WORDS

CKIP-1/Arp2/3/Actin cytoskeleton/ myoblast fusion/ zebrafish muscle development

INTRODUCTION

Pioneering works have provided a critical knowledge of the cellular events associated with muscle fiber formation in zebrafish. Two distinct lineages of muscle precursors can be distinguished within the zebrafish developing somites (Devoto et al., 1996). The slow-twitch muscle fibers derive from adaxial myogenic precursors which begin to differentiate alongside the notochord while the rest of the myotome gives rise to fast-twitch fibers. The majority of adaxial cells migrate through the lateral myotome, to form the superficial layer of slow muscle. This migration is crucial for zebrafish somite development because it initiates a medial to lateral wave of fast muscle precursor differentiation (Henry and Amacher, 2004). Whereas slow-twitch myoblasts mature into mononucleate fibers, fast muscle precursors fuse with each other to form syncytial myotubes.

Adaxial cells differentiation and migration is preceded by morphological changes that have been thoroughly characterized (Daggett et al., 2007) (Yin and Solnica-Krezel, 2007). They lose their cuboidal, epithelial character, flatten and intercalate between one another, and ultimately make attachments with somite boundaries and elongate next to the notochord (Daggett et al., 2007). Using time-lapse video microscopy of genetic mosaic analysis and mathematical models studies, Snow CJ et al. (Snow et al., 2008) have provided fundamental insights into the cellular mechanisms that drive fast muscle fiber formation. They showed that zebrafish fast muscle fiber morphogenesis consists of three phases: short precursor cells with protrusive activity, intercalation/elongation consisting in protrusion extension and filling, boundary capture/myotube formation until both ends of the muscle fiber anchor to the myotendinous junction (boundary capture) and finally fusion. Dynamic interplay between the plasma membrane and the underlying cortical actin cytoskeleton is critical for all these cell morphogenetic movements and an essential role of actin regulators has been demonstrated in muscle fiber formation (reviewed in Rochlin et al., 2010).

Filamentous actin is nucleated and organized into branched networks by the actin-related protein 2/3 (Arp2/3 complex), which nucleates new filaments and concomitantly anchors them to the sides of existing filaments, and the capping protein (CP), which binds to the rapidly growing barbed ends of filaments and terminates their growth (Pollard and Borisy, 2003). Both capping and nucleation activities are tightly coupled and required for dendritic actin networks formation and actin -based motility (Akin and Mullins, 2008; Carlier and Pantaloni, 1997).

The pleckstrin homology (PH) domain-containing protein **Casein Kinase 2 Interacting Protein-1 (CKIP-1)** (Bosc et al., 2000) contains a PH domain at the N-terminus and a putative leucine zipper (LZ) motif at the C-terminus. We and others have shown that CKIP-1 is mainly localized at the plasma membrane (Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004; Xi et al., 2010) and binds to phosphoinositides through its PH domain (Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004; Xi et al., 2010). CKIP-1 interacts with actin capping protein at the barbed ends of actin filaments (Canton et al., 2005; Canton et al., 2006). We have identified CKIP-1 protein as an actor of myoblast fusion *in vitro* (Safi et al., 2004). This prompted us to investigate its role in muscle fiber formation *in vivo*. We examined muscle fiber formation in Ckip-1 morpholino injected zebrafish embryos and showed that Ckip-1 knock down in zebrafish embryo impairs fast-twitch myoblast elongation and fusion. Search for CKIP-1 binding partners involved in cytoskeleton regulation (Pilot-Storck et al., 2010) identified ARPC1 subunit of Arp2/3 complex. We demonstrate that CKIP-1, through binding to plasma membrane phosphoinositides *via* its PH domain, regulates cell morphology through membrane recruitment of Arp2/3 complex. These results clearly establish CKIP-1 as a regulator of actin cytoskeleton and suggest a CKIP-1 dependent coordination of Arp2/3 activities. They additionally contribute *in vivo* functional data to support this hypothesis.

MATERIALS AND METHODS

Zebrafish Husbandry

Zebrafish maintenance and embryo collection were carried out using established protocols (Westerfield, 2001). Zebrafish embryos were staged according to (Halpern et al., 1995)

Morpholinos

Morpholinos (MO) were designed with sequence complementary to ckip1 cDNA and purchased from Gene-Tools, LCC. The sequences of the two ckip1 morpholino antisense oligonucleotides used were: ckip1 MO1 5'-TGGCTCAATGAAACACCGCTTCCCG-3' (-24 to +1 of the ATG codon) and ckip1 MO2 5'-CTCTCTCCCTCCACGAACAATCCAG-3' (-51 to -27 from the ATG codon). Ckip1MO were tagged with fluorescein at the 3' end to monitor success of injection and even distribution of morpholino in the embryos. Morpholinos were injected at a concentration of 1-2 mM

Whole-mount in situ hybridization

Whole-mount in situ hybridizations were performed according to Thisse and Thisse (http://www-igbmc.u-strasbg.fr/zf_info/zbook/chapt9/9.82.html). Riboprobe for ckip1 was transcribed from a template comprising 319 bp from nt 38-357 localized within the PH domain. A sense RNA probe complementary to the specific ckip1 probe was prepared as negative control. The myoD (Odenthal et al., 1996), ptc and shh RNA probes were prepared as previously described (http://www-igbmc.u-strasbg.fr/zf_info/zbook/chapt9/9.82.html)(B. Thisse, 2004). Embryos were observed on a LUMAR stereomicroscope (Zeiss).

Immunochemistry staining

Immunofluorescence labeling on embryos frozen sections was performed as previously described (Bader et al., 2009). For whole-mount immunofluorescence labeling, embryos were fixed overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde. Fixed embryos were blocked and permeabilized using a solution containing 5% goat serum and 0.5% Triton X100 in PBS. Embryos were incubated with F59 and F310 antibodies (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA), β catenin antibody (Sigma), Phalloidin⁴⁸⁸ and TOTO[®]-3 iodide⁶⁴²⁻⁶⁶⁰ (Invitrogen). After an overnight incubation with primary antibodies at 4°C, embryos were extensively washed in PBS at room temperature and incubated with the secondary antibody conjugated to alexa⁴⁸⁸ or alexa⁵⁵⁵ (Invitrogen) at room temperature for 1 hr. Sections and whole-mount embryos were observed with a spectral confocal laser scanning microscope (TCS SP5; Leica). Leica confocal software (LAS AF) was used for confocal acquisition. For all imaging, exposure settings were identical between compared samples. Images were processed using Adobe Photoshop software.

Cell lines, reagents and antibodies.

C2C12 myoblasts were cultured in growth medium (GM): Dulbecco modified Eagle medium (Gibco BRL), supplemented with 15% fetal calf serum (HyClone, Perbio). Transient transfections were realized with Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's instructions. Anti CKIP-1 antibody has been described previously. The other antibodies were: mouse monoclonal anti HA-tag (HA-11) (Covance), mouse monoclonal anti M2-Flag (Sigma), rabbit polyclonal anti ARPC2 and ARPC1A, provided by the Welch Laboratory and anti -CP α (MAb 5B12.3) and -CP β (MAb 3F2.3) subunits of the actin capping protein were obtained from the Iowa Hybridoma Bank developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the Department of Biological Sciences, University of Iowa (Iowa City, Iowa). The actin filaments were stained with phalloidin Alexa

Fluor 488 (Molecular Probes). Secondary antibodies for immunofluorescence were goat anti mouse and rabbit Alexa Fluor 555 and Alexa Fluor 488.

Plasmid constructs.

Full-length cDNA encoding M2-flag tagged- wild type (Safi et al., 2004) and mutant CKIP-1 were subcloned into pcDNA3 vector (Invitrogen).

The cDNA encoding CKIP-1 (residues 172-409) deleted from CP and PH domains was obtained by PCR and subcloned into HindIII-XbaI sites of pcDNA3 vector. The following oligonucleotide primers were used: forward primer: 5' ATAAAGCTTCCCGCCATGGCTGTGGC 3' and reverse primer: 5' GCGGCCGCTCACATCAGGCTCTTCCGGT 3'. An HA tag was placed at the 3' extremity by PCR using the same forward primer than above and the following reverse primer 5'GTATCTAGATCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTATGCGAATTCCATCAG GCTCTTC 3'. The resulting PCR fragment was subcloned into the HindIII-NotI sites of the pcDNA3 vector.

FLAG-CKIP-1 R154-156E (CKIP-1 mutant defective for CP interaction (Canton et al., 2006) was generated by PCR amplification as previously described (Mal et al., 2004) using the Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzyme) with the following forward primer: 5'CCTACTGAAGACGAAGCAAAAATCCAACACTCCCGCCGTCCTC-3', and reverse primer: 5'TTTTGCTTCGTCTTCAGTAGGGTGGGCAAGATAGCTGTCCTCCTC-3'. FLAG-CKIP-1 Δ 20-131 was generated by PCR amplification as previously described (Imai et al., 1991) using the forward primer 5'-AGAGCTAAAAACCGTATCTTGG-3' and the reverse primer 5'-CGCAGACTGATGGTTTCCATC-3'.

FLAG-CKIP-1 Δ 1-131, FLAG-CKIP-1 Δ 1-136, FLAG-CKIP-1 Δ 1-141 were generated using M2-flag tagged- wild type CKIP-1 as a template, the following forward primers: 5' CGCGCGGAATTCAGAGCTAAAAACCGTATCTTGG 3', 5' CGCGCGGAATTCAT

CTTGATGAGGTCACCG 3', 5'CGCGCGGAATTCACCGTTGAGGAGGACAG 3', respectively, and the same reverse primer: 5' CAATCAGCGGCCGCACTAGTCT 3' were used. The resulting PCR fragments were subcloned into the EcoRI-NotI sites of M2-flag tagged wild type CKIP-1. CKIP-1 siRNA was previously described (Safi et al., 2004).

The pCS2⁺Lyn m-cherry construct contains the m-cherry fused to 10-aa palmitoylation/myristoylation sequence from Lyn tyrosine kinase (Kovarova et al., 2001) that targets the chimeric protein to membranes.

Western-blot analysis

Embryos and cells were lysed in buffer (100 mM Tris-Cl, pH7, 5, 2mM EDTA, 100 mM NaCl, 1%Triton X-100, protease and phosphatase inhibitors (Complete, Roche Molecular Biochemicals), 10mM β -glycerophosphate, sodium vanadate 6mM, and sodium fluoride 50mM). Protein concentrations were determined using the BioRad DC kit; BioRad. 50 μ g total proteins were separated by 11% SDS-PAGE electrophoresis and transferred onto nylon membranes (Hybond P, Amersham). Membranes were blocked with TBS-0.02%Tween containing 5% skimmed milk and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Membranes were washed and incubated for 30 min with anti -mouse and -rabbit HRP-conjugated secondary antibodies (Amersham). After several washes in TBS-0.02% Tween, membranes were incubated with ECL reagent (Amersham).

Immunofluorescence analysis

Immunofluorescence analysis was performed as follows. Cells were fixed for 10 min in 3,7% formalin-PBS prior to permeabilization for 10 min with 1 % triton in PBS and saturation for 10 min with 1 % BSA in PBS. Cells were then incubated with the primary antibodies diluted in PBS with 1% BSA for 1 hour at room temperature or overnight at 4°C, then washed in PBS, and incubated for 30 min with secondary antibodies.

Labeled cells were observed with a spectral confocal laser scanning microscope (TCS SP5; Leica). Leica confocal software (LAS AF) was used for confocal acquisition. For all imaging, exposure settings were identical between compared samples. Images were processed using Adobe Photoshop software.

Time-lapse Video Microscopy

Cells were maintained in a 37°C, 6% CO₂, in relative humidity atmosphere. They were grown on 0.10 mm-thick tissue culture dish and studied for 15 hours after serum starvation and wound-healing. Video time lapse was realized with an inverted microscope Axiovert 100M Zeiss, Germany (objective 10X, numeric aperture, 0.25). Cell images were captured in transmitted illumination (exposure time, 10 ms) every 10 min for 15 hours as time series of 16-bit files. Paths and trajectories of 25 cells per experiment during 840 minutes were analyzed with Metamorph software. First phase contrast image of 86 sequential images (every 10 minutes) was pseudocolored green, last image was pseudocolored red and the images were superimposed.

Co-immunoprecipitation experiments

Cells were transiently transfected with pcDNA3 CKIP-1 wild type and mutants. Cells were washed twice in cold PBS and lysed on ice in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP40 and protease and phosphatase inhibitors (Complete, Roche Molecular Biochemicals), 10mM β -glycerophosphate, sodium vanadate 6mM, and sodium fluoride 50mM). Lysates were centrifuged for 5 min at 14 000 rpm at 4°C, and protein concentrations were measured in supernatants. Lysates were precleared by incubation for 30 min with proteins A/G Sepharose beads. After centrifugation, antibodies were added to supernatants for 4 hours at 4°C. Next, 60 μ l of proteins A/G Sepharose beads were added to supernatants for 1 hour at 4°C. Beads were

washed three times in lysis buffer. Total proteins and co-immunoprecipitates were analyzed by western blotting.

Yeast two-hybrid experiments

CKIP-1 and ARPC1A human open reading frames were transferred by recombinational cloning into pDB-dest and pAD-dest-CYH destination vectors to generate DB-ORF and AD-ORF fusions, respectively (Rual et al., 2004). DB-ORF and AD-ORF were transformed individually into MAT α MaV203 or MATa MaV103 yeast strains, respectively. DB-ORF and AD-ORF transformed cells were spotted on solid synthetic complete (Sc) media lacking leucine (Sc-L) or tryptophan (Sc-W), respectively. DB-CKIP-1 transformed cells were transformed by an AD-cDNA library from whole mouse embryo, E10.5 (ProQuest, Invitrogen) and plated on Sc-L-W plates lacking histidine and containing 20mM 3-AT (Sc-L-W-H+3AT) to select for colonies that exhibited elevated expression levels of the GAL1::HIS3 yeast two-hybrid marker. After 5 days at 30°C, colonies were consolidated on Sc-L-W-H+3-AT plates and then transferred to Sc-L-W-H+3AT and Sc-L-W-U plates to confirm GAL1::HIS3 and SPAL10::URA3 transcriptional activity and to solid medium containing yeast extract, peptone and dextrose (YPD) to determine GAL1::lacZ transcriptional activity using a β -galactosidase filter assay. We screened for colonies that tested positive for at least two assays. A PCR and a sequencing reaction identified ARPC1A as a CKIP-1 binding partner. This interaction was retested by mating DB-CKIP-1 to AD-ARPC1A yeasts. After one day, the cells were transferred on Sc-L-W to select for diploids. After one day, the diploids were plated on to Sc-L-W-H+3AT, to YPD and to Sc-L+3AT plates containing tryptophan and cycloheximide (Sc-L+3AT+CYH). The pAD-dest-CYH vector contains the CYH2 negative selection marker that allows plasmid shuffling on cycloheximide-containing media. This step allowed us to check that no auto-activator arose during yeast two-hybrid selections (Li et al., 2004).

RESULTS

Identification of the zebrafish *ckip-1* gene and study of its expression pattern

To explore its function in zebrafish myogenesis, *ckip-1* gene and its expression pattern were characterized in zebrafish *Danio rerio*. BLAST searches of the Sanger Ensembl zebrafish database identified nucleotide sequences whose conceptual translation products showed significant levels of similarity to the mammalian CKIP-1. A RACE-PCR strategy was devised to amplify the putative zebrafish *ckip-1* cDNA, allowing the recovery of the complete coding sequence of Ckip-1 (data not shown). The isolated cDNA was found in Genebank (GENE ID: 562940 LOC562940 | similar to Pleckstrin homology domain-containing family O member 1 (Casein kinase 2-interacting protein 1) (CK2-interacting protein-1) (CKIP-1) (C-Jun-binding protein) (JBP) [*Danio rerio*]). It is predicted to encode a protein of 403 amino acids protein that displays 55,5% identity with mouse CKIP-1 (Figure S1). In its N-terminal part, zebrafish Ckip-1 contains a PH domain (residues 23-133) followed by the CP binding domain (residues 138 to 165 (Hernandez-Valladares et al., 2010)) which display 80,9 and 86,2% identity with the corresponding mouse domains respectively. On the basis of these domains organisation and of the quite high level of protein similarity between the mouse (NP_075809) and human (NP_057358) CKIP-1 and the corresponding zebrafish protein, we concluded that this transcript encodes the zebrafish Ckip-1 homolog.

The spatial distribution of *ckip1* during zebrafish development was analyzed by *in situ* hybridization on whole embryos at different stages (Figure S2). Whole mount ISH with a digoxigenin-labeled *ckip-1* antisense probe complementary to the PH domain showed a strong and diffuse distribution of *ckip-1* mRNA throughout the embryo as early as the one-cell stage, indicating that Ckip-1 is maternally derived. The signal localized ubiquitously in the embryos until the end of somitogenesis. At 26 somite stage, *ckip-1* mRNA was detected in the head region and in the developing somites (Figure S2 A). Similar results were obtained with an antisense probe (nt 1144-1548) complementary to the C-terminal part of Ckip-1 (data not

shown). Ckip-1 expression was further analyzed by western blot using our anti CKIP-1 antibody that recognizes zebrafish Ckip-1 protein (Figure S2 B). It shows that Ckip-1 is expressed at significant levels from one cell stage to 22 hpf (26 somites) and is downregulated afterwards.

Ckip-1 knockdown impairs fast-twitch muscle precursor fusion

In fast muscle lineage, Ckip-1 localized at the periphery of fast precursor cells, closed to the plasma membrane visualized by beta catenin staining (Figure 1A). To investigate a possible requirement of Ckip-1 in myoblast elongation and fusion, its expression was knocked down with two different antisense morpholino oligonucleotides (MO1 and MO2) directed against the 5' UTR of Ckip-1 mRNA. Knockdown efficiency of morpholino antisense oligonucleotides was assessed by immunofluorescence (Figure S3 A) and western-blot analysis (Figure S3 B). Subsequently, we injected pCS2 + Lyn-m cherry expression construct that stains plasma membranes and allows the observation of individual injected cells. The injected embryos were fixed at 24-26 hpf, stained for Prox 1 that allow pionner cell and slow fiber nuclei visualization, and analyzed by confocal microscopy. There is an anterior to posterior and a medial to lateral progression of fast-twitch muscle cell elongation and fusion (Henry and Amacher, 2004). We first quantified the medial to lateral progression of muscle cell fusion at the level of somite XII (mid-trunk). The majority of cherry positive myocytes in *ckip-1*-embryos was not elongated and did not span the somite width at the surface as well as throughout the mediolateral width of the myotome (Figure 1B). A substantial proportion (95%) was mononucleated (Figure 1C). However, the small percentage of cells that did fuse displayed 2,11 +/- 0,395 nuclei per fibre. At the same level, wild type embryos formed syncytial fast fibres (Figure 1B) and 91 % of cherry positive fibres were multinucleated with an average of 2,67 +/- 0,336 of nuclei per fibre (Figure 1C). As expected, in recently formed posterior somites (somite XVIII) of wild-type embryos, only 34 +/- 19,4 % of cells had fused with a mean number of nuclei of 2 +/- 0,5 per fibre, showing the antero posterieur progression

of fast-twitch muscle cell formation (Figure 1C). Impaired fusion in *ckip-1*- embryos is not due to a delayed antero posterior differentiation progression since the same percentage of unfused cells was observed more anteriorly at the level of somite IV than in somites XII (Figure 1B and C). The fused cells displayed $2,3 \pm 0,32$ nuclei per fibre. These results clearly show that CKIP-1 knock down impairs fast myoblast elongation and fusion.

Examination of embryos at 18 hpf showed that in contrast to wild-type embryos, the morphology of *ckip-1*- embryos fast precursors remained irregular and most of them did not extend protrusions in the direction of elongation and between other cells as compared to control animals (Figure 1D). Indeed, in wild type embryos, short fast muscle precursor cells elongate and intercalate along the anteroposterior axis.

In *ckip-1*- embryos, expression of the muscle determination gene, *myoD*, was unaffected, indicating that the fast-muscle precursor fusion defect was unlikely to have arisen from a general impairment in their commitment to myogenesis (Figure S4). Moreover, similarly to what observed in wild type embryos, the unfused myoblasts of *ckip-1*- embryos also reacted with monoclonal antibody F310, which specifically recognizes zebrafish fast myosin heavy chain (Figure 1E) suggesting that the fast myoblasts were nevertheless capable of differentiating as mononucleated muscles of the fast-twitch type.

Fusion defect is not due to abnormal slow fibre migration through the fast myotome.

Whole mount immunofluorescence followed by confocal microscopy in 8 to 10 somite embryos detected Ckip-1 accumulations, co-localized with actin cytoskeleton, at the sites where cuboidal adaxial cells of the posterior presomitic mesoderm contact the notochord (Figure 2A). More anteriorly in the mesoderm, adaxial cells elongate anteroposteriorly along the notochord and acquire a flattened fiber-like appearance. In these cells, Ckip-1 was enriched at the actin-rich attachment sites to somite boundaries and co-localized with actin fibers (Figure 2B). It has been demonstrated that as slow muscle fibers migrate through the somite,

they act as organizers to instruct a morphogenetic wave of muscle cell elongation leading to fusion. As seen in figure 1B, slow fibres expressing *prox 1* were seen laterally in both morphant and control animals showing that they had reached the myotome periphery. However, nuclear *prox 1* staining does not allow the visualization of slow fibre morphology and their differentiation; i.e. the expression of slow MyHC. To investigate if *Ckip-1* knock down affects slow fiber migration and thus fast twitch myoblast elongation and fusion, we stained 24 hr post fertilization (hpf) embryo cryosections with F59 antibody for slow myosin heavy chain. Confocal analysis revealed that slow fibres development in *ckip-1-* embryos appeared unaltered (Figure 2C). However, we noticed that they were no longer located in the characteristic chevron pattern. This is likely to be an indirect consequence of alteration in somite morphology due to improperly elongated fast myofibers and a shortened anteroposterior axis (data not shown). When an average of $23 \pm 0,8$ SEM fibers were present at the lateral surface of each somite in control 48hpf embryos ($n = 10$), morphant animals ($n = 9$) only had $16 \pm 0,86$ SEM such cells, and therefore presented gaps in the lateral palisade of slow muscle fibers (Figure 2C). This lack of some slow fibers at the myotome periphery is very unlikely the cause of fast twitch myoblast fusion defect. Indeed, it was shown transplantation of a single slow muscle fiber can rescue fast muscle cell elongation in the somite in which the slow muscle fiber is migrating (Henry and Amacher, 2004).

The absence of CKIP-1 does not impair the slow-twitch program execution as shown by slow MyHC (Figure 2C) expression and the slow muscle-specific homeobox gene *prox1* activation (Figure S4 C). The Hedgehog (Hh) signaling that originates from the notochord and the neural tube specifies slow myoblasts (Hirsinger et al., 2004; Lewis et al., 1999) (Blagden et al., 1997). No defects in notochord-derived *shh* expression and that of its targets: the patched 1 (*ptc1*) receptor and *myoD* on adaxial cells (Figure S4 A, B) were observed in *ckip-1-* embryos showing that the pathway is intact and functional. These results show that *Ckip-1* knock down did not prevent slow fibre specification, formation, migration and differentiation.

CKIP-1 is required for lamellipodia extension

To investigate the molecular mechanisms involved in cell morphology regulation by CKIP-1, we performed experiments *in vitro* in C2C12 myoblasts. Endogenous CKIP-1 was mainly found in plasma membrane protrusions in association with F-actin network (Figure 3A). Consistently, a marked enrichment of CKIP-1 could be observed in these structures as compared to adjacent areas at the cell periphery. In migrating C2C12 cells, CKIP-1 accumulated at the leading edges along the actin cortex (Figure 3B). To determine if CKIP-1 had a functional role in actin polymerization, the effects of CKIP-1 overexpression and depletion were examined in insulin stimulated C2C12 cells. In muscle cells, insulin induces actin polymerization and lamellipodia formation in a PI3K-Rac1 dependent manner (Ishikura et al., 2008). As previously reported, CKIP-1 accumulated in plasma membrane protrusions induced by insulin (Safi et al., 2004) and cells overexpressing CKIP-1 (M2-CKIP-1) displayed larger lamellipodia (Figure 3C). Measurements showed a 40% increase of cell perimeter in M2-CKIP-1 transfected versus control cells (Figure 3D). More importantly, the proportion of cell perimeter involved in lamellipodia increased more than two fold in M2-CKIP-1 cells as compared to control cells (Figure 3E, left graph). Accordingly, CKIP-1 depletion by siRNA (Figure 3F) had opposite effects. Indeed, C2C12 cells cotransfected with CKIP-1 siRNA and RFP expression vector displayed a reduced cell surface and were mostly bipolar with stress fibers running in one major direction and no more large protrusions even after insulin treatment (Figure 3G). Lamellipodia size was drastically reduced in these cells (Figure 3E, right graph). These effects were not observed with a non-specific siRNA (Figure 3G).

Altogether, these results showed that CKIP-1 predominantly co-localizes with cortical actin at regions of active cytoskeleton remodeling and is required for lamellipodia extension. Since membrane lamellipodia are required for cell movements, decreasing CKIP-1 expression

should impair cell motility. As expected (Figure S5), we showed that the inhibition of lamellipodia formation induced by CKIP-1 depletion affects cell migration.

CKIP-1 regulation of cell morphology requires its interaction with Arp2/3 complex and its membrane localization.

To elucidate the mechanism of action of CKIP-1 in the formation of cell protrusions and the regulation of cell motility, a yeast two-hybrid screen was performed to identify new interactors of CKIP-1 (Pilot-Storck et al., 2010). The Arp2/3 subunit ARPC1A was identified as a direct binding partner for CKIP-1 (Figure 4A). This interaction was confirmed by coimmunoprecipitation of CKIP-1 and ARPC1A in cell lysates of insulin stimulated C2C12 cells (Figure 4B). The ARPC2 subunit was also detected in CKIP-1 immunoprecipitates (Figure 4B), indicating that ARPC1A/CKIP-1 interaction preserved the functional role of ARPC1A in assembling ARP proteins. Consistently, a colocalization of ARPC1A and ARPC2 with CKIP-1 was observed in cell protrusions (Figure 4C).

To identify CKIP-1 domains involved in Arp2/3 binding, we generated CKIP-1 deletion mutants (Figure 5A). Alignments of human CKIP-1 with CARMIL (Canton et al., 2006) and other CP binding proteins (Hernandez-Valladares et al., 2010) defined a region encompassing residues 124 to 165 as essential for CP binding and inhibition. More precisely, it was shown that mutation of Arg-155 and Arg-157 fully abrogates CKIP-1 interaction with CP (Canton et al., 2006). We show that mutation of the corresponding residues Arg-154 and Arg-156 in mouse CKIP-1 abrogated CP binding and drastically reduced ARPC2 amount in the immunoprecipitates (Figure 5B). Deletion of the first 131 residues or only the PH domain (residues 20 to 131) did not impair ARPC2 and CP binding to CKIP-1. A decrease in CP and ARPC2 binding to CKIP-1 was observed with the deletion of residues 1 to 136, which was amplified with the deletion of residues 1 to 141. Finally, the deletion of residues 1 to 171 fully

abrogated CP and ARPC2 binding to CKIP-1. In conclusion, the CKIP-1 regions implicated in the binding to Arp2/3 and CP are tightly linked and located between residues 131 to 171.

As expected from co-immunoprecipitation experiments, CKIP-1 Δ R154E, R156E which is still located at the plasma membrane, displayed a slight co-localization with ARPC1A but does not show any co-staining with CP (Figure 5C). Due to the absence of the PH domain, both Δ 20-131 CKIP-1 and Δ 1-171 CKIP-1 mutants were not localized at the plasma membrane. In cells expressing these mutants, ARPC1A and CP were mainly cytoplasmic.

We then examined the impact of CKIP-1 mutations on cell morphology (Figure 5D). Expression of mutants impaired in their binding to Arp2/3 (R154E, R156E and Δ 1-171 mutants or expression CKIP-1 mutants which lacks the PH domain and thus are not located at the plasma membrane (Δ 20-131 and Δ 1-171) altered cell morphology, with cells displaying reduced perimeters and an absence of lamellipodia. In these cells, actin was organized in long stress fibers rather than large networks. In conclusion, recruitment of Arp2/3 to active regions of the plasma membrane by CKIP-1 is necessary for actin remodeling.

Ckip-1 knock down impairs Arp2/3 localization in zebrafish embryo muscle

To determine whether the absence of Ckip-1 impacts on Arp2/3 localization in zebrafish developing myotome, we examined Arp2/3 in 22 somite embryos. A punctuate ARPC2 staining was observed in fast twitch myoblasts on both sides of the myosepta in wild type embryos. In *ckip-1*⁻ embryos, ARPC2 punctuate staining was more randomly distributed in the fast myotome (Figure 6A) and fewer dots could be seen. No decrease in ARPC2 expression (Figure 6B) was observed by immunoblot between *ckip-1*⁻ and wild type embryos showing that ARPC2 was most probably diffusely distributed in the cytoplasm. In conclusion, these data indicate that Ckip-1 influences Arp2/3 localization *in vivo* in zebrafish myotome and strongly suggest that myotome defects in *ckip-1*⁻ embryos may come from an aberrant Arp2/3 localization.

DISCUSSION

In this work, we demonstrate that Ckip-1 is required for zebrafish muscle fast precursor cell fusion. We show that CKIP-1 regulates cell morphology through cortical actin remodeling by recruiting at the plasma membrane the principal actin nucleator (Arp2/3 complex) of actin filament.

CKIP-1 is required for fast-twitch myoblast fusion in zebrafish

Investigation of the role of Ckip-1 in zebrafish myogenesis revealed that muscle fast twitch myoblasts precursor cell morphological changes were affected in *ckip-1*- embryos. In zebrafish, fast-twitch myoblast fuse after elongation and boundaries capture (Snow et al., 2008). In Ckip-1 deficient embryos, most myoblasts don't elongate and remained mononucleated. However, they retained the capacity to differentiate and express fast MyHC. Thus, Ckip-1 interfered with morphogenetic behaviors and fusion but not with the differentiation genetic program. An apparent discrepancy between our in vivo data and in vitro is the absence of slow fibre migration defect whereas CKIP-1 knock down in C2C12 myoblasts impedes migration (Figure 5S). After elongation, slow fibres make attachments with somite boundaries next to the notochord and migrate through the fast zebrafish myotome. On the contrary to individual cultured cells, slow fibre migration does not require extension of large membrane protrusions. This may explain the different effect of CKIP-1 knock down between these two types of migration.

It has been shown that slow fibre migration is influenced by differential cell adhesion. Indeed, there is a dynamic and reciprocal wave of N-cadherin and M-cadherin expression within the myotome occurring during slow cell migration. It generates adhesive environments that drive slow-twitch muscle cell migration through the myotome (Cortes et al., 2003). Inhibition of N-or M- cadherin expression within the myotome perturbs migration. Since Ckip-1 knock down does not affect slow fibre migration, one can hypothesize that it does not perturb this adhesive environment necessary for slow fibre migration.

CKIP-1 regulates actin dynamics through its binding to Arp2/3 and membrane phosphoinositides

To investigate how CKIP-1 is involved in membrane remodeling that occurs during cellular protrusion extension and membrane fusion, we performed a yeast two hybrid screen and identified ARPC1A, a subunit of Arp2/3 complex as a CKIP-1 interacting protein. The ARPC2 subunit was also detected in CKIP-1 immunoprecipitates, indicating that ARPC1A/CKIP-1 interaction preserved the functional role of ARPC1A in assembling ARP proteins. ARPC1A subunit of Arp2/3 complex is important for the proper structural organization of the nucleation site and for binding to Arp2/3 activators (Gournier et al., 2001; Pan et al., 2004, Balcer, 2010 #815; Robinson et al., 2001; Zalevsky et al., 2001).

CKIP-1 interacts with actin capping protein at the barbed ends of actin filaments (Canton et al., 2005; Canton et al., 2006). Capping protein and Arp2/3 complex are known to cooperate in dynamic actin remodeling events (Akin and Mullins, 2008; Carlier and Pantaloni, 1997). Here, we show that CKIP-1 binds the principal nucleator (Arp2/3 complex) of actin filament assembly. Inhibition of CKIP-1 binding to Arp2/3 affects its membrane localization and abrogates lamellipodia formation at the cell leading edge. Removal of the PH domain required for the recruitment of CKIP-1 at the plasma membrane led to the same alterations. Thus, cell protrusions formation requires CKIP-1 binding to Arp2/3, as well as its plasma membrane localization through phosphoinositides binding via the pleckstrin homology (PH) domain (Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004).

CKIP-1 resembles other proteins such as CARMIL (Jung et al., 2001), CD2AP (Lynch et al., 2003) and FAM21 (Bear, 2009; Gomez and Billadeau, 2009). These proteins have been shown to link CP to Arp2/3 and Arp2/3 activators through diverse protein complexes. These associations may recruit Arp2/3 close to the ends of actin filaments, promoting actin branching. Indeed, real-time observation of actin filament branching using total internal reflection

fluorescence microscopy showed that branching occurred preferentially near the barbed end (Amann and Pollard, 2001).

The role of Arp2/3 and its activators as well as other cytoskeleton regulators in membrane remodeling at sites of muscle cell fusion has been demonstrated in different animal models such as *Drosophila* and *Mus musculus* (Rochlin et al., 2010). Our work strongly suggests that Arp2/3 via its interaction with CKIP-1 might also be involved in zebrafish fast myoblast fusion. We previously showed that CKIP-1 targeting at the plasma membrane depends on PI3K signaling activation (Safi et al., 2004). One can hypothesize that CKIP-1 behaves as a scaffold, bringing Arp2/3 to the active regions of the plasma membrane in response to external cues that activate PI3K and/or induce myoblast membrane fusion.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to M.D. Welch (Department of Molecular and Cell Biology, University of California) for providing Arp2/3 subunit antibodies. The (MAb 5B12.3) (MAb 3F2.3), (MAb F59) (MAb F310) were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242.

We thank the zebrafish (PRECI) and microscopy (Plateau Technique Imagerie/Microscopie) facilities of the IFR128 Biosciences. F.C. was supported by the AFM (Association française contre les Myopathies). A.G. is supported by the French Ministère de la Recherche. This work was supported by the Association française contre les Myopathies (to E. Goillot), the Association pour la Recherche contre le Cancer (to E. Goillot) and the Ministère de la Recherche et de la Technologie (ACI BDPI to L. Schaeffer).

REFERENCES

- Akin, O. and Mullins, R. D.** (2008). Capping protein increases the rate of actin-based motility by promoting filament nucleation by the Arp2/3 complex. *Cell* **133**, 841-51.
- Amann, K. J. and Pollard, T. D.** (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15009-13.
- B. Thisse, V. H., A. Lux, A. Alunni, A. Degraeve, I. Seiliez, J. Kirchner, J.-P. Parkhill and C. Thisse.** (2004). Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening. *Meth. Cell. Biol.* **77**, 505-519.
- Bader, H. L., Keene, D. R., Charvet, B., Veit, G., Driever, W., Koch, M. and Ruggiero, F.** (2009). Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (fascia) and basement membranes. *Matrix Biol* **28**, 32-43.
- Bear, J. E.** (2009). Sorting out endosomes in the WASH. *Dev Cell* **17**, 583-4.
- Blagden, C. S., Currie, P. D., Ingham, P. W. and Hughes, S. M.** (1997). Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes Dev* **11**, 2163-75.
- Bosc, D. G., Graham, K. C., Saulnier, R. B., Zhang, C., Prober, D., Gietz, R. D. and Litchfield, D. W.** (2000). Identification and characterization of CKIP-1, a novel pleckstrin homology domain-containing protein that interacts with protein kinase CK2. *J Biol Chem* **275**, 14295-306.
- Canton, D. A., Olsten, M. E., Kim, K., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G., Cooper, J. A. and Litchfield, D. W.** (2005). The pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 is involved in regulation of cell morphology and the actin cytoskeleton and interaction with actin capping protein. *Mol Cell Biol* **25**, 3519-34.
- Canton, D. A., Olsten, M. E., Niederstrasser, H., Cooper, J. A. and Litchfield, D. W.** (2006). The role of CKIP-1 in cell morphology depends on its interaction with actin-capping protein. *J Biol Chem* **281**, 36347-59.
- Carlier, M. F. and Pantaloni, D.** (1997). Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* **269**, 459-67.
- Cortes, F., Daggett, D., Bryson-Richardson, R. J., Neyt, C., Maule, J., Gautier, P., Hollway, G. E., Keenan, D. and Currie, P. D.** (2003). Cadherin-mediated differential cell adhesion controls slow muscle cell migration in the developing zebrafish myotome. *Dev Cell* **5**, 865-76.
- Daggett, D. F., Domingo, C. R., Currie, P. D. and Amacher, S. L.** (2007). Control of morphogenetic cell movements in the early zebrafish myotome. *Dev Biol* **309**, 169-79.
- Devoto, S. H., Melancon, E., Eisen, J. S. and Westerfield, M.** (1996). Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development* **122**, 3371-80.
- Gomez, T. S. and Billadeau, D. D.** (2009). A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell* **17**, 699-711.
- Gournier, H., Goley, E. D., Niederstrasser, H., Trinh, T. and Welch, M. D.** (2001). Reconstitution of human Arp2/3 complex reveals critical roles of individual subunits in complex structure and activity. *Mol Cell* **8**, 1041-52.
- Halpern, M. E., Thisse, C., Ho, R. K., Thisse, B., Riggleman, B., Trevarrow, B., Weinberg, E. S., Postlethwait, J. H. and Kimmel, C. B.** (1995). Cell-autonomous shift from axial to paraxial mesodermal development in zebrafish floating head mutants. *Development* **121**, 4257-64.
- Henry, C. A. and Amacher, S. L.** (2004). Zebrafish slow muscle cell migration induces a wave of fast muscle morphogenesis. *Dev Cell* **7**, 917-23.
- Hernandez-Valladares, M., Kim, T., Kannan, B., Tung, A., Aguda, A. H., Larsson, M., Cooper, J. A. and Robinson, R. C.** (2010). Structural characterization of a capping protein

interaction motif defines a family of actin filament regulators. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 497-503.

Hirsinger, E., Stellabotte, F., Devoto, S. H. and Westerfield, M. (2004). Hedgehog signaling is required for commitment but not initial induction of slow muscle precursors. *Dev Biol* **275**, 143-57.

Imai, Y., Matsushima, Y., Sugimura, T. and Terada, M. (1991). A simple and rapid method for generating a deletion by PCR. *Nucleic Acids Res* **19**, 2785.

Ishikura, S., Koshkina, A. and Klip, A. (2008). Small G proteins in insulin action: Rab and Rho families at the crossroads of signal transduction and GLUT4 vesicle traffic. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 61-74.

Jung, G., Remmert, K., Wu, X., Volosky, J. M. and Hammer, J. A., 3rd. (2001). The Dictyostelium CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *J Cell Biol* **153**, 1479-97.

Kovarova, M., Tolar, P., Arudchandran, R., Draberova, L., Rivera, J. and Draber, P. (2001). Structure-function analysis of Lyn kinase association with lipid rafts and initiation of early signaling events after Fcepsilon receptor I aggregation. *Mol Cell Biol* **21**, 8318-28.

Lewis, K. E., Concordet, J. P. and Ingham, P. W. (1999). Characterisation of a second patched gene in the zebrafish *Danio rerio* and the differential response of patched genes to Hedgehog signalling. *Dev Biol* **208**, 14-29.

Li, S., Armstrong, C. M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P. O., Han, J. D., Chesneau, A., Hao, T. et al. (2004). A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* **303**, 540-3.

Lynch, D. K., Winata, S. C., Lyons, R. J., Hughes, W. E., Lehrbach, G. M., Wasinger, V., Corthals, G., Cordwell, S. and Daly, R. J. (2003). A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **278**, 21805-13.

Mal, T. K., Masutomi, Y., Zheng, L., Nakata, Y., Ohta, H., Nakatani, Y., Kokubo, T. and Ikura, M. (2004). Structural and functional characterization on the interaction of yeast TFIID subunit TAF1 with TATA-binding protein. *J Mol Biol* **339**, 681-93.

Odenthal, J., Haffter, P., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J. et al. (1996). Mutations affecting the formation of the notochord in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 103-15.

Olsten, M. E., Canton, D. A., Zhang, C., Walton, P. A. and Litchfield, D. W. (2004). The Pleckstrin homology domain of CK2 interacting protein-1 is required for interactions and recruitment of protein kinase CK2 to the plasma membrane. *J Biol Chem* **279**, 42114-27.

Pan, F., Egile, C., Lipkin, T. and Li, R. (2004). ARPC1/Arc40 mediates the interaction of the actin-related protein 2 and 3 complex with Wiskott-Aldrich syndrome protein family activators. *J Biol Chem* **279**, 54629-36.

Pilot-Storck, F., Chopin, E., Rual, J. F., Baudot, A., Dobrokhotov, P., Robinson-Rechavi, M., Brun, C., Cusick, M. E., Hill, D. E., Schaeffer, L. et al. (2010). Interactome mapping of the phosphatidylinositol 3-kinase-mammalian target of rapamycin pathway identifies deformed epidermal autoregulatory factor-1 as a new glycogen synthase kinase-3 interactor. *Mol Cell Proteomics* **9**, 1578-93.

Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65.

Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S. and Pollard, T. D. (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* **294**, 1679-84.

Rochlin, K., Yu, S., Roy, S. and Baylies, M. K. (2010). Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Dev Biol* **341**, 66-83.

- Rual, J. F., Hirozane-Kishikawa, T., Hao, T., Bertin, N., Li, S., Dricot, A., Li, N., Rosenberg, J., Lamesch, P., Vidalain, P. O. et al.** (2004). Human ORFeome version 1.1: a platform for reverse proteomics. *Genome Res* **14**, 2128-35.
- Safi, A., Vandromme, M., Caussanel, S., Valdacci, L., Baas, D., Vidal, M., Brun, G., Schaeffer, L. and Goillot, E.** (2004). Role for the pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 in phosphatidylinositol 3-kinase-regulated muscle differentiation. *Mol Cell Biol* **24**, 1245-55.
- Snow, C. J., Goody, M., Kelly, M. W., Oster, E. C., Jones, R., Khalil, A. and Henry, C. A.** (2008). Time-lapse analysis and mathematical characterization elucidate novel mechanisms underlying muscle morphogenesis. *PLoS Genet* **4**, e1000219.
- Westerfield, M.** (2001). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). *University of Oregon Press, Eugene, Oregon*.
- Xi, S., Tie, Y., Lu, K., Zhang, M., Yin, X., Chen, J., Xing, G., Tian, C., Zheng, X., He, F. et al.** (2010). N-terminal PH domain and C-terminal auto-inhibitory region of CKIP-1 coordinate to determine its nucleus-plasma membrane shuttling. *FEBS Lett* **584**, 1223-30.
- Yin, C. and Solnica-Krezel, L.** (2007). Convergence and extension movements mediate the specification and fate maintenance of zebrafish slow muscle precursors. *Dev Biol* **304**, 141-55.
- Zalevsky, J., Grigorova, I. and Mullins, R. D.** (2001). Activation of the Arp2/3 complex by the *Listeria acta* protein. Acta binds two actin monomers and three subunits of the Arp2/3 complex. *J Biol Chem* **276**, 3468-75.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Ckip-1 knockdown impairs fast-twitch muscle precursor fusion

Confocal images of fast-twitch precursor cells (A) at the depth of the notochord within 8-10 somite embryos (14hpf) labelled with Ckip-1 (green), beta-catenin (red) and DAPI (blue). Dorsal view, anterior to the top. Ckip-1 is localized at the membranes highlighted by beta-catenin staining. (B) All panels (side view, anterior left) are confocal images encompassing a three somites view of 24 hpf embryos injected with *ckip-1* (*ckip-1*-) and control (wild-type) morpholinos and subsequently with pCS2 + Lyn-m cherry expression construct that stains plasma membranes and allows the observation of individual injected cells. Embryos were labeled with anti-Prox1 that stains pioneer cells and slow fiber nuclei (green) and DAPI (blue). Prox1 positive nuclei were traced and coloured green to be more visible. The numbers designate the somite number along the anterior-posterior axis. The left m-Cherry panels are identical to the m-Cherry DNA Prox1 panels on their right. Two images are shown for each embryo, one at the periphery of the myotome (lateral) and one at the level of the notochord (NC) (medial). In morphant embryos, myosept have been traced in white. (C) Number of m-Cherry positive fibres and mononucleated fast-twitch myoblasts as well as number of nuclei per fibre on 10 to 15 focal plans scanning the entire myotome of five to six somites (mid trunk) of 24 hpf *ckip-1* (*ckip-1*-) and control (wild-type) morpholino injected embryos were counted. Results represents mean +/- SEM of six different morphant and wild-type embryos. (D) Confocal images (mid-trunk, side view, anterior left) encompassing a two somites width view of 18 hpf *ckip-1* (*ckip-1*-) and control (wild-type) morpholino and pCS2 + Lyn-m cherry expression construct injected embryos labeled with DAPI (blue). Arrows show short and elongating cells in 18 hpf *ckip-1* (*ckip-1*-) and control (wild-type) morpholino injected embryos respectively. (E) Confocal images showing a lateral view of two somites at the depth

of the notochord in 18 hpf *ckip-1* (*ckip-1-*) and control (wild-type) morpholino injected embryos labeled for fast MyHC (F310) (red) and DAPI (blue). Mid-trunk, anterior to the top.

Figure 2

Ckip-1 knock down does not affect slow muscle cell migration through the fast myotome

Confocal image of adaxial cells (**A, B**) at the depth of the notochord within 8-10 somite embryos (14hpf) labeled with Ckip-1 (green), phalloidin (red) and DAPI (blue). Dorsal view, anterior to the top. (**A**) Ckip-1 is expressed in cuboidal adaxial cells in the posterior presomitic mesoderm. More anteriorly, adaxial cells have intercalated (**B**) and Ckip-1 localizes in actin-rich somite attachments and cytoplasmic actin fibers. Arrows indicate Ckip-1 colocalization with actin. (**C**) Single frames of a 3D reconstitution encompassing a five somite width lateral view of 48 hpf *ckip-1* (*ckip-1-*) and control (wild-type) morpholino injected embryos labeled with F59 antibody (grey). Anterior to the top. Arrows show gaps in the lateral palisade of slow muscle fibers.

Figure 3

CKIP-1 is required for lamellipodia extensions

(**A, B**) Confocal image of C2C12 cell labeled with phalloidin and anti-CKIP-1 antibody. Arrowheads point to CKIP-1 cell surface accumulation at actin remodelling sites in cellular protrusions (**A**) and lamellipodia (**B**). (**C, D, E**) M2-CKIP-1 transfected- and control C2C12 cells were serum starved for 6 hours and then stimulated with insulin for 10 min. (**C**) Confocal image of insulin stimulated M2-CKIP-1 transfected C2C12 cell labeled with phalloidin and anti-CKIP-1 antibody. (**D**) The perimeter of insulin stimulated M2-CKIP-1 transfected- and control (C) -C2C12 cells was measured using ImageJ software. Results shown represent the average perimeter of ~120 cells in six different experiments; error bars indicate SEM. (**E**). Lamellipodia size represents the ratio of the membrane length constituting the lamellipodia on

cell total perimeter in M2-CKIP-1 transfected cells (left graph) and CKIP-1siRNA transfected cells (right graphs) as compared to control cells. In **D** and **E**, statistical significance was evaluated in independent samples *t*-tests; (**): $p < 0,005$, (***) : $p < 0,001$ respectively. **(F)** Control (C) and CKIP-1 siRNA transfected C2C12 cell extracts were immunoblotted for CKIP-1 and tubulin as a loading control. **(G)** Confocal image of RFP expression vector and CKIP-1 or control siRNA co-transfected cells treated with insulin and labeled with phalloidin.

Figure 4

CKIP-1 interacts with Arp2/3 subunit ARPC1A and colocalizes with Arp2/3 and CP in membrane protrusions

(A) Yeast two-hybrid assay of ARPC1A and CKIP-1 proteins interaction. The following controls were spotted: negative control, empty DB and AD vectors, positive controls, DB-pRB with AD-E2F1 and DB-c-Jun with AD-c-Fos. DB: DNA-binding Domain, AD: Activation Domain. Yeasts were plated onto $-His+3AT$ plates for expression of the *HIS3* reporter gene; onto plates containing cycloheximide ($+3AT+CYH$) to detect auto-activators and onto YPD to determine *GAL1::lacZ* transcriptional activity by using a β -galactosidase filter assay (β -GAL).

(B) Total lysates were prepared from M2-CKIP-1 transfected C2C12 cells after serum starvation (-FCS) followed by insulin stimulation (+ins). CKIP-1 was immunoprecipitated with anti-M2-tag antibody. Mouse Ig (Ig) was used as control. Immunoprecipitates (left panel) as well as input lysates (right panel) were immunoblotted for CKIP-1, ARPC1A and ARPC2. **(C)** Confocal images of M2-CKIP-1 transfected C2C12 cells co-stained for CKIP-1 and endogenous ARPC1A and ARPC2. Arrowheads indicate ARPC1A and ARPC2 co-localizations with CKIP-1 in membrane protrusions.

Figure 5

Cell morphology regulation by CKIP-1 requires its binding to Arp2/3 as well as its membrane localization.

(A) Schematic representation of the different CKIP-1 mutant proteins. (B) Total lysates were prepared from wild-type M2-CKIP-1, M2-CKIP-1 R154E, R156E, M2-CKIP-1 Δ 20-131, M2-CKIP-1 Δ 1-131, M2-CKIP-1 Δ 1-136, M2-CKIP-1 Δ 1-141 and HA-CKIP-1 Δ 1-171 transfected C2C12 cells after serum starvation (-FCS) followed by insulin stimulation. CKIP-1 wild type and mutant proteins were immunoprecipitated with anti-M2 or HA-tag antibodies. Immunoprecipitates as well as input lysates were immunoblotted for CKIP-1, ARPC2 and capping proteins CP. (white asterisk shows HA-CKIP-1 Δ 1-171 mutant whose size is closed to ARPC2). (C) Confocal images of C2C12 cells expressing either wild type or mutant CKIP-1 labeled with anti-CKIP-1, -ARPC1A and -CP antibodies to examine their localization. Cell extremities are shown. All cells were serum starved for 6 hours and then stimulated with insulin for 10 min. (D) Confocal images of insulin stimulated control and R154E, R156E, M2-CKIP-1 Δ 20-131 and HA-CKIP-1 Δ 1-171 transfected C2C12 cells stained with phalloïdin for actin visualization.

Figure 6

CKIP-1 knockdown impairs Arp2/3 localization in zebrafish embryo muscle

(A) Confocal images encompassing two somites in 22 somite stage (20hpf) in *kip-1* (*kip-1*-) and control (wild-type) morpholino injected embryos fast myotome labeled with β -catenin (green), ARPC2 (red) and DNA (blue). Mid-trunk, dorsal view, anterior to the left. (D) Whole *kip-1* (*kip-1*-) and control (wild-type) morpholino injected embryo lysates (24hpf) were immunoblotted for ARPC2 and α tubulin as a loading control.

Figure 1

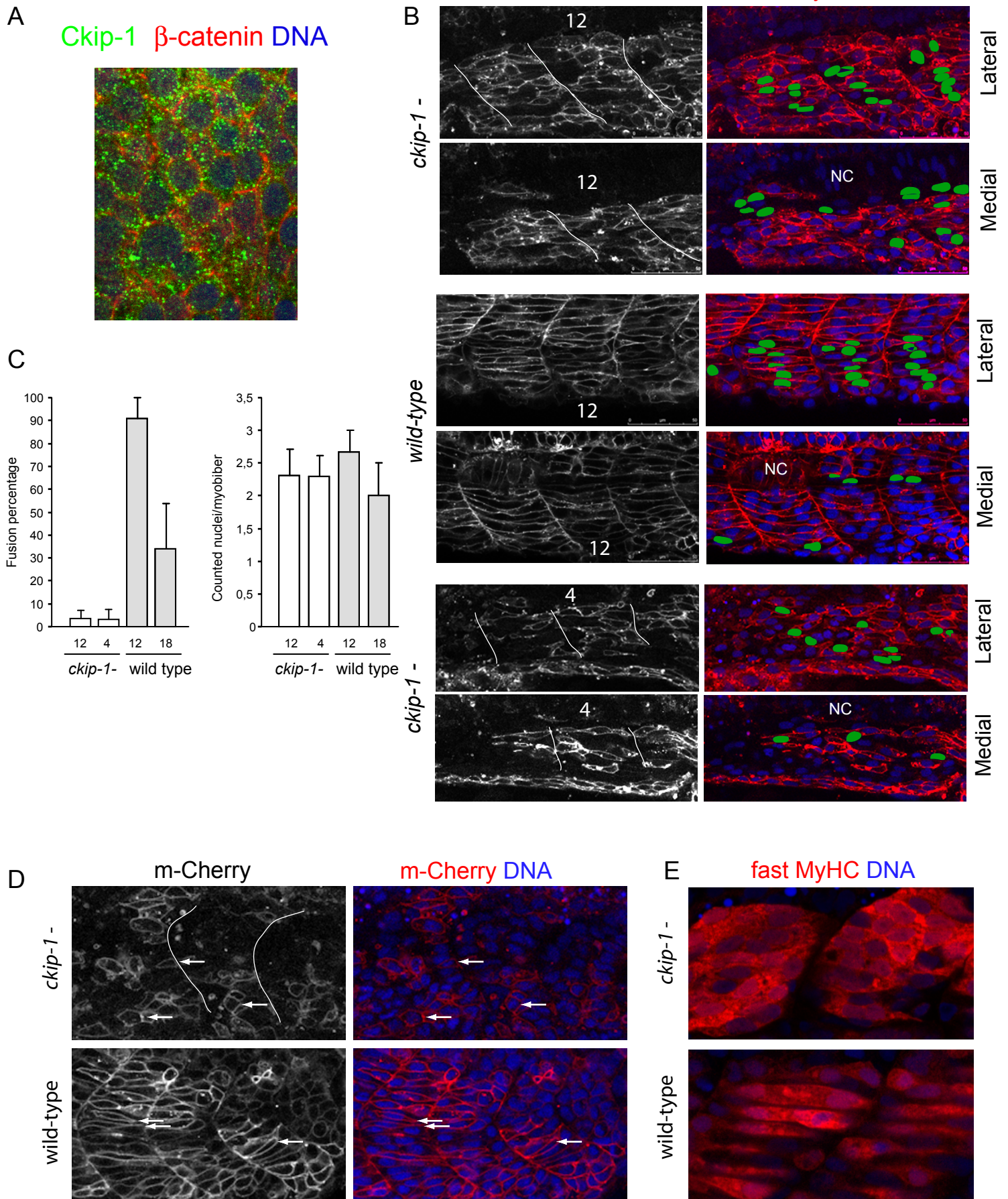


Figure 2

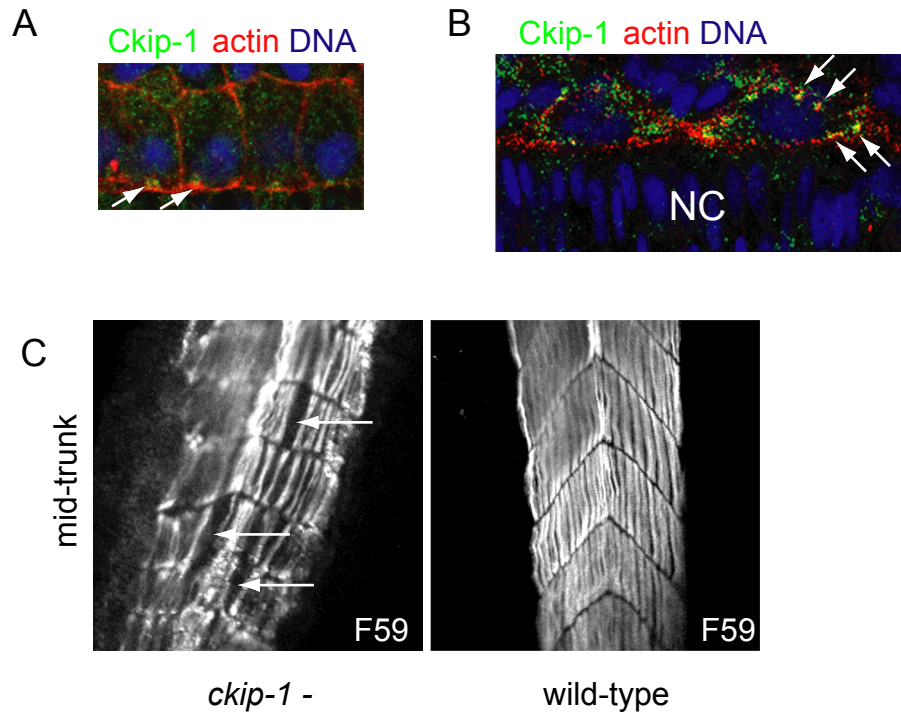


Figure 3

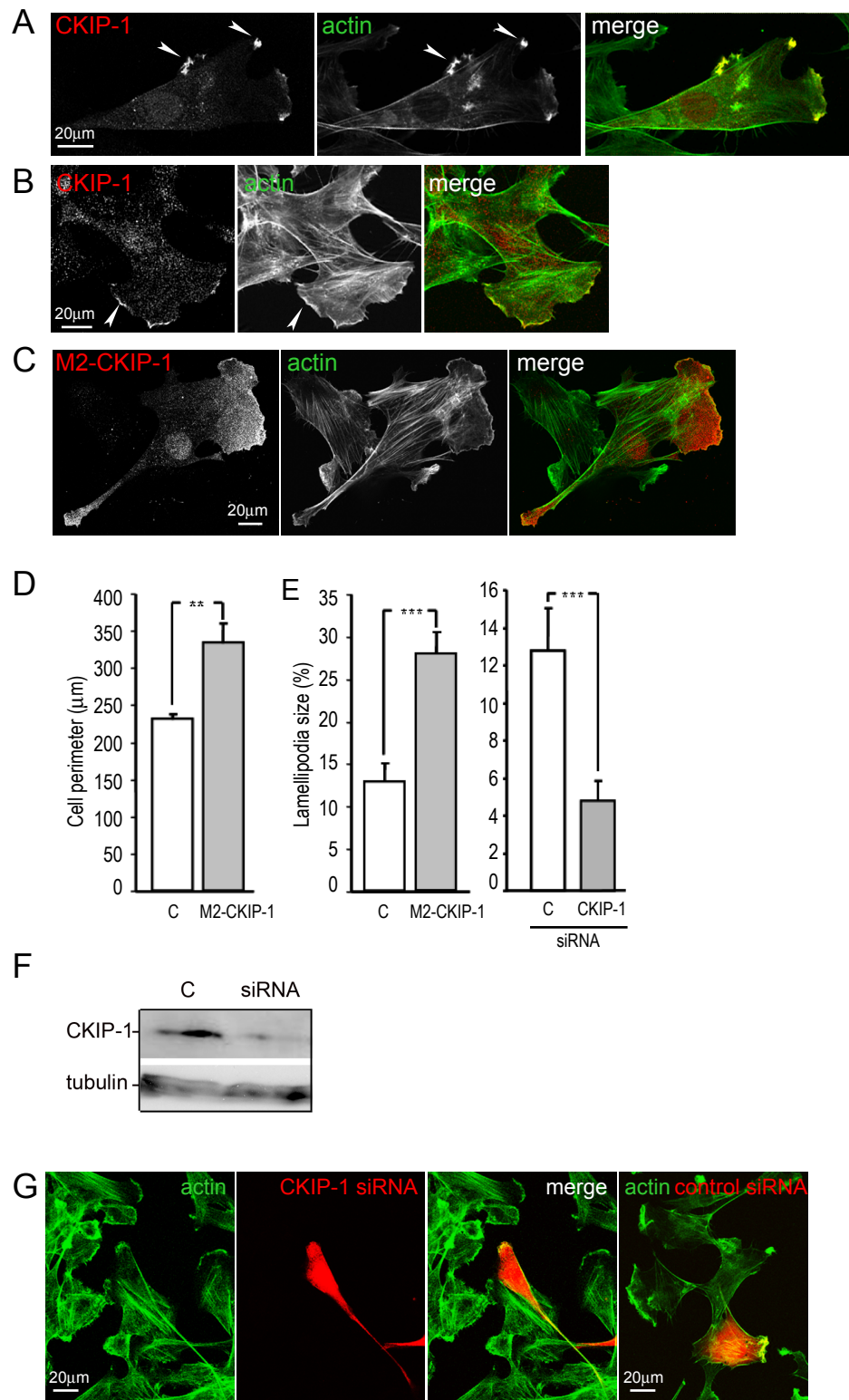
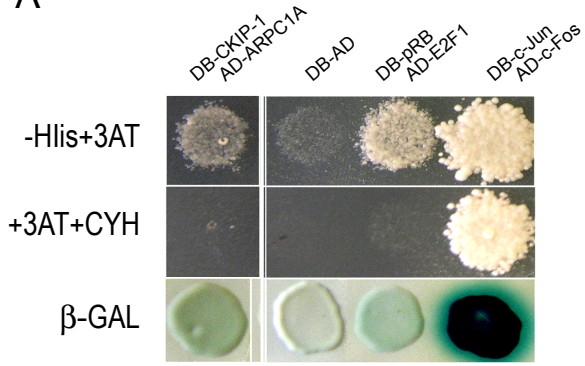
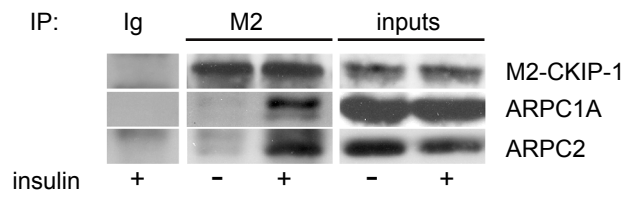


Figure 4

A



B



C

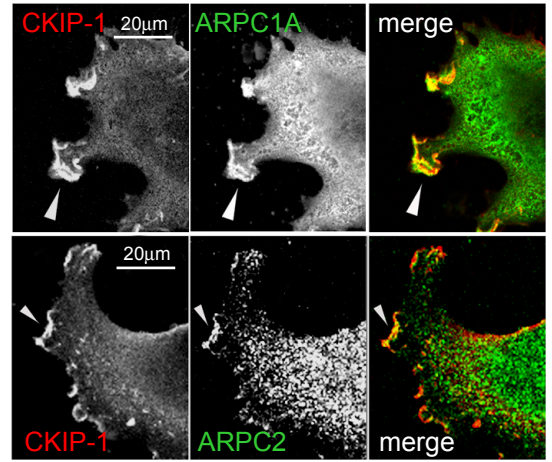


Figure 5

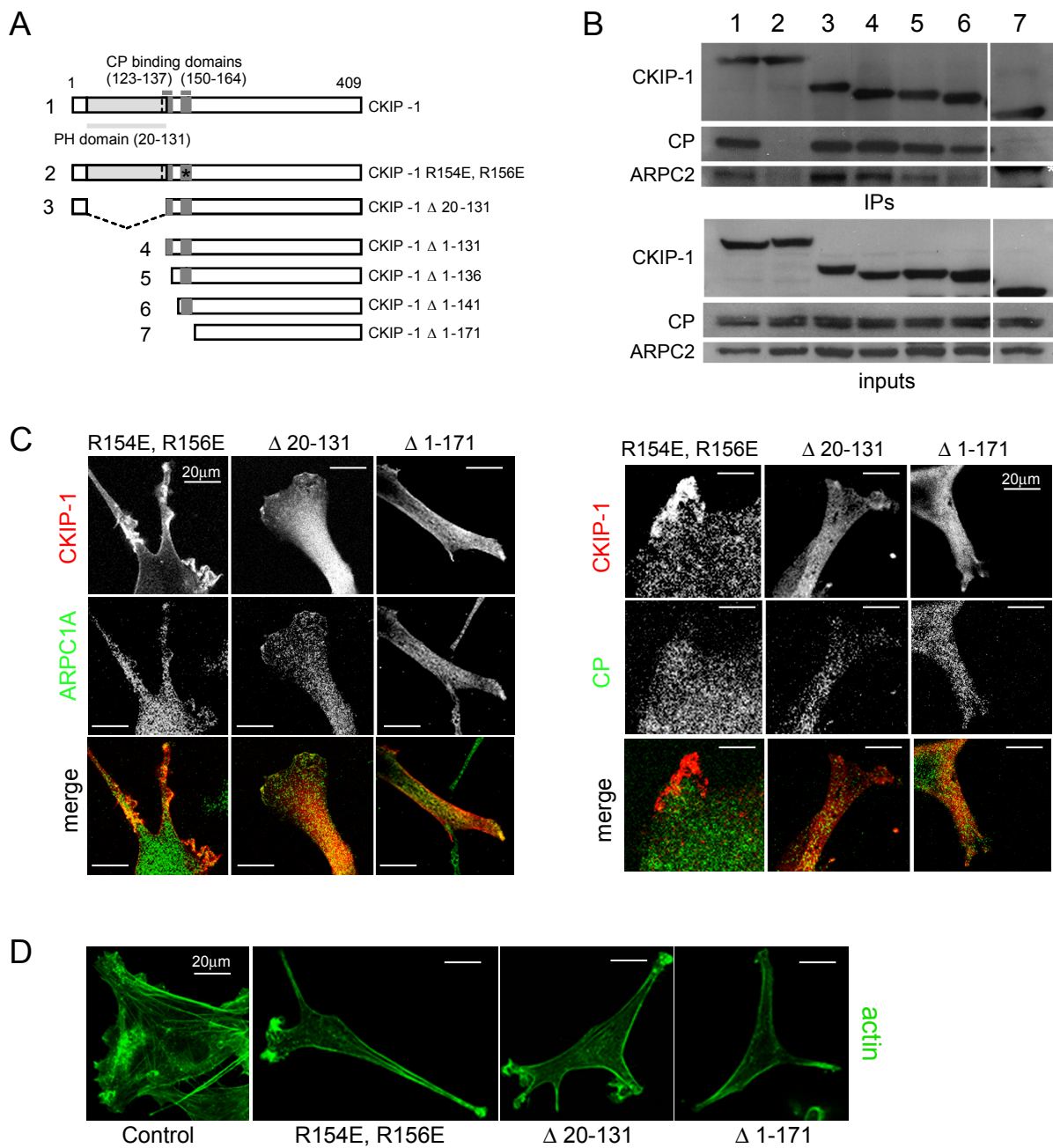
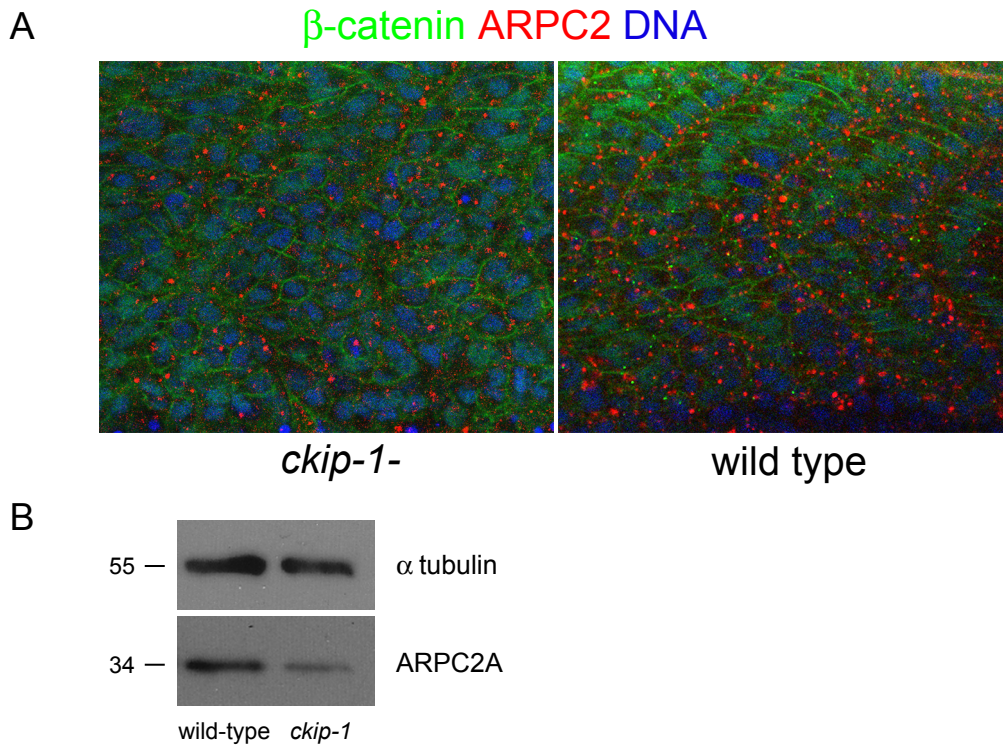


Figure 6



LEGENDS TO SUPPLEMENTAL DATA

Legend to Figure S1

Zebrafish Ckip-1 protein sequence

Sequence alignments of the human (NP_057358), mouse (NP_075809) and zebrafish (encoded by GENE ID: 562940) CKIP-1 proteins. Text colours and symbols: blue asterisk; fully conserved residue, black double dot; conservation of strong groups, single black dot; conservation of weak groups, green text; CP domains, blue text; PH domain.

Legend to Figure S2

Ckip-1 expression pattern in zebrafish

(A). Whole mount *in situ* hybridization on zebrafish *Danio rerio* embryos at different stages with a digoxigenin-labeled *ckip-1* PH domain antisense probe for the localization of *ckip-1* mRNA. Using an antisense probe complementary to the C-terminal part of *ckip-1* cDNA gave the same results (data not shown). Specificity of hybridization signal was attested with sense RNA probe complementary to the specific probe (control 7hpf).

(B). Western blot using our anti CKIP-1 antibody that recognizes *Danio rerio* Ckip-1 on whole embryos lysates (100µg). Equal loading was checked by coomassie staining of the gel.

Legend to figure S3

Morpholino antisense oligonucleotides knockdown efficiency assessment by immunofluorescence and western-blot analysis.

To evaluate the role of Ckip-1 in myogenesis, its expression was knocked down with two different antisense morpholino oligonucleotides (MO1 and MO2) directed against the 5' UTR

of Ckip-1 mRNA. Two different morpholino oligonucleotides (M1 and M2) were used in the different experiments described in this work. No differences were observed between MO1 and MO2 in Ckip-1 expression inhibition (data not shown). MO1 is FITC labelled and thus was not used when other proteins were detected by immunofluorescence.

(A) Mosaic inhibition of Ckip-1 by injection of MO1 (10pmoles) into a single blastomere of a 32 –cell stage embryo. Following injection of MO1, at stage 70% of epiboly, embryo were fixed and labelled with anti-CKIP-1 antibody. Morpholino negative cell (o) is Ckip-1 positive whereas morpholino positive cells (green cell *) shows a reduced Ckip-1 staining.

(B) The efficacy of morpholinos was also tested by western blot. Embryos were injected at stage 1-4 cells with phenol red (C) or Ckip-1 MO2 morpholino (5pmoles) and whole lysates were prepared at stage 70% epiboly for SDS-PAGE electrophoresis. The decrease in Ckip-1 expression was tested with the anti-CKIP-1 antibody. Equal loading was assessed with actin staining. Both morpholino gave the same results. Injection of higher doses of morpholinos increased mortality precluding analysis of the effect of total inhibition of Ckip-1 (data not shown).

Legend to figure S4

Expression of Hedgehog (*Hh*), patched 1 (*ptc1*), *myoD* and the slow muscle-specific homeobox gene *prox1* in Ckip-1 morphant embryos.

The analysis of (A) *myoD*, *shh*, (B) *ptc1* (in situ hybridization) and (C) Prox1 (immunofluorescence) expression in wild type and Ckip-1 MO injected embryos revealed that *myoD*, *shh*, *ptc1* and Prox1 expression levels and patterns are not affected in Ckip-1 MO injected embryos as compared to control animals.

Legend to figure S5

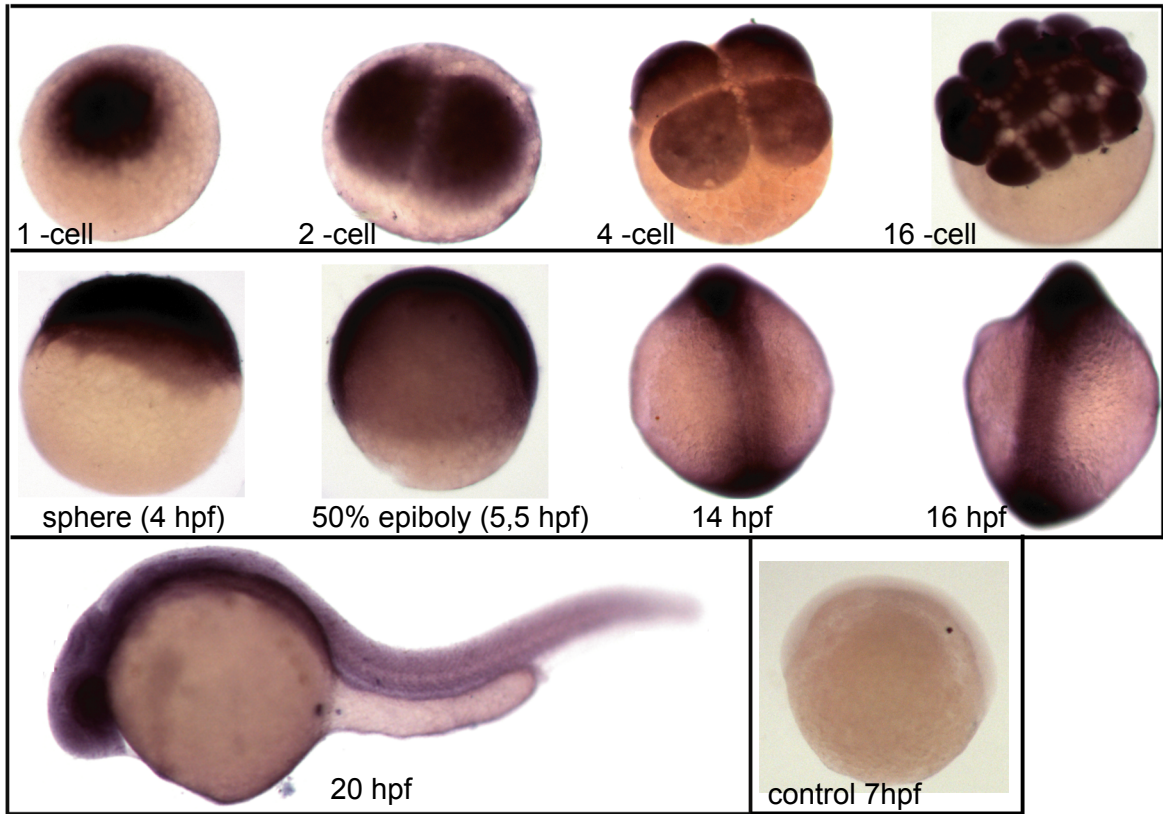
Reduced cell motility of CKIP-1siRNA transfected cells

The ability of CKIP-1siRNA transfected cells to migrate was evaluated in an *in vitro* wound-healing assay. Control siRNA and CKIP-1siRNA transfected C2C12 cells were cultured until confluence was reached in growth medium and then switched to serum free medium for 24 hours. After creating a wound in cell monolayer, a video time-lapse was realized. (A) First phase contrast image of 84 sequential images was pseudocolored in green, last image was pseudocolored in red and the images were superimposed. White line delimits the borders of the scratch at the beginning of the experiment. CKIP-1 were unable to invade the space generated by the wound and hardly migrated compared to control cells. (B) Schematic representation of control- and CKIP-1 siRNA cells trajectories analyzed with Metamorph software. Red and black trajectories are the ones followed by cells on the right and left side of the wound, respectively. Distances in x and y axis are indicated in microns. Cells were observed during 840 min. Whereas control cells displayed quite straight trajectories toward the wound, siRNA cells paths were less ordered and several cells migrated backwards into the monolayer. (C) Average distance and cell velocity of 25 control- and CKIP-1 siRNA cells. Results represent two different experiments; error bars indicate SEM. CKIP-1 depleted cells showed a reduced migration rate. In 840 min, the average total covered distance (microns) was $413,4 \pm 72,2$ microns SEM for control cells and $218,6 \pm 34,1$ microns SEM for CKIP-1 siRNA cells with an overall average velocity of $0,492 \pm 0,086$ microns /min. SEM and $0,237 \pm 0,038$ microns/min. SEM for control and siRNA treated cells respectively. (D) Seven successive confocal images (every 10 minutes) of control- and CKIP-1 -siRNA transfected C2C12 cells. White arrows indicate lamellipodia extension in control siRNA cells and thin and long protrusions in CKIP-1siRNA cells. A closer observation of phase contrast images of migrating cells revealed that control cells were extending lamellipodia whereas siRNA treated cells extended long and thin protrusions and remained

mostly bipolar. In conclusion, these data show that the inhibition of lamellipodia formation induced by CKIP-1 depletion affects cell migration.

Figure S2

A



B

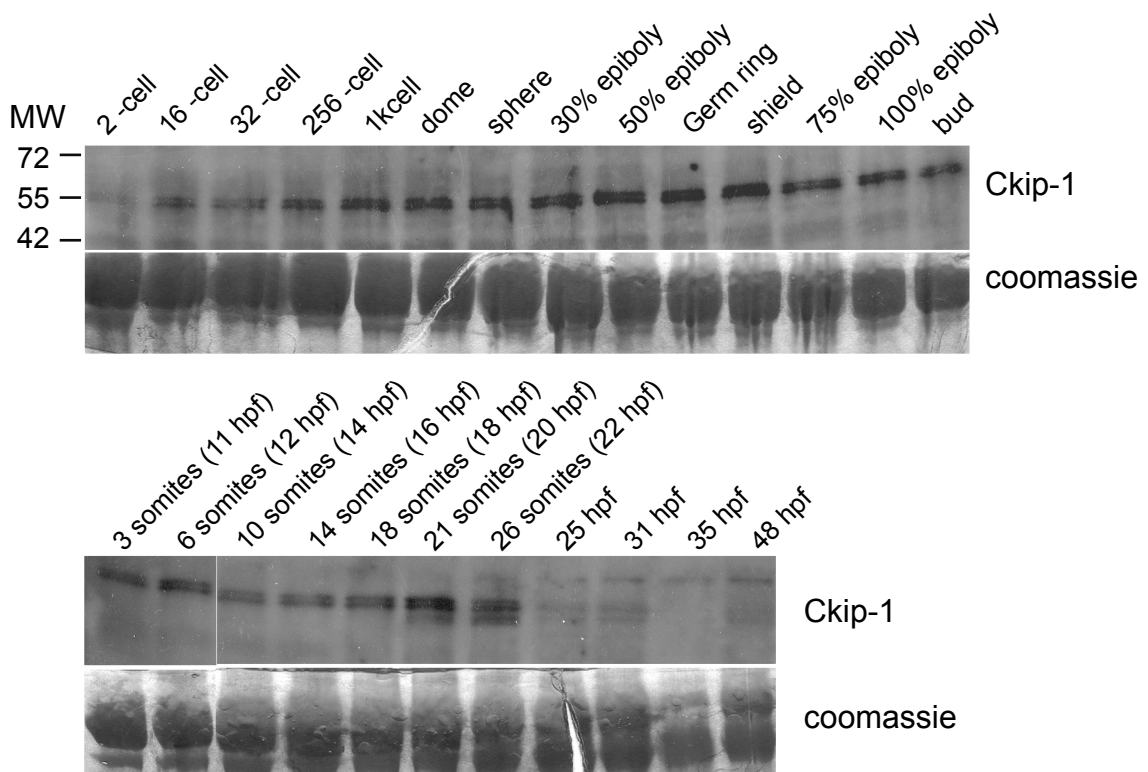


Figure S3

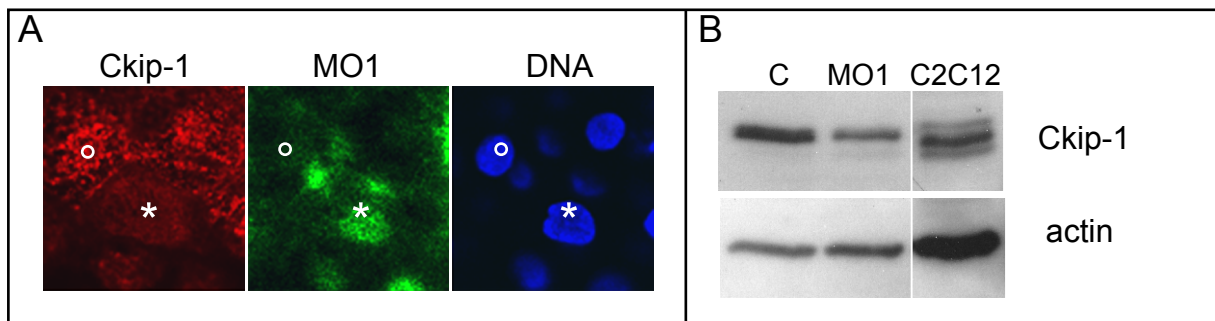


Figure S4

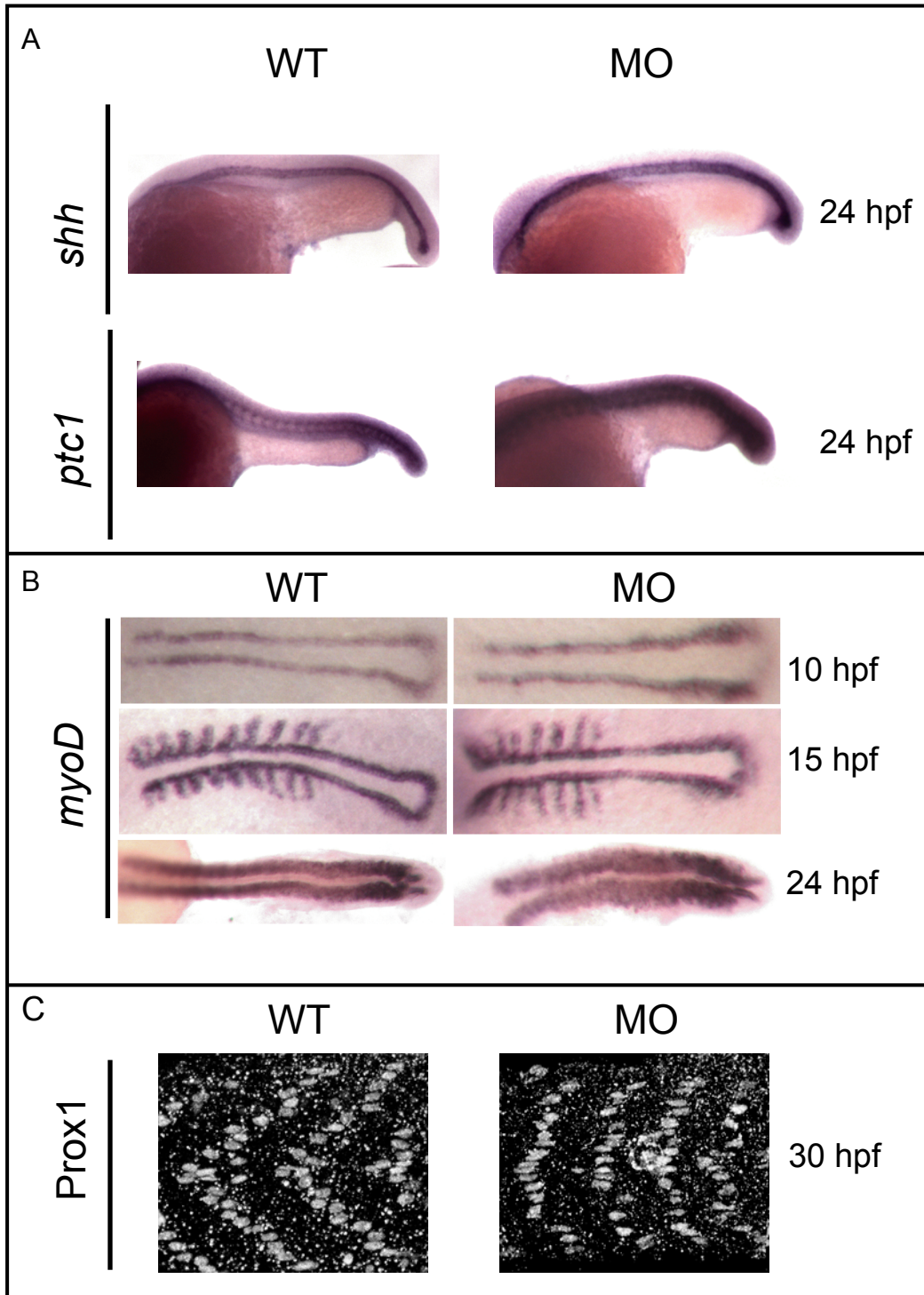
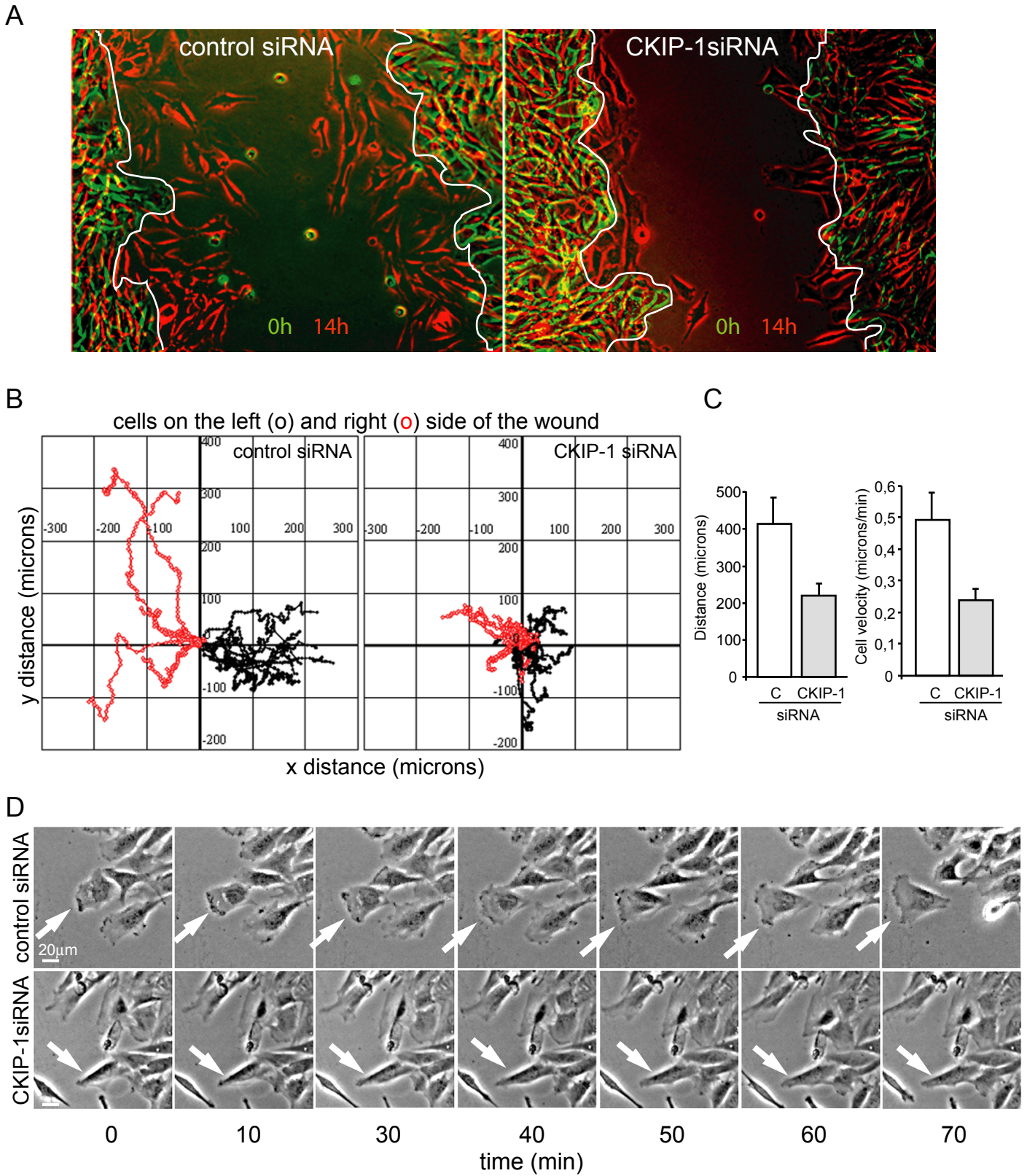


Figure S5



II/ Détermination du patron d'expression des protéines CKIP-1 au cours de la différenciation musculaire et mise en évidence de l'implication de CKIP-1 dans le remodelage des membranes *in vivo*.

Chez les mammifères, la formation du muscle strié squelettique est un processus qui se déroule en plusieurs étapes. Les précurseurs de cellules musculaires quittent les somites et migrent jusqu'au site où se formera le futur muscle. Puis ces cellules subissent des modifications morphologiques et fusionnent entre elles pour former des myotubes dont la maturation aboutit à la formation de fibres musculaires fonctionnelles. Nous avons montré que la protéine CKIP-1 est impliquée dans la différenciation musculaire. L'inhibition de son expression inhibe la différenciation des myoblastes C2C12 *in vitro* et la fusion des myoblastes *in vivo* dans les embryons de poisson zèbre. CKIP-1 est également capable de modifier la morphologie des cellules en interagissant avec deux régulateurs majeurs du cytosquelette d'actine : le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 et les protéines de coiffe CP $\alpha\beta$. Ainsi, CKIP-1 interviendrait dans le processus de fusion en régulant le remodelage de l'actine corticale par l'intermédiaire du recrutement à la membrane plasmique des facteurs de régulation de l'actine.

Au cours de cette étude nous avons étudié les rôles de CKIP-1 au cours de la différenciation musculaire en associant des études *in vitro* dans les myoblastes C2C12 et des études *in vivo* chez la souris. Nous avons mis en évidence l'existence d'une nouvelle isoforme de CKIP-1 migrant à 28 kDa qui a été nommée CKIP-1p28. Celle-ci est traduite à partir d'un codon ATG alternatif situé en aval du domaine PH. Au cours de la différenciation des myoblastes C2C12, l'expression de CKIP-1p28 augmente tandis que CKIP-1 est clivée après l'aspartate D146 ce qui libère un produit de clivage, nommé CKIP-1 147-408 également dépourvu du domaine PH. Nous avons montré que ces trois protéines (CKIP-1, CKIP-1p28 et CKIP-1 147-408) présentent des localisations intracellulaires et des propriétés d'interaction avec les complexes Arp2/3 et CP qui leur sont propres. En outre, nous avons mis en évidence que la modulation de l'expression de CKIP-1 et/ou CKIP-1p28 affecte la capacité des cellules à se différencier. Le patron d'expression et la localisation des protéines CKIP-1 ont ensuite été analysés *in vivo*. De manière intéressante, le patron d'expression mis en évidence au cours de la différenciation des myoblastes *in vitro* est identique à celui observé *in vivo* au cours de la myogenèse et au cours de la régénération musculaire. Autrement dit, au cours de ces trois

processus, CKIP-1 est progressivement clivée. Ainsi, dans le muscle adulte seuls CKIP-1p28 et le produit de clivage sont détectés. Afin d'obtenir des informations sur la fonction de CKIP-1 *in vivo*, nous l'avons surexprimée dans le muscle de souris adultes. Dans le muscle mature, la protéine CKIP-1 exogène est localisée au niveau des triades et sa surexpression induit un élargissement des tubules T et des accumulations de membranes intracellulaires suggérant un rôle pour CKIP-1 dans le remodelage des membranes. En effet, des expériences réalisées *in vitro* ont confirmé l'implication de CKIP-1 dans le trafic intracellulaire. L'ensemble de ces données concernant le patron d'expression de CKIP-1 et l'effet de sa surexpression *in vivo* suggère qu'au cours de la myogenèse chez la souris, CKIP-1 pourrait non seulement être impliquée dans la fusion, comme cela a été montré chez le poisson zèbre, mais elle pourrait également intervenir dans la mise en place du réseau membranaire interne de la cellule musculaire.

Cette partie des résultats est présentée sous la forme d'un article. Cependant, il s'agit d'une ébauche non finalisée qu'il conviendra de compléter notamment par le séquençage de l'extrémité N-terminale par la méthode d'Edman des formes clivées *in vitro* et *in vivo*, et par l'étude de cette dernière par surexpression dans le muscle squelettique.

Ma contribution à cette étude

J'ai réalisé l'ensemble de cette étude à l'exception :

- de l'identification et de la caractérisation moléculaire de CKIP-1p28 et de ses transcrits,
- de l'établissement du patron d'expression de CKIP-1p28 dans les lignées tumorales,
- de la génération de la lignée stable exprimant CKIP-1p28 et l'étude des capacités de ces cellules à se différencier et à migrer,
- de l'induction de la régénération musculaire par injection de cardiotoxine.

**PROTEIN EXPRESSION PATTERN IN MUSCLE AND INVOLVEMENT IN
MEMBRANE REMODELLING OF CKIP-1**

Alexandre Guiraud¹, Sabine Caussanel-Boude^{1,2}, Dominique Baas¹, Pierre Copin¹, Laurent Schaeffer¹ and Evelyne Goillot¹

1: Equipe Différenciation Neuromusculaire, Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS UMR 5239/ENS Lyon, Université de Lyon, SFR BioSciences Gerland - Lyon Sud (US8 / UMS3444), 46 allée d'Italie, 69364 LYON cedex 07, France.

2: present address: Faculté de Médecine de Lyon-RTH Laennec de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Contact: Correspondence should be addressed to E.G. (e-mail: Evelyne.Goillot@ens-lyon.fr; Tel.: 33-472-72-81-24; Fax: 33-472-72-80-80)

Short title: CKIP-1 and membrane remodelling in muscle

SUMMARY

CKIP-1 is an adaptor protein that has been involved in muscle differentiation and in cell morphology regulation through interaction with actin cytoskeleton regulators. Here, we report the existence of a 28 kD CKIP-1 isoform, CKIP-1p28, which is translated from an alternative start codon downstream the PH domain. During C2C12 myoblast differentiation CKIP-1p28 expression is increased and CKIP-1 is cleaved leading to a product also devoid of PH domain. Importantly, CKIP-1 proteins follow the same pattern during *in vivo* myogenesis and muscle regeneration in mouse. In order to investigate for CKIP-1 functions in muscles we overexpressed CKIP-1 in mouse adult skeletal muscle. In mature muscle, exogenous CKIP-1 localizes at the triads and its overexpression induces T-tubules enlargement and intracellular membrane accumulations suggesting a role for CKIP-1 in membrane remodeling *in vivo*. *In vitro* experiments show that indeed, CKIP-1 is involved in intracellular membrane trafficking. We propose that during *in vivo* myogenesis, CKIP-1 proteins could be involved not only in myoblast fusion, as shown in zebrafish, but also in the formation of the intracellular membrane network.

KEY WORDS

CKIP-1 / membrane remodelling / skeletal muscle / mouse myogenesis

INTRODUCTION

Myogenesis is a multistep process through which somatic muscle progenitor cells give rise to hundreds of skeletal muscles throughout the body (Buckingham et al., 2003). Myogenesis can be divided in four partially overlapping steps: migration from somites to sites of future skeletal muscles, fusion of myoblasts in myotubes, myobrillogenesis and establishment of the intracellular membrane network composed of plasma membrane invaginations called T-tubules and sarcoplasmic reticulum. All these steps rely on cell morphology modifications mediated by the remodeling of plasma and intracellular membrane, and actin cytoskeleton. The role of actin cytoskeleton in migration has been extensively studied and is now well established. It is involved in the formation of lamellipodia and filopodia, two specialized membrane structures required for migration (Le Clainche and Carlier, 2008). Inhibition of actin polymerization also proved the requirement for actin remodeling in the fusion step *in vitro* (Nowak et al., 2009). In *Drosophila*, myoblast plasma membrane fusion occurs subsequently to the formation and dissociation of actin foci at sites of contact between differentiating myoblasts (Richardson et al., 2007). In mammalian cells, it has recently been shown that the coalescence of membranes from two fusing myoblasts implies localized cortical actin depolymerization (Duan and Gallagher, 2009). Concerning the establishment of the intracellular membrane network, the implication of actin cytoskeleton is less clear. Nevertheless, some of the proteins proposed to be involved in this process, such as amphiphysin and dynamin 2, are known regulators of membrane remodeling through interaction with or regulation of the actin cytoskeleton (Kaksonen et al., 2006).

The pleckstrin homology (PH) domain-containing protein Casein Kinase 2 Interacting Protein-1 (CKIP-1) was originally isolated as a specific CK2 α subunit-interacting protein in a yeast two-hybrid screening (Bosc et al., 2000). CKIP-1 contains a PH domain at its N-terminus and a leucine zipper (LZ) motif at its C-terminus. We and others have shown that CKIP-1 is mainly localized at the plasma membrane through its PH domain which binds to phosphoinositides (Bosc et al., 2000; Litchfield et al., 2001; Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004; Zhang et al., 2006). Based on its interactions with a number of signaling mediators including protein kinases and enzymes (CK2, ATM, AKT, SMURF1), transcription factors (c-Jun, Jun D) and signaling proteins (Nmi, IFP35), CKIP-1 was implicated in cell survival and proliferation, apoptosis, and cytokine signaling (Bosc et al., 2000; Lu et al., 2008; Olsten et al., 2004; Tokuda et al., 2007; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2005). It appears that CKIP-1 is able to regulate some of its interactors by localizing them to specific sites in the cell. Moreover, CKIP-1 regulatory effect can be mediated only by a part of the

protein. Indeed when cells undergo apoptosis, CKIP-1 is cleaved by caspase-3 and the resulting C-terminal fragment is translocated to the nucleus where it represses activator protein-1 (AP-1) and promotes apoptosis.

We have implicated CKIP-1 in muscle differentiation. Inhibition of its expression *in vitro* abrogates C2C12 myoblast differentiation, and its downregulation *in vivo* in zebrafish embryos impairs myoblast fusion (Baas et al., submitted; Safi et al., 2004). Moreover, CKIP-1 has been shown to regulate actin cytoskeleton through interaction with capping proteins (CP) and actin nucleation complex, Actin-related protein (Arp) 2/3 (Baas et al., submitted; Canton et al., 2005; Canton et al., 2006). Given its role in myoblast fusion and actin regulation, CKIP-1 is proposed to act on myoblast fusion through regulation of cortical actin via membrane recruitment of actin regulators.

Here we report the existence of two new CKIP-1 protein forms, CKIP-1p28 which is a smaller CKIP-1 protein translated from an alternative start codon and CKIP-1 147-408 which is a CKIP-1 cleavage product that appears during muscle differentiation *in vitro*. We describe their expression pattern in differentiating C2C12 myoblasts and during myogenesis and muscle regeneration *in vivo*. We compare their ability to bind the Arp2/3 and CP actin cytoskeleton regulators. In order to investigate for CKIP-1 functions in muscles we overexpressed CKIP-1 in mouse adult skeletal muscle. We observe T-tubules enlargement and intracellular membrane accumulation suggesting a role for CKIP-1 in membrane remodeling *in vivo*. *In vitro* experiments show that indeed, CKIP-1 is involved in intracellular membrane trafficking.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines, culture conditions and transfection

C2C12 cells (ATCC number CRL-1772TM) were grown at 37°C under 5% CO₂. Cells were maintained as myoblasts in growth medium (GM): Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAA) supplemented with 15% fetal calf serum (PAA). Cells were differentiated in differentiation medium (DM): DMEM supplemented with 2% horse serum (Gibco BRL). Human recombinant insulin (Sigma) was used at 25 µM. Cell transfections with plasmids were performed with Lipofectamine 2000 (InvitrogenTM) according to the manufacturer's instructions. siRNA transfections were performed with LipofectamineTM RNAiMAX (InvitrogenTM) as follows: 30,000 C2C12 cells were seeded in 35 mm diameter tissue culture dishes and transfected 3h later with 40 pmol siRNA and 2 µL de LipofectamineTM RNAiMAX according to the manufacturer's instructions. After 24h in GM, cells were transfected a second time, let in GM for 24h more, trypsinized and seeded at 150,000 cells per 35 mm dish. Finally, cells were analyzed 24h later (*ie* 72h after the first transfection).

Animal care, *in vivo* electroporation and cardiotoxin injection

OF1 (Oncins France 1) female mice were obtained from Charles River Laboratories International Inc. For the duration of the experiment, mice were housed at a constant temperature of 23°C with a 12-hour-light/dark cycle and provided with mouse chow and water *ad libitum* in a restricted-access, specific-pathogen-free animal care facility at the Ecole Normale Supérieure of Lyon (Plateau de Biologie Experimentale de la Souris). All operative procedures were performed using aseptic techniques and in accordance with national and European legislation on animal experimentation. Prior to electroporation and cardiotoxin injection, mice were anaesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (Ketamine500, Virbac, 100 mg.kg⁻¹) and xylazine (Rompun, Centravet, 20 mg.kg⁻¹) to obtain a deep state of general anesthesia.

For *in vivo* overexpression experiments, 7 µg of expression vectors diluted in 30 µl of 0.9% NaCl were injected in 5 week old mice tibialis anterior muscle. Injected muscles were then electroporated (Electro Square PoratorTM ECM 830, BTX[®]) thanks to eight 80 V.cm⁻¹ pulses of 20 ms each applied at 2 Hz by 2.5 cm² plaque electrodes (Q-biogen) placed on each side of the leg. 5 days after electroporation, animals were euthanized and hindlimbs were fixed for further immunofluorescence analysis.

To induce muscle repair, a single dose of cardiotoxin (100 µl of a 10 µM solution) from *Naja nigricollis* snake venom (Latoxan) was injected intramuscularly into the right tibialis anterior

muscle of 8 week old mice. As a control, the contralateral muscle was injected with 100 μ l of PBS. 3 or 5 days after injection, muscles were dissected out and total protein extracts were prepared.

Antibodies

The rabbit polyclonal antibody against CKIP-1 has been described previously (Safi et al., 2004). It was raised against a peptide encoding 15 amino acids (241 to 255) in the carboxy-terminal part of mouse CKIP-1. Other antibodies were mouse monoclonal anti M2 Flag (SIGMA[®]), mouse monoclonal anti α -actinin (EA53, SIGMA[®]), rabbit polyclonal anti Akt (Cell Signaling technology[®]), rabbit polyclonal anti phospho (Ser473) Akt (Cell Signaling technology[®]), mouse monoclonal anti annexin II (BD Transduction Laboratories[™]), rabbit polyclonal anti p34-Arc/ARPC2 (Millipore[™]), mouse monoclonal anti CP α (mAb 5B12.3, DSHB), mouse monoclonal anti CP β (mAb 3F2.3, DSHB), mouse monoclonal anti DHPR α (IID5E1, DSHB), mouse monoclonal anti GAPDH (14C10, Cell Signaling technology[®]), mouse monoclonal anti histone H3 (Upstate[®]), rabbit polyclonal anti insulin receptor β (BD Transduction Laboratories[™]), rabbit polyclonal anti myogenin (M-225, Santa-Cruz Biotechnology[®]), mouse monoclonal anti myosin heavy chain (mAb F59, DSHB), mouse monoclonal anti RyR1 (34C, SIGMA[®]), and mouse monoclonal anti α -tubulin (DM1A, SIGMA[®]).

Secondary antibodies used in immunofluorescence analysis were goat anti rabbit IgG Alexa Fluor 488, goat anti mouse IgG Alexa Fluor 488, goat anti rabbit IgG Alexa Fluor 555 and goat anti mouse IgG Alexa Fluor 555. All were from Molecular Probes, Invitrogen[™].

Secondary antibodies used in western blot analysis were HRP (HorseRadish Peroxidase) conjugated sheep anti mouse IgG and donkey anti rabbit IgG (Amersham Biosciences).

Plasmids, shRNAs and siRNAs

All constructs were generated with the Taq Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Roche) and confirmed by DNA sequencing.

Full-length cDNA encoding M2 flag tagged-CKIP-1 was subcloned into the KpnI-NotI sites of the pCDNA3 vector (Invitrogen[™]) as described in Safi *et al.* (Safi et al., 2004).

The cDNA encoding M2-CKIP-1 obtained by PCR, was also cloned into the KpnI-NotI sites of the pSPUTK *in vitro* translation vector (Stratagene).

The pCDNA3-CKIP-1 172-408 plasmid for *in vitro* translation was obtained by PCR using the pCDNA3-M2-CKIP-1 plasmid as a template and the oligonucleotide primers 5'

ATAAAGCTTCCCGCCATGGCTGTGGC 3' and 5' CGGCCGCTCACATCAGGCTCTTC CGGT 3'. The resulting PCR product was subcloned in pcDNA3 vector HindIII-NotI sites (Invitrogen™).

The untagged deletion constructs corresponding to potential caspase cleavage products were obtained by PCR using the pcDNA3-M2-CKIP-1 plasmid as a template and the following oligonucleotide primers: 5' CGCGCGGAATTCCCACCATGTATGAGAAGTGCGAAGAG CTC 3' and 5' CAATCAGCGGCCGCACTAGTCT 3' for CKIP-1 74-408; 5' CGCGCGGA ATTCCCACCATGGAGGTCACCGTTGAGGAG 3' and 5' CAATCAGCGGCCGCACTAG TCT 3' for CKIP-1 140-408; 5' CGCGCGGAATTCCCACCATGAGCTATCTTGCCCACC CTA 3' and 5' CAATCAGCGGCCGCACTAGTCT 3' for CKIP-1 147-408; 5' CGCGCGGA ATTCCCACCATGAGAGCAAAAATCCAACACTCC 3' and 5' CAATCAGCGGCCGCACTAGTCT 3' for CKIP-1 156-408 ; 5' CGCGCGGAATTCCCAGCATGAAGAAGAGCG 3' and 5' CGCGCGGCCGCGCCGCTCAGTCCCTCTGGGATAGGATC 3' for CKIP-1 1-279; 5' CGCGCGGAATTCCCAGCATGAAGAAGAGCG 3' and 5' CGCGCGGCCGCGCCGCTCAG TCCTGGATCCGGGAC 3' for CKIP-1 1-309; 5' CGCGCGGAATTCCCAGCATGAAGAA GAGCG 3' and 5' CGCGCGGCCGCGCCGCTCAGTCCGGTGGAGACTGTG 3' for CKIP-1 1-344. The resulting PCR products were subcloned in pcDNA3 vector EcoRI-NotI sites (Invitrogen™).

The CKIP-1-M2 and CKIP-1 147-408-M2 constructs used for co-immunoprecipitation were obtained by PCR using the pcDNA3-M2-CKIP-1 plasmid as a template, the same reverse oligonucleotide primer 5' CGCGCGGAATTCTCACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCC ATCAGGCTCTTCCGGTATTG 3' and the forward oligonucleotide primers 5' CGCGCGAAGCTTCCGCCATGAAGAAGAGCG 3' and 5' CGCGCGAAGCTTCCACCA TGAGCTATCTTGCCCACCCTAC 3', respectively. The resulting PCR products were subcloned in pcDNA3 vector HindIII-EcoRI sites (Invitrogen™).

The CKIP-1p28-HA construct was obtained by PCR using the pcDNA3-M2-CKIP-1 plasmid as a template and the following oligonucleotide primers: 5' ATAAAGCTTCCCGCCATGGC TGTGGC 3' and 5' GTATCTAGATCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTATGCG AATTCCATCAGGCTCTTC 3'. The resulting PCR product was subcloned in pcDNA3 vector HindIII-XbaI sites (Invitrogen™).

The CKIP-1-Cherry construct was obtained by PCR using the pcDNA3-M2-CKIP-1 plasmid as a template and the following oligonucleotide primers: 5' CGCGCGAGATCTCCACCATG AAGAAGAGCGGCTC 3' and 5' CGCGCGAAGCTTCATCAGGCTCTTCCGG 3'. The

resulting PCR product was subcloned in the BglIII-HindIII sites of pmCherry-N1 vector (Clontech).

The PH_{CKIP-1}-Cherry, CKIP-1 ΔPH-Cherry and Myr-CKIP-1ΔPH-Cherry constructs corresponding to m-Cherry protein N-terminally fused respectively to CKIP-1 PH domain (aa 21 to 131), CKIP-1 devoid of its PH domain (aa 132 to 408) and CKIP-1 devoid of its PH domain N-terminally fused to v-Src myristoylation sequence (Georgescu et al., 2000; Olsten et al., 2004) were obtained by PCR using the CKIP-1-Cherry encoding plasmid as a template and the following oligonucleotide primers: 5' CGCGCGAGA TCTCCACCATGGCGCCCGAGAAGGTC 3' and 5' CGCGCGAAGCTTGGTAATGGCAG AACTCAGG 3' for PH_{CKIP-1}-Cherry; 5' CGCGCGAGATCTCCACCATGAGAGCTAAAA ACCGTATCTTG 3' and 5' CGCGCGAAGCTTCATCAGGCTCTTCCGG 3' for CKIP-1 ΔPH-Cherry; 5' GCGCGCAGATCTCCACCATGGGTAGCAGCAAGAGCAAGCCCAAG GATCCCAGCCAGCGGAGAGCTAAAAACCGTATCTTGGATGAG 3' and 5' CGCGCG AAGCTTCATCAGGCTCTTCCGG 3' for Myr-CKIP-1ΔPH-Cherry. The resulting PCR product was subcloned in the BglIII-HindIII sites of pmCherry-N1 vector (Clontech).

The CKIP-1p28-GFP construct was realized with the Gateway[®] system (Invitrogen[™]) according to the manufacturer's instructions. CKIP-1p28 was amplified by PCR using the pcDNA3-M2-CKIP-1 plasmid as a template and the following oligonucleotide primers: 5' GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGCTGTGGCTTCGAC 3' and 5' GGG GACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGTACATCAGGCTCTTCCGGTA 3'. The resulting PCR product was cloned into pDONR[™]223 vector and then homologously recombined to pcDNA[™]-DEST47 destination vector.

GFP-Rab4a, GFP-Rab8 and GFP-Rab11 constructs were kindly provided by Dr Philippe Chavrier (Institut Curie, Paris, France); GFP-Rab5a and GFP-Rab7 constructs were kindly provided by Dr Monique Arpin (Institut Curie, Paris, France).

The short hairpin RNA (shRNA) target sequence was selected within the common region of both *Ckip-1* mRNA populations, according to GenScript instructions. The forward primer sequence contain 5'-3': the sense target sequence, a loop TTCAAGAGA, the antisense target sequence, and a terminal signal (T6). The 5' and 3' ends of forward and reverse primers were designed to create BamHI and HindIII sticky ends once annealed. Forward and reverse primers were as follows: 5' GATCCCGCTTCTCTGTACTGGGGAACCTTGATATCCGGTT CCCAGTACAGAGAAGTTTTTCCAAA 3' and 5' AGCTTTTGGAAAAA ACTTCTCT GTACTGGGGAACCGGATATCAAGTTCCCCAGTACAGAGAAGCGG 3'. Annealing

was performed according to the manufacturer's instruction and the resulting dimer was cloned into the BamHI-HindIII sites of the pRNAT-H1.1/Neo (GenScript).

Stealth RNAi™ siRNAs duplexes (Invitrogen™) were designed by Invitrogen™ to target sequences in *Ckip-1* ORF: siRNA1, siRNA2, and siRNA3 targeted 5' CCUCAUGGCUGUGGCCUUCGACCUCU 3' (nt 510-534), 5' CCUCAGAUGGGAUGCACACAUUAGA 3' (nt 536-560), and 5' GAUCCAGGACCUGGUAGCAAGGAAA 3' (nt 918-942), respectively. A scramble siRNA not homologous to any sequence in vertebrate transcriptome, tested not to induce stress response and with a 45 to 55% GC content (Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Med GC, Invitrogen™) was used as a control.

Western blot analysis

Total protein extract preparation

Protein extracts from C21C2 cells were obtained as follows. Cells were washed twice in ice cold PBS and lysed 10 min on ice in extraction buffer (25 mM Tris HCl pH7.4, 50 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 2% NP40, 0.2% SDS, protease inhibitors [SIGMAFAST™, SIGMA-ALDRICH®], phosphatase inhibitors [1 mM sodium orthovanadate, 2 mM β-glycérophosphate, 10 mM sodium fluoride]). The lysates were sonicated on ice with six 40 W bursts of 2 s each with a Vibra-Cell™ 75185 sonicator and then centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4°C to remove cellular debris. For saponin preextraction, cells were rapidly washed in pre-warmed PBS and then permeabilized for 5 min in pre-warmed 0.05% saponin in 80 mM PIPES buffer. Cells were washed twice in ice cold PBS and protein extracts were performed as above mentioned.

Protein extracts from 6 week old OF1 female mouse muscles were obtained as follows. Muscle was homogenized in extraction buffer with Ultra-Turrax T8.01 (IKA®) on ice for 15s, twice.

Immunoblot analysis

Protein concentration was determined with DC protein assay kit (Bio-Rad). Equal amounts of proteins (50 µg for C21C2 cells, 100 µg for muscles) were then separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred onto PVDF Immobilon®-P membranes (Millipore™). Membranes were blocked with TBST (Tris Buffered Saline + 0.02% Tween20) containing 5% skimmed milk and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Membranes were washed in TBST for 10 min, four times, and incubated for 1 h with HRP-conjugated secondary antibodies (see *Antibodies* section). After

four new washes in TBST, membranes were incubated with enhanced chemiluminescence reagents (ECL PLUS, Amersham Biosciences).

Cell fractionation

Cells were rapidly washed with ice cold PBS, then lysed on ice in TSE buffer (10 mM Tris, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, protease inhibitors [SIGMAFAST™, SIGMA-ALDRICH®], phosphatase inhibitors [1 mM sodium orthovanadate, 2 mM β-glycerophosphate, 10 mM sodium fluoride]) by trituration through a 26G needle 30 times. The homogenate was centrifuged at 1,500 g to pellet nuclei. The pellet (P1,5) was washed in TSE buffer, resuspended in TSE buffer containing 1% NP40 and incubated at 4°C for 1 h. This constituted the N fraction. The supernatant (S1,5) was further centrifuged at 16,000 g for 10 min at 4°C to remove cellular debris. P100 and S100 fractions were obtained by centrifugation of the supernatant (S16) at 100,000 g for 2 h at 4°C. The supernatant (S100) was removed and the pellet was washed in TSE buffer, resuspended in TSE buffer containing 1% NP40 and incubated at 4°C for 1h. This constituted the P100 fraction. Protein concentrations were measured (DC protein assay kit; Bio-Rad), and equal amounts of each fraction were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Coimmunoprecipitation

Cells were washed twice in ice-cold PBS and lysed for 30 min on ice in lysis buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.05% deoxycholic acid, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 2 mM EDTA, protease inhibitors [SIGMAFAST™, SIGMA-ALDRICH®], phosphatase inhibitors [1 mM sodium orthovanadate, 2 mM β-glycerophosphate, 10 mM sodium fluoride]). Cell lysis was completed by trituration through a 26G needle 10 times on ice and lysates were centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4°C. Protein concentration was measured in supernatant (input) using DC protein assay kit (Bio-Rad). One mg of proteins was incubated for 4 h at 4°C with 2 μg of anti M2 Flag or anti HA tag antibodies, then 1 h at 4°C with equal amounts of protein A-Sepharose 4 Fast flow beads and protein G-Sepharose 4 Fast flow beads (SIGMA-ALDRICH®). Beads were washed three times in lysis buffer, heated at 95°C for 5 min in loading buffer (60 mM Tris [pH6.8], 2% SDS, 100 mM DTT, 6% glycerol, 0.02% bromophenol blue). Inputs and co-immunoprecipitates were then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Myofibrillar purification

Myofibrils were purified as previously described (Meng et al., 1996). Tibialis anterior muscle from 6 week old OF1 female mouse was homogenized in 20 volumes of buffer I (39 mM sodium borate, 25 mM KCl, 5 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), and protease inhibitors [SIGMAFAST™, SIGMA-ALDRICH®], pH 7.1) with Ultra-Turrax T8.01 (IKA®) on ice for 15s, twice. The homogenate (*fraction H*) was centrifuged at 1,500 g for 12 min. The supernatant (*fraction S1*) was removed and the pellet was re-extracted. The pellet was resuspended in 20 volumes of buffer II (39 mM sodium borate, 25 mM KCl, 1 mM DTT, SIGMAFAST™, pH 7.1) (*fraction P1*) and centrifuged at 1,500 g for 12 min. The supernatant (*fraction S2*) was removed and this step was repeated (*fractions P2* and *S3*). The resulting pellet was further extracted for 30 min with Triton X-100 buffer (39 mM sodium borate, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, SIGMAFAST™, pH 7.1) (*fraction P3*). The material was filtered through two layers of cheese-cloth and centrifuged at 1,500 g for 12 min and the pellet re-extracted once more with Triton X-100 buffer. The pellet was then washed twice with suspension buffer (10 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM DTT, SIGMAFAST™, pH 7.1). The final pellet (myofibrils) was resuspended in low-salt buffer (10 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 20% glycerol, SIGMAFAST™, pH 7.1) (*fraction MF*). Protein concentrations were measured (DC protein assay kit; Bio-Rad), and equal amounts of each fraction were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Wound-healing assay and time-lapse video microscopy

Cells were grown to confluence on 0.10 mm-thick tissue culture dishes, serum-starved for 4 h and a wound was created by scrapping the cell monolayer in the center of the dish. Wound-healing was monitored for 12 h by video time lapse. Cells were observed with an inverted microscope Axiovert 100M Zeiss (objective 10X, numeric aperture, 0.25). Cell images were captured in transmitted illumination (exposure time, 10 ms) every 10 min for 12 hours as time series of 16-bit files. During video time lapse, cells were maintained in a 37°C, 5% CO₂ chamber with relative humidity. On time 0 h and time 12 h pictures, mean positions of wound edges were represented by white dashed lines. The wound size was defined as the minimal distance separating both wound edges, and the distance covered by cells during wound healing assay was defined as half of the difference between wound size at time 0 h and wound size at time 12 h.

Immunofluorescence analysis

Immunofluorescence analysis of C2C12 cells was performed as follows. Cells were grown in 35 mm petri dishes (Corning). Cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS and washed in PBS, prior to permeabilization for 10 min with 0.1% Triton-X 100 in PBS. Cells were washed and stained with primary antibodies diluted in PBS with 1% BSA 2 h at room temperature or overnight at 4°C. Cells were washed in PBS, incubated with secondary antibodies for 1h at room temperature. Cells were finally washed in PBS and mounted with Vectashield with or without DAPI to stain nuclei (Vector laboratories).

For immunofluorescence analysis of muscle cryosections, hindlimbs were fixed with tibialis anterior in a stretch position overnight at 4°C in 4% PFA in PBS. Tibialis anterior muscles were dissected out and incubated 24 h at 4°C in a cryoprotective solution of 30% sucrose in PBS. Muscles are then embedded in Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (Sakura®) and stored at -80°C. Transverse and/or longitudinal 10 µm cryosections were obtained using a cryostat (Microm HM 505E). Sections were first rehydrated in PBS then permeabilised and saturated 30 min at room temperature in PBS, 0.5% Triton X-100, 1% BSA, 5% Normal Goat Serum (NGS), before being stained overnight at 4°C with primary antibodies diluted in PBS, 0.1% Triton X-100, 1% BSA, 5% NGS. After three 10 min washes in PBS, 0.1% Triton X-100, sections were incubated 1 h at room temperature with secondary antibodies diluted in PBS, 0.1% Triton X-100, 1% BSA, 5% NGS. After again three washes, sections were mounted with Vectashield with or without DAPI to stain nuclei (Vector laboratories). For WGA-TRITC staining, rehydrated cryosections were directly incubated with 100 µg/ml WGA-TRITC (SIGMA-ALDRICH®), 1% BSA in PBS for 1h at room temperature without any preliminary permeabilization or saturation step. Cryosections were washed in PBS and mounted as described above.

Fluorescent images were acquired on a confocal microscope (Leica TCS SP5) (except for images of figure 6B which were acquired with an epifluorescence microscope [Zeiss Axioplan 2]) and processed with Photoshop CS3 (Adobe Systems).

Transferrin internalization assay

For the kinetics of transferrin internalization, cells were serum-starved for 30 min at 37°C. Fluorescent transferrin (transferrin-Alexa Fluor 555, Invitrogen™, 10 µg/ml) was bound onto the plasma membrane cells for 1 h at 4°C in internalization medium (DMEM, 0.5% BSA, 10 mM Hepes, pH 7.4). Unbound transferrin was extensively washed in cold internalization medium then chased for various times in internalization medium at 37°C in a water bath.

After the chase, cells were placed on melting ice, quickly washed 3 times with cold stop medium (PBS, 0.5% BSA) then fixed and processed for immunofluorescence.

Electron microscopy

For electron microscopy, electroporated tibialis anterior muscles were microdissected under an epifluorescent microscope (SZX 12 Olympus) and electroporated fibers were fixed overnight at 4°C in 1% PFA, 1.5% glutaraldehyde, 0.2 M sodium cacodylate, pH 7.4. After washes in 0.15 M sodium cacodylate, pH 7.4, and post fixation for 45 min at room temperature in 1% OsO₄, 0.15 M sodium cacodylate, pH7.4, samples were dehydrated by successive incubations in 30%, 50%, 70%, 95% and 100% ethanol for 5 min each. Dehydrated samples were incubated in propylene oxide 10 min, twice, and 90 min in propylene oxide/Epon resin (Electron Microscopy Sciences) (1:1). Finally samples were incubated 24h in three successive embedding solutions (1.7% BDMA [Benzyltrimethylamine, Electron Microscopy Sciences] in Epon resin) and embedded for 3 days at 56°C in embedding solution. Ultrathin sections (70 nm) were contrasted with 7% uranyl acetate in methanol and lead citrate and observed with a Philips CM120 electron microscope.

Selective staining of T-tubules in TA muscles was adapted from (Al-Qusairi et al., 2009). Electroporated fibers were fixed overnight at 4°C in 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, and 50 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). Samples were washed in 0.15 M cacodylate buffer (pH 7.4), postfixed with 2% OsO₄, 0.8% K₄[Fe(CN)₆] in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4) for 2 h at 4°C and incubated with 5% uranyl acetate for 2 h at 4 °C. Samples were then dehydrated and processed as above described.

For selective staining of plasmalemma, electroporated fibers were fixed overnight at 4°C in 2% paraformaldehyde, 1.5% glutaraldehyde, and 0.2% ruthenium red (SIGMA-ALDRICH®) in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4). Samples were washed in 0.2% ruthenium red in 0.15M cacodylate buffer (pH7.4), postfixed with 1% OsO₄, 0.2% ruthenium red in 0.15M cacodylate buffer (pH 7.4) for 3 h at 4°C and dehydrated and processed as above described.

RESULTS

Characterization of a shorter form of CKIP-1; CKIP-1p28

In the process of analyzing CKIP-1 expression in various mouse tissues with our previously described anti CKIP-1 specific antibody, we detected by immunoblotting an additional band with an approximate molecular weight of 28 kD as compared to CKIP-1 that migrates at 55 kD. This band was present in every tested adult mouse tissue, while CKIP-1 wasn't detected in some (bone, bone marrow, liver, eyes) (fig 1A). Moreover, this 28 kD product was also detected in almost every human tumour cell lines (breast, liver, kidney) and primary rhabdomyosarcoma extracts we examined (Sup fig S1). In general, this 28 kD protein was the expressed predominant form in both healthy differentiated tissues and tumors.

Our polyclonal antibody is directed against a peptide encompassing 15 amino acids (241-255) in the carboxyl-terminus part of mouse CKIP-1, indicating that this 28 kD band must contain this region of CKIP-1. The sequence of CKIP-1 contains five in frame ATG start codons, encoding methionine residues at positions 1, 172, 183, 385, and 408, suggesting internal initiation of translation as a possible source of the 28 kD product (fig 1B). *In vitro* translation experiments using an expression construct for CKIP-1 cDNA starting at the ATG at position 172 resulted in a product migrating at 28kD identical to that observed in C2C12 cells (fig 1C lanes 2, 3). On the contrary, no product was obtained with a cDNA starting at the ATG in position 183 (data not shown). Importantly, a band of 28 kD was also detected in *in vitro* translation of a CKIP-1 construct N-terminally tagged by the M2 flag showing that a complete *Ckip-1* ORF can produce this shorter protein (fig 1C lane 1). However, this 28 kD product was not produced when the ATG codon at position 172 of this M2-CKIP-1 construct was mutated in TTG (A172T mutation) (data not shown). Taken together, these results demonstrated the existence of two isoforms of CKIP-1 originating from different translation initiation codons: CKIP-1 which starts at methionine residue 1, and a 28 kD product which starts at methionine residue 172. Given its apparent molecular weight of 28 kD, this product of the *Ckip-1* gene has been designated CKIP-1p28. In order to characterize CKIP-1p28 synthesis, we performed RNase protection and RNA circularization assays on *Ckip-1* mRNAs. Both approaches demonstrated that some *Ckip-1* mRNAs were initiated after the first ATG codon but before CKIP-1p28 start codon. These mRNAs must therefore be specifically translated into CKIP-1p28 (Sup fig S2).

Altogether, these data demonstrated the existence of an additional CKIP-1 protein; CKIP-1p28 that starts at methionine 172 and therefore lacks the PH domain (aa 20-131) as well as CP and Arp2/3 binding domain (aa 137-165).

CKIP-1 is cleaved during muscle differentiation *in vitro*

In a previous work, we have shown differentiation dependent changes in CKIP-1 expression (Safi et al., 2004). In order to check whether CKIP-1p28 expression is also varying during the differentiation process *in vitro*, we analyzed the expression of both CKIP-1 proteins in proliferating C2C12 myoblasts and after induction of differentiation (fig 2A). In proliferating myoblasts cultivated in growth medium (GM), full length CKIP-1 expression was higher than that of CKIP-1p28. Switching cells into low serum medium (differentiation medium, DM) induced myoblast differentiation as assessed by the expression of two markers of muscle differentiation, myogenin and myosin heavy chain. Upon differentiation, both CKIP-1 protein expressions increased, but the amount of CKIP-1 rapidly decreased after 24 h in DM (as previously described in Safi *et al.* (Safi et al., 2004), while CKIP-1p28 expression rose until 120 h in DM and was maintained high thereafter. Therefore, whereas the CKIP-1/CKIP-1p28 ratio was in favour of CKIP-1 in proliferating myoblasts, it was progressively reversed during differentiation and became in favour of CKIP-1p28 in differentiated cells.

Strikingly, our CKIP-1 antibody recognized another prominent band migrating between CKIP-1 and CKIP-1p28, at approximately 38 kD (fig 2A). This band appeared during the first 6 h in DM and increased with muscle differentiation. This 38 kD product cannot be the result of translation from an alternative start codon and it is not a splice variant since RT-PCR showed that neither proliferating nor differentiating myoblast *Ckip-1* mRNAs do undergo alternative splicing (Sup fig S3). However, two cleavage products of CKIP-1 have already been described. Indeed, caspase 3 has been shown to cleave human CKIP-1 after the aspartic residues D310 and D345 in an *in vitro* TNF/CHX-induced apoptosis model (Zhang et al., 2005). Moreover, caspase 3 is activated during muscle differentiation (Fernando et al., 2002). We thus hypothesised that this 38 kD band could be due to a cleavage by caspases. CKIP-1 sequence contains 24 aspartic residues, that is to say 24 potential caspase cleavage sites. We therefore generated different mouse CKIP-1 constructs corresponding to products of potential caspase cleavage after aspartate residues (fig 2B). These sites were chosen because their products have a theoretical molecular weight that would fit with the 38 kD endogenous product. All these constructs were transfected in C2C12 cells and myoblasts were then subjected to saponin preextraction to compare the extractability of the exogenous constructs to the extractability of the endogenous 38 kD product. Saponin preextraction is usually performed to extract membrane-unbound (cytosolic) proteins (Cao et al., 2007) (Sup fig S4). In every condition, endogenous CKIP-1 was enriched in preextracted samples (fig 2C). This is consistent with its nuclear and plasma membrane localization (Bosc et al., 2000; Litchfield

et al., 2001; Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004). On the contrary, the 38 kD product was totally extracted by saponin suggesting that it is cytosolic. Among the different transfected constructs, CKIP-1 140-408 and CKIP-1 147-408 were the only ones to display similar migration to the 38 kD product and to be extracted by saponin as well. Closer examination of the migration properties of both constructs compared to the endogenous product revealed that CKIP-1 147-408 has the same mobility as the 38 kD band, when separated by SDS-11%PAGE (fig 2D). This strongly suggests that the 38 kD band corresponds to the C-terminal fragment released by caspase cleavage after aspartic residue D146. We thus called this 38 kD cleaved form CKIP-1 147-408. Importantly, the four amino acid residues defining the caspase cleavage site suspected to be involved in mouse CKIP-1 cleavage during C2C12 differentiation – VEED₁₄₆ – is a caspase-6 consensus target sequence conserved in human, zebrafish, and chicken CKIP-1 (fig 2E). A simple way to demonstrate the requirement of this caspase site for CKIP-1 cleavage during differentiation would be to transfect wild type CKIP-1 and CKIP-1 D146A mutant in differentiating myoblasts and compare their susceptibility to differentiation-induced cleavage. Unfortunately, exogenous CKIP-1, even wild type, is not cleaved during C2C12 differentiation. This precluded the use of mutated CKIP-1 form to confirm cleavage site location along CKIP-1 sequence. We therefore decided to sequence the N-terminal amino acids of the cleaved form through Edman degradation. These experiments are ongoing. Taken together, these results showed that during C2C12 differentiation, the amount of CKIP-1 globally decreases while the amount of CKIP-1p28 increases. CKIP-1 decrease results from its cleavage after aspartic residue D146.

CKIP-1 protein localizations and interactions with actin cytoskeleton regulatory proteins in C2C12 cells

We and others have shown that CKIP-1 is involved in actin cytoskeleton regulation through Arp2/3 and CP $\alpha\beta$ binding and that its location in cell modulates its regulatory function on actin (Baas et al., submitted; Canton et al., 2005; Canton et al., 2006). The ability of CKIP-1 proteins to interact with Arp2/3 and CP $\alpha\beta$ and their intracellular localization were therefore investigated. CKIP-1 is able to shuttle between the plasma membrane and the nucleus. Its plasma membrane localization depends on the presence of its PH domain (Bosc et al., 2000; Litchfield et al., 2001; Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004; Zhang et al., 2006). CKIP-1 shuttling to the nucleus relies on a nuclear localization motif within the PH domain (aa 82 to 90) which is counteracted by an auto-inhibitory region in the C-terminal part of the protein (aa 382 to 389) (Xi et al., 2010). In order to localize the different CKIP-1 forms within

the cell, we coupled immunofluorescence and biochemical studies. In myoblast, where CKIP-1 is the predominant form, immunofluorescence analysis with our CKIP-1 antibody reveals a prominent nuclear staining and a weak membrane and/or cytosolic staining (fig 3A). This is consistent with the cell fractioning experiment that shows that CKIP-1 is divided into two fractions: a predominant pool of CKIP-1 is in the nuclear fraction (N) and a small pool of the protein is in the particulate fraction (P) corresponding to membrane-associated and insoluble cytoplasmic proteins (fig 3B). CKIP-1p28 is exclusively found in the soluble (S) fraction. After 72h in DM, when CKIP-1, its cleavage product as well as CKIP-1p28 can be detected, some myotubes have already formed. In myotubes, the staining is cytoplasmic while the surrounding myoblasts display a staining similar to that observed in myoblasts in GM (fig 3A). At this stage of differentiation, CKIP-1 is less abundant in the nuclear fraction, while its membrane-associated fraction remains the same. Considering that there is no nuclear staining in myotubes, if CKIP-1 is present in myotubes it is necessarily associated to the plasma membrane. CKIP-1p28 and the cleavage product CKIP-1 147-408, which are both devoid of PH domain, are only detected in the S fraction all the way through differentiation (fig 3B).

To confirm the proposed localizations for the different CKIP-1 forms, myoblasts transfected with CKIP-1, CKIP-1p28, and CKIP-1 147-408 were subjected to immunofluorescence with our anti CKIP-1 antibody (fig 3C). As previously described, CKIP-1 is present at the plasma membrane and in the nucleus. On the contrary, CKIP-1p28 and CKIP-1 147-408 both display a cytoplasmic localization, but CKIP-1 147-408 is also detected in the nucleus. Overall, these results are consistent with those from the cell fractioning experiment, except for CKIP-1 147-408 that was shown to be exclusively cytosolic when resulting from CKIP-1 cleavage, whereas it is also present in the nucleus when overexpressed. This discrepancy could be due to the excess of CKIP-1 147-408 present in the transfected cells.

In a previous work (Baas et al., submitted), we showed that, during muscle formation, CKIP-1 is involved in cell morphology changes through interaction with two actin cytoskeleton regulators: the actin nucleation complex Arp2/3 –through a direct interaction with ARPC1A subunit– and the capping proteins CP α and CP β . In order to investigate for a potential role of the different CKIP-1 forms in actin remodelling and cell morphology changes, we tested their ability to bind Arp2/3 and CP. C2C12 cells were transfected with CKIP-1-M2, CKIP-1 147-408-M2 or CKIP-1p28-HA, starved for 4 h and then treated or not with 25 μ M insulin for 20 min to stimulate actin remodelling. Consistent with our previous results, insulin treatment induces CKIP-1 interaction with ARPC2 subunit of the Arp2/3

complex and slightly increases the interaction between CKIP-1 and CP α (fig 3D). Similarly, CKIP-1 147-408 was able to co-immunoprecipitate ARPC2 and CP α in insulin stimulated cells, although it possesses only the 20 last amino acids of the 30 residues constituting the CP/Arp binding domain (aa 137 to 165). Not surprisingly, CKIP-1p28 was unable to form complex with ARPC2 nor CP α after insulin stimulation since it does not bear either CP or ARPC1A binding domains. Altogether, these results show that the three CKIP-1 proteins present along muscle differentiation *in vitro* display specific intracellular localizations and protein interactions: CKIP-1 is localized in the nucleus and at the plasma membrane and interacts with Arp2/3 and CP $\alpha\beta$; CKIP-1 147-408 is able to interact with Arp2/3 and CP $\alpha\beta$ but it is not localized at the plasma membrane since it lacks the PH domain; and CKIP-1p28 lacks PH domain and Arp/CP binding domain and is thus localized in the cytoplasm and is unable to interact with Arp2/3 nor CP $\alpha\beta$ (fig 3E). These results suggest that the CKIP-1 protein forms may have different effects on actin cytoskeleton regulation. Indeed, CKIP-1 cleavage generates CKIP-1 147-408 fragment that still binds Arp2/3 and CP $\alpha\beta$ but is not recruited to the plasma membrane. CKIP-1 147-408 may therefore display different binding partners. In that case, CKIP-1 cleavage could modulate its scaffolding function. Alternatively, it may sequester Arp2/3 and CP from sites where actin remodelling is not or no more needed.

CKIP-1 and CKIP-1p28 expression regulates myotube formation and myoblast migration

We previously showed that changes in full length CKIP-1 expression level modulate C2C12 response to differentiation signals (Safi et al., 2004). Indeed, CKIP-1 overexpression potentiates C2C12 cell differentiation and fusion, while CKIP-1 downregulation by siRNA delays differentiation. We then wanted to test whether a modulation of CKIP-1p28 expression could regulate muscle differentiation as well. For this purpose, we generated a C2C12 cell line stably transfected with a construct encoding CKIP-1p28. This cell line will be subsequently designated C2C12/CKIP-1p28 cells. These cells were characterized by a strong CKIP-1p28 expression even in proliferating myoblasts when CKIP-1p28 is usually low (fig 4A). But this was associated with a decreased CKIP-1 expression suggesting that CKIP-1 protein expressions are linked. When switched to low serum differentiation medium, C2C12/CKIP-1p28 cells showed reduced ability to myotube formation. Indeed, only 15% of CKIP-1p28 cells underwent fusion with an average of 2 nuclei per myotube whereas 54% of control C2C12 cells formed myotubes containing an average of 12 nuclei. These results are

consistent with the reduced CKIP-1 expression in C2C12/CKIP-1p28 cells which is known to be associated with a lack of differentiation.

We next asked whether CKIP-1p28 knockdown could potentiate and/or accelerate cell fusion. To this purpose, CKIP-1p28 was knocked down by shRNA. The two mRNA populations encoding CKIP-1 proteins have different transcription initiation but are strictly homologous in sequence (Sup Fig S2). However they could adopt different secondary structures making specific regions of mRNAs accessible in one population and inaccessible in the second mRNA population. Different sequences were therefore tested for their efficiency to abolish selectively CKIP-1p28 expression. The best target sequence was located between nt 777 and 795 after the first ATG and therefore 261 nt downstream of the second ATG codon. As shown in figure 4B, seventy two hours after C2C12 cell transfection with pRNAt-shRNA, the level of CKIP-1p28 protein was dramatically reduced whereas no significant changes in full length CKIP-1 were observed. These cells were then switched to differentiation medium. Transfected cells could be detected since pRNAt also encodes GFP. Knockdown of CKIP-1p28 expression, without affecting full length CKIP-1 level, accelerated C2C12 differentiation. Indeed, only 72 hours after DM addition, 76.5 % of GFP positive myoblasts formed myotubes versus 48.6 % for control vector transfected cells (fig 4C). These myotubes were thicker and more ramified and this increase in size was paralleled by an increase in the number of nuclei per myotube (fig 4D). shRNA expressing myotubes contained an average of 25 nuclei versus 11 in control myotubes. Inhibition of CKIP-1p28 or increased CKIP-1/CKIP-1p28 ratio therefore appears to promote cell fusion.

The first step of muscle differentiation *in vitro* but also *in vivo* consists in the migration of individual myoblasts towards each others. Myoblasts that came in close apposition then adhere to each other and finally fuse. Inhibition of myoblast migration leads to the formation of myotubes with reduced numbers of nuclei (Bae et al., 2008; Jansen and Pavlath, 2006). Considering that the effects on myotube size that we observed were induced by the manipulation of CKIP-1 isoform expression levels before the migration step, we wondered whether the variation in myotube size could be a result of altered myoblast migration properties. To test this hypothesis, we subjected control C2C12 and C2C12/CKIP-1p28 myoblasts to an *in vitro* wound-healing assay. A wound was created in a monolayer of C2C12 or C2C12/CKIP-1p28 cells and the ability of cells to fulfill the wound was monitored by video time lapse (fig 4E). After 12 h, whereas control cells had markedly progressed from each side of the wound towards the center of the gap, C2C12/CKIP-1p28 cells were not as effective in invading the space generated by the wound. Indeed, each edge of the wound

moved forward to the center of the gap by 123.7 μm in C2C12 cells, and only by 82.5 μm in C2C12/CKIP-1p28 cells. This clearly showed that CKIP-1p28 constitutive expression alters the migration capacity of myoblasts. The defects in myotube formation observed in C2C12/CKIP-1p28 cells could, therefore, be explained, not only by a defect in myoblast fusion due to a lack of CKIP-1, but also by an alteration of myoblast migration.

CKIP-1 forms pattern *in vivo* during myogenesis and muscle regeneration

To check for the relevance of the different CKIP-1 forms, we investigated for their presence in skeletal muscles *in vivo*. Western blot analysis of total protein extracts from various adult skeletal muscles revealed two bands, one migrating at 28 kD which corresponds to CKIP-1p28 and the other one migrating at 43 kD (fig 5A). This 43 kD band is specific to skeletal muscle since it is not observed in other tested organs (fig 1A). Neither an internal initiation of translation nor an alternative splicing can explain the presence of this 43 kD product (Sup fig S3), suggesting that it may be the result of CKIP-1 cleavage.

In an attempt to compare full length CKIP-1 fate during myogenesis *in vitro* and *in vivo*, we performed western blot on quadriceps protein extracts from E14, E16, E18 embryos and 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 week old mice (fig 5B). CKIP-1 was present in E14 muscles and its amount progressively decreased until it disappeared between P14 and P21. In parallel, the 43 kD band appeared at E18 and then increased in intensity. To confirm that this protein pattern was specifically found in muscles in formation, we induced muscle repair by injecting cardiotoxin in tibialis anterior muscles. Cardiotoxin causes muscle injury followed by muscle regeneration which more or less recapitulates the events occurring during myogenesis. Three days after cardiotoxin injection, full length CKIP-1 was detected in muscle while the 43 kD band was absent as compared to control muscle (fig 5C). This pattern was comparable to that observed during early myogenesis (E14, E16). 7 days after cardiotoxin injection CKIP-1 was still visible and the 43 kD band reappeared. Similar amounts of both proteins were present in muscles at this stage. The ratio between CKIP-1 and the 43 kD band was comparable to that observed during late myogenesis (P7). Therefore, cardiotoxin-induced muscle regeneration is characterized by the same CKIP-1 protein pattern as that observed during myogenesis *in vivo*, but also *in vitro*: CKIP-1 detection progressively decreases, while a CKIP-1 form of lower molecular weight gets more and more abundant. The striking similarity between *in vitro* and *in vivo* CKIP-1 protein pattern strongly suggests that CKIP-1 is also cleaved *in vivo*. But, whether *in vitro* and *in vivo* cleavage sites are the same is unknown since both proteins do not migrate at the same molecular weight *in vitro* and *in vivo* (38 kD and 43 kD, respectively).

Anyway, if they are identical, the 5 kD difference between *in vitro* and *in vivo* cleaved forms is not due to a difference in their phosphorylation status (Sup fig S5).

Altogether, these results demonstrated that CKIP-1 and CKIP-1p28 are present during myogenesis *in vitro* and *in vivo*. Thereafter, CKIP-1 is constitutively cleaved whereas CKIP-1p28 is maintained, so that mature muscles only contain the cleaved form and CKIP-1p28.

CKIP-1 cleaved form and CKIP-1p28 localization in adult mouse muscle

We studied CKIP-1 protein localizations in skeletal muscle through immunofluorescence and biochemical analysis. Immunofluorescence on endogenous proteins provided a striated staining composed of two kinds of bands: thick bands and thin bands (fig 6A). Thick bands (fig 6A, arrowheads) were centred on Z-disk localized by α -actinin, and extended until the A-I junction localized by DHPR α and RyR, whereas thin bands (fig 6A, arrows) were localized between α -actinin-stained Z-disks. Endogenous CKIP-1 proteins were thus localized throughout the I-band (thick bands) and at the M-line (thin bands). But, given that our antibody detects CKIP-1p28 and the protein corresponding to the 43 kD band, these immunostainings did not allow any discrimination between the staining due to CKIP-1p28 and the staining due to the protein corresponding to the 43 kD band. To address this issue we expressed a CKIP-1p28-GFP fusion protein in 6 week old mouse tibialis anterior muscles. Overexpressed CKIP-1p28 displayed a striated staining with a thick band co-localizing with α -actinin at the Z-disk (fig 6B, arrowhead) and a thin band localized at the M-line (fig 6B, arrow). CKIP-1p28 alone gave a staining similar to that obtained with endogenous proteins except that the band localized at the level of the Z-disk was thicker in the endogenous protein staining. Thus, in endogenous protein staining, the staining localized on both sides of the Z-line was specifically due to the protein corresponding to the 43 kD band.

Biochemical analysis allowed us to precise the distribution of the different CKIP-1 forms present in adult skeletal muscle. Subcellular fractions from fresh mouse tibialis anterior muscles were prepared as described in material and methods. The final product of this fractionation represents isolated myofibrils (MF) (fig 6C). As compared to the crude muscle homogenate (H), the MF fraction was highly enriched in sarcomeric proteins such as myosin, actin, α -actinin and CP α . CKIP-1p28 was found to be enriched in the MF fraction demonstrating that it is associated with myofibrillar proteins. This is consistent with its localization at Z-disks and M-lines. On the contrary, the 43 kD band was almost totally found in the first supernatant which corresponds to cytosolic, sarcolemma-bound and organelles-associated proteins. Altogether these data show that, in adult skeletal muscle, CKIP-1p28 is

associated with myofibrillar protein at the Z-disk and the M-line, while the 43 kD protein is localized (at least) on both sides of the Z-disk and is not bound to myofibrillar proteins.

Full length CKIP-1 overexpression induces intracellular membrane accumulation

We showed that CKIP-1 is expressed during myogenesis and in adult muscle in mice. In mature skeletal muscle, CKIP-1 is expressed and constitutively cleaved. In order to study CKIP-1 cleavage as well as the evolution of the cleaved form in mature skeletal muscles *in vivo*, adult skeletal muscles were electroporated with plasmids encoding CKIP-1 protein. Unfortunately, contrary to the endogenous protein, overexpressed CKIP-1 is not cleaved *in vivo* (Sup fig S6). We took advantage of this, to study the effect of the overexpression of an uncleavable CKIP-1 form in mature skeletal muscles. Adult skeletal muscles were electroporated with a plasmid encoding a CKIP-1-Cherry fusion protein. In electroporated adult tibialis anterior muscles, CKIP-Cherry was localized at the periphery of the fibers but also inside the fibers (Fig 7a,b). On skeletal muscle longitudinal sections, CKIP-1-Cherry labelling appeared as two distinct bands flanking marker of the Z-line (α -actinin). These bands co-localized with specific markers of T-tubules (DHPR α) and junctional sarcoplasmic reticulum (RyR) (Fig 7c-k). On transverse sections, CKIP-1-Cherry displayed a honeycomb staining also co-localizing with DHPR α and RyR (Fig 7i-q). These co-stainings demonstrated that, inside the fibers, CKIP-1 was localized at the triad, a specialized structure where excitation-contraction coupling takes place. Triads are T-tubule and sarcoplasmic reticulum connection sites that surround each myofibril on both sides of the Z-disk. The fact that CKIP-1 was present at the periphery of the fiber and along triads suggested that it was associated to membranes. The expression of a CKIP-1 mutant lacking the PH domain (CKIP-1 Δ PH-Cherry) led to a more diffuse staining as compared to CKIP-1-Cherry staining (Sup fig S7A and Ba,c). On the contrary, CKIP-1 PH domain alone (PH_{CKIP-1}-Cherry) showed the same localization as full-length CKIP-1 revealing that CKIP-1 localization was dependent on its PH domain (Sup fig S7A and Ba,e).

Strikingly, more than 48 % of CKIP-1-Cherry overexpressing muscle fibers displayed a strong CKIP-1-Cherry staining concentrated at localized sites along the fiber (n=373, from 4 independent experiments). These strong stainings altered the cylindrical morphology of the fibers by inducing peripheral bulges (Fig 8Aa). Inside the fiber, the area surrounding a strong CKIP-1-Cherry staining was characterised by a perturbation of CKIP-1-Cherry striated staining (Fig 8Ab). To identify the nature of these structures where CKIP-1-Cherry is concentrated, affected fibers were microdissected under an epifluorescence microscope and

subjected to transmission electron microscopy. The observation of affected cells revealed that the strong fluorescent stainings detected in optical microscopy were in fact sites of membrane accumulation (Fig 8Bc,d). We never observed such membrane abnormalities in muscles overexpressing Cherry alone (Fig 8Ba,b). These membrane defects were associated with a disorganisation of the surrounding myofibrils and an alteration of the structure of T-tubules which were enlarged (Fig 8Be-h). In an attempt to identify CKIP-1 properties that were involved in the establishment of these membrane defects, we overexpressed CKIP-1 mutants and checked for their ability to induce membrane accumulations by confocal microscopy. Especially, we wanted to verify whether membrane accumulations were a side effect due to saturation of free membrane phosphoinositides by overexpressed CKIP-1, resulting in deregulation of membrane homeostasis. The overexpression of the CKIP-1 Δ PH-Cherry construct, which does not bind to membrane, did not lead to such peripheral membrane accumulations in any of the overexpressing fiber observed, as shown by the regular parallel morphology of the electroporated fibers (Sup fig S7Bd). More importantly, the overexpression of CKIP-1 PH domain alone (PH_{CKIP-1}-Cherry) did not promote membrane accumulations, while retaining the ability to bind membrane phosphoinositides (Sup fig S7Bf). These results showed that CKIP-1-induced membrane accumulation requires CKIP-1 membrane binding but is not simply due to a saturation of free phosphoinositide sites by the PH domain of overexpressed CKIP-1. Eventually, the replacement of CKIP-1 PH domain by a myristoylation sequence from *v-Src*, allowing CKIP-1 membrane localization without any phosphoinositides binding (Olsten et al., 2004), restored triad localization and induced membrane accumulations similar to that observed with wild-type CKIP-1-Cherry (Sup fig S7A and Bg,h). These results demonstrated that CKIP-1-induced membrane accumulations are dependent on CKIP-1 localization at the membrane but not necessarily through binding of the PH domain to phosphoinositides.

CKIP-1-induced membrane aggregates are composed of plasma and intracellular membranes.

We then tried to better characterize the nature of these membrane accumulations. For this purpose, immunofluorescent stainings were useless since secondary antibodies aspecifically bound to CKIP-1-induced membrane accumulations (data not shown). Therefore, we used alternative techniques to stain membrane compartments. Given that membrane accumulation appeared at the periphery of the fibers, first we tested for the presence of plasma membrane in these membrane aggregates. We performed three different

approaches to stain plasma membrane: wheat germ agglutinin (WGA) and ruthenium red stainings which allowed a plasma membrane staining by confocal and transmission electron microscopy, respectively (Lee et al., 2002; Robu et al., 2003), and potassium ferrocyanide staining which allowed a specific staining of T-tubules by electron microscopy (Al-Qusairi et al., 2009). These three different approaches confirmed that CKIP-1-induced membrane accumulations were composed of plasma membrane (fig 9A,B), but the electron microscopic studies undoubtedly demonstrated that plasma membrane was only a small portion of accumulated membranes (fig 9B). This suggested that the remaining part was composed of intracellular membranes. The presence of intracellular membranes among the CKIP-1-induced membrane accumulations was confirmed by co-electroporations of CKIP-1-Cherry and internal membrane markers fused to EGFP: EGFP-Rab4, -Rab5, -Rab7, -Rab8 and -Rab11. EGFP-Rab protein intracellular localizations were not affected by the presence of overexpressed CKIP-1-Cherry (Sup fig S7). However, CKIP-1-induced membrane accumulations not only altered Rab protein striated localization but also led to EGFP-Rab4, -Rab5, -Rab7, and -Rab8 aggregation (fig 9C). The enrichment of Rab11 at sites of membrane accumulations was less clear. This aggregation of EGFP-Rab proteins was not due to an EGFP-dependant accumulation, since, in the presence of CKIP-1-induced membrane accumulation, EGFP alone did not display its striated pattern anymore (like EGFP-Rab proteins) but it did not particularly accumulate at sites of membrane aggregations (fig 9C, upper panels). The presence of Rab4, Rab5, Rab7, and Rab8 in CKIP-1-induced membrane accumulations suggested that these aggregates may contain early endosomes, clathrin-coated endocytic vesicles, late endosomes, lysosomes, trans-golgi network-derived exocytic vesicles. These Rab protein aggregations indicated that several steps of the intracellular trafficking were altered in CKIP-1-overexpressing muscles.

These results strongly suggested that CKIP-1 is involved in membrane trafficking.

CKIP-1 is involved in intracellular trafficking

To gain insight into the molecular origin of the above described membrane accumulations and Rab protein aggregations, we next investigated the potential influence of CKIP-1 on a membrane receptor trafficking; the transferrin receptor. CKIP-1 involvement in intracellular trafficking was analyzed in C2C12 myoblasts wherein CKIP-1 expression was down-regulated by siRNAs. Three different siRNAs designed by Invitrogen™ to target *Ckip-1* mRNAs were compared to scramble siRNA for their ability to decrease CKIP-1 expression. siRNA1 and siRNA3 induced a 66.4% and a 33% decrease in CKIP-1 expression

respectively, while siRNA2 failed to significantly inhibit CKIP-1 expression (7.8% decrease, not significant) (fig 10A,B). Interestingly, these siRNAs did not affect CKIP-1p28 expression enabling the specific testing of CKIP-1 role. siRNAs transfected cells were subjected to transferrin internalization assay which consists in following over time the endocytosis of transferrin receptor (TfR) through the use of labelled transferrin. Once they have fixed their ligand, plasma membrane TfRs are internalized through clathrin-coated pits and trafficked via early endosomes to a juxtannuclear recycling compartment, where they accumulate before being recycled back to the plasma membrane. We monitored the perinuclear accumulation of transferrin as a marker of the final internalization step. In scramble transfected cells, the percentage of cells displaying juxtannuclear transferrin accumulation increased until it reached a plateau after 10 min internalization (fig 10C). In siRNA1 and siRNA3 transfected cells, the apparition of perinuclear transferrin accumulation was delayed. Indeed first accumulations were observed after 10 min (versus 5 min in scramble transfected cells) and the percentage of cells with perinuclear accumulation of transferrin did not reach the plateau value observed in scramble transfected cells even after 20 min internalization. Consistent with its poor effect on CKIP-1 expression, siRNA2 led to a timecourse of transferrin accumulation very similar to that obtained with scramble cells, confirming that the effect described in siRNA1 and siRNA3 transfected cells is specifically due to CKIP-1 down-regulation. CKIP-1 is therefore required for effective transferrin internalization and its downregulation slows this process. Altogether these results show that full length CKIP-1 overexpression in adult skeletal muscle induces intracellular membrane accumulation probably by deregulating intracellular membrane trafficking.

DISCUSSION

In this study, we reported the existence of a 28 kD isoform of the CKIP-1 protein, that we named CKIP-1p28. In the process of analyzing CKIP-1 expression in various mouse tissues with our polyclonal anti-CKIP-1 antibody raised against residues 241 to 255, we observed that, in addition of the full-length CKIP-1 protein (CKIP-1), another band with an approximate molecular weight of 28 kD (CKIP-1p28) was detected in every normal mouse tissue we examined. By *in vitro* translation experiments, we demonstrated that this protein is initiated at the second ATG codon (residue 172) in the CKIP-1 coding region and therefore lacks the pleckstrin homology domain (residues 20-131) as well as Arp2/3 and CP binding domain (residues 137-165). By two different technical approaches (RNase protection assays and RNA circularization), we showed that CKIP-1p28 is encoded by its own mRNA population with transcription initiation starts located downstream of the first translation start codon. Cloning and sequencing of a 4,000 bp genomic DNA fragment upstream of the first translation initiation ATG codon revealed a region of 440 bp with a high GC content (81%) containing numerous SP1 sites and devoid of TATA and CAAT boxes (data not shown). These are characteristics of a GC-rich/TATA-less promoter region with multiple transcription initiation sites (Carninci et al., 2006).

In a previous work, we have demonstrated that CKIP-1 was required for C2C12 differentiation *in vitro* and that the first hours in DM were characterized by a peak of CKIP-1 expression followed by a continuous decrease (Safi et al., 2004). In this report, we studied the expression profile of both CKIP-1 isoforms during C2C12 differentiation. Consistent with our previous observation, upon induced differentiation, CKIP-1 amount was first increased and then decreased, whereas CKIP-1p28 expression increased gradually from 24h in DM and reached a maximum at 120h. This analysis also revealed a differentiation-dependent apparition of a 38 kD product. By CKIP-1 deletion constructs analysis, we demonstrated that this 38 kD product results from CKIP-1 cleavage after aspartate residue D146. This aspartate residue D146 is part of a caspase-6 consensus cleavage site conserved in human, zebrafish and chicken CKIP-1 suggesting that this CKIP-1 cleavage could involve caspase-6. Unfortunately, we have not been able to test the requirement of this cleavage for muscle differentiation by transfecting uncleavable CKIP-1 D146A mutant because overexpressed CKIP-1, even wild type, is not cleaved upon induced differentiation (data not shown). The fact that overexpressed CKIP-1 is not cleaved during muscle differentiation could be due to the saturation of the endogenous cleavage system by exogenous CKIP-1. CKIP-1 has already been shown to undergo caspase-3 cleavage during apoptosis (Zhang et al., 2005). Indeed,

upon TNF induced apoptosis, endogenous CKIP-1 is cleaved by caspase-3 after aspartate residue D310 (D309 in mouse CKIP-1). Contrary to D146 cleavage site, D310 does not belong to a canonical caspase cleavage site and is not conserved in chicken CKIP-1 (data not shown). These results show that different extracellular signals lead to different CKIP-1 cleavages depending on the nature of initiator or effector caspases involved.

Importantly, our *in vivo* studies confirmed the existence and the expression pattern of CKIP-1, CKIP-1p28 and the cleaved form. Indeed, we showed that CKIP-1 was also cleaved during *in vivo* myogenesis. CKIP-1 cleavage started at E18 and full length CKIP-1 was no longer detected at 3 weeks, so that in adult skeletal muscles, CKIP-1p28 and the cleaved form were the only CKIP-1 proteins to be detected. The fact that, *in vitro*, full length CKIP-1 is still detected after 7 days in DM could be explained by the presence of mononucleated incompletely differentiated myoblasts in the dishes even after one week of differentiation. The cleaved form was muscle-specific since it was absent from all other tested mouse tissues. We observed that, in skeletal muscle, full length CKIP-1 was specifically detected in regenerating muscles and was then progressively cleaved similarly to what was observed during myogenesis. Muscle degeneration and subsequent regeneration were induced by injection of cardiotoxin that are pore-forming agents (Forouhar et al., 2003) leading to degradation of skeletal muscle cells. This muscle damage provokes the activation of satellite cells, which are located between the plasma membrane and basal lamina of the adult muscle fibre (Mauro, 1961), and considered to be the precursors of regenerated muscle. Once activated, satellite cells proliferate, migrate towards each other, and fuse together to form new myofibers. Considering CKIP-1 expression profile during myogenesis and cardiotoxin-induced regeneration, it is tempting to speculate that CKIP-1 participates to the steps leading to the formation of skeletal muscles. On the contrary, it seems not to be necessary as a full length protein in adult muscle. This putative requirement for CKIP-1 during myogenesis in mouse is consistent with our previous data showing that Ckip-1 is necessary for fusion of muscle precursor cells during myogenesis in zebrafish.

CKIP-1 has been involved in actin cytoskeleton regulation through interactions with two main regulators of actin polymerization, capping proteins (CP) that block actin polymerization and depolymerisation, and ARPC1A, a subunit of the actin nucleation complex Arp2/3, which binds to the side of a preexisting actin filament and nucleates the formation of branched filaments. The domain of CKIP-1 involved in CP and Arp2/3 binding has been localized just downstream the PH domain, from aa 138 to aa 166 (137 to 165 in mouse) (Baas et al., submitted; Hernandez-Valladares et al., 2010). Given the prominent role

of actin cytoskeleton in the successive steps of muscle differentiation, we tested the ability of each CKIP-1 protein – CKIP-1, CKIP-1p28 and CKIP-1 147-408 – to interact with CP and Arp2/3. We showed by co-immunoprecipitation experiments, immunostainings and cell fractioning that CKIP-1 interacted with Arp2/3 and CP, and was located at the plasma membrane and in the nucleus. On the contrary, CKIP-1p28 was exclusively found in the cytoplasm and was able to interact neither with CP nor with Arp2/3. This is consistent with the fact that CKIP-1p28 lacks PH and Arp/CP binding domains. Interestingly, CKIP-1 147-408, which lacks PH domain and the first third of CP/Arp domain, showed intermediate properties: it was localized in the cytoplasm, like CKIP-1p28, but was able to interact with Arp and CP, like CKIP-1. These results therefore showed that the CKIP-1 domain involved in ARPC1A binding is localized between aa 146 and 171, according to our previous results (Baas et al., submitted). Intracellular locations of the different CKIP-1 proteins are consistent with previous data concerning CKIP-1 localization. Indeed the PH domain is responsible for CKIP-1 plasma membrane localization through phosphoinositide binding, but it has also been implicated in CKIP-1 translocation to the nucleus through a small nuclear localization motif (aa 82-90 in human, aa 81-89 in mouse) (Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004; Xi et al., 2010). This explains the specific cytoplasmic localization of CKIP-1p28 and CKIP-1 147-408. We have previously shown that CKIP-1 capacity to affect cellular morphology by remodelling actin cytoskeleton is dependent on its capacity to interact with Arp and CP but also on its ability to be targeted to the plasma membrane through its PH domain. In this regard, CKIP-1p28 and CKIP-1 147-408 could act as CKIP-1 regulators during muscle differentiation. On the one hand, CKIP-1 147-408 could compete with CKIP-1 for Arp2/3 and CP binding, thus preventing their translocation to the plasma membrane. On the other hand, CKIP-1p28, as it is unable to bind CP and Arp2/3, could inhibit CKIP-1 actions on actin cytoskeleton in a different way. It has been proposed by two different groups that CKIP-1 is able to homodimerize through LZ domain-mediated interactions (Olsten et al., 2004; Tokuda et al., 2007). Since CKIP-1p28 still contains its LZ domain, it could form heterodimer with CKIP-1, thus affecting its ability to bind to its interactors. Thus, CKIP-1 cleavage and progressive replacement by CKIP-1 147-408 associated with the increase in CKIP-1p28 expression along muscle differentiation would be two complementary ways to inhibit CKIP-1 during muscle differentiation. The fact that overexpressed CKIP-1, that is not cleaved during differentiation (see above), induced the formation of thicker myotubes with more nuclei than control myotubes (Safi et al., 2004) confirms that the differentiation-induced CKIP-1 cleavage may be a way to inhibit its activating functions on C2C12 differentiation (maybe fusion). But

whatever functions CKIP-1p28 and the cleaved form fulfill during myogenesis, their functions in adult muscle remain to be determined.

Our *in vitro* studies on C2C12 cells demonstrated that modulation of the relative amounts of CKIP-1 and CKIP-1p28 proteins at the initiation of differentiation affected the ability of myoblasts to form multinucleated myotubes. Myoblasts with low levels of CKIP-1 or high levels of CKIP-1p28 led to the formation of myotubes with a low number of nuclei, whereas myoblasts with high levels of CKIP-1 or low levels of CKIP-1p28 were associated with the formation of myotubes with a high number of nuclei (this study and (Safi et al., 2004)). These results are consistent with the defects in fusion of fast muscle precursors reported in zebrafish embryos injected with morpholino oligonucleotides inhibiting *ckip-1* expression, showing CKIP-1 involvement in myoblast fusion (Baas et al., submitted). Using wound healing assay, we also showed in this report that a high CKIP-1 level was required for directional cell migration, while a high CKIP-1p28 expression altered migration. Therefore, CKIP-1 is involved not only in myoblast fusion but also in their migration. Consequently, the defects in myotube formation characteristic of myoblasts expressing low levels of CKIP-1 could be accounted for by defects in both steps, myoblast migration towards each other and myoblast fusion. *In vivo*, zebrafish myoblasts depleted for CKIP-1 did not show major migration defects (Baas et al., submitted). This apparent discrepancy between *in vivo* and *in vitro* data can be explained by the fact that myoblast migration relies on different mechanisms in both cases. In C2C12 cells, migration involves the formation of specialized membrane protrusions, lamellipodia and filopodia, extended through remodelling of the underlying actin cytoskeleton. CKIP-1 overexpression has been shown to promote the formation of such structures (Baas et al., submitted; Canton et al., 2005). In zebrafish, slow muscle precursor first elongate, so that their extremities attach to the myosepts and then, they migrate to the periphery of the myotome through transverse displacement of cell edges along myosepts. This kind of cell move does not require the extension of large cell protrusions, thus explaining divergence between *in vivo* and *in vitro* results. In mouse embryo muscles and in regenerating adult muscles, muscle cell progenitors also have to migrate to their fusion partners. Their migration is more similar to that observed in C2C12 cells. The presence of CKIP-1 in embryonic muscles and its reappearance in regenerating muscles could be correlated with its requirement for myoblast migration.

In order to obtain additional information concerning the role(s) of full length CKIP-1 in skeletal muscles *in vivo*, we overexpressed CKIP-1-Cherry expressing plasmids in adult skeletal muscles. CKIP-1-Cherry was localized at the periphery of the fibers and at triads.

These intracellular locations were dependent on CKIP-1 PH domain suggesting that CKIP-1 was bound to membranes. More importantly, we showed that CKIP-1 overexpression induced the formation of membrane accumulations at the periphery of almost half of electroporated fibers. These membrane defects were associated with a disorganization of surrounding myofibrils. Considering that CKIP-1 regulates actin cytoskeleton, a plausible hypothesis would be that CKIP-1 overexpression perturbs the organization of myofibrils; and the lack of cytoskeleton scaffold provokes consecutively the accumulation of the intracellular membrane network – T-tubules and sarcoplasmic reticulum – because it is no more maintained by sarcomeres. However, two arguments are against this proposed sequence of events: (1) the membrane accumulation altered the regular cylindrical morphology of the fiber, thus arguing for the presence of an excess of material which wouldn't be the case in the above mentioned hypothesis; (2) regions of electroporated fibers that are less affected by CKIP-1 overexpression displayed a regular sarcomeric organization but their T-tubules were enlarged, thus showing that membrane accumulations, are a direct consequence and not a side effect of CKIP-1 overexpression. The formation of these membrane aggregates required the presence of CKIP-1 at the membrane but it was not simply due to a saturation of free membrane phosphoinositides by the huge amount of CKIP-1 PH domain present in the fibers. Moreover CKIP-1 binding to CP seemed dispensable since the CKIP-1 R154,156E mutant defective in CP binding was also able to induce membrane accumulations (preliminary unpublished data). However, the specific requirement of CKIP-1 Arp2/3-binding property in membrane accumulation induction could not be tested since the precise CKIP-1 amino acids required for this interaction are still unknown. Thus, we do not have, for the moment, a CKIP-1 mutant that is unable to bind Arp2/3 while retaining the ability to interact with CP. This kind of mutant would be very helpful to study specifically the requirement of CKIP-1-Arp2/3 interaction in the formation of these membrane accumulations. We demonstrated by (1) confocal and transmission electron microscopy using specific markers of plasmalemma and T-tubules, and by (2) co-electroporation with EGFP-Rab constructs that these CKIP-1-induced membrane aggregates are mainly composed of internal membrane and to a lesser extent T-tubules. This prominence of intracellular membranes suggested a role for CKIP-1 in intracellular membrane trafficking.

We showed that CKIP-1 downregulation by siRNA in C2C12 cells slowed-down transferrin receptor internalization. CKIP-1 implication in intracellular membrane trafficking is consistent with its ability to regulate the actin cytoskeleton. The implication of the actin cytoskeleton in membrane trafficking has been well described (reviewed in (Kaksonen et al.,

2006)). It is involved in clathrin-coated endocytic vesicle fission from the plasma membrane (Merrifield et al., 2005), in intracellular membrane movement through actin rocketing (actin polymerization next to vesicles to push them in the cytoplasm) (Taunton et al., 2000), in the membrane deformation and maturation process leading to the biogenesis of transport intermediate from endosomes (Derivery et al., 2009; Morel et al., 2009). The fact that CKIP-1 is implicated in membrane trafficking and that the first detectable effect of its overexpression in skeletal muscle is an enlargement of T-tubules suggests that it could participate to the setting up of the muscle's intracellular membrane network. Indeed the formation of this intracellular membrane network occurs from E14 to E18, and then its maturation lasts until 3 weeks after birth (Takekura et al., 2001). Full length CKIP-1 is thus present during the main part of the process and is then progressively cleaved during the maturation step. Moreover, the establishment of T-tubules and sarcoplasmic reticulum requires the deformation of plasma membrane to initiate T-tubules, the deformation of endoplasmic reticulum to develop sarcoplasmic reticulum, and probably the traffic of intracellular vesicles to elongate T-tubules (Flucher, 1992; Komazaki et al., 1999; Lee et al., 2002). All these modifications are known or supposed to involve the actin cytoskeleton and CKIP-1 could, therefore, be one of the numerous proteins involved in the establishment of the intracellular membrane network or its maintenance.

Finally, CKIP-1 properties, intracellular localization, and effects of its overexpression in skeletal muscle were reminiscent of myotubularin MTM1. MTM1 is a lipid phosphatase that dephosphorylates phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P) and PtdIns(3,5)P₂ in PtdIns and PtdIns5P, respectively. It binds phosphatidylinositol through a PH-GRAM (Pleckstrin Homology-Glucosyltransferase, Rab-like GTPase Activators and Myotubularins) domain and has been involved in endosomal trafficking and lamellipodia and filopodia formation (Cao et al., 2007; Kim et al., 2002; Laporte et al., 2002). Numerous mutations in the MTM1 encoding gene have been identified in patients affected with X-linked centronuclear myopathy (XLCNM) (Laporte et al., 1996). XLCNM is a very severe congenital myopathy associated with generalized muscle weakness and hypotonia at birth. In skeletal muscle, MTM1 is localized at triads. Moreover its overexpression induces membrane defects characterized by organized membrane assemblies located in the subsarcolemmal region of the fiber, while MTM1 KO mice display disorganized T-tubules (Al-Qusairi et al., 2009; Buj-Bello et al., 2008). We showed that MTM1 ectopic expression in C2C12 cells abolishes CKIP-1 plasma membrane localization (Safi et al., 2004). All these observations

strongly suggest that CKIP-1 and MTM1 may participate in the same pathway. Therefore, the implication of CKIP-1 in the physiopathology of CNM has to be investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the mouse (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris) and microscopy (Plateau Technique Imagerie/Microscopie) facilities of the SFR BioSciences Gerland – Lyon Sud. The (mAb 5B12.3) (mAb 3F2.3), (mAb F59) (IID5E1) were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242.

A.G. is supported by the French Ministère de la Recherche and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). P.C. is supported by the French Ministère de la Recherche. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (to E. Goillot), the Association pour la Recherche contre le Cancer (to E. Goillot) and the Ministère de la Recherche et de la Technologie (ACI BDPI to L. Schaeffer).

REFERENCES

- Al-Qusairi, L., N. Weiss, A. Toussaint, C. Berbey, N. Messaddeq, C. Kretz, D. Sanoudou, A.H. Beggs, B. Allard, J.L. Mandel, J. Laporte, V. Jacquemond, and A. Buj-Bello. 2009. T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:18763-8.
- Baas, D., S. Caussanel-Boude, A. Guiraud, F. Calhabeu, E. Delaune-Henry, F. Pilot, E. Chopin, I. Machuca-Gayet, A. Vernay, S. Bertrand, J.-F. Rual, P. Jurdic, D.E. Hill, M. Vidal, L. Schaeffer, and E. Goillot. submitted. CKIP-1 is involved in Zebrafish muscle fibre formation through actin cytoskeletal organization.
- Bae, G.U., U. Gaio, Y.J. Yang, H.J. Lee, J.S. Kang, and R.S. Krauss. 2008. Regulation of myoblast motility and fusion by the CXCR4-associated sialomucin, CD164. *J Biol Chem*. 283:8301-9.
- Bosc, D.G., K.C. Graham, R.B. Saulnier, C. Zhang, D. Prober, R.D. Gietz, and D.W. Litchfield. 2000. Identification and characterization of CKIP-1, a novel pleckstrin homology domain-containing protein that interacts with protein kinase CK2. *J Biol Chem*. 275:14295-306.
- Buckingham, M., L. Bajard, T. Chang, P. Daubas, J. Hadchouel, S. Meilhac, D. Montarras, D. Rocancourt, and F. Relaix. 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*. 202:59-68.
- Buj-Bello, A., F. Fougousse, Y. Schwab, N. Messaddeq, D. Spehner, C.R. Pierson, M. Durand, C. Kretz, O. Danos, A.M. Douar, A.H. Beggs, P. Schultz, M. Montus, P. Deneffe, and J.L. Mandel. 2008. AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis. *Hum Mol Genet*. 17:2132-43.
- Canton, D.A., M.E. Olsten, K. Kim, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie, J.A. Cooper, and D.W. Litchfield. 2005. The pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 is involved in regulation of cell morphology and the actin cytoskeleton and interaction with actin capping protein. *Mol Cell Biol*. 25:3519-34.
- Canton, D.A., M.E. Olsten, H. Niederstrasser, J.A. Cooper, and D.W. Litchfield. 2006. The role of CKIP-1 in cell morphology depends on its interaction with actin-capping protein. *J Biol Chem*. 281:36347-59.
- Cao, C., J. Laporte, J.M. Backer, A. Wandinger-Ness, and M.P. Stein. 2007. Myotubularin lipid phosphatase binds the hVPS15/hVPS34 lipid kinase complex on endosomes. *Traffic*. 8:1052-67.
- Carninci, P., A. Sandelin, B. Lenhard, S. Katayama, K. Shimokawa, J. Ponjavic, C.A. Semple, M.S. Taylor, P.G. Engstrom, M.C. Frith, A.R. Forrest, W.B. Alkema, S.L. Tan, C. Plessy, R. Kodzius, T. Ravasi, T. Kasukawa, S. Fukuda, M. Kanamori-Katayama, Y. Kitazume, H. Kawaji, C. Kai, M. Nakamura, H. Konno, K. Nakano, S. Mottagui-Tabar, P. Arner, A. Chesi, S. Gustincich, F. Persichetti, H. Suzuki, S.M. Grimmond, C.A. Wells, V. Orlando, C. Wahlestedt, E.T. Liu, M. Harbers, J. Kawai, V.B. Bajic, D.A. Hume, and Y. Hayashizaki. 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet*. 38:626-35.
- Derivery, E., C. Sousa, J.J. Gautier, B. Lombard, D. Loew, and A. Gautreau. 2009. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell*. 17:712-23.
- Duan, R., and P.J. Gallagher. 2009. Dependence of myoblast fusion on a cortical actin wall and nonmuscle myosin IIA. *Dev Biol*. 325:374-85.

- Fernando, P., J.F. Kelly, K. Balazsi, R.S. Slack, and L.A. Megeney. 2002. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:11025-30.
- Flucher, B.E. 1992. Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev Biol*. 154:245-60.
- Forouhar, F., W.N. Huang, J.H. Liu, K.Y. Chien, W.G. Wu, and C.D. Hsiao. 2003. Structural basis of membrane-induced cardiotoxin A3 oligomerization. *J Biol Chem*. 278:21980-8.
- Georgescu, M.M., K.H. Kirsch, P. Kaloudis, H. Yang, N.P. Pavletich, and H. Hanafusa. 2000. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res*. 60:7033-8.
- Hernandez-Valladares, M., T. Kim, B. Kannan, A. Tung, A.H. Aguda, M. Larsson, J.A. Cooper, and R.C. Robinson. 2010. Structural characterization of a capping protein interaction motif defines a family of actin filament regulators. *Nat Struct Mol Biol*. 17:497-503.
- Jansen, K.M., and G.K. Pavlath. 2006. Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *J Cell Biol*. 174:403-13.
- Kaksonen, M., C.P. Toret, and D.G. Drubin. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:404-14.
- Kim, S.A., G.S. Taylor, K.M. Torgersen, and J.E. Dixon. 2002. Myotubularin and MTMR2, phosphatidylinositol 3-phosphatases mutated in myotubular myopathy and type 4B Charcot-Marie-Tooth disease. *J Biol Chem*. 277:4526-31.
- Komazaki, S., M. Nishi, K. Kangawa, and H. Takeshima. 1999. Immunolocalization of mitsugumin29 in developing skeletal muscle and effects of the protein expressed in amphibian embryonic cells. *Dev Dyn*. 215:87-95.
- Laporte, J., F. Blondeau, A. Gansmuller, Y. Lutz, J.L. Vonesch, and J.L. Mandel. 2002. The PtdIns3P phosphatase myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles. *J Cell Sci*. 115:3105-17.
- Laporte, J., L.J. Hu, C. Kretz, J.L. Mandel, P. Kioschis, J.F. Coy, S.M. Klauck, A. Poustka, and N. Dahl. 1996. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet*. 13:175-82.
- Le Clainche, C., and M.F. Carlier. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev*. 88:489-513.
- Lee, E., M. Marcucci, L. Daniell, M. Pypaert, O.A. Weisz, G.C. Ochoa, K. Farsad, M.R. Wenk, and P. De Camilli. 2002. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*. 297:1193-6.
- Litchfield, D.W., D.G. Bosc, D.A. Canton, R.B. Saulnier, G. Vilks, and C. Zhang. 2001. Functional specialization of CK2 isoforms and characterization of isoform-specific binding partners. *Mol Cell Biochem*. 227:21-9.
- Lu, K., X. Yin, T. Weng, S. Xi, L. Li, G. Xing, X. Cheng, X. Yang, L. Zhang, and F. He. 2008. Targeting WW domains linker of HECT-type ubiquitin ligase Smurf1 for activation by CKIP-1. *Nat Cell Biol*. 10:994-1002.
- Mandl, C.W., F.X. Heinz, E. Puchhammer-Stockl, and C. Kunz. 1991. Sequencing the termini of capped viral RNA by 5'-3' ligation and PCR. *Biotechniques*. 10:484, 486.
- Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 9:493-5.
- Meng, H., J.J. Leddy, J. Frank, P. Holland, and B.S. Tuana. 1996. The association of cardiac dystrophin with myofibrils/Z-disc regions in cardiac muscle suggests a novel role in the contractile apparatus. *J Biol Chem*. 271:12364-71.
- Merrifield, C.J., D. Perrais, and D. Zenisek. 2005. Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell*. 121:593-606.

- Morel, E., R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2009. Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell*. 16:445-57.
- Nowak, S.J., P.C. Nahirney, A.K. Hadjantonakis, and M.K. Baylies. 2009. Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. *J Cell Sci*. 122:3282-93.
- Olsten, M.E., D.A. Canton, C. Zhang, P.A. Walton, and D.W. Litchfield. 2004. The Pleckstrin homology domain of CK2 interacting protein-1 is required for interactions and recruitment of protein kinase CK2 to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 279:42114-27.
- Richardson, B.E., K. Beckett, S.J. Nowak, and M.K. Baylies. 2007. SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development*. 134:4357-67.
- Robu, V.G., E.S. Pfeiffer, S.L. Robia, R.C. Balijepalli, Y. Pi, T.J. Kamp, and J.W. Walker. 2003. Localization of functional endothelin receptor signaling complexes in cardiac transverse tubules. *J Biol Chem*. 278:48154-61.
- Safi, A., M. Vandromme, S. Caussanel, L. Valdacci, D. Baas, M. Vidal, G. Brun, L. Schaeffer, and E. Goillot. 2004. Role for the pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 in phosphatidylinositol 3-kinase-regulated muscle differentiation. *Mol Cell Biol*. 24:1245-55.
- Takekura, H., B.E. Flucher, and C. Franzini-Armstrong. 2001. Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev Biol*. 239:204-14.
- Taunton, J., B.A. Rowning, M.L. Coughlin, M. Wu, R.T. Moon, T.J. Mitchison, and C.A. Larabell. 2000. Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol*. 148:519-30.
- Tokuda, E., N. Fujita, T. Oh-hara, S. Sato, A. Kurata, R. Katayama, T. Itoh, T. Takenawa, K. Miyazono, and T. Tsuruo. 2007. Casein kinase 2-interacting protein-1, a novel Akt pleckstrin homology domain-interacting protein, down-regulates PI3K/Akt signaling and suppresses tumor growth in vivo. *Cancer Res*. 67:9666-76.
- Xi, S., Y. Tie, K. Lu, M. Zhang, X. Yin, J. Chen, G. Xing, C. Tian, X. Zheng, F. He, and L. Zhang. 2010. N-terminal PH domain and C-terminal auto-inhibitory region of CKIP-1 coordinate to determine its nucleus-plasma membrane shuttling. *FEBS Lett*. 584:1223-30.
- Zhang, L., Y. Tang, Y. Tie, C. Tian, J. Wang, Y. Dong, Z. Sun, and F. He. 2007. The PH domain containing protein CKIP-1 binds to IFP35 and Nmi and is involved in cytokine signaling. *Cell Signal*. 19:932-44.
- Zhang, L., Y. Tie, C. Tian, G. Xing, Y. Song, Y. Zhu, Z. Sun, and F. He. 2006. CKIP-1 recruits nuclear ATM partially to the plasma membrane through interaction with ATM. *Cell Signal*. 18:1386-95.
- Zhang, L., G. Xing, Y. Tie, Y. Tang, C. Tian, L. Li, L. Sun, H. Wei, Y. Zhu, and F. He. 2005. Role for the pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 in AP-1 regulation and apoptosis. *Embo J*. 24:766-78.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Identification of CKIP-1p28.

(A) A 28 kD product is detected by anti CKIP-1 antibody in mouse tissues. Total protein extracts from bones, bone marrow, thymus, lymph nodes, spleen, pancreas, liver, kidney, lung, salivary glands, brain and eyes from a 6 week old female OF1 mouse were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with our rabbit polyclonal anti CKIP-1 antibody.

(B) CKIP-1 amino acid sequence. Methionine residues are written in bold letters.

(C) Comparison between *in vitro* translation products and endogenous CKIP-1 proteins. Products from *in vitro* translation of pSPUTK-M2-CKIP-1 (M2-CKIP-1, lane 1) and pcDNA3-CKIP-1 172-408 (CKIP-1 172-408, lane 2) constructs and 50 µg of total protein extracts of C2C12 myoblasts cultured in GM (C2C12, lane 3) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti CKIP-1 antibody. In C2C12 extracts, the presence of additional bands above CKIP-1 55 kD band suggests that CKIP-1 undergoes posttranslational modifications, as previously mentioned (Safi et al., 2004).

Figure 2: CKIP-1 is cleaved during *in vitro* muscle differentiation.

(A) Immunoblots for endogenous CKIP-1 proteins, myogenin, and myosin heavy chain realised with 50 µg of total protein extracts of C2C12 myoblasts cultured in GM and induced to differentiate by culture in DM for up to 7 days. Time in DM is indicated in hours (h) and days (d). Loading was verified by immunoblotting for α -tubulin. CKIP-1, CKIP-1p28 and the 38 kD product are indicated by an arrow, an arrowhead and a star, respectively. Another band is also detected between CKIP-1 and the 38 kD product (double star).

(B) Schematic representation of the constructs corresponding to putative caspase cleavage products susceptible to correspond to the 38 kD product detected by anti CKIP-1 antibody. The caspase cleavage sites corresponding to these constructs are represented by dotted lines in the full length CKIP-1 protein (CKIP-1), and the corresponding aspartate residues are indicated. Among these potential caspase cleavage sites, D309 (RIQD₃₀₉) and D344 (SPPD₃₄₄) correspond to the sites described by Zhang *et al.* (Zhang et al., 2005); D73 (DLSD₇₃) and D146 (VEED₁₄₆) correspond to caspase-3 and caspase-6 consensus target sequences, DXXD and (V/I/L)EXD, respectively. CKIP-1 main domains are also depicted.

(C) Comparison of saponin extractability between CKIP-1 constructs shown in (B) and the endogenous 38 kD product. CKIP-1 constructs described in (B) were transfected in C2C12 myoblasts, and after 24 h in GM, cells were subjected to saponin preextraction (+) or not (-) before usual protein extract protocol was performed. Untransfected cells were grown in DM

for 72 h to allow the apparition of the 38 kD product and then cells were subjected to the same procedure. Protein extracts were separated by SDS-PAGE and CKIP-1 protein profiles were compared by anti CKIP-1 immunoblotting.

(D) Close comparison of apparent size between CKIP-1 140-408, CKIP-1 147-408, CKIP-1 156-408 constructs transfected in myoblasts grown in GM for 24 h and the endogenous 38 kD product present in C2C12 cells differentiated in DM for 72 h.

(E) Sequence alignment between mouse, human, chicken and zebrafish CKIP-1 amino acid sequences centred on the VEED₁₄₆ caspase-6 consensus cleavage site identified in mouse. Cleavage position is indicated by an arrow and the four amino acids defining the caspase cleavage site are underlined.

On (A, C, D) immunoblots, CKIP-1, CKIP-1p28, and the cleaved product are indicated by an arrow, an arrowhead, and a star respectively.

Figure 3: Intracellular localization and protein interactors of CKIP-1 proteins.

(A) Immunofluorescence for endogenous CKIP-1 proteins during muscle differentiation. Endogenous CKIP-1 proteins were detected with anti CKIP-1 antibody in proliferating C2C12 cells grown in GM and in differentiating C2C12 cells cultured in DM for 72 h. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 20 μ m.

(B) Distribution of endogenous CKIP-1 proteins in the nuclear (N), soluble (S) and particulate (P) fractions. Fractions were prepared from proliferating (GM) and differentiating (DM 72 h) C2C12 cells. A 50 μ g portion of each fraction was analyzed by immunoblotting using anti CKIP-1 antibody. Insulin receptor β (IR β) and histone H3 were also detected as markers of the particulate and nuclear fractions, respectively.

(C) Immunofluorescence for overexpressed CKIP-1 proteins. C212 cells were transfected with pcDNA3-CKIP-1 (CKIP-1), pcDNA3-CKIP-1 147-408 (CKIP-1 147-408) or pcDNA3-CKIP-1p28 (CKIP-1p28), fixed 24 h later and processed for immunodetection of overexpressed CKIP-1 proteins only, through a short 1 h incubation with anti CKIP-1 antibody. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 20 μ m.

(D) Co-immunoprecipitation experiments with CKIP-1-M2, CKIP-1 147-408-M2 and CKIP-1p28-HA. C2C12 cells were transfected with pcDNA3-CKIP-1-M2 (CKIP-1-M2), pcDNA3-CKIP-1 147-408-M2 (CKIP-1 147-408-M2) or pcDNA3-CKIP-1p28-HA (CKIP-1p28-HA) and cultured in GM for 20 h. Cells were serum-starved for 4 h and stimulated (+) or not (-) with 25 μ M insulin for 20 min. Protein extracts were then subjected to immunoprecipitation (IP) with anti M2 or anti HA antibodies. Immunoprecipitated proteins and inputs were

analyzed by immunoblotting for CKIP-1, ARPC2 and CP α proteins. The star next to input HA immunoblots localizes the residual signal due to previous immunoblot for ARPC2.

(E) Table recapitulating the intracellular localization and the known protein interactors of CKIP-1 proteins involved in actin cytoskeleton regulation. PM, plasma membrane; C, cytoplasm; N, nucleus.

Figure 4: CKIP-1p28 expression regulates *in vitro* muscle differentiation.

(A) Immunoblots for CKIP-1 proteins realised with 50 μ g of total protein extracts of C2C12/CKIP-1p28 myoblasts and C2C12 myoblasts cultured in growth medium (GM) and induced to differentiate by culture in differentiation medium (DM) for up to 3 days. Time in DM is indicated in hours. CKIP-1, CKIP-1p28 and the 38 kD product are indicated by an arrow, an arrowhead and a star, respectively.

(B) CKIP-1p28 downregulation by shRNA. Proliferating C2C12 cells were transfected with empty pRNAt vector (pRNAt) or pRNAt-shRNA (shRNA) and grown in GM for 48 h or 72 h. 50 μ g of total protein extracts from each condition were separated by SDS-PAGE and immunoblotted for CKIP-1. Loading was verified by immunoblotting for α -tubulin.

(C) CKIP-1p28 downregulation promotes myoblast fusion. C2C12 cells were transfected with empty pRNAt vector (pRNAt) or pRNAt-shRNA (shRNA), grown in GM for 72 h and induced to differentiate in DM for 72 h more. Cells were fixed, stained with DAPI and analyzed by epifluorescence microscopy to see all layers of the cell culture. Transfected cells expressed GFP. PC, Phase contrast.

(D) Mean number of nuclei per C2C12 transfected cell. C2C12 cells were transfected with empty pRNAt vector (pRNAt) or pRNAt-shRNA (shRNA) and treated as in (C). Nuclei were counted in 210 pRNAt-transfected C2C12 cells, and 153 shRNA-transfected C2C12 cells. Numbers above error bars indicate the percentage of differentiation, i.e., proportion of cells containing three or more nuclei. Error bar, S.E.

(E) CKIP-1p28 stable transfection alters cell migration in wound healing assay. Wound healing was monitored on C2C12 and C2C12/CKIP-1p28 cells as described in material and methods. Wound edges are localized by dashed lines on time 0 h and time 12 h pictures. Scale bar, 100 μ m.

Figure 5: CKIP-1 is cleaved during *in vivo* myogenesis.

(A) Immunoblot for endogenous CKIP-1 proteins performed with total protein extracts from various skeletal muscles. 100 μ g of total protein extracts from gastrocnemius (G), tibialis

anterior (TA), quadriceps (Q), biceps brachii (B), triceps brachii (T), pectoralis major/minor (P), rectus abdominus (A) from a 6 week old female OF1 mouse were analyzed by immunoblotting for CKIP-1 proteins. Loading was verified by immunoblotting for GAPDH.

(B) CKIP-1 proteins during skeletal muscle development *in vivo*. Total protein extracts from quadriceps dissected out from embryonic day (E) 14, 16 and 18 embryos and from mice at postnatal day (P) 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 were centrifuged at 1,500g for 12 min at 4°C to increase 43 kD product detection (see below, fig 5C). One hundred µg of proteins from the supernatant were separated by SDS-PAGE and immunoblotted for CKIP-1.

(C) Effect of cardiotoxin treatment on CKIP-1 proteins. Total proteins were extracted from tibialis anterior muscles collected from 6 week old female OF1 mice on the indicated days after injection of 100 µl of 10 µM cardiotoxin (CTX) or PBS (-).

On (A, B, C) immunoblots, CKIP-1, CKIP-1p28, and the 43 kD product are indicated by an arrow, an arrowhead and a star, respectively.

Figure 6: Intracellular localization of CKIP-1 proteins in adult skeletal muscle.

(A) Immunofluorescence for endogenous CKIP-1 proteins in adult skeletal muscle *in vivo*. Longitudinal cryosections of tibialis anterior muscle from 6 week old female OF1 mice were stained for CKIP-1 and markers of Z-lines (α -actinin) and triads (DHPR α , RyR). Thick bands centred on Z-lines and thin bands localized at M-lines were indicated by arrowheads and arrows, respectively.

(B) Localization of overexpressed CKIP-1p28 in adult skeletal muscle *in vivo*. Tibialis anterior muscles of a 5 week old female OF1 mouse were electroporated with CKIP-1p28-GFP, fixed 5 days later and longitudinally cryosectioned. Cryosections were stained for α -actinin. A thick band co-localizing with Z-line and a thin band localized at M-line were indicated by an arrowhead and an arrow, respectively. (A) and (B), scale bars, 5 µm.

(C) Purification of skeletal myofibrils. (a) Coomassie Blue staining of SDS gel representing skeletal muscle fractions obtained during isolation of myofibrils. Each lane was loaded with 50 µg of proteins and the proteins were separated by SDS-PAGE. H, homogenate; S1, supernatant fraction of the homogenate (buffer I wash); P1, pellet of the homogenate; S2, supernatant of the buffer II wash; P2, pellet of the buffer II wash; S3, supernatant of the Triton X-100 (buffer III) wash; P3, pellet of the Triton X-100 wash; MF, the isolated myofibrils washed with the suspension buffer. The mobility of myosin and actin is indicated. (b) Immunoblots for CKIP-1, α -actinin and CP α of skeletal muscle fractions obtained from (a).

Figure 7: Intracellular localization of overexpressed CKIP-1-Cherry in adult skeletal muscle.

Co-stainings of CKIP-1-Cherry with different endogenous skeletal muscle proteins. Tibialis anterior muscles of 5 week old female OF1 mice were electroporated with CKIP-Cherry, fixed 5 days later and cryosectionned. Longitudinal (a, c-k) and transversal (b, l-q) cryosections were stained for markers of Z-lines (α -actinin [c-e]) and triads (DHPR α [f-h, l-n] and RyR [i-k, o-q]). Scale bars, 20 μ m in (a, b) and 5 μ m in (c-q).

Figure 8: CKIP-1-Cherry overexpression in adult muscle induces membrane accumulation.

(A) Strong CKIP-1-Cherry stainings in CKIP-1-Cherry overexpressing muscles. Tibialis anterior muscles of 5 week old female OF1 mice were electroporated with CKIP-1-Cherry, fixed 5 days later and cryosectionned. Longitudinal cryosections were analyzed by confocal microscopy. Scale bars, 50 μ m in (a) and 25 μ m in (b).

(B) Ultrastructural defects in CKIP-1-Cherry overexpressing muscles. Tibialis anterior muscles of 5 week old female OF1 mice were electroporated with Cherry (a, b) or CKIP-1-Cherry (c-h) and processed for transmission electron microscopy 5 days later. (a, b) Cherry-overexpressing muscles show normal ultrastructural organization as assessed by the regular sarcomeric structure and the normal position and shape of T-tubules (arrows). The picture in (a) shows peripheral regions of two neighbouring muscle fibers. (c-h) CKIP-1-Cherry-overexpressing muscles show membrane accumulations next to the plasma membrane (arrowhead) (c, d). These membrane accumulations (double arrows) are often close to disorganized sarcomeres (arrows) (e, f), whereas more deeply in the fiber, sarcomeres are regularly aligned but some T-tubules appear to be enlarged (arrows) (g, h). (b, d, f) are magnifications of (a, c, e). Scale bars, 2 μ m in (a, c, e, g) and 1 μ m in (b, d, f, h).

Figure 9: CKIP-1-induced membrane accumulations are composed of plasma and intracellular membranes.

(A) CKIP-1-induced membrane accumulations are composed of plasma membrane. Tibialis anterior muscles of 5 week old female OF1 mice were electroporated with CKIP-1-Cherry, fixed 5 days later and cryosectionned. Longitudinal (upper panels) and transversal (lower panels) cryosections were stained with WGA-TRITC and analyzed by confocal microscopy. Scale bars, 10 μ m.

(B) Plasma membrane is only a small portion of CKIP-1-induced membrane accumulations. Tibialis anterior muscles of 5 week old female OF1 mice were electroporated with Cherry (a) or CKIP-1-Cherry (b) and processed, 5 days later, for transmission electron microscopy using potassium ferrocyanide as a selective staining procedure for T-tubules (a, and b upper panels) and ruthenium red as a selective staining procedure for plasma membrane (b lower panels). Scale bars, 1 μm for (a) and left panel in (b), and 0.5 μm for right panel in (b).

(C) CKIP-1-induced membrane accumulations are composed of intracellular membranes. Tibialis anterior muscles of 5 week old female OF1 mice were co-electroporated with CKIP-1-Cherry and one of the following constructs: EGFP, EGFP-Rab4, EGFP-Rab5, EGFP-Rab7, EGFP-Rab8 and EGFP-Rab11. Electroporated muscles were fixed 5 days later, and longitudinally cryosectioned. Cryosections were analyzed by confocal microscopy. Scale bars, 20 μm .

Figure 10: CKIP-1 downregulation slows down transferrin internalization.

(A) Effect of CKIP-1 siRNAs on CKIP-1 and TfR protein levels. C2C12 myoblasts were transfected with scramble (Scr) or CKIP-1 siRNA1, 2 or 3 as described in material and methods and total protein extracts were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting for CKIP-1 and TfR. Loading was verified by immunoblotting for α -tubulin. (a) A representative result is shown. (b) The densities of CKIP-1 and TfR bands were quantified using ImageJ software and normalized against α -tubulin. Results from four individual experiments were averaged. Error bar, S.E. *, $p < 0.01$ in two tailed Student's t test.

(B) Effect of CKIP-1 siRNAs on transferrin internalization. C2C12 myoblasts were transfected as in (A) and subjected to transferrin internalization assay as described in material and methods. At each time point, the percentage of cells presenting a perinuclear transferrin aggregation was determined.

Figure 1

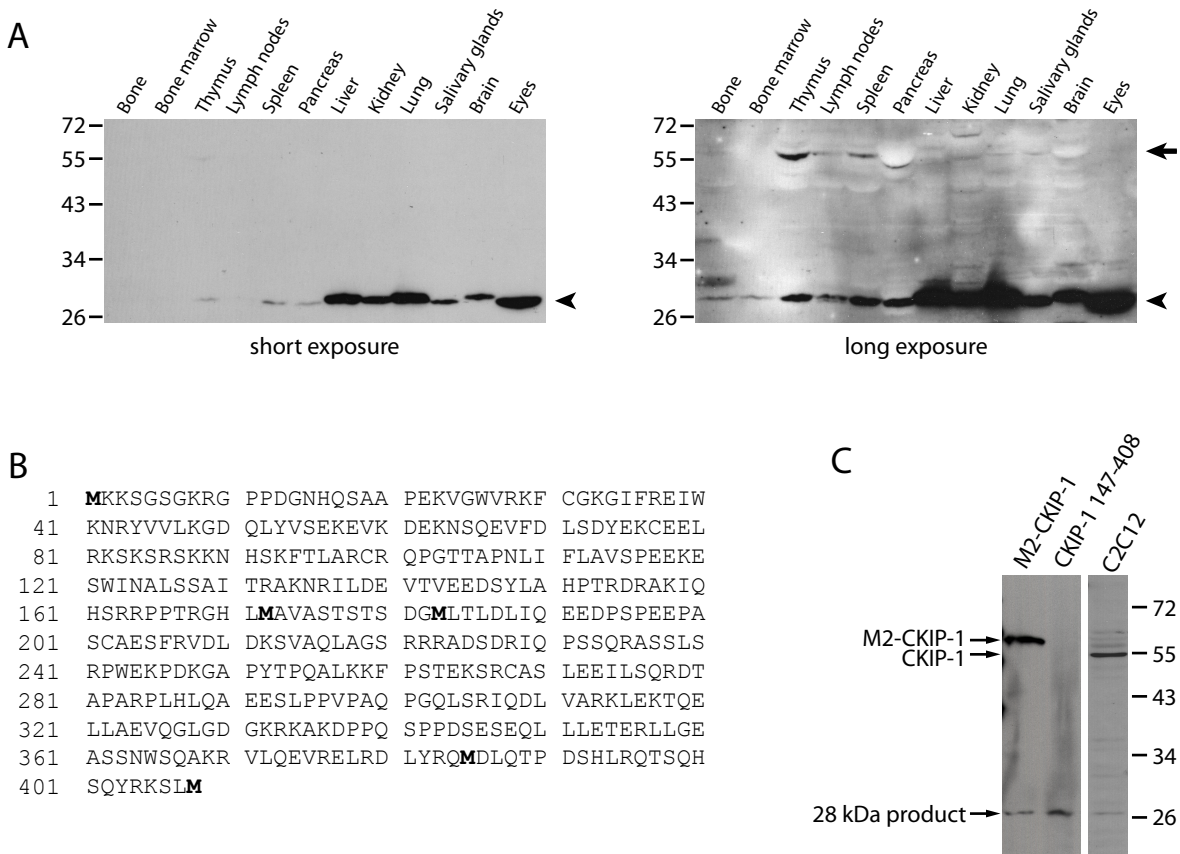


Figure 2

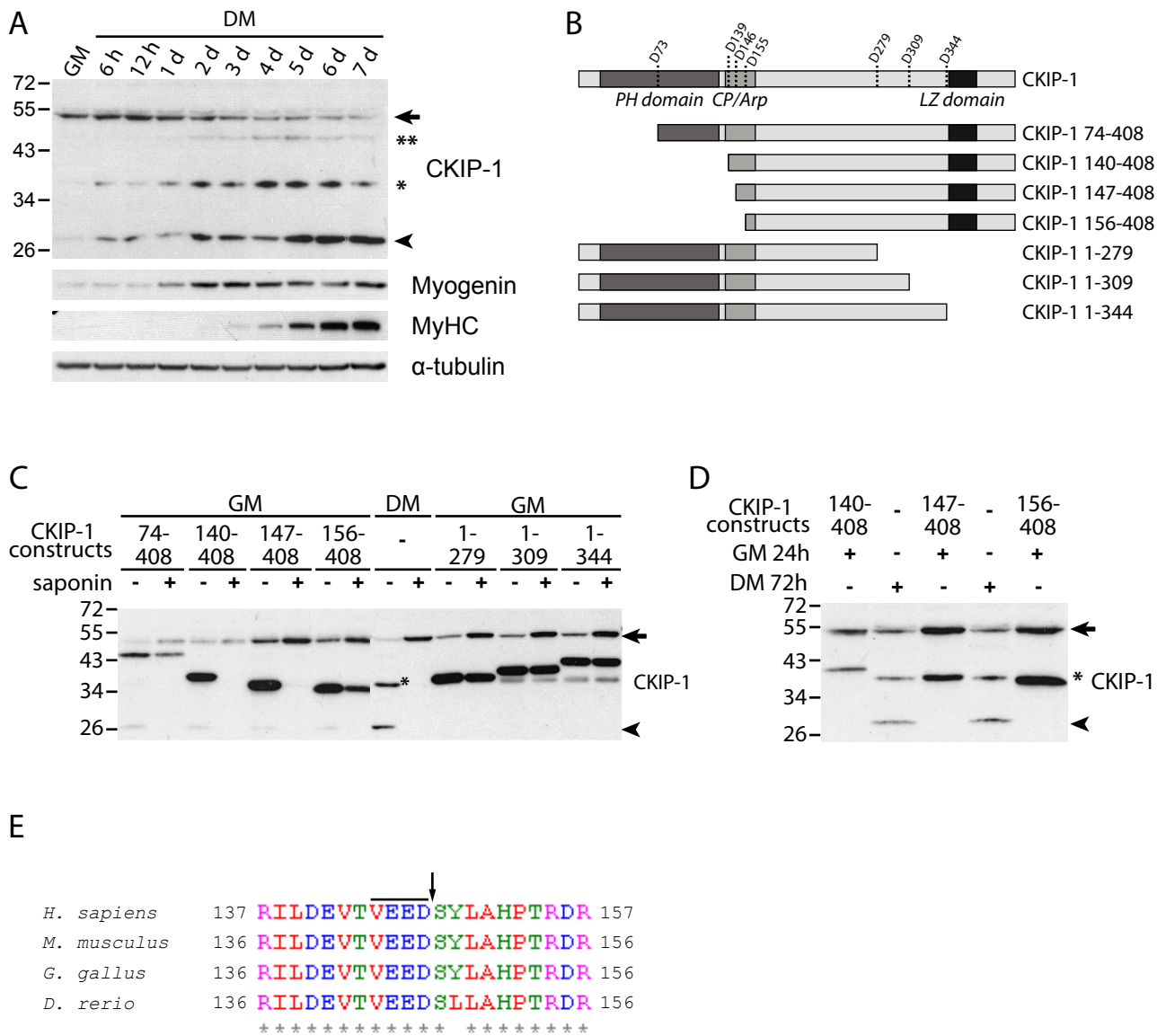
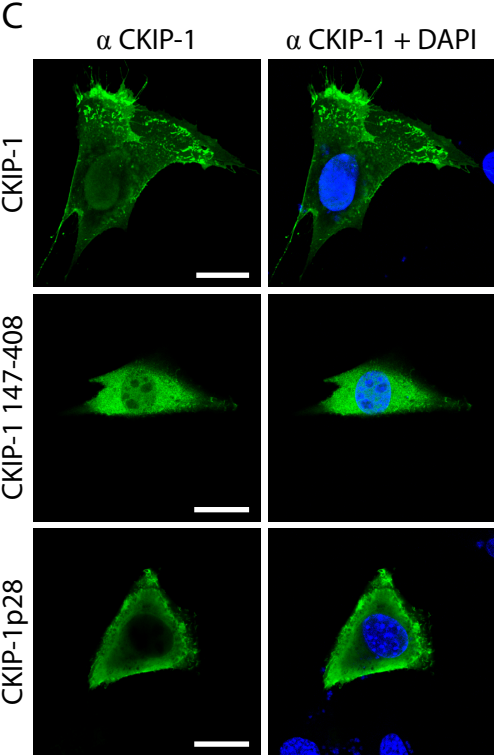
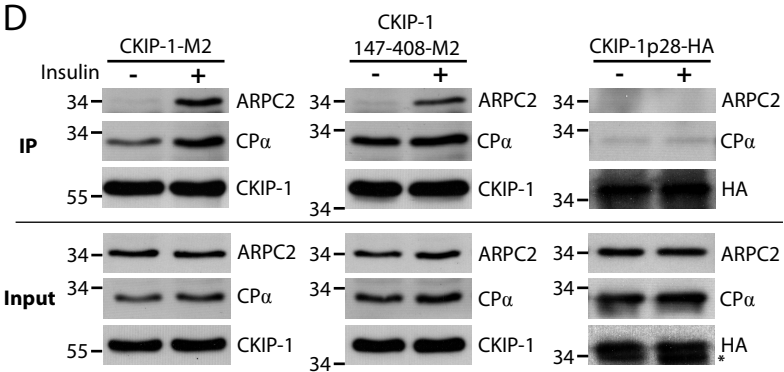
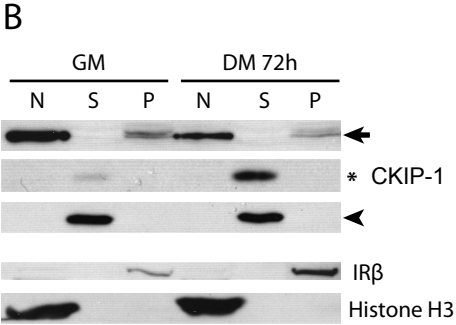
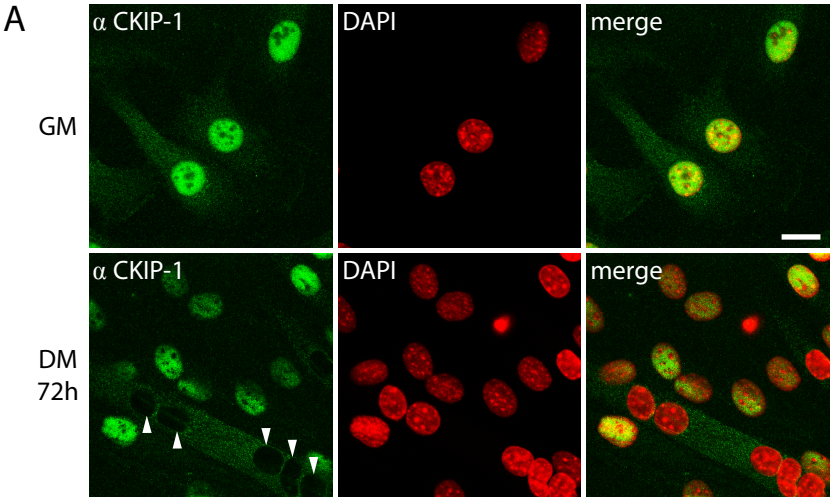


Figure 3



E

	Intracellular localization			Protein interactors	
	PM	C	N	Arp	CP
CKIP-1	+	-	+	+	+
CKIP-1 147-408	-	+	-	+	+
CKIP-1p28	-	+	-	-	-

Figure 4

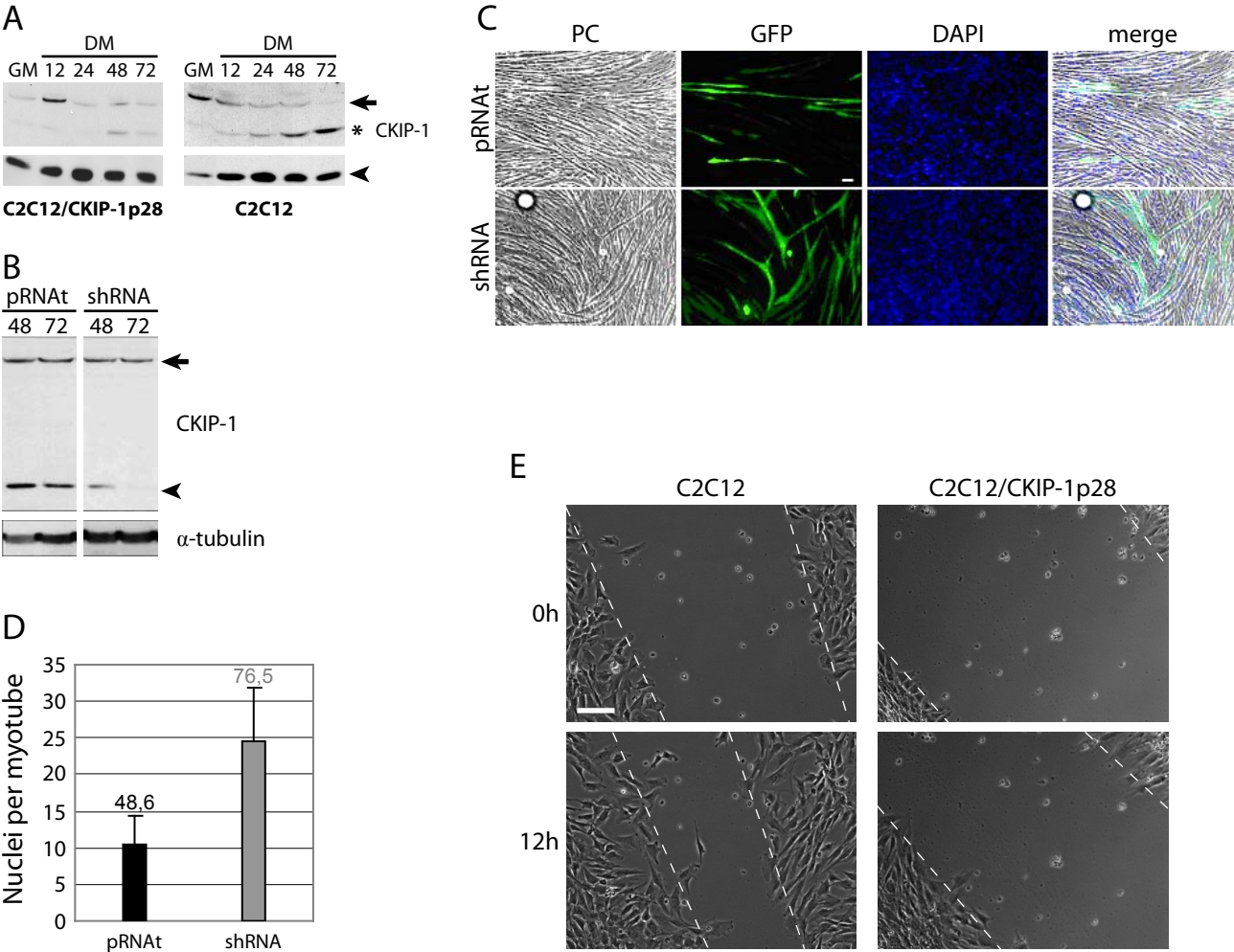


Figure 5

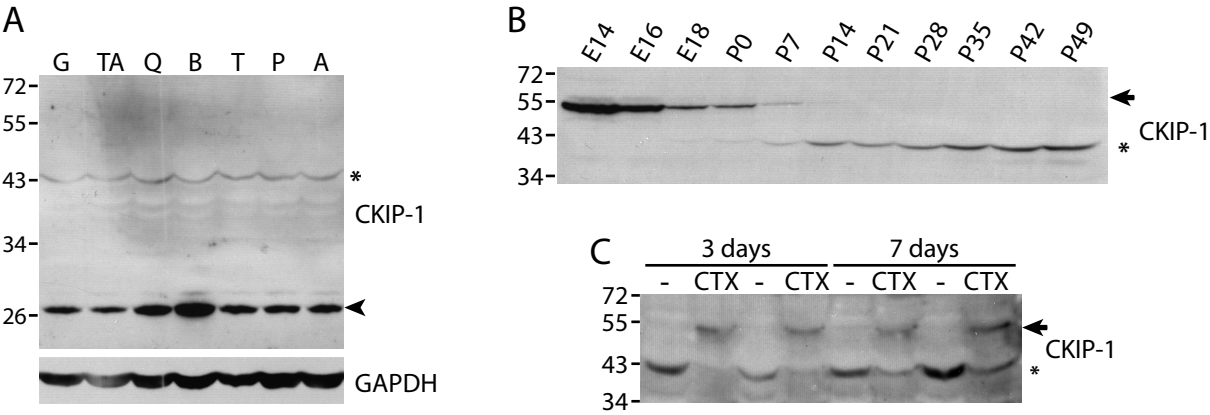


Figure 6

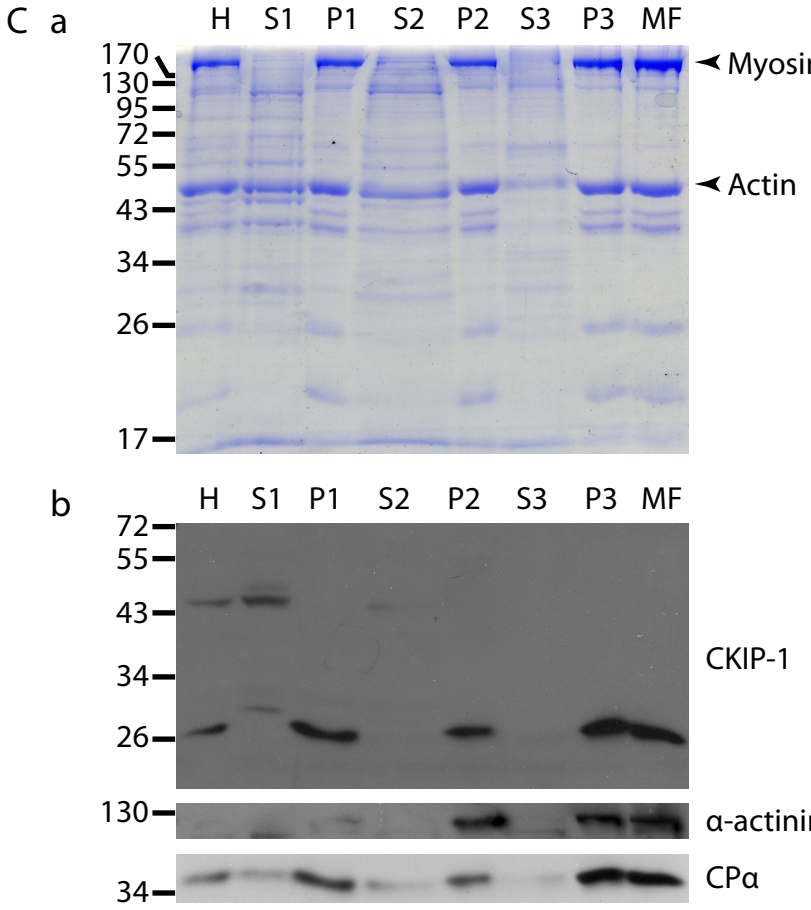
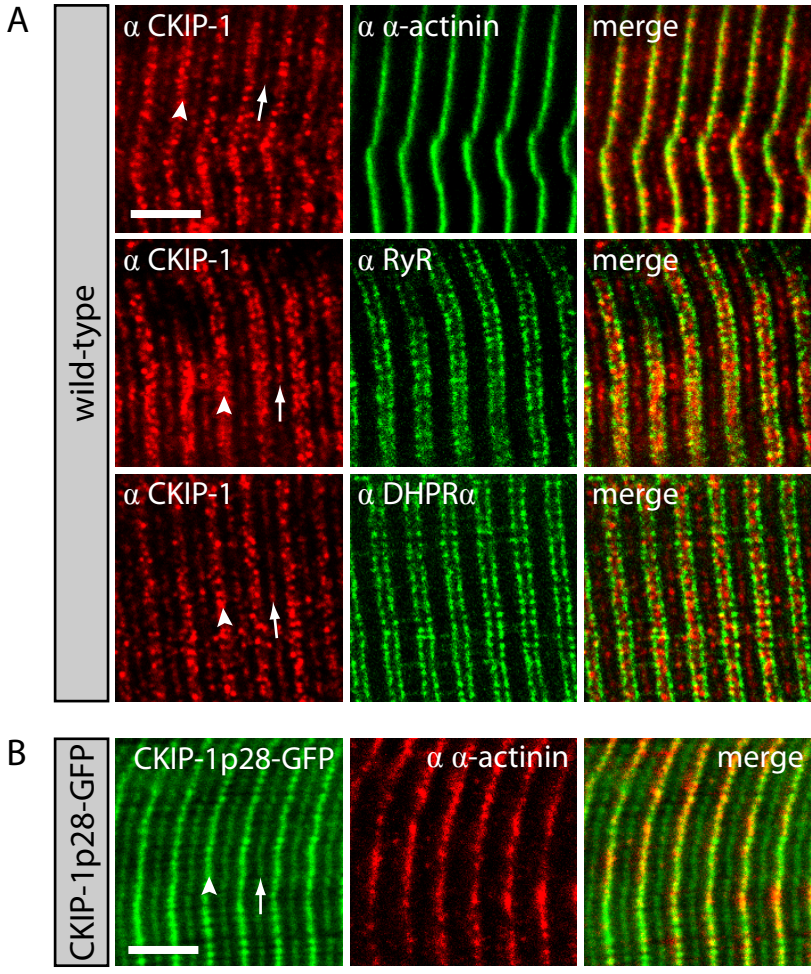


Figure 7

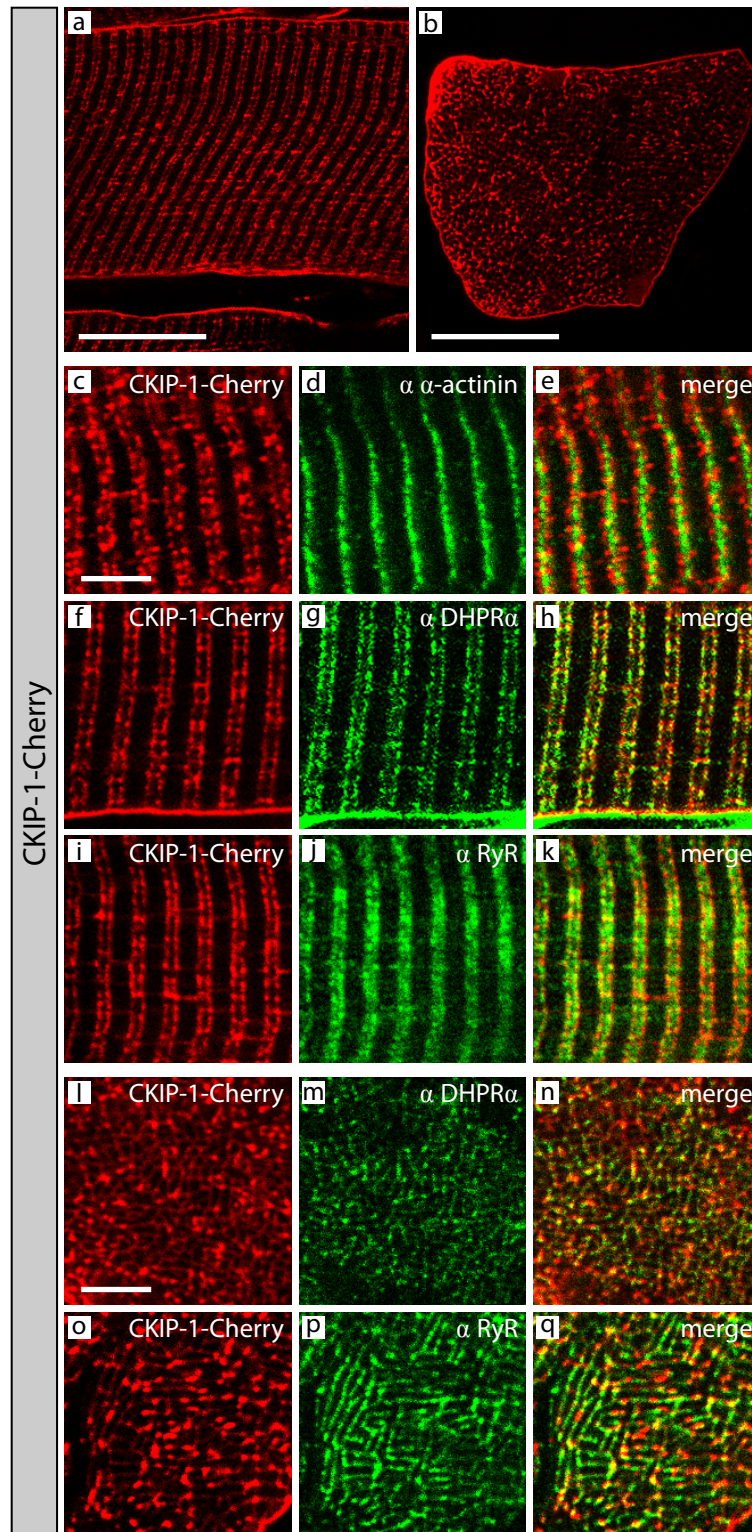


Figure 8

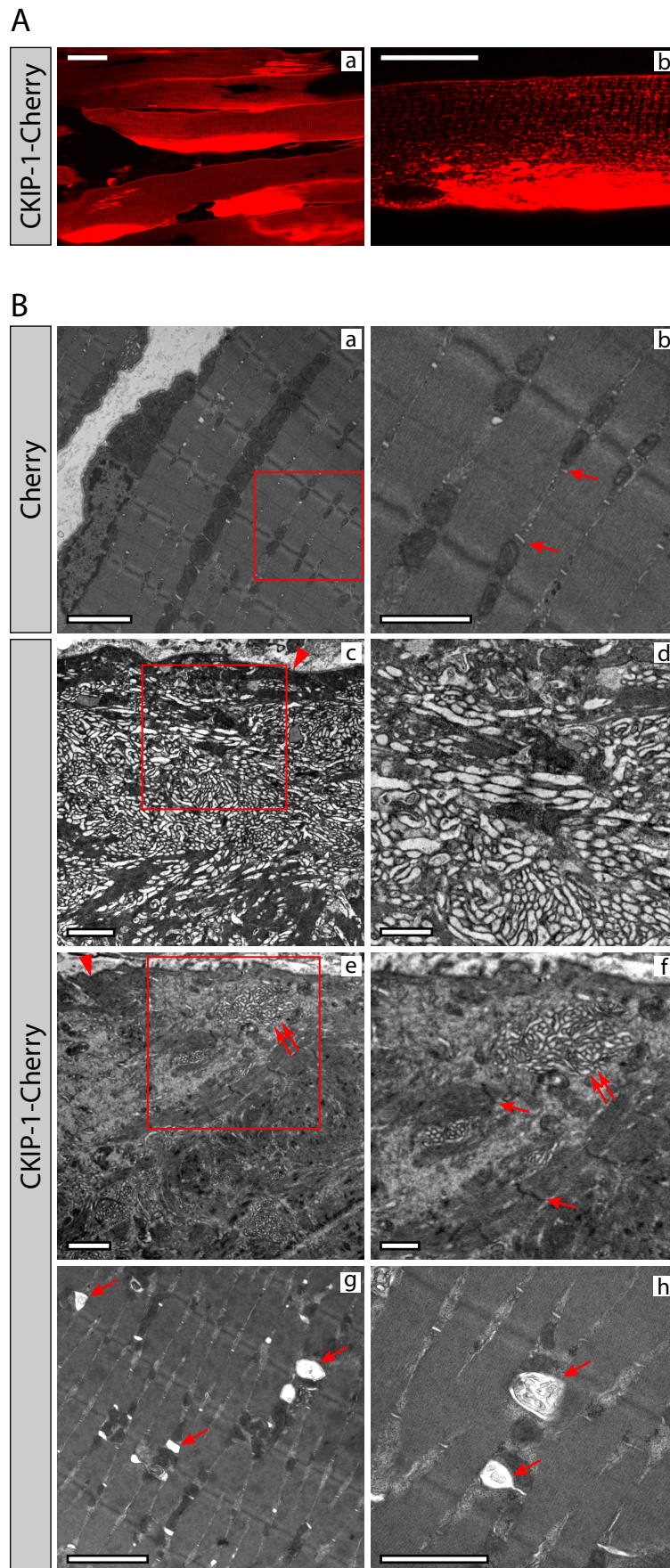
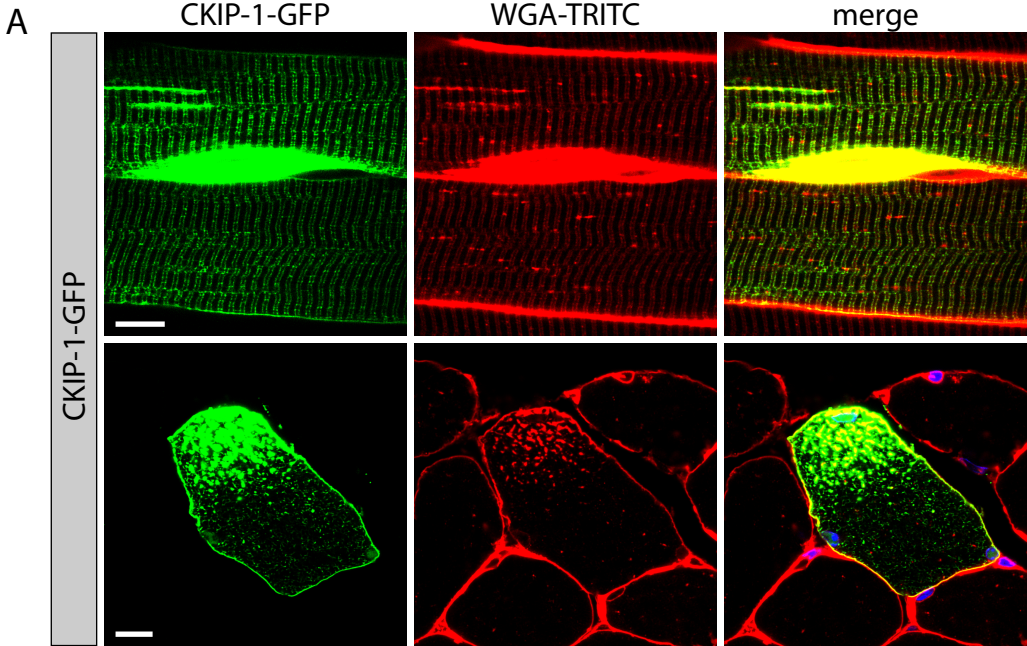


Figure 9



B

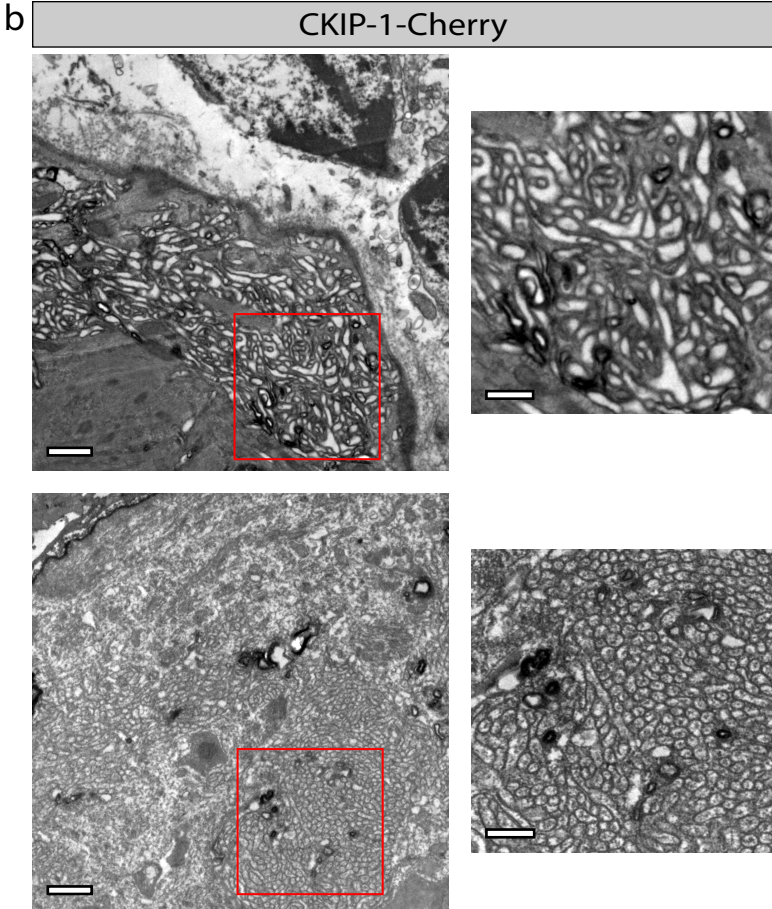
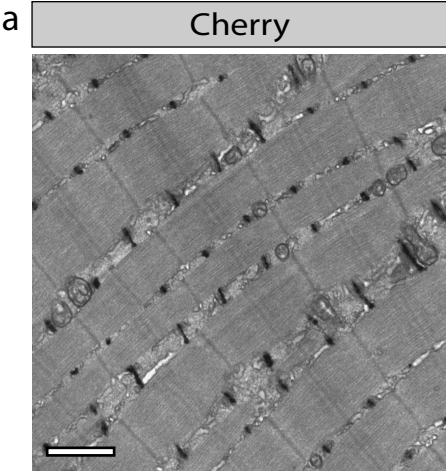


Figure 9 C

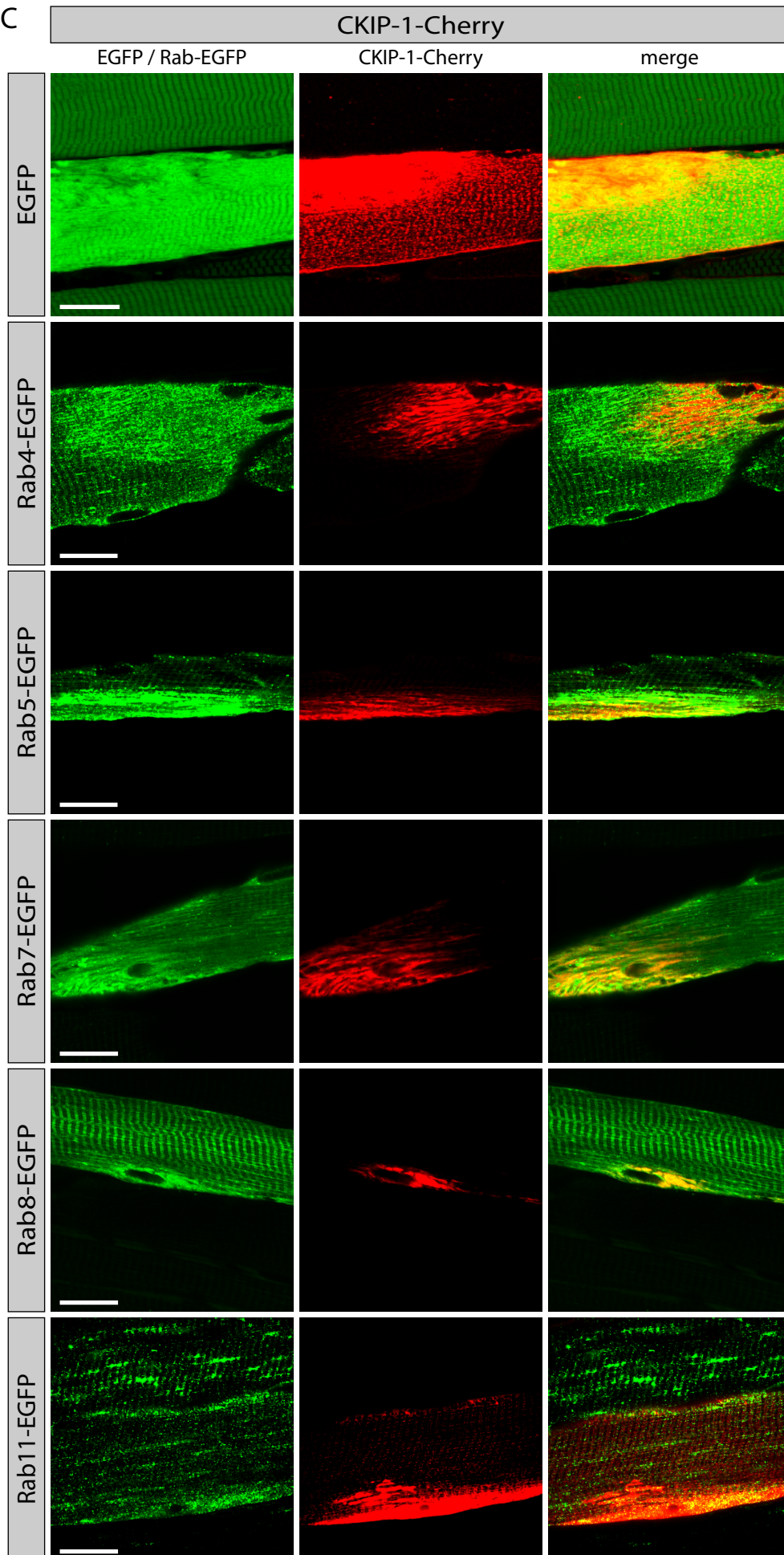
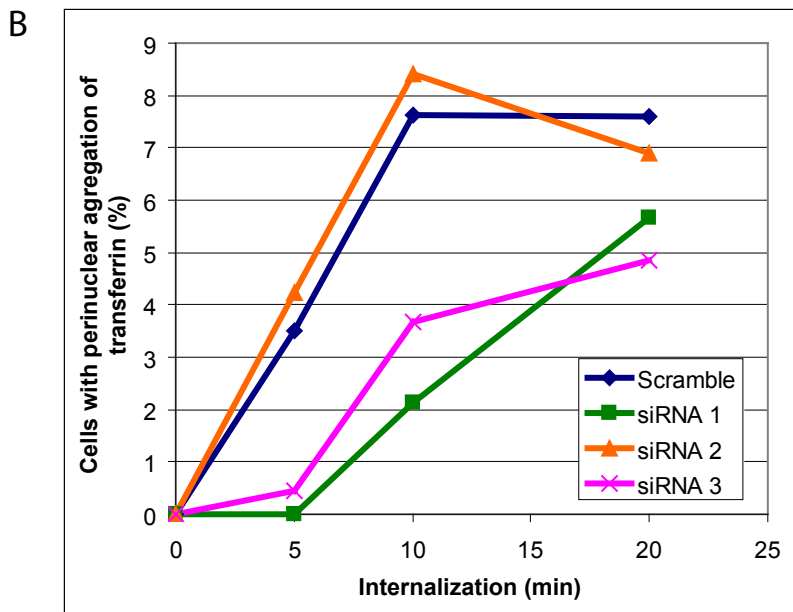
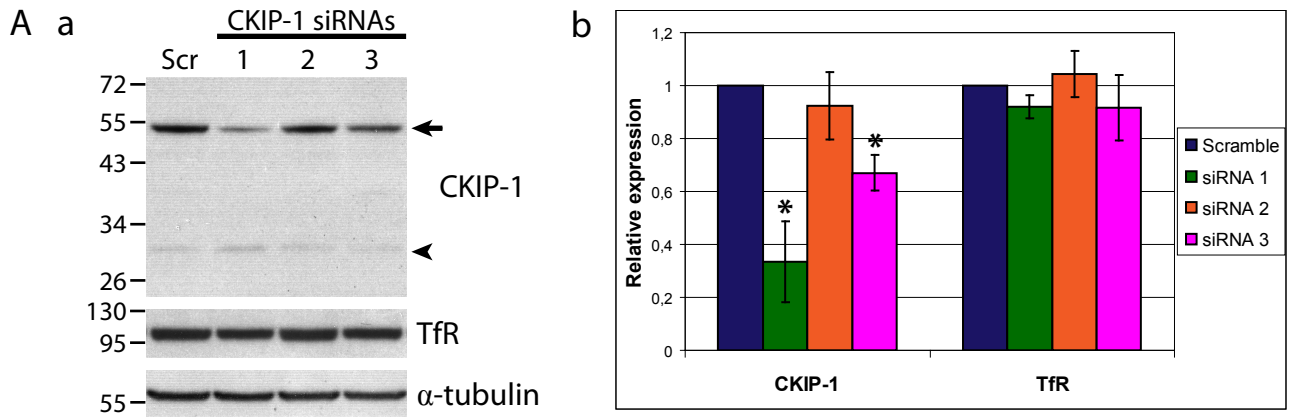


Figure 10



SUPPLEMENTARY DATA

LEGENDS TO SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary figure S1: CKIP-1 28 kD product in tumor cell lines.

Total protein extracts from breast (A), liver (B), and kidney (C) tumor cell lines were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting for CKIP-1. C2C12 cell protein extracts were loaded as positive controls (C, extreme right lane). Among the 32 tumor cell lines that were tested, 30 presented a band at 28 kD, and for 26 of them, this 28 kD band was the main band detected by our rabbit polyclonal anti CKIP-1 antibody.

Supplementary figure S2: Characterization of *Ckip-1* mRNAs.

To determine whether CKIP-1 and CKIP-1p28 are translated from the same mRNA, the transcription start nucleotides of *Ckip-1* mRNAs were mapped by RNase protection assays (A,B) and RNA circularization assay (C).

(A,B) Mapping of *Ckip-1* mRNAs transcription start nucleotides by RNase protection assays.

(A) Localization of the probes used in RNase protection assays on a theoretical complete *Ckip-1* mRNA. *Ckip-1* ORF (open reading frame) is flanked by 5' and 3' UTR (untranslated region) (striped rectangles). The sequences coding for the PH domain, the Arp/CP binding domain, and the LZ domain are coloured in dark grey, light grey and black, respectively. The rest of the coding sequence is coloured in lighter grey. The positions of the first and second ATG, leading to the production of CKIP-1 and CKIP-1p28, respectively, are indicated as well as the position of the stop codon. The parts of *Ckip-1* mRNAs covered by the three genomic probes are also presented.

(B) RNase protection assays. Total mRNA from C2C12 cells in GM (C2C12 GM), grown to confluence (C2C12 confluent), and differentiated for 5 days in DM (C2C12 DM5) were hybridized with probe 1 (b), probe 2 (c), subjected to RNase digestion and products were resolved on 5% denaturing polyacrylamide gels. tRNA were used as negative controls. Numbers on the left of each band correspond to the approximate deduced position of transcription initiation (transcription initiations located upstream the first ATG codon are in blue, while those downstream are in pink). MW, molecular weights.

These experiments showed that, whatever culture conditions are, C2C12 cells transcribe the same *Ckip-1* mRNAs (compare C2C12 GM, C2C12 confluent, and C2C12 DM5 for each probe). However, two main populations of mRNAs were detected, one starting between nucleotide positions -76 and -56 before the first ATG codon, and another one that starts

downstream of the first ATG codon, between nucleotide positions +118 and +128 (see b and c). This second population of mRNAs probably encodes CKIP-1p28.

(C) Mapping of *Ckip-1* mRNAs transcription start nucleotides by RNA circularization.

RNA circularization consists in ligating the 5' and 3' ends of a single mRNA. The junction is then cloned and sequenced allowing the determination of nucleotides present at the very ends of mRNAs. The nucleotide sequence of the 5' ends of RNA molecules were determined using circularized lots of RNAs of proliferating C2C12 cells. The graph shows the relative abundance of transcripts initiated at the indicated positions. This experiment confirmed the presence of two populations of *Ckip-1* mRNAs: one starting upstream the first ATG codon (blue points), and the other one starting downstream the first ATG codon (pink points). The major transcription start site of the first *Ckip-1* mRNA population is at position -47, while the second *Ckip-1* mRNA population mostly starts at positions +38 and +108.

Both approaches delivered consistent results suggesting that CKIP-1p28 is generated by a different mRNA population starting after the first ATG codon.

Supplementary figure S3: *In vitro* 38 kD product and *in vivo* 43 kD product are not the results of alternative exon splicing.

In vitro 38 kD product and *in vivo* 43 kD product can not be the result of translation from an alternative start codon, as CKIP-1p28, since translation from one of the three remaining methionine residues (M183, M385, M408) would produce proteins smaller than CKIP-1p28 (fig 1B). We thus tested whether they could be splice variants.

(A) Schematic representation of unspliced *Ckip-1* pre-mRNA. Exons (Ex), introns and 5'/3'UTR are represented as boxes, solid lines and dashed lines, respectively. The regions encoding the PH domain, the LZ domain and the rest of the protein are colored in dark grey, black and light grey, respectively. The first ATG codon (used for CKIP-1 synthesis) and the second ATG codon (used for CKIP-1p28 synthesis) are indicated. The position and orientation of PCR oligonucleotide primers are shown, and the line above exon 6 (Ex6) localizes the 15 peptides recognized by our rabbit polyclonal antibody on the corresponding amino acid sequence.

(B) Table recapitulating the theoretical sizes of putative RT-PCR products obtained with F1-R6b, F1-R3, F1-R4, F2-R4, F2-R5, F3-R5, F3-R6a primer pairs, with or without exon splicing. The mentioned primers are those described in (A).

(C) RT-PCR product migrations. mRNA were extracted from proliferating C2C12 cells grown in GM (GM), differentiating C2C12 cells grown in DM for 72 h (DM), tibialis anterior

muscle (TA) and soleus muscle (S) from a 6 week old female OF1 mouse as described in material and methods. mRNAs were reverse transcribed with random hexamers and subjected to PCR with the indicated primer pairs. For each tested primer pair (except F1-R6b), the theoretical positions of PCR products without (arrows) and with (arrowheads) exon splicing are indicated according to the values determined in (B). In each condition, only one RT-PCR product was detected and it migrated at a position corresponding to unspliced mRNA. For F3-R5 primer pair, a weaker band was visible at ~140 bp. This band might correspond to the splicing of exon 4, even though it seemed a bit too high since the theoretical size is 107 bp. Moreover, exon 4 splicing was also tested with F2-R5 and F3-R6a primer pairs which did not reveal any band lower than the one corresponding to the unspliced mRNA. The weaker band detected in RT-PCR with F3-R5 was therefore likely to be an aspecific PCR product, confirming that, *in vitro* or *in vivo*, Ckip-1 mRNAs did not undergo alternative exon splicing.

Supplementary figure S4: Effect of saponin preextraction on relative enrichment of different intracellular proteins.

Protein extracts from proliferating C2C12 cells preextracted (+) or not (-) with saponin were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting for CKIP-1, membrane-bound (insulin receptor β , IR β), nuclear (Histone H3) and cytosolic (GAPDH) proteins. Saponin preextraction induced an enrichment of membrane-bound and nuclear proteins, while cytosolic proteins were almost completely lost. CKIP-1 (arrow) was enriched by saponin preextraction. The effect of saponin preextraction on CKIP-1p28 could not be assessed here since proliferating myoblasts presented a nearly undetectable CKIP-1p28 expression (arrowhead).

Supplementary figure S5: The observed higher molecular weight of *in vivo* cleavage product as compared to *in vitro* cleavage product is not due to phosphorylation.

Supernatants of total protein extracts from 6 week old mouse tibialis anterior muscle centrifuged at 1,500g for 12 min at 4°C were incubated (+) or not (-) with SAP and analyzed by SDS-PAGE and western-blotting. Efficacy of the shrimp alkaline phosphatase (SAP) treatment was assessed by immunoblotting for P-Akt Ser473. Dephosphorylation did not have any effect on the 43 kD product showing either that this product is not phosphorylated *in vivo* or that its dephosphorylation does not affect its migration.

Supplementary figure S6: Exogenous CKIP-1 is not cleaved in adult muscle *in vivo*.

Six tibialis anterior muscles of 5 week old female OF1 mice were co-electroporated with pmCherry-N1 vector and empty pcDNA3 vector (pcDNA3), pcDNA3-M2-CKIP-1 vector (M2-CKIP-1) or pcDNA3-CKIP-1-M2 vector (CKIP-1-M2). Cherry expressing fibers were isolated under an epifluorescence microscope. Total protein extracts from electroporated fibers were centrifuged at 1,500g for 12 min at 4°C to increase 43 kD product detection (see figure 5C). One hundred µg of proteins from the supernatant were separated by SDS-PAGE and immunoblotted for CKIP-1. Loading was verified by immunoblotting for α-tubulin. Line corresponding to protein extracts from muscles overexpressing M2-CKIP-1 or CKIP-1-M2 displayed one intense band migrating at about 55 kD which corresponded to M2-flag tagged CKIP-1. But, apart this band corresponding to full length overexpressed CKIP-1, neither an additional band nor an increase in the intensity of the 43 kD band was observed in M2-flag tagged CKIP-1-overexpressing muscle extracts as compared to extracts from muscles electroporated with empty pcDNA3 vector, showing that exogenous CKIP-1 is not cleaved.

Supplementary figure S7: CKIP-1 intracellular localization and CKIP-1-induced membrane accumulations are dependent on CKIP-1 capacity to bind membrane.

(A) Schematic representation of Cherry fusion proteins overexpressed in muscles in this study. CKIP-1 main domains are depicted. *Myr*, v-Src myristoylation sequence.

(B) Intracellular localization and capacity to induce membrane accumulations of overexpressed CKIP-1 mutants in adult skeletal muscle. Tibialis anterior muscles of 5 week old female OF1 mice were electroporated with CKIP-1-Cherry (a, b), CKIP-1-ΔPH-Cherry (c, d), PH_{CKIP-1}-Cherry (e, f) or Myr-CKIP-1-ΔPH-Cherry (g, h), fixed 5 days later and cryosectioned. Longitudinal cryosections were analyzed by confocal microscopy. Membrane accumulations are indicated by arrowheads. Scale bars, 5 µm in (a, c, e, g) and 50 µm in (b, d, f, h).

CKIP-1 binding to membrane is required for its intracellular localization and for the induction of membrane accumulations.

Supplementary figure S8: CKIP-1-induced membrane accumulations are composed of intracellular membranes.

Tibialis anterior muscles of 5 week old female OF1 mice were co-electroporated with Cherry or CKIP-1-Cherry and one of the following constructs: EGFP, EGFP-Rab4, EGFP-Rab5,

EGFP-Rab7, EGFP-Rab8 and EGFP-Rab11. Electroporated muscles were fixed 5 days later, and longitudinally cryosectioned. Cryosections were analyzed by confocal microscopy.

(A) Intracellular localization of CKIP-1-Cherry (left panel) and Cherry (right panel) was determined by Z-disk staining with anti α -actinin antibodies.

(B) Comparison of Rab protein intracellular localization in fibers overexpressing CKIP-1-Cherry (left panel) or Cherry (right panel).

In the absence of membrane accumulation, EGFP-Rab proteins were all localized at the I band in Cherry but also in CKIP-1-Cherry overexpressing muscles, as shown by α -actinin / Cherry or CKIP-1-Cherry co-localizations on one hand (A), and EGFP-Rab / Cherry or CKIP-1-Cherry co-localizations on the other hand (B).

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

RNA isolation and analysis

RNAs from muscle tissues were extracted with TRI Reagent[®] (SIGMA-ALDRICH[®]). 10 mg of muscle were lysed in TRI Reagent[®] with FastPrep[®]-24 (20s at 4m/s, twice with ceramic beads, Lysing Matrix D, MP Biomedicals[™]). Lysed muscle was incubated for 5 min at 30°C and centrifuged at 20,000g for 5 min at room temperature. The supernatant was vigorously mixed to chloroform, incubated for 15 min at 30°C and centrifuged at 12,000g for 15 min at room temperature. RNAs in the aqueous phase were then isopropanol precipitated, washed with 70% ethanol and resuspended in water. RNAs from cell culture were extracted with the NucleoSpin[®] RNA II kit (MACHEREY-NAGEL) according to the manufacturer's instructions.

The resulting RNAs were reverse transcribed into cDNA using random hexamers and RevertAid[™] H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. cDNAs were amplified by PCR using the Platinum[®] Taq DNA polymerase (Invitrogen[™]) and the following primer oligonucleotides: F1, 5' CGCCATGAAGAAGAGCGGCT 3'; F2, 5' CGGATGGAAACCATCAGTCT 3'; F3, 5' ATCCAAGAGCAGGAGCAAGA 3'; R3, 5' CCTGCTCTTGATTCCGGA 3'; R4, 5' GGCGTTGATCCATGACTCCT 3'; R5, 5' GTAGGGTGGGCAAGATAGCT 3'; R6a, 5' AGCTCTCAGCACAAAGAGGCT 3'; R6b, 5' TCACATCAGGCTCTTCCGGT 3'.

For RNase protection assays, probes were synthesized as follows. The positions of probes relative to A of the ATG initiation codon numbered + 1 were: 1, (-52 to +314); 2, (-796 to +105). 5'UTR-cDNA fragments corresponding to these probes were amplified with the following primers: 1F, 5' ATACTCGAGCGGCTAGCACGAGCCGCCGA 3', 1R, 5' GTGG TGCCCGGCTGTCTGCA 3'; 2F, 5' ATACTCGAGTTCTTGATAAATTCTCTCCCA 3'; 2R, 5' ATTTAGGTGACACTATAGAATACAATCCCTTCCCGCAGAATTT 3'. PCR products were subcloned into pGEM-T vector and sequenced. After pGEM-T vector linearization, [³²P]UTP-labelled RNA probes (1.5 - 105 dpm/ng) were generated by *in vitro* transcription using the SP6 or T7 riboprobe system (Promega) depending on the orientation of the fragment. Hybridization (carried out overnight with 1 ng of labelled probe and 10 µg of total RNA at 65°C) and RNase treatment were performed with the RPAII kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. Products were resolved on 5% denaturing polyacrylamide gels that were dried and autoradiographed.

For RNA circularization, the protocol was adapted from (Mandl et al., 1991). Cytoplasmic RNA (5 µg) was treated for 1 h with 10U of calf intestine phosphatase (New England

Biolabs) to prevent subsequent circularization of incomplete RNA molecules. Complete mRNAs were then uncapped through incubation with 1U of tobacco acid pyrophosphatase (Fermentas) for 1 h and finally circularized with 80U of RNA ligase (Promega). Each enzyme was successively removed by phenol–chloroform extraction. All circularized RNAs were submitted (1) to reverse transcription with a coding sequence specific primer (5' TTGCTCCTGCTCTTGGATTT 3'), (2) to PCR with the primers 5' CTGGAGACAGAGAG GCTGCT 3' and 5' CTCGGAGACGTAGAGCTGGT 3', and (3) to Nested-PCR with the primers 5' GACCTCCCAGCACAGTCAAT 3' and 5' CACCACATAGCGGTTTTTCC 3'. The Nested-PCR products were subcloned into the pGEM-T vector and sequenced.

Protein dephosphorylation

Muscle was splitted in two parts. The first one was homogenized in extraction buffer devoid of phosphatase inhibitors and centrifuged at 1,500g for 12 min at 4°C to remove myofibrillar proteins. 50 µg of proteins from the supernatant are incubated with 10U of SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) for 2 h at 37°C in a final volume of 50 µl. The other part of the muscle was treated the same way but with phosphatase inhibitors and without SAP. Both extracts were then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Figure S1

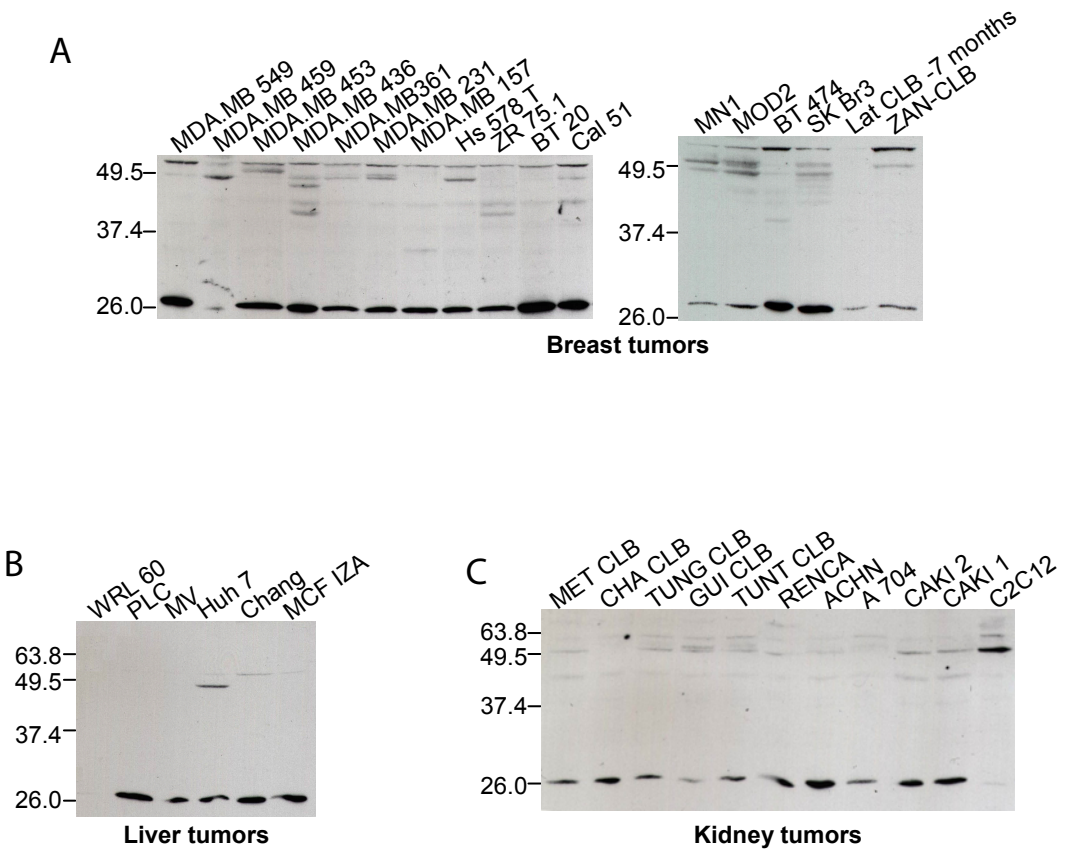


Figure S2

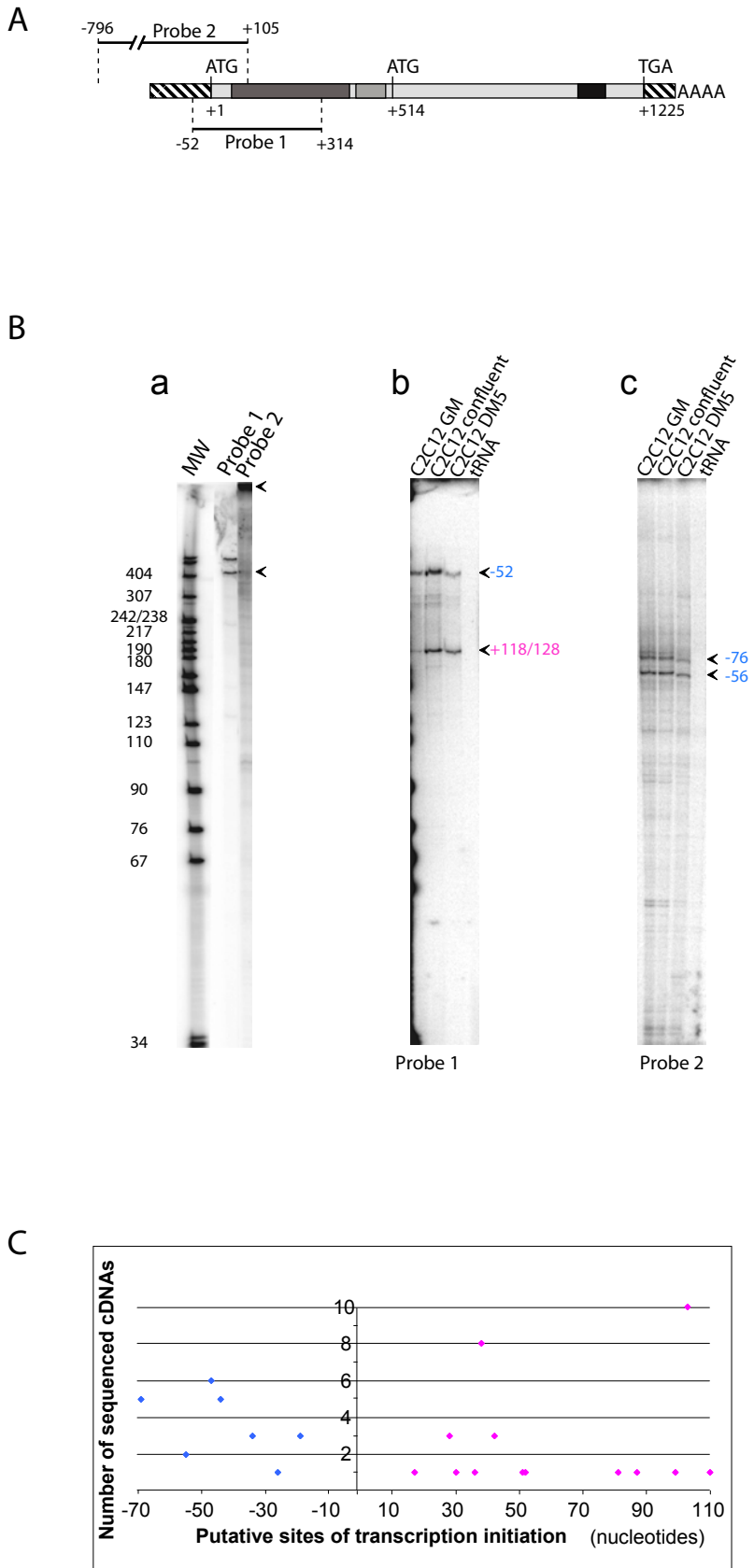
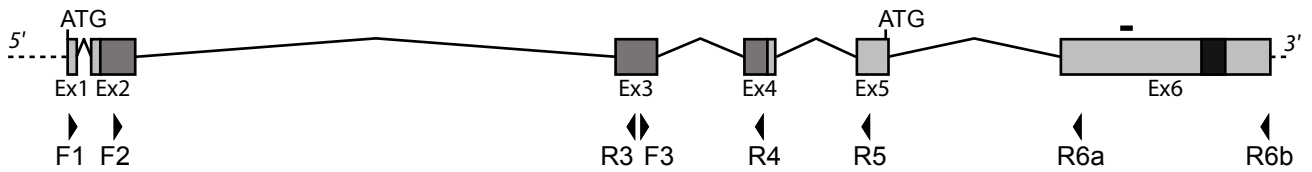


Figure S3

A



B

Number of spliced exons	0	1					2					3			4	
Spliced exons #	∅	2	3	4	5	2;3	2;4	2;5	3;4	3;5	4;5	3;4;5	2;4;5	2;3;5	2;3;4	2;3;4;5
RT-PCR product size with F1 - R6b primer pair (in bp)	1231	1084	1090	1126	1129	943	979	982	985	988	1024	883	877	841	838	736
RT-PCR product size with F1 - R3 primer pair (in bp)	262	115														
RT-PCR product size with F1 - R4 primer pair (in bp)	379	232	238			91										
RT-PCR product size with F2 - R4 primer pair (in bp)	340		199													
RT-PCR product size with F2 - R5 primer pair (in bp)	423		282	318					177							
RT-PCR product size with F3 - R5 primer pair (in bp)	212			107												
RT-PCR product size with F3 - R6a primer pair (in bp)	371			266	269						164					

C

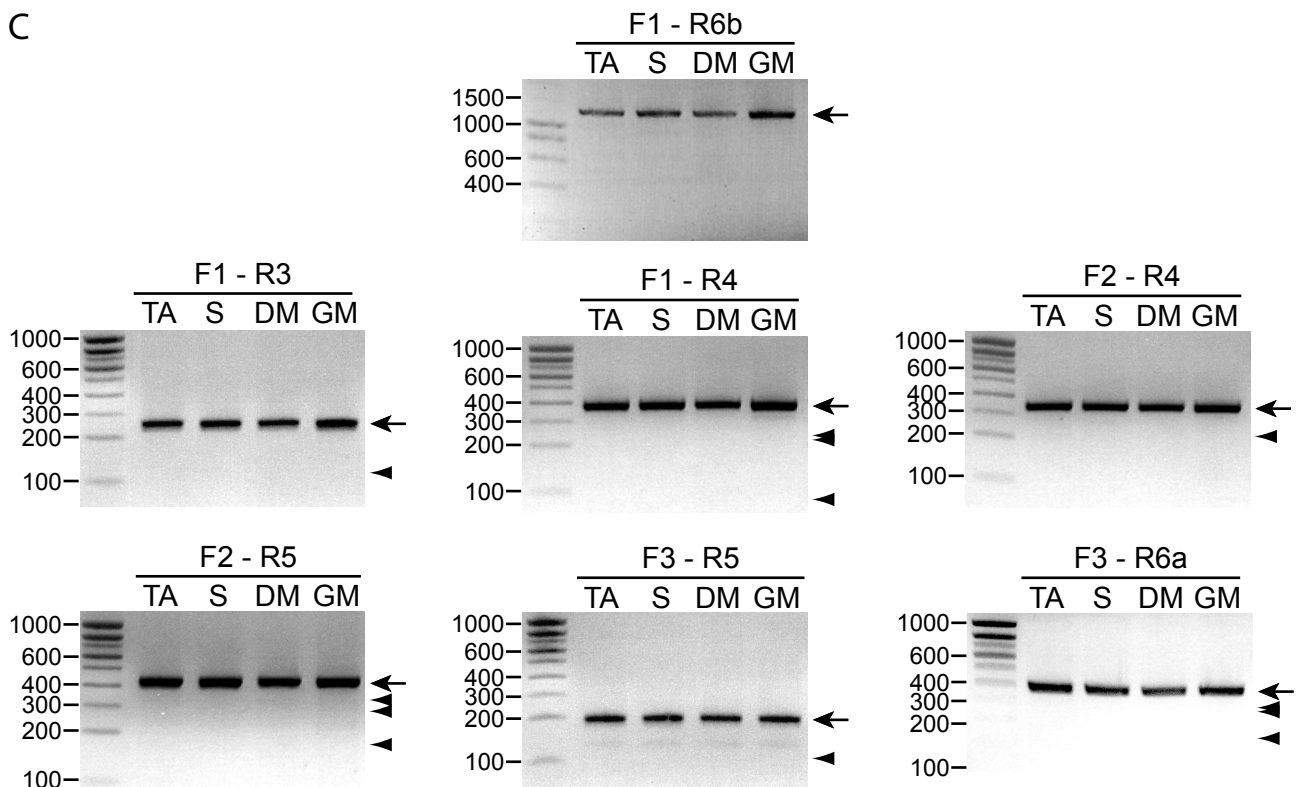


Figure S4

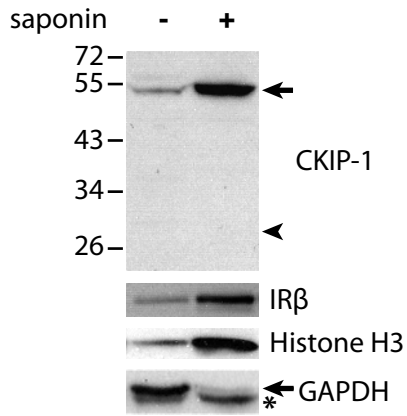


Figure S5

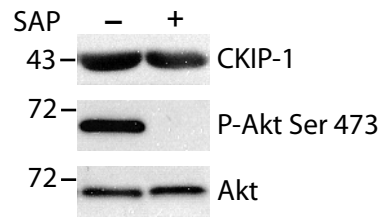


Figure S6

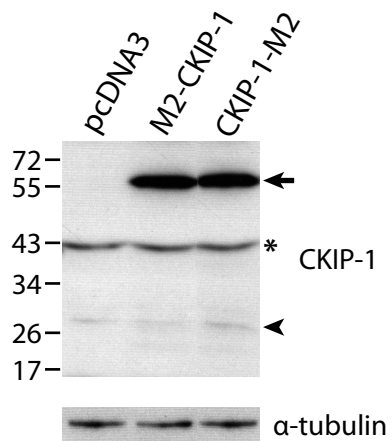


Figure S7

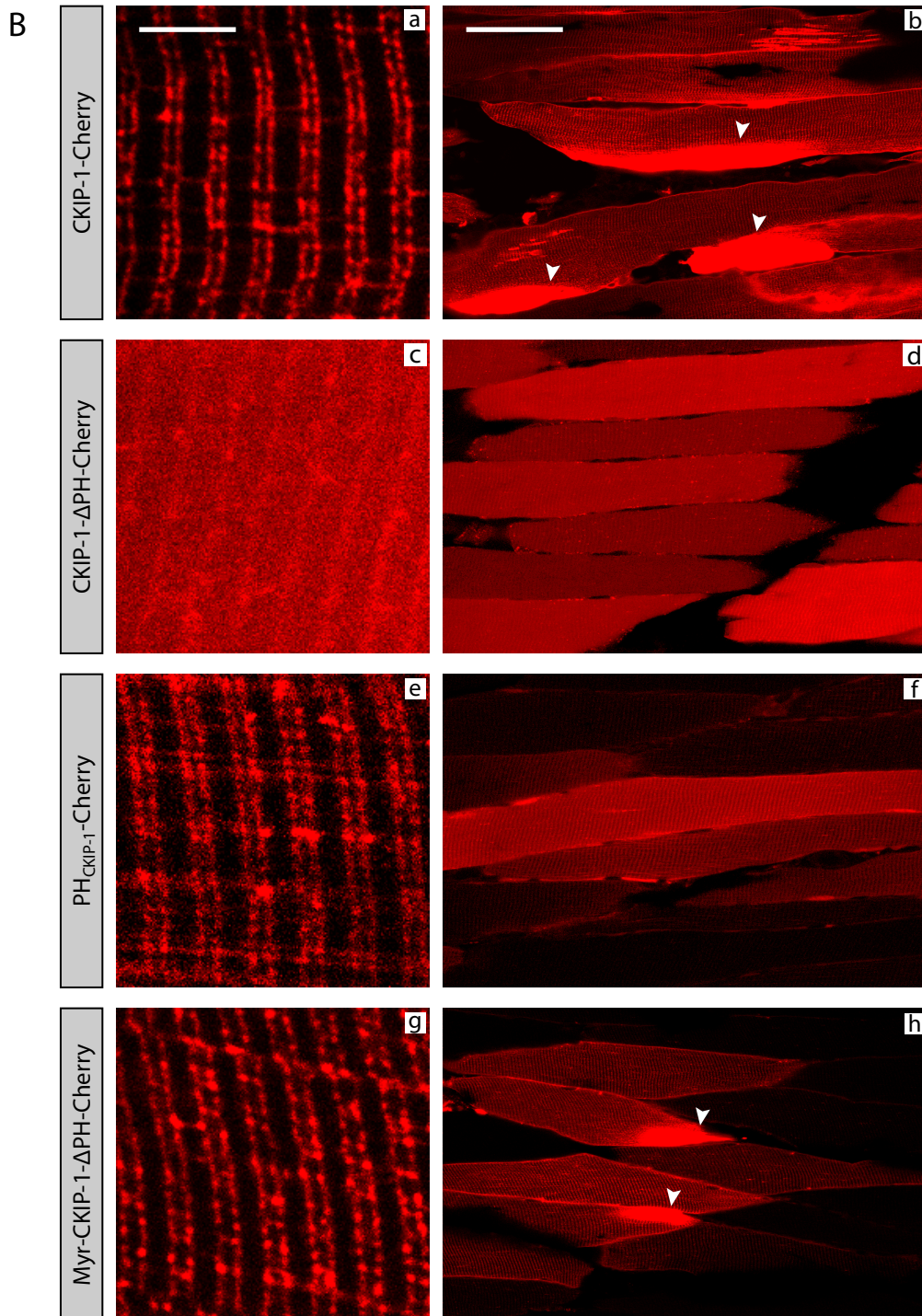
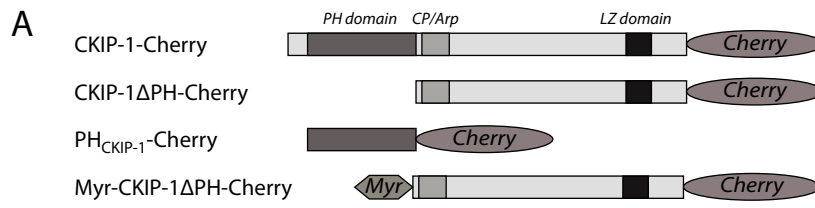
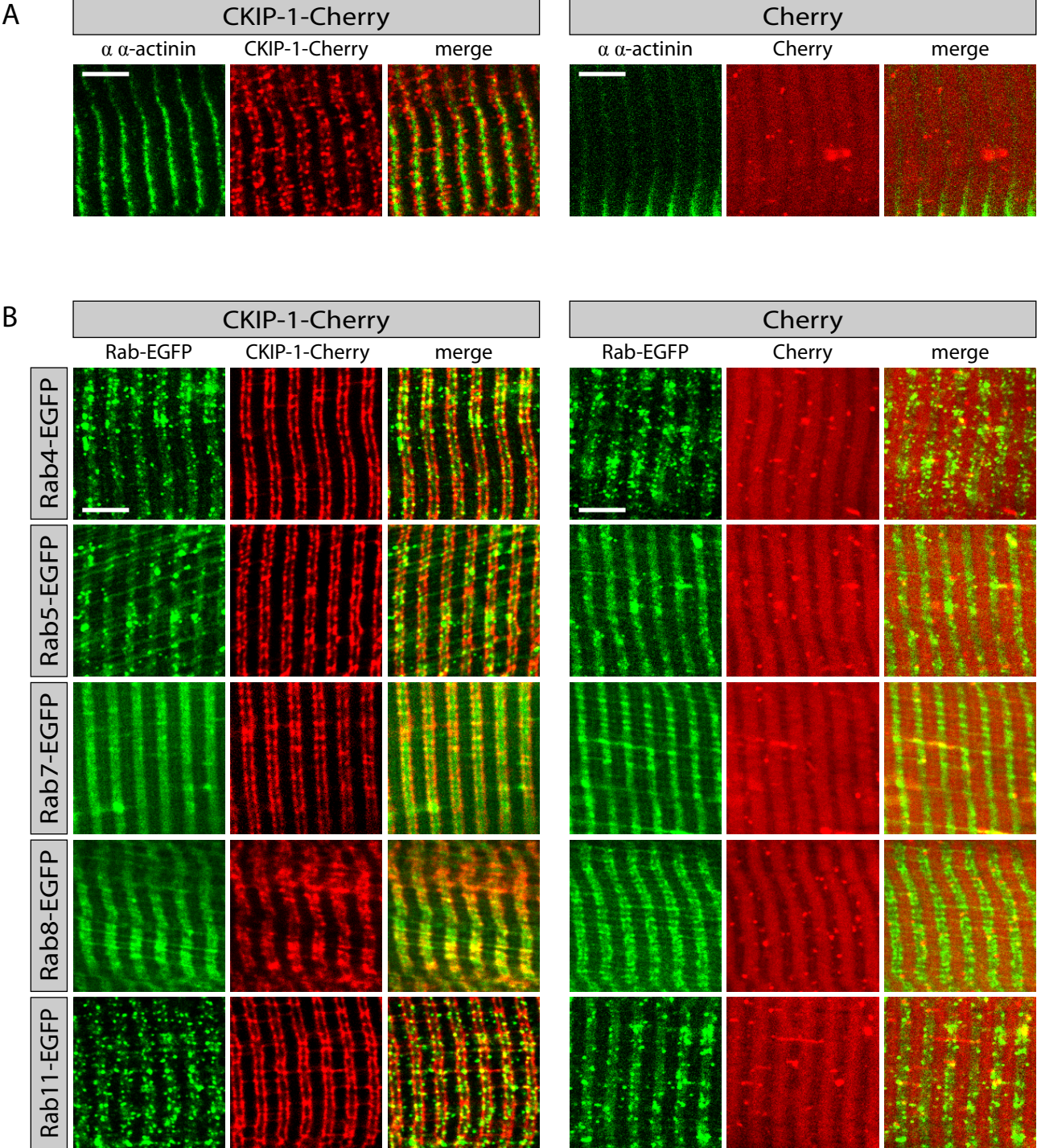


Figure S8



III/ Preuves supplémentaires en faveur d'un rôle de CKIP-1 dans le remodelage des membranes des cellules musculaires

INTRODUCTION

Au cours des deux premières parties de la section résultats de ce manuscrit, nous avons montré d'une part que CKIP-1 est impliquée dans la formation de protrusions membranaires, la migration des myoblastes *in vitro*, et leur fusion *in vivo*. D'autre part, des expériences de surexpression *in vivo* et d'inhibition de l'expression *in vitro* ont révélé que CKIP-1 est également impliquée dans le trafic intracellulaire (2^{ème} partie des résultats de ce manuscrit). L'ensemble des résultats que nous avons obtenu montre que CKIP-1 intervient dans ces différents processus par l'intermédiaire de ses aptitudes à remodeler le cytosquelette d'actine, et les membranes situées à proximité, en se complexant avec les protéines CP $\alpha\beta$ et le complexe Arp2/3. Au cours de cette partie, je vais essayer d'apporter de nouveaux arguments en faveur de l'implication de CKIP-1 dans le remodelage du cytosquelette d'actine et des membranes en analysant par immunofluorescence deux processus dont le déroulement est basé sur le remodelage du cytosquelette et des membranes : la fusion des myoblastes et la cytodivision.

La fusion des myoblastes a été étudiée de manière extensive *in vitro* dans les cultures cellulaires de myoblastes et *in vivo* chez la drosophile. Dans ces deux modèles, l'entrée en contact des myoblastes est suivie par une accumulation d'actine filamenteuse et de certains de ses régulateurs tels que le complexe Arp2/3, WASP, ou encore WAVE au niveau de la zone d'accolement des membranes plasmiques (Gildor et al., 2009; Kim et al., 2007; Massarwa et al., 2007; Vasyutina et al., 2009). L'importance du cytosquelette d'actine dans l'étape de fusion a été démontrée par le fait que l'inhibition chimique du remodelage des filaments d'actine bloque la formation des myotubes (Nowak et al., 2009). Puis des vésicules intracellulaires s'accumulent à leur tour au site de contact entre les myoblastes. La fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique est à l'origine de l'ouverture d'un pore de fusion entre les deux myoblastes. La formation du pore de fusion et son extension sont elles-aussi sous la dépendance du cytosquelette d'actine (Gildor et al., 2009).

Le second processus qui va être observé ici est la cytodivision. Celle-ci correspond à l'étape finale de la mitose qui assure la séparation physique des deux cellules filles après répartition équitable du matériel génétique de la cellule mère. Au cours de la cytodivision, un anneau contractile d'actomyosine (actine et myosine) se forme dans le plan équatorial de la

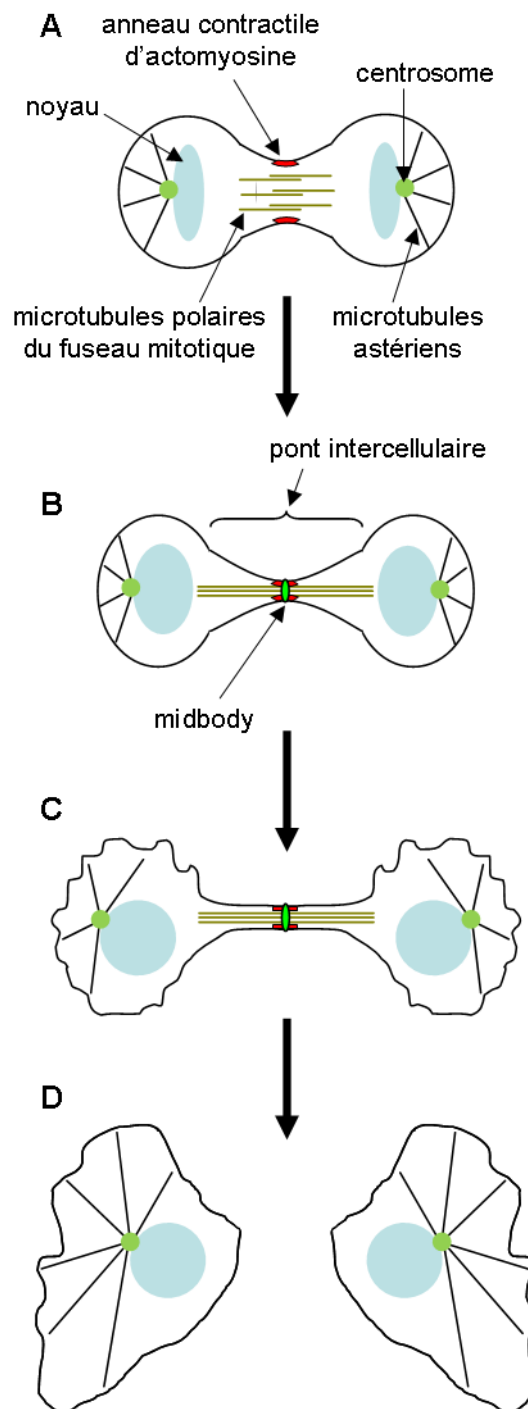


Figure 1 : Les principales étapes de la cytotiérèse

Après séparation équitable du matériel génétique entre les deux futures cellules filles, un anneau d'actomyosine se forme sous la membrane plasmique dans le plan équatorial de la cellule (A). La constriction de cet anneau réduit la zone de communication entre les deux cellules à un pont cytoplasmique au centre duquel les microtubules polaires du fuseau mitotique s'organisent en fuseaux qui forment des interdigitations au niveau du midbody (B). Tandis que les cellules perdent progressivement leur forme sphérique en ré-adhérant au substrat, le pont cytoplasmique devient de plus en plus fin (C). Enfin la séparation physique des deux cellules filles survient à proximité du midbody : c'est l'abscission (D).

cellule (Figure 1). La constriction de cet anneau creuse un sillon entre les deux cellules filles qui sont alors reliées par une structure étroite : le pont cytoplasmique. Celui-ci contient des faisceaux de microtubules antiparallèles formant des interdigitations dans une région centrale dense aux électrons appelée le « *midbody* ». La rupture du pont cytoplasmique constitue l'étape finale de la cytodierèse qui aboutit à la séparation des deux cellules filles ou abscission. Le trafic vésiculaire joue un rôle primordial, quoique pour l'instant assez mal compris, dans l'étape d'abscission. En effet, après la formation du pont cytoplasmique, de nombreuses vésicules intracellulaires s'accumulent au niveau du *midbody*. Parmi ces vésicules se trouvent notamment des vésicules positives pour la GTPase Rab11 spécifique des endosomes de recyclage (Fielding et al., 2005). De manière intéressante, l'inhibition de l'expression de Rab11 bloque spécifiquement l'étape d'abscission démontrant l'importance du trafic intracellulaire dans la cytodierèse (Wilson et al., 2005).

Cette étude se bornera à une analyse descriptive de la localisation de CKIP-1 pendant ces deux processus.

RESULTATS

CKIP-1 s'accumule aux sites de fusion entre myoblastes *in vitro*.

Nous avons montré que la modulation de l'expression de CKIP-1 dans les myoblastes C2C12 affecte leur capacité à former des myotubes. Ainsi la surexpression de CKIP-1 induit la formation de gros myotubes contenant un plus grand nombre de noyaux que les myotubes formés à partir de myoblastes contrôles (Safi et al., 2004). En revanche, l'inhibition de l'expression de *Ckip-1* par morpholino oligonucléotides antisens dans des embryons de poissons zèbres est à l'origine de défauts de fusion des précurseurs des fibres rapides (1^{ère} partie des résultats de ce manuscrit). Ainsi, les fibres rapides des embryons morphants *Ckip-1* possèdent un nombre réduit de noyaux par rapport aux embryons injectés avec le morpholino oligonucléotide contrôle. Ces résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* montrent l'implication de CKIP-1 dans l'étape de fusion des myoblastes en myotubes ou en fibres musculaires plurinucléés. Afin d'affiner notre compréhension des mécanismes par lesquels CKIP-1 intervient au cours de la fusion, j'ai cherché à déterminer sa localisation intracellulaire pendant cette étape. Dans ce but, des myoblastes C2C12 surexprimant M2-CKIP-1 ont été analysés par immunofluorescence après avoir été cultivés 48 h en milieu de différenciation. Après 48 h de différenciation, les myoblastes se sont alignés comme le prouve l'observation du réseau d'actine : les filaments d'actine marqués par la phalloïdine présentent tous une

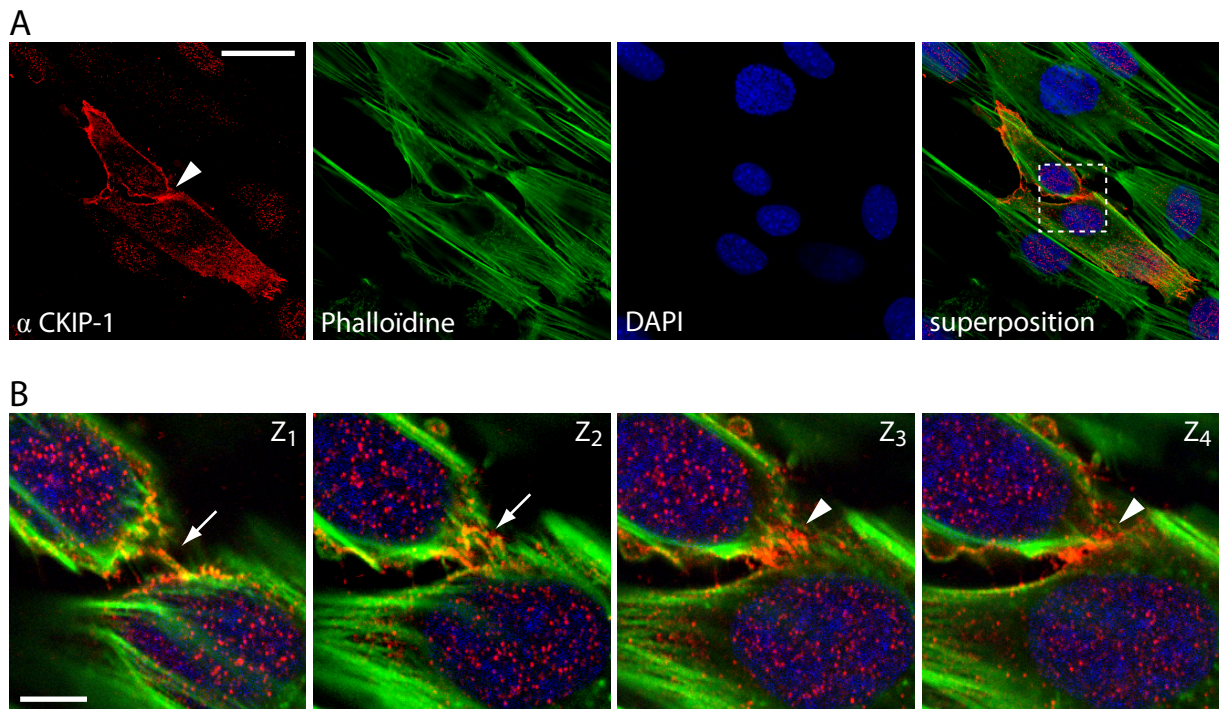


Figure 2 : CKIP-1 s'accumule au site de fusion entre les myoblastes.

(A) Après transfection avec le plasmide codant pour M2-CKIP-1, les myoblastes C2C12 ont été cultivés 12 h en milieu de croissance, puis 48 h en milieu de différenciation avant d'être fixés. Les protéines CKIP-1, l'actine filamenteuse et les noyaux sont alors marqués avec l'anticorps anti CKIP-1 (rouge), la phalloïdine (verte) et le DAPI (bleu), respectivement. La zone de contact entre les deux myoblastes est indiquée par une tête de flèche. Barre d'échelle, 20 μm .

(B) Différents plans optiques obtenus par section confocale en Z de la zone encadrée en A. Deux plans optiques successifs sont séparés de 1 μm . Les marquages sont les mêmes qu'en A. Lorsque les deux myoblastes sont séparés par un espace, celui-ci est occupé par des faisceaux de filaments d'actine qui sont co-localisés avec CKIP-1 (Z1, Z2, flèches). Par contre l'accolement des membranes des deux myoblastes est marqué par une accumulation du marquage CKIP-1 (Z3, Z4, têtes de flèches). Barre d'échelle, 5 μm .

orientation parallèle entre eux et parallèle à l'axe d'allongement maximal de la cellule (Figure 1A). A cette étape de la différenciation, M2-CKIP-1 est majoritairement présente à la membrane plasmique. De plus, elle est accumulée au niveau de la zone de contact entre les deux myoblastes (Figure 2A, tête de flèche). Cette zone de contact entre les deux myoblastes semble être un site de fusion. L'observation de cette zone de contact à l'aide de clichés confocaux pris à différentes positions en Z (Figure 2B Z₁, Z₂, Z₃, Z₄) révèle que CKIP-1 est localisée à la base et le long de prolongements membranaires soutenus par des filaments d'actine (Figure 2B Z₁ et Z₂, flèches). Ces prolongements sont situés dans une région du site de fusion où les membranes plasmiques des deux myoblastes ne sont pas accolées. En revanche, dans la région où les deux membranes plasmiques sont plus proches, on peut observer un marquage continu de CKIP-1 qui couvre totalement la zone de contact membranaire (Figure 2B. Z₃, Z₄, têtes de flèches). Ces observations suggèrent fortement que CKIP-1 s'accumule au niveau des sites de fusion des myoblastes où elle co-localise avec les structures formées par le cytosquelette d'actine impliquées dans la fusion.

CKIP-1 s'accumule au niveau du *midbody* des cellules en cours de cytotérière.

La cytotérière constitue l'étape ultime de la mitose. Elle est initiée par l'action du cytosquelette d'actine qui forme l'anneau d'actomyosine nécessaire à la formation du pont cytoplasmique. Puis la séparation finale des cellules requiert l'établissement d'un trafic vésiculaire polarisé vers le *midbody*. Compte tenu de l'intervention du cytosquelette d'actine et du trafic intracellulaire au cours de la cytotérière, je me suis intéressé à la localisation de CKIP-1 au cours de ce processus. Pour cela, des myoblastes C2C12 surexprimant M2-CKIP-1 ont été marqués avec un anticorps contre l' α -tubuline. Ce marquage anti α -tubuline permet de détecter facilement les cellules en cours de cytotérière grâce à l'organisation particulière du cytosquelette des microtubules au cours de cette étape. Les figures 3A et A' présentent des cellules en fin de cytotérière. En effet, elles sont toujours reliées entre elles au niveau du pont cytoplasmique (Figures 3A et A', pointes de flèches), mais elles ont déjà perdu la forme sphérique caractéristique des cellules en début de cytotérière. Dans ces cellules en fin de cytotérière, CKIP-1 présente une double localisation. D'une part, elle est localisée à la membrane plasmique au niveau des protrusions membranaires émises par les deux cellules filles en train de ré-adhérer (Figures 3A et A', flèches). D'autre part, CKIP-1 s'accumule au niveau du pont cytoplasmique reliant les deux cellules (Figures 3A et A', têtes de flèches). Sur la figure 3A, CKIP-1 est présente au pont cytoplasmique sous forme de plusieurs points isolés, dont la taille suggère que ce sont des vésicules (Figure 3A, flèche ouverte), et d'une

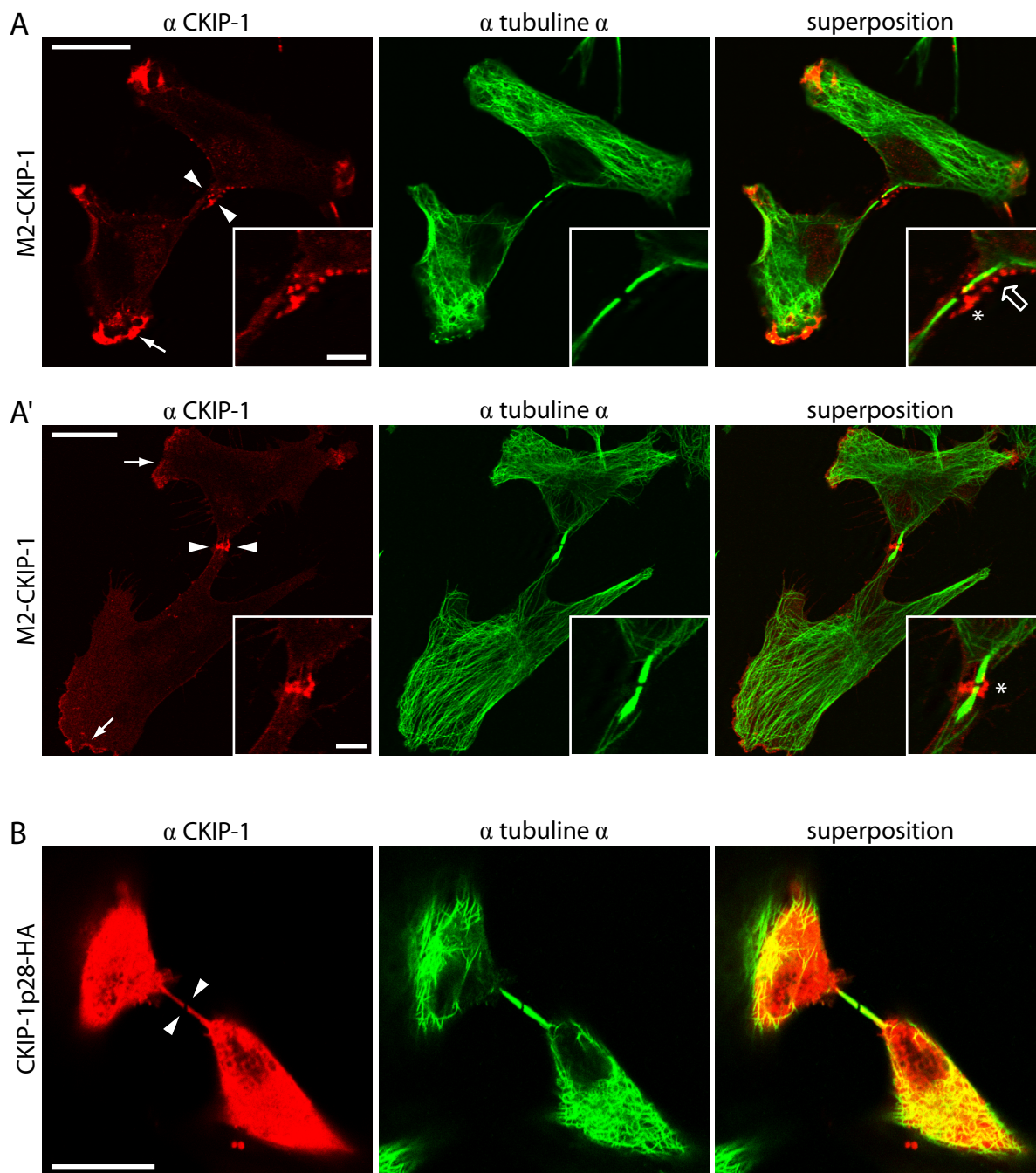


Figure 3 : CKIP-1 s'accumule au *midbody* au cours de la cytodifférenciation.

Après transfection avec le plasmide codant pour M2-CKIP-1 (A, A') ou CKIP-1p28-HA (B), les myoblastes C2C12 sont cultivés 16 h en milieu de croissance puis fixés et marqués avec l'anticorps anti CKIP-1 (rouge) et l'anticorps anti α -tubuline (vert).

(A, A') CKIP-1 est localisée au *midbody* (têtes de flèches) et à l'extrémité des protrusions membranaires émises par les cellules qui ré-adhèrent au support (flèches). Les photographies placées en médaillons sont des grossissements centrés sur le *midbody*. CKIP-1 présente un marquage ponctué à proximité du *midbody* (A, flèche ouverte), et s'accumule au niveau du *midbody* (A et A', astérisque).

(B) CKIP-1p28 est exclue du *midbody* (têtes de flèches).

Barres d'échelle, 20 μ m en A, A', B, et 5 μ m dans les grossissements en A et A'.

zone d'accumulation située au niveau du *midbody* localisé par l'interruption du marquage α -tubuline (Figure 3A, astérisque). En revanche, sur la figure 3A', CKIP-1 est exclusivement présente sous forme d'une accumulation située au *midbody* (Figure 3A', astérisque). Ces différences de localisation peuvent s'expliquer par le fait que les figures 3A et 3A' montrent deux stades différents de la cytodivision, 3A' étant postérieur à 3A. Ces observations suggèrent que, lors de l'étape de la cytodivision précédant l'abscission, des vésicules positives pour CKIP-1 migrent vers le *midbody* où elles s'accumulent. En outre, l'observation de cellules surexprimant CKIP-1p28-HA montre que CKIP-1p28 occupe une localisation cytoplasmique diffuse au cours de la cytodivision (Figure 3B). Ceci prouve que le domaine de CKIP-1 situé entre les acides aminés 1 et 171 est nécessaire à la localisation particulière de CKIP-1 pendant la cytodivision. D'autre part, le fait que CKIP-1 soit accumulée au *midbody*, alors qu'une protéine cytoplasmique telle que CKIP-1p28 est exclue de cette région, montre que le recrutement de CKIP-1 au *midbody* est un processus actif.

DISCUSSION

Au cours de cette étude descriptive, j'ai montré que CKIP-1 s'accumule à la membrane plasmique des myoblastes en différenciation, et plus précisément au niveau de la zone de contact entre les cellules qui est sans doute un site de fusion. Dans cette zone de contact entre les myoblastes, l'espace intercellulaire est occupé par des structures soutenues par des filaments d'actine parallèles qui pourraient correspondre à des filopodes (Figure 2B Z₁). L'observation de l'espace séparant deux myoblastes en cours de fusion par microscopie confocale, microscopie électronique à balayage et microscopie à force atomique a révélé la présence de filopodes et de tubules membranaires qui créent une zone de communication entre les myoblastes (Kim et al., 2008; Stadler et al., 2010). Les faisceaux de filaments d'actine avec lesquels CKIP-1 co-localise pourraient constituer l'architecture de ces filopodes et tubules membranaires.

L'accumulation d'actine filamenteuse observée au site de fusion est cohérente avec les nombreuses observations montrant la nécessité du cytosquelette d'actine et de ses régulateurs au site de fusion. Le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 a en effet été détecté à la zone de contact entre des myoblastes en cours de fusion aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, et sa régulation correcte semble être requise pour la fusion (Kim et al., 2007; Massarwa et al., 2007; Vasyutina et al., 2009). Etant donné que CKIP-1 s'accumule au site de fusion et qu'il est capable d'interagir avec Arp2/3, il est tentant de supposer que CKIP-1 assure le

recrutement du complexe de nucléation de l'actine au site de fusion. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en analysant la localisation intracellulaire du complexe Arp2/3 dans des myoblastes dont l'expression de CKIP-1 a été inhibée par siRNA spécifiquement lors de l'étape de fusion. Ceci conférerait à CKIP-1 un rôle central dans le processus de fusion.

L'observation de myoblastes en cours de division a permis de montrer que CKIP-1 est localisée au niveau du *midbody* lors de l'étape de la cytotérièse qui précède l'abscission. De plus, les observations réalisées suggèrent que le transfert de CKIP-1 vers le *midbody* s'opère en association avec des vésicules. L'existence d'un transfert de vésicules vers le *midbody* a été largement documentée. En effet, des vésicules positives pour Rab11 sont transportées vers le *midbody* et ce trafic est même nécessaire à l'abscission (Fielding et al., 2005). Au cours de la cytotérièse, plusieurs rôles peuvent être imaginés pour CKIP-1. Tout d'abord CKIP-1 pourrait participer au ciblage des vésicules intracellulaires vers le *midbody*. En effet, il a été montré récemment que des PI(3)P s'accumulent au niveau du *midbody* (Sagona et al., 2010). Ces phosphoinositides pourraient ainsi constituer le signal déclencheur du recrutement de CKIP-1 et donc des vésicules auxquelles elle est associée vers le *midbody*. Alternativement, CKIP-1 pourrait être transportée vers le *midbody* en tant que simple protéine cargo associée aux vésicules positives pour Rab11. Et une fois localisée au *midbody*, CKIP-1 pourrait intervenir dans le remodelage du cytosquelette et/ou de la membrane qui sous-tend l'abscission. Quoiqu'il en soit, CKIP-1 ne semble pas être indispensable à la cytotérièse puisque nous n'avons pas observé de défaut drastique de la mitose dans les cellules transfectées avec les siRNA dirigés contre CKIP-1 (nous n'avons par exemple pas observé une augmentation importante de la proportion de cellules binucléées, données non montrées). Cependant, aucun de nos siRNA ne permet une inhibition totale de l'expression de CKIP-1. Ainsi l'expression résiduelle de CKIP-1 est peut-être suffisante pour permettre la cytotérièse.

Ces données confirment que CKIP-1 est présente dans les zones de la cellule subissant un remodelage actif de leur cytosquelette et de leur membrane comme les lamellipodes, les zones de fusion entre les myoblastes et la région du pont cytoplasmique où se déroule la séparation physique des deux cellules filles issues d'une mitose. Cependant, afin d'obtenir des informations sur la dynamique de recrutement de CKIP-1 et éventuellement le rôle de CKIP-1 dans ces régions particulières de la cellule, il serait intéressant d'observer ces phénomènes (notamment la fusion des myoblastes) en *video time lapse* sur des cellules exprimant CKIP-1-Cherry ou CKIP-1-GFP.

Discussion générale et perspectives

Etat de la question

Les travaux réalisés au cours de ma thèse avaient pour but d'améliorer la compréhension des rôles de la protéine CKIP-1 dans le muscle squelettique de souris. Initialement, CKIP-1 avait été identifiée au laboratoire comme une protéine intervenant dans la différenciation des myoblastes C2C12 (voir le paragraphe IV.B.3 de l'introduction) (Safi et al., 2004). En effet, il avait été montré que la surexpression de CKIP-1 dans des myoblastes C2C12 mime les effets de l'IGF-1 (Coolican et al., 1997; Engert et al., 1996). Elle augmente dans un premier temps la phase initiale de prolifération des myoblastes puis elle stimule dans un second temps l'expression de la myogénine et la fusion des myoblastes en myotubes. L'action de l'IGF-1 sur la différenciation des cellules musculaires est médiée par la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). L'utilisation d'inhibiteurs chimiques spécifiques tels que le LY294002 et la wortmannine bloque les effets activateurs de l'IGF-1. Il en est de même pour CKIP-1, ce qui a permis de montrer que l'action de CKIP-1 au cours de la différenciation musculaire est régulée par la voie PI3K. Une isoforme de CKIP-1 migrant à 28 kDa a également été identifiée dans les myoblastes C2C12 par Sabine Caussanel, une étudiante en thèse dans le laboratoire. Cette isoforme plus courte, nommée CKIP-1p28, est issue d'une initiation alternative de la traduction à partir du résidu méthionine en position 172 de CKIP-1 (2^{ème} partie des résultats de ce manuscrit). CKIP-1p28 est donc dépourvue de domaine PH (aa 20 à 131), si bien qu'elle est exclusivement cytoplasmique alors que CKIP-1 est localisée à la membrane plasmique et dans le noyau (Bosc et al., 2000; Litchfield et al., 2001; Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004; Zhang et al., 2006).

CKIP-1 et la régulation du cytosquelette d'actine *in vitro*

Dans un premier temps, j'ai participé à l'étude de l'interaction entre CKIP-1 et le complexe Arp2/3. Cette interaction a été mise en évidence lors de l'établissement de la cartographie de l'interactome de la voie phosphatidylinositol 3-kinase-mammalian target of rapamycin (PI3K-mTOR) qui a été réalisé au laboratoire (Pilot-Storck et al., 2010). CKIP-1 étant régulée par la voie de signalisation PI3K au cours de la différenciation, a été incluse dans les trente-trois protéines dont les interacteurs ont été recherchés lors de la réalisation de l'interactome. Ce dernier a été obtenu en réalisant deux cribles double-hybride en levures : le premier entre les trente-trois composants de la voie PI3K-mTOR et une banque de cDNA d'embryon de souris de E10,5, et le second entre les trente-trois composants de la voie PI3K-mTOR et la banque d'ORFeome humain v1.1 ORF. Cet interactome a révélé un nouvel

interacteur de CKIP-1 : la sous-unité ARPC1A du complexe Arp2/3 de nucléation de l'actine. Le complexe Arp2/3 se fixe sur le côté d'un filament d'actine préexistant et initie la polymérisation d'un nouveau filament d'actine « branché » sur le côté du premier (Rouiller et al., 2008). La réalisation d'expériences de co-purification par affinité (co-AP, *co-affinity purification*) entre des protéines CKIP-1 et ARPC1A tronquées, puis de co-immunoprécipitation avec des constructions de CKIP-1 présentant des délétions de plus en plus importantes de leur région N-terminale a permis d'identifier le domaine nécessaire à l'interaction avec ARPC1A. Cette région est située entre les acides aminés 146 et 171 de CKIP-1 c'est-à-dire en aval du domaine PH mais en amont du codon start de CKIP-1p28. CKIP-1p28 ne possède donc pas le domaine d'interaction avec ARPC1A. La mise en évidence de ce nouvel interacteur fait de CKIP-1 un régulateur à part entière du cytosquelette d'actine. En effet, le groupe de DW Litchfield a montré que CKIP-1 interagit avec le complexe des protéines CP α et β (Canton et al., 2005). Le domaine d'interaction avec les protéines CP est également localisé après le domaine PH, entre les acides aminés 138 à 166 de la protéine CKIP-1 humaine (acides aminés 137 à 165 de la protéine CKIP-1 de souris) (Bruck et al., 2006; Canton et al., 2006; Hernandez-Valladares et al., 2010). Ainsi, le domaine, et même les acides aminés, nécessaires à l'interaction de CKIP-1 avec les protéines CP ou ARPC1A sont semblables. En effet les résidus arginine R155 et R157 de la protéine CKIP-1 humaine sont requis pour l'interaction avec les protéines CP (Canton et al., 2006); et nous avons montré que la mutation des résidus correspondants de CKIP-1 murin (R154 R156) conduit à une perte de l'interaction avec les protéines CP mais aussi à une réduction drastique de l'interaction avec ARPC1A. La quasi identité des domaines impliqués dans l'interaction de CKIP-1 avec ARPC1A et les protéines CP et l'implication des mêmes acides aminés clés dans les deux interactions suggèrent que les deux interactions sont mutuellement exclusives. Une manière « simple » de le prouver consisterait à réaliser une chromatographie d'exclusion et à vérifier si CKIP-1, ARPC1A et les protéines CP se retrouvent ou non dans les mêmes fractions. Nous avons en effet montré que CKIP-1 est co-immunoprécipité avec ARPC1A mais aussi ARPC2 ce qui suggère très fortement que l'ensemble du complexe Arp2/3 est associé à CKIP-1. Ainsi, le complexe putatif CKIP-1/Arp2/3 serait beaucoup plus « gros » que le complexe putatif CKIP-1/CP $\alpha\beta$ et cette différence d'encombrement stérique devrait être suffisante pour permettre leur séparation dans des fractions distinctes. L'existence de ces deux types de complexes suggérerait soit qu'il existe deux sous-populations de CKIP-1, l'une étant capable de lier Arp2/3 et l'autre CP $\alpha\beta$, soit que toutes les molécules de CKIP-1 sont

capables de lier alternativement Arp2/3 et CP $\alpha\beta$. Dans les deux cas, cela créerait un degré supplémentaire de complexité dans la régulation du cytosquelette d'actine par CKIP-1.

Les deux interacteurs de CKIP-1, les protéines CP et le complexe Arp2/3, sont des éléments indispensables à la formation d'un réseau dense d'actine branchée. La présence des protéines CP et du complexe Arp2/3 sous la membrane plasmique permet la polymérisation de ce réseau d'actine contre la membrane générant ainsi la force protrusive à l'origine de la formation des lamellipodes et de la migration cellulaire (Iwasa and Mullins, 2007; Steffen et al., 2006). Nous avons montré que la surexpression de CKIP-1 est associée à des modifications de la morphologie des myoblastes C2C12. Le périmètre des cellules est plus important et les cellules forment des lamellipodes plus étendus (1^{ère} partie des résultats de ce manuscrit). Ces effets ont également été observés dans la lignée de cellules dendritiques humaines DC1.4 (Canton et al., 2005). Nous avons aussi montré que ces modifications morphologiques n'étaient induites qu'à condition que CKIP-1 soit capable de lier la membrane plasmique avec son domaine PH, et d'interagir avec CP et Arp2/3 via son domaine d'interaction. Nous avons en outre mis en évidence que ces modifications morphologiques des cellules sont associées à des modifications fonctionnelles. En effet, les cellules présentant un niveau élevé de CKIP-1 sont capables de migrer efficacement. En revanche un faible niveau d'expression de CKIP-1 ou un niveau élevé de CKIP-1p28 ne permettent pas une migration cellulaire efficace. Tous ces résultats nous ont suggéré que CKIP-1 stimule la formation des lamellipodes et la migration cellulaire en recrutant les protéines CP et Arp2/3 à la membrane plasmique où elles agissent de concert pour former un réseau dense d'actine branchée.

La capacité d'interagir avec les protéines CP et le complexe Arp2/3 n'est pas propre à CKIP-1. En effet, la protéine CARMIL (*CP*, *Arp2/3*, *myosin I linker*) partage cette propriété. CARMIL a été initialement identifiée chez les acanthamibes (une famille d'eucaryotes unicellulaires) comme un partenaire des myosines de classe I (Xu et al., 1995). Puis il a été montré qu'elle interagissait avec le complexe de protéine CP et le complexe Arp2/3 (Jung et al., 2001). CARMIL interagit avec CP α et CP β via un domaine compris entre ses acides aminés 970 à 998. Ce domaine est homologue au domaine de CKIP-1 impliqué dans l'interaction avec les CP (acides aminés 137 à 165 de CKIP-1 murin) (Hernandez-Valladares et al., 2010). Cette interaction inhibe la propriété de coiffe des protéines CP en diminuant leur affinité pour l'extrémité barbue des filaments d'actine (Yang et al., 2005). En ce qui concerne Arp2/3, la sous-unité du complexe et le domaine de CARMIL impliqués dans l'interaction n'ont pas été identifiés. Outre ses interacteurs, CARMIL présente de très nombreuses similarités avec CKIP-1. En effet, CARMIL possède un domaine de liaison membranaire qui

permet sa localisation à la membrane plasmique, notamment au niveau des lamellipodes. La surexpression de CARMIL (isoforme 1) augmente la proportion de cellules présentant de larges lamellipodes, tandis que l'inhibition de son expression par siRNA induit une diminution de la taille des lamellipodes et un ralentissement de la migration cellulaire (Liang et al., 2009; Yang et al., 2005). Ainsi, l'inhibition de l'expression de CKIP-1 ou de CARMIL par siRNA reproduit l'absence de lamellipode observée dans les cellules dont l'expression des sous-unités du complexe Arp2/3 ou des protéines CP a été inhibée (Iwasa and Mullins, 2007; Steffen et al., 2006). Ceci est cohérent avec la fonction proposée pour CKIP-1 et CARMIL qui consisterait à permettre le recrutement des protéines CP et du complexe Arp2/3 à la membrane. Or des expériences de délocalisation spécifique des protéines CP ou du complexe Arp2/3 des lamellipodes, plutôt que l'inhibition totale de leur expression, pourrait permettre d'étudier de manière plus fine la coopération entre ces deux complexes dans la formation des lamellipodes. Cependant pour l'instant aucune étude n'a permis d'analyser l'effet de la perte spécifique de l'interaction de CARMIL ou de CKIP-1 avec le complexe Arp2/3 d'une part et les protéines CP d'autre part. En effet, le mutant R154-156E que nous avons utilisé provoque à la fois la perte de l'interaction avec les protéines CP et une réduction drastique de l'interaction entre CKIP-1 et ARPC1A (1^{ère} partie des résultats de ce manuscrit). Il est important de noter que le maintien d'une faible interaction avec le complexe Arp2/3 alors que l'interaction avec les protéines CP est totalement perdue permet d'éliminer l'hypothèse d'une interaction indirecte entre CKIP-1 et Arp2/3 médiée par les protéines CP. Cette hypothèse était éventuellement envisageable puisque les levures possèdent des orthologues des protéines CP α et β de mammifères qui auraient pu intervenir lors du crible double hybride en levure. Dans le cas de CARMIL, Yang *et al.* ont montré que la réexpression d'une forme de CARMIL dépourvue de son domaine d'interaction avec les protéines CP ne permet pas de sauver le phénotype des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre CARMIL (Yang et al., 2005). Or, si le domaine d'interaction de CARMIL avec le complexe Arp2/3 est le même que celui de CKIP-1 et recouvre donc le domaine de liaison aux protéines CP (ce qui est probable compte tenu de la forte identité de séquence entre les domaines d'interaction avec les protéines CP de CARMIL et CKIP-1 (Hernandez-Valladares et al., 2010)), la forme tronquée de CARMIL utilisée pour la tentative de sauvetage phénotypique serait également incapable de lier le complexe Arp2/3. La délocalisation spécifique du complexe Arp2/3 ou des protéines CP des lamellipodes nécessite donc d'identifier spécifiquement les acides aminés impliqués dans l'interaction avec le complexe Arp2/3. Ceci pourrait être fait en réalisant des mutations ponctuelles systématiques des acides aminés 146 à 171 de CKIP-1 et

en sélectionnant les mutations qui provoquent spécifiquement la perte d'interaction avec le complexe Arp2/3. Il serait ensuite intéressant de vérifier si les acides aminés ainsi mis en évidence sont conservés dans la séquence de CARMIL et d'autres protéines adaptatrices liant CP comme CD2AP (*CD2-associated protein*), CapZIP (*CapZ-interacting protein*) ou WASHCAP (*WASH and capping protein-associated protein*) (Bruck et al., 2006).

Enfin, le mécanisme de recrutement de CARMIL à la membrane plasmique a été étudié. Le groupe de JA Cooper a montré que l'absence de CP n'a aucun effet sur le recrutement de CARMIL à la membrane plasmique, par contre l'absence du complexe Arp2/3 empêche la localisation membranaire de CARMIL. Réciproquement, l'absence de CARMIL provoque une diminution du marquage Arp2/3 au niveau des petits lamellipodes formés ((Liang et al., 2009) et données non publiées). Les auteurs en ont donc déduit que le recrutement initial de CARMIL à la membrane nécessite Arp2/3 ; puis CARMIL provoque à son tour le recrutement de complexes Arp2/3 augmentant ainsi leur représentation à la membrane des lamellipodes. Le même type de mécanisme de délocalisation peut être imaginé pour CKIP-1. Cependant, contrairement à CARMIL, le recrutement de CKIP-1 à la membrane plasmique nécessite l'activation de la voie PI3-K par une stimulation à l'insuline par exemple. Ceci offre donc une possibilité de régulation de l'action de CKIP-1 sur le cytosquelette qui n'a pas été mise en évidence pour CARMIL.

CKIP-1 et la régulation du cytosquelette d'actine *in vivo* chez le poisson zèbre *Danio rerio* : mise en évidence d'un rôle de CKIP-1 dans la fusion

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de l'inhibition de *ckip-1* par morpholino oligonucléotide antisens au cours du développement embryonnaire du poisson zèbre (1^{ère} partie des résultats de ce manuscrit). Les embryons injectés avec le morpholino dirigé contre les ARNm de *ckip-1* (morphants *ckip-1*), présentent des défauts morphologiques. Nous avons montré que ces défauts sont corrélés à des anomalies de la myogenèse. Tout d'abord les cellules adaxiales, précurseurs des fibres lentes, présentent des mouvements morphogénétiques anormaux et des défauts du cytosquelette d'actine. Ces résultats sont conformes aux modifications de morphologie et d'organisation des filaments d'actine que nous observons dans les myoblastes C2C12 transfectés avec un siRNA dirigé contre CKIP-1. De plus, l'inhibition de l'expression de la protéine Cap1 (*adenylate cyclase-associated protein 1*), impliquée dans la régulation de l'actine corticale conduit à un phénotype similaire (Daggett et al., 2007). Les défauts observés dans les embryons morphants *ckip-1* peuvent s'expliquer par le rôle de CKIP-1 dans la régulation du cytosquelette d'actine par

l'intermédiaire de ses interactions avec les protéines CP et le complexe Arp2/3 (voir plus haut).

La myogenèse se poursuit dans chaque somite par un étirement des cellules adaxiales dans l'axe antéro-postérieur jusqu'à ce que leurs extrémités s'attachent aux myoseptes délimitant le somite (Daggett et al., 2007). Une fois attachées aux myoseptes, les cellules adaxiales migrent radialement vers la périphérie du somite où elles formeront la musculature lente du myotome mature. Les embryons morphants *ckip-1* ne présentent pas de défauts majeurs dans cette étape de migration radiale puisque 73% des cellules adaxiales parviennent à la périphérie. Ces résultats semblent en désaccord avec ceux observés *in vitro* dans les myoblastes C2C12. En effet, les cellules dont l'expression de *Ckip-1* a été inhibée par siRNA présentent un déficit important de leur capacité à migrer. Cette apparente contradiction peut s'expliquer par la mise en œuvre de structures très différentes dans les deux cas. La migration des myoblastes *in vitro* nécessite la formation de lamellipodes soutenus par un réseau dense d'actine branchée. Les lamellipodes sont présents à l'avant des cellules où ils orientent le mouvement et permettent la mise en place de nouvelles structures d'adhérence entre la cellule et le support, tandis que l'arrière de la cellule se détache progressivement du substrat (Le Clainche and Carlier, 2008). Le déplacement des précurseurs des fibres lentes est totalement différent puisqu'il s'apparente à un transfert de la cellule par un mouvement latéral de ces extrémités le long de rails composés par les myoseptes. Les cellules ne sont donc pas polarisées comme c'est le cas *in vitro* et elles ne présentent pas de lamellipodes. Ces différences de modalité de déplacement des cellules permettent d'expliquer pourquoi CKIP-1 est nécessaire à la migration des myoblastes *in vitro*, alors que son absence n'affecte que très peu la migration radiale des précurseurs des fibres lentes dans l'embryon de poisson zèbre *in vivo*.

Enfin, l'observation de la mise en place des fibres rapides des embryons morphants *ckip-1* a révélé des défauts de fusion. En effet, contrairement aux fibres lentes qui restent mononucléées, les fibres rapides sont plurinucléées car elles sont issues de la fusion des précurseurs des fibres rapides qui constituent la grande majorité des cellules du myotome. La migration radiale des précurseurs des fibres lentes s'opère donc à travers la masse des précurseurs des fibres rapides ; et c'est le passage des précurseurs des fibres lentes qui déclenche la fusion des précurseurs des fibres rapides entre eux (Henry and Amacher, 2004). Nous avons montré que les fibres rapides des embryons morphants *ckip-1* possèdent un nombre réduit de noyaux par rapport aux embryons injectés avec le morpholino oligonucléotide contrôle ce qui montre que Ckip-1 est nécessaire à la fusion des précurseurs

de fibres rapides (1^{ère} partie des résultats de ce manuscrit). Cette fonction potentielle de CKIP-1 dans la fusion avait déjà été suggérée par les résultats obtenus *in vitro*. En effet, la surexpression de CKIP-1 dans des myoblastes C2C12 induit la formation de myotubes contenant un plus grand nombre de noyaux que les myotubes issus de la fusion de myoblastes contrôles (Safi et al., 2004). Ces myotubes présentent aussi une morphologie inhabituelle : ils sont plus larges et moins longs que les myotubes contrôles, suggérant que des myoblastes ont fusionné entre eux même s'ils n'étaient pas dans la position particulière qui est nécessaire à la fusion en temps normal. Enfin, j'ai montré que, dans les myoblastes C2C12 en différenciation, CKIP-1 s'accumule avec l'actine filamenteuse dans des régions membranaires qui semblent être des sites de fusion (3^{ème} partie des résultats de ce manuscrit). L'ensemble des résultats que nous avons obtenus *in vivo* dans les embryons de poisson zèbre et *in vitro* dans les myoblastes C2C12 montre l'implication de CKIP-1 dans la fusion des myoblastes, ou des précurseurs de fibres musculaires, en myotubes.

L'importance de CKIP-1 dans la fusion peut s'expliquer par le rôle prépondérant du cytosquelette d'actine dans cette étape. En effet l'inhibition chimique du remodelage de l'actine, spécifiquement au cours de l'étape de fusion des myoblastes C2C12, réduit drastiquement le pourcentage de fusion (Nowak et al., 2009). Il a de plus été montré *in vitro* dans les myoblastes C2C12 et *in vivo* chez la drosophile que l'actine filamenteuse ainsi que de nombreux régulateurs du cytosquelette d'actine s'accumulent aux sites de fusion entre les myoblastes. Ainsi, le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 et ses régulateurs WASP et WAVE ont été détectés au site de fusion et leur présence est nécessaire à la fusion des myoblastes entre eux (Kim et al., 2007; Massarwa et al., 2007; Richardson et al., 2007; Vasyutina et al., 2009). Cependant, le mécanisme qui assure le recrutement de ces composants spécifiquement au site de fusion reste inconnu. Compte tenu de ses propriétés biochimiques et de sa localisation intracellulaire au cours de la fusion, CKIP-1 constitue un bon candidat pour remplir ce rôle au moins en ce qui concerne Arp2/3. En effet, non seulement CKIP-1 est capable de lier Arp2/3, mais en plus il peut être recruté à la membrane plasmique via son domaine PH en réponse à un stimulus extracellulaire (1^{ère} partie des résultats de ce manuscrit et (Safi et al., 2004)). L'établissement d'un contact avec la membrane plasmique d'un myoblaste voisin pourrait constituer, pour un myoblaste en cours de différenciation, le stimulus extracellulaire provoquant le recrutement de CKIP-1 et par conséquent d'Arp2/3 au niveau du futur site de fusion.

Les rôles de CKIP-1 dans la modification de la morphologie des cellules, dans la migration et la fusion des myoblastes requièrent la présence du domaine PH d'une part, et du

domaine d'interaction avec le complexe Arp2/3 et les protéines CP d'autre part. Ces résultats montrent que la régulation du cytosquelette d'actine par CKIP-1 passe par le recrutement de Arp2/3 et CP α/β à la membrane plasmique. La modulation de l'action des protéines par modification de leur localisation intracellulaire est un mode de régulation post-traductionnelle courant. La plupart du temps, il est assuré par des protéines adaptatrices. Ces protéines possèdent des domaines d'interaction protéine-protéine ou protéine-lipide et bien que dépourvues d'activité enzymatique intrinsèque, elles jouent un rôle essentiel en régulant l'assemblage de complexes multimoléculaires de signalisation essentiels à la transmission intracellulaire des signaux extracellulaires reçus par la cellule. CKIP-1 a déjà été impliquée dans ce type de régulation. En effet, CKIP-1 est capable de recruter les kinases CK2 et ATM à la membrane plasmique en fonctions des signaux intra- ou extra-cellulaires (Bosc et al., 2000; Olsten et al., 2004; Zhang et al., 2006). Ce recrutement des kinases à la membrane plasmique leur donne accès à des substrats différents de ceux auxquels elles avaient accès avant d'être déplacées. La relocalisation des kinases permet donc de réguler les voies de signalisation auxquelles elles participent. Cette capacité de CKIP-1 à modifier la localisation des kinases fait de cette protéine un régulateur non enzymatique de kinases. Nos résultats concernant le recrutement de Arp2/3 et CP α/β à la membrane plasmique par CKIP-1 montrent que la fonction régulatrice de CKIP-1 par relocalisation de ses interacteurs ne se limite pas qu'aux kinases.

CKIP-1 subit un clivage pendant la différenciation musculaire *in vitro* et *in vivo*

La principale partie de mon travail de thèse a consisté à étudier la protéine CKIP-1 au cours de la myogenèse embryonnaire et dans le muscle squelettique adulte de souris. L'étude *in vivo* de CKIP-1 chez la souris avait déjà été tentée au laboratoire. En effet, deux tentatives de génération de souris génétiquement modifiées pour *Ckip-1* avaient été entreprises avant mon arrivée au laboratoire. Dans un premier temps, la réalisation d'une souris *knockout* pour *Ckip-1* avait été initiée. Malheureusement, l'obtention de cellules souches embryonnaires (*ES cells, embryonic stem cells*) dont le gène *Ckip-1* n'est pas fonctionnel s'est révélée impossible suite à des problèmes de prolifération de ces cellules. Une autre stratégie a alors été imaginée en tirant profit de nos connaissances sur CKIP-1p28. En effet, la surexpression de CKIP-1p28 dans les cellules C2C12 inhibe l'expression de la protéine CKIP-1 endogène et a des effets antagonistes sur le cytosquelette d'actine. Une lignée de souris transgénique exprimant une construction *Ckip-1p28-HA* sous la dépendance d'un promoteur MLC1F (*myosin light chain 1f*) a été générée. Le promoteur MLC1F est activé dans les précurseurs somitiques des fibres

musculaires squelettiques rapides dès le neuvième jour embryonnaire et dans les cellules musculaires cardiaques des oreillettes dès le douzième jour embryonnaire (Lyons et al., 1990; McGrew et al., 1996). Les premiers animaux transgéniques ont montré un nombre de fibres musculaires réduit de deux tiers. J'avais pour objectif de caractériser le phénotype de cette lignée et d'en étudier les causes. Malheureusement cette lignée n'a pu être maintenue pour deux raisons majeures : (1) le transgène provoquait la mort périnatale des souris (dans les premières 24 heures suivant la naissance), (2) le transgène était apparemment localisé dans une région génomique difficile d'accès, rendant le génotypage des souris très problématique. Je me suis donc par la suite concentré sur l'étude des protéines CKIP-1 dans les muscles adultes. J'ai tout d'abord réalisé le patron d'expression de CKIP-1 dans le muscle squelettique et dans d'autres tissus. Cette étude a fourni deux informations principales : (1) dans tous les tissus étudiés, notre anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les acides aminés 241 à 255 de CKIP-1 détecte une bande majoritaire migrant à environ 28 kDa qui correspond à CKIP-1p28, et une bande minoritaire, pas toujours détectable, migrant à 55 kDa et qui correspond à CKIP-1 ; (2) dans les extraits de muscles striés squelettiques, la bande à 55 kDa est absente, mais une bande à 43 kDa est détectée en plus de CKIP-1p28 (2^{ème} partie des résultats de ce manuscrit). CKIP-1p28 est donc présente de manière ubiquitaire alors que nous ne sommes pas parvenus à détecter CKIP-1 dans l'ensemble des tissus testés. De plus dans la majorité des tissus, dont les muscles striés squelettiques, CKIP-1p28 est la forme prépondérante des protéines CKIP-1 alors qu'elle est minoritaire dans les myoblastes C2C12. Cependant, nous avons montré que l'expression de CKIP-1p28 est fortement augmentée au cours de la différenciation musculaire *in vitro*. Au contraire, la quantité de CKIP-1 chute drastiquement après une phase transitoire de hausse. Cette diminution de la quantité de CKIP-1 au cours de la différenciation des myoblastes C2C12 est concomitante à l'apparition d'une bande à 38 kDa détectée par notre anticorps anti CKIP-1. J'ai montré que cette bande qui apparaît au cours de la différenciation musculaire *in vitro* est très certainement issue du clivage de CKIP-1 après le résidu aspartate situé en position 146. Ce site de clivage est une séquence consensus de clivage de type (V/I/L)EXD reconnue par la caspase-6. Nous avons voulu tester l'effet de l'inhibition de ce clivage sur le déroulement de la différenciation en transfectant une construction CKIP-1 porteuse de la mutation D146A. Malheureusement, aucune des constructions CKIP-1 surexprimées dans les myoblastes n'est clivée au cours de la différenciation même si la construction transfectée code pour une protéine CKIP-1 sauvage. Ceci est certainement dû à la saturation du système endogène de clivage par la grande quantité de CKIP-1 exogène présente.

L'existence de formes plus courtes de CKIP-1 a déjà été observée. Ainsi, le traitement de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) par l'interleukine-2 induit l'apparition d'une bande à 35 kDa détectée par un anticorps dirigé contre la région C-terminale de CKIP-1 humain (acides aminés 308 à 409) (Zhang et al., 2007). Compte tenu de sa taille et du fait qu'il contient la région C-terminale de CKIP-1, les auteurs ont suggéré que ce produit correspondait à une protéine CKIP-1 dépourvue de sa région N-terminale, domaine PH inclus. Ils ont d'ailleurs nommé ce produit « ΔPH-like », cependant sa nature précise ainsi que son mécanisme d'apparition n'ont pas été étudiés. De manière plus importante, l'existence d'un clivage de CKIP-1 par la caspase-6 a été montrée *in vitro* par Zhang *et al.* qui ont incubé des molécules de CKIP-1 traduites *in vitro* (en présence de méthionines marquées au ³⁵S) avec des molécules de caspase-6 purifiées (Zhang et al., 2005). Ce clivage de CKIP-1 par la caspase-6 a généré un fragment d'environ 35 kDa. Malheureusement la détection de ce fragment ayant été réalisée par autoradiographie, il est impossible de savoir s'il s'agissait d'un fragment C-terminal ou N-terminal. Cependant, la taille du fragment obtenu (35 kDa) est cohérente avec la taille du fragment que l'on observe (38 kDa) étant donné que, selon leurs conditions de SDS-PAGE, les auteurs détectent CKIP-1 à 50 kDa alors que nous le détectons à 55 kDa. Enfin, il a été montré que CKIP-1 pouvait également être clivée par la caspase-3 au cours de l'apoptose induite par le TNF dans les cellules HEK293 (Zhang et al., 2005). Les sites de clivage D310 et D345 ciblés par la caspase-3 ont été mis en évidence sur des formes surexprimées de CKIP-1, mais il semble que le clivage de la protéine CKIP-1 endogène soit exclusivement réalisé après l'aspartate D310. Ce clivage libère un fragment N-terminal de ~35 kDa et un fragment C-terminal de ~15 kDa contenant le domaine LZ qui pénètre dans le noyau où il interagit avec AP-1 et inhibe son activité anti-apoptotique. Ce clivage décrit par Zhang *et al.* ne correspond pas au clivage que nous avons mis en évidence puisque les fragments N-terminaux générés ont une taille apparente plus élevée que le fragment généré au cours de la différenciation des myoblastes C2C12 (2^{ème} partie des résultats de ce manuscrit). Les auteurs mentionnent également au cours de leur étude que la protéine CKIP-1 endogène peut également être clivée dans les cellules HEK293 en réponse à une privation de sérum. Ce type de traitement est similaire au protocole utilisé pour induire la différenciation des myoblastes. Il apparaît donc qu'un simple abaissement de la quantité de sérum dans le milieu de culture est suffisant pour induire le clivage de la forme endogène de CKIP-1, ce qui est conforme à ce que nous observons dans les myoblastes C2C12. L'ensemble de nos résultats et les données obtenues par le groupe de F. He suggèrent fortement que le clivage que nous observons au cours de la différenciation est

dû à la caspase-6. Malgré cela, la preuve formelle de l'implication de la caspase-6 dans ce clivage sera difficile à apporter. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur « général » des caspases est proscrite puisque l'activation de la caspase-3 et de la caspase-9 sont nécessaires à la différenciation des myoblastes C2C12 *in vitro* (Fernando et al., 2002; Murray et al., 2008). Ainsi, un inhibiteur général de caspases bloquerait la différenciation, si bien que l'éventuelle absence de clivage de CKIP-1 pourrait être imputée soit au fait que c'est effectivement une caspase qui clive CKIP-1, soit à l'inhibition de la différenciation qui empêcherait indirectement le déclenchement du clivage de CKIP-1. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la caspase-6 (tel que Z-VEID-FMK (N-benzyloxycarbonyl-VEID-fluoromethyl ketone)) conduirait aux mêmes incertitudes d'interprétation, même s'il n'y a, à notre connaissance, aucune preuve de l'implication de la caspase-6 dans la différenciation musculaire. Ainsi, la seule manière de prouver l'implication de la caspase-6 dans ce clivage serait d'incuber des protéines CKIP-1 et CKIP-1 D146A traduites *in vitro* en présence de caspases-6 purifiées afin de vérifier que la mutation D146A empêche effectivement le clivage.

Nous avons donc montré que CKIP-1 est clivée au cours de la différenciation des myoblastes *in vitro*. *In vivo*, la myogenèse se traduit aussi par une diminution de la quantité de CKIP-1 associée à l'apparition d'un produit de masse moléculaire inférieure. Cependant, la nature précise de la forme à 43 kDa détectée dans le muscle squelettique de souris adulte n'a pas été établie puisque nous ne sommes pas parvenus à en immunoprécipiter une quantité suffisante pour qu'elle soit séquencée par la méthode d'Edman. Néanmoins, il pourrait s'agir du même produit de clivage que celui identifié *in vitro* ; la différence de masse moléculaire apparente pouvant s'expliquer par des modifications post-traductionnelles différentes. Nous avons déjà vérifié que la différence de migration n'est pas due à une phosphorylation de la forme détectée *in vivo* (2^{ème} partie des résultats de ce manuscrit). Cependant, d'autres modifications post-traductionnelles sont encore à tester, puisque CKIP-1 présente par exemple de nombreux sites de glycosylation (données non montrées). Ces tests seront réalisés en parallèle de nouveaux protocoles d'immunoprécipitation de la forme clivée à partir d'extraits protéiques de muscles afin d'améliorer les rendements de la co-immunoprécipitation et ainsi obtenir davantage de matériel purifié.

Les différentes formes de protéines CKIP-1 : des protéines aux propriétés différentes vis-à-vis de la régulation du cytosquelette d'actine

Nous nous sommes par la suite intéressés aux caractéristiques biochimiques des différentes protéines CKIP-1 identifiées. La forme entière de CKIP-1 est constituée par les acides aminés 1 à 408 et possède donc tous les domaines d'interaction. En revanche, CKIP-1p28 est traduite à partir de la méthionine 172 ; elle est donc dépourvue de domaine PH (acides aminés 20 à 131) et de domaine d'interaction avec ARPC1A et CP $\alpha\beta$ (acides aminés 137 à 165). La forme clivée CKIP-1 147-408 est également dépourvue de domaine PH et du premier tiers du domaine d'interaction avec CP $\alpha\beta$ et ARPC1A. Nous avons montré que les trois protéines CKIP-1 qui sont présentes au cours de la différenciation musculaire sont caractérisées par des propriétés biochimiques qui leur sont propres : CKIP-1 est localisée dans le noyau et à la membrane plasmique et elle lie les protéines CP et le complexe Arp2/3 ; CKIP-1p28 est exclusivement cytoplasmique et n'interagit ni avec les protéines CP ni avec le complexe Arp2/3 ; enfin CKIP-1 147-408 présente des caractéristiques intermédiaires entre CKIP-1p28 et CKIP-1 puisqu'elle est localisée dans le cytoplasme et a conservé la capacité de former des complexes avec les protéines CP et le complexe Arp2/3 malgré l'absence d'une partie du domaine d'interaction (2^{ème} partie des résultats de ce manuscrit).

Outre des propriétés d'interaction et des localisations intracellulaires différentes, j'ai montré que les trois formes de protéines CKIP-1 sont présentes en quantités variables au cours de la différenciation musculaire. En effet, au cours de la différenciation des myoblastes C2C12 *in vitro*, la quantité CKIP-1p28 augmente fortement alors que la quantité de CKIP-1 chute drastiquement après une courte phase transitoire de hausse. Cette baisse de la quantité de CKIP-1 est concomitante à une hausse de la quantité de CKIP-1 147-408. Les mêmes variations sont observées *in vivo* concernant CKIP-1 et la forme clivée, si ce n'est que dans le muscle adulte, CKIP-1 n'est plus du tout détectée ce qui n'est pas le cas dans les myoblastes *in vitro*. Cette différence s'explique par le fait que les extraits musculaires sont réalisés sur une population de cellules dont l'immense majorité est formée par des fibres musculaires matures, tandis que même après sept jours de différenciation la population de cellules C2C12 présentait encore une fraction non négligeable de myoblastes mononucléés. La comparaison des résultats *in vitro* et *in vivo* suggèrent que CKIP-1 n'est détectable que dans les myoblastes non différenciés ou en cours de différenciation, tandis que dans les fibres matures, CKIP-1 est clivée immédiatement après sa synthèse ce qui explique que nous ne détectons plus que la forme clivée dans le muscle de souris adulte.

Enfin, nous avons montré que les quantités des protéines CKIP-1 et CKIP-1p28 exprimées par les myoblastes lors de l'initiation de la différenciation influent sur la capacité des cellules C2C12 à se différencier. La présence d'une quantité élevée de CKIP-1 et d'une quantité faible de CKIP-1p28 (obtenue par surexpression de CKIP-1 ou inhibition de l'expression de CKIP-1p28) est associée à la formation de myotubes contenant davantage de noyaux. Ceci peut s'expliquer par l'implication de CKIP-1 dans l'étape de fusion des myoblastes. En revanche, une faible quantité de CKIP-1 et une quantité élevée de CKIP-1p28 (obtenues par inhibition de l'expression de CKIP-1 ou la surexpression de CKIP-1p28) sont associées à la formation de myotubes renfermant moins de noyaux que les cellules contrôles ((Safi et al., 2004) et 2^{ème} partie des résultats de ce manuscrit). La formation de myotubes contenant un nombre réduit de noyaux a une double origine. Elle s'explique d'une part par la nécessité de CKIP-1 pour la réalisation de l'étape de fusion, et d'autre part par le fait que les cellules présentant une faible quantité de CKIP-1 possèdent des capacités migratoires réduites. Or des défauts de migration des myoblastes induisent la formation de myotubes de taille réduite (Bae et al., 2008; Jansen and Pavlath, 2006). Ainsi, les défauts de migration des myoblastes suivis des défauts de fusion liés au déficit en CKIP-1 sont à l'origine de la petite taille des myotubes formés.

La chute de la quantité de CKIP-1 au cours de la myogenèse due à son clivage tant *in vitro* qu'*in vivo* suggère que CKIP-1 n'est nécessaire sous sa forme entière que lors de la formation des fibres musculaires. Nous avons pu confirmer cette hypothèse en induisant de la régénération musculaire par injection de cardiotoxine. Cette toxine cause la dégénérescence des cellules musculaires en perméabilisant leur membrane ce qui provoque leur dépolarisation conduisant à leur mort. La régénération du muscle débute alors grâce à l'intervention des cellules satellites. Celles-ci se multiplient, migrent les unes vers les autres, fusionnent et achèvent leur différenciation en fibres musculaires qui peuvent alors remplacer les cellules détruites par l'injection de cardiotoxine. La régénération reproduit donc la myogenèse, au moins d'un point de vue structural (Harris, 2003). Les signaux déclencheurs sont, quant à eux, différents puisque la régénération par les cellules satellites est notamment activée par les cytokines libérées par les cellules inflammatoires. Suite au traitement des muscles squelettiques à la cardiotoxine, CKIP-1 est de nouveau détectable sous sa forme entière et ceci est couplé à une disparition de la forme clivée. Puis au fil du temps, nous avons assisté à la réapparition de la forme clivée de la même manière qu'elle apparaît au cours de la myogenèse. Ces résultats semblent confirmer que CKIP-1 est nécessaire au cours de la myogenèse notamment pour les étapes de migration puis de fusion des myoblastes. En

revanche, dans les fibres musculaires matures, sa présence en tant que telle ne semble plus requise puisqu'elle semble être clivée si rapidement qu'elle n'est plus détectable. Le clivage de CKIP-1 pourrait donc être considéré comme un moyen d'inhiber la protéine quand elle n'est plus nécessaire au fonctionnement de la cellule. En effet, le clivage permet de remplacer une protéine capable de transférer le complexe Arp2/3 et les protéines CP à la membrane plasmique par une protéine qui n'est plus capable de lier la membrane et qui est donc susceptible de séquestrer les complexes Arp2/3 et CP dans le cytoplasme bloquant ainsi leur effet sur le remodelage du cytosquelette cortical et de la membrane plasmique. Le fait que le clivage puisse être vu comme un moyen d'inhiber les fonctions de CKIP-1 est corroboré par l'absence de modification de la forme des cellules surexprimant CKIP-1 147-408 en présence d'insuline. En effet, suite à une stimulation à l'insuline, ces cellules ne présentent pas d'augmentation des protrusions membranaires contrairement aux cellules surexprimant la forme entière de CKIP-1. De plus, les myoblastes surexprimant CKIP-1 forment des myotubes avec une morphologie anormale. Dans ce dernier cas, l'absence de clivage de la forme surexprimée conduit à la présence anormalement prolongée de CKIP-1 au cours de la différenciation. Ceci pourrait être à l'origine d'un recrutement et de fusions anarchiques des myoblastes à l'origine de ces myotubes aux formes inhabituelles (voir plus haut). Cependant, cette vision du fonctionnement des protéines CKIP-1 qui réduit le clivage à une manière d'inhiber la forme entière peut sembler simpliste. Surtout, elle ne permet pas d'expliquer pourquoi cette inhibition par clivage a lieu spécifiquement dans les muscles striés squelettiques et pas dans les autres organes. En effet, dans les yeux par exemple, ni CKIP-1 ni une forme clivée ne sont détectables. Cette régulation de CKIP-1 par clivage spécifique aux muscles squelettiques peut constituer un moyen pour la cellule musculaire d'avoir très rapidement des protéines CKIP-1 disponibles pour une action ponctuelle comme par exemple la réparation de la membrane plasmique (voir plus bas). En effet, une simple inhibition du clivage permettrait d'obtenir immédiatement des protéines CKIP-1 fonctionnelles. Ce système de régulation par clivage permet d'éviter de passer par des étapes de transcription puis de traduction coûteuses en temps. Enfin, nous ne pouvons pour le moment pas exclure l'hypothèse selon laquelle la forme clivée a un rôle dans le muscle mature. Nous tenterons de rechercher son rôle éventuel en la surexprimant dans le muscle adulte. Mais ceci ne sera possible que lorsque nous aurons déterminé avec certitude la nature de cette forme clivée détectée *in vivo*.

CKIP-1 dans le muscle adulte de souris

J'ai ensuite poursuivi l'étude des protéines CKIP-1 dans le muscle squelettique de souris en étudiant leur localisation. J'ai montré par immunofluorescence, surexpression dans le muscle *in vivo* et purification des protéines myofibrillaires que CKIP-1p28 est associée à la fraction des protéines myofibrillaires majoritairement au niveau de la strie Z mais aussi au niveau de la ligne M. L'association de CKIP-1p28 avec les protéines des myofibrilles peut paraître étonnante compte tenu du fait que CKIP-1p28 est libre dans le cytoplasme dans les myoblastes C21C2 en cours de différenciation et qu'elle est dépourvue des domaines d'interaction avec les protéines du cytosquelette, CP et Arp2/3. Ceci suggère que la localisation de CKIP-1p28 dans le muscle adulte est due à une (des) interaction(s) avec des protéines spécifiquement retrouvées dans les fibres matures ou à des liaisons à des complexes protéiques qui ne se forment que dans les cellules musculaires matures. Cette localisation intracellulaire de CKIP-1p28 à la strie Z et à la ligne M suggère deux types de fonctions éventuelles : soit un rôle structural, soit un rôle dans la signalisation. En effet, la strie Z et la ligne M remplissent une double fonction au sein des cellules musculaires (Clark et al., 2002; Frank et al., 2006). A la strie Z, les molécules d' α -actinine associées notamment à CapZ et à la filamine constituent des points d'ancrage pour les filaments d'actine, de titine et de nébuline. De même à la ligne M, la myoméline, la M-protéine et l'obscurine servent de points d'attache aux filaments de myosine et de titine. Les protéines de la strie Z et de la ligne M assurent donc la cohésion structurale des sarcomères. Cependant d'autres protéines telles que les protéines FATZ (*γ -filamin/ABP-L, α -actinin and telethonin binding protein of the Z-disc*), la protéine kinase C, la calcineurine, la E3 ubiquitine-ligase MURF-1 ou encore la protéine pro-apoptotique Bag-1 ne remplissent aucun rôle structural mais interviennent dans la signalisation au sein de la cellule musculaire (voir les paragraphes I.B.1.d et e de l'introduction). Etant donné que la surexpression de CKIP-1p28 n'a pas déclenché de phénotype particulier dans les cellules musculaires de souris adultes, je ne dispose actuellement d'aucun argument permettant de trancher en faveur d'un rôle structural ou dans la signalisation cellulaire.

La comparaison des immunomarquages obtenus sur les protéines endogènes avec notre anticorps polyclonal de lapin anti CKIP-1 avec la localisation de la protéine surexprimée CKIP-1p28-GFP a permis de mettre en évidence un marquage spécifiquement dû à la forme clivée. En effet, les protéines CKIP-1 endogènes sont localisées à la bande I et à la ligne M, alors que CKIP-1p28-GFP est localisée à la strie Z (qui est au centre de la bande I, Figure 3 B) et à la bande M. Le marquage des extrémités de la bande I dans les immunofluorescences

contre les protéines endogènes est donc spécifiquement dû à la forme clivée de 43 kDa. Nous ne pouvons cependant pas exclure la possibilité que la forme clivée soit également localisée à la strie Z et à la bande M, comme CKIP-1p28. Cependant, la purification des protéines myofibrillaires a montré que la forme clivée n'est pas associée aux protéines sarcomériques. Donc, si cette forme clivée est présente à la strie Z et à la ligne M ce n'est pas par le biais d'une interaction avec les protéines des myofibrilles. L'étude précise de la localisation intracellulaire de la forme clivée sera réalisée par analyse de muscles la surexprimant fusionnée à la GFP, dès que ses bornes N-terminale et C-terminale auront été identifiées avec précision.

Ne pouvant pas étudier directement la forme clivée, j'ai surexprimé la protéine CKIP-1 entière dans le muscle adulte afin d'étudier l'effet d'une absence de clivage. En effet, la protéine CKIP-1 surexprimée *in vivo* n'est pas clivée comme l'est la protéine endogène. Ce résultat est conforme à l'absence de clivage des formes exogènes de CKIP-1 que nous avons observée *in vitro* et peut également s'expliquer par une saturation du système de clivage endogène par la grande quantité de CKIP-1 exogène présente. Dans le muscle adulte, CKIP-1 est localisée au plasmalemme et au niveau des triades. Et surtout, la surexpression de CKIP-1 provoque une dilatation des tubules T ainsi que la formation d'amas membranaires sous-sarcolemmaux à l'origine d'une désorganisation des sarcomères. J'ai montré par microscopie confocale et microscopie électronique à transmission que les amas membranaires induits par la surexpression de CKIP-1 sont majoritairement formés par une accumulation de membranes intracellulaires alors que la membrane plasmique n'en constitue qu'une part peu importante. La formation de ces amas ne correspond pas à une simple relocalisation du réseau membranaire interne puisque les amas de membranes provoquent des renflements des cellules qui les contiennent, suggérant que CKIP-1 provoque une augmentation de la quantité de membranes internes peut-être en influant sur le trafic intracellulaire. En effet, j'ai montré que, *in vitro*, CKIP-1 est nécessaire à la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Ces données sont cohérentes avec le fait que CKIP-1 avait déjà été observée sur des vésicules intracellulaires ((Safi et al., 2004) et 3^{ème} partie des résultats de ce manuscrit).

Les capacités de CKIP-1 à réguler le remodelage du cytosquelette d'actine peuvent expliquer son implication dans le trafic intracellulaire. En effet, le cytosquelette d'actine a été impliqué dans de nombreuses étapes du trafic intracellulaire. Ainsi, la polymérisation de l'actine par le complexe Arp2/3 intervient dans l'endocytose des vésicules à puits recouvert de clathrine, l'endocytose dépendante de la cavéoline, la phagocytose, la macropinocytose, la propulsion des endosomes (*actin rocketting*) et le bourgeonnement de vésicules de transport à

partir des endosomes (Derivery et al., 2009; Kaksonen et al., 2006; Morel et al., 2009; Robertson et al., 2009). Le cytosquelette d'actine agit soit en participant à la déformation de la membrane nécessaire à l'invagination de la membrane plasmique ou au bourgeonnement depuis les vésicules intracellulaires, soit en fournissant la force nécessaire à la scission de la vésicule de sa membrane d'origine, soit enfin en servant de moteur au déplacement des vésicules via la formation d'un réseau d'actine contre la membrane de l'organite. Etant donné que CKIP-1 a été localisée à la membrane plasmique et autour de vésicules intracellulaires, et qu'elle interagit avec le complexe Arp2/3 et les protéines CP, CKIP-1 pourrait être impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine au cours de l'une ou de chacune de ces étapes ((Bosc et al., 2000; Canton et al., 2005; Litchfield et al., 2001; Olsten et al., 2004; Safi et al., 2004; Zhang et al., 2006) et 1^{ère} et 2^{ème} parties des résultats de ce manuscrit). Ceci expliquerait pourquoi l'absence de CKIP-1 provoque un ralentissement de l'endocytose du récepteur à la transferrine.

Le fait que CKIP-1 soit impliquée dans le trafic intracellulaire *in vitro* et *in vivo*, et que sa surexpression induise une dilatation des tubules T nous pousse à proposer l'hypothèse d'une implication de CKIP-1 dans la mise en place du réseau membranaire interne du muscle strié squelettique au cours de la myogenèse. En effet, la mise en place de ce réseau membranaire implique notamment l'expansion du réticulum sarcoplasmique par extension et déformation de sa membrane, et l'invagination de la membrane plasmique à l'origine de la formation des tubules T (Takekura et al., 2001). L'implication du cytosquelette d'actine dans le déroulement de ces événements n'a pour l'instant pas été démontrée dans les cellules musculaires, cependant des preuves de la nécessité du cytosquelette d'actine ont été démontrées dans d'autres types cellulaires (Bu et al., 2010 ; Derivery et al., 2009). En outre, le profil d'expression de CKIP-1 au cours de la myogenèse *in vivo* est tout à fait compatible avec un rôle dans ce processus. CKIP-1 est effectivement détectée pendant la totalité de la période du développement correspondant à la mise en place de ce système membranaire. Elle est détectée en grande quantité, dans les muscles embryonnaires de souris, de E14 à la naissance, ce qui correspond à la période d'élongation des tubules T et du développement du réticulum sarcoplasmique (Takekura et al., 2001). Puis la quantité de CKIP-1 détectée diminue progressivement jusqu'à disparaître entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine post-natale. Cette période correspond à la phase de maturation des triades, qui se traduit essentiellement par leur réorientation. L'ensemble de ces arguments plaide en faveur d'une possible intervention de CKIP-1 dans la mise en place du réseau membranaire interne du muscle strié squelettique.

Les amas de membranes sous-sarcolemmaux induits par CKIP-1 rappellent enfin les amas de vésicules observés dans les souris *Dysferline*^{-/-} (Selcen et al., 2001). La dysferline est impliquée dans le système de réparation des lésions membranaires qui apparaissent dans les cellules musculaires au cours des phases de contraction/étirement. La réparation est obtenue par le transport de vésicules intracellulaires vers le lieu de la blessure. Puis une fois sur place, ces vésicules fusionnent avec la membrane lésée ce qui permet de combler les interruptions du sarcolemme. Cette étape de fusion est sous la dépendance de la dysferline (Bansal et al., 2003). On peut imaginer que CKIP-1 intervient dans le transport des vésicules intracellulaires vers la zone lésée. En conditions normales, CKIP-1 est clivée quasiment instantanément après sa traduction ce qui explique qu'elle ne soit pas détectée. En revanche, en cas de blessures de la membrane plasmique, le clivage pourrait être temporairement stoppé. CKIP-1 serait alors présente sous sa forme entière et pourrait intervenir dans le trafic des vésicules vers la membrane. Ainsi, la surexpression de CKIP-1 permettrait de mimer la réponse de la fibre à une blessure ce qui pourrait expliquer les amas de membranes retrouvés sous le sarcolemme. Il serait donc intéressant d'étudier l'éventuelle implication de CKIP-1 dans la réparation du sarcolemme. D'autant plus que l'annexine A2 a été identifiée par spectrométrie de masse dans des co-immunoprécipitats de CKIP-1 endogène à partir de lysats de cellules C2C12 (données non montrées). Or les annexines sont des protéines ubiquitaires qui ont été impliquées dans la réparation de la membrane plasmique. Elles se fixent aux phospholipides membranaires de manière dépendante du calcium et sont impliquées dans le trafic vésiculaire. Il a été montré que leur expression est augmentée dans les muscles de patients atteints de dysferlinopathies (Lennon NJ, J Biol Chem 2003). Lennon *et al.* ont montré que les annexines A2 et A1 colocalisent et interagissent avec la dysferline à la membrane plasmique en présence de calcium ou suite à une lésion de la membrane plasmique. En effet, en conditions physiologiques, la survenue de lésions membranaires cause une hausse de la concentration cytosolique en calcium due à une entrée du calcium extracellulaire dans la cellule. Les auteurs proposent que les annexines pourraient être impliquées dans la réparation membranaire par l'agrégation de vésicules intracellulaires qui seraient recrutées aux sites de lésions membranaires par l'interaction annexine-dysferline. Dans ce modèle, CKIP-1 pourrait faciliter le ciblage de ces vésicules par son action sur le cytosquelette d'actine et sa participation à un complexe protéique incluant certaines annexines.

La poursuite des études *in vivo* de *Ckip-1* : génération d'une souris *knockout* conditionnel

L'ensemble des résultats que nous avons obtenu sur les protéines CKIP-1 a permis de démontrer ou de suggérer les fonctions suivantes pour CKIP-1 : migration des myoblastes, fusion des myoblastes, mise en place du réseau membranaire intracellulaire de la cellule musculaire, réparation du sarcolemme. Toutes ces fonctions sont en adéquation avec (1) les capacités de CKIP-1 à se fixer à la membrane plasmique et à réguler le cytosquelette d'actine, (2) le profil protéique de CKIP-1 au cours de la myogenèse et en réponse à une dégénérescence du muscle adulte. Afin de tester ces fonctions proposées pour CKIP-1, nous avons voulu étudier les muscles squelettiques de la lignée de souris *Ckip-1^{-/-}* générée par le groupe de F. He (Lu et al., 2008). Ces souris naissent en bonne santé, selon les ratios mendéliens attendus, ne présentent pas de défaut apparent de croissance et sont fertiles. En revanche, elles subissent une augmentation de leur masse osseuse qui s'accroît avec l'âge. Ce défaut est dû à une ostéogenèse accélérée liée à une diminution de l'activité de l'E3-ubiquitine ligase Smurf1. L'absence de défaut de croissance apparent suggère que les muscles squelettiques se sont développés. Ces résultats semblent en désaccord avec les importants défauts morphologiques observés dans les embryons de poisson zèbre morphants *Ckip-1*. Ces divergences entre les deux modèles peuvent être dues à une redondance des fonctions remplies par CKIP-1 chez la souris mais pas chez le poisson zèbre. Cependant, au cours de l'étude de Lu K, *et al*, les muscles des souris *Ckip-1^{-/-}* n'ont pas été étudiés à l'échelle tissulaire ou cellulaire (Lu et al., 2008) ; et nous n'avons pas pu le faire de notre côté (le groupe de F. He ayant refusé de nous envoyer des souris *Ckip-1^{-/-}* ou même leurs muscles). Ainsi, rien n'indique que les muscles de ces souris KO n'ont aucun défaut. En outre, un autre argument motive l'étude de ces muscles. En effet, Lu K, *et al* ont expliqué les défauts osseux des souris *Ckip-1^{-/-}* par une activation de l'ostéogenèse due à l'absence de stimulation de l'activité E3-ubiquitine ligase de Smurf1, celle-ci étant dépendante de l'interaction de Smurf1 avec CKIP-1 (Lu et al., 2008). Or Smurf1 a également été impliqué dans la différenciation des cellules musculaires (Ying et al., 2003). Smurf1 est en effet nécessaire à la différenciation myogénique des myoblastes C2C12 et inhibe leur conversion en ostéoblastes médiée par BMP-2 (bone morphogenetic protein-2). Ainsi la surexpression de Smurf1 dans des myoblastes C2C12 accélère la différenciation et augmente l'expression de la myogénine. Ces effets rappellent ceux induits par la surexpression de CKIP-1 (Safi et al., 2004). L'activation de Smurf1 par CKIP-1 permettrait ainsi d'expliquer les effets positifs de CKIP-1 sur la différenciation musculaire qui sont indépendants du cytosquelette d'actine comme l'activation

de l'expression du marqueur précoce de différenciation qu'est la myogénine. La régulation de Smurf1 par CKIP-1 constitue donc un argument supplémentaire en faveur de l'implication de CKIP-1 dans la différenciation musculaire.

Nous avons donc décidé de générer une lignée de souris *knockout* conditionnel pour *Ckip-1* afin de tester les fonctions proposées pour CKIP-1 spécifiquement dans le muscle strié squelettique. Dans cette lignée, l'exon 3 de *Ckip-1* sera flanqué par des séquences *LoxP*. Les souris homozygotes *Ckip-1^{lox/lox}* seront ensuite croisées avec des souris HSA-Cre-ER^{T2} (*human α -skeletal actin* - Cre-estrogen receptor^{T2}) dans lesquelles l'expression de la recombinaise Cre-ER^{T2}, dont l'action est dépendante du tamoxifène, est sous le contrôle d'un promoteur spécifique du muscle squelettique (Schuler et al., 2005). Ces croisements permettront de supprimer l'expression des protéines CKIP-1 de manière contrôlée aussi bien spatialement (via le promoteur HSA) que temporellement (via la dépendance de l'activité de la recombinaise Cre au tamoxifène). L'effet de la perte des protéines CKIP-1 au cours des différentes étapes de la myogenèse et à l'âge adulte pourra ainsi être testé. Le principal défaut de ces souris est qu'elles ne permettront pas de distinguer, au cours de la myogenèse, les effets spécifiquement dus à l'absence de CKIP-1 des effets spécifiquement dus à l'absence de CKIP-1p28. En revanche à l'âge adulte, l'étude de la fonction des différentes formes pourra être réalisée en électroporant l'une ou l'autre forme dans les souris aux muscles striés KO pour *Ckip-1*.

CKIP-1 et les myopathies caractérisées par des défauts membranaires

L'ensemble des données que nous avons obtenues sur CKIP-1, et notamment les données obtenues *in vivo*, rappelle de manière frappante les résultats concernant la myotubularine MTM1. MTM1 est une phosphatase qui reconnaît les phosphatidylinositol 3-monophosphates (PI(3)P) et les phosphatidylinositol 3,5-bisphosphates (PI(3,5)P₂) et les transforme en PI et PI(5)P. *In vitro*, MTM1 est localisée à la membrane plasmique et à la surface des endosomes dont elle régule le trafic probablement en régulant les phosphoinositides membranaires (Cao et al., 2007; Kim et al., 2002; Laporte et al., 2002; Tsujita et al., 2004). En outre, sa surexpression induit la formation de protrusions membranaires telles que des lamellipodes et des filopodes. Dans le muscle strié squelettique, MTM1 est localisée au sarcolemme et au niveau des triades, et sa surexpression provoque l'accumulation dans les fibres musculaires de saccules et vacuoles membranaires positives pour des marqueurs du sarcolemme (Buj-Bello et al., 2008). Au contraire, l'absence de MTM1 dans les souris KO *Mtm1* se traduit par des défauts d'organisation des tubules T

associés à des défauts de couplage excitation-contraction (Al-Qusairi et al., 2009). Al-Qusairi *et al.* suggèrent donc que MTM1 est impliquée dans l'organisation structurale de la machinerie de couplage excitation-contraction à la membrane des tubules T ou du réticulum sarcoplasmique. Toutes ces caractéristiques sont retrouvées avec CKIP-1 hormis une différence majeure : CKIP-1 n'a aucune activité enzymatique. Il est cependant intéressant de noter que les PI(3)P auxquels se fixe le domaine PH de CKIP-1 font partie des phosphatidylinositol phosphates ciblés par MTM1. Et ainsi, la co-transfection de MTM1 avec CKIP-1 provoque la relocalisation de ce dernier de la membrane plasmique vers le cytoplasme, alors qu'une co-transfection avec une forme mutée de MTM1 dépourvue d'activité phosphatase (MTM1 C375S) n'a pas d'effet sur la localisation membranaire de CKIP-1 (Safi et al., 2004). Ainsi, non seulement CKIP-1 et MTM1 possèdent des caractéristiques et fonctions communes, mais en plus les deux protéines se fixent aux mêmes sites membranaires. MTM1 a été initialement identifiée chez des patients souffrant de myopathie centronucléaire (CNM, *centronuclear myopathy*) (Laporte et al., 1996). Les CNM sont des myopathies congénitales sévères associées à une faiblesse musculaire généralisée et une hypotonie dès la naissance. L'étude histopathologique des muscles squelettiques des patients a révélé la présence de petites fibres rondes portant des noyaux centraux. Récemment, l'étude immunohistologique de biopsies musculaires de patients a révélé que les CNM sont également associées à une désorganisation des éléments de la triade (Toussaint et al., 2010). Il existe trois formes de CNM : l'XLCNM causée par des mutations dans *MTM1*, des CNM autosomales dominantes causées par des mutations dans *DNM2*, et des CNM autosomales récessives causées par des mutations dans *BINI* (Bitoun et al., 2005; Laporte et al., 1996; Nicot et al., 2007). Cependant, il existe des cas de CNM dont l'origine moléculaire est inconnue puisqu'ils ne présentent pas de mutation dans ces trois gènes (Jungbluth et al., 2009). Compte tenu des grandes similarités observées entre les effets *in vitro* et *in vivo* de CKIP-1 et de MTM1, nous avons initié une collaboration avec l'équipe du Dr Jocelyn Laporte qui a mis en place un projet de séquençage haut débit afin d'identifier de nouveaux gènes mutés chez des patients souffrant de CNM. *CKIP-1* a été inclus dans la liste des gènes à séquencer chez les patients ne présentant pas de mutation dans les gènes *MTM1*, *DNM2* et *BINI*. Le séquençage concerne aussi deux familles de patients souffrant de myopathie à agrégats tubulaires. Ces myopathies sont caractérisées par une faiblesse musculaire généralisée associée à la présence d'agrégats de tubules membranaires au sein des cellules musculaires (Pavlovicova et al., 2003). L'origine de ces agrégats est encore mal connue : ils pourraient être issus d'une expansion anormale des tubules T, du réticulum sarcoplasmique ou

même des mitochondries. Pour l'instant, aucune mutation n'a été mise en évidence dans *CKIP-1* chez les patients dont les gènes candidats ont été séquencés. Cependant, les résultats obtenus sur les muscles surexprimant CKIP-1 ont montré qu'une variation du niveau d'expression de CKIP-1 était suffisante pour induire la formation de figures pathologiques dans les cellules musculaires. Le niveau d'expression des protéines CKIP-1 a donc été analysé par western blot à l'IGBMC dans des lignées de lymphocytes immortalisées de patients. Certaines lignées ont présenté des variations de la quantité de CKIP-1 produite (données non montrées). Cependant le niveau d'expression de CKIP-1 étant dépendant des conditions de culture, de la densité et de l'état prolifératif des cellules, ces différences peuvent être dues à des facteurs externes et ne pas refléter une réelle modification de l'expression de CKIP-1 spécifique de la lignée cellulaire étudiée. L'étude des quantités et de la nature des protéines CKIP-1 (CKIP-1, forme clivée, CKIP-1p28) présentes dans des biopsies musculaires de patients serait par conséquent beaucoup plus informative. Malheureusement, nous n'avons pour l'instant pas eu accès à ces biopsies.

CKIP-1 et CK2 : un rôle dans le muscle strié squelettique ?

De manière étonnante, nous n'avons jamais détecté CK2 parmi les interacteurs de CKIP-1 dans les myoblastes ou les myotubes C2C12. Pourtant, le patron d'expression de CK2 déterminé par Northern blot est très semblable à celui de CKIP-1 : CK2 est majoritairement exprimée dans les muscles squelettiques et le cœur, ce qui suggère que les protéines CKIP-1 et CK2 coexistent dans ces deux tissus (Bosc et al., 2000). En outre de nombreux arguments suggèrent que CK2 est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine. CK2 co-immunoprécipite avec la sous-unité Arc35p (*actin-related protein 2/3 complex subunit 35 kD*, qui correspond à la sous-unité ARPC2 chez l'homme) du complexe Arp2/3 dans les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Schaerer-Brodbeck and Riezman, 2003). Cette co-immunoprécipitation n'est pas due à une interaction directe entre les deux protéines : le complexe qu'elles forment est dépendant de la présence de la calmoduline. Ensuite, CK2 phosphoryle WASP ce qui augmente son interaction avec le complexe Arp2/3 conduisant à une augmentation de la polymérisation de l'actine (Cory et al., 2003). Et enfin, CK2 interagit en double hybride avec la protéine de coiffe CP α et augmente l'inhibition par CKIP-1 de l'activité de coiffe des protéines CP (Canton et al., 2005). Ce dernier effet de CK2 est indépendant de son activité kinase. Tous ces résultats montrent que CK2 joue clairement un rôle, même s'il est pour l'instant mal compris, dans la régulation du cytosquelette d'actine. De plus cette régulation du cytosquelette d'actine par CK2 se fait par l'intermédiaire des deux

interacteurs de CKIP-1, le complexe Arp2/3 et les protéines CP. Enfin, une étude récente a démontré le rôle de CK2 dans la maintenance des myofibrilles des muscles striés (Iskratsch et al., 2010). CK2 phosphoryle un variant d'épissage de la formine FHOD3 (*formin homology domain-containing protein-3*) spécifique des muscles striés. Les membres de la famille des formines forment des filaments d'actine non branchés en stimulant la polymérisation de l'actine à l'extrémité barbue des filaments. La phosphorylation de FHOD3 par CK2 empêche son recrutement aux autophagosomes et permet son ciblage à la strie Z des myofibrilles dans les cardiomyocytes. La présence de FHOD3 assure le maintien de l'intégrité des myofibrilles. CK2 est donc également impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine dans les muscles striés. Cependant, les formes de CKIP-1 détectées dans le muscle adulte sont dépourvues du domaine PH qui est requis pour l'interaction avec CK2 (Olsten et al., 2004). Par conséquent, si l'interaction entre CK2 et CKIP-1 existe dans le muscle squelettique, elle peut avoir lieu pendant la myogenèse et pendant les phases de régénération du muscle. En effet, dans le muscle adulte sain, CKIP-1 est très rapidement clivé, de plus sa localisation intracellulaire est différente de celle de CK2. L'éventuelle interaction entre CKIP-1 et CK2 dans le muscle strié squelettique, qui ne pourrait avoir lieu que dans des fenêtres de temps réduites, et son rôle putatif dans la formation ou le maintien des muscles striés squelettiques restent à étudier.

Mes travaux de thèse ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires expliquant les rôles de CKIP-1 dans la régulation du cytosquelette d'actine (Figure 36). J'ai en outre avancé la caractérisation d'une forme clivée de CKIP-1 spécifiquement retrouvée dans les muscles squelettiques. L'ensemble des travaux que j'ai réalisés *in vitro* et *in vivo* a ainsi permis de révéler ou de suggérer de nouvelles fonctions pour les protéines CKIP-1 en lien avec le remodelage du cytosquelette d'actine et des membranes du muscle strié squelettique. L'étude de ces fonctions pourra être poursuivie grâce à l'analyse de la lignée de souris présentant une inactivation de *Ckip-1* spécifique du tissu musculaire strié squelettique.

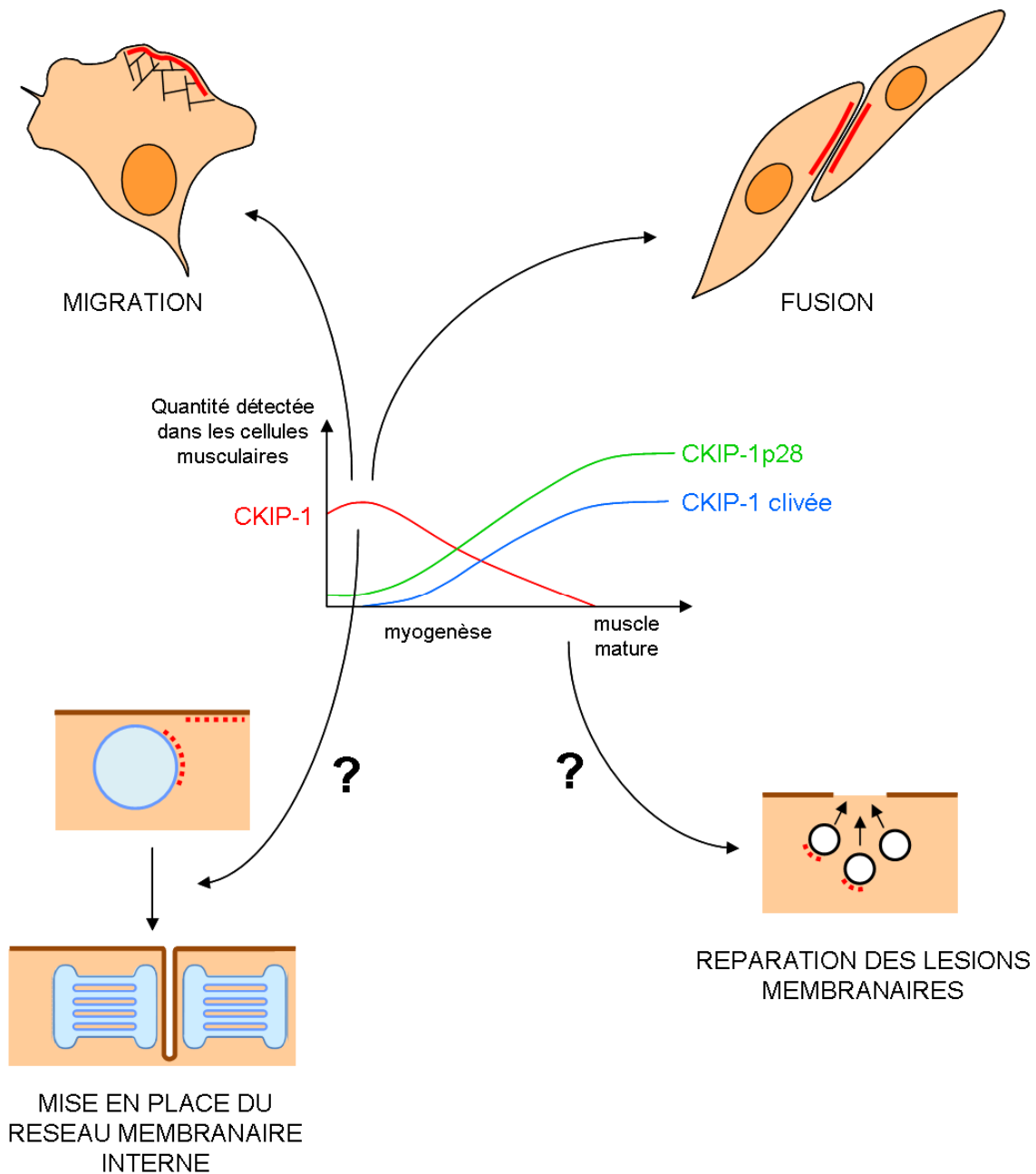


Figure 39 : Rôles de CKIP-1 dans le muscle strié squelettique

Différentes formes de protéines CKIP-1 sont détectées au cours de la vie du muscle strié squelettique et présentent des localisations intracellulaires et des interacteurs différents.

Au cours de la myogenèse, CKIP-1 intervient dans la migration et la fusion des myoblastes grâce à ses capacités à réguler l'organisation de l'actine corticale.

Nos résultats montrent également que CKIP-1 est capable de remodeler les membranes et de réguler le trafic intracellulaire. Elle pourrait donc participer à la mise en place du réseau membranaire interne lors de la myogenèse en participant à la déformation de la membrane plasmique et/ou du réticulum sarcoplasmique. Enfin, CKIP-1 pourrait être impliquée dans le processus de réparation des lésions membranaires en participant au trafic des vésicules membranaires vers le site de lésion de la membrane plasmique.

(Les lignes rouges et les tirets rouges représentent, respectivement, les localisations intracellulaires observées et potentielles de CKIP-1 dans les différents processus présentés.)

Matériel et méthodes

I/ Lignée cellulaire, conditions de culture

La lignée cellulaire C2C12 est une lignée de myoblastes dérivée de cellules satellites de souris. La culture des cellules se fait à 37°C sous 5% de CO₂. Les cellules sont maintenues à l'état de myoblastes en milieu de croissance (Growth Medium, GM) : Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAA), complété avec 15% de sérum de veau fœtal (HyClone). La différenciation des myoblastes en myotubes est déclenchée en milieu de différenciation (Differentiation Medium, DM) : milieu DMEM complété avec 2% de sérum de cheval (Gibco BRL).

II/ Construction des vecteurs d'expression, shRNA, siRNA et transfection

II.A/ Réalisation des constructions

Toutes les constructions ont été réalisées avec la Taq Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Roche), à l'exception des mutations ponctuelles qui ont été réalisées avec la *Pfu* DNA Polymerase (Promega) selon les instructions des fabricants. Les produits de PCR obtenus ont été purifiés sur gel à l'aide du kit Nucleospin[®] Extract II (Macherey-Nagel). Pour les clonages par digestion-ligation, les enzymes de restriction ont été utilisées dans les conditions préconisées par le fournisseur (New England BioLabs[®]) pour digérer le produit de PCR purifié et le vecteur de destination. Puis, après purification sur gel du produit de PCR et du vecteur de destination digérés, les ligations ont été réalisées avec la T4 DNA ligase (New England Biolabs[®]). Chaque construction a été vérifiée par séquençage (réalisé par la société Beckman Coulter Genomics).

La construction M2-CKIP-1 a été décrite dans (Safi et al., 2004). Le cDNA codant pour M2-CKIP-1 a été obtenu par PCR avec les oligonucléotides suivants : 5' GGTACCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGAATTCAAGAAGAGCG GCTCC 3' (oligonucléotide sens avec un site KpnI, une séquence Kozak consensus, un codon ATG, la séquence du flag M2, un site *EcoR* I, et les 15 premiers nucléotides de CKIP-1 à l'exception du codon ATG), 5' CAATCAGCGGCCGCACTAGTCTCGAGTTTTTTT (oligonucléotide antisens avec un site *Not* I, et 19 nucléotides situés à 125 paires de bases en

3' du codon TGA de CKIP-1). Le produit de PCR a ensuite été cloné entre les sites *Kpn* I et *Not* I du vecteur pcDNA3 (Invitrogen™).

La construction M2-CKIP-1 a servi de matrice pour la réalisation des formes délétées de CKIP-1, taggées avec le flag M2 en N-terminal, qui ont été obtenues par PCR avec l'oligonucléotide antisens 5' CAATCAGCGGCCGCACTAGTCT 3', et les oligonucléotides sens suivants comportant un site *Eco*R I suivi de 15 à 22 nucléotides de la séquence de CKIP-1 à la position voulue :

- M2-CKIP-1 Δ 1-131

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCAGAGCTAAAAACCGTATCTTGG 3'

- M2-CKIP-1 Δ 1-136

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCATCTTGGATGAGGTCACCG 3'

- M2-CKIP-1 Δ 1-141

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCACCGTTGAGGAGGACAG 3'

- M2-CKIP-1 Δ 1-146

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCAGCTATCTTGCCCACCCTA 3'

- M2-CKIP-1 Δ 1-151

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCCTACTCGAGACAGAGC 3'

- M2-CKIP-1 Δ 1-156

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCGCAAAAATCCAACACTCCC 3'

- M2-CKIP-1 Δ 1-161

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCTCCCGCCGTCCTCCA 3'

- M2-CKIP-1 Δ 1-166

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCACCCGGGGACACCTC 3'.

Les produits de PCR obtenus ont été clonés entre les sites *Eco*R I et *Not* I de la construction M2-CKIP-1, à la place du CKIP-1 sauvage, après le flag M2.

Les constructions CKIP-1-M2 et CKIP-1 147-408-M2 ont été obtenues par PCR en utilisant la construction M2-CKIP-1 comme matrice, les oligonucléotides sens 5' CGCGCGAAGCTTCCGCCATGAAGAAGAGCG 3' et 5' CGCGCGAAGCTTCCACCA TGAGCTATCTTGCCCACCCTAC 3', respectivement, et l'oligonucléotide antisens 5' CGCGCGGAATTCTCACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCATCAGGCTCTTCCGGT

ATTG 3'. Les produits de PCR obtenus ont été clonés entre les sites *Hind* III et *Eco*R I du vecteur pcDNA3 (Invitrogen™).

Les formes tronquées de CKIP-1 correspondant aux produits de clivages potentiels par les caspases ont été obtenues par PCR en utilisant la construction M2-CKIP-1 comme matrice et les oligonucléotides suivants :

- CKIP-1 74-408

oligonucléotide sens :

5' CGCGCGGAATTCCCACCATGTATGAGAAGTGCGAAGAGCTC 3'

oligonucléotide antisens : 5' CAATCAGCGGCCGCACTAGTCT 3'

- CKIP-1 140-408

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCCCACCATGGAGGTCACCGTTGAGGAG 3'

oligonucléotide antisens : 5' CAATCAGCGGCCGCACTAGTCT 3'

- CKIP-1 147-408

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCCCACCATGAGCTATCTTGCCCACCCTA 3'

oligonucléotide antisens : 5' CAATCAGCGGCCGCACTAGTCT 3'

- CKIP-1 156-408

oligonucléotide sens :

5' CGCGCGGAATTCCCACCATGAGAGCAAAAATCCAACACTCC 3'

oligonucléotide antisens : 5' CAATCAGCGGCCGCACTAGTCT 3'

- CKIP-1 1-279

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCCCGCCATGAAGAAGAGCG 3'

oligonucléotide antisens : 5' CGCGCGGCGGCCGCTCAGTCCCTCTGGGATAGGATC 3'

- CKIP-1 1-309

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCCCGCCATGAAGAAGAGCG 3'

oligonucléotide antisens : 5' CGCGCGGCGGCCGCTCAGTCCTGGATCCGGGAC 3'

- CKIP-1 1-344

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGGAATTCCCGCCATGAAGAAGAGCG 3'

oligonucléotide antisens : 5' CGCGCGGCGGCCGCTCAGTCGGGTGGAGACTGTG 3'.

Les produits de PCR obtenus ont été clonés entre les sites *Eco*R I et *Not* I du vecteur pcDNA3.

La construction CKIP-1-Cherry a été obtenue par PCR en utilisant la construction M2-CKIP-1 comme matrice et les oligonucléotides suivants : oligonucléotides sens 5' CGCGCGAGATCTCCACCATGAAGAAGAGCGGCTC 3', oligonucléotide antisens : 5' CGCGCGAAGCTTCATCAGGCTCTTCCGG 3'. Le produit de PCR obtenu a été cloné entre les sites *Bgl* II et *Hind* III du vecteur pmCherry-N1 (Clontech).

Les constructions PH_{CKIP-1}-Cherry, CKIP-1 Δ 1-131-Cherry, et Myr-CKIP-1 Δ 1-131-Cherry correspondant respectivement au domaine PH de CKIP-1, à CKIP-1 dépourvu de son domaine PH, et à CKIP-1 dépourvu de son domaine PH précédé de la séquence de myristoylation de v-Src (Georgescu et al., 2000; Olsten et al., 2004) fusionnés à la protéine mCherry, ont été obtenues par PCR en utilisant la construction CKIP-1-Cherry comme matrice et les oligonucléotides suivants :

- PH_{CKIP-1}-Cherry

oligonucléotide sens : 5' CGCGCGAGATCTCCACCATGGCGCCCGAGAAGGTC 3'

oligonucléotide antisens : 5' CGCGCGAAGCTTGGTAATGGCAGAACTCAGG 3'

- CKIP-1 Δ 1-131-Cherry

oligonucléotide sens :

5' CGCGCGAGATCTCCACCATGAGAGCTAAAAACCGTATCTTG 3'

oligonucléotide antisens : 5' CGCGCGAAGCTTCATCAGGCTCTTCCGG 3'

- Myr-CKIP-1 Δ 1-131-Cherry

oligonucléotide sens : 5'

GCGCGCAGATCTCCACCATGGGTAGCAGCAAGAGCAAGCCCAAGGATCCCAGCC
AGCGGAGAGCTAAAAACCGTATCTTGGATGAG 3'

oligonucléotide antisens : 5' CGCGCGAAGCTTCATCAGGCTCTTCCGG 3'.

Les produits de PCR obtenus ont été clonés entre les sites *Bgl* II et *Hind* III du vecteur pmCherry-N1.

La construction EGFP-CKIP-1 a été obtenue par PCR en utilisant la construction CKIP-1-Cherry comme matrice, l'oligonucléotide sens 5' CGCGCGAGATCTATGAAGAA GAGCGGCTCC 3' et l'oligonucléotide antisens 5' CGCGCGAAGCTTTACATCAGGCT CTTCCGG 3'. Le produit de PCR obtenu a été cloné entre les sites *Bgl* II et *Hind* III du vecteur pEGFP-C1 (Clontech).

Les constructions CKIP-1-GFP et CKIP-1p28-GFP ont été réalisées à l'aide du système Gateway[®] (Invitrogen[™]) selon les instructions du fabricant. CKIP-1 et CKIP-1p28 ont été amplifiés par PCR en utilisant la construction M2-CKIP-1 comme matrice, l'oligonucléotide antisens 5' GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGTACATCAGGCTCTTCCGGTA 3' et les oligonucléotides sens 5' GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGAAGAAGAGCGGCTCC 3' et 5' GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGCATGGCTGTGGCTTCGAC 3', respectivement. Les produits de PCR obtenus ont été clonés dans le vecteur donneur pDONR[™]223, puis transférés du vecteur d'entrée au vecteur de destination pcDNA[™]-DEST47.

Le mutant CKIP-1 R154-156E (mutant n'interagissant pas avec CP (Canton et al., 2006)) a été généré par PCR avec l'oligonucléotide sens 5' CCTACTGAAGACG AAGCAAAAATCCAACACTCCCGCCGTCCTC 3' et l'oligonucléotide antisens 5' TTTTGCTTCGTCTTCAGTAGGGTGGGCAAGATAGCTGTCCTCCTC 3'.

Le mutant CKIP-1 M172L (mutant dont le codon ATG de CKIP-1p28 a été muté en TTG) a été généré par PCR avec l'oligonucléotide sens 5' CAACCCGGGGACACCTTTG GCTGTGGCTTCGAC 3' et l'oligonucléotide antisens 5' GTCGAAGCCACAGCCAAGAG GTGTCCCCGGGTTG 3'.

Le mutant CKIP-1 D146A (mutant dont le site de clivage par les caspases 143-VEED-146 a été muté en 143-VEEA-146) a été généré par PCR avec l'oligonucléotide sens 5' CCGT TGAGGAGGCCAGCTATCTTGC 3' et l'oligonucléotide antisens 5' GCAAGATAGCTGG CCTCCTCAACGG 3'.

Les constructions GFP-Rab4a, GFP-Rab8, GFP-Rab11 d'une part, et GFP-Rab5a et GFP-Rab7 d'autre part, nous ont été aimablement fournies respectivement par les Dr Philippe Chavrier et Monique Arpin (Institut Curie, Paris, France).

II.B/ shRNA

L'inhibition de l'expression de CKIP-1p28 a été réalisée par shRNA (*short hairpin RNA*). Trois shRNA correspondant à trois séquences cibles ont été testées. Les séquences cibles ont été choisies, selon la méthode de Genscript, dans la région commune à CKIP-1 et à CKIP-1p28. Le shRNA1, le shRNA2 et le shRNA3 ciblent les nucléotides 381 à 401, 591 à 609, et 777 à 795, respectivement. Les shRNAs ont été commandés sous forme d'oligonucléotides à hybrider. La séquence complète d'un oligonucléotide de sens comprend de 5' vers 3' : la séquence cible, une boucle TTCAAGAGA, la séquence antisens complémentaire de la cible et un signal de terminaison de la transcription (6 T). L'oligonucléotide antisens est complémentaire de l'oligonucléotide sens, à l'exception de ses extrémités. En effet, les extrémités des oligonucléotides sens ont été dessinées de sorte que leur hybridation génère un site *BamH I* en 5' et un site *HindIII* en 3'.

Les séquences des différents oligonucléotides sont les suivantes :

- shRNA1 sens : 5' GATCCCGTTAGCTCTGGTAATGGCAGAATTGATATCCGT
TCTGCCATTACCAGAGCTAATTTTTTCCAAA 3'

- shRNA1 antisens : 5' AGCTTTTGGAAAAAATTAGCTCTGGTAATGGCAGAAC
GGATATCAATTCTGCCATTACCAGAGCTAACGG 3'

- shRNA2 sens : 5' GATCCCAGCACAAGAGGCTGGCTCCTTGATATCCGGGAG
CCAGCCTCTTGTGCTTTTTTCCAAA 3'

- shRNA2 antisens : 5' AGCTTTTGGAAAAAAGCACAAGAGGCTGGCTCCCG
GATATCAAGGAGCCAGCCTCTTGTGCTGG 3'

- shRNA3 sens : 5' GATCCCGCTTCTCTGTACTGGGGAAGTTGATATCCGGTTC
CCCAGTACAGAGAAGTTTTTCCAAA 3'

- shRNA3 antisens : 5' AGCTTTTGGAAAAAAGTTCTCTGTACTGGGGAACCGG
ATATCAAGTTCCCAGTACAGAGAAGCGG 3'

L'hybridation des oligonucléotides complémentaires est obtenue par chauffage à 95°C pendant 10 min en SSC (*saline sodium citrate*) 1X suivi d'un refroidissement lent à température ambiante. Le fragment d'ADN double-brin obtenu est ensuite cloné entre les sites *Hind III* et *BamH I* du vecteur pRNAT H1.1/Neo qui code pour la GFP (*green fluorescent protein*).

II.C/ siRNA

L'inhibition de l'expression de CKIP-1 a été réalisée à l'aide de 3 Stealth RNAi™ siRNAs (Invitrogen™) ciblant des séquences sélectionnées par Invitrogen™ dans le cadre ouvert de lecture de *Ckip-1* :

- siRNA 1 : CCUCAUGGCUGUGGCUUCGACCUCU (nucléotides 510 à 534)
- siRNA 2 : CCUCAGAUGGGAUGCUAACAUUAGA (nucléotides 536 à 560)
- siRNA 3 : GAUCCAGGACCUGGUAGCAAGGAAA (nucléotides 918 à 942).

Les 3 siRNAs ont été commandés sous forme de duplex sens/antisens préhybridés.

Un siRNA ne ciblant aucune séquence dans le transcriptome des vertébrés, n'induisant pas de réponse au stress, et présentant un taux de GC compris entre 45 et 55% (Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Medium GC (Invitrogen™)) a été utilisé comme contrôle.

II.D/ Transfection

La transfection de constructions plasmidiques dans les myoblastes C2C12 a été réalisée à l'aide de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) selon les instructions du fabricant mais en adaptant les quantités de réactifs utilisés (1 µg d'ADN et 3 µL de Lipofectamine™ 2000 pour un puits de 35 mm de diamètre).

La transfection des siRNAs a été réalisée à l'aide de Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen™). 30000 myoblastes C2C12 sont ensemencés dans un puits de 35 mm de diamètre 3h avant la première transfection. Les cellules sont alors transfectées selon les instructions du fabricant : 40 pmol de siRNA d'une part, et 2 µL de Lipofectamine™ RNAiMAX d'autre part, sont dilués dans 100 µL de milieu Opti-MEM® (Invitrogen™) chacun. Les deux solutions sont mélangées puis déposées sur les cellules après 20 min d'incubation à température ambiante. 24h après la première transfection, les cellules sont transfectées une seconde fois selon le même protocole, puis, après 24h supplémentaires, les cellules sont détachées de leur support par un traitement à la trypsine et réensemencées à 150000 cellules par puits de 35 mm de diamètre. Les cellules sont analysées 24h après (soit 72h après la première transfection).

III/ Extraction d'ARN et RT-PCR

L'extraction des ARN de tissu musculaire est réalisée à l'aide du TRI Reagent[®] (SIGMA-ALDRICH[®]). 10 mg de muscles fraîchement prélevés sont plongés dans 400 µL de TRI Reagent contenant des billes de céramique (Lysing Matrix D, MP Biomedicals[™]) puis broyés aux FastPrep[®]-24 (deux fois 20s à 4m/s, MP Biomedicals[™]) et enfin incubés 5 min à 30°C. Après une centrifugation de 5 min à 20000g à température ambiante, le surnageant est prélevé et les billes sont rincées avec 350 µL de TRI Reagent[®]. Après une nouvelle centrifugation, le deuxième surnageant obtenu est ajouté au premier, puis 200 µL de chloroforme sont ajoutés aux surnageants. Le mélange est incubé 15 min à 30°C, centrifugé 15 min à 12000g à 4°C et la phase aqueuse obtenue est prélevée. La précipitation des ARN présents dans cette phase est réalisée par ajout de 500 µL d'isopropanol, incubation 10 min à température ambiante et centrifugation 10 min à 12000g à 4°C. Le culot obtenu est rincé à l'éthanol 70% et resuspendu dans de l'eau RNase free. La qualité des ARN est vérifiée sur gel d'agarose.

L'extraction des ARN de culture cellulaire est réalisée à l'aide du kit NucleoSpin[®] RNA II (MACHEREY-NAGEL) selon les instructions du fabricant.

Les ARN obtenus sont rétrotranscrits en ADNc à l'aide de la RevertAid[™] H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas) et d'hexamères aléatoires. 400 ng d'ARN sont dénaturés 5 min à 70°C en présence des hexamères aléatoires. Après un retour à 4°C et l'ajout du tampon de la RevertAid[™] H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas), de dNTP (1 mM), de RNasine et de 20 unités de RevertAid[™] H Minus Reverse Transcriptase, le mélange obtenu est porté successivement 15 min à 25°C (phase d'hybridation), 60 min à 42°C (phase d'élongation) et enfin 10 min à 70°C (phase d'inactivation de la transcriptase inverse).

Pour tester l'épissage alternatif de *Ckip-1*, les cDNAs obtenus (2 µL d'une dilution au 1/10 du mélange de transcription inverse) sont ensuite amplifiés avec la Platinum[®] Taq DNA polymerase (Invitrogen[™]) selon le programme suivant : 94°C 2 min, [94°C 30 s, Tm 30 s, 68°C 1 min/kb] x 40 cycles, 68°C 7 min. Les oligonucléotides utilisés sont les suivants :

- oligonucléotide sens F1 5' CGCCATGAAGAAGAGCGGCT 3',
- oligonucléotide sens F2 5' CGGATGGAAACCATCAGTCT 3',
- oligonucléotide sens F3 5' ATCCAAGAGCAGGAGCAAGA 3'
- oligonucléotide antisens R3 5' CCTGCTCTTGGATTTCCGGA 3',
- oligonucléotide antisens R4 5' GGCGTTGATCCATGACTCCT 3',

- oligonucléotide antisens R5 5' GTAGGGTGGGCAAGATAGCT 3',
- oligonucléotide antisens R6a 5' AGCTCTCAGCACAAGAGGCT 3'
- oligonucléotide antisens R6b 5' TCACATCAGGCTCTTCCGGT 3'.

IV/ Animaux, électroporation *in vivo* et injection de la cardiotoxine

Les souris femelles OF1 (Oncins France 1) sont fournies par Charles River Laboratories International Inc. Pendant la durée des expériences, les souris sont hébergées à une température constante de 25°C avec un cycle jour/nuit de 12 h dans l'animalerie SOPF (Standard Organisms and Pathogens Free) de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon. Les animaux ont accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Toutes les manipulations et procédures menées sur les animaux sont réalisées dans des conditions d'asepsie et en accord avec les recommandations du comité local d'éthique.

Avant l'électroporation ou l'injection de cardiotoxine, les souris OF1 femelles sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (Ketamine500, Virbac, 100 mg.kg⁻¹) et xylazine (Rompun, Centravet, 20 mg.kg⁻¹) pour obtenir une anesthésie générale profonde.

Pour les expériences de surexpression *in vivo*, 7 µg d'ADN (purifié sur deux gradients successifs de chlorure de césium) dilués dans une solution de 0,45% NaCl sont injectés dans les muscles tibiaux antérieur de souris OF1 femelles de 5 semaines. Deux électrodes planes de 2,5 cm² (Q-biogen) sont placées de part et d'autre du muscle injecté et 8 impulsions électriques de 20 ms à 80 V/cm sont appliquées à une fréquence de 2 Hz à l'aide d'un électroporateur standard de signal carré (Electro Square PoratorTM ECM 830, BTX[®]). Les mélanges d'ADN électroporés contiennent soit 7 µg du vecteur d'intérêt (cas d'un vecteur d'expression codant pour une protéine d'intérêt fusionnée à une protéine fluorescente), soit 5 µg du vecteur d'intérêt et 2 µg de pEGFP-N1 ou pmCherry-N1 (Clontech) (cas d'un vecteur d'expression codant pour une protéine d'intérêt non fusionnée à une protéine fluorescente). Cinq jours après l'électroporation, la patte est fixée pour être analysée par immunofluorescence ou le muscle est prélevé et les fibres électroporées sont microdisséquées sous un microscope à fluorescence (SZX 12 Olympus) pour être analysées. La microdissection est réalisée dans du PBS froid et les fibres électroporées sont rapidement collectées à l'aide de pinces ultrafines (Moria, n°5) puis plongées dans le tampon adéquat.

Pour induire la réparation musculaire, une injection intramusculaire de cardiotoxine (100 μ L d'une solution à 10 μ M) issue du venin du serpent *Naja nigricollis* (Latoxan) est réalisée dans le muscle tibial antérieur droit de souris OF1 femelles de 8 semaines. Pour tenir lieu de contrôle, le muscle controlatéral est injecté avec 100 μ L de PBS. Les muscles sont prélevés 3 ou 7 jours après l'injection.

V/ Immunofluorescence

V.A/ Immunofluorescence sur cellules en culture

Les cellules sont cultivées en boîte de culture de 35 mm de diamètre (Corning) selon les conditions décrites dans la partie *Lignée cellulaire, conditions de culture*. Après un rinçage rapide au PBS, les cellules sont fixées 20 min à température ambiante avec une solution de PBS, 4% paraformaldéhyde (PFA), pH 7,4, puis lavées 3 fois au PBS. Les cellules sont perméabilisées 10 min à température ambiante avec une solution de PBS, 0,1% Triton X-100, lavées 3 fois au PBS, puis incubées 30 min à température ambiante avec la solution de saturation (PBS, 1% BSA). L'incubation avec les anticorps primaires s'effectue dans la solution de saturation sur la nuit à 4°C ou 2h à température ambiante pour le marquage des protéines endogènes ou des protéines surexprimées, respectivement. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont incubées 1h à température ambiante en présence des anticorps secondaires (et de la phalloïdine marquée le cas échéant) dilués dans la solution de saturation. Les cellules sont finalement lavées 3 fois au PBS puis montées dans le milieu de montage Vectashield avec ou sans DAPI (Vector laboratories). Les échantillons sont analysés à l'aide d'un microscope confocal spectral (Leica TCS SP5) et les images obtenues sont traitées avec le logiciel Adobe Photoshop CS3.

V.B/ Immunofluorescence sur coupes congelées de muscles

Pour l'analyse par immunofluorescence de coupes congelées de muscles, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale, les pattes postérieures sont prélevées, maintenues en extension et fixées sur la nuit à 4°C en PBS, 4% PFA, pH 7,4. La fixation des pattes postérieures en extension permet de fixer le muscle tibial antérieur en position étirée. Après 3 lavages au PBS, le muscle tibial antérieur est prélevé et plongé pendant 24h dans une solution

cryoprotectrice de PBS, 30% saccharose à 4°C. Le muscle est alors inclus dans le milieu Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (Sakura®) puis conservé à -80°C. Des coupes transversales et/ou longitudinales de 10 µm sont ensuite réalisées à l'aide d'un cryostat (Microm HM 505E), puis transférées sur des lames SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser®) et stockées à -80°C. Les échantillons sont ensuite réhydratés 10 min à température ambiante dans du PBS, perméabilisés et saturés 30 min à température ambiante en PBS, 0,5% Triton X-100, 1% BSA, 5% Normal Goat Serum (NGS), puis incubés sur la nuit à 4°C en présence des anticorps primaires dilués dans du PBS, 0,1% Triton X-100, 1% BSA, 5% NGS. Après 3 lavages de 10 min en PBS, 0,1% Triton X-100, les coupes sont incubées 1h à température ambiante en présence des anticorps secondaires, et de la phalloïdine marquée (Alexa Fluor® 488 phalloïdine, Alexa Fluor® 555 phalloïdine [Molecular Probes, Invitrogen™]) le cas échéant, dilués dans du PBS, 0,1% Triton X-100, 1% BSA, 5% NGS. Les échantillons sont finalement lavés 10 min en PBS, 0,1% Triton X-100, puis 2 fois 10 min en PBS avant d'être montés dans le milieu de montage Vectashield avec ou sans DAPI (Vector laboratories). Pour le marquage au WGA-TRITC, les coupes congelées sont rehydratées et directement incubées 1h à température ambiante avec 100µg/ml WGA-TRITC (SIGMA-ALDRICH®) en PBS, 1% BSA sans perméabilisation ni saturation préalables. Les coupes sont ensuite lavées au PBS et montées comme décrit précédemment. Les échantillons sont analysés à l'aide d'un microscope confocal spectral (Leica TCS SP5) et les images obtenues sont traitées avec le logiciel Adobe Photoshop CS3.

VI/ Internalisation de la transferrine

L'étude de l'internalisation de la transferrine est réalisée à l'aide de transferrine couplée au fluorochrome Alexa FluorR 555 (Transferrin-Alexa555, Molecular Probes, Invitrogen™). Les cellules sont privées de sérum 30 min à 37°C en DMEM, puis elles sont incubées en présence de transferrine-Alexa555 (10 µg/mL) dans du milieu d'internalisation (DMEM, 0,5% BSA, 10 mM Hepes, pH 7,4) pendant 1h à 4°C. La transferrine non liée aux récepteurs membranaires est éliminée par 3 lavages en milieu d'internalisation froid, puis les cellules sont placées à 37°C dans un bain-marie pendant des périodes de chasse de durée variable. Après cette chasse qui permet l'internalisation de la transferrine, les cellules sont placées sur de la glace fondante et lavées 3 fois avec du milieu d'arrêt (PBS, 0,5% BSA) froid. Les

cellules sont alors fixées 20 min en PBS, 4% PFA, pH 7,4, puis traitées pour immunofluorescence.

VII/ Immuno-blot

VII.A/ Préparation des extraits protéiques de cellules en culture

Les cellules sont lavées rapidement 2 fois en PBS froid, puis lysées 10 min sur glace dans le tampon d'extraction DNS (25 mM Tris HCl pH7,4, 50 mM NaCl, 0,5% déoxycholate de sodium, 2% NP40, 0,2% SDS, inhibiteurs de protéases [SIGMAFAST™, SIGMA-ALDRICH®], inhibiteurs de phosphatases [1 mM orthovanadate de sodium, 2 mM β -glycérophosphate, 10 mM fluorure de sodium]). L'extrait protéique brut obtenu est ensuite soniqué sur glace (6 cycles de 2 s ON / 2 s OFF à 40 W avec un sonicateur Vibra-Cell™ 75185), puis centrifugé à 20000 g 10 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires.

VII.B/ Préparation des extraits protéiques de tissu de souris

Les tissus sont homogénéisés dans le tampon d'extraction DNS (25 mM Tris HCl pH7,4, 50 mM NaCl, 0,5% déoxycholate de sodium, 2% NP40, 0,2% SDS, inhibiteurs de protéases [SIGMAFAST™, SIGMA-ALDRICH®], inhibiteurs de phosphatases [1 mM orthovanadate de sodium, 2 mM β -glycérophosphate, 10 mM fluorure de sodium]) à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax T8.01 (IKA®). L'homogénat total est centrifugé à 1000 g 20 min à 4°C. Le surnageant (S1000 g) est prélevé et le culot (P1000 g) est resuspendu dans le tampon d'extraction DNS.

VII.C/ Western blot

La concentration des protéines présentes dans les extraits cellulaires et tissulaires est déterminée à l'aide du DC protein assay kit (Bio-Rad). Les protéines sont ensuite séparées par Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) puis transférées sur membrane PVDF (polyvinylidene fluoride) Immobilon®-P (Millipore™). La membrane est ensuite bloquée avec du Tris-Buffered Saline, 0.02% Tween20 (TBST) contenant 5% de

lait écrémé (Régilait), puis incubée en présence de l'anticorps primaire sur la nuit à 4°C. Après 4 lavages de 10 min en TBST, la membrane est incubée 1 h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (GE Healthcare). La membrane est lavée 4 fois 10 min en TBST puis incubée en présence de réactifs chémo-luminescents (ECL Plus, Amersham Biosciences).

VIII/ Expériences de fractionnement

VIII.A/ Fractionnement sub-cellulaire de cellules en culture

Les cellules sont lavées rapidement 2 fois en PBS froid, puis lysées sur glace dans un tampon hypotonique TSE (10 mM Tris, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, inhibiteurs de protéases [SIGMAFAST™, SIGMA-ALDRICH®], inhibiteurs de phosphatases [1 mM orthovanadate de sodium, 2 mM β-glycérophosphate, 10 mM fluorure de sodium]) par 30 passages à travers une aiguille 26G. La suspension obtenue est centrifugée à 1500 g 10 min à 4°C pour isoler les noyaux. Le culot (P1500 g) est lavé dans le tampon TSE puis resuspendu dans du tampon TSE, 1% NP40. Le surnageant (S1500 g) est centrifugé à 16000 g 10 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le culot (P16000 g) est resuspendu dans du tampon TSE, 1% NP40, tandis que le surnageant (S16000 g) est centrifugé à 100000 g 2h à 4°C afin de séparer la fraction membranaire (P100000 g) de la fraction cytosolique (S100000 g). La fraction membranaire est resuspendue dans du tampon TSE, 1% NP40.

VIII.B/ Fractionnement sub-cellulaire de tissu musculaire

Le muscle est homogénéisé dans le tampon d'extraction (10 mM NaHCO₃, 0,2 mM CaCl₂, inhibiteurs de protéases [SIGMAFAST™, SIGMA-ALDRICH®], inhibiteurs de phosphatases [1 mM orthovanadate de sodium, 2 mM β-glycérophosphate, 10 mM fluorure de sodium]) à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax T8.0 (IKA®). L'homogénat est mélangé volume à volume à une solution de 500 mM sucrose, 300 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 60 mM histidine, pH 7,4, puis la suspension obtenue est centrifugée à 1000 g 20 min à 4°C. Le culot (P1000 g) est resuspendu dans du PBS, 2% Triton-X 100, inhibiteurs de protéases (SIGMAFAST™), et le surnageant (S1000 g) est centrifugé à 10000 g 20 min à 4°C. Le culot (P10000 g) est resuspendu dans du PBS, 2% Triton-X 100, inhibiteurs de protéases (SIGMAFAST™), et le

surnageant (S10000 g) est centrifugé à 100000g 30 min à 4°C. Le surnageant (S100000 g) constitue la fraction cytosolique, tandis que le culot (P100000 g) constitue la fraction membranaire. Ce culot est lavé dans une solution de 250 mM sucrose, 600 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 30 mM histidine, pH 7,4, puis resuspendu dans du PBS, 2% Triton-X 100, inhibiteurs de protéases (SIGMAFAST™).

VIII.C/ Purification des myofibrilles d'un tissu musculaire

Le muscle tibial antérieur de souris OF1 femelles de 6 semaines est homogénéisé dans 20 volumes de tampon I (39 mM borate de sodium, 25 mM KCl, 5 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol [DTT], inhibiteurs de protéases [SIGMAFAST™, SIGMA-ALDRICH®], pH 7,1) à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax T8.01 (IKA®). L'homogénat est centrifugé à 1500 g 12 min à 4°C. Le surnageant (fraction S1) est conservé et le culot est resuspendu dans 20 volumes de tampon II (39 mM sodium borate, 25 mM KCl, 1 mM DTT, SIGMAFAST™, pH 7,1) (fraction P1), puis centrifugé à 1500 g 12 min à 4°C. Le surnageant est conservé (fraction S2) tandis que le culot est resuspendu dans 20 volumes de tampon II (fraction P2) puis centrifugé à 1500 g 12 min à 4°C. Le culot est extrait dans du tampon III (39 mM borate de sodium, 25 mM KCl, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, inhibiteurs de protéases SIGMAFAST™, pH 7,1) 30 min à 4°C. La suspension est filtrée sur gaze puis centrifugée à 1500 g 12 min à 4°C. Le surnageant (fraction S3) est conservé et le culot est resuspendu dans le tampon IV (10 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM DTT, inhibiteurs de protéases SIGMAFAST™, pH 7,1) (fraction P3). La suspension est centrifugée à 1500 g 12 min à 4°C et le culot est lavé avec le tampon IV. Le culot final (myofibrilles) est resuspendu dans le tampon V (10 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 20% glycérol, inhibiteurs de protéases SIGMAFAST™, pH 7,1).

IX/ Co-immunoprecipitation

Pour les expériences de co-immunoprécipitation, les cellules sont lysées 30 min sur la glace dans le tampon de lyse (50 mM Tris [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0,05% acide déoxycholique, 1% Triton X-100, 10% glycérol, 2 mM EDTA, inhibiteurs de protéases [Complete, Roche Molecular Biochemicals]). Les lysats sont passés dix fois à travers une

seringue 26G et centrifugés 10 min à 20000 g. Le surnageant est récupéré et sa concentration protéique est déterminée à l'aide du DC protein assay kit (Bio-Rad). 1 mg de protéines est incubé 4 h à 4°C avec 2 µg d'anticorps anti flag M2 ou anti tag HA, puis 1 h à 4°C en présence de 30 µl d'un mélange volume à volume de protéine A-Sépharose 4 Fast flow (Amersham Biosciences) / protéine G-Sépharose 4 Fast flow (Sigma-Aldrich). Les immunoprécipitats obtenus sont lavés trois fois dans le tampon de lyse puis chauffés 5 min à 95°C dans du tampon de charge (60 mM Tris [pH6.8], 2% SDS, 100 mM DTT, 6% glycérol, 0,02% bleu de bromophénol). Les échantillons obtenus sont ensuite séparés par SDS-PAGE et analysés par western-blot.

X/ Déphosphorylation

Une moitié de muscle est homogénéisée dans le tampon DNS dépourvu d'inhibiteurs de phosphatases. L'homogénat est centrifugé à 1000 g 20 min à 4°C et 50 µg de protéines du surnageant sont traités par 10 unités de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) dans un volume final de 50 µL pendant 2h à 37°C. L'autre moitié du muscle est traitée de la même manière sauf que (1) elle est homogénéisée dans du tampon DNS avec inhibiteurs de phosphatases, (2) les 10 unités de SAP sont remplacées par 10 µL d'H₂O. Les deux extraits obtenus sont ensuite séparés par SDS-PAGE et analysés par western blot.

XI/ Analyses ultrastructurales

Pour la microscopie électronique, les muscles tibiaux antérieurs électroporés sont microdisséqués sous une loupe à fluorescence. Les zones électroporées sont fixées en PFA 1%, glutaraldéhyde 1,5%, cacodylate de sodium 0,2 M, pH 7,4 sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages en cacodylate de sodium 0,15 M, pH 7,4, les fragments de muscles sont post-fixés 45 min à température ambiante en tétraoxyde d'osmium (OsO₄) 1%, cacodylate de sodium 0,15 M, pH 7,4 puis déshydratés par des bains successifs de 5 min d'éthanol 30%, 50%, 70 %, 95%, 100%. Après 2 bains de 10 min à température ambiante en oxyde de propylène, et un bain de 90 min en oxyde de propylène 50%, Epon A (résine Eponate 12TM 42%, DDSA [Dodecanyl Succinic Anhydride] 58%, Electron Microscopy Sciences) 25%, Epon B (résine Eponate 12TM 49%, NMA [Methyl-5-Norbornene-2,3-Dicarboxylic Anhydride] 51%,

Electron Microscopy Sciences) 25%, les échantillons sont incubés pendant 24h dans 3 bains successifs de solution d'inclusion (Epon A 49,15%, Epon B 49,15%, BDMA [Benzyl diméthylamine, Electron Microscopy Sciences] 1,7%). Les échantillons sont finalement inclus dans la solution d'inclusion 72h à 56°C. Des coupes ultrafines de 70 nm sont ensuite contrastées avec de l'acétate d'uranyle (7% en méthanol) et du citrate de plomb et observées à l'aide d'un microscope électronique Philipps CM120.

Le marquage sélectif des tubules T a été adapté d'après (Al-Qusairi et al., 2009). Les fibres électroporées sont fixées en PFA 2%, glutaraldéhyde 2,5%, CaCl₂ 50 mM, cacodylate de sodium 0,1M, pH7,4 sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages en cacodylate de sodium 0,15 M, pH 7,4, les échantillons sont post-fixés 2h à 4°C en OsO₄ 2%, K₄[Fe(CN)₆] 0,8%, cacodylate de sodium 0,1M, pH 7,4, puis incubés dans de l'acétate d'uranyle 2h à 4°C. Les échantillons sont ensuite déshydratés et traités comme mentionnés ci-dessus.

Pour le marquage sélectif du plasmalemme, les fibres électroporées sont fixées en PFA 2%, glutaraldéhyde 1,5%, rouge de ruthénium (SIGMA-ALDRICH[®]) 0,2%, Cacodylate de sodium 0,2M, pH7,4 sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages en rouge de ruthénium 0,2%, cacodylate de sodium 0,15M, pH7,4, les échantillons sont post-fixés 3h à 4°C en OsO₄ 1%, rouge de ruthénium 0,2%, cacodylate de sodium 0,15M, pH7,4, puis déshydratés et traités comme mentionnés ci-dessus.

XII/ Anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : l'anticorps polyclonal de lapin anti CKIP-1 développé au laboratoire, dirigé contre la région correspondant aux acides aminés 241 à 255 de la protéine CKIP-1 murine (Safi et al., 2004), l'anticorps monoclonal de souris anti tag HA (HA-11, Covance), l'anticorps polyclonal de lapin anti tag HA (HA-11, Zymed), l'anticorps monoclonal de souris anti flag M2 (SIGMA[®]), l'anticorps monoclonal de souris anti α -actinine (EA53, SIGMA[®]), l'anticorps monoclonal de souris anti annexine II (BD Transduction Laboratories[™]), l'anticorps polyclonal de lapin anti Akt (Cell Signaling technology[®]), l'anticorps polyclonal de lapin anti phospho (Ser473) Akt (Cell Signaling technology[®]), l'anticorps polyclonal de lapin anti p34-Arc/ARPC2 (Millipore[™]), l'anticorps monoclonal de souris anti CP α (mAb 5B12.3, DSHB), l'anticorps monoclonal de souris anti CP β (mAb 3F2.3, DSHB), l'anticorps monoclonal de souris anti DHPR α (IIID5E1, DSHB),

l'anticorps monoclonal de lapin anti GAPDH (14C10, Cell Signaling technology[®]), l'anticorps monoclonal de souris anti Histone H3 (Upstate[®]), l'anticorps polyclonal de lapin anti myogénine (M-225, Santa-Cruz Biotechnology[®]), l'anticorps monoclonal de souris anti chaîne lourde de myosine (mAb F59, DSHB), l'anticorps monoclonal de souris anti RyR1 (34C, SIGMA[®]), l'anticorps polyclonal de lapin anti récepteur β à l'insuline (BD Transduction Laboratories[™]), l'anticorps monoclonal de souris anti récepteur à la transferrine (H68.4, Santa-Cruz Biotechnology[®]) et l'anticorps monoclonal de souris anti tubuline α (clone DM1A, SIGMA[®]).

Les filaments d'actine sont marqués avec la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 488 ou 555 (Molecular Probes).

Les anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence sont, soit couplés à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) : anticorps de chèvre anti IgG de lapin, anticorps de chèvre anti IgG de souris, anticorps d'âne anti IgG de chèvre, soit couplés à l'Alexa Fluor 555 (Molecular Probes) : anticorps de chèvre anti IgG de lapin, anticorps de chèvre anti IgG de souris, anticorps d'âne anti IgG de lapin et anticorps d'âne anti IgG de souris.

Les anticorps secondaires utilisés pour les western blots sont l'anticorps de mouton anti IgG de souris et l'anticorps d'âne anti IgG de lapin tous deux couplés à l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxidase) (Amersham Biosciences).

Références

- A bank of digital resources for teaching biology.** <http://biodidac.bio.uottawa.ca/>
- The Titin/Telethonin Complex.** <http://www.ks.uiuc.edu/Research/telethonin/>.
- Abramovici, H., and S.H. Gee.** 2007. Morphological changes and spatial regulation of diacylglycerol kinase-zeta, syntrophins, and Rac1 during myoblast fusion. *Cell Motil Cytoskeleton.* 64:549-67.
- Achanzar, W.E., and S. Ward.** 1997. A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *J Cell Sci.* 110 (Pt 9):1073-81.
- Ackermann, M.A., L.Y. Hu, A.L. Bowman, R.J. Bloch, and A. Kontrogianni-Konstantopoulos.** 2009. Obscurin interacts with a novel isoform of MyBP-C slow at the periphery of the sarcomeric M-band and regulates thick filament assembly. *Mol Biol Cell.* 20:2963-78.
- Agarkova, I., D. Auerbach, E. Ehler, and J.C. Perriard.** 2000. A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. *J Biol Chem.* 275:10256-64.
- Agarkova, I., and J.C. Perriard.** 2005. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol.* 15:477-85.
- Al-Qusairi, L., N. Weiss, A. Toussaint, C. Berbey, N. Messaddeq, C. Kretz, D. Sanoudou, A.H. Beggs, B. Allard, J.L. Mandel, J. Laporte, V. Jacquemond, and A. Buj-Bello.** 2009. T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:18763-8.
- Amsili, S., H. Zer, S. Hinderlich, S. Krause, M. Becker-Cohen, D.G. MacArthur, K.N. North, and S. Mitrani-Rosenbaum.** 2008. UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) binds to alpha-actinin 1: novel pathways in skeletal muscle? *PLoS One.* 3:e2477.
- Anderson, L.V., K. Davison, J.A. Moss, C. Young, M.J. Cullen, J. Walsh, M.A. Johnson, R. Bashir, S. Britton, S. Keers, Z. Argov, I. Mahjneh, F. Fougousse, J.S. Beckmann, and K.M. Bushby.** 1999. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet.* 8:855-61.
- Armani, A., S. Galli, E. Giacomello, P. Bagnato, V. Barone, D. Rossi, and V. Sorrentino.** 2006. Molecular interactions with obscurin are involved in the localization of muscle-specific small ankyrin1 isoforms to subcompartments of the sarcoplasmic reticulum. *Exp Cell Res.* 312:3546-58.
- Aspenstrom, P., A. Fransson, and J. Saras.** 2004. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* 377:327-37.
- Bae, G.U., U. Gaio, Y.J. Yang, H.J. Lee, J.S. Kang, and R.S. Krauss.** 2008. Regulation of myoblast motility and fusion by the CXCR4-associated sialomucin, CD164. *J Biol Chem.* 283:8301-9.
- Bagnato, P., V. Barone, E. Giacomello, D. Rossi, and V. Sorrentino.** 2003. Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J Cell Biol.* 160:245-53.
- Bang, M.L., X. Li, R. Littlefield, S. Bremner, A. Thor, K.U. Knowlton, R.L. Lieber, and J. Chen.** 2006. Nebulin-deficient mice exhibit shorter thin filament lengths and reduced contractile function in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 173:905-16.
- Bansal, D., K. Miyake, S.S. Vogel, S. Groh, C.C. Chen, R. Williamson, P.L. McNeil, and K.P. Campbell.** 2003. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature.* 423:168-72.
- Barrios-Rodiles, M., K.R. Brown, B. Ozdamar, R. Bose, Z. Liu, R.S. Donovan, F. Shinjo, Y. Liu, J. Dembowy, I.W. Taylor, V. Luga, N. Przulj, M. Robinson, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, I. Jurisica, and J.L. Wrana.** 2005. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science.* 307:1621-5.
- Bashir, R., S. Britton, T. Strachan, S. Keers, E. Vafiadaki, M. Lako, I. Richard, S. Marchand, N. Bourg, Z. Argov, M. Sadeh, I. Mahjneh, G. Marconi, M.R. Passos-Bueno, S. Moreira Ede, M. Zatz, J.S. Beckmann, and K. Bushby.** 1998. A gene related to Caenorhabditis elegans spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet.* 20:37-42.
- Beam, K.G., C.M. Knudson, and J.A. Powell.** 1986. A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. *Nature.* 320:168-70.

- Belete, H.A., L.M. Godin, R.W. Stroetz, and R.D. Hubmayr.** 2010. Experimental models to study cell wounding and repair. *Cell Physiol Biochem.* 25:71-80.
- Bennett, P.M., A.J. Baines, M.C. Lecomte, A.M. Maggs, and J.C. Pinder.** 2004. Not just a plasma membrane protein: in cardiac muscle cells alpha-II spectrin also shows a close association with myofibrils. *J Muscle Res Cell Motil.* 25:119-26.
- Bitoun, M., S. Maugenre, P.Y. Jeannet, E. Lacene, X. Ferrer, P. Laforet, J.J. Martin, J. Laporte, H. Lochmuller, A.H. Beggs, M. Fardeau, B. Eymard, N.B. Romero, and P. Guicheney.** 2005. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet.* 37:1207-9.
- Bloch, R.J.** 1986. Actin at receptor-rich domains of isolated acetylcholine receptor clusters. *J Cell Biol.* 102:1447-58.
- Boczkowska, M., G. Rebowski, M.V. Petoukhov, D.B. Hayes, D.I. Svergun, and R. Dominguez.** 2008. X-ray scattering study of activated Arp2/3 complex with bound actin-WCA. *Structure.* 16:695-704.
- Bondesen, B.A., K.A. Jones, W.C. Glasgow, and G.K. Pavlath.** 2007. Inhibition of myoblast migration by prostacyclin is associated with enhanced cell fusion. *Faseb J.* 21:3338-45.
- Bosc, D.G., K.C. Graham, R.B. Saulnier, C. Zhang, D. Prober, R.D. Gietz, and D.W. Litchfield.** 2000. Identification and characterization of CKIP-1, a novel pleckstrin homology domain-containing protein that interacts with protein kinase CK2. *J Biol Chem.* 275:14295-306.
- Boudriau, S., M. Vincent, C.H. Cote, and P.A. Rogers.** 1993. Cytoskeletal structure of skeletal muscle: identification of an intricate exosarcomeric microtubule lattice in slow- and fast-twitch muscle fibers. *J Histochem Cytochem.* 41:1013-21.
- Bowman, A.L., D.H. Catino, J.C. Strong, W.R. Randall, A. Kontrogianni-Konstantopoulos, and R.J. Bloch.** 2008. The rho-guanine nucleotide exchange factor domain of obscurin regulates assembly of titin at the Z-disk through interactions with Ran binding protein 9. *Mol Biol Cell.* 19:3782-92.
- Brandt, N.R., G. Franklin, J.P. Brunschwig, and A.H. Caswell.** 2001. The role of mitsugumin 29 in transverse tubules of rabbit skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys.* 385:406-9.
- Brown, I.E., D.H. Kim, and G.E. Loeb.** 1998. The effect of sarcomere length on triad location in intact feline caudofemoralis muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil.* 19:473-77.
- Bruck, S., T.B. Huber, R.J. Ingham, K. Kim, H. Niederstrasser, P.M. Allen, T. Pawson, J.A. Cooper, and A.S. Shaw.** 2006. Identification of a novel inhibitory actin-capping protein binding motif in CD2-associated protein. *J Biol Chem.* 281:19196-203.
- Brzoska, E., V. Bello, T. Darribere, and J. Moraczewski.** 2006. Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro. *Differentiation.* 74:105-18.
- Bu, W., K.B. Lim, Y.H. Yu, A.M. Chou, T. Sudhakaran, and S. Ahmed.** 2010. Cdc42 interaction with N-WASP and Toca-1 regulates membrane tubulation, vesicle formation and vesicle motility: implications for endocytosis. *PLoS One.* 5:e12153.
- Buck, E.D., H.T. Nguyen, I.N. Pessah, and P.D. Allen.** 1997. Dyspedic mouse skeletal muscle expresses major elements of the triadic junction but lacks detectable ryanodine receptor protein and function. *J Biol Chem.* 272:7360-7.
- Buckingham, M., L. Bajard, T. Chang, P. Daubas, J. Hadchouel, S. Meilhac, D. Montarras, D. Rocancourt, and F. Relaix.** 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat.* 202:59-68.
- Buj-Bello, A., F. Fougousse, Y. Schwab, N. Messaddeq, D. Spehner, C.R. Pierson, M. Durand, C. Kretz, O. Danos, A.M. Douar, A.H. Beggs, P. Schultz, M. Montus, P. Deneffe, and J.L. Mandel.** 2008. AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis. *Hum Mol Genet.* 17:2132-43.
- Buj-Bello, A., V. Laugel, N. Messaddeq, H. Zahreddine, J. Laporte, J.F. Pellissier, and J.L. Mandel.** 2002. The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15060-5.
- Burden, S.J.** 2002. Building the vertebrate neuromuscular synapse. *J Neurobiol.* 53:501-11.
- Butler, M.H., C. David, G.C. Ochoa, Z. Freyberg, L. Daniell, D. Grabs, O. Cremona, and P. De Camilli.** 1997. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is

- concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 137:1355-67.
- Cai, C., H. Masumiya, N. Weisleder, N. Matsuda, M. Nishi, M. Hwang, J.K. Ko, P. Lin, A. Thornton, X. Zhao, Z. Pan, S. Komazaki, M. Brotto, H. Takeshima, and J. Ma.** 2009. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol.* 11:56-64.
- Canton, D.A., M.E. Olsten, K. Kim, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie, J.A. Cooper, and D.W. Litchfield.** 2005. The pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 is involved in regulation of cell morphology and the actin cytoskeleton and interaction with actin capping protein. *Mol Cell Biol.* 25:3519-34.
- Canton, D.A., M.E. Olsten, H. Niederstrasser, J.A. Cooper, and D.W. Litchfield.** 2006. The role of CKIP-1 in cell morphology depends on its interaction with actin-capping protein. *J Biol Chem.* 281:36347-59.
- Cao, C., J. Laporte, J.M. Backer, A. Wandinger-Ness, and M.P. Stein.** 2007. Myotubularin lipid phosphatase binds the hVPS15/hVPS34 lipid kinase complex on endosomes. *Traffic.* 8:1052-67.
- Capetanaki, Y., R.J. Bloch, A. Kouloumenta, M. Mavroidis, and S. Psarras.** 2007. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res.* 313:2063-76.
- Cartaud, A., F. Stetzkowski-Marden, A. Maoui, and J. Cartaud.** 2011. Agrin triggers the clustering of raft-associated acetylcholine receptors through actin-cytoskeleton reorganization. *Biol Cell.*
- Cerny, J., Y. Feng, A. Yu, K. Miyake, B. Borgonovo, J. Klumperman, J. Meldolesi, P.L. McNeil, and T. Kirchhausen.** 2004. The small chemical vacuolin-1 inhibits Ca(2+)-dependent lysosomal exocytosis but not cell resealing. *EMBO Rep.* 5:883-8.
- Charrasse, S., F. Comunale, M. Fortier, E. Portales-Casamar, A. Debant, and C. Gauthier-Rouviere.** 2007. M-cadherin activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF trio during myoblast fusion. *Mol Biol Cell.* 18:1734-43.
- Charrasse, S., F. Comunale, Y. Grumbach, F. Poulat, A. Blangy, and C. Gauthier-Rouviere.** 2006. RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *Mol Biol Cell.* 17:749-59.
- Chen, F., L. Ma, M.C. Parrini, X. Mao, M. Lopez, C. Wu, P.W. Marks, L. Davidson, D.J. Kwiatkowski, T. Kirchhausen, S.H. Orkin, F.S. Rosen, B.J. Mayer, M.W. Kirschner, and F.W. Alt.** 2000. Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol.* 10:758-65.
- Chen, Y.J., P. Zhang, E.H. Egelman, and J.E. Hinshaw.** 2004. The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes. *Nat Struct Mol Biol.* 11:574-5.
- Clark, K.A., A.S. McElhinny, M.C. Beckerle, and C.C. Gregorio.** 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:637-706.
- Comunale, F., M. Causeret, C. Favard, J. Cau, N. Taulet, S. Charrasse, and C. Gauthier-Rouviere.** 2007. Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell-cell contact formation in C2C12 myoblasts. *Biol Cell.* 99:503-17.
- Constantin, B., N. Imbert, C. Besse, C. Cognard, and G. Raymond.** 1995. Cultured rat skeletal muscle cells treated with cytochalasin exhibit normal dystrophin expression and intracellular free calcium control. *Biol Cell.* 85:125-35.
- Conti, F.J., S.J. Monkley, M.R. Wood, D.R. Critchley, and U. Muller.** 2009. Talin 1 and 2 are required for myoblast fusion, sarcomere assembly and the maintenance of myotendinous junctions. *Development.* 136:3597-606.
- Coolican, S.A., D.S. Samuel, D.Z. Ewton, F.J. McWade, and J.R. Florini.** 1997. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem.* 272:6653-62.
- Cory, G.O., R. Cramer, L. Blanchoin, and A.J. Ridley.** 2003. Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. *Mol Cell.* 11:1229-39.

- Couchoux, H., B. Allard, C. Legrand, V. Jacquemond, and C. Berthier.** 2007. Loss of caveolin-3 induced by the dystrophy-associated P104L mutation impairs L-type calcium channel function in mouse skeletal muscle cells. *J Physiol.* 580:745-54.
- Craig, S.W., and J.V. Pardo.** 1983. Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites. *Cell Motil.* 3:449-62.
- Czuchra, A., X. Wu, H. Meyer, J. van Hengel, T. Schroeder, R. Geffers, K. Rottner, and C. Brakebusch.** 2005. Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell.* 16:4473-84.
- Dabiri, G.A., K.K. Turnacioglu, J.M. Sanger, and J.W. Sanger.** 1997. Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9493-8.
- Daggett, D.F., C.R. Domingo, P.D. Currie, and S.L. Amacher.** 2007. Control of morphogenetic cell movements in the early zebrafish myotome. *Dev Biol.* 309:169-79.
- Dai, Z., X. Luo, H. Xie, and H.B. Peng.** 2000. The actin-driven movement and formation of acetylcholine receptor clusters. *J Cell Biol.* 150:1321-34.
- Davis, D.B., K.R. Doherty, A.J. Delmonte, and E.M. McNally.** 2002. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem.* 277:22883-8.
- DeChiara, T.M., D.C. Bowen, D.M. Valenzuela, M.V. Simmons, W.T. Poueymirou, S. Thomas, E. Kinetz, D.L. Compton, E. Rojas, J.S. Park, C. Smith, P.S. DiStefano, D.J. Glass, S.J. Burden, and G.D. Yancopoulos.** 1996. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell.* 85:501-12.
- Derivery, E., C. Sousa, J.J. Gautier, B. Lombard, D. Loew, and A. Gautreau.** 2009. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell.* 17:712-23.
- Di Biase, V., and C. Franzini-Armstrong.** 2005. Evolution of skeletal type e-c coupling: a novel means of controlling calcium delivery. *J Cell Biol.* 171:695-704.
- Disanza, A., S. Mantoani, M. Hertzog, S. Gerboth, E. Frittoli, A. Steffen, K. Berhoerster, H.J. Kreienkamp, F. Milanesi, P.P. Di Fiore, A. Ciliberto, T.E. Stradal, and G. Scita.** 2006. Regulation of cell shape by Cdc42 is mediated by the synergic actin-bundling activity of the Eps8-IRSp53 complex. *Nat Cell Biol.* 8:1337-47.
- Doberstein, S.K., R.D. Fetter, A.Y. Mehta, and C.S. Goodman.** 1997. Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol.* 136:1249-61.
- Doherty, K.R., A. Cave, D.B. Davis, A.J. Delmonte, A. Posey, J.U. Earley, M. Hadhazy, and E.M. McNally.** 2005. Normal myoblast fusion requires myoferlin. *Development.* 132:5565-75.
- Doherty, K.R., A.R. Demonbreun, G.Q. Wallace, A. Cave, A.D. Posey, K. Heretis, P. Pytel, and E.M. McNally.** 2008. The endocytic recycling protein EHD2 interacts with myoferlin to regulate myoblast fusion. *J Biol Chem.* 283:20252-60.
- Dowling, J.J., A.P. Vreede, S.E. Low, E.M. Gibbs, J.Y. Kuwada, C.G. Bonnemann, and E.L. Feldman.** 2009. Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet.* 5:e1000372.
- Du, A., J.M. Sanger, K.K. Linask, and J.W. Sanger.** 2003. Myofibrillogenesis in the first cardiomyocytes formed from isolated quail precardiac mesoderm. *Dev Biol.* 257:382-94.
- Du, A., J.M. Sanger, and J.W. Sanger.** 2008. Cardiac myofibrillogenesis inside intact embryonic hearts. *Dev Biol.* 318:236-46.
- Duan, R., and P.J. Gallagher.** 2009. Dependence of myoblast fusion on a cortical actin wall and nonmuscle myosin IIA. *Dev Biol.* 325:374-85.
- Durieux, A.C., B. Prudhon, P. Guicheney, and M. Bitoun.** 2010a. Dynamin 2 and human diseases. *J Mol Med.* 88:339-50.
- Durieux, A.C., A. Vignaud, B. Prudhon, M.T. Viou, M. Beuvin, S. Vassilopoulos, B. Fraysse, A. Ferry, J. Laine, N.B. Romero, P. Guicheney, and M. Bitoun.** 2010b. A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum Mol Genet.* 19:4820-36.

- Ebashi, S., Y. Toyokura, H. Momoi, and H. Sugita.** 1959. High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy. *J. Biochem.* 46:103-104.
- Edwards, D.C., L.C. Sanders, G.M. Bokoch, and G.N. Gill.** 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol.* 1:253-9.
- Ellis, S., and H. Mellor.** 2000. The novel Rho-family GTPase rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Curr Biol.* 10:1387-90.
- Emery, A.E.** 2002. The muscular dystrophies. *Lancet.* 359:687-95.
- Engert, J.C., E.B. Berglund, and N. Rosenthal.** 1996. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol.* 135:431-40.
- Felder, E., F. Protasi, R. Hirsch, C. Franzini-Armstrong, and P.D. Allen.** 2002. Morphology and molecular composition of sarcoplasmic reticulum surface junctions in the absence of DHPR and RyR in mouse skeletal muscle. *Biophys J.* 82:3144-9.
- Fernandez, C., D. Figarella-Branger, P. Alla, J.R. Harle, and J.F. Pellissier.** 2002. Colchicine myopathy: a vacuolar myopathy with selective type I muscle fiber involvement. An immunohistochemical and electron microscopic study of two cases. *Acta Neuropathol.* 103:100-6.
- Fernando, P., J.F. Kelly, K. Balazsi, R.S. Slack, and L.A. Megeney.** 2002. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:11025-30.
- Fielding, A.B., E. Schonteich, J. Matheson, G. Wilson, X. Yu, G.R. Hickson, S. Srivastava, S.A. Baldwin, R. Prekeris, and G.W. Gould.** 2005. Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *Embo J.* 24:3389-99.
- Fili, N., V. Calleja, R. Woscholski, P.J. Parker, and B. Larijani.** 2006. Compartmental signal modulation: Endosomal phosphatidylinositol 3-phosphate controls endosome morphology and selective cargo sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:15473-8.
- Flucher, B.E., M.E. Morton, S.C. Froehner, and M.P. Daniels.** 1990. Localization of the alpha 1 and alpha 2 subunits of the dihydropyridine receptor and ankyrin in skeletal muscle triads. *Neuron.* 5:339-51.
- Flucher, B.E., H. Takekura, and C. Franzini-Armstrong.** 1993. Development of the excitation-contraction coupling apparatus in skeletal muscle: association of sarcoplasmic reticulum and transverse tubules with myofibrils. *Dev Biol.* 160:135-47.
- Flucher, B.E., M. Terasaki, H.M. Chin, T.J. Beeler, and M.P. Daniels.** 1991. Biogenesis of transverse tubules in skeletal muscle in vitro. *Dev Biol.* 145:77-90.
- Fortier, M., F. Comunale, J. Kucharczak, A. Blangy, S. Charrasse, and C. Gauthier-Rouviere.** 2008. RhoE controls myoblast alignment prior fusion through RhoA and ROCK. *Cell Death Differ.* 15:1221-31.
- Frank, D., C. Kuhn, H.A. Katus, and N. Frey.** 2006. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med.* 84:446-68.
- Franzini-Armstrong, C.** 1991. Simultaneous maturation of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum during muscle differentiation in the mouse. *Dev Biol.* 146:353-63.
- Franzini-Armstrong, C., and A.O. Jorgensen.** 1994. Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annu Rev Physiol.* 56:509-34.
- Fugier, C., A.F. Klein, C. Hammer, S. Vassilopoulos, Y. Ivarsson, A. Toussaint, V. Tosch, A. Vignaud, A. Ferry, N. Messaddeq, Y. Kokunai, R. Tsuburaya, P. de la Grange, D. Dembele, V. Francois, G. Precigout, C. Boulade-Ladame, M.C. Hummel, A.L. de Munain, N. Sergeant, A. Laquerriere, C. Thibault, F. Deryckere, D. Auboeuf, L. Garcia, P. Zimmermann, B. Udd, B. Schoser, M.P. Takahashi, I. Nishino, G. Bassez, J. Laporte, D. Furling, and N. Charlet-Berguerand.** 2011. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med.* 17:720-5.
- Fujita, H., T. Nedachi, and M. Kanzaki.** 2007. Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes. *Exp Cell Res.* 313:1853-65.
- Gach, M.P., G. Cherednichenko, C. Haarmann, J.R. Lopez, K.G. Beam, I.N. Pessah, C. Franzini-Armstrong, and P.D. Allen.** 2008. Alpha2delta1 dihydropyridine receptor subunit

- is a critical element for excitation-coupled calcium entry but not for formation of tetrads in skeletal myotubes. *Biophys J.* 94:3023-34.
- Galbiati, F., J.A. Engelman, D. Volonte, X.L. Zhang, C. Minetti, M. Li, H. Hou, Jr., B. Kneitz, W. Edelmann, and M.P. Lisanti.** 2001. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem.* 276:21425-33.
- Galbiati, F., D. Volonte, J.A. Engelman, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti.** 1999. Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *J Biol Chem.* 274:30315-21.
- Gautam, M., P.G. Noakes, L. Moscoso, F. Rupp, R.H. Scheller, J.P. Merlie, and J.R. Sanes.** 1996. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell.* 85:525-35.
- Gazzerro, E., F. Sotgia, C. Bruno, M.P. Lisanti, and C. Minetti.** 2010. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur J Hum Genet.* 18:137-45.
- Georgescu, M.M., K.H. Kirsch, P. Kaloudis, H. Yang, N.P. Pavletich, and H. Hanafusa.** 2000. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res.* 60:7033-8.
- Giacomello, E., and V. Sorrentino.** 2009. Localization of ank1.5 in the sarcoplasmic reticulum precedes that of SERCA and RyR: relationship with the organization of obscurin in developing sarcomeres. *Histochem Cell Biol.* 131:371-82.
- Gilbert, R., M.G. Kelly, T. Mikawa, and D.A. Fischman.** 1996. The carboxyl terminus of myosin binding protein C (MyBP-C, C-protein) specifies incorporation into the A-band of striated muscle. *J Cell Sci.* 109 (Pt 1):101-11.
- Gildor, B., R. Massarwa, B.Z. Shilo, and E.D. Schejter.** 2009. The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate *Drosophila* myoblast fusion. *EMBO Rep.* 10:1043-50.
- Grefte, S., A.M. Kuijpers-Jagtman, R. Torensma, and J.W. Von den Hoff.** 2007. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev.* 16:857-68.
- Gregg, R.G., A. Messing, C. Strube, M. Beurg, R. Moss, M. Behan, M. Sukhareva, S. Haynes, J.A. Powell, R. Coronado, and P.A. Powers.** 1996. Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13961-6.
- Guo, W., and K.P. Campbell.** 1995. Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 270:9027-30.
- Hall, A.** 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* 33:891-5.
- Harris, J.B.** 2003. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon.* 42:933-45.
- Hasebe-Kishi, F., and Y. Shimada.** 2000. Dynamics of actin and alpha-actinin in nascent myofibrils and stress fibers. *J Muscle Res Cell Motil.* 21:717-24.
- Hayashi, C., Y. Ono, N. Doi, F. Kitamura, M. Tagami, R. Mineki, T. Arai, H. Taguchi, M. Yanagida, S. Hirner, D. Labeit, S. Labeit, and H. Sorimachi.** 2008. Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 283:14801-14.
- Heasman, S.J., and A.J. Ridley.** 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:690-701.
- Heidenhain, M.** 1913. Über die Entstehung der quergestreiften Muskelsubstanz bei der Forelle. *Archiv für Mikroskopische Anatomie.* 83:427-522.
- Henry, C.A., and S.L. Amacher.** 2004. Zebrafish slow muscle cell migration induces a wave of fast muscle morphogenesis. *Dev Cell.* 7:917-23.
- Hernandez-Deviez, D.J., S. Martin, S.H. Laval, H.P. Lo, S.T. Cooper, K.N. North, K. Bushby, and R.G. Parton.** 2006. Aberrant dysferlin trafficking in cells lacking caveolin or expressing dystrophy mutants of caveolin-3. *Hum Mol Genet.* 15:129-42.

- Hernandez-Valladares, M., T. Kim, B. Kannan, A. Tung, A.H. Aguda, M. Larsson, J.A. Cooper, and R.C. Robinson.** 2010. Structural characterization of a capping protein interaction motif defines a family of actin filament regulators. *Nat Struct Mol Biol.* 17:497-503.
- Hnasko, R., and M.P. Lisanti.** 2003. The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol Interv.* 3:445-64.
- Hnia, K., H. Tronchere, K.K. Tomczak, L. Amosii, P. Schultz, A.H. Beggs, B. Payrastre, J.L. Mandel, and J. Laporte.** 2011. Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J Clin Invest.* 121:70-85.
- Hollnagel, A., C. Grund, W.W. Franke, and H.H. Arnold.** 2002. The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol Cell Biol.* 22:4760-70.
- Holtzer, H., T. Hijikata, Z.X. Lin, Z.Q. Zhang, S. Holtzer, F. Protasi, C. Franzini-Armstrong, and H.L. Sweeney.** 1997. Independent assembly of 1.6 microns long bipolar MHC filaments and I-Z-I bodies. *Cell Struct Funct.* 22:83-93.
- Hong, T.T., J.W. Smyth, D. Gao, K.Y. Chu, J.M. Vogan, T.S. Fong, B.C. Jensen, H.M. Colecraft, and R.M. Shaw.** 2010. BIN1 localizes the L-type calcium channel to cardiac T-tubules. *PLoS Biol.* 8:e1000312.
- Horackova, M., Z. Byczko, and B. Morash.** 2000. Maintenance of Ca⁽ⁱ⁾(2⁺)transients during prolonged cardiac arrest aids rapid contractile recovery. *Eur J Pharmacol.* 404:247-57.
- Huang, Y., P. Verheesen, A. Roussis, W. Frankhuizen, I. Ginjaar, F. Haldane, S. Laval, L.V. Anderson, T. Verrips, R.R. Frants, H. de Haard, K. Bushby, J. den Dunnen, and S.M. van der Maarel.** 2005. Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display. *Eur J Hum Genet.* 13:721-30.
- Huxley, H.E.** 1963. Electron Microscope Studies on the Structure of Natural and Synthetic Protein Filaments from Striated Muscle. *J Mol Biol.* 7:281-308.
- Ikonen, E.** 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* 13:470-7.
- Innocenti, M., S. Gerboth, K. Rottner, F.P. Lai, M. Hertzog, T.E. Stradal, E. Frittoli, D. Didry, S. Polo, A. Dianza, S. Benesch, P.P. Di Fiore, M.F. Carlier, and G. Scita.** 2005. Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nat Cell Biol.* 7:969-76.
- Iskratsch, T., S. Lange, J. Dwyer, A.L. Kho, C. dos Remedios, and E. Ehler.** 2010. Formin follows function: a muscle-specific isoform of FHOD3 is regulated by CK2 phosphorylation and promotes myofibril maintenance. *J Cell Biol.* 191:1159-72.
- Ito, K., S. Komazaki, K. Sasamoto, M. Yoshida, M. Nishi, K. Kitamura, and H. Takeshima.** 2001. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol.* 154:1059-67.
- Iwasa, J.H., and R.D. Mullins.** 2007. Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr Biol.* 17:395-406.
- Jansen, K.M., and G.K. Pavlath.** 2006. Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *J Cell Biol.* 174:403-13.
- Jung, G., K. Remmert, X. Wu, J.M. Volosky, and J.A. Hammer, 3rd.** 2001. The Dictyostelium CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *J Cell Biol.* 153:1479-97.
- Jungbluth, H., C. Wallgren-Pettersson, and J. Laporte.** 2008. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis.* 3:26.
- Jungbluth, H., C. Wallgren-Pettersson, and J.F. Laporte.** 2009. 164th ENMC International workshop: 6th workshop on centronuclear (myotubular) myopathies, 16-18th January 2009, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 19:721-9.
- Kaksonen, M., C.P. Toret, and D.G. Drubin.** 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:404-14.
- Karalaki, M., S. Fili, A. Philippou, and M. Koutsilieris.** 2009. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo.* 23:779-96.
- Kee, A.J., P.W. Gunning, and E.C. Hardeman.** 2009. Diverse roles of the actin cytoskeleton in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 30:187-97.

- Kee, A.J., G. Schevzov, V. Nair-Shalliker, C.S. Robinson, B. Vrhovski, M. Ghoddusi, M.R. Qiu, J.J. Lin, R. Weinberger, P.W. Gunning, and E.C. Hardeman.** 2004. Sorting of a nonmuscle tropomyosin to a novel cytoskeletal compartment in skeletal muscle results in muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 166:685-96.
- Kim, K.C., A.H. Caswell, J.A. Talvenheimo, and N.R. Brandt.** 1990. Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry.* 29:9281-9.
- Kim, S., K. Shilagardi, S. Zhang, S.N. Hong, K.L. Sens, J. Bo, G.A. Gonzalez, and E.H. Chen.** 2007. A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Dev Cell.* 12:571-86.
- Kim, S.A., G.S. Taylor, K.M. Torgersen, and J.E. Dixon.** 2002. Myotubularin and MTMR2, phosphatidylinositol 3-phosphatases mutated in myotubular myopathy and type 4B Charcot-Marie-Tooth disease. *J Biol Chem.* 277:4526-31.
- Kim, S.J., S. Kim, H. Shin, and C.S. Uhm.** 2008. Intercellular interaction observed by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy.* 108:1148-51.
- Klinge, L., S. Laval, S. Keers, F. Haldane, V. Straub, R. Barresi, and K. Bushby.** 2007. From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *Faseb J.* 21:1768-76.
- Knudson, C.M., N. Chaudhari, A.H. Sharp, J.A. Powell, K.G. Beam, and K.P. Campbell.** 1989. Specific absence of the alpha 1 subunit of the dihydropyridine receptor in mice with muscular dysgenesis. *J Biol Chem.* 264:1345-8.
- Komazaki, S., K. Ito, H. Takeshima, and H. Nakamura.** 2002. Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1. *FEBS Lett.* 524:225-9.
- Komazaki, S., M. Nishi, K. Kangawa, and H. Takeshima.** 1999. Immunolocalization of mitsugumin29 in developing skeletal muscle and effects of the protein expressed in amphibian embryonic cells. *Dev Dyn.* 215:87-95.
- Komazaki, S., M. Nishi, and H. Takeshima.** 2003. Abnormal junctional membrane structures in cardiac myocytes expressing ectopic junctophilin type 1. *FEBS Lett.* 542:69-73.
- Komazaki, S., M. Nishi, H. Takeshima, and H. Nakamura.** 2001. Abnormal formation of sarcoplasmic reticulum networks and triads during early development of skeletal muscle cells in mitsugumin29-deficient mice. *Dev Growth Differ.* 43:717-23.
- Kontrogianni-Konstantopoulos, A., D.H. Catino, J.C. Strong, S. Sutter, A.B. Borisov, D.W. Pumplun, M.W. Russell, and R.J. Bloch.** 2006. Obscurin modulates the assembly and organization of sarcomeres and the sarcoplasmic reticulum. *Faseb J.* 20:2102-11.
- Kontrogianni-Konstantopoulos, A., E.M. Jones, D.B. Van Rossum, and R.J. Bloch.** 2003. Obscurin is a ligand for small ankyrin 1 in skeletal muscle. *Mol Biol Cell.* 14:1138-48.
- Kovacic-Milivojevic, B., F. Roediger, E.A. Almeida, C.H. Damsky, D.G. Gardner, and D. Ilic.** 2001. Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *Mol Biol Cell.* 12:2290-307.
- Krolenko, S.A., and J.A. Lucy.** 2001. Reversible vacuolation of T-tubules in skeletal muscle: mechanisms and implications for cell biology. *Int Rev Cytol.* 202:243-98.
- Kruger, M., J. Wright, and K. Wang.** 1991. Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filament length, nebulin size, and epitope profile. *J Cell Biol.* 115:97-107.
- Kurokawa, K., R.E. Itoh, H. Yoshizaki, Y.O. Nakamura, and M. Matsuda.** 2004. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol Biol Cell.* 15:1003-10.
- Labeit, S., T. Gibson, A. Lakey, K. Leonard, M. Zeviani, P. Knight, J. Wardale, and J. Trinick.** 1991. Evidence that nebulin is a protein-ruler in muscle thin filaments. *FEBS Lett.* 282:313-6.
- Lange, S., K. Ouyang, G. Meyer, L. Cui, H. Cheng, R.L. Lieber, and J. Chen.** 2009. Obscurin determines the architecture of the longitudinal sarcoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 122:2640-50.
- Lange, S., F. Xiang, A. Yakovenko, A. Vihola, P. Hackman, E. Rostkova, J. Kristensen, B. Brandmeier, G. Franzen, B. Hedberg, L.G. Gunnarsson, S.M. Hughes, S. Marchand, T.**

- Sejersen, I. Richard, L. Edstrom, E. Ehler, B. Udd, and M. Gautel.** 2005. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*. 308:1599-603.
- Lannergren, J., H. Westerblad, and J.D. Bruton.** 2002. Dynamic vacuolation in skeletal muscle fibres after fatigue. *Cell Biol Int*. 26:911-20.
- Laporte, J., F. Bedez, A. Bolino, and J.L. Mandel.** 2003. Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Hum Mol Genet*. 12 Spec No 2:R285-92.
- Laporte, J., F. Blondeau, A. Gansmuller, Y. Lutz, J.L. Vonesch, and J.L. Mandel.** 2002. The PtdIns3P phosphatase myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles. *J Cell Sci*. 115:3105-17.
- Laporte, J., L.J. Hu, C. Kretz, J.L. Mandel, P. Kioschis, J.F. Coy, S.M. Klauck, A. Poustka, and N. Dahl.** 1996. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet*. 13:175-82.
- Laporte, J., W. Kress, and J.L. Mandel.** 2001. Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by detection of myotubularin. *Ann Neurol*. 50:42-6.
- Laurin, M., N. Fradet, A. Blangy, A. Hall, K. Vuori, and J.F. Cote.** 2008. The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:15446-51.
- Le Clainche, C., and M.F. Carrier.** 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev*. 88:489-513.
- Lee, C.W., J. Han, J.R. Bamburg, L. Han, R. Lynn, and J.Q. Zheng.** 2009. Regulation of acetylcholine receptor clustering by ADF/cofilin-directed vesicular trafficking. *Nat Neurosci*. 12:848-56.
- Lee, E., M. Marcucci, L. Daniell, M. Pypaert, O.A. Weisz, G.C. Ochoa, K. Farsad, M.R. Wenk, and P. De Camilli.** 2002. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*. 297:1193-6.
- Lennon, N.J., A. Kho, B.J. Bacskai, S.L. Perlmutter, B.T. Hyman, and R.H. Brown, Jr.** 2003. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem*. 278:50466-73.
- Li, Z., M. Mericskay, O. Agbulut, G. Butler-Browne, L. Carlsson, L.E. Thornell, C. Babinet, and D. Paulin.** 1997. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J Cell Biol*. 139:129-44.
- Liang, Y., H. Niederstrasser, M. Edwards, C.E. Jackson, and J.A. Cooper.** 2009. Distinct roles for CARMIL isoforms in cell migration. *Mol Biol Cell*. 20:5290-305.
- Lipton, B.H.** 1977. A fine-structural analysis of normal and modulated cells in myogenic cultures. *Dev Biol*. 60:26-47.
- Litchfield, D.W., D.G. Bosc, D.A. Canton, R.B. Saulnier, G. Vilks, and C. Zhang.** 2001. Functional specialization of CK2 isoforms and characterization of isoform-specific binding partners. *Mol Cell Biochem*. 227:21-9.
- Littlefield, R., A. Almenar-Queralt, and V.M. Fowler.** 2001. Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle. *Nat Cell Biol*. 3:544-51.
- Liu, J., M. Aoki, I. Illa, C. Wu, M. Fardeau, C. Angelini, C. Serrano, J.A. Urtizberea, F. Hentati, M.B. Hamida, S. Bohlega, E.J. Culper, A.A. Amato, K. Bossie, J. Oeltjen, K. Bejaoui, D. McKenna-Yasek, B.A. Hosler, E. Schurr, K. Arahata, P.J. de Jong, and R.H. Brown, Jr.** 1998. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*. 20:31-6.
- Lommel, S., S. Benesch, K. Rottner, T. Franz, J. Wehland, and R. Kuhn.** 2001. Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep*. 2:850-7.
- Lu, K., X. Yin, T. Weng, S. Xi, L. Li, G. Xing, X. Cheng, X. Yang, L. Zhang, and F. He.** 2008. Targeting WW domains linker of HECT-type ubiquitin ligase Smurf1 for activation by CKIP-1. *Nat Cell Biol*. 10:994-1002.
- Lyons, G.E., M. Ontell, R. Cox, D. Sassoon, and M. Buckingham.** 1990. The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. *J Cell Biol*. 111:1465-76.

- Madhavan, R., Z.L. Gong, J.J. Ma, A.W. Chan, and H.B. Peng.** 2009. The function of cortactin in the clustering of acetylcholine receptors at the vertebrate neuromuscular junction. *PLoS One*. 4:e8478.
- Marieb, E.** Human Anatomy and Physiology. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Martonosi, A., M.A. Gouvea, and J. Gergely.** 1960. Studies on actin. III. G-F transformation of actin and muscular contraction (experiments in vivo). *J Biol Chem*. 235:1707-10.
- Marty, I.** 2004. Triadin: a multi-protein family for which purpose? *Cell Mol Life Sci*. 61:1850-3.
- Marty, I., J. Faure, A. Fourest-Lieuvin, S. Vassilopoulos, S. Oddoux, and J. Brocard.** 2009. Triadin: what possible function 20 years later? *J Physiol*. 587:3117-21.
- Marty, I., M. Robert, M. Villaz, K. De Jongh, Y. Lai, W.A. Catterall, and M. Ronjat.** 1994. Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:2270-4.
- Massarwa, R., S. Carmon, B.Z. Shilo, and E.D. Schejter.** 2007. WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in Drosophila. *Dev Cell*. 12:557-69.
- McElhinny, A.S., B. Kolmerer, V.M. Fowler, S. Labeit, and C.C. Gregorio.** 2001. The N-terminal end of nebulin interacts with tropomodulin at the pointed ends of the thin filaments. *J Biol Chem*. 276:583-92.
- McGrew, M.J., N. Bogdanova, K. Hasegawa, S.H. Hughes, R.N. Kitsis, and N. Rosenthal.** 1996. Distinct gene expression patterns in skeletal and cardiac muscle are dependent on common regulatory sequences in the MLC1/3 locus. *Mol Cell Biol*. 16:4524-34.
- McNeil, A.K., U. Rescher, V. Gerke, and P.L. McNeil.** 2006. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J Biol Chem*. 281:35202-7.
- Mejillano, M.R., S. Kojima, D.A. Applewhite, F.B. Gertler, T.M. Svitkina, and G.G. Borisy.** 2004. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell*. 118:363-73.
- Melzer, W., Z. Andronache, and D. Ursu.** 2006. Functional roles of the gamma subunit of the skeletal muscle DHP-receptor. *J Muscle Res Cell Motil*. 27:307-14.
- Meunier, B., M. Quaranta, L. Daviet, A. Hatzoglou, and C. Leprince.** 2009. The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170). *Eur J Cell Biol*. 88:91-102.
- Miana-Mena, F.J., S. Roux, J.C. Benichou, R. Osta, and P. Brulet.** 2002. Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:3234-9.
- Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa.** 1998. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J*. 17:6932-41.
- Miller, G., H. Musa, M. Gautel, and M. Peckham.** 2003. A targeted deletion of the C-terminal end of titin, including the titin kinase domain, impairs myofibrillogenesis. *J Cell Sci*. 116:4811-9.
- Minetti, C., M. Bado, P. Broda, F. Sotgia, C. Bruno, F. Galbiati, D. Volonte, G. Lucania, A. Pavan, E. Bonilla, M.P. Lisanti, and G. Cordone.** 2002. Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am J Pathol*. 160:265-70.
- Miyake, K., and P.L. McNeil.** 1995. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *J Cell Biol*. 131:1737-45.
- Morel, E., R.G. Parton, and J. Gruenberg.** 2009. Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell*. 16:445-57.
- Morris, G.E.** 2001. The role of the nuclear envelope in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Trends Mol Med*. 7:572-7.
- Mrosek, M., D. Labeit, S. Witt, H. Heerklotz, E. von Castelmur, S. Labeit, and O. Mayans.** 2007. Molecular determinants for the recruitment of the ubiquitin-ligase MuRF-1 onto M-line titin. *Faseb J*. 21:1383-92.
- Muller, A.J., J.F. Baker, J.B. DuHadaway, K. Ge, G. Farmer, P.S. Donover, R. Meade, C. Reid, R. Grzanna, A.H. Roach, N. Shah, A.P. Soler, and G.C. Prendergast.** 2003. Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Mol Cell Biol*. 23:4295-306.

- Murphy, R.M., J.P. Mollica, and G.D. Lamb.** 2009. Plasma membrane removal in rat skeletal muscle fibers reveals caveolin-3 hot-spots at the necks of transverse tubules. *Exp Cell Res.* 315:1015-28.
- Murray, T.V., J.M. McMahon, B.A. Howley, A. Stanley, T. Ritter, A. Mohr, R. Zwacka, and H.O. Fearnhead.** 2008. A non-apoptotic role for caspase-9 in muscle differentiation. *J Cell Sci.* 121:3786-93.
- Musa, H., S. Meek, M. Gautel, D. Peddie, A.J. Smith, and M. Peckham.** 2006. Targeted homozygous deletion of M-band titin in cardiomyocytes prevents sarcomere formation. *J Cell Sci.* 119:4322-31.
- Nicholson-Dykstra, S., H.N. Higgs, and E.S. Harris.** 2005. Actin dynamics: growth from dendritic branches. *Curr Biol.* 15:R346-57.
- Nicot, A.S., A. Toussaint, V. Tosch, C. Kretz, C. Wallgren-Pettersson, E. Iwarsson, H. Kingston, J.M. Garnier, V. Biancalana, A. Oldfors, J.L. Mandel, and J. Laporte.** 2007. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet.* 39:1134-9.
- Nishi, M., S. Komazaki, N. Kurebayashi, Y. Ogawa, T. Noda, M. Iino, and H. Takeshima.** 1999. Abnormal features in skeletal muscle from mice lacking mitsugumin29. *J Cell Biol.* 147:1473-80.
- Nixon, S.J., J. Wegner, C. Ferguson, P.F. Mery, J.F. Hancock, P.D. Currie, B. Key, M. Westerfield, and R.G. Parton.** 2005. Zebrafish as a model for caveolin-associated muscle disease; caveolin-3 is required for myofibril organization and muscle cell patterning. *Hum Mol Genet.* 14:1727-43.
- Nizhynska, V., R. Neumueller, and R. Herbst.** 2007. Phosphoinositide 3-kinase acts through RAC and Cdc42 during agrin-induced acetylcholine receptor clustering. *Dev Neurobiol.* 67:1047-58.
- Nobes, C.D., and A. Hall.** 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.
- Nowak, S.J., P.C. Nahirney, A.K. Hadjantonakis, and M.K. Baylies.** 2009. Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. *J Cell Sci.* 122:3282-93.
- O'Brien, S.P., K. Seipel, Q.G. Medley, R. Bronson, R. Segal, and M. Streuli.** 2000. Skeletal muscle deformity and neuronal disorder in Trio exchange factor-deficient mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:12074-8.
- Oddoux, S., J. Brocard, A. Schweitzer, P. Szentesi, B. Giannesini, J. Brocard, J. Faure, K. Pernet-Gallay, D. Bendahan, J. Lunardi, L. Csernoch, and I. Marty.** 2009. Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem.* 284:34918-29.
- Ohtake, Y., H. Tojo, and M. Seiki.** 2006. Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. *J Cell Sci.* 119:3822-32.
- Olsten, M.E., D.A. Canton, C. Zhang, P.A. Walton, and D.W. Litchfield.** 2004. The Pleckstrin homology domain of CK2 interacting protein-1 is required for interactions and recruitment of protein kinase CK2 to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 279:42114-27.
- Ottenheijm, C.A., A.M. Knottnerus, D. Buck, X. Luo, K. Greer, A. Hoying, S. Labeit, and H. Granzier.** 2009. Tuning passive mechanics through differential splicing of titin during skeletal muscle development. *Biophys J.* 97:2277-86.
- Ozawa, E., Y. Hagiwara, and M. Yoshida.** 1999. Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biochem.* 190:143-51.
- Pajcini, K.V., J.H. Pomerantz, O. Alkan, R. Doyonnas, and H.M. Blau.** 2008. Myoblasts and macrophages share molecular components that contribute to cell-cell fusion. *J Cell Biol.* 180:1005-19.
- Paolini, C., M. Quarta, A. Nori, S. Boncompagni, M. Canato, P. Volpe, P.D. Allen, C. Reggiani, and F. Protasi.** 2007. Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *J Physiol.* 583:767-84.
- Pappas, C.T., N. Bhattacharya, J.A. Cooper, and C.C. Gregorio.** 2008. Nebulin interacts with CapZ and regulates thin filament architecture within the Z-disc. *Mol Biol Cell.* 19:1837-47.

- Pardo, J.V., J.D. Siliciano, and S.W. Craig.** 1983. A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:1008-12.
- Park, H., R. Bhalla, R. Saigal, M. Radisic, N. Watson, R. Langer, and G. Vunjak-Novakovic.** 2008. Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs. *J Tissue Eng Regen Med.* 2:279-87.
- Parton, R.G., M. Way, N. Zorzi, and E. Stang.** 1997. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol.* 136:137-54.
- Pato, C., F. Stetzkowski-Marden, K. Gaus, M. Recouvreur, A. Cartaud, and J. Cartaud.** 2008. Role of lipid rafts in agrin-elicited acetylcholine receptor clustering. *Chem Biol Interact.* 175:64-7.
- Pavlovicova, M., M. Novotova, and I. Zahradnik.** 2003. Structure and composition of tubular aggregates of skeletal muscle fibres. *Gen Physiol Biophys.* 22:425-40.
- Peckham, M., P. Young, and M. Gautel.** 1997. Constitutive and variable regions of Z-disk titin/connectin in myofibril formation: a dominant-negative screen. *Cell Struct Funct.* 22:95-101.
- Pellegrin, S., and H. Mellor.** 2005. The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol.* 15:129-33.
- Peng, H.B., A.A. Ali, Z. Dai, D.F. Daggett, E. Raulo, and H. Rauvala.** 1995. The role of heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in the postsynaptic induction in cultured muscle cells. *J Neurosci.* 15:3027-38.
- Peng, H.B., H. Xie, and Z. Dai.** 1997. Association of cortactin with developing neuromuscular specializations. *J Neurocytol.* 26:637-50.
- Perkins, A.D., S.J. Ellis, P. Asghari, A. Shamsian, E.D. Moore, and G. Tanentzapf.** 2010. Integrin-mediated adhesion maintains sarcomeric integrity. *Dev Biol.* 338:15-27.
- Pernigo, S., A. Fukuzawa, M. Bertz, M. Holt, M. Rief, R.A. Steiner, and M. Gautel.** 2010. Structural insight into M-band assembly and mechanics from the titin-obscurin-like-1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:2908-13.
- Person, V., S. Kostin, K. Suzuki, S. Labeit, and J. Schaper.** 2000. Antisense oligonucleotide experiments elucidate the essential role of titin in sarcomerogenesis in adult rat cardiomyocytes in long-term culture. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3851-9.
- Petrof, B.J., J.B. Shrager, H.H. Stedman, A.M. Kelly, and H.L. Sweeney.** 1993. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:3710-4.
- Pilot-Storck, F., E. Chopin, J.F. Rual, A. Baudot, P. Dobrokhotov, M. Robinson-Rechavi, C. Brun, M.E. Cusick, D.E. Hill, L. Schaeffer, M. Vidal, and E. Goillot.** 2010. Interactome mapping of the phosphatidylinositol 3-kinase-mammalian target of rapamycin pathway identifies deformed epidermal autoregulatory factor-1 as a new glycogen synthase kinase-3 interactor. *Mol Cell Proteomics.* 9:1578-93.
- Porter, G.A., G.M. Dmytrenko, J.C. Winkelmann, and R.J. Bloch.** 1992. Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol.* 117:997-1005.
- Posey, A.D., Jr., P. Pytel, K. Gardikiotes, A.R. Demonbreun, M. Rainey, M. George, H. Band, and E.M. McNally.** 2011. Endocytic recycling proteins EHD1 and EHD2 interact with fer-1-like-5 (Fer1L5) and mediate myoblast fusion. *J Biol Chem.* 286:7379-88.
- Proszynski, T.J., J. Gingras, G. Valdez, K. Krzewski, and J.R. Sanes.** 2009. Podosomes are present in a postsynaptic apparatus and participate in its maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:18373-8.
- Protasi, F., C. Franzini-Armstrong, and P.D. Allen.** 1998. Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 140:831-42.
- Radice, G.L., H. Rayburn, H. Matsunami, K.A. Knudsen, M. Takeichi, and R.O. Hynes.** 1997. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol.* 181:64-78.
- Raeker, M.O., F. Su, S.B. Geisler, A.B. Borisov, A. Kontrogianni-Konstantopoulos, S.E. Lyons, and M.W. Russell.** 2006. Obscurin is required for the lateral alignment of striated myofibrils in zebrafish. *Dev Dyn.* 235:2018-29.

- Ralston, E., and T. Ploug.** 1999. Caveolin-3 is associated with the T-tubules of mature skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res.* 246:510-5.
- Ramjaun, A.R., and P.S. McPherson.** 1998. Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem.* 70:2369-76.
- Rash, J.E., and D. Fambrough.** 1973. Ultrastructural and electrophysiological correlates of cell coupling and cytoplasmic fusion during myogenesis in vitro. *Dev Biol.* 30:166-86.
- Razzaq, A., I.M. Robinson, H.T. McMahon, J.N. Skepper, Y. Su, A.C. Zehlf, A.P. Jackson, N.J. Gay, and C.J. O'Kane.** 2001. Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* 15:2967-79.
- Rezgui, S.S., S. Vassilopoulos, J. Brocard, J.C. Platel, A. Bouron, C. Arnoult, S. Oddoux, L. Garcia, M. De Waard, and I. Marty.** 2005. Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J Biol Chem.* 280:39302-8.
- Richardson, B.E., K. Beckett, S.J. Nowak, and M.K. Baylies.** 2007. SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development.* 134:4357-67.
- Ridley, A.J.** 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16:522-9.
- Ridley, A.J., and A. Hall.** 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 70:389-99.
- Robertson, A.S., E. Smythe, and K.R. Ayscough.** 2009. Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci.* 66:2049-65.
- Roseblatt, M., C. Hidalgo, C. Vergara, and N. Ikemoto.** 1981. Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem.* 256:8140-8.
- Rosen, G.D., J.R. Sanes, R. LaChance, J.M. Cunningham, J. Roman, and D.C. Dean.** 1992. Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell.* 69:1107-19.
- Rossi, D., V. Barone, E. Giacomello, V. Cusimano, and V. Sorrentino.** 2008. The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic.* 9:1044-9.
- Rouiller, I., X.P. Xu, K.J. Amann, C. Egile, S. Nickell, D. Nicastro, R. Li, T.D. Pollard, N. Volkman, and D. Hanein.** 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 180:887-95.
- Sadava, Heller, Orians, Purves, and Hillis.** Life : The Science of Biology. Sinauer Associates, Inc.
- Safi, A., M. Vandromme, S. Caussanel, L. Valdacci, D. Baas, M. Vidal, G. Brun, L. Schaeffer, and E. Goillot.** 2004. Role for the pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 in phosphatidylinositol 3-kinase-regulated muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* 24:1245-55.
- Sagona, A.P., I.P. Nezis, N.M. Pedersen, K. Liestol, J. Poulton, T.E. Rusten, R.I. Skotheim, C. Raiborg, and H. Stenmark.** 2010. PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat Cell Biol.* 12:362-71.
- Sanger, J.W., and H. Holtzer.** 1972. Cytochalasin B: effects on cell morphology, cell adhesion, and mucopolysaccharide synthesis (cultured cells-contractile microfilaments-glycoproteins-embryonic cells-sorting-out). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69:253-7.
- Sanger, J.W., S. Kang, C.C. Siebrands, N. Freeman, A. Du, J. Wang, A.L. Stout, and J.M. Sanger.** 2005. How to build a myofibril. *J Muscle Res Cell Motil.* 26:343-54.
- Sanger, J.W., J. Wang, Y. Fan, J. White, and J.M. Sanger.** 2010. Assembly and dynamics of myofibrils. *J Biomed Biotechnol.* 2010:858606.
- Sanger, J.W., J. Wang, B. Holloway, A. Du, and J.M. Sanger.** 2009. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in zebrafish. *Cell Motil Cytoskeleton.* 66:556-66.
- Schaerer-Brodbeck, C., and H. Riezman.** 2003. Genetic and biochemical interactions between the Arp2/3 complex, Cmd1p, casein kinase II, and Tub4p in yeast. *FEMS Yeast Res.* 4:37-49.
- Schredelseker, J., V. Di Biase, G.J. Obermair, E.T. Felder, B.E. Flucher, C. Franzini-Armstrong, and M. Grabner.** 2005. The beta 1a subunit is essential for the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:17219-24.
- Schuler, M., F. Ali, E. Metzger, P. Chambon, and D. Metzger.** 2005. Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. *Genesis.* 41:165-70.

- Schwander, M., M. Leu, M. Stumm, O.M. Dorchies, U.T. Ruegg, J. Schittny, and U. Muller.** 2003. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell.* 4:673-85.
- Selcen, D., G. Stilling, and A.G. Engel.** 2001. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology.* 56:1472-81.
- Serena, E., M. Flaibani, S. Carnio, L. Boldrin, L. Vitiello, P. De Coppi, and N. Elvassore.** 2008. Electrophysiologic stimulation improves myogenic potential of muscle precursor cells grown in a 3D collagen scaffold. *Neurol Res.* 30:207-14.
- Serysheva, II.** 2004. Structural insights into excitation-contraction coupling by electron cryomicroscopy. *Biochemistry (Mosc).* 69:1226-32.
- Shah, S.B., F.C. Su, K. Jordan, D.J. Milner, J. Friden, Y. Capetanaki, and R.L. Lieber.** 2002. Evidence for increased myofibrillar mobility in desmin-null mouse skeletal muscle. *J Exp Biol.* 205:321-5.
- Shen, X., C. Franzini-Armstrong, J.R. Lopez, L.R. Jones, Y.M. Kobayashi, Y. Wang, W.G. Kerrick, A.H. Caswell, J.D. Potter, T. Miller, P.D. Allen, and C.F. Perez.** 2007. Triadins modulate intracellular Ca(2+) homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 282:37864-74.
- Skwarek-Maruszewska, A., P. Hotulainen, P.K. Mattila, and P. Lappalainen.** 2009. Contractility-dependent actin dynamics in cardiomyocyte sarcomeres. *J Cell Sci.* 122:2119-26.
- Snapper, S.B., F. Takeshima, I. Anton, C.H. Liu, S.M. Thomas, D. Nguyen, D. Dudley, H. Fraser, D. Purich, M. Lopez-Illasaca, C. Klein, L. Davidson, R. Bronson, R.C. Mulligan, F. Southwick, R. Geha, M.B. Goldberg, F.S. Rosen, J.H. Hartwig, and F.W. Alt.** 2001. N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol.* 3:897-904.
- Sohn, R.L., P. Huang, G. Kawahara, M. Mitchell, J. Guyon, R. Kalluri, L.M. Kunkel, and E. Gussoni.** 2009. A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:9274-9.
- Sonnemann, K.J., D.P. Fitzsimons, J.R. Patel, Y. Liu, M.F. Schneider, R.L. Moss, and J.M. Ervasti.** 2006. Cytoplasmic gamma-actin is not required for skeletal muscle development but its absence leads to a progressive myopathy. *Dev Cell.* 11:387-97.
- Soteriou, A., M. Gamage, and J. Trinick.** 1993. A survey of interactions made by the giant protein titin. *J Cell Sci.* 104 (Pt 1):119-23.
- Stadler, B., T.M. Blattler, and A. Franco-Obregon.** 2010. Time-lapse imaging of in vitro myogenesis using atomic force microscopy. *J Microsc.* 237:63-9.
- Steffen, A., J. Faix, G.P. Resch, J. Linkner, J. Wehland, J.V. Small, K. Rottner, and T.E. Stradal.** 2006. Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol Biol Cell.* 17:2581-91.
- Stelzer, J.E., D.P. Fitzsimons, and R.L. Moss.** 2006. Ablation of myosin-binding protein-C accelerates force development in mouse myocardium. *Biophys J.* 90:4119-27.
- Stetzkowski-Marden, F., K. Gaus, M. Recouvreur, A. Cartaud, and J. Cartaud.** 2006. Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J Lipid Res.* 47:2121-33.
- Sugihara, K., N. Nakatsuji, K. Nakamura, K. Nakao, R. Hashimoto, H. Otani, H. Sakagami, H. Kondo, S. Nozawa, A. Aiba, and M. Katsuki.** 1998. Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene.* 17:3427-33.
- Svitkina, T.M., and G.G. Borisy.** 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol.* 145:1009-26.
- Svitkina, T.M., E.A. Bulanova, O.Y. Chaga, D.M. Vignjevic, S. Kojima, J.M. Vasiliev, and G.G. Borisy.** 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol.* 160:409-21.
- Symons, M., and N. Rusk.** 2003. Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Curr Biol.* 13:R409-18.
- Takeda, K., Z.X. Yu, S. Qian, T.K. Chin, R.S. Adelstein, and V.J. Ferrans.** 2000. Nonmuscle myosin II localizes to the Z-lines and intercalated discs of cardiac muscle and to the Z-lines of skeletal muscle. *Cell Motil Cytoskeleton.* 46:59-68.

- Takeda, S., S. Minakata, R. Koike, I. Kawahata, A. Narita, M. Kitazawa, M. Ota, T. Yamakuni, Y. Maeda, and Y. Nitani.** 2010. Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation--steric and allosteric inhibition. *PLoS Biol.* 8:e1000416.
- Takekura, H., B.E. Flucher, and C. Franzini-Armstrong.** 2001. Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev Biol.* 239:204-14.
- Takekura, H., and N. Kasuga.** 1999. Differential response of the membrane systems involved in excitation-contraction coupling to early and later postnatal denervation in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 20:279-89.
- Takekura, H., N. Kasuga, K. Kitada, and T. Yoshioka.** 1996a. Morphological changes in the triads and sarcoplasmic reticulum of rat slow and fast muscle fibres following denervation and immobilization. *J Muscle Res Cell Motil.* 17:391-400.
- Takekura, H., N. Kasuga, and T. Yoshioka.** 1996b. Influences of sarcomere length and selective elimination of myosin filaments on the localization and orientation of triads in rat muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil.* 17:235-42.
- Takekura, H., H. Shuman, and C. Franzini-Armstrong.** 1993. Differentiation of membrane systems during development of slow and fast skeletal muscle fibres in chicken. *J Muscle Res Cell Motil.* 14:633-45.
- Takekura, H., H. Tamaki, T. Nishizawa, and N. Kasuga.** 2003. Plasticity of the transverse tubules following denervation and subsequent reinnervation in rat slow and fast muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil.* 24:439-51.
- Takekura, H., S. Komazaki, M. Nishi, M. Iino, and K. Kangawa.** 2000. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell.* 6:11-22.
- Takekura, H., M. Shimuta, S. Komazaki, K. Ohmi, M. Nishi, M. Iino, A. Miyata, and K. Kangawa.** 1998. Mitsugumin29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle. *Biochem J.* 331 (Pt 1):317-22.
- Tanabe, T., K.G. Beam, J.A. Powell, and S. Numa.** 1988. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature.* 336:134-9.
- Thompson, H.M., H. Cao, J. Chen, U. Euteneuer, and M.A. McNiven.** 2004. Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nat Cell Biol.* 6:335-42.
- Tokuda, E., N. Fujita, T. Oh-hara, S. Sato, A. Kurata, R. Katayama, T. Itoh, T. Takenawa, K. Miyazono, and T. Tsuruo.** 2007. Casein kinase 2-interacting protein-1, a novel Akt pleckstrin homology domain-interacting protein, down-regulates PI3K/Akt signaling and suppresses tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 67:9666-76.
- Tokuyasu, K.T.** 1989. Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. III. Generation of fasciae adherentes and costameres. *J Cell Biol.* 108:43-53.
- Toussaint, A., B.S. Cowling, K. Hnia, M. Mohr, A. Oldfors, Y. Schwab, U. Yis, T. Maisonobe, T. Stojkovic, C. Wallgren-Pettersson, V. Laugel, A. Echaniz-Laguna, J.L. Mandel, I. Nishino, and J. Laporte.** 2010. Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta Neuropathol.* 121:253-66.
- Tsujita, K., T. Itoh, T. Ijuin, A. Yamamoto, A. Shisheva, J. Laporte, and T. Takenawa.** 2004. Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction. *J Biol Chem.* 279:13817-24.
- Usher-Smith, J.A., J.A. Fraser, C.L. Huang, and J.N. Skepper.** 2007. Alterations in triad ultrastructure following repetitive stimulation and intracellular changes associated with exercise in amphibian skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 28:19-28.
- Vaghy, P.L., J. Fang, W. Wu, and L.P. Vaghy.** 1998. Increased caveolin-3 levels in mdx mouse muscles. *FEBS Lett.* 431:125-7.
- Vale, R.D., and R.A. Milligan.** 2000. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science.* 288:88-95.
- Vassilopoulos, S., S. Oddoux, S. Groh, M. Cacheux, J. Faure, J. Brocard, K.P. Campbell, and I. Marty.** 2010. Caveolin 3 is associated with the calcium release complex and is modified via in vivo triadin modification. *Biochemistry.* 49:6130-5.

- 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.* 280:28601-9.
- Vasyutina, E., B. Martarelli, C. Brakebusch, H. Wende, and C. Birchmeier. 2009. The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:8935-40.
- Vlahovich, N., A.J. Kee, C. Van der Poel, E. Kettle, D. Hernandez-Deviez, C. Lucas, G.S. Lynch, R.G. Parton, P.W. Gunning, and E.C. Hardeman. 2009. Cytoskeletal tropomyosin Tm5NM1 is required for normal excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Mol Biol Cell.* 20:400-9.
- Vlahovich, N., G. Schevzov, V. Nair-Shaliker, B. Ilkovski, S.T. Artap, J.E. Joya, A.J. Kee, K.N. North, P.W. Gunning, and E.C. Hardeman. 2008. Tropomyosin 4 defines novel filaments in skeletal muscle associated with muscle remodelling/regeneration in normal and diseased muscle. *Cell Motil Cytoskeleton.* 65:73-85.
- Wakayama, Y., E. Bonilla, and D.L. Schotland. 1983. Muscle plasma membrane abnormalities in infants with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 33:1368-70.
- Wang, K., M. Knipfer, Q.Q. Huang, A. van Heerden, L.C. Hsu, G. Gutierrez, X.L. Quian, and H. Stedman. 1996. Human skeletal muscle nebulin sequence encodes a blueprint for thin filament architecture. Sequence motifs and affinity profiles of tandem repeats and terminal SH3. *J Biol Chem.* 271:4304-14.
- Wang, Y., X. Li, H. Duan, T.R. Fulton, J.P. Eu, and G. Meissner. 2009. Altered stored calcium release in skeletal myotubes deficient of triadin and junctin. *Cell Calcium.* 45:29-37.
- Weatherbee, S.D., K.V. Anderson, and L.A. Niswander. 2006. LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development.* 133:4993-5000.
- Weber, A., C.R. Pennise, G.G. Babcock, and V.M. Fowler. 1994. Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *J Cell Biol.* 127:1627-35.
- Weinert, S., N. Bergmann, X. Luo, B. Erdmann, and M. Gotthardt. 2006. M line-deficient titin causes cardiac lethality through impaired maturation of the sarcomere. *J Cell Biol.* 173:559-70.
- Weisleder, N., H. Takeshima, and J. Ma. 2008. Immuno-proteomic approach to excitation--contraction coupling in skeletal and cardiac muscle: molecular insights revealed by the mitsugumins. *Cell Calcium.* 43:1-8.
- Welser, J.V., J.E. Rooney, N.C. Cohen, P.B. Gurpur, C.A. Singer, R.A. Evans, B.A. Haines, and D.J. Burkin. 2009. Myotendinous junction defects and reduced force transmission in mice that lack alpha7 integrin and utrophin. *Am J Pathol.* 175:1545-54.
- Weston, C., B. Yee, E. Hod, and J. Prives. 2000. Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *J Cell Biol.* 150:205-12.
- Wilson, G.M., A.B. Fielding, G.C. Simon, X. Yu, P.D. Andrews, R.S. Hames, A.M. Frey, A.A. Peden, G.W. Gould, and R. Prekeris. 2005. The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis. *Mol Biol Cell.* 16:849-60.
- Witt, C.C., C. Burkart, D. Labeit, M. McNabb, Y. Wu, H. Granzier, and S. Labeit. 2006. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *Embo J.* 25:3843-55.
- Wu, Y., S.P. Bell, K. Trombitas, C.C. Witt, S. Labeit, M.M. LeWinter, and H. Granzier. 2002. Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation.* 106:1384-9.
- Xi, S., Y. Tie, K. Lu, M. Zhang, X. Yin, J. Chen, G. Xing, C. Tian, X. Zheng, F. He, and L. Zhang. 2010. N-terminal PH domain and C-terminal auto-inhibitory region of CKIP-1 coordinate to determine its nucleus-plasma membrane shuttling. *FEBS Lett.* 584:1223-30.
- Xu, P., A.S. Zot, and H.G. Zot. 1995. Identification of Acan125 as a myosin-I-binding protein present with myosin-I on cellular organelles of Acanthamoeba. *J Biol Chem.* 270:25316-9.
- Yang, C., M. Pring, M.A. Wear, M. Huang, J.A. Cooper, T.M. Svitkina, and S.H. Zigmond. 2005. Mammalian CARMIL inhibits actin filament capping by capping protein. *Dev Cell.* 9:209-21.

- Yarmola, E.G., and M.R. Bubb.** 2006. Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. *Trends Biochem Sci.* 31:197-205.
- Ying, S.X., Z.J. Hussain, and Y.E. Zhang.** 2003. Smurf1 facilitates myogenic differentiation and antagonizes the bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast conversion by targeting Smad5 for degradation. *J Biol Chem.* 278:39029-36.
- Yuan, Q., G.C. Fan, M. Dong, B. Altschaf, A. Diwan, X. Ren, H.H. Hahn, W. Zhao, J.R. Waggoner, L.R. Jones, W.K. Jones, D.M. Bers, G.W. Dorn, 2nd, H.S. Wang, H.H. Valdivia, G. Chu, and E.G. Kranias.** 2007. Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity. *Circulation.* 115:300-9.
- Yuan, S.H., W. Arnold, and A.O. Jorgensen.** 1991. Biogenesis of transverse tubules and triads: immunolocalization of the 1,4-dihydropyridine receptor, TS28, and the ryanodine receptor in rabbit skeletal muscle developing in situ. *J Cell Biol.* 112:289-301.
- 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.* 272:23389-97.
- Zhang, L., Y. Tang, Y. Tie, C. Tian, J. Wang, Y. Dong, Z. Sun, and F. He.** 2007. The PH domain containing protein CKIP-1 binds to IFP35 and Nmi and is involved in cytokine signaling. *Cell Signal.* 19:932-44.
- Zhang, L., Y. Tie, C. Tian, G. Xing, Y. Song, Y. Zhu, Z. Sun, and F. He.** 2006. CKIP-1 recruits nuclear ATM partially to the plasma membrane through interaction with ATM. *Cell Signal.* 18:1386-95.
- Zhang, L., G. Xing, Y. Tie, Y. Tang, C. Tian, L. Li, L. Sun, H. Wei, Y. Zhu, and F. He.** 2005. Role for the pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 in AP-1 regulation and apoptosis. *Embo J.* 24:766-78.
- Zhou, D., C.S. Birkenmeier, M.W. Williams, J.J. Sharp, J.E. Barker, and R.J. Bloch.** 1997. Small, membrane-bound, alternatively spliced forms of ankyrin 1 associated with the sarcoplasmic reticulum of mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol.* 136:621-31.
- Zimmerberg, J., and S. McLaughlin.** 2004. Membrane curvature: how BAR domains bend bilayers. *Curr Biol.* 14:R250-2.

TITRE français

Implication de la protéine adaptatrice CKIP-1 dans le remodelage du cytosquelette d'actine et des membranes dans le muscle strié squelettique

RESUME français

Les cellules des muscles striés squelettiques sont constituées d'éléments contractiles enveloppés par un réseau membranaire. La formation et l'entretien du muscle strié squelettique impliquent la migration des précurseurs myogéniques, la fusion des myoblastes en myotubes et la mise en place des triades. Ces événements reposent sur le remodelage des membranes et du cytosquelette d'actine des cellules musculaires. Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle de la protéine adaptatrice CKIP-1 (*casein kinase 2 interacting protein-1*) dans certaines étapes du développement du muscle strié squelettique. Après avoir identifié le complexe de nucléation de l'actine Arp (*actin-related protein*) 2/3 comme un nouvel interacteur de CKIP-1, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de *ckip-1* chez l'embryon de poisson zèbre altère la morphologie des myoblastes et empêche leur fusion du fait d'une désorganisation du cytosquelette d'actine. J'ai également montré que CKIP-1 n'est présente qu'au cours des étapes précoces de la myogenèse *in vitro* et *in vivo* chez la souris, puis elle est progressivement clivée. En outre, la modulation de l'expression de CKIP-1 provoque des défauts membranaires aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans le muscle adulte de souris, suggérant que CKIP-1 est impliquée dans le remodelage des membranes. CKIP-1, par ses capacités à remodeler le cytosquelette d'actine et les membranes, pourrait intervenir dans plusieurs étapes de la vie du muscle : la migration, la fusion des myoblastes et la mise en place ou le maintien du réseau membranaire interne des cellules du muscle strié squelettique.

MOTS-CLES français

muscle strié squelettique, myogenèse, cytosquelette, actine, fusion membranaire, CKIP-1

TITRE anglais

CKIP-1 scaffold protein involvement in actin cytoskeleton and membrane remodelling in skeletal muscle

RESUME anglais

Skeletal muscle cells are composed of contractile elements wrapped in a membrane network. Formation and maintenance of skeletal muscle involve muscle precursor migration, fusion and triad formation. These events rely on actin cytoskeleton and membrane remodelling in muscle cells. The aim of my thesis work was to study the role of the scaffold protein CKIP-1 (*casein kinase 2 interacting protein-1*) at different steps of skeletal muscle development. We identified the actin nucleation complex Arp (*actin-related protein*) 2/3 as a CKIP-1 new interactor and showed that *Ckip-1* depletion in zebrafish embryos alters fast twitch myoblast morphology and prevents their fusion due to actin cytoskeleton disorganization. I further showed that CKIP-1 is only present during early myogenesis *in vitro* and *in vivo* in mouse, and is then cleaved. Modulation of CKIP-1 expression induces membrane defects *in vitro* but also *in vivo* in adult mouse muscle, suggesting that CKIP-1 is involved in membrane remodelling. Through its abilities to remodel actin cytoskeleton and thus membranes, CKIP-1 could be implicated in various steps of muscle life: myoblast migration, fusion, and formation or maintenance of the intracellular membrane compartments of skeletal muscle cells.

MOTS-CLEFS anglais

skeletal muscle, myogenesis, cytoskeleton, actin, membrane fusion, CKIP-1