



Université Claude Bernard



## DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **21 septembre 2018**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **KUTCHUKIAN Candice**

Titre de la thèse : « *Signalisation calcique et couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique : modulation par certains phosphoinositides et altérations associées dans deux myopathies centronucléaires* »



### Résumé

Le couplage excitation-contraction (EC) des fibres musculaires squelettiques s'opère à travers un efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique (RS) vers le compartiment cytosolique, en réponse à l'activité électrique de la membrane plasmique. Des mutations dans le gène codant pour la phosphoinositide (PtdInsP) 3-phosphatase myotubularine (MTM1) sont associées à la myopathie centronucléaire (CNM) liée à l'X (XL-CNM), caractérisée par une faiblesse musculaire très sévère limitant l'espérance de vie de quelques mois à quelques années. Une altération du couplage EC a été décrite dans les fibres musculaires déficientes en MTM1 qui joue certainement un rôle critique dans la faiblesse musculaire associée à la XL-CNM. Cependant la fonction exacte de MTM1, les mécanismes pathologiques de la XL-CNM et le rôle potentiel des PtdInsPs dans le couplage EC normal et pathologique restent peu connus.

Dans ce contexte, mon projet de thèse a visé à comprendre les interactions fonctionnelles entre les PtdInsPs et l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique, avec un intérêt spécifique pour les implications pathologiques. L'étude du couplage EC et de l'homéostasie calcique musculaire s'est basée sur une combinaison d'électrophysiologie et de microscopie confocale, sur fibres musculaires isolées de souris contrôles et de souris transgéniques, modèles de CNM humaines.

Dans un premier temps, j'ai testé les conséquences d'une réduction rapide du taux de PtdIns(4,5) $P_2$  (le PtdInsP majoritaire dans la membrane plasmique) sur la fonction du couplage EC. Pour cela, j'ai exprimé dans les fibres musculaires de souris sauvages une PtdInsP phosphatase sensible au potentiel, la Ci-VSP. Les résultats ont montré une altération de l'efflux calcique du RS en réponse à l'activation de la phosphatase, démontrant l'implication du PtdIns(4,5) $P_2$  dans la régulation du couplage EC et de l'homéostasie calcique musculaire.

Dans un deuxième temps, j'ai réalisé une caractérisation complète des défauts de signalisation calcique et du couplage EC dans les fibres musculaires isolées de souris *Mtm1* KO. Les résultats ont montré que l'efflux calcique du RS dans ce modèle est non seulement d'amplitude réduite, mais présente également des altérations cinétiques sévères. De plus, j'ai

pu montrer que ces défauts sont spatialement inhomogènes à l'échelle subcellulaire, au moins en partie en raison d'altérations de la structure des fibres musculaires. L'inhibition pharmacologique de l'activité PtdIns 3-kinase améliore ces défauts *in vitro* ainsi que la survie des souris *in vivo*, suggérant que l'accumulation des substrats de MTM1 participe aux défauts du couplage EC. Ces résultats montrent par ailleurs le bénéfice thérapeutique potentiel d'une approche pharmacologique basée sur l'inhibition d'activité PtdIns 3-kinase. Enfin, j'ai mis en évidence des altérations du couplage EC et de la signalisation calcique dans un modèle d'une forme plus modérée (autosomique dominante) de CNM, associée à des mutations dans le gène *DNM2* (modèle murin KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup>). Certaines de ces altérations sont quantitativement similaires à celles identifiées dans le modèle *Mtm1* KO et pourraient contribuer à la faiblesse musculaire. Cependant, d'autres défauts (altérations structurales, réduction de l'amplitude de l'efflux calcique) affectent beaucoup moins sévèrement le modèle KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> que le modèle *Mtm1* KO, et pourraient être déterminants dans la différence de sévérité entre les deux formes de CNM.

**MOTS-CLES :** Muscle squelettique ; Couplage excitation-contraction ; Phosphoinositides ; Myopathie myotubulaire ; Myopathie centronucléaire ; Calcium