



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **27 septembre 2019**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Colline SANCHEZ**

Titre de la thèse : « *Biosenseurs fluorescents appliqués à l'étude de la fonction du réticulum sarcoplasmique dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique* »



Résumé

La cascade d'évènements permettant la contraction de la fibre musculaire striée squelettique en réponse à l'activité électrique de sa membrane plasmique est regroupée sous le terme de couplage excitation-contraction (EC). Le couplage EC a lieu au niveau des triades, domaines nanoscopiques au niveau desquels les invaginations transversales de la membrane plasmique (tubules-T) sont en contact étroit avec deux citernes terminales adjacentes de réticulum sarcoplasmique (RS).

Plus précisément, lors de l'excitation d'une fibre musculaire, un potentiel d'action se propage dans toute la surface de la membrane plasmique et en profondeur de la cellule via les tubules-T. Cette dépolarisation y est détectée par les protéines membranaires sensibles au potentiel $\text{Ca}_v1.1$ qui en retour, par couplage mécanique, déclenchent l'ouverture des canaux calciques du RS que sont les récepteurs de la ryanodine de type 1 (RYR1). Ceci est à l'origine de l'augmentation massive de Ca^{2+} intracellulaire qui déclenche l'activation des myofilaments et donc la contraction.

La compréhension des mécanismes de contrôle et de régulation des canaux RYR1 reste encore aujourd'hui limitée. En particulier, la mesure de l'activité physiologique de ces canaux dans la fibre musculaire intacte est toujours réalisée de manière très indirecte. Par ailleurs le rôle éventuel de variations de potentiel de la membrane du RS pendant l'activité musculaire n'a jamais été révélé. Une connaissance approfondie de ces phénomènes est pourtant essentielle à la compréhension de la fonction musculaire squelettique normale et pathologique.

Dans ce contexte, l'objectif général de mon projet de thèse a été de mettre au point et utiliser des biosenseurs fluorescents localisés spécifiquement à la membrane des citernes terminales du RS de fibres musculaires différenciées – par leur fusion à une séquence d'adressage appropriée. Grâce à la combinaison des techniques d'électrophysiologie et d'imagerie de la fluorescence des biosenseurs sur fibres musculaires isolées, nous avons pu étudier l'activité du RS au cours de la fonction musculaire. Plus particulièrement, mon travail de thèse aborde deux problèmes biologiques principaux : le potentiel de membrane du RS et la signalisation calcique du RS au cours du couplage EC.

Le premier objectif a visé à caractériser les changements de potentiel de la membrane du RS pendant l'activation du couplage EC. Pour cela, nous avons utilisé des biosenseurs de FRET de la famille *Mermaid*. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de changement substantiel du potentiel transmembranaire du RS pendant l'activation du couplage EC. Ces données confirment – pour la première fois en condition physiologique – que le flux de Ca^{2+} à travers les canaux RYR1 est équilibré par des contre-flux ioniques compensatoires qui permettent le maintien du potentiel de membrane du RS. Ceci assure la pérennité du flux de Ca^{2+} et contribue à l'efficacité du couplage EC.

Le deuxième objectif a visé à détecter les variations de concentration en Ca^{2+} à proximité immédiate des canaux RYR1. Pour cela, nous avons utilisé le biosenseur fluorescent sensible au Ca^{2+} *GCaMP6f*. Le biosenseur adressé à la membrane du RS fournit un accès unique à l'activité individuelle de populations distinctes de canaux RYR1 au sein de différentes triades d'une même fibre musculaire. Au-delà de la caractérisation détaillée des propriétés des sondes GCaMP6f dans cette préparation, nos résultats montrent la stupéfiante synchronisation de l'activité de libération de Ca^{2+} des triades d'une même fibre musculaire au cours du couplage EC. Les résultats ouvrent des perspectives particulièrement intéressantes pour les études de situations pathologiques d'altération de l'activité des canaux RYR1.