

Résumé

Caractérisation du sarcolemme dans les dystrophies musculaires des ceintures

Les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD) sont un groupe hétérogène de dystrophies musculaires à progression lente (DM), dont les caractéristiques communes sont : une augmentation de la créatine kinase, ainsi qu'une faiblesse du muscle squelettique. Des mutations du gène de la dysferline causent un spectre de DM ; la LGMD de type 2B, la myopathie de Miyoshi (MM) et la myopathie du compartiment distal antérieur (MCAD) communément appelés dysferlinopathies. Le muscle squelettique des patients atteints de LGMD de type 2B montre un phénotype dystrophique, tels que des variations de la taille des fibres, ainsi que des noyaux centralisés, mais aussi une accumulation inhabituelle de vésicules sous le sarcolemme. La dysferline est une protéine transmembranaire dont la localisation sous-cellulaire est principalement attribuée à la membrane plasmique, mais aussi au développement des tubules-T et aux vésicules intracellulaires. Au niveau du sarcolemme, il a été démontré que la protéine dysferline est essentielle pour une réparation efficace de la membrane, elle jouerait également un rôle dans plusieurs autres fonctions cellulaires telles que la fusion des vésicules, le trafic intracellulaire, l'adhésion cellulaire, la réponse immunitaire ainsi que dans le métabolisme. La LGMD de type 1C, un autre type de LGMD, est due à des mutations dans le gène de la cavéoline-3 (cav-3). La cav-3 est l'isoforme spécifique au muscle de la famille des protéines des cavéolines, qui avec la famille des protéines cavines représentent les composants structuraux et fonctionnels majeurs des cavéoles. Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique de 40 à 80 nm de diamètre appartenant à un type spécialisé de microdomaines membranaires appelés « lipid rafts » (LR). Les LR sont des domaines membranaires très dynamiques, qui se distinguent par leur composition en protéines et en lipides, avec des rôles multiples dans la signalisation cellulaire, l'endocytose, le métabolisme des lipides et du cholestérol et dans le « mechanosensing ». La protéine cav-3 est connue pour réguler la localisation de la dysferline, ainsi que le taux de l'endocytose à la membrane plasmique. Les deux protéines sont considérées comme étant fonctionnellement liées l'une à l'autre. Récemment, des mutations récessives dans le gène anoctamine-5 (ano-5) ont été démontrées comme pouvant être liées aux LGMD. Il a déjà été observé dans les dysferlinopathies que des mutations dans le gène ANO5 peuvent conduire à un phénotype clinique de type LGMD ou

MM. La protéine ano-5 est un membre de la famille des protéines anoctamines. On pense que les anoctamines contiennent huit domaines transmembranaires et qu'ils fonctionnent comme des canaux de chlorure activés par le calcium. Il est à noter que le phénotype clinique des anoctaminopathies montre plusieurs ressemblances avec les dysferlinopathies.

Dans le but d'analyser les mécanismes moléculaires des LGMD et d'étudier les potentielles interactions de la dysferline, de la cav-3 et de la ano5, des expériences sur des cellules musculaires primaires portant des mutations associées aux gènes *DYSF*, *CAV3*, et *ANO5* ont été analysées. Les lignées cellulaires ont été caractérisées par des méthodes conventionnelles telles que le marquage en immunofluorescence et l'analyse par Western blot. Afin d'étudier l'effet des mutations des gènes causant les LGMD sur la morphologie du sarcolemme, des analyses de microscopie électroniques à transmission (MET) sur des myotubes différenciés ont été réalisées. Des structures d'endocytose telles que : les cavéoles, les vésicules sous-sarcolemmales ont été quantifiées. Afin d'explorer l'association fonctionnelle de la dysferline et de la cav-3, une isolation biochimique des LR de myotubes contrôles et de myotubes LGMD de type 2B a été effectué et ceci par purification de membranes résistants aux détergents (DRMs). Une analyse de l'immunopurification de vésicules contenant de la dysferline a été établie afin de révéler de nouvelles fonctions de la dysferline. Ces vésicules ont été isolées par fractionnement cellulaire suivi d'une immunopurification (IP). La caractérisation de ces vésicules a été faite au niveau de l'ultrastructure cellulaire par MET et au niveau protéique par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).

Les études d'immunomarquage ont montré que la protéine dysferline et la cav-3 sont partiellement colocalisées dans des structures vésiculaires de la membrane plasmique des myotubes primaires humains. La purification biochimique des DRMs issus des myotubes différenciés a montré que la dysferline est associée aux LR liées aux cytosquelettes d'actine. L'analyse de la MET sur les myotubes issus des muscles des patients atteints de LGMD a montré des altérations dans l'abondance des cavéoles à la membrane plasmique qui est en corrélation avec les mutations causant la maladie. Il est intéressant de noter que les myotubes issus de patients avec des mutations dans le gène *CAV3* montrent des cavéoles intactes. L'analyse de l'ultrastructure cellulaire a montré que la dysferline est localisée à la membrane plasmique mais également dans des vésicules cytosoliques. L'immunopurification de ces vésicules contenant de la dysferline a révélé la présence de la cav-3 ainsi que et d'autres partenaires de la dysferline tels que l'annexine A1 et A2, AHNAK, et PTRF (synonyme à cavine-1). Ces vésicules contiennent environ 500 protéines détectées par LC-MS, ce qui pourrait représenter des protéines structurales vésiculaires, ainsi que des nouveaux partenaires potentiels d'interaction de la dysferline.

Les résultats de cette étude permettent de conclure que les cavéoles jouent un rôle essentiel dans le contexte des LGMD. Surtout pour les LGMD de type 2B, l'abondance des cavéoles à la membrane plasmique dans les myotubes primaires humains peut être corrélée avec les mutations qui causent la maladie. La dysferline et la cav-3 paraissent être liées au niveau structurel et fonctionnel. Dans cette étude, nous proposons que la fonction de la dysferline dans la réparation membranaire soit médiée par la formation des LR liée à l'actine, même si les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à être élucidés. Nos résultats confirment que la dysferline est localisée dans des vésicules cytoplasmiques, qui sont impliqués dans des multiples mécanismes cellulaires tels que le transport vésiculaire, l'endo- et exocytose, l'adhésion cellulaire et dans la dynamique des LR. Dans l'ensemble, l'association de la dysferline et de la cav-3 dans les fonctions cellulaires, en particulier sur les cavéoles, peut être démontrée dans cette étude.