Caractérisation et implication des canaux TRPV1 et du Translocon dans la physiopathologie des muscles striés squelettiques et cardiaque.

Pr. Fabien Van Coppenolle
Laboratoire CarMeN; INSERM U1060

Université Claude Bernard Lyon 1 France

Plan

Hyperthermie Maligne des Anesthésies: Perte de l'homéothermie.
Thermorécepteurs: TRPV1 et chaleur.

Etude 1: Caractérisation fonctionnelle de TRPV1 dans le réticulum sarcoplasmique du muscle strié squelettique de souris.

Etude 2: Implication du canal cationique TRPV1 dans le cas pathologique de l'hyperthermie maligne.

Etude 3: TRPV1 et autres….

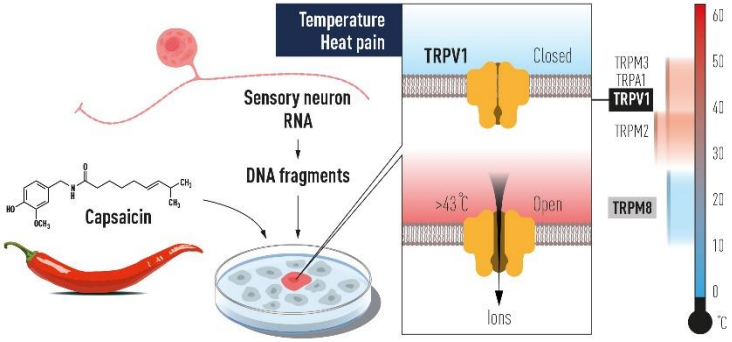
Le translocon: un canal calcique de fuite: Ischémie-reperfusion cardiaque.

Etude 4: Rôle cardioprotecteur de la modulation pharmacologique du translocon lors d'un pré-conditionnement.

2021 Nobel Prize in Physiology or Medicine

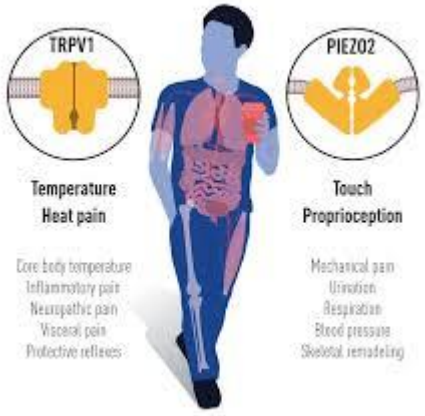
David Julius (University of California, San Francisco) :
TRPV1 (Heat receptor).





Ardem Patapoutian (UCLA, Los Angeles):
TRPM8 (Cold receptor)
and PIEZO 1 (Mechano-sensitive receptor).





I. Contexte

Hyperthermie maligne

- Maladie génétique transmissible sur un mode autosomique dominant
- Complication rare de l'anesthésie générale
  - Déclenchée par les agents halogénés
  - Provoquant un état d'hypermétabolisme musculaire
- Urgence vitale
  - Traitement : Dantrolène

Historique

- Denborough M, Lovell R. Anesthetic deaths in a family. Lancet 1960 ; 2 : 45
  - affection génétiquement transmissible
- 1970 origine musculaire de l'hyperthermie
  - Mise en place des tests de contracture à l'halothane et à la caféïne
- 1982 découverte de l'efficacité surprenante du Dantrolène dans la crise HM
- Progrès liés à la génétique moléculaire

Fréquence

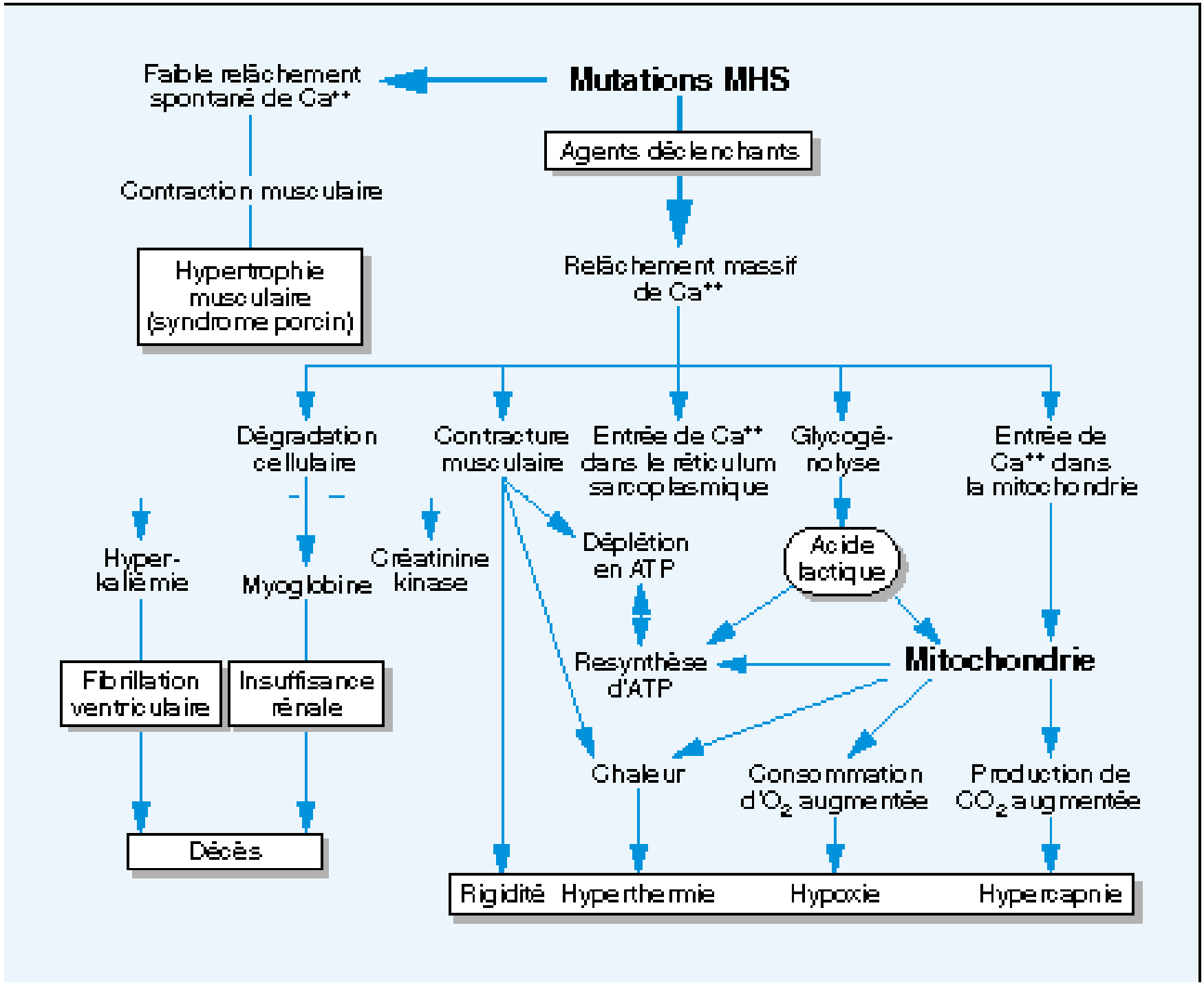
- Forme fulminante : 1/250 000 anesthésies
- 1/ 62000 AG halogénés/succinylcholine
- 1/ 85000 AG sans succinylcholine
- Nombre de nouveaux cas / an en France : 20 à 40
- Événement Rare : 4 fois dans la vie professionnelle d’un anesthésiste

Gravité

- Rhabdomyolyse aiguë
- Défaillance multiviscérale
  - Forme fulminante : mortalité de 80 à 90 % avant l'usage du Dantrolène
  - Depuis l'utilisation du Dantrolène : mortalité 5 %

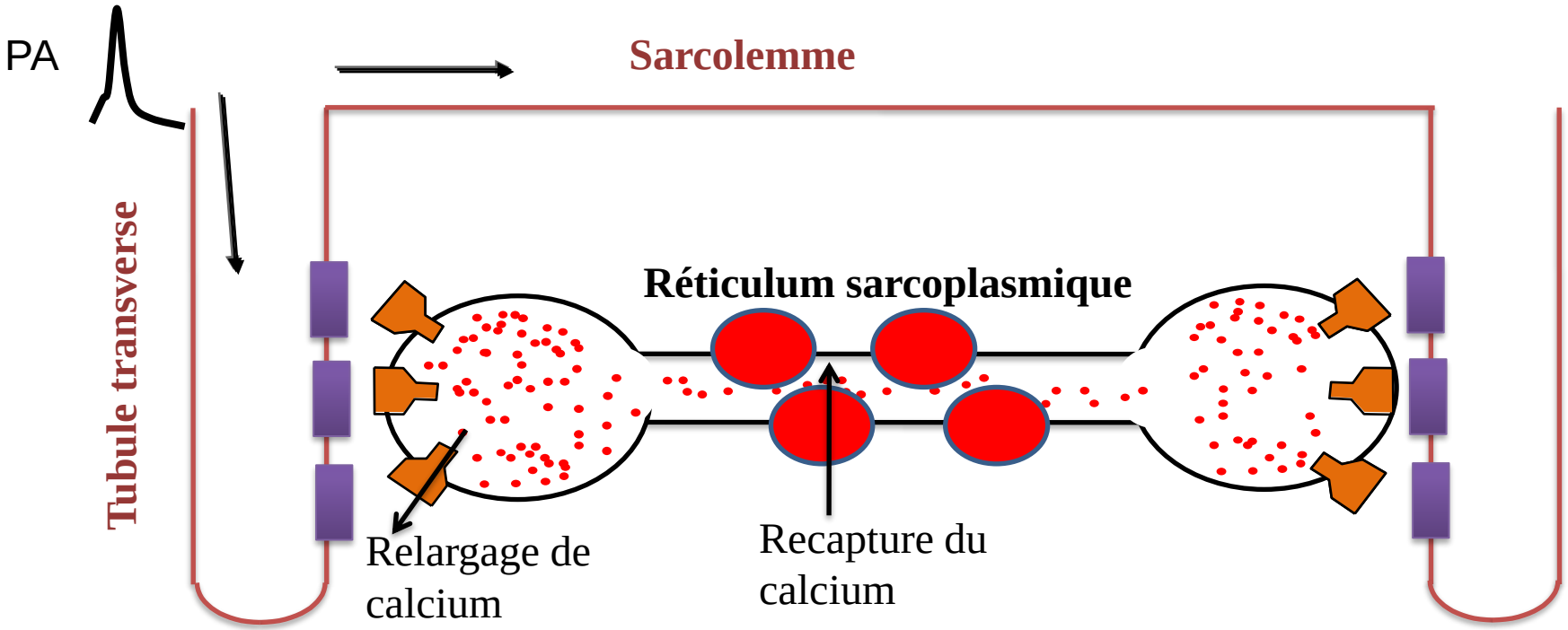
Physiopathologie

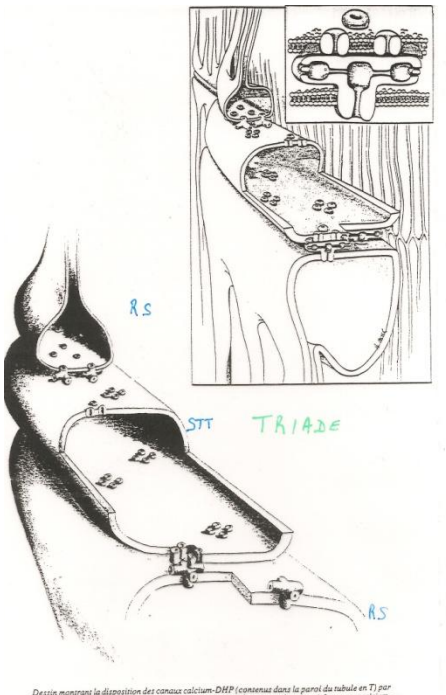
- Trouble de l'homéostasie calcique dans la cellule musculaire
- Dysfonctionnement des canaux calciques :
  - Récepteurs à la Ryanodine RYR1
  - Récepteurs aux Dihydropyridines
- Élément initial : élévation du calcium libre myoplasmique
    - Cascade de destruction de la cellule musculaire

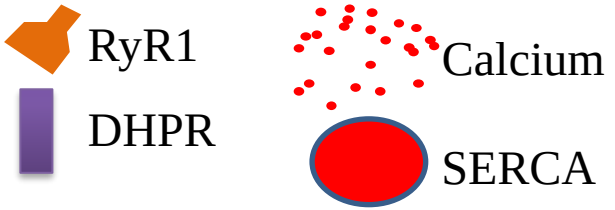

Mutations MHS
Faible relâchement spontané de Ca++
Contraction musculaire
Hypertrophie musculaire (syndrome porcin)
Agents déclenchants
Relâchement massif de Ca++
Dégradation cellulaire
Contracture musculaire
Entrée de Ca++ dans le réticulum sarcoplasmique
Glycogénolyse
Entrée de Ca++ dans la mitochondrie
Hyperkaliémie
Myoglobine
Créatinine kinase
Déplétion en ATP
Acide lactique
Resynthèse d'ATP
Mitochondrie
Fibrillation ventriculaire
Insuffisance rénale
Décès
Chaleur
Consommation d'O_2 augmentée
Production de CO_2 augmentée
Rigidité
Hyperthermie
Hypoxie
Hypercapnie

Génétique

- Modèle porcin d'HM
  - « Porcine stress syndrom » pathologie proche du syndrome humain
    - Crise déclenchée par les halogénés ou par un stress intense
    - Mode de transmission autosomique récessif
    - Origine génétique unique : mutation Ryr 1?







1 RyR1 / 4 DHPR

Cycle du calcium

Génétique

- Gène RYR1
- Localisé sur le chromosome 19q13.2
- Mutation R614C
- Plus de 400 mutations décrites
- Les mutations HMS vont affecter des domaines de la protéine qui seront impliqués principalement dans la régulation de l'activité d'ouverture du canal calcique
- Pb: tous les cas d'HM ne sont pas associés à des variants RYR1.

Agents déclenchants









- Tous les agents Halogénés
  - Mais vitesse d'apparition plus lente avec le Desflurane et le Sévoflurane / Halothane

Traitement de la crise

- Urgence thérapeutique
- Arrêt des agents halogénés
- Hyper ventilation en oxygène pur
- Administration de Dantrolène
- Appeler de l’aide

Diagnostic de la sensibilité HM

- Test de contracture halothane caféine
- Analyse génétique
- Qui dépister ? (test de contracture musculaire)
  - Sujets aux antécédents personnels ou familiaux d'HM
  - Sujets avec élévation chronique des CPK
  - Coup de chaleur d'effort
  - Myopathie à central core
  - Après une crise HM

I. Contexte

Test de contracture



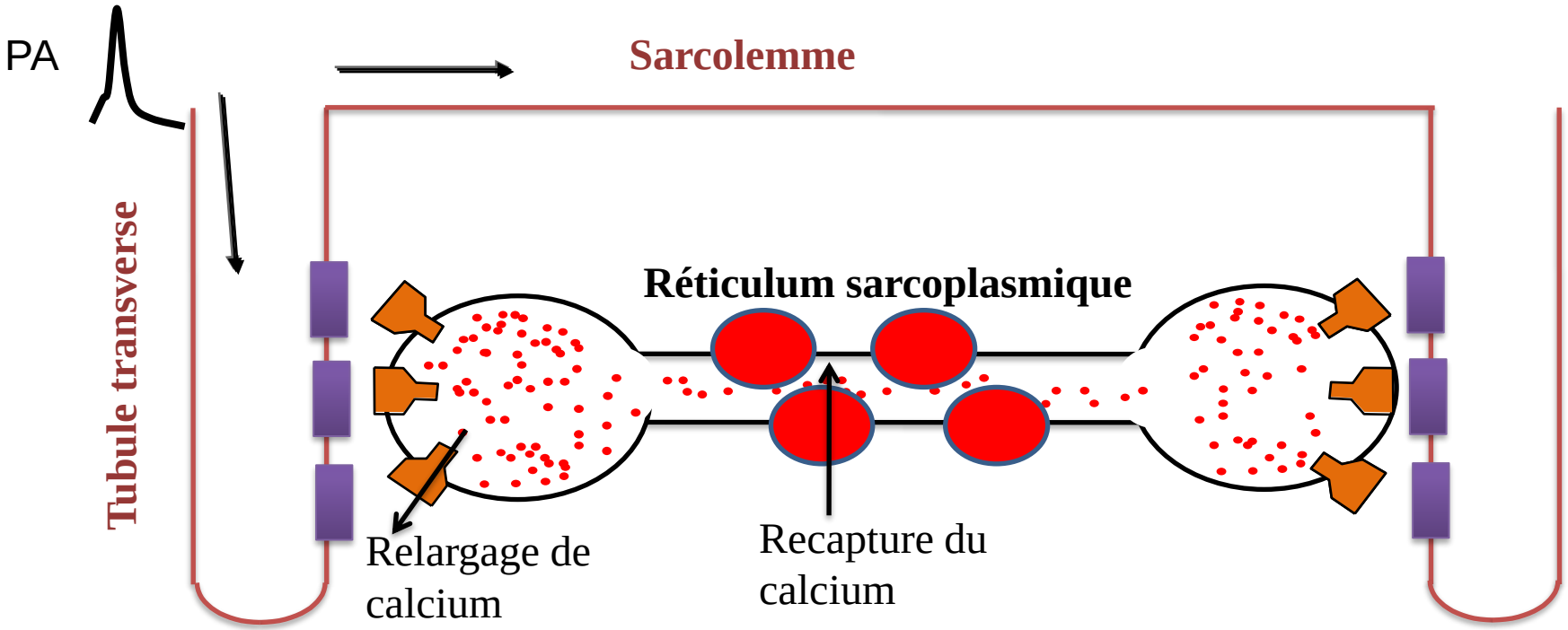
- Standardisation en Europe et en Amérique du Nord
- Test de contracture à l'halothane
- Test de contracture à la caféine

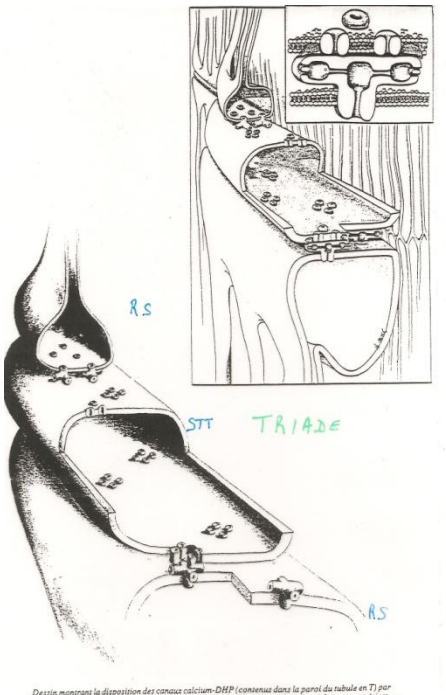
(activateur des récepteurs à la ryanodine).

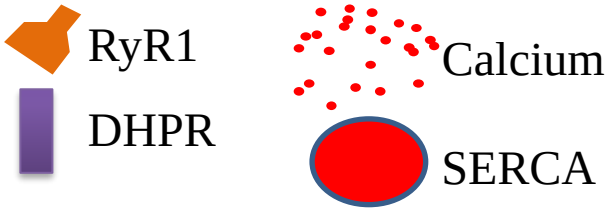


- **HMS** quand au moins un test à l'halothane et un test à la caféine sont positifs
- **HME** : HMEh quand seul le test à l'halothane est positif

  HMEc quand seul le test à la caféine est positif
- **HMN** aucun test positif







1 RyR1 / 4 DHPR

Cycle du calcium

PA

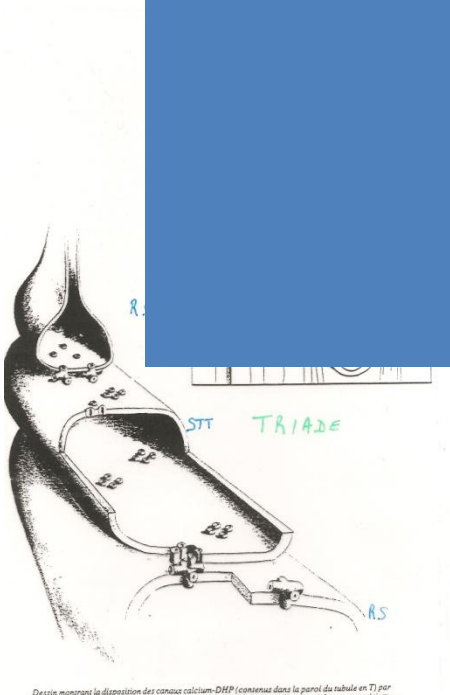
Sarcolemme

Tubule transverse

Autres candidats que RYR1?

Calcium

SERCA



Dessin montrant la disposition des canaux calcium-DHP (contenus dans la paroi du tubule en T) par

Cycle du calcium

Plan

Hyperthermie Maligne des Anesthésies: Perte de l'homéothermie.

Thermorécepteurs: TRPV1 et chaleur.

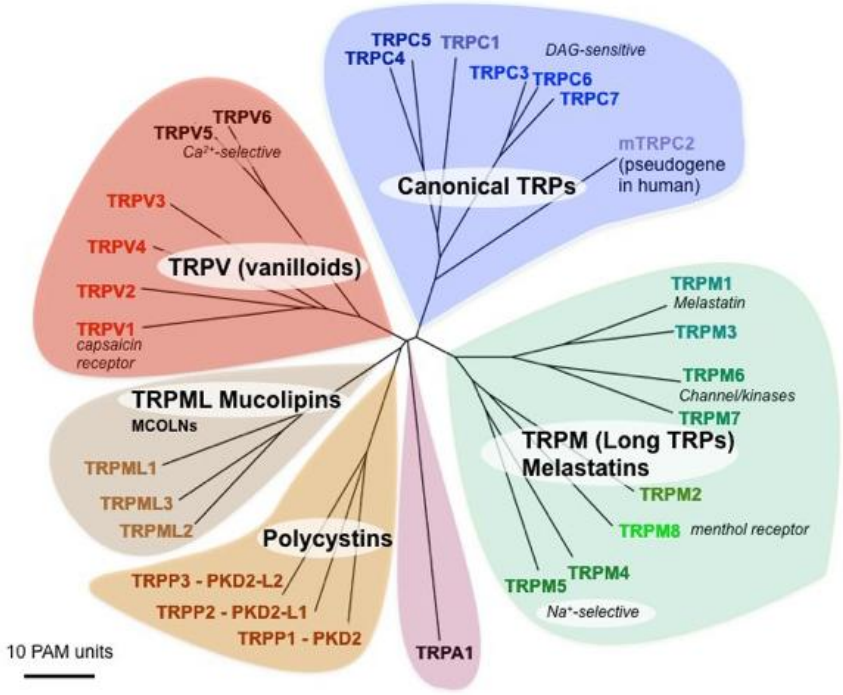
Etude 1: Caractérisation fonctionnelle de TRPV1 dans le réticulum sarcoplasmique du muscle strié squelettique de souris

Etude 2: Implication du canal cationique TRPV1 dans le cas pathologique de l'hyperthermie maligne

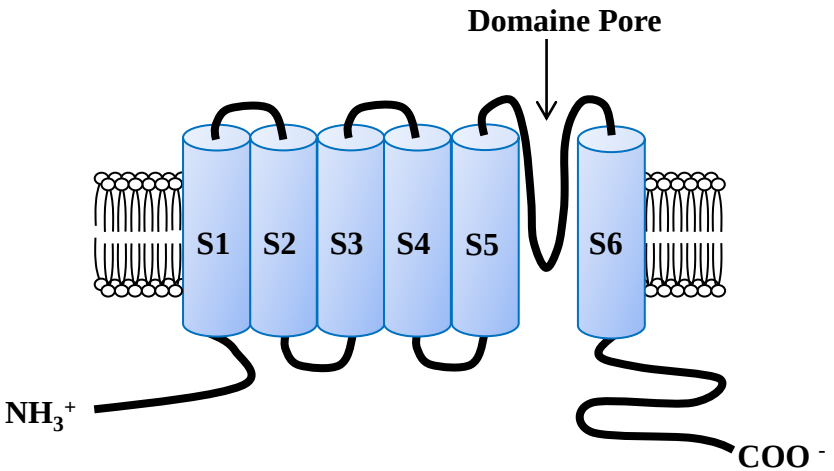
Etude 3: TRPV1 et autres….

I. Contexte

La superfamille des canaux Transient Receptor Potential (TRP)



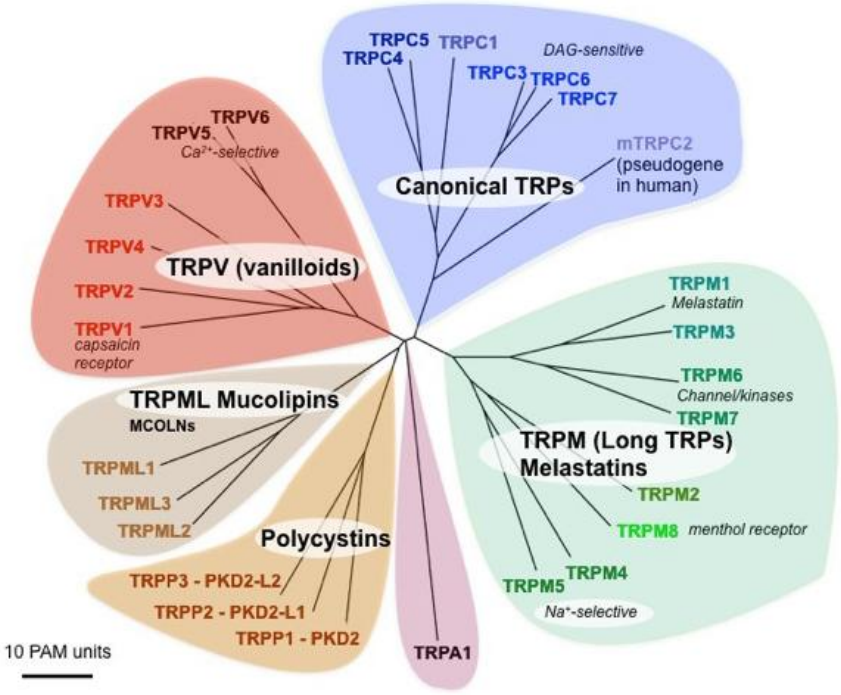
Clapham et al., 2001



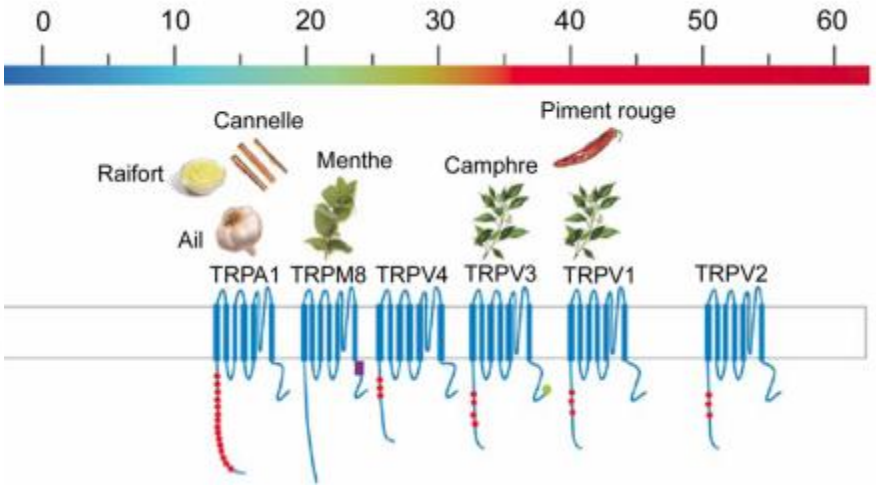
- Superfamille séparée en 7 sous-familles: TRPC (1-7); TRPM (1-8); TRPA1; TRPN; TRPP (1-5); TRPML (1-3); TRPV1 (1-6)
- Canal composé de 6 segments transmembranaires
- 2 boucles terminales cytosoliques
- Domaine pore entre les segments 5 et 6

I. Contexte

La superfamille des canaux Transient Receptor Potential (TRP)



Clapham et al., 2001

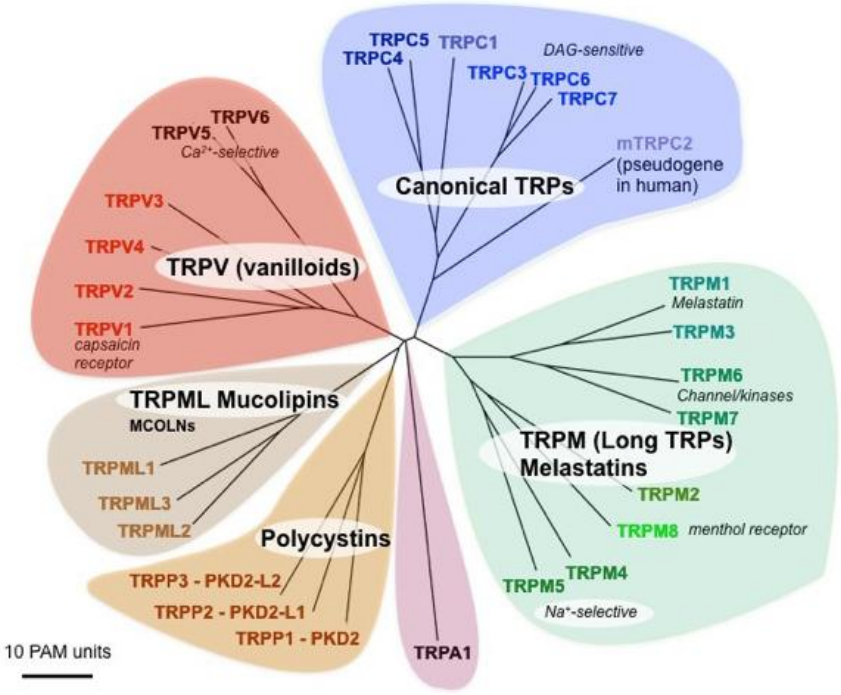


Dhaka A et al., 2006

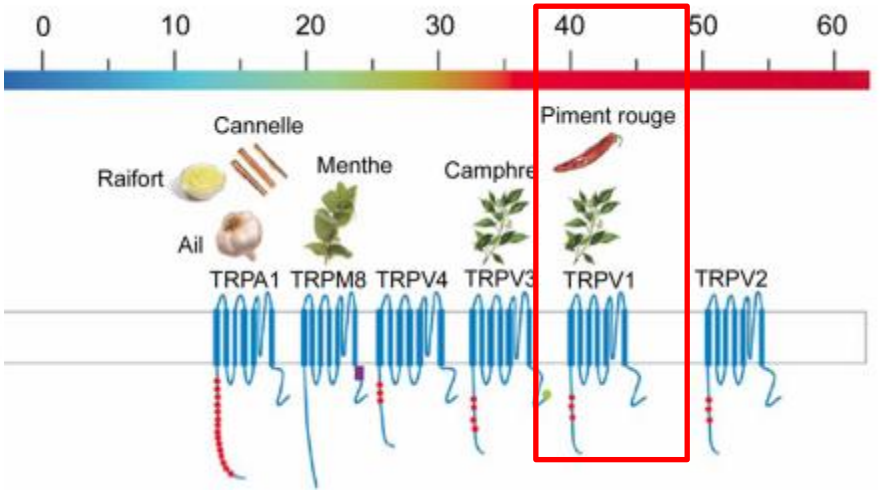
- Superfamille séparée en 7 sous-familles: TRPC (1-7); TRPM (1-8); TRPA1; TRPN; TRPP (1-5); TRPML (1-3); TRPV1 (1-6)
- Canal composé de 6 segments transmembranaires
- 2 boucles terminales cytosoliques
- Domaine pore entre les segments 5 et 6

I. Contexte

La superfamille des canaux Transient Receptor Potential (TRP)



Clapham et al., 2001



Dhaka A et al., 2006

- Superfamille séparée en 7 sous-familles: TRPC (1-7); TRPM (1-8); TRPML (1-3); TRPP (1-5); TRPN; TRPA1; **TRPV1 (1-6)**
- Canal composé de 6 segments transmembranaires
- 2 boucles terminales cytosoliques
- Domaine pore entre les segments 5 et 6

I. Contexte

Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1)

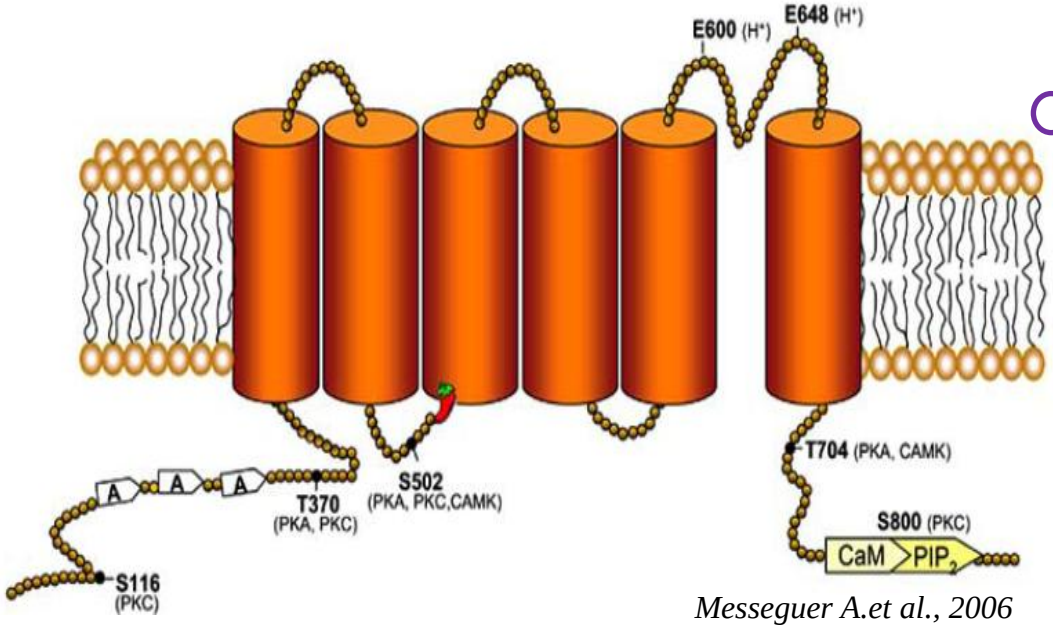
Sensibilité à la Capsaïcine



Sensibilité aux protons

Sensibilité aux fortes températures





Messeguer A.et al., 2006

Sensibilité à la capsazépine

I. Contexte

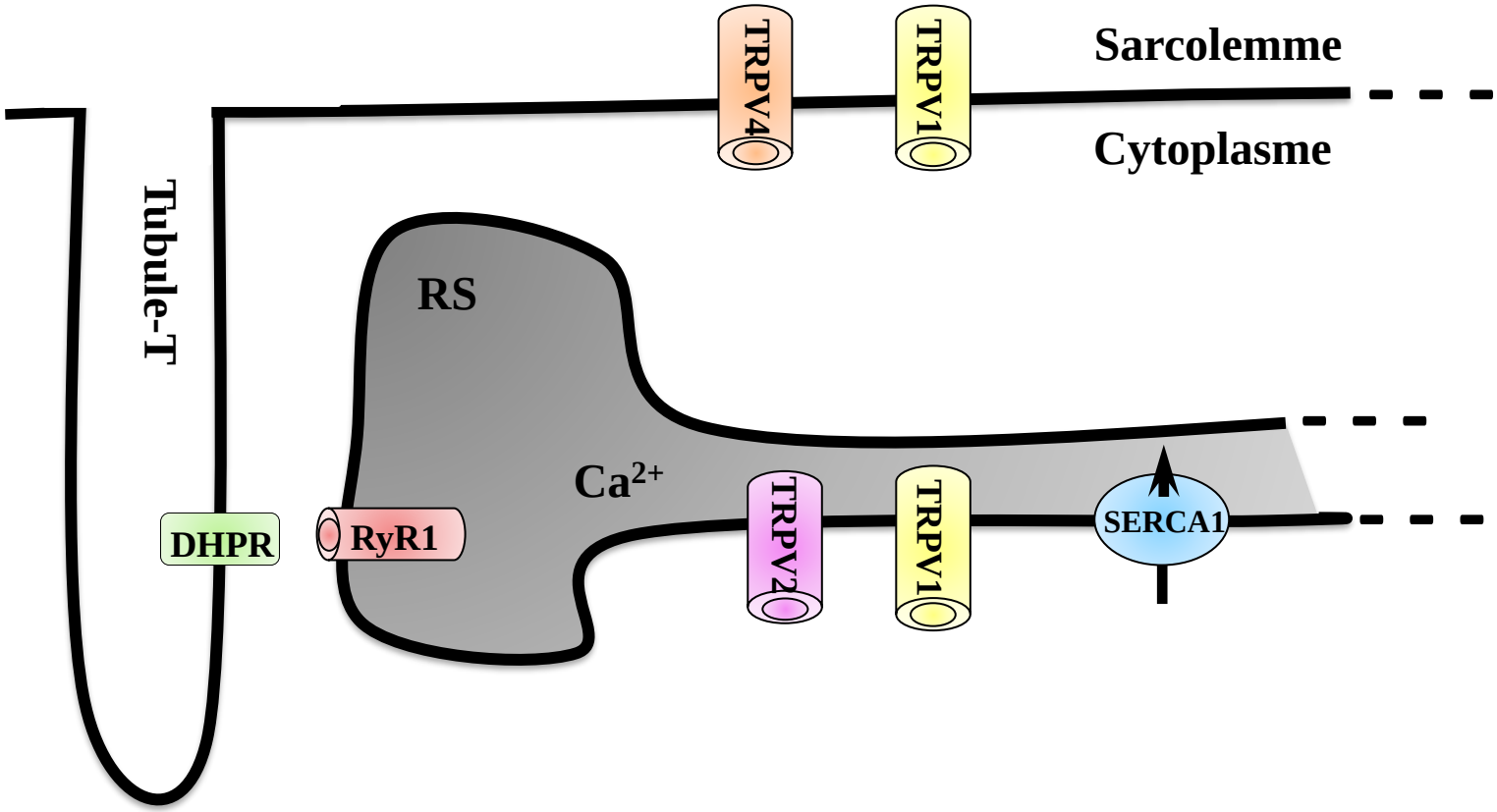
TRPV et muscle squelettique

Expression de la sous-famille TRPV dans le muscle strié squelettique:

TRPV2 est localisé au niveau du RS dans les fibres musculaires striées squelettiques de souris ***(Zanou et al., 2009)***

TRPV4 est localisé au niveau du sarcolemme dans les fibres musculaires striées squelettiques de souris ***(Kruger et al., 2008)***

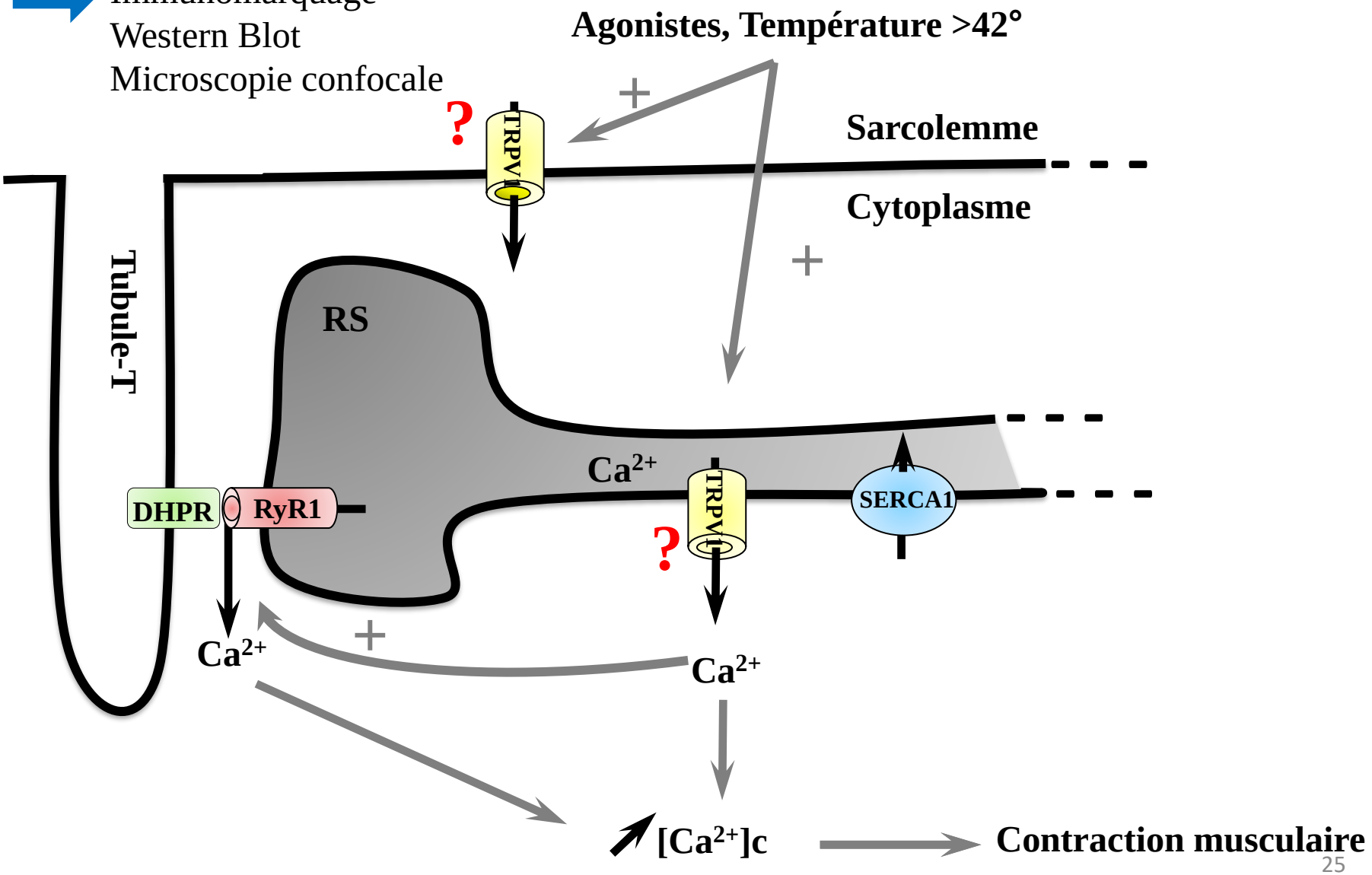
TRPV1 est localisé à la fois au niveau du RS et du sarcolemme dans les lignées cellulaires de rat ***(Xin et al., 2005)***



II. Objectifs de travail

1. Caractérisation de TRPV1 dans le muscle strié squelettique de souris

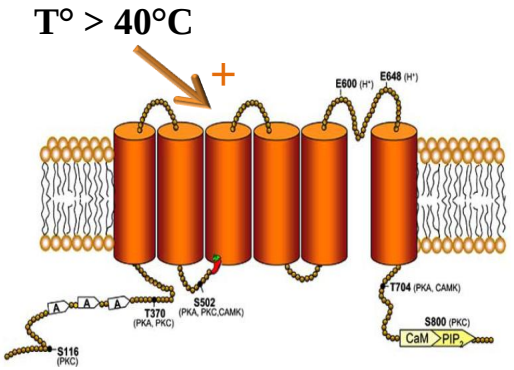
Immunomarquage
Western Blot
Microscopie confocale



II. Objectifs de travail

2. Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

➡ Microscopie confocale



Neurones: activation du canal TRPV1 par les anesthésiques volatils *(Cornett et al., 2008)*

Hyperthermie Maligne:

Crise du métabolisme exacerbée du muscle strié squelettique menant à une brusque montée de température chez le patient (> 42°C). *(Rosenberg H. et al., 2007)*

Pathologie déclenchée par une exposition à différents agents pharmacologiques → anesthésiques volatils → **halothane**, **isoflurane**, **desflurane.**

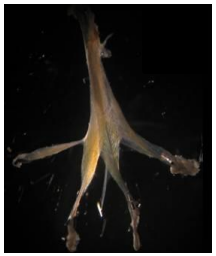
→ Si les éléments déclencheurs de l'hyperthermie maligne sont connus, leurs **cibles sont inconnues**.

TRPV1, canal cationique à l'origine d'une libération exacerbée de calcium du réticulum sarcoplasmique suite à l'application d'anesthésiques volatils?

Etude 1

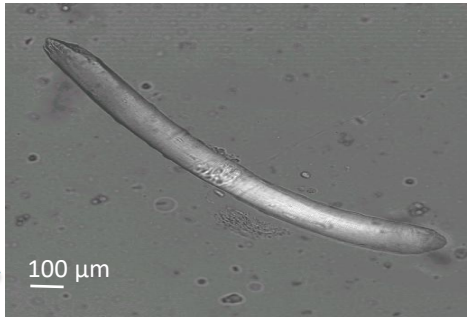
Localisation de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

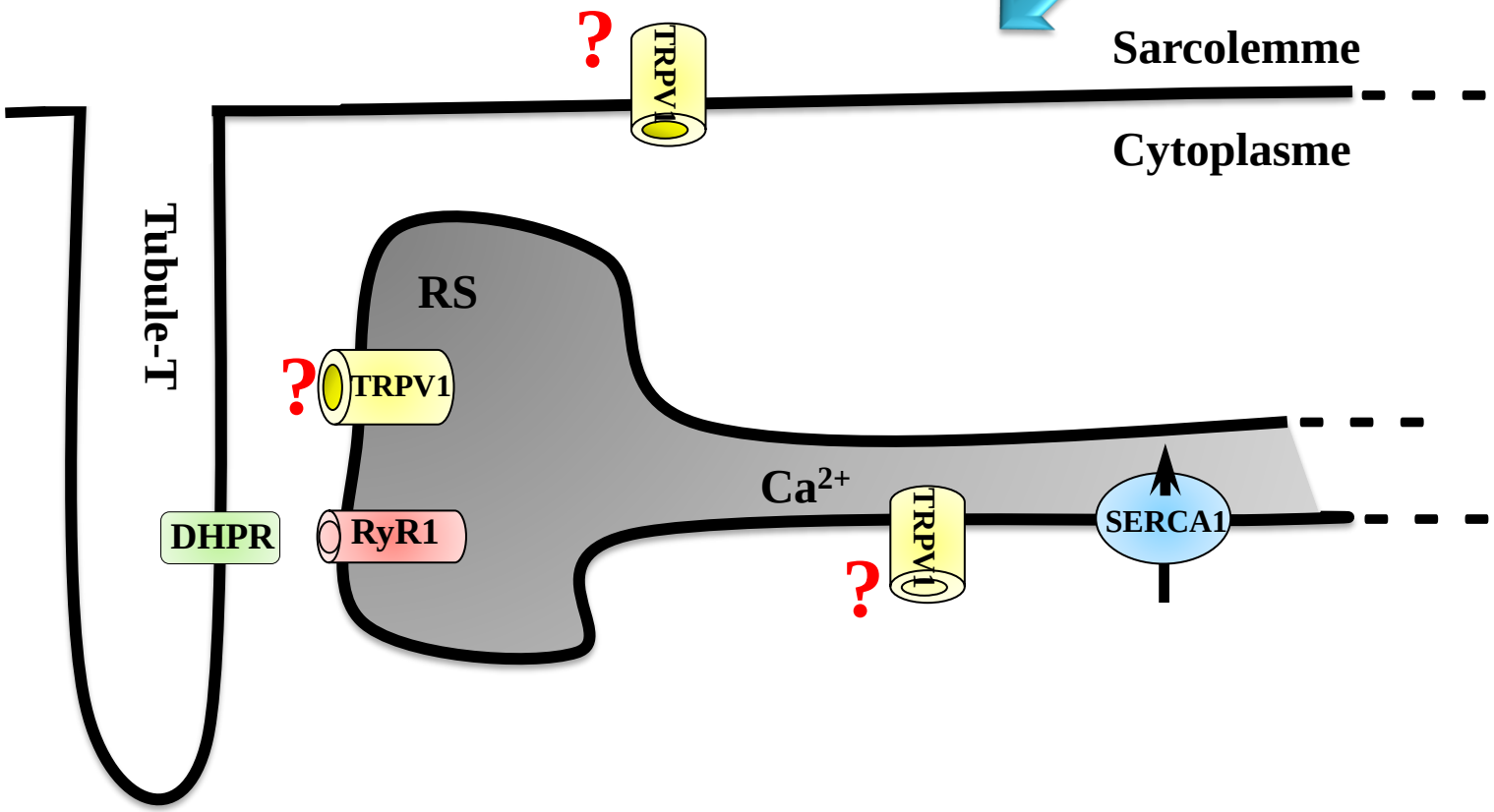




Flexor Digitorum Brevis

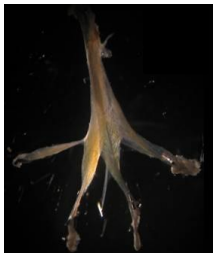
Collagénase I





Etude 1 — Localisation de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

Technique de localisation : immunomarquage

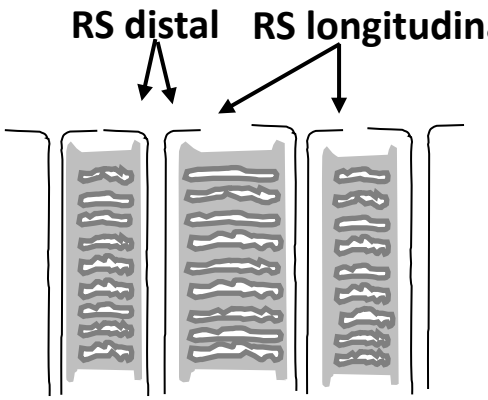


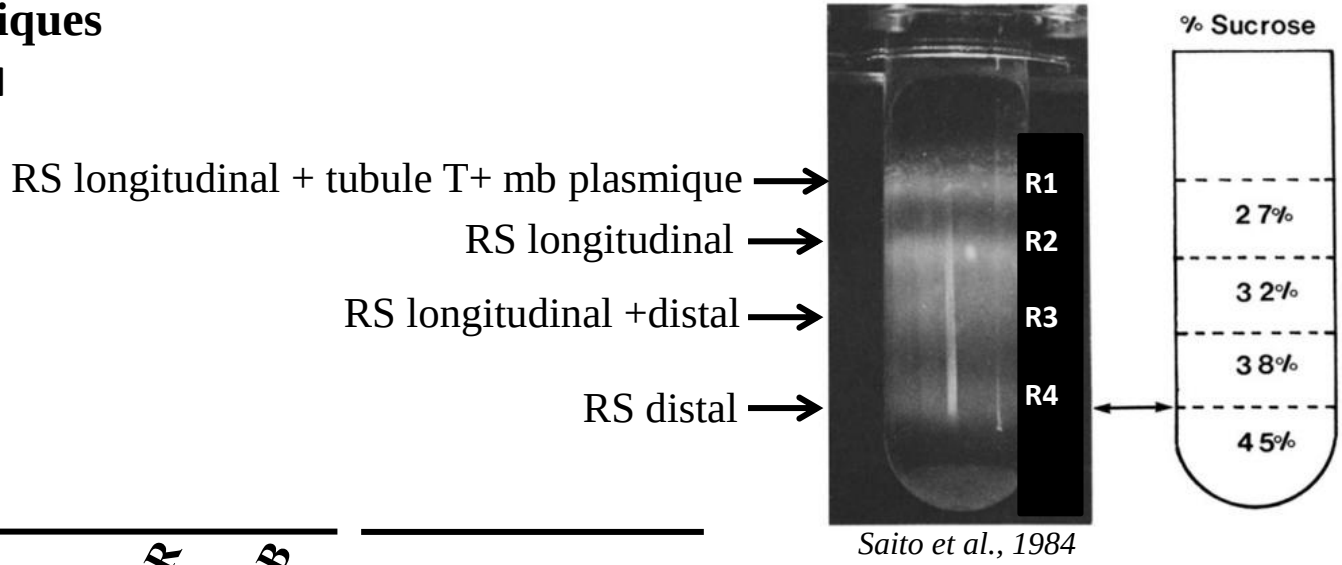
TRPV1 est exprimé au niveau de la partie longitudinale du RS.

Etude 1 — Localisation de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

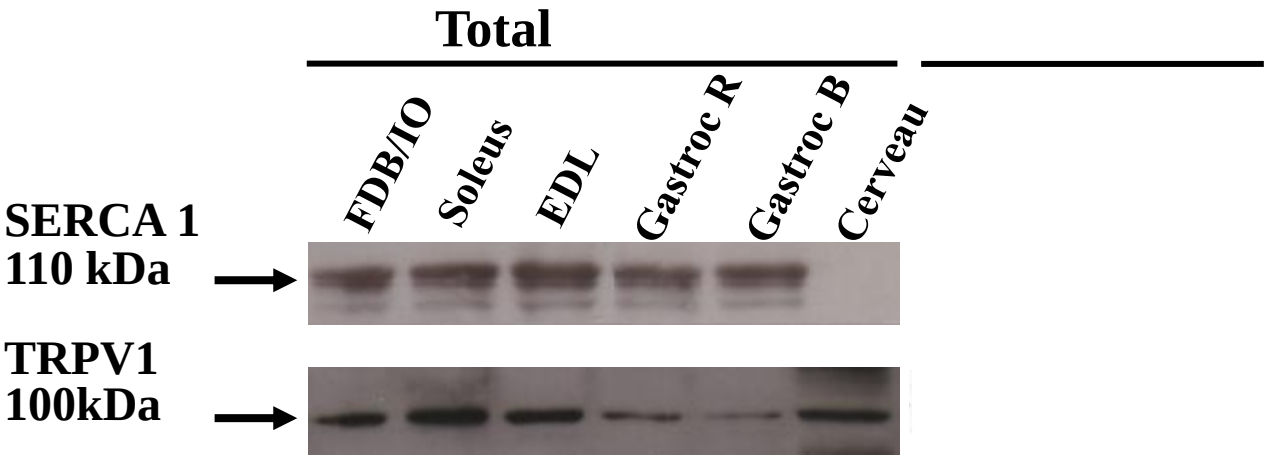
Technique de localisation: Western Blot

Observation des différents niveaux d'expression de TRPV1 et SERCA1 dans les muscles striés squelettiques





Saito et al., 1984



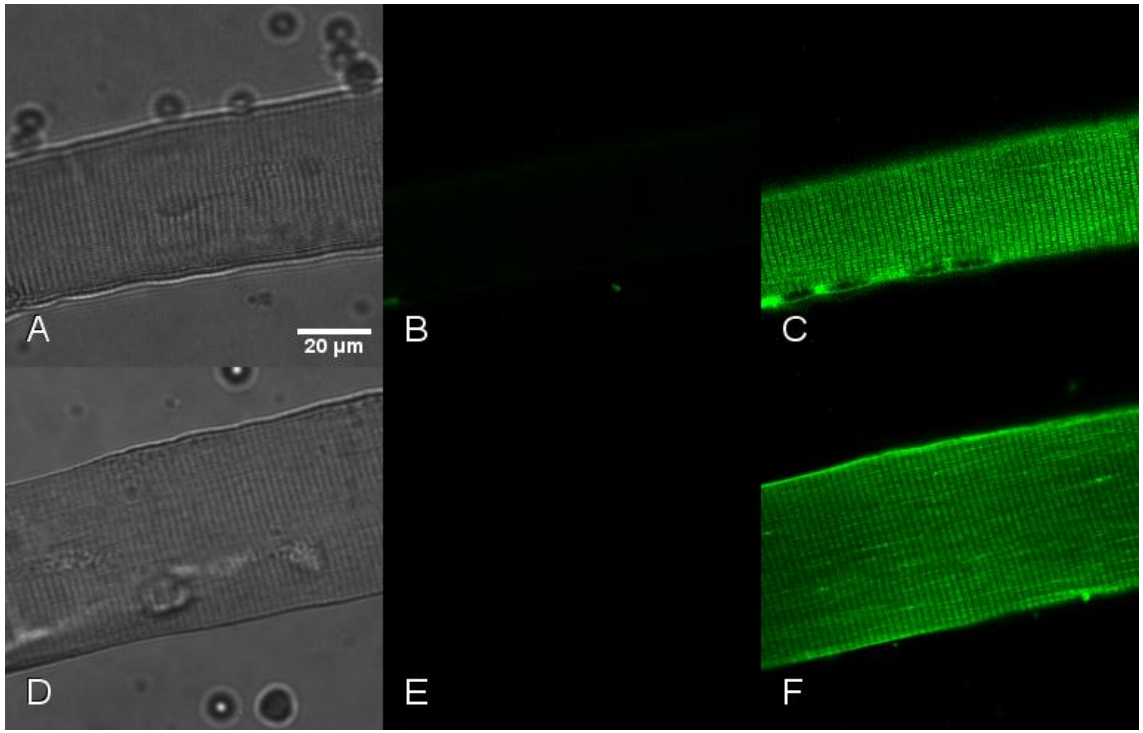
Protéine TRPV1: présente dans les différents muscles testés. préférentiellement exprimée au niveau de la partie longitudinale du RS.

Etude 1 — Localisation de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

Technique de localisation: utilisation de la sonde FM1-43 et microscopie confocale

- capsaïcine

+ capsaïcine



Sonde FM1-43: traverse la membrane via TRPV1 en présence de capsaïcine.
(Meyers et al., 2003)

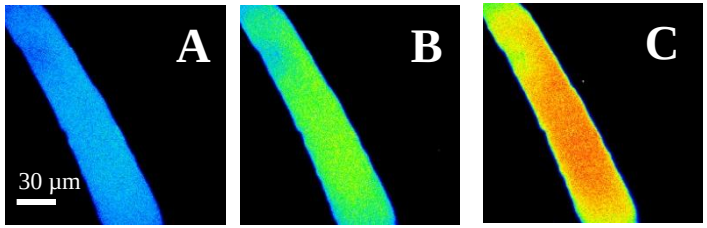
La sonde FM1-43 n'entre pas dans les fibres isolées de FDB.
TRPV1 est localisé uniquement au niveau de la partie longitudinale du réticulum sarcoplasmique.

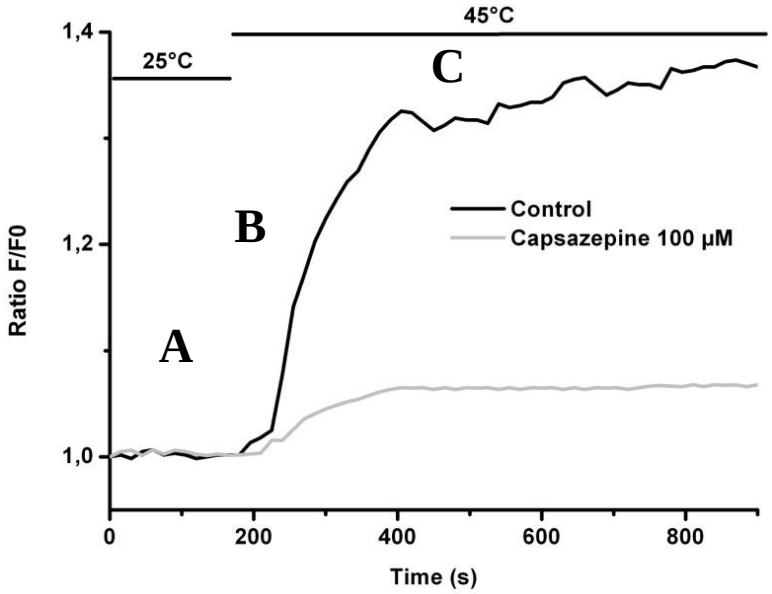
Etude 1

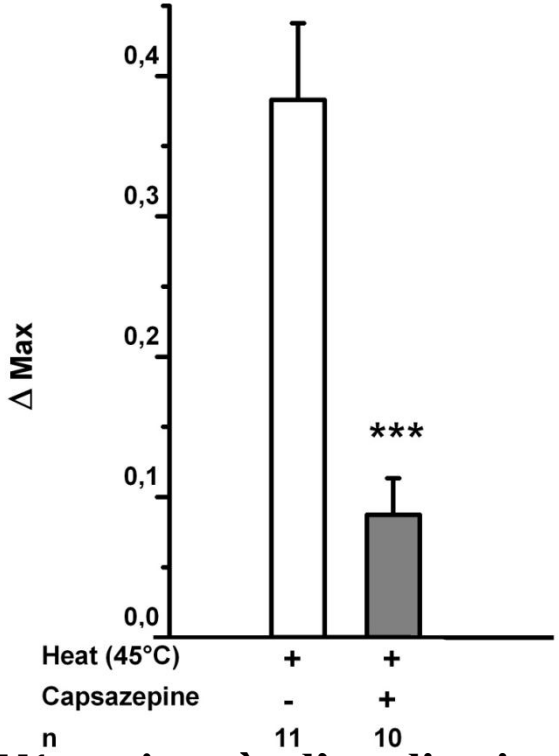
Fonctionnalité de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

Imagerie calcique en microscopie confocale sur cellules musculaires striées squelettiques isolées (FDB) de souris OF1.

Observation de la libération de calcium par TRPV1 suite à l'application de fortes températures sur les fibres isolées. Utilisation de la sonde calcique Fluo4-AM.





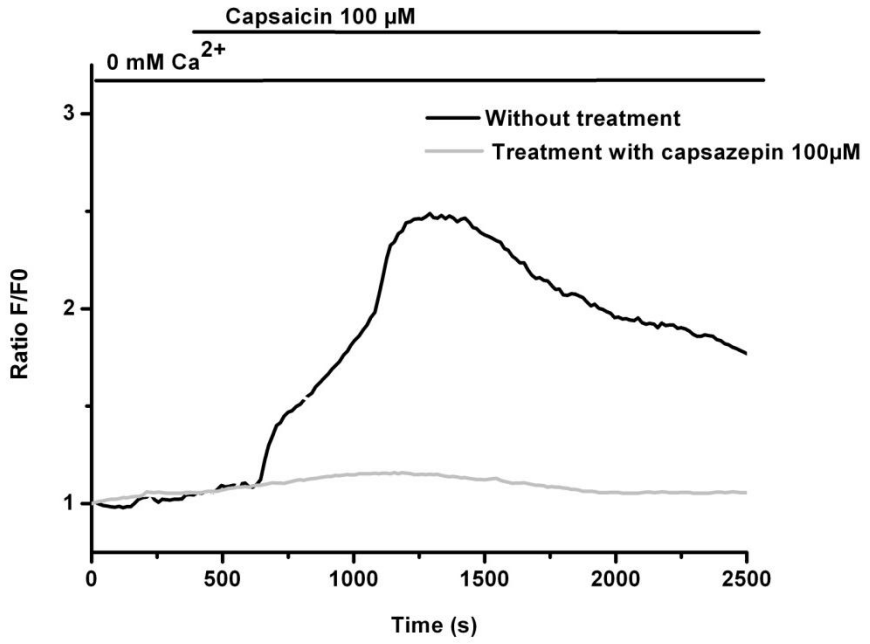


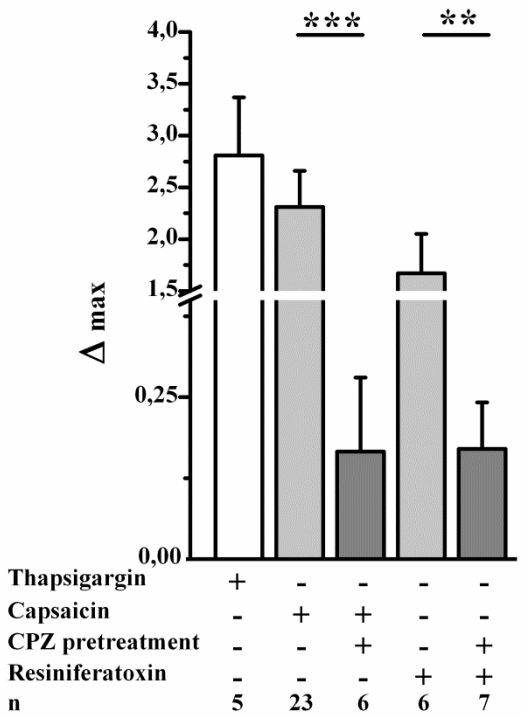
Libération de calcium *via* TRPV1 suite à l'application de fortes températures. TRPV1 est activé physiologiquement par la température.

Etude 1

Fonctionnalité de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

Imagerie calcique en microscopie confocale sur cellules musculaires striées squelettiques isolées (FDB) de souris OF1.
Observation de la libération de calcium par TRPV1 suite à l'application de différents agents pharmacologiques sur les fibres isolées. Utilisation de la sonde calcique Fluo4-AM.





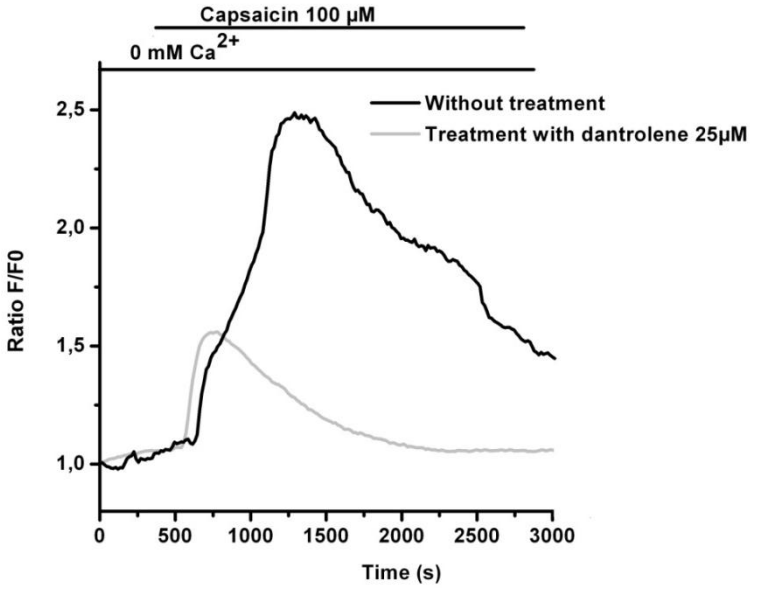
TRPV1 est fonctionnel dans notre modèle d'étude:
- Activé par la capsaïcine 100 µM et la résinifératoxine 10 µM
- Inhibé par la capsazépine 100 µM

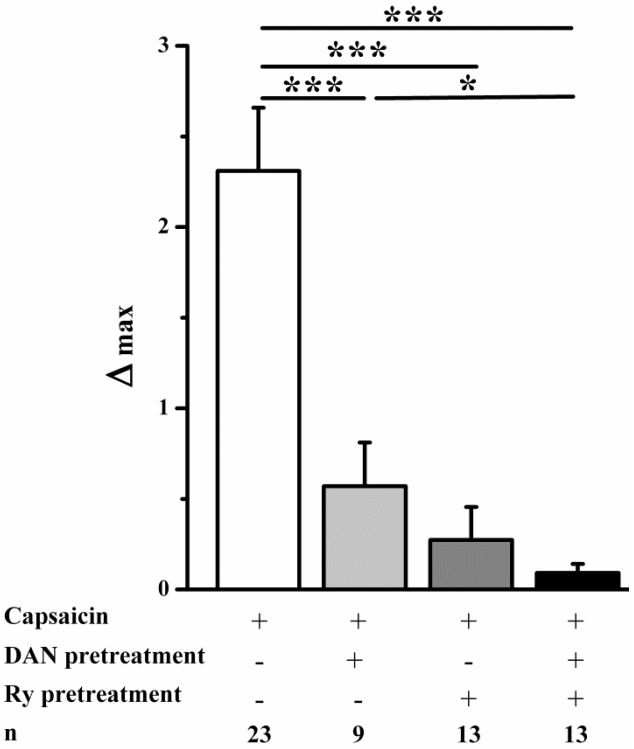
Etude 1

Fonctionnalité de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

Imagerie calcique en microscopie confocale sur cellules musculaires striées squelettiques isolées (FDB) de souris OF1.

Observation de la libération de calcium par TRPV1 suite à l'application de différents agents pharmacologiques sur les fibres isolées. Utilisation de la sonde calcique Fluo4-AM.



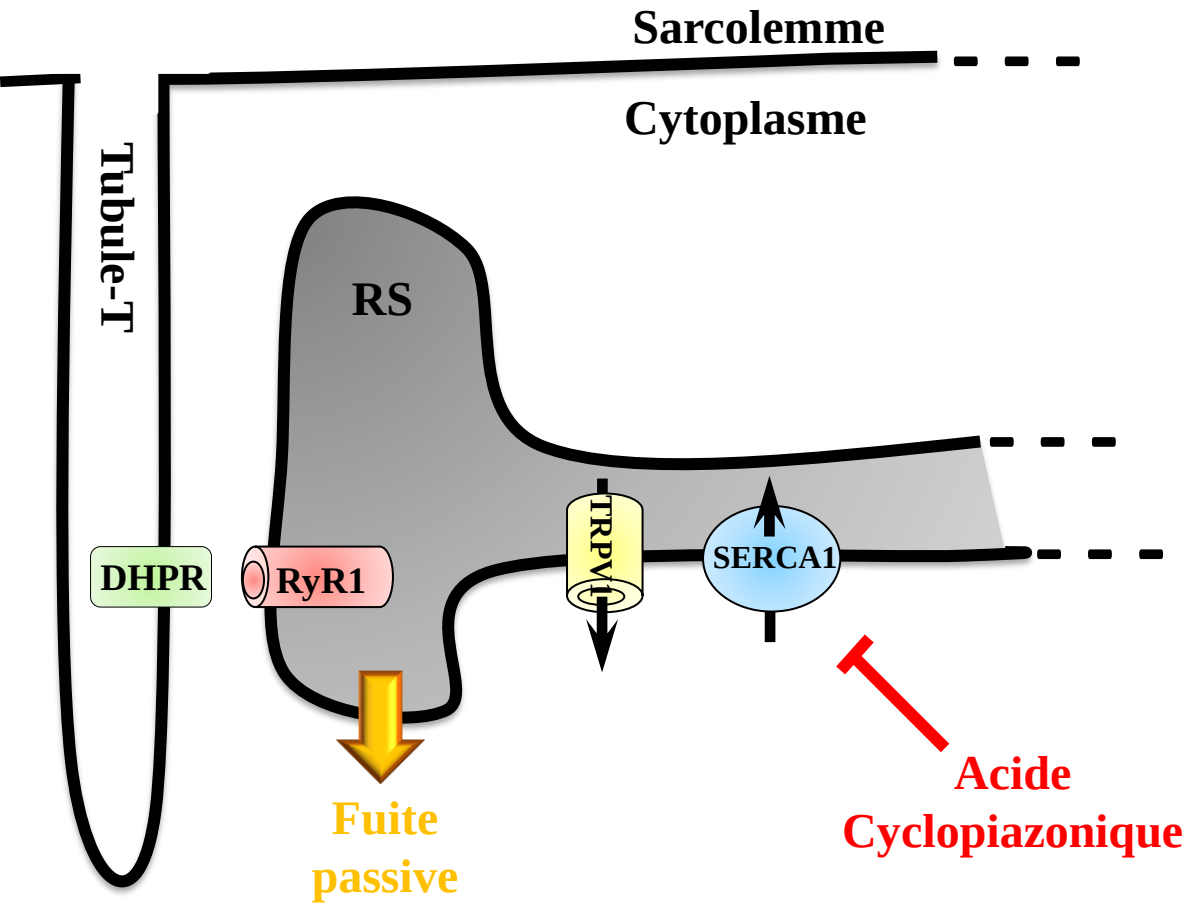


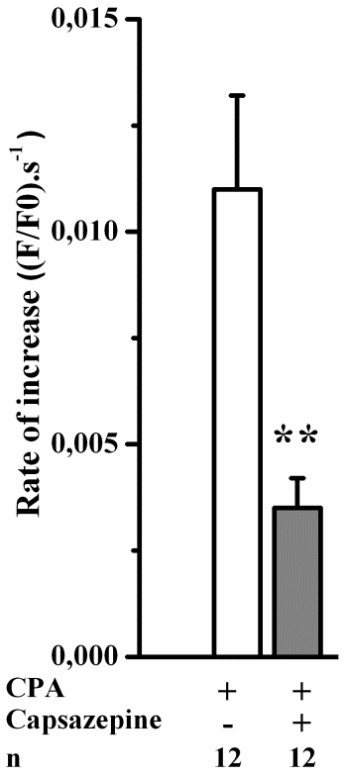
L'inhibition du RyR1 entraîne une diminution de l'élévation de calcium induite par la capsaïcine. Le calcium libéré par TRPV1 pourrait potentialiser la réponse du RyR1.

Etude 1

Fonctionnalité de TRPV1 dans le muscle strié squelettique

Imagerie calcique en microscopie confocale sur cellules musculaires striées squelettiques isolées (FDB) de souris OF1. Observation d'une fuite de calcium du RS *via* TRPV1 en condition de repos.

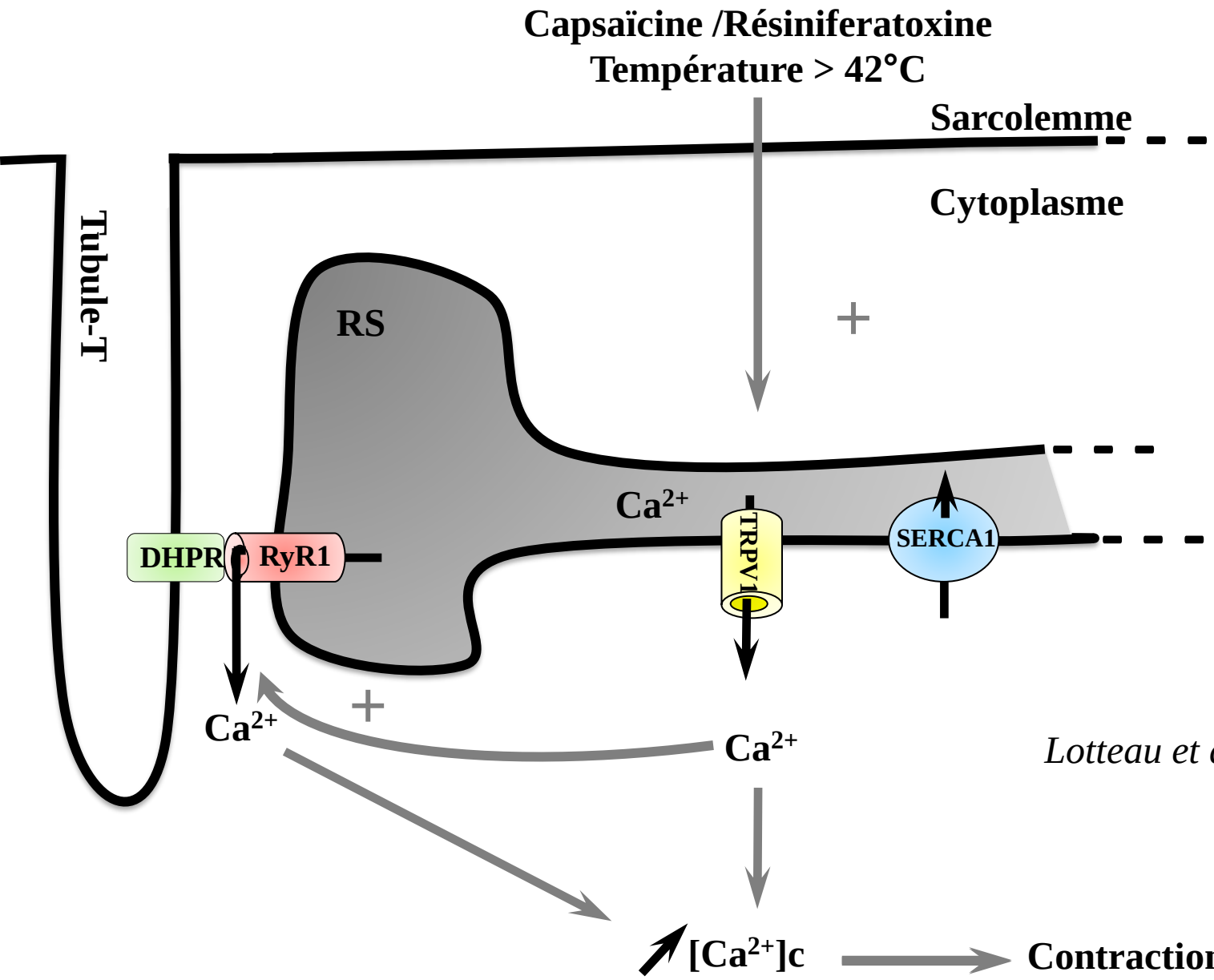




TRPV1 contribuerait à la fuite calcique passive au repos du réticulum sarcoplasmique.

Etude 1

Conclusion



Lotteau et al., PLoS One 2013

Plan

Hyperthermie Maligne des Anesthésies: Perte de l'homéothermie.

Thermorécepteurs: TRPV1 et chaleur.

Etude 1: Caractérisation fonctionnelle de TRPV1 dans le réticulum sarcoplasmique du muscle strié squelettique de souris

Etude 2: Implication du canal cationique TRPV1 dans le cas pathologique de l'hyperthermie maligne

Etude 3: TRPV1 et autres….

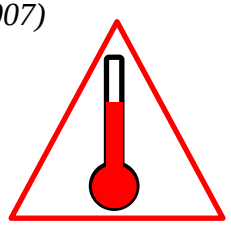
Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Hyperthermie Maligne:

Définition:

Crise du métabolisme exacerbée du muscle strié squelettique menant à une brusque montée de température chez le patient (> 42°C). *(Rosenberg H. et al., 2007)*



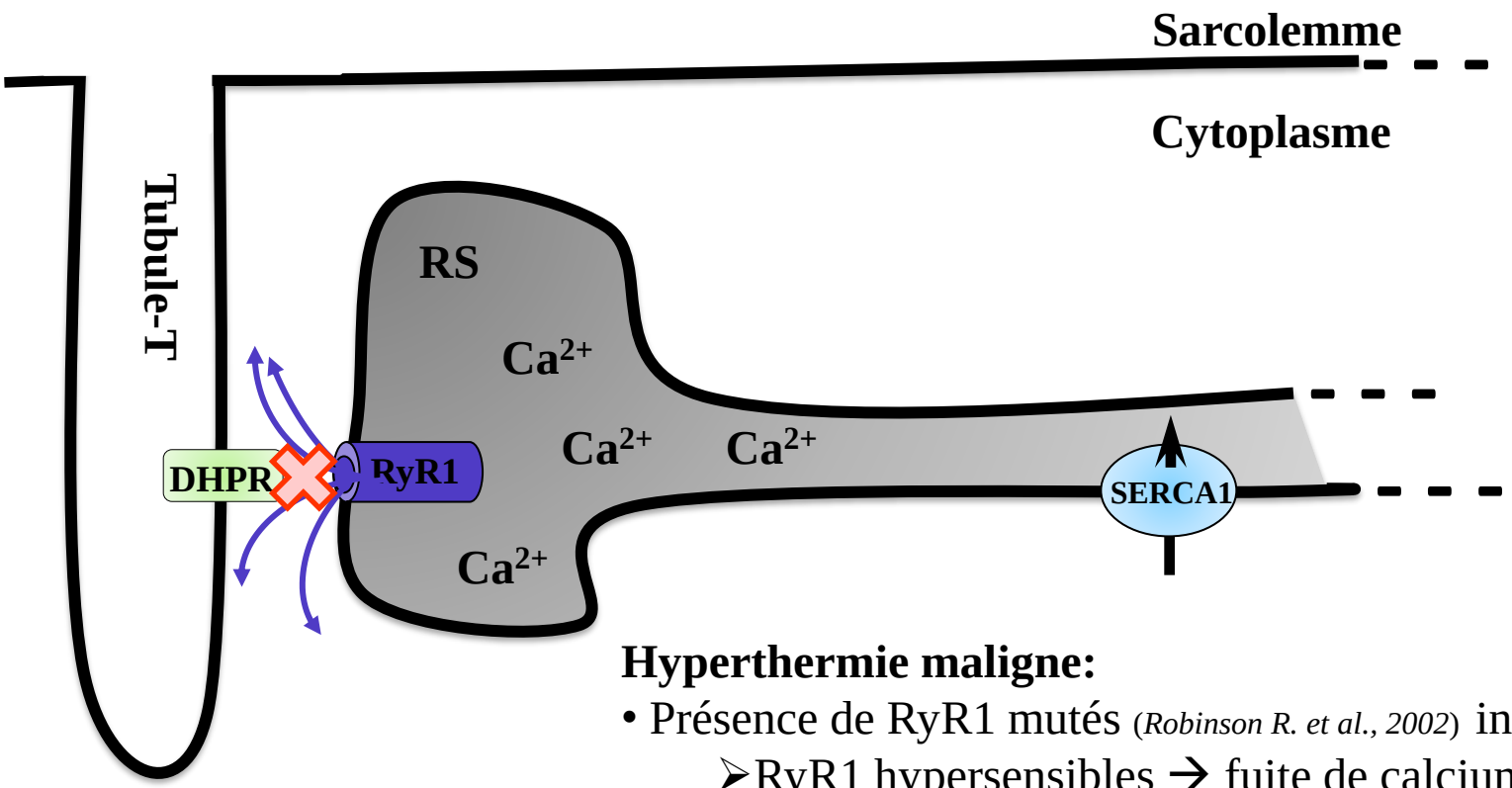
Causes:

Pathologie déclenchée par une exposition à différents agents pharmacologiques → anesthésiques volatils → **halothane**, **isoflurane**, **desflurane.**

→ Si les éléments déclencheurs de l'hyperthermie maligne sont connus, leurs **cibles sont inconnues**.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne



Hyperthermie maligne:

- Présence de RyR1 mutés (*Robinson R. et al., 2002*) induisant:
  - ➢RyR1 hypersensibles → fuite de calcium au repos
  - ➢Découplage RyR1-DHPR → pas de libération de Ca^{2+}
- Pas d'effet directs des anesthésiques volatils sur les RyR1 mutés

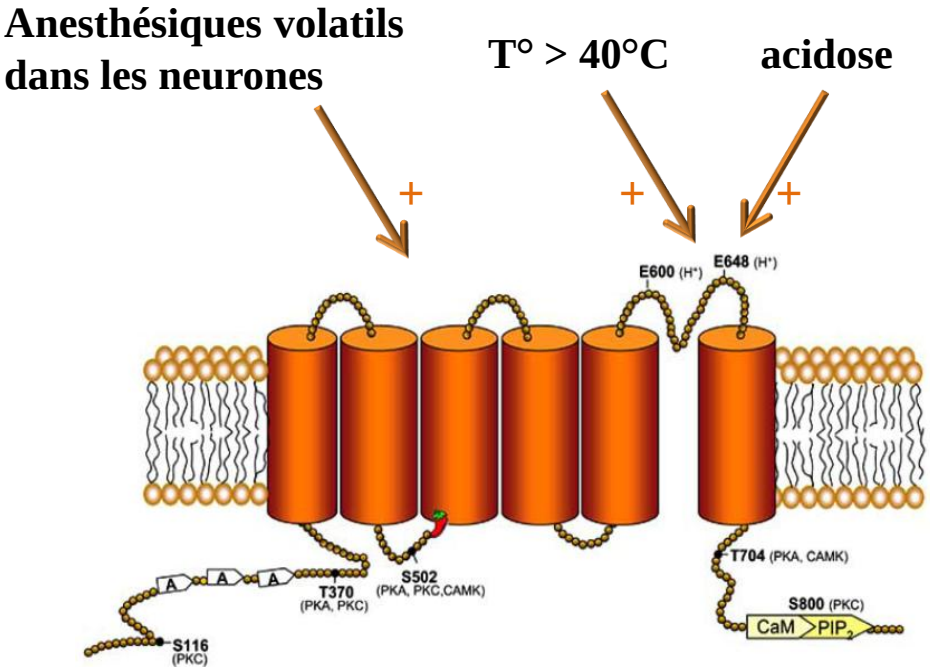
Quelles sont les cibles potentielles des anesthésiques volatils?

TRPV1?

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

TRPV1



Localisé au niveau de la partie longitudinale du RS dans les cellules musculaires striées squelettiques.

TRPV1 est un canal de fuite fonctionnel du RS qui pourrait interagir avec le RyR1 dans les fibres musculaires striées squelettiques.

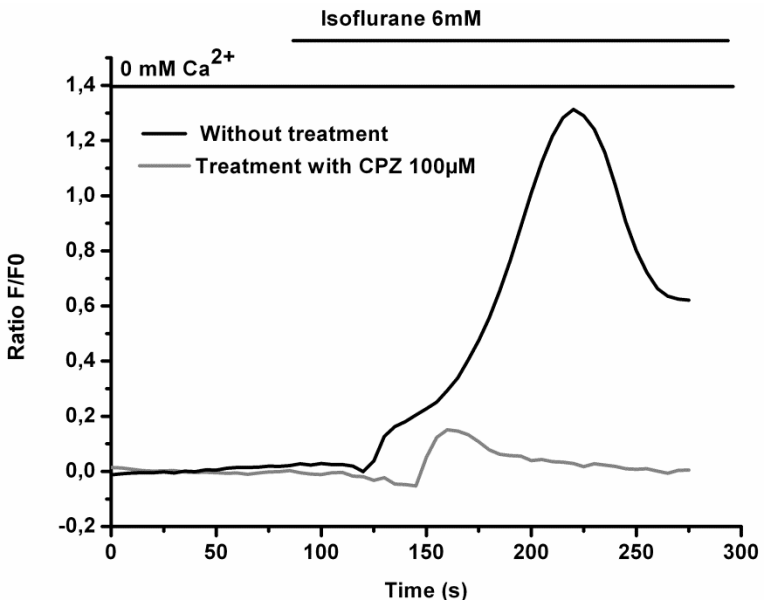
TRPV1 est activé par les anesthésiques volatils dans les neurones ***(Cornett P.M et al., 2008)***

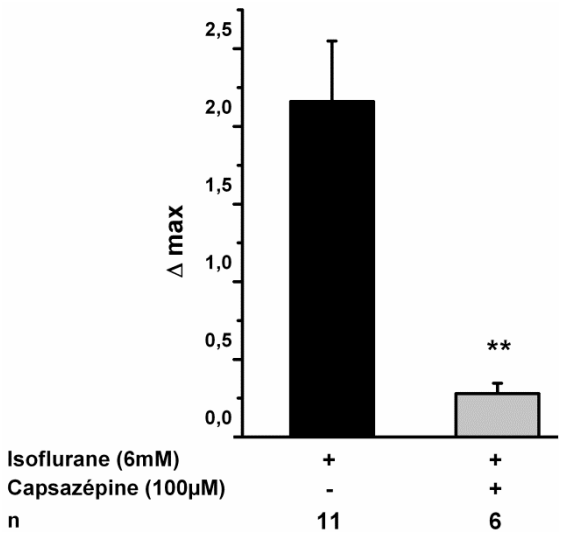
TRPV1 semble le candidat idéal à l'origine d'une libération exacerbée de calcium du RS suite à l'application d'anesthésiques volatils.

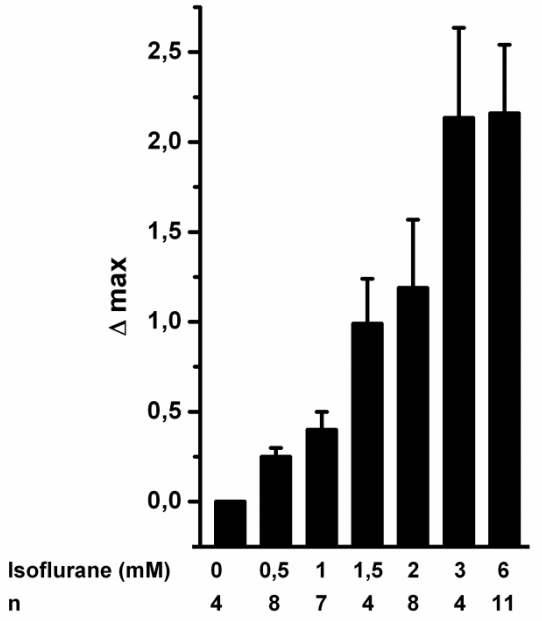
Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Imagerie calcique en microscopie confocale sur cellules musculaires striées squelettiques isolées (FDB) de souris OF1.
Utilisation de la sonde calcique Fluo4-AM.



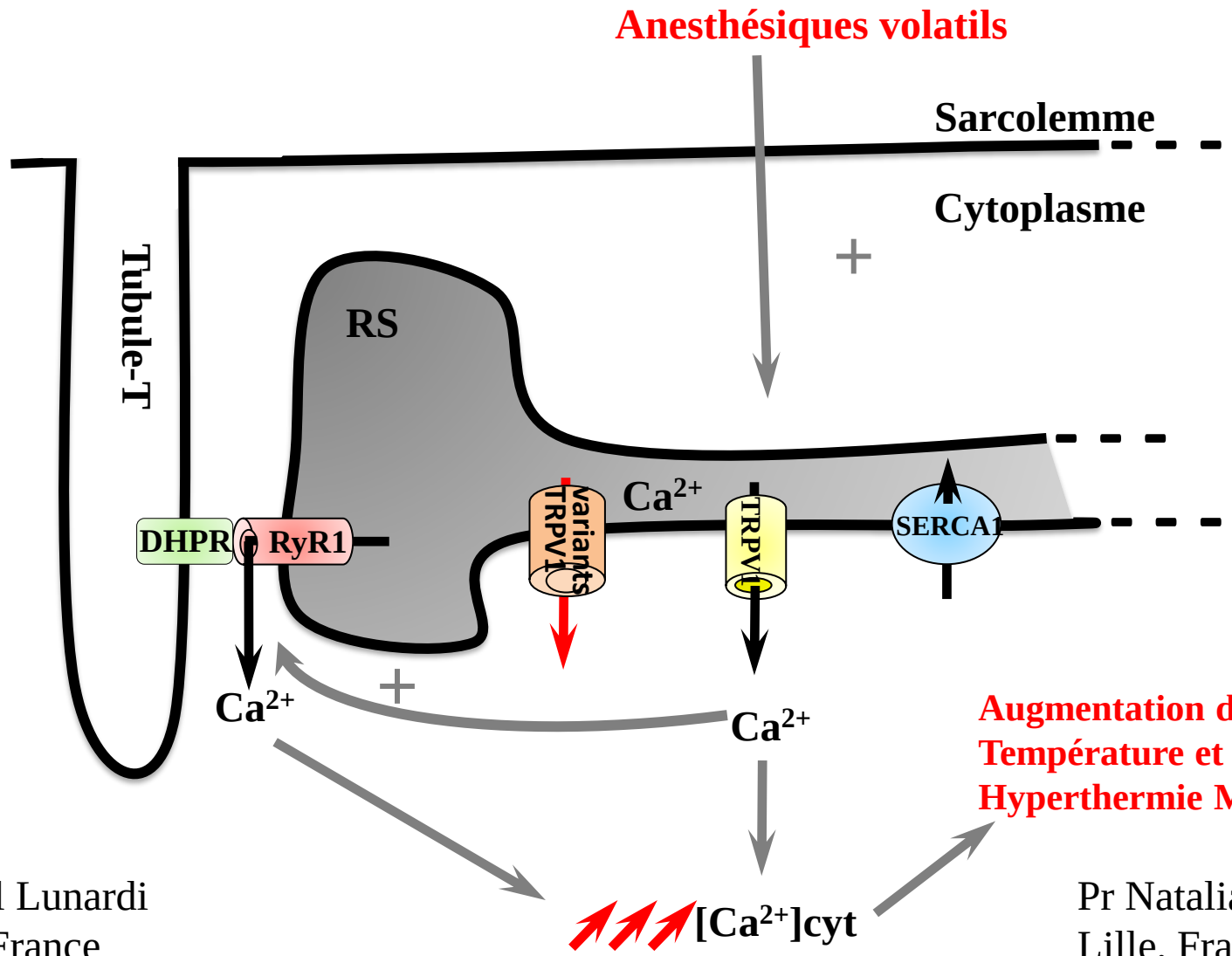




TRPV1 est activé par les anesthésiques volatils dans les cellules musculaires striées squelettiques différenciées de souris OF1.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne



PU PH Joël Lunardi
Grenoble, France

Pr Natalia Pevarskaya
Lille, France

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

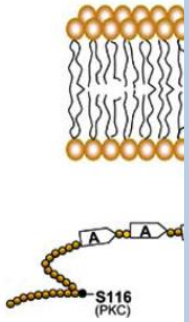
Etude des variants TRPV1 humains.

Variant TRPV1 T612M:

veloppé une
ératoire après

MH équivoque
rise.

TRPV1 humain



Diagnostic des patients susceptibles à l'HM



Biopsie musculaire

Test de contracture *in vitro:*
Halothane, Caféine

Patient sensible à l'HM (SHM)	Patient équivoque à l'HM (EHM)	Patient non sensible à l'HM (NHM)
Réponse + à l'halothane Réponse + à la caféine	Réponse + à l'un des deux tests	Réponse - à l'halothane Réponse - à la caféine

Variant TRPV1 N394*del*

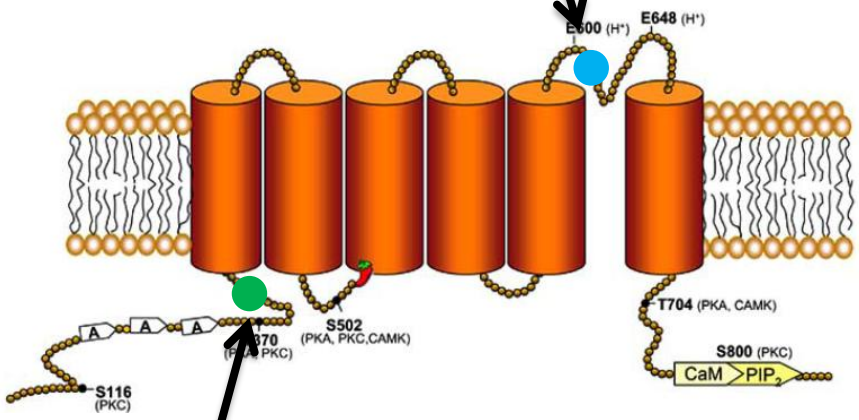
Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains.

Variant TRPV1T612M

TRPV1 humain



Variant TRPV1 N394*del*

Variant TRPV1 T612M:

Patient ayant développé une hyperthermie post-opératoire après anesthésie.

Testé secondairement MH équivoque plusieurs mois après la crise.

Variant TRPV1 N394*del*:

Patient asymptomatique, testé secondairement MH équivoque dans le cadre d'une étude familiale.

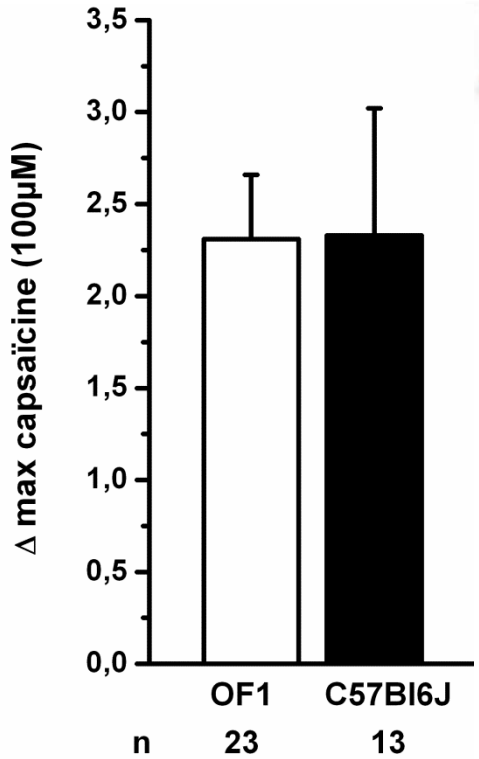
Porteur d'une mutation récessive du gène RyR1 à priori non responsable du caractère MH équivoque. Ses deux enfants sont atteints d'une myopathie associée au gène RyR1.

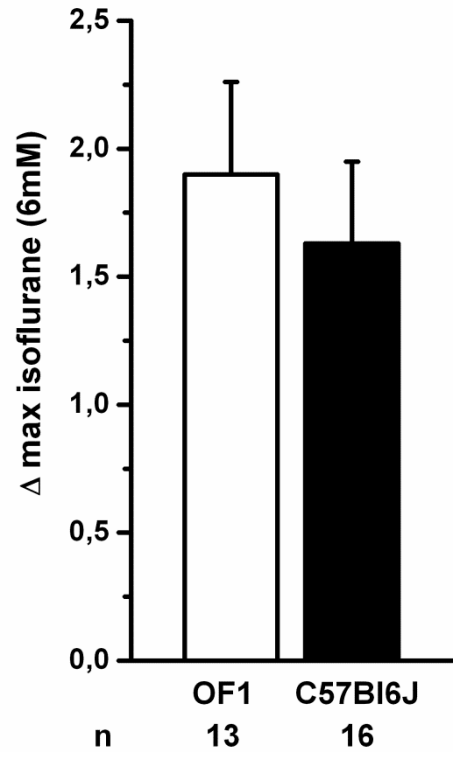
Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Comparaison des réponses à la capsaïcine et à l'isoflurane entre les souris OF1 et C57Bl6J







La réponse à la capsaïcine ainsi que la réponse à l'isoflurane est identique entre les souris OF1 et C57Bl6J.

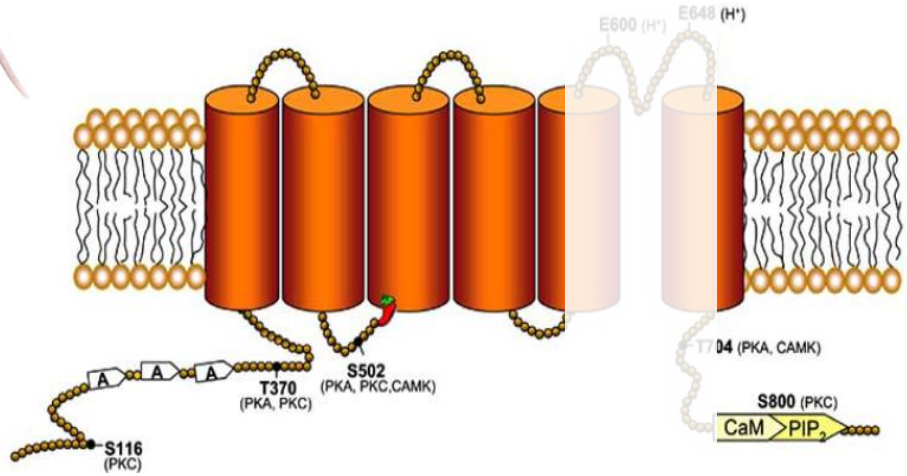
Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Comparaison des réponses à la capsaïcine et à l'isoflurane entre les souris C57Bl6J et TRPV1$^{-/-}$

Construction des souris TRPV1$^{-/-}$ par le Dr. D Julius Université de Californie





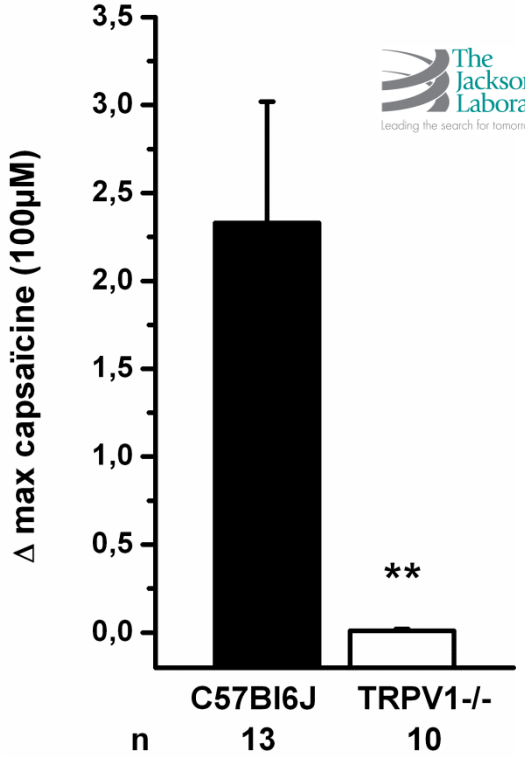
Interruption de l'exon codant la partie 5 et une partie de la région 6 des domaines transmembranaires ainsi que la région pore du canal au niveau du chromosome 11.

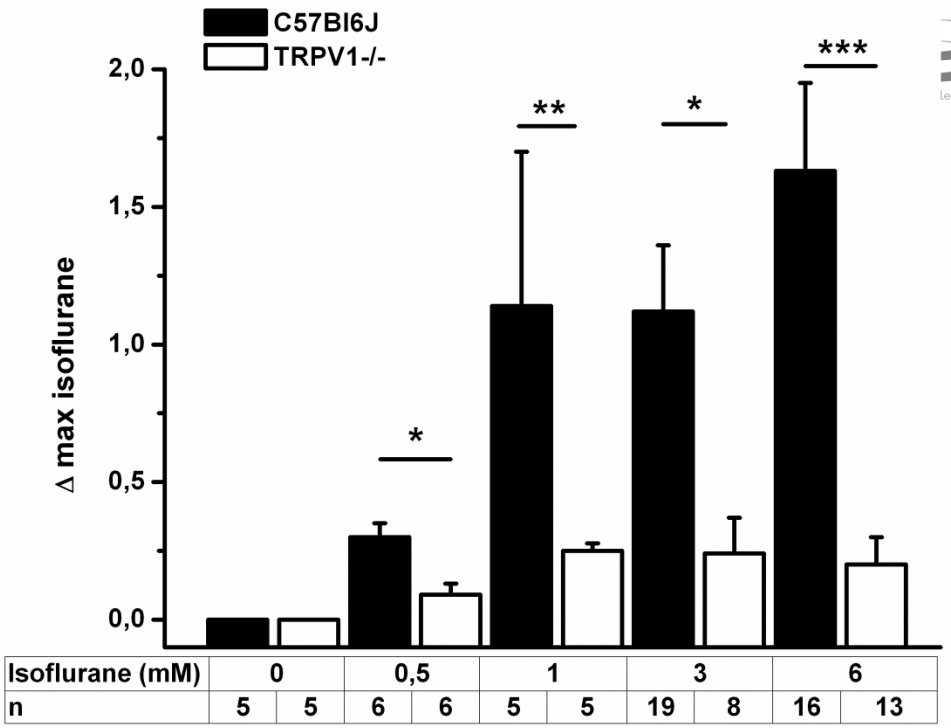
Souris viables, fertiles, de taille normale ne présentant pas de troubles comportementaux majeurs.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Comparaison des réponses à la capsaïcine et à l'isoflurane entre les souris C57Bl6J et TRPV1$^{-/-}$





Les cellules musculaires isolées de souris déficientes en TRPV1 ne répondent plus à la capsaïcine. Leur réponse à l'isoflurane est significativement diminuée.

Etude 2

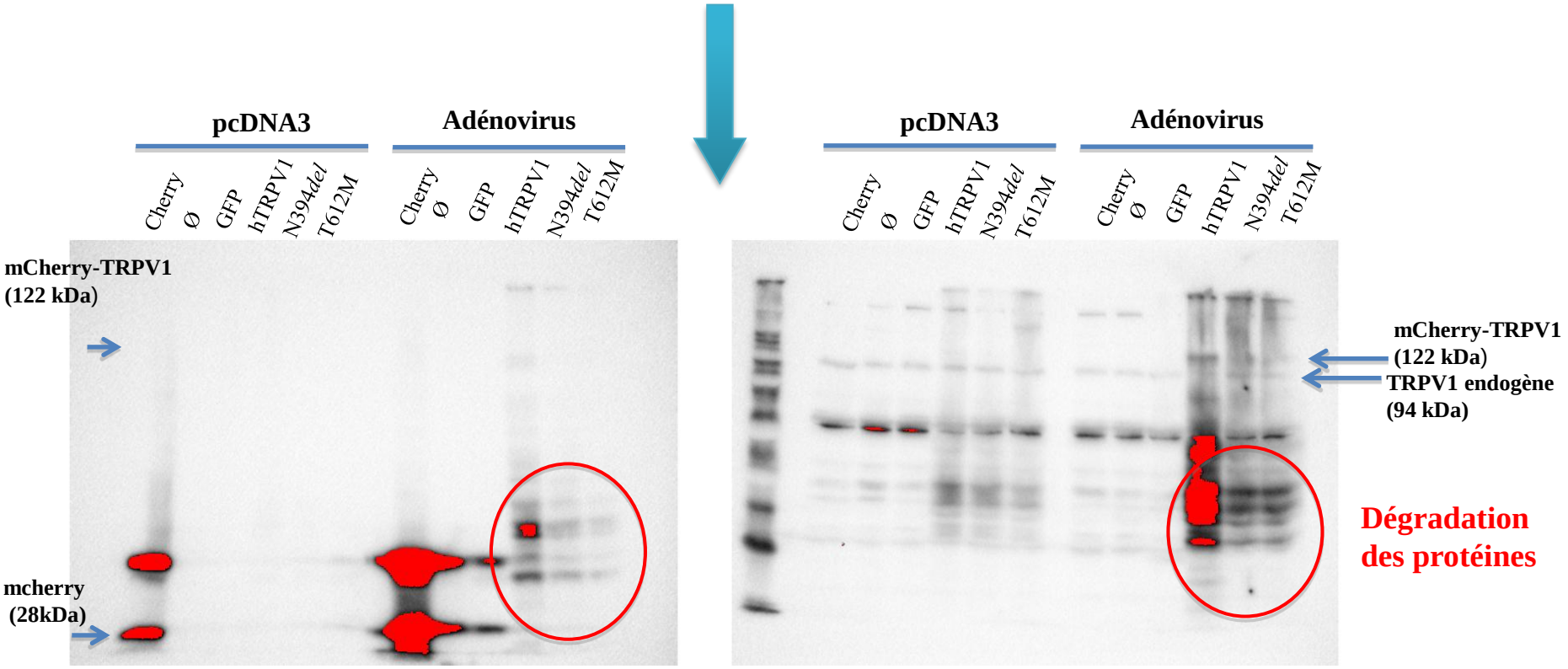
Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains.

Transfection: infection par adénovirus

Construction des adénovirus

Tests dans les cellules HEK293 et HUH7



Problème de surexpression des variants TRPV1 humains et de TRPV1 humain dans les adénovirus.

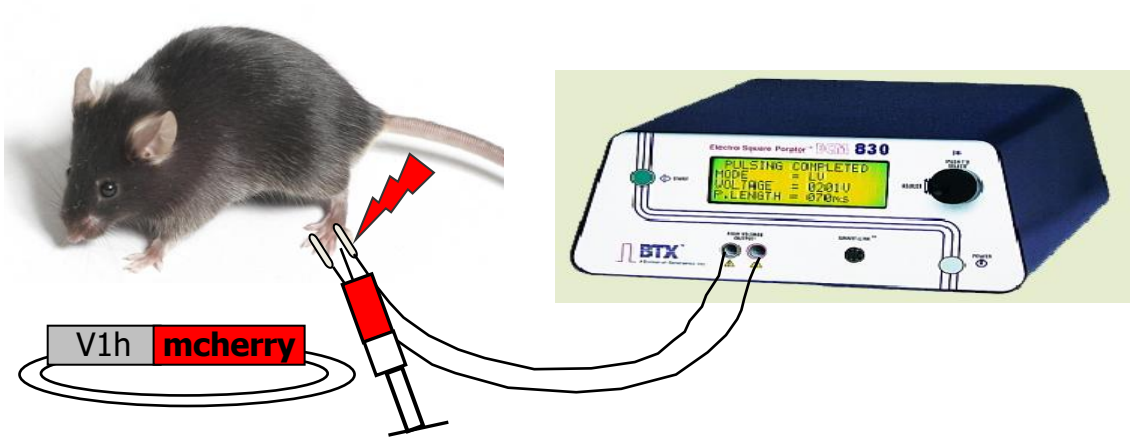
Dégradation rapide des protéines TRPV1.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains:

Transfection: électroporation *in vivo*



8 jours après électroporation

Isolement enzymatique des fibres

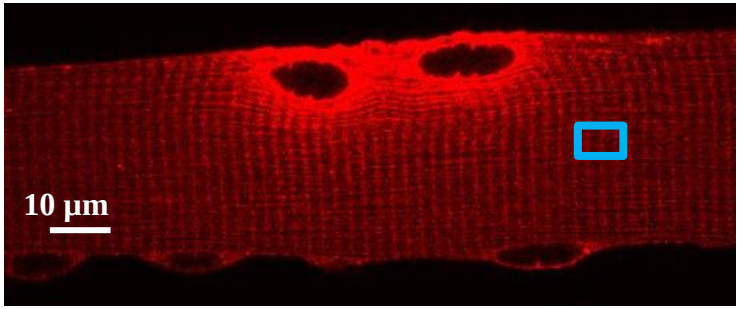
Observation microscope confocal du profil d'expression de TRPV1.

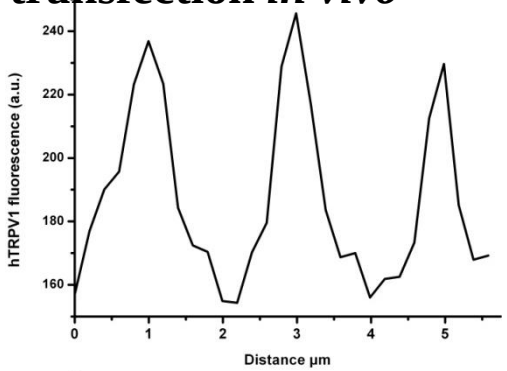
Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

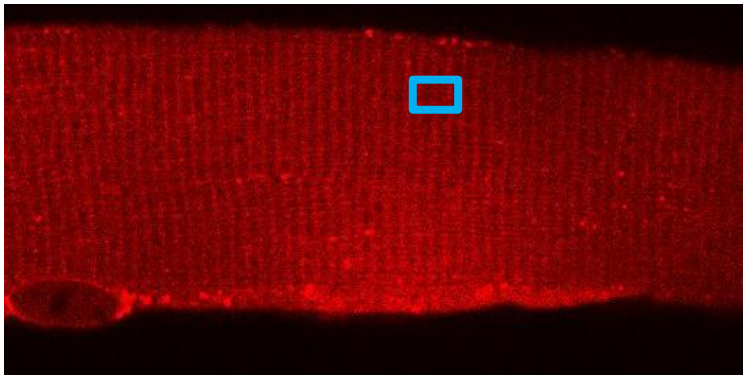
Etude des variants TRPV1 humains par la technique de la transfection *in vivo*

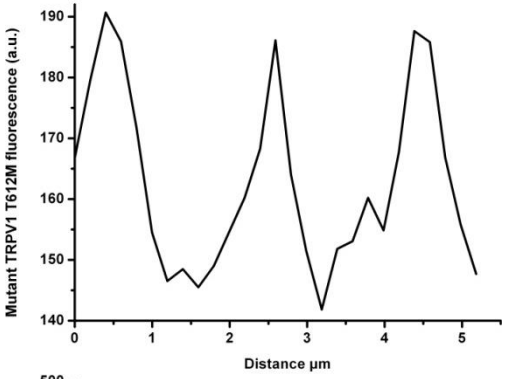
hTRPV1 transfecté dans les souris TRPV1$^{-/-}$



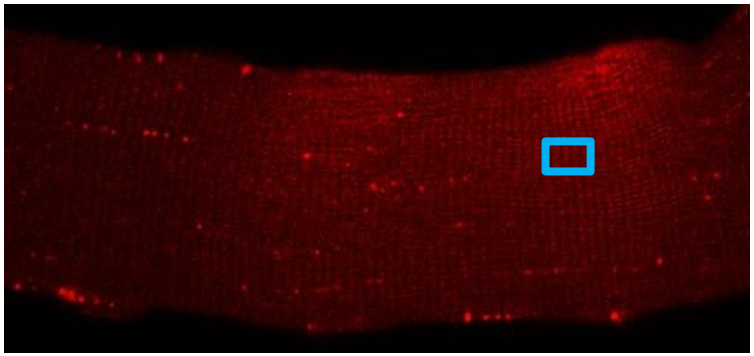


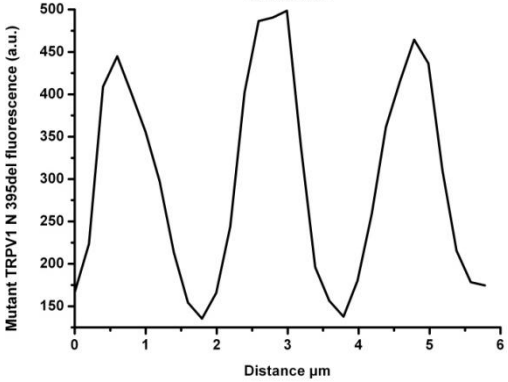
Variant T612M transfecté dans les souris TRPV1$^{-/-}$





Variant N394*del* transfecté dans les souris TRPV1$^{-/-}$



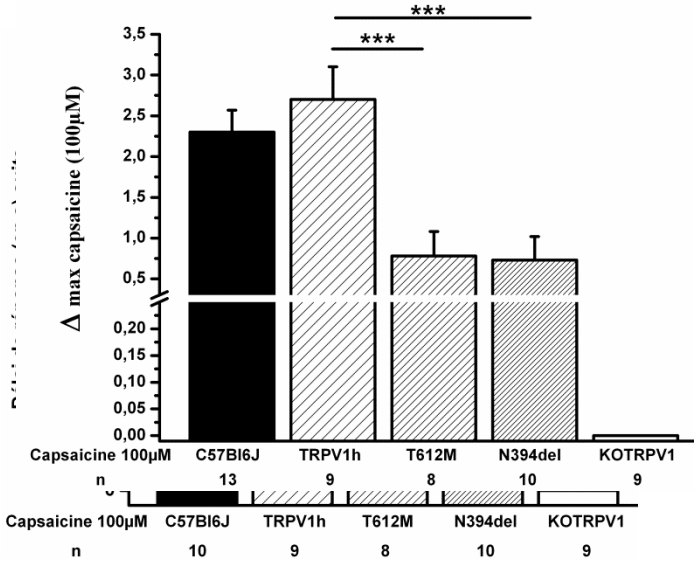


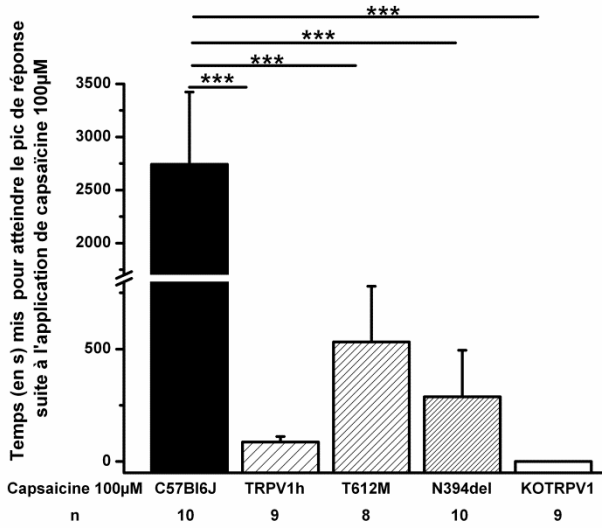
Localisation similaire à celle du TRPV1 endogène.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains par la technique de la transfection *in vivo*. Comparaison de la réponse à la capsaïcine.





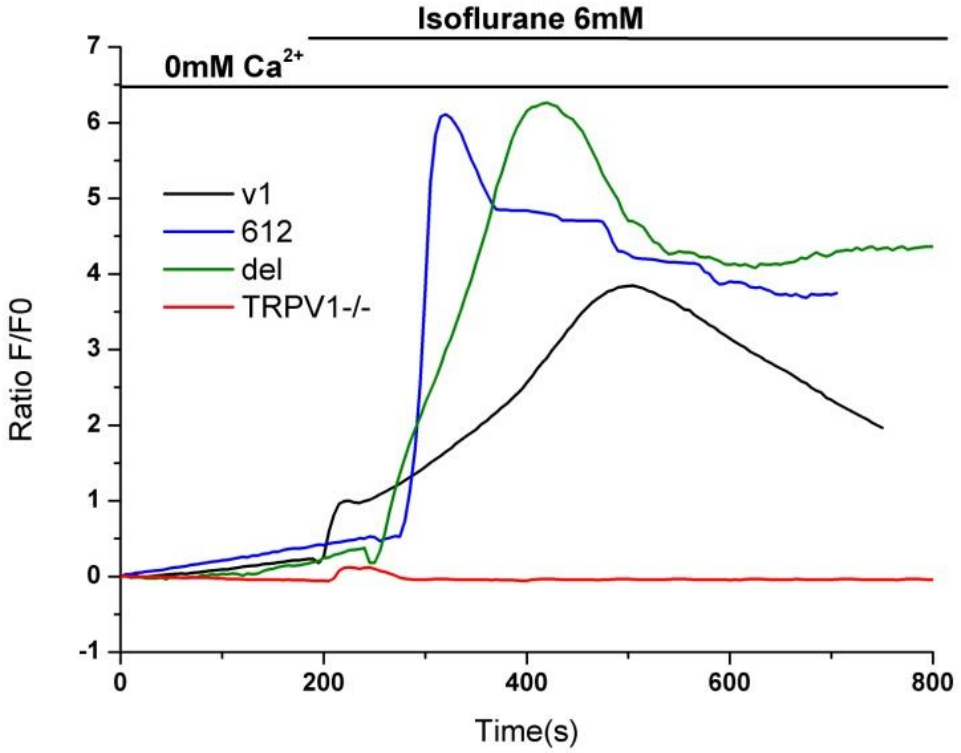
La réponse à la capsaïcine est diminuée sur les cellules TRPV1$^{-/-}$ transfectées avec les variants TRPV1.

Le délai et le temps de réponse à la capsaïcine est diminué sur les cellules TRPV1$^{-/-}$ transfectées avec hTRPV1 et ses variants. hTRPV1 est plus sensible à la capsaïcine que le TRPV1 endogène de souris.

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

Etude des variants TRPV1 humains par la technique de la transfection *in vivo*. Comparaison de la réponse à l'isoflurane.

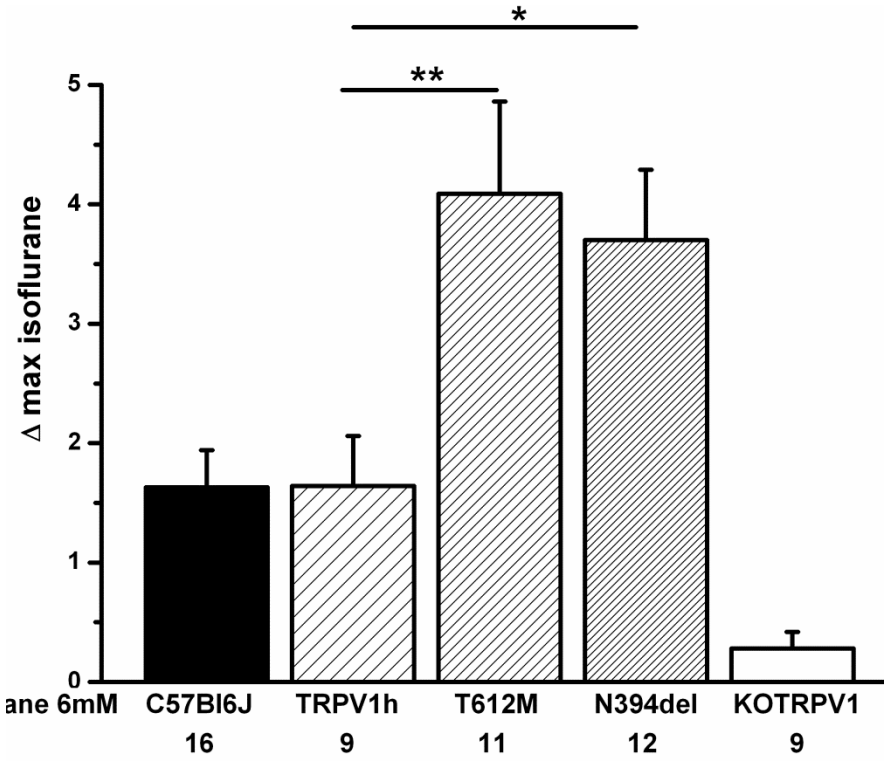


La réponse à l'isoflurane est augmentée sur les cellules transfectées avec les variants TRPV1

Etude 2

Implication de TRPV1 dans le cas pathologique de l'Hyperthermie Maligne

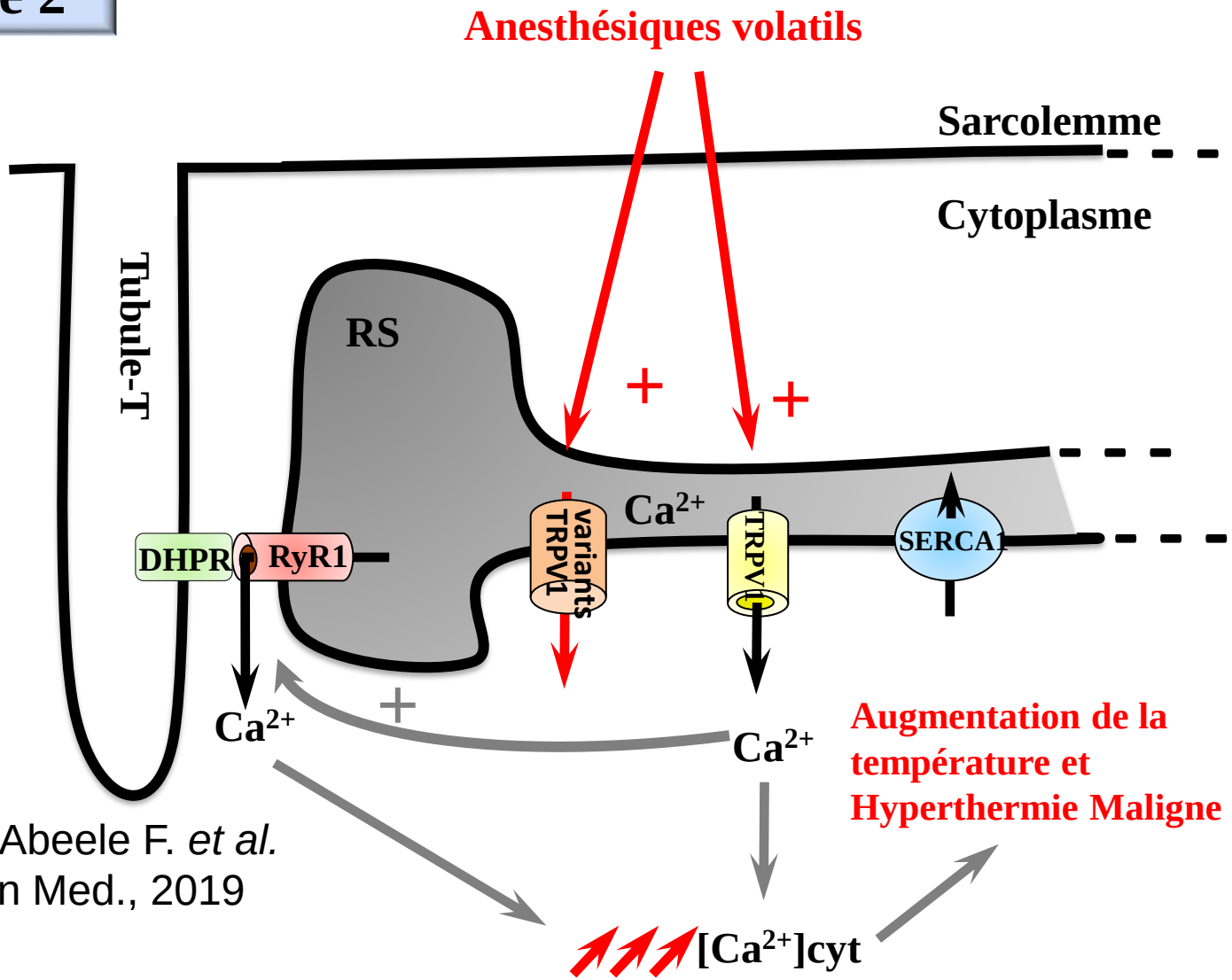
Etude des variants TRPV1 humains par la technique de la transfection *in vivo*. Comparaison de la réponse à l'isoflurane.



La réponse à l'isoflurane est augmentée sur les cellules transfectées avec les variants TRPV1

Etude 2

Conclusion



Vanden Abeele F. *et al.*
Genet. In Med., 2019

Variants TRPV1 humains: plus sensibles à l'isoflurane; potentiels déclencheurs de la crise d'HM à l'origine d'une libération de calcium exacerbée dans le cytoplasme. Le calcium une fois libéré par les variants TRPV1 T612M et N394*del* pourrait dans un second temps favoriser la forte libération de calcium des RyR1 mutés chez des patients susceptibles à l'HM.

Etude 3

Hyperthermie d'effort et coup de chaleur.

- Hyperthermie d'effort = Hyperthermie maligne due à un exercice physique intense et prolongé.

- Diagnostiquée initialement chez des militaires. Nombre croissant dû à des pratiques sportives intenses: randonnées; trails; ultra-trails, ….







Etude 3

Hyperthermie d'effort et coup de chaleur.

- Hyperthermie d'effort = Hyperthermie maligne due à un exercice physique intense et prolongé.

- Diagnostiquée initialement chez des militaires. Nombre croissant dû à des pratiques sportives intenses: randonnées; trails; ultra-trails, ….

- Liens hyperthermie maligne des anesthésies et hyperthermie d'effort?
  - HM des anesthésies: 60% des cas dus à RYR1
  - HM d'effort: 10% des cas dus à RYR1
  - TRPV1?

Etude 3

Hyperthermie d'effort et coup de chaleur.

- Hyperthermie d'effort = Hyperthermie maligne due à un exercice physique intense et prolongé.

- Diagnostiquée initialement chez des militaires. Nombre croissant dû à des Pratiques sportives intenses: randonnées; trails; ultra-trails, ….

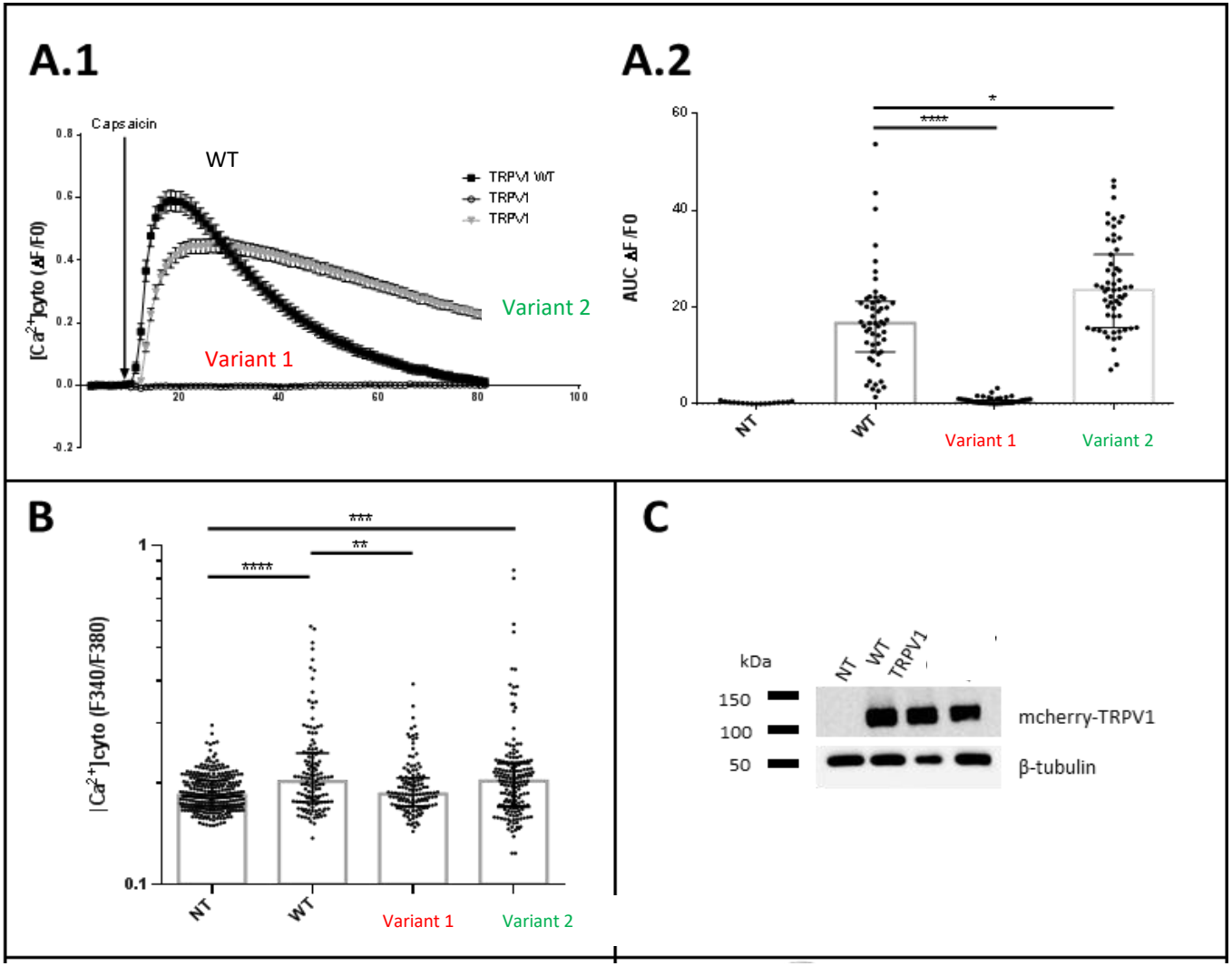
- Liens hyperthermie maligne des anesthésies et hyperthermie d'effort?
  - HM des anesthésies: 60% des cas dus à RYR1
  - HM d'effort: 10% des cas dus à RYR1
  - TRPV1?

- Cohorte de 49 militaires ayant déclenché une HM d'effort.
  - 2 variants TRPV1 identifiés.



Etude 3

Hyperthermie d'effort et coup de chaleur.



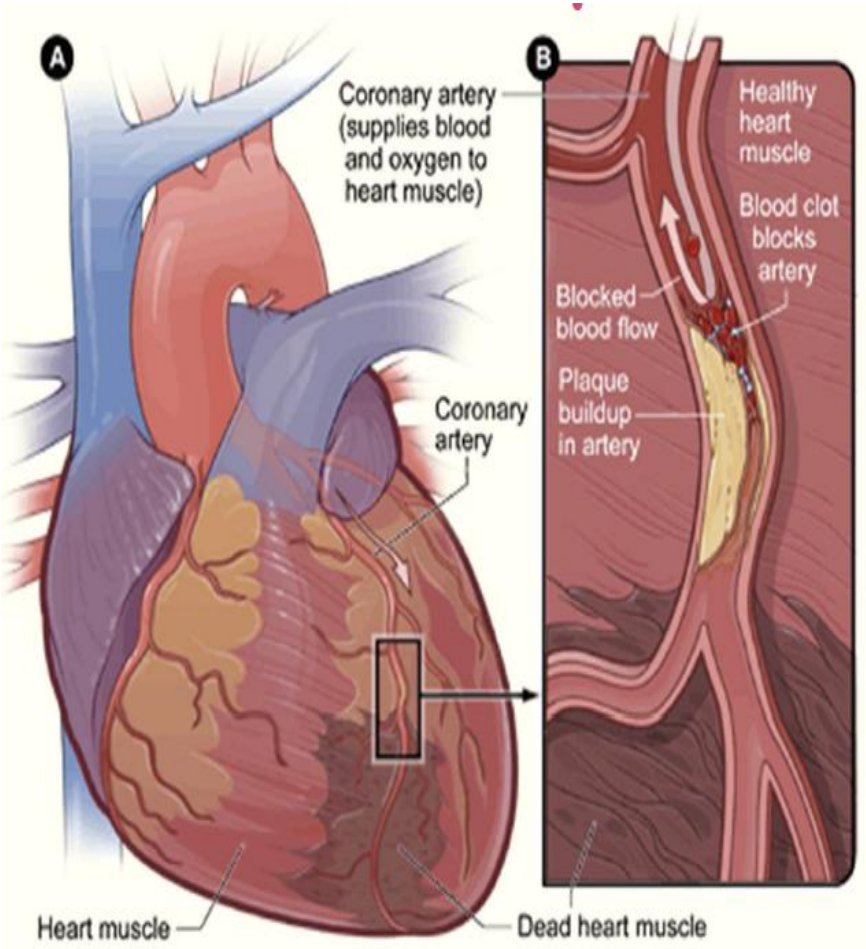
Etude 4

Infarctus du myocarde

- Cause majeure de mortalité
- En aval de l'obstruction → cellules en ischémie

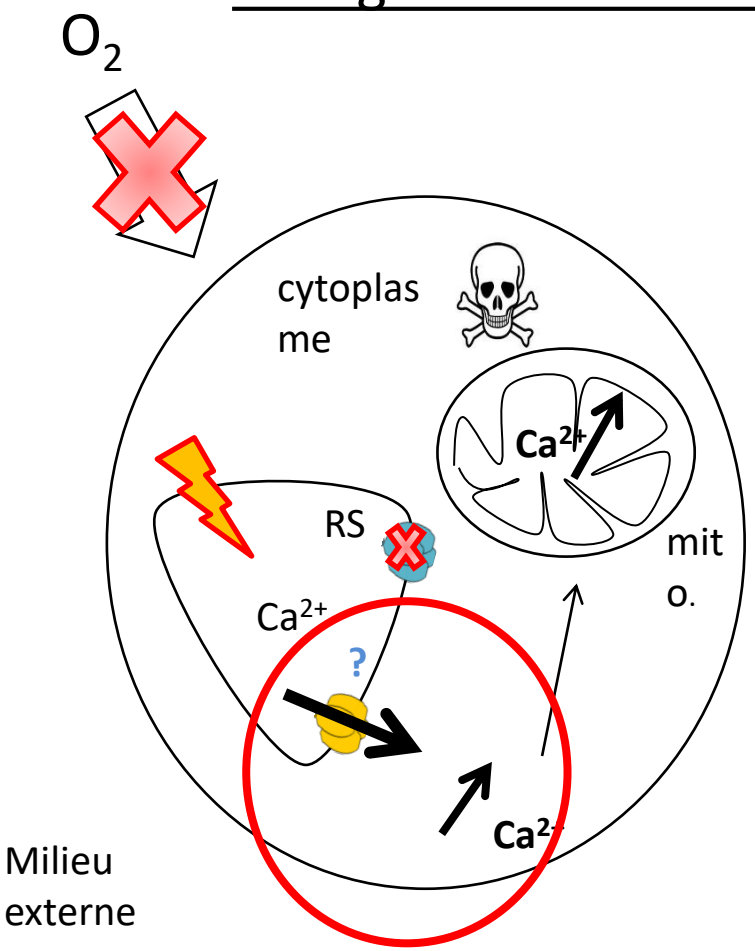
- Zone infarcie risquant de nécroser

- Si reperfusion → ré-oxygénation des cellules + apports en nutriments



Etude 4

Dérégulation de l'homéostasie calcique au cours de l'ischémie/r



I/R

↓

Baisse d'apport en O2
Diminution de la synthèse d'ATP par la mito → Stress du RE

↓

Libération de Ca^{2+} du RE
Pas de re-pompage par les pompes

+/-

Modulation pharmacologique de la fuite calcique des canaux du RE menant à la survie cellulaire ou une augmentation de la mort cellulaire.

↓

Augmentation de $[Ca^{2+}]_{mit.}$
Augmentation de $[Ca^{2+}]_{cyt.}$

↓

Apoptose des cardiomyocytes

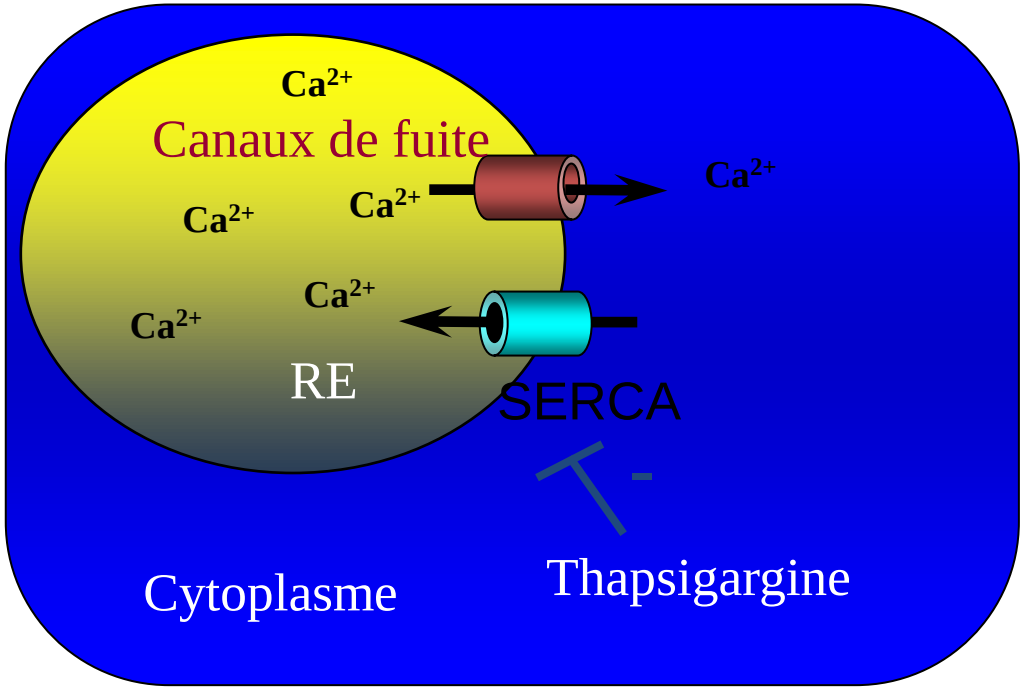
But : - Identifier la voie par laquelle le Ca est libéré du RE

- Modulation pharmacologique des canaux de fuite : *in vivo* et *in vitro*

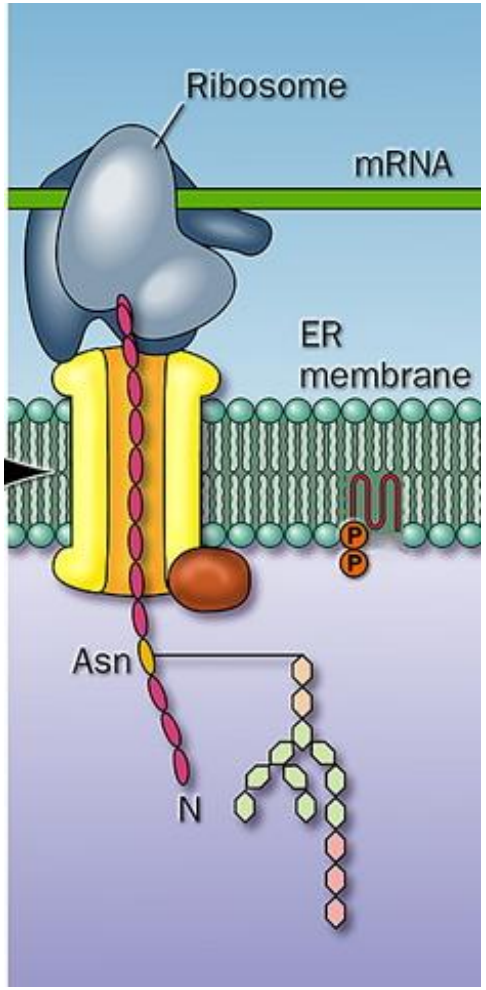
Canaux de fuite

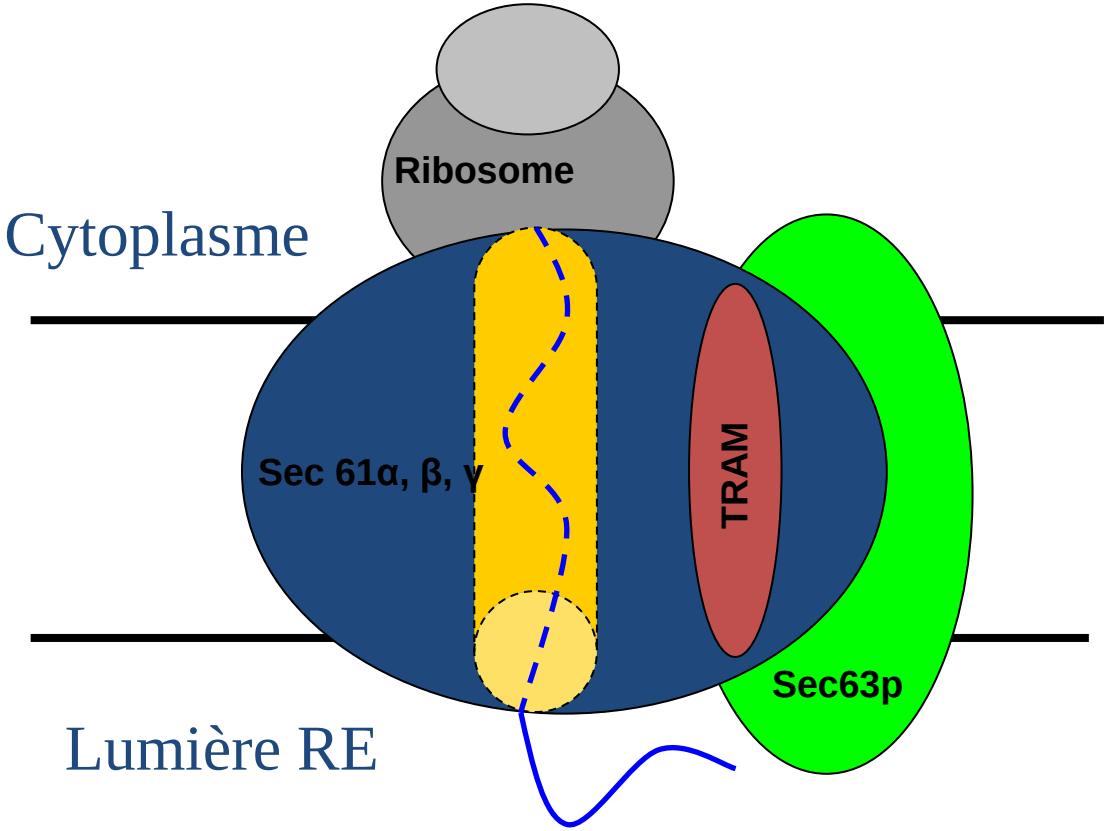
Fuite passive

Translocon: canal de fuite passive?



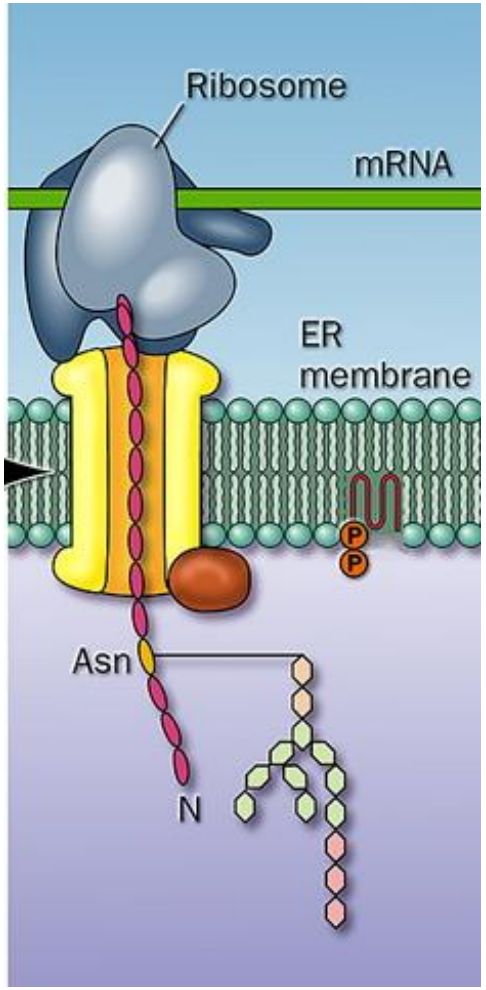
Traduction protéique

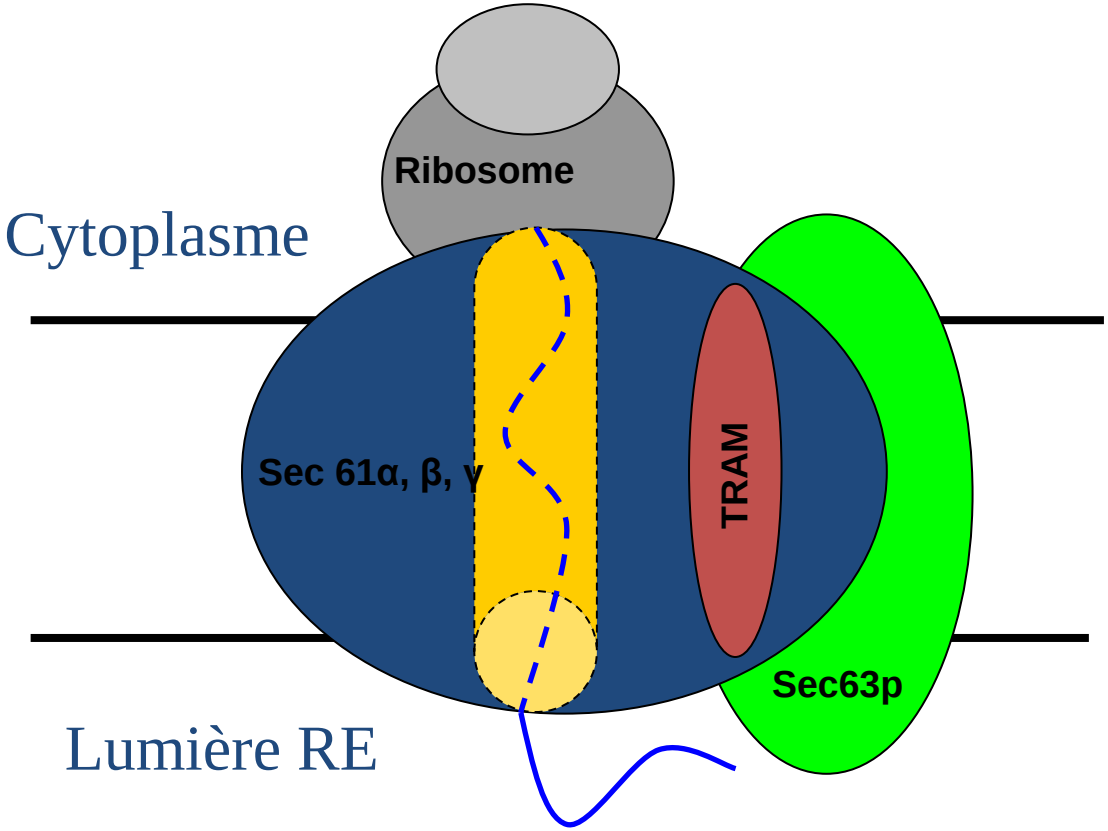




D'après Mol. Biol of the Cell 4ème Ed.

Le translocon: un canal de fuite potentiel

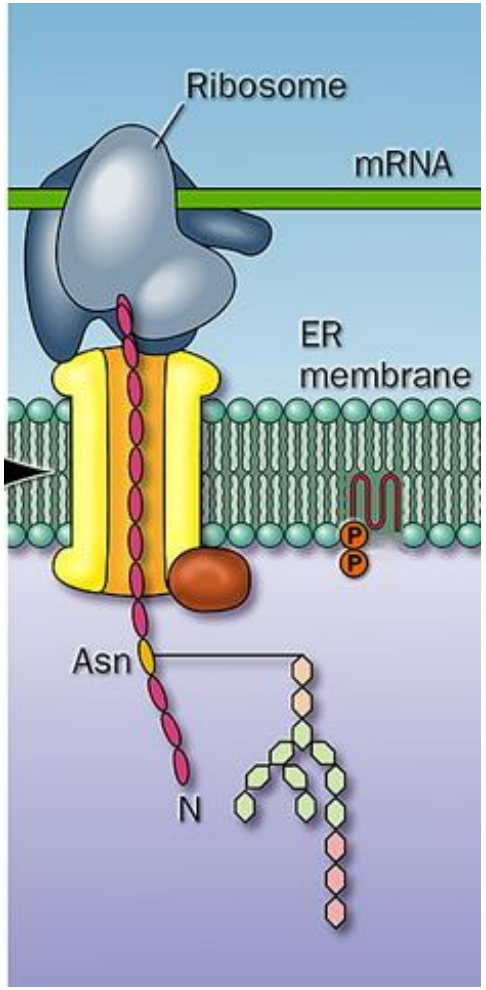


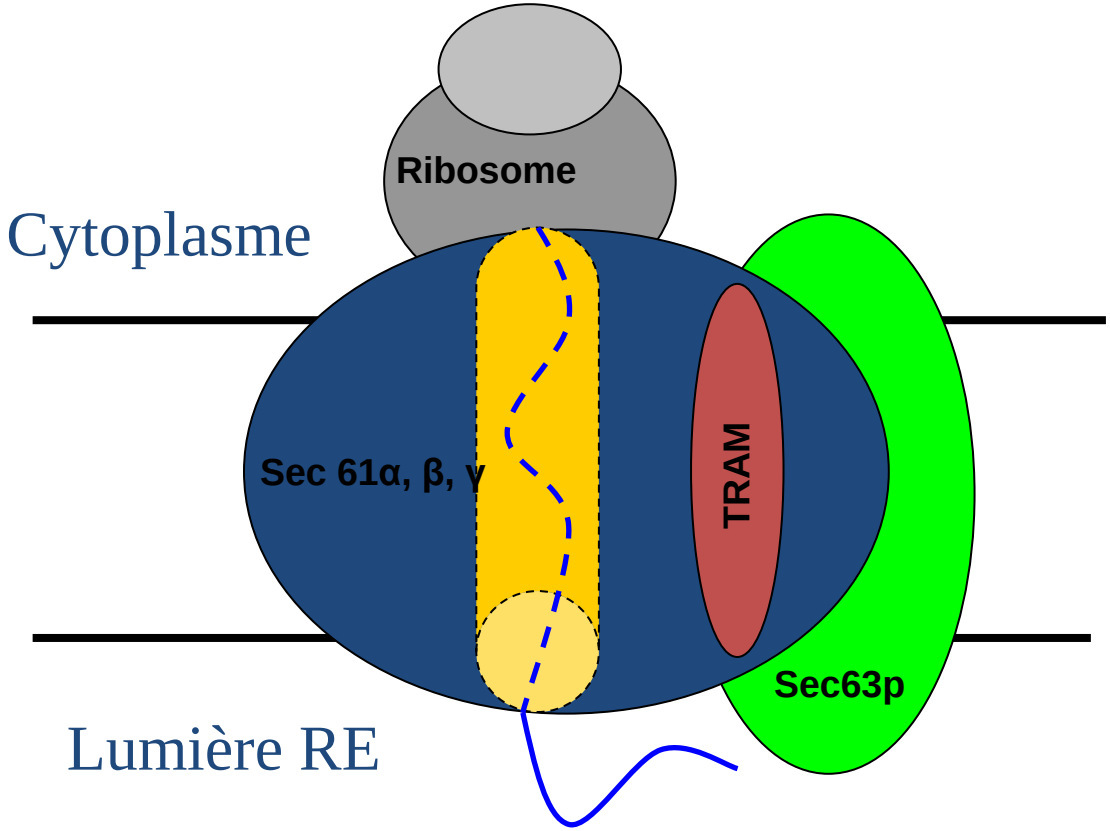


Translocon perméable aux petites molécules polarisées (Heritage and Wonderlin, J. Biol. Chem., 2001).

D'après Mol. Biol of the Cell 4ème Ed.

Le translocon: un canal de fuite potentiel

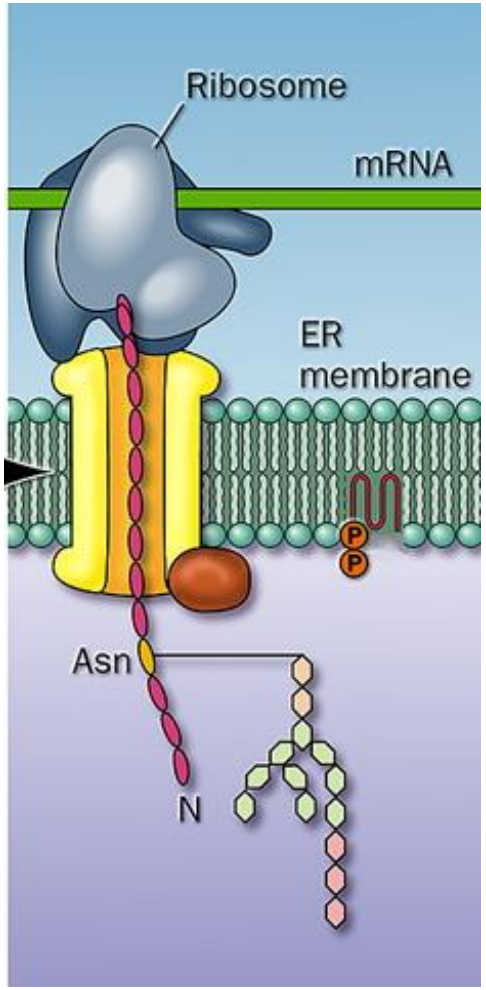




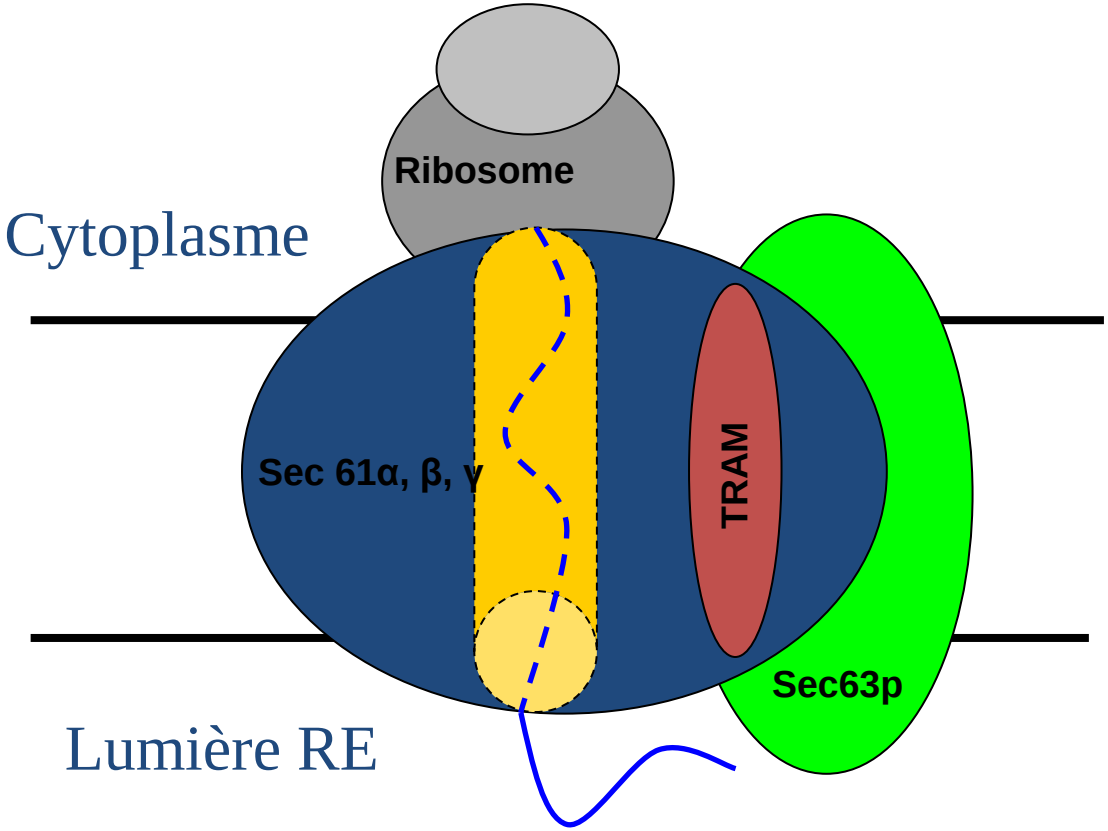
Ouvertures spontanées du translocon possibles (Simon et Blobel, Cell, 1991).

D'après Mol. Biol of the Cell 4ème Ed.

Le translocon: un canal de fuite potentiel

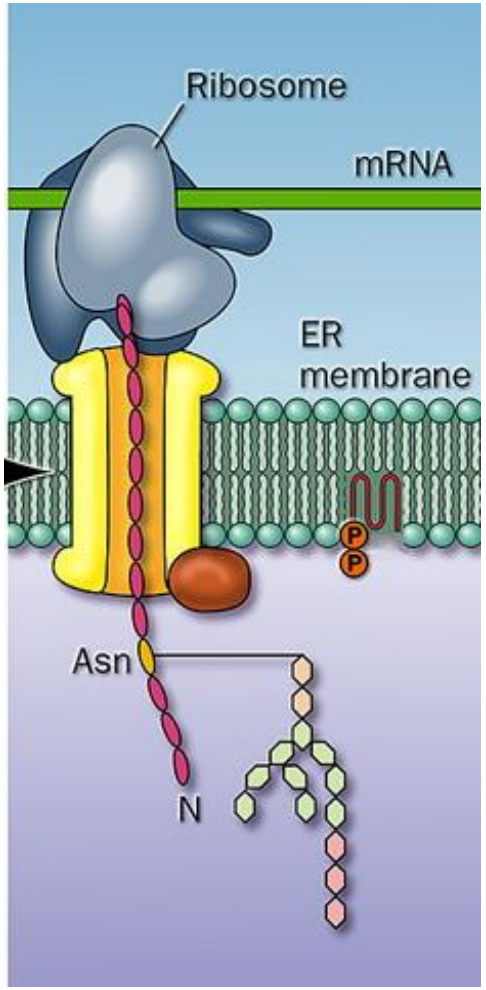


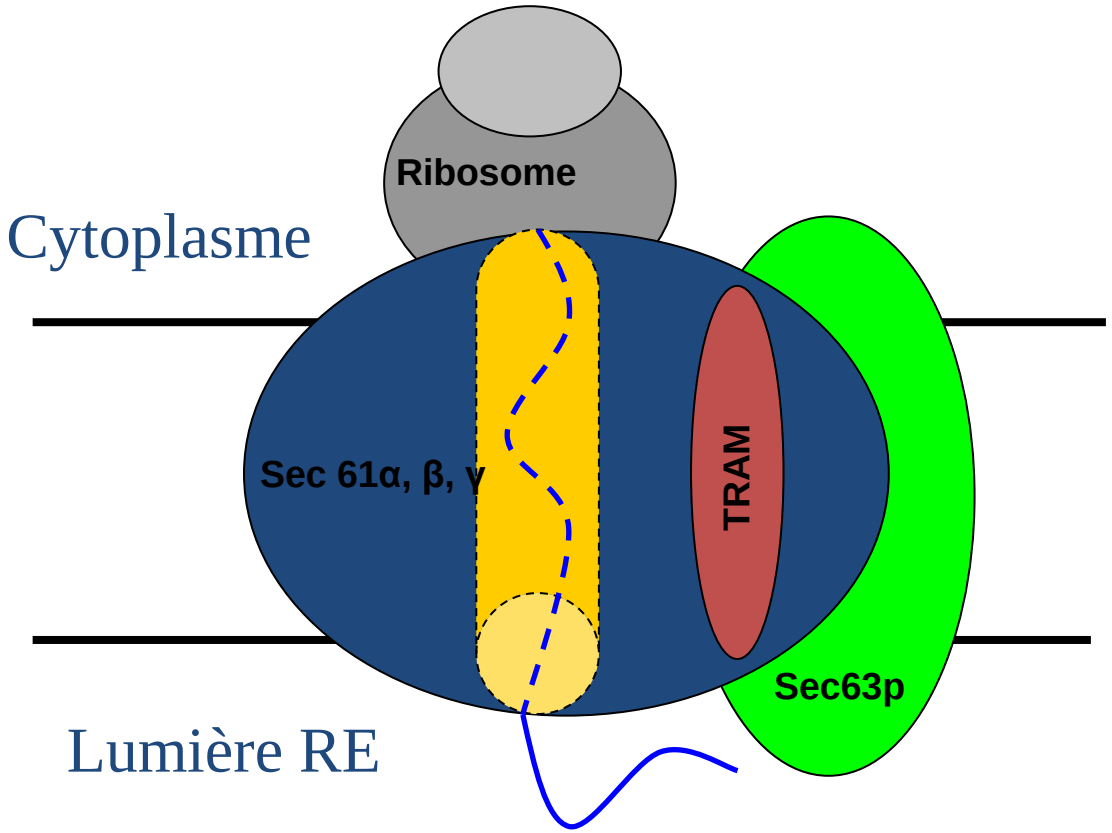
D'après Mol. Biol of the Cell 4ème Ed.



Le ribosome reste en place sur le translocon après la fin de la traduction (Potter et Nichitta, J. Biol. Chem., 2000).

Le translocon: un canal de fuite potentiel

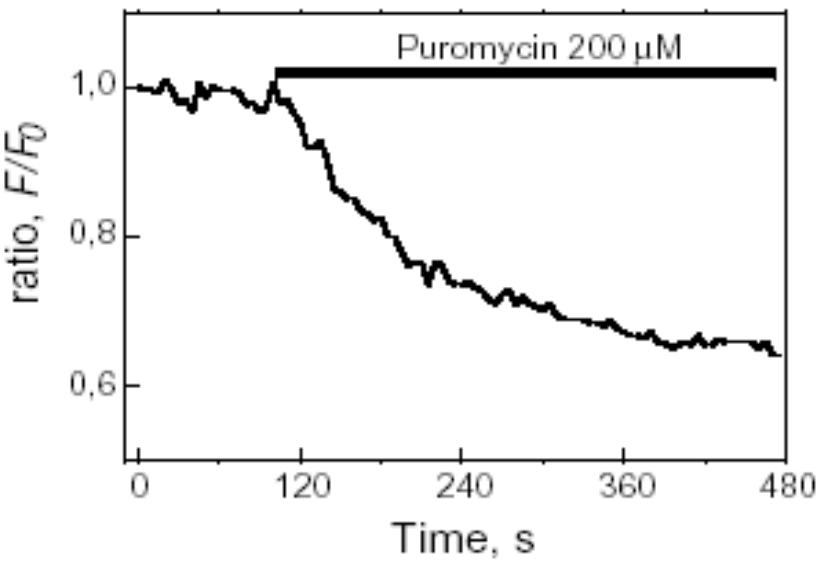




Pharmacologie: Puromycine et Anisomycine.

D'après Mol. Biol of the Cell 4ème Ed.

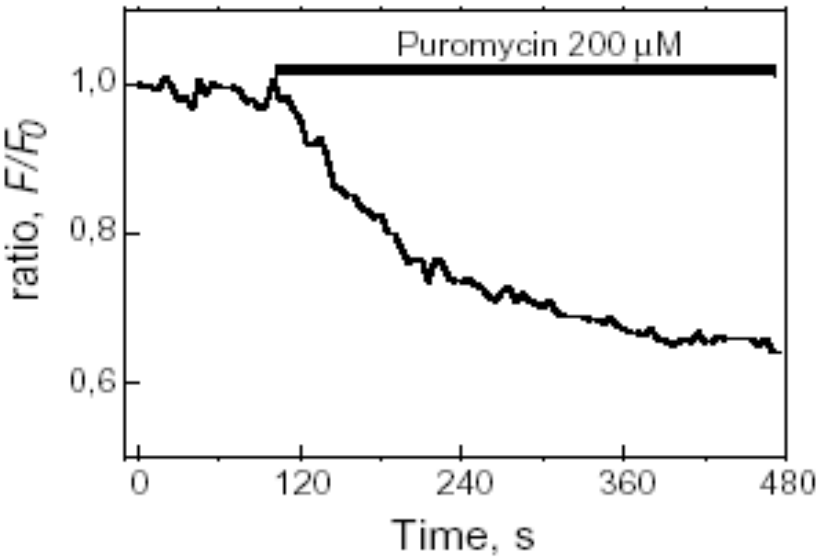
Translocon: a calcium leak channel

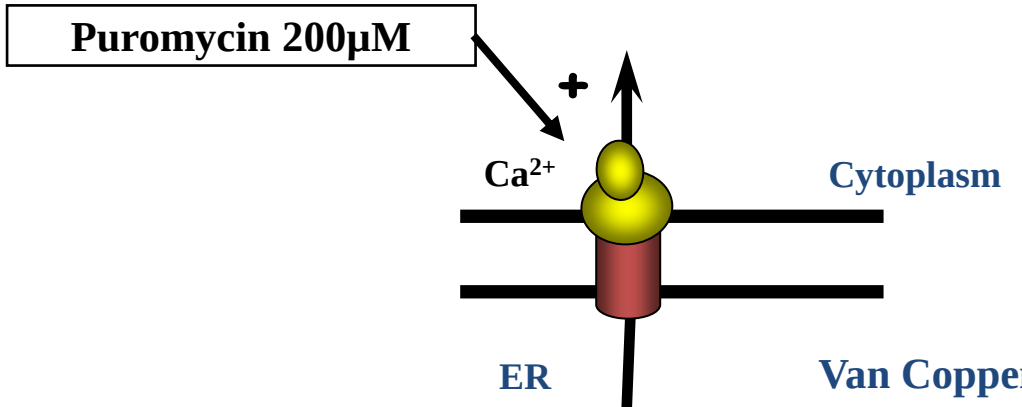


LNCaP cells (Human Lymph Node Cancer Prostate).
Mag Fluo 4 loaded cells.

Van Coppenolle *et al.*, J. Cell Science, 2004

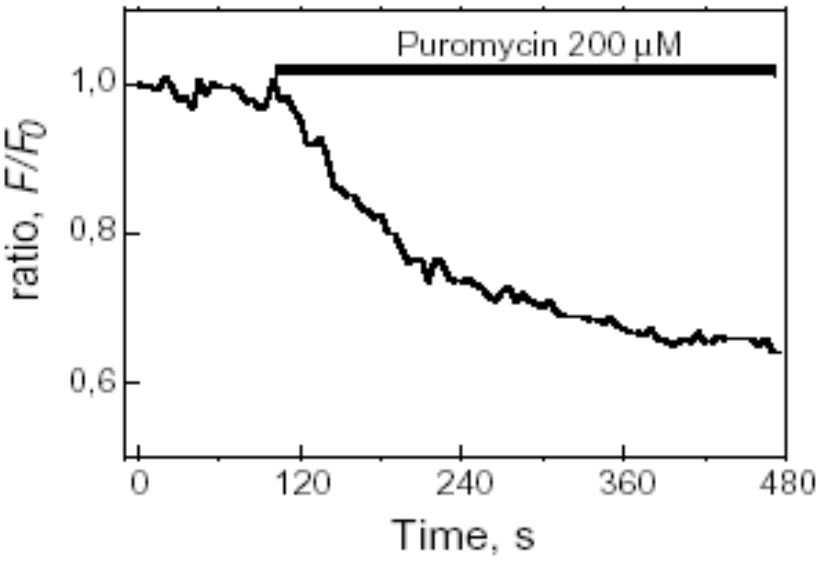
Translocon: a calcium leak channel

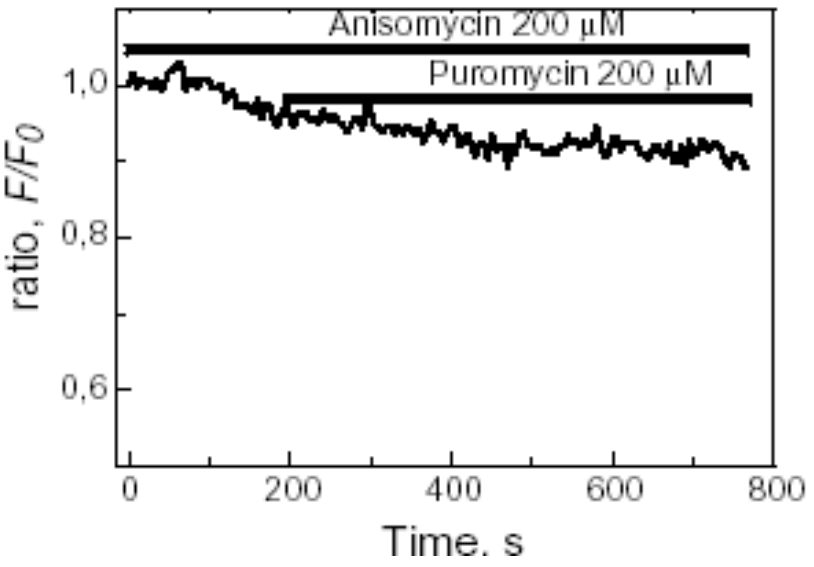




Van Coppenolle *et al.*, J. Cell Science, 2004

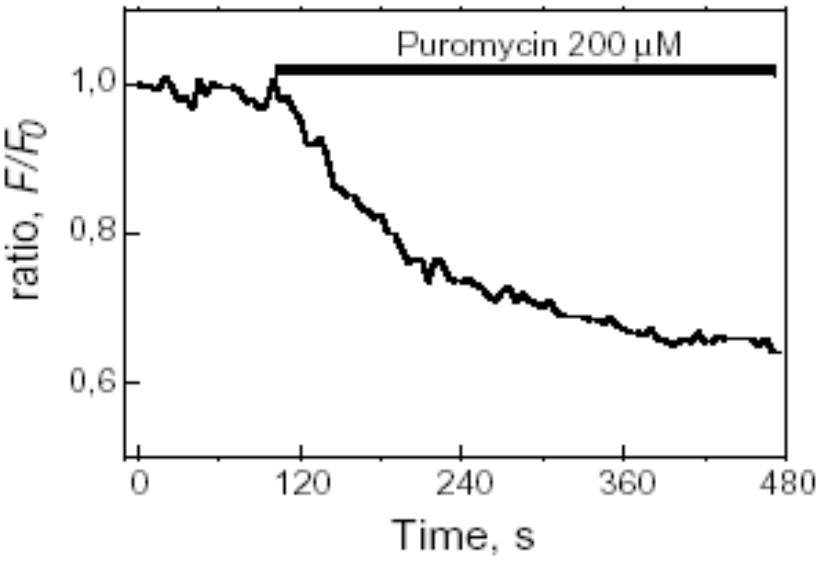
Translocon: a calcium leak channel

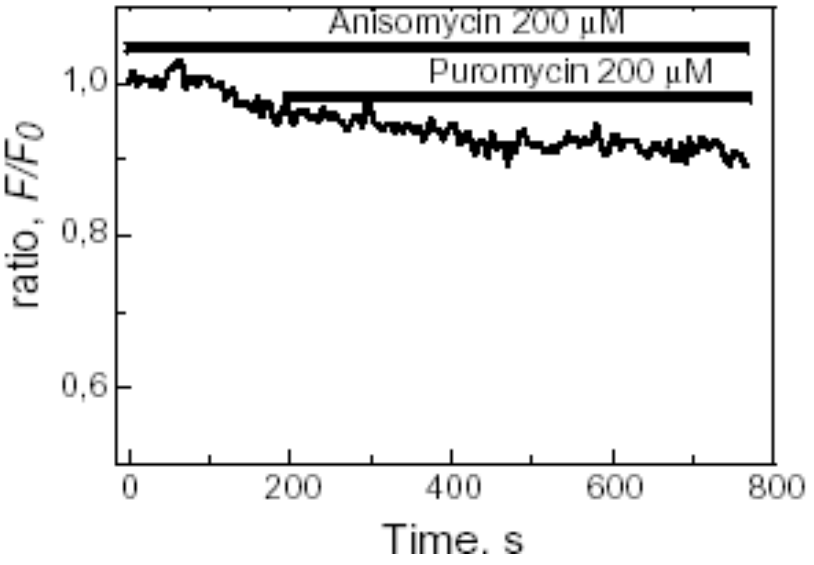


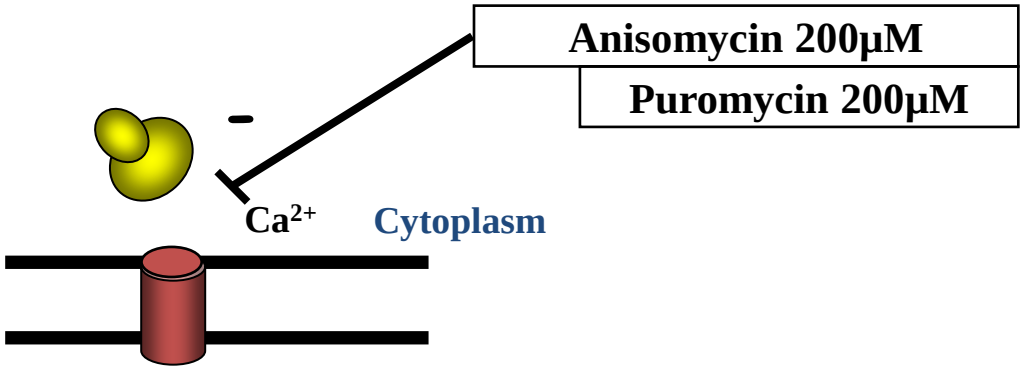


Van Coppenolle *et al.*, J. Cell Science, 2004

Translocon: a calcium leak channel

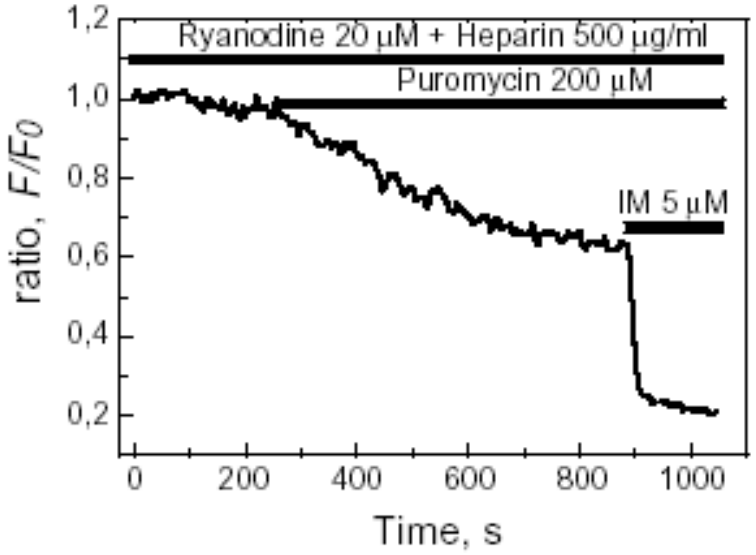


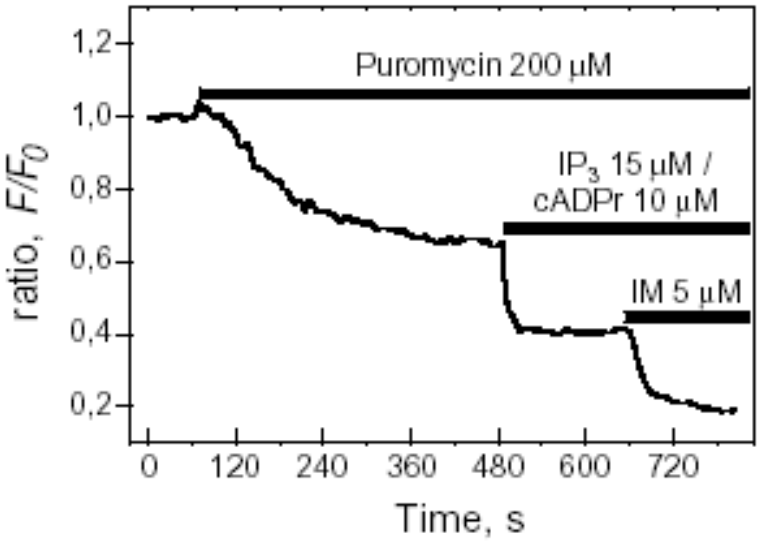




Van Coppenolle *et al.*, J. Cell Science, 2004

Activated *vs* basal calcium leak in the ER

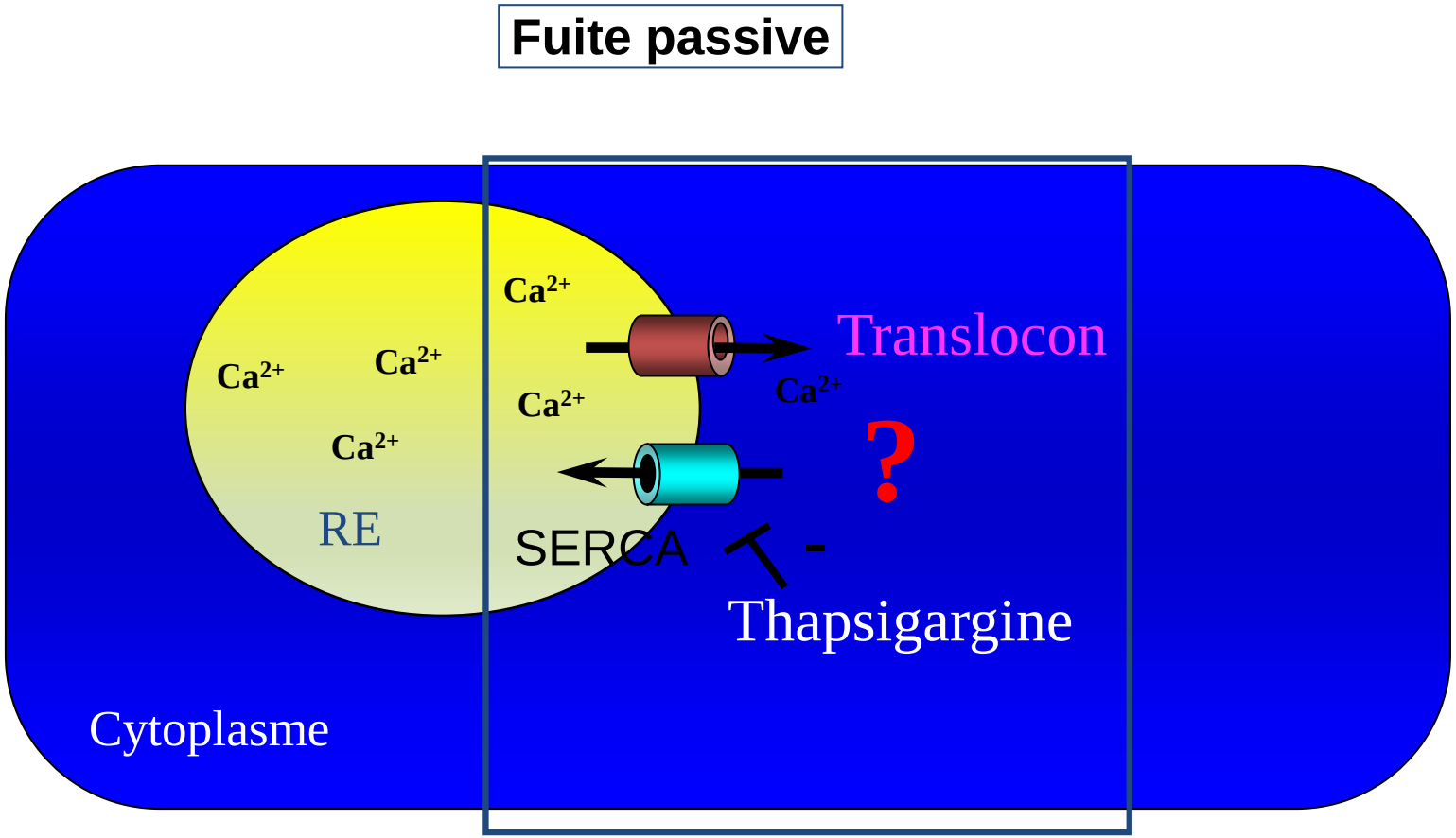




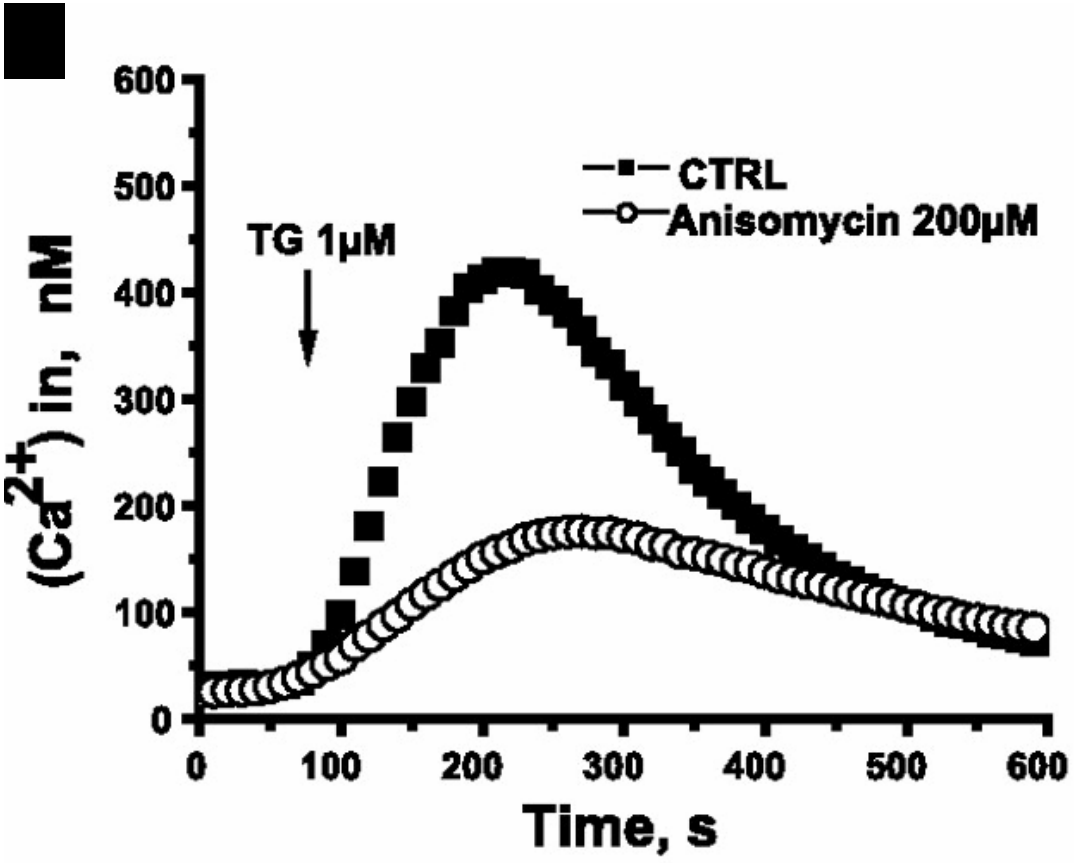
IP3R and RyR are not involved in puromycin-induced calcium leak.

Van Coppenolle *et al.*, J. Cell Science, 2004

Implication dans la réponse à la thapsigargine?



Implication dans le réponse à la thapsigargine?

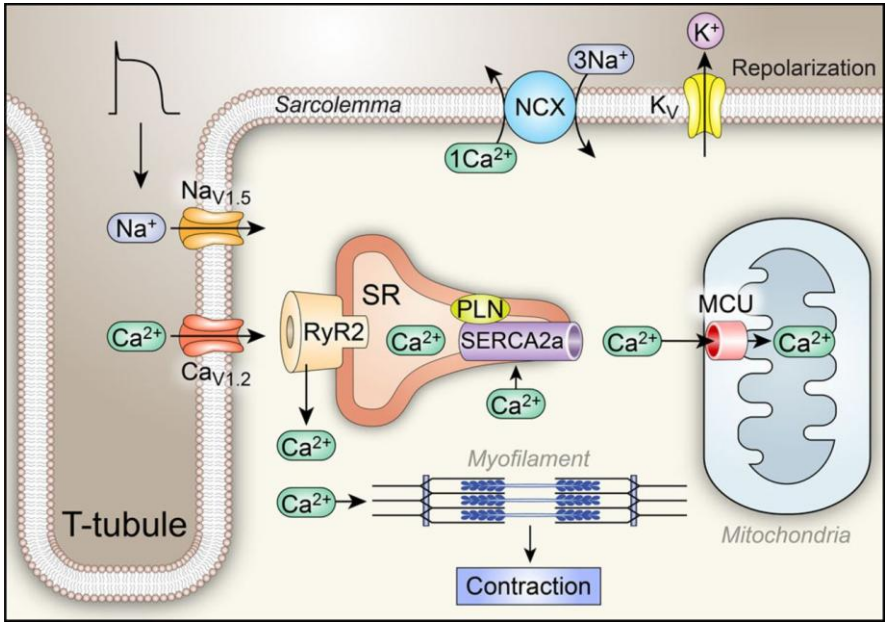


L'anisomycine réduit la vidange induite par la thapsigargine.
La « vidange Tg » transite par le translocon.

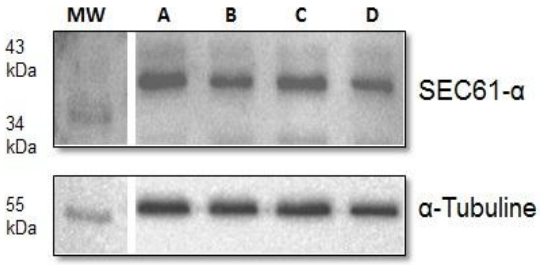
Flourakis *et al.*, Faseb J., 2006

Rôle du translocon dans la cardioprotection. (Ribal Al-Mawla)

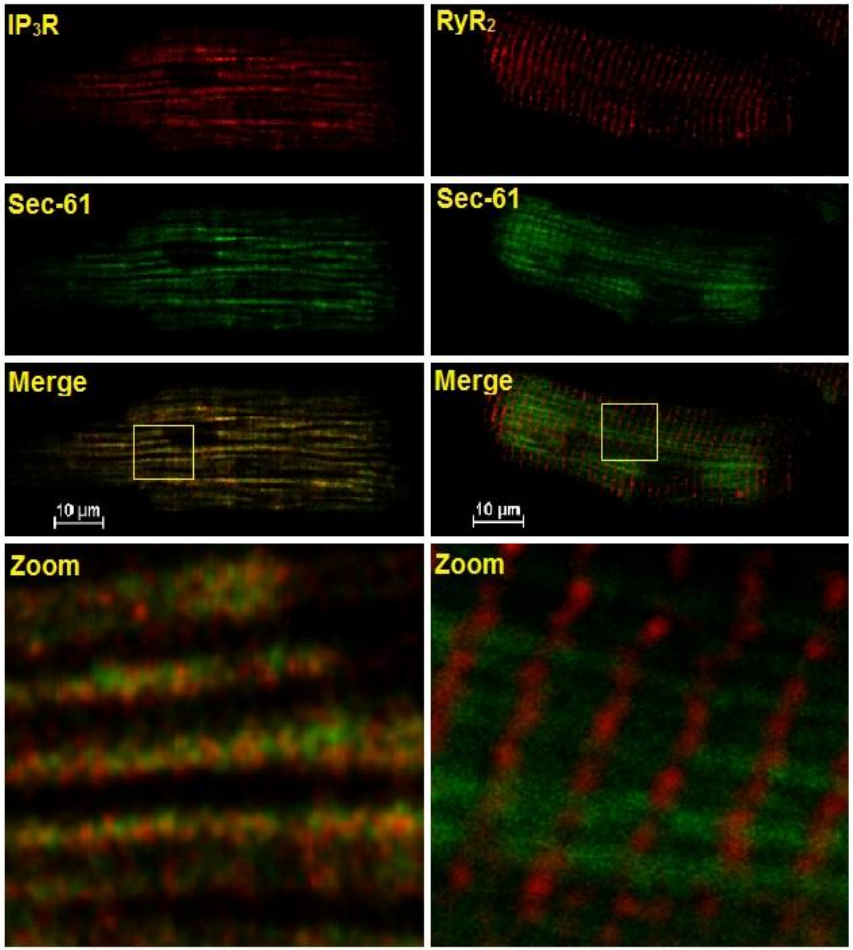
1- vérification de l'expression et de la localisation du TLC



A



B



Rôle du translocon dans la cardioprotection. (Ribal Al-Mawla)

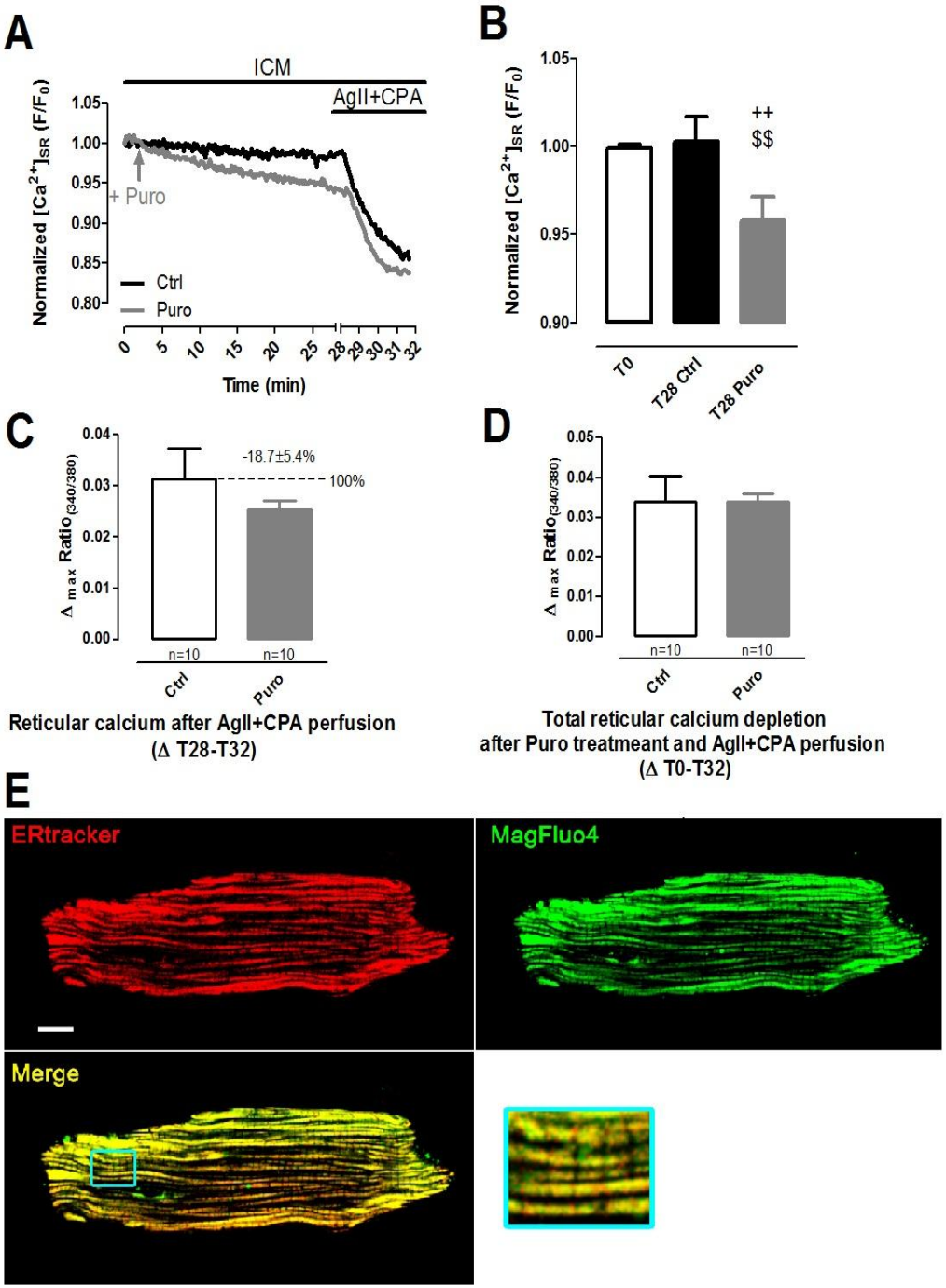
ICM: intracelllar medium.

AgII: angiotensine 2

CPA: Acide cyclopiazonique; inhibiteur SERCA

Puro: puromycine (maintien du TLC ouvert).

Conclusion: le pré-traitement puro diminue les stocks calciques intracellulaires.



Rôle du translocon dans la cardioprotection. (Ribal Al-Mawla)

A-C: Ionomycin: ionophore calcique.

Pas d'effets significatifs des pré-traitements Puro+/- émétine (bloqueur TLC) sur le contenu Global des stocks calciques (réticulum+mito).

D-F: CFB (Ca2+ free buffer). FCCP (inhibiteur Mito).

PréT Puro: Baisse du calcium mito.

G-I: Caféine: Activateur des RyRs.

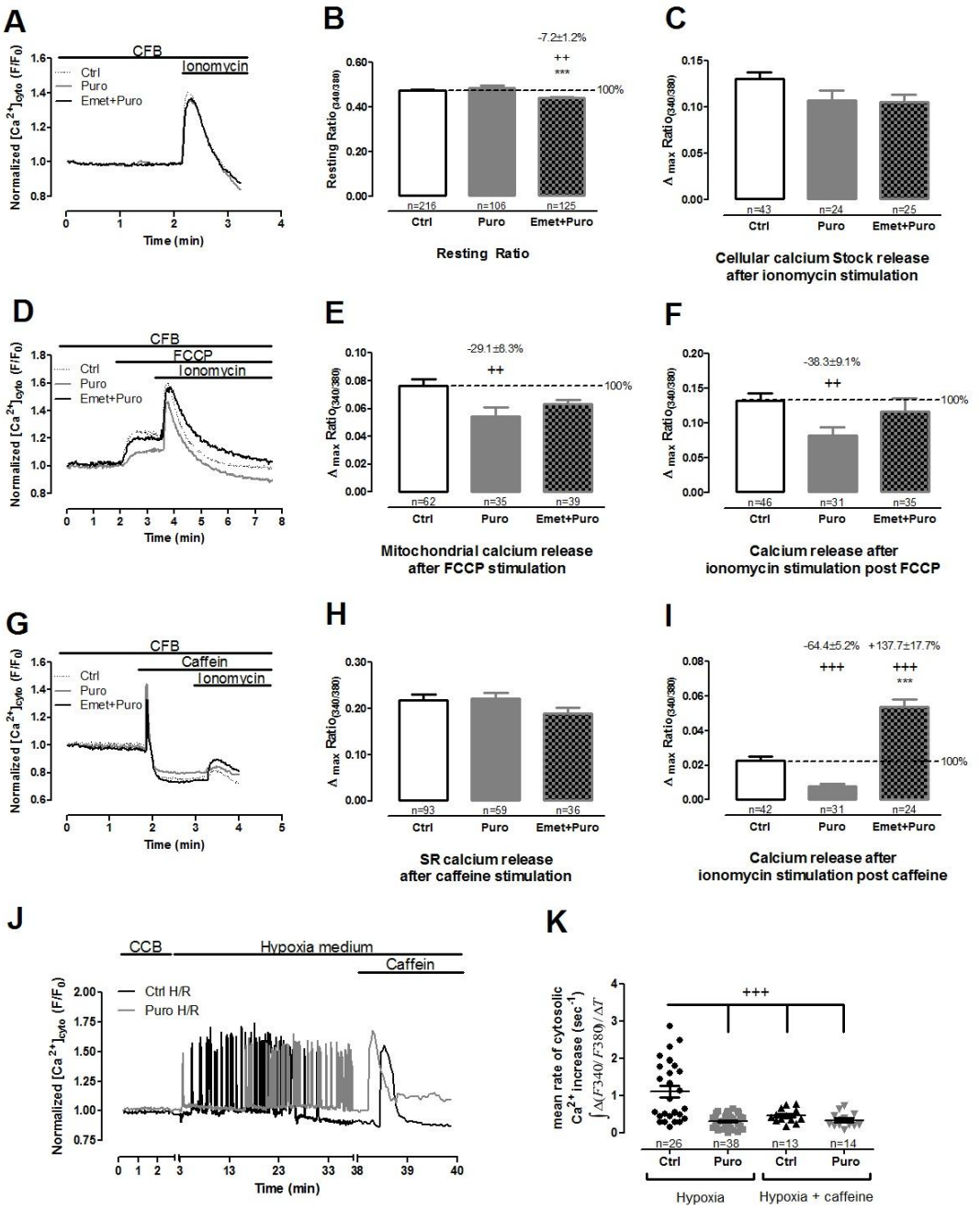
Pas d'effets des préT Puro+/-émétine sur le stock Calcique caféine sensible.

PréT puro: forte baisse du Ca2+ restant.

PréT puro+émétine: forte hausse du Ca2+ restant. D'où action sur autre stock réticulaire et/ou stock IP 3 sensible.

J-K: CCB (Ca2+ containing buffer).

PréT Puro: baisse des oscillations calciques lors de l'hypoxie; pas d'effets sur le stock caféine-sensible (RyRs).

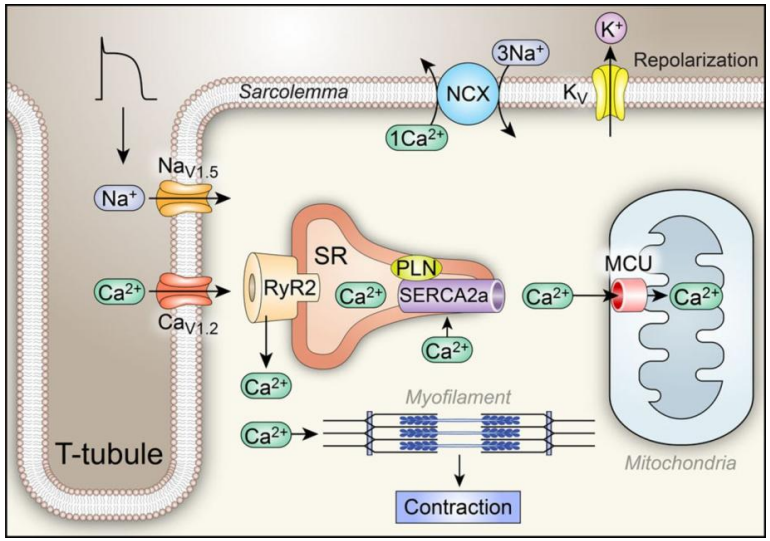


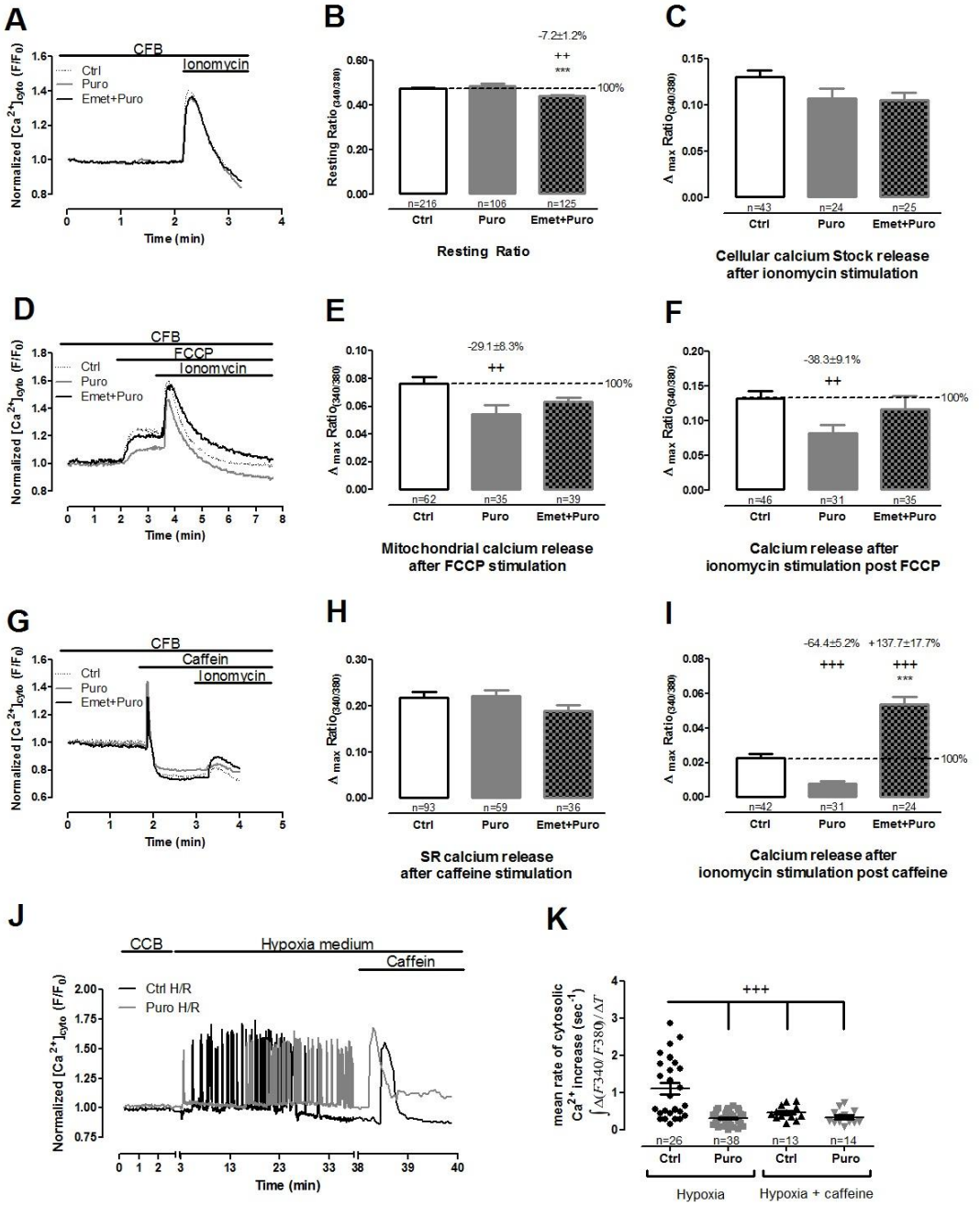
Rôle du translocon dans la cardioprotection. (Ribal Al-Mawla)

Existence probable de deux stocks calciques réticulaires

- Réticulum jonctionnel (RyRs, caféine-sensible)

- Réticulum longitudinal (R-IP_3) insensible à la caféine.

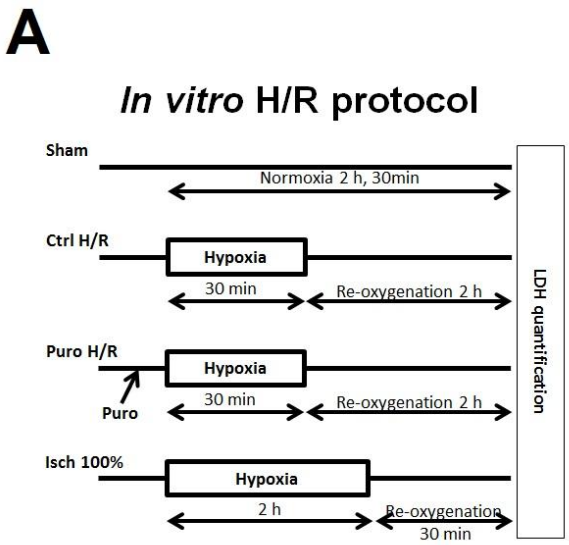


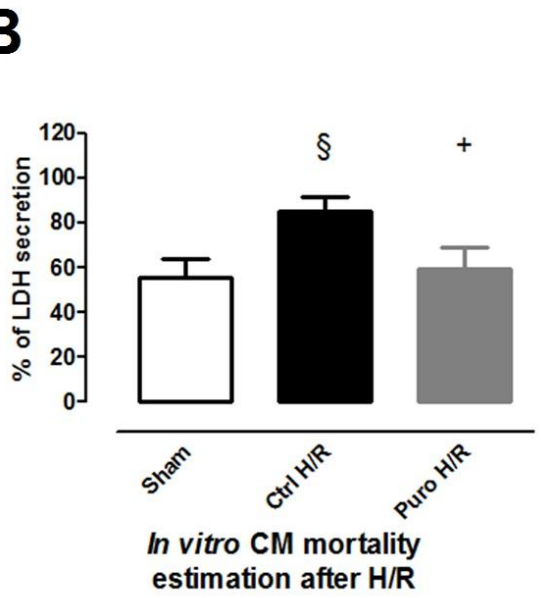


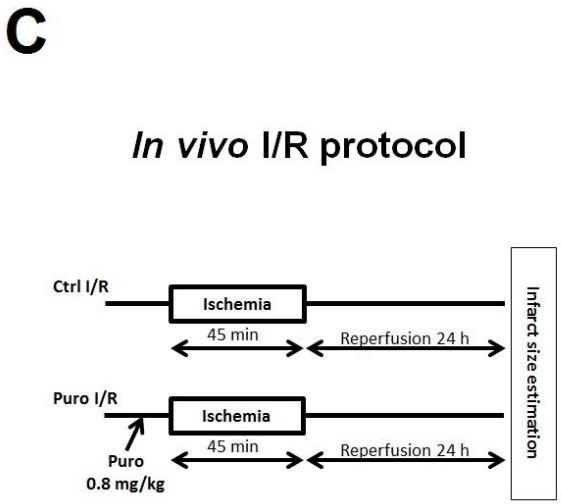
Rôle du translocon dans la cardioprotection. (Ribal Al-Mawla)

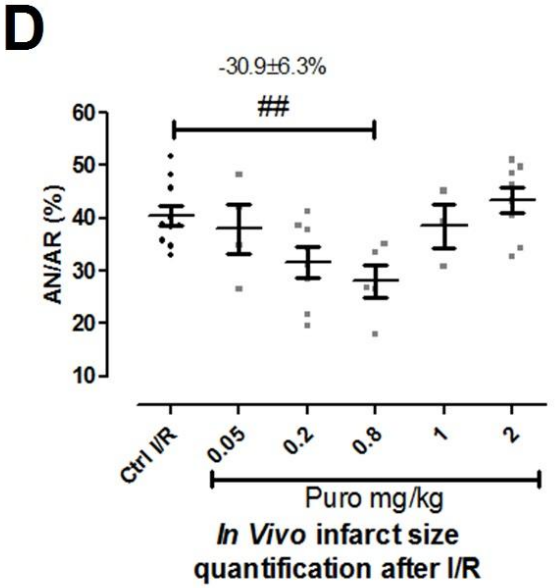
Le pré-conditionnement à la puromycine réduit la mortalité cellulaire induit par l'hypoxie-réoxygénation.

Le pré-conditionnement à la puromycine réduit la taille de l'infarctus induit par le protocole d'ischémie-reperfusion.









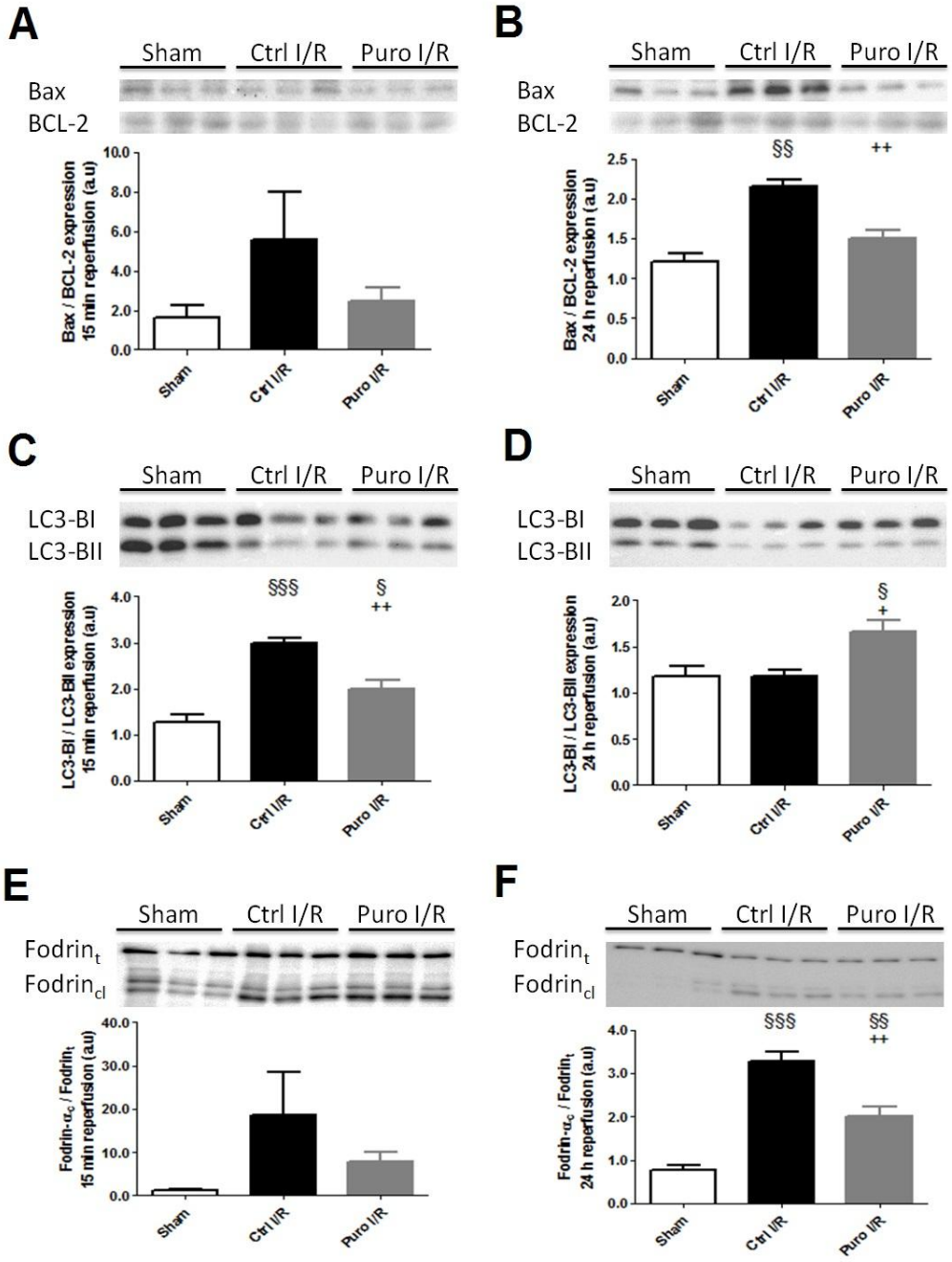
Rôle du translocon dans la cardioprotection. (Ribal Al-Mawla)

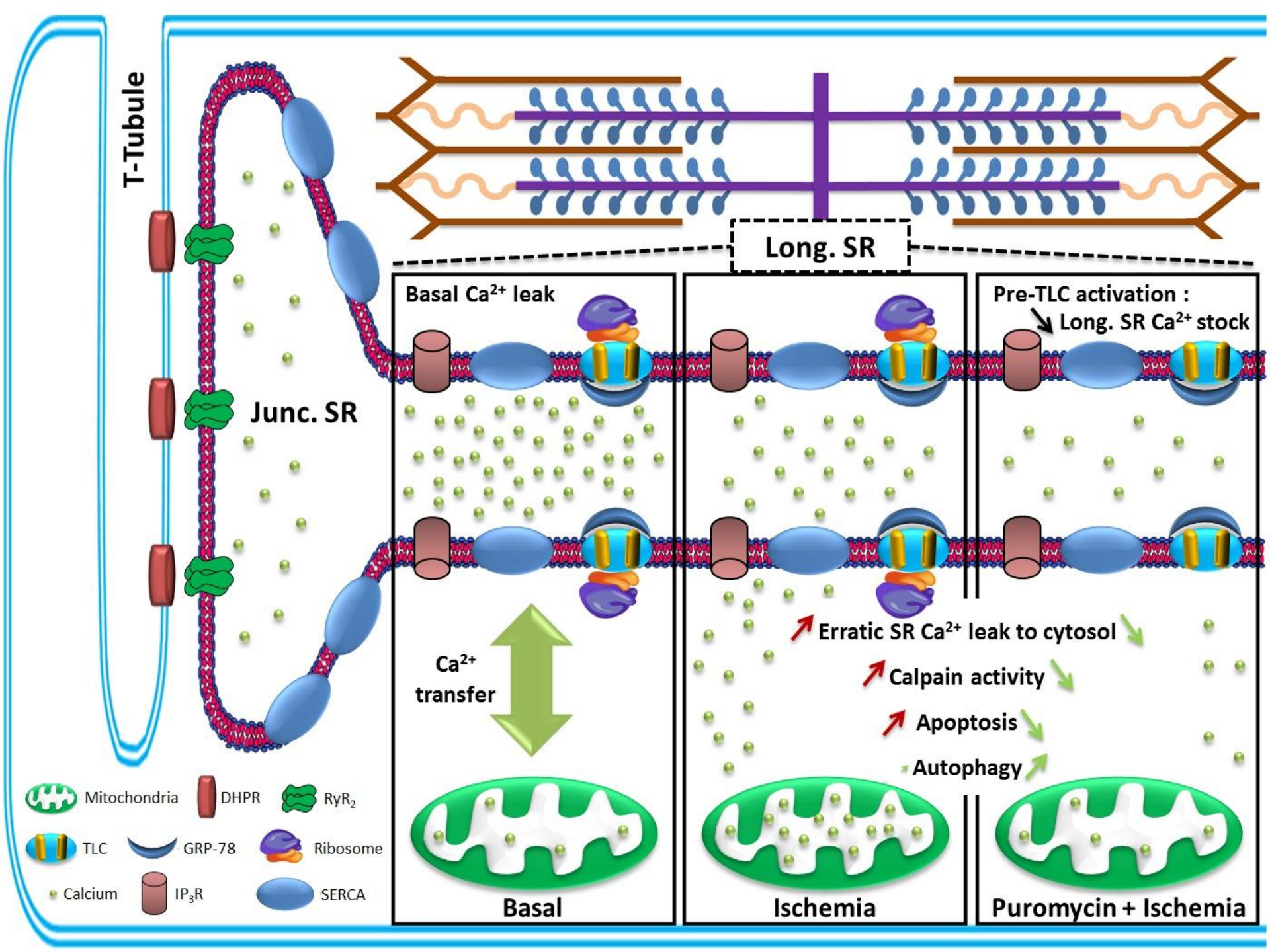
Mesures réalisées à partir de ventricules de souris.

Effets de l'ischémie-reperfusion (I/R):

- Induction de l'apoptose.
- Hausse de l'autophagie à court-terme.
- Activation des calpaïnes (cf Fodrin).

Le pré-conditionnement à la puromycine réduit l'apoptose induite par l'I/R et favorise l'autophagie à long terme (réparation cellulaire).




T-Tubule
Junc. SR
Long. SR
Basal Ca2+ leak
Pre-TLC activation :
Long. SR Ca2+ stock
Ca2+
transfer
Erratic SR Ca2+ leak to cytosol
Calpain activity
Apoptosis
Autophagy
Mitochondria
DHPR
RyR2
TLC
GRP-78
Ribosome
Calcium
IP3R
SERCA
Basal
Ischemia
Puromycin + Ischemia

Merci pour votre attention