

# MYOPATHIE DE DUCHENNE/BECKER : APPORT DE LA MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

Véronique VIÉ <sup>1,\*</sup>, Sarah AMEZIANE-LE HIR <sup>1,2</sup>,  
Gilles PABOEUF <sup>1</sup>, Céline RAGUÉNÈS-NICOL <sup>2</sup>

\* [vvie@univ-rennes1.fr](mailto:vvie@univ-rennes1.fr)

1. *Université de Rennes, CNRS, IPR Institut de Physique de Rennes - UMR 6251, Département Matière Molle, 35000 RENNES, France.*
2. *Université de Rennes, IGDR Institut de Génétique et Développement de Rennes – UMR 6290, équipe SIM, 35043 RENNES, France.*

## RESUME

Les myopathies de Duchenne et de Becker sont des maladies génétiques dégénératives causées par l'absence ou des mutations de la protéine musculaire appelée dystrophine. Cette protéine est indispensable au maintien de l'intégrité de la cellule musculaire lors des cycles d'élongation/contraction. Malgré de nombreuses connaissances au niveau clinique, la littérature livre peu d'informations sur les mécanismes moléculaires de l'activité de la dystrophine notamment concernant le très grand domaine central de cette protéine. Nous nous sommes intéressés aux possibles interactions entre ce domaine central et la membrane plasmique en utilisant des méthodes biochimiques et biophysiques basées sur des systèmes modèles membranaires et sur des fragments purifiés du domaine central de la dystrophine. Par une analyse systématique, nous avons mis en évidence des caractéristiques spécifiques à certains fragments tout le long de ce domaine central. Ils éclairent l'importance des interactions avec la membrane dans la préservation de l'édifice membrane/dystrophine lors de l'activité musculaire.

## MOTS CLES

**Dystrophine, monocouche de Langmuir, microscopie à force atomique**

## ABSTRACT

Duchenne and Becker's myopathies are degenerative genetic diseases caused by the absence or mutations of the muscular protein dystrophin. This protein is essential for maintaining the integrity of the muscular cell during elongation/contraction cycles. Despite a great amount of knowledge at the clinical level, the literature provides little information on the molecular mechanisms of dystrophin activity, particularly with regard to the very large central domain of this protein. We studied possible interactions between this central domain and the plasma membrane thanks to biochemical and biophysical methods using model membranes and purified fragments of the dystrophin central domain. Through systematic analysis, we identified fragment specific characteristics along this central domain. This enlightens the importance of interactions with the plasma membrane in order to preserve the membrane/dystrophin scaffold during muscular activity.

## KEY WORDS

**Dystrophin, Langmuir monolayer, Atomic Force Microscopy**

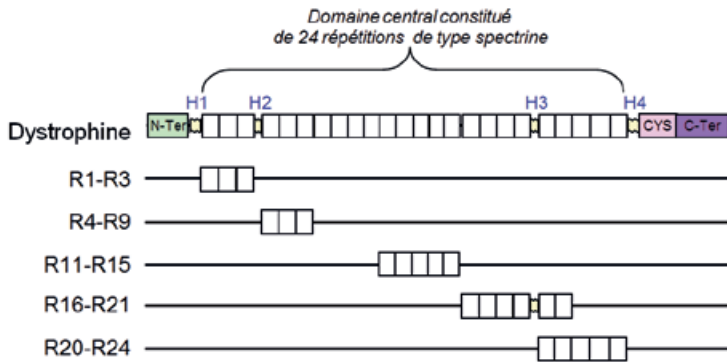
## INTRODUCTION

La dystrophine est une longue protéine filamenteuse (3685 acides aminés pour une longueur estimée à 175 nm) [1] qui connecte le cytosquelette et la matrice extracellulaire via la membrane plasmique sarcolemmale. Ce lien est indispensable au maintien de l'intégrité des cellules contractiles lors de l'activité musculaire c'est-à-dire lors des cycles de contractions/élongations [2, 3]. L'absence ou le dysfonctionnement lié à des mutations de cette protéine conduisent aux myopathies de Duchenne ou de Becker [4].

Cette protéine est constituée de quatre régions, le domaine N-terminal qui est connu pour se lier à l'actine fibrillaire du cytosquelette [1], le domaine central constitué de répétitions de type « spectrine », le domaine riche en cystéines qui est connecté à un complexe transmembranaire du  $\beta$ -dystroglycane, et le domaine C-terminal. Le domaine central correspond à 75 % de la protéine. Il est constitué de 24 répétitions « spectrin-like » (notées R) structurellement similaires, en faisceau de 3 hélices  $\alpha$ . Il peut se subdiviser en trois parties R1-3, R4-19, R20-24 séparées par des zones « charnières » non structurées [5]. La dystrophine fait partie du « cytosquelette membranaire » qui joue un rôle dans l'architecture et la résistance des cellules [6]. Mais la dystrophine, qui a de nombreux partenaires cellulaires, est également considérée comme une possible plateforme d'interactions [7]. Le domaine central peut notamment interagir avec l'actine F [8, 9], les microtubules [10] et la neuronal Nitric Oxide Synthase [11], l'oxyde nitrique produit étant impliqué dans la régulation de la réponse contractile [12]. À la fin des années 90, De Wolf et al. ont montré que la répétition 2 de la dystrophine interagit avec les lipides via des interactions électrostatiques et augmente la viscoélasticité de la membrane protégeant la membrane cellulaire des ruptures lors des cycles de contraction/élongation [13]. Cette étude réalisée sur un modèle simplifié de membranes a été prolongée par presque 15 ans de travaux de nos équipes, à l'Institut de Physique de Rennes et à l'Institut de Génétique et de Développement de Rennes, sur des fragments normaux ou mutés du domaine central de la dystrophine. En particulier, nous avons montré que des mutations dans la zone R16 à R21, qui correspondent à un tiers des patients souffrants de myopathie de Becker, conduisent à des protéines tronquées interagissant plus fortement avec la membrane [14].

Dans cet article, nous proposons d'illustrer l'utilisation de la microscopie à force atomique et plus largement des techniques dédiées aux études des interfaces

par les principaux résultats obtenus ces dernières années sur la détermination des interactions dystrophine/membrane plasmique. Les études ont porté sur 5 fragments couvrant l'ensemble du domaine central de la dystrophine (**Figure 1**). Les protéines recombinantes purifiées ont été étudiées en présence de films de Langmuir, monocouche de phospholipides, comme modèle membranaire. Les techniques de biophysique des interfaces associées à la microscopie à force atomique ont permis de montrer que l'interaction avec les phospholipides dépend de la position du fragment le long du domaine central.



**Figure 1** : Schéma de la structure en domaines de la dystrophine montrant le domaine N-terminal, le domaine central, le domaine riche en cystéines et le domaine C-terminal. Le domaine central est constitué de 24 régions (R1 à R24) organisées en faisceau de triple alpha-hélices comme la spectrine, et nommées « répétitions de type spectrine ». 4 charnières (H1 à H4) en enroulement aléatoire (random coil) sont réparties parmi les 24 répétitions de type spectrine. Les protéines étudiées, R1-3, R4-9, R11-15, R16-21 et R20-24 sont également schématisées.

## MATERIELS ET METHODES

Les lipides utilisés sont fournis par Avanti Polar Lipids (Alabama, US). Les autres produits chimiques proviennent de chez Sigma et les colonnes de chromatographie de chez GE healthcare.

### Expressions et purifications des protéines

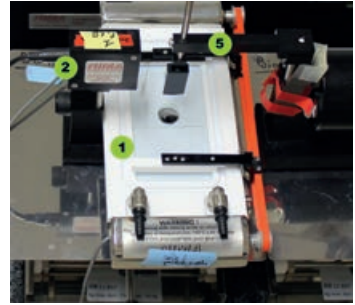
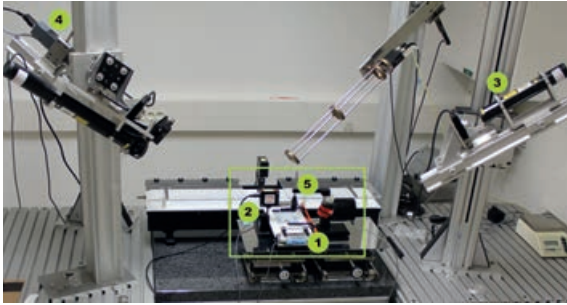
Les fragments de la dystrophine sont produits dans les cultures de *Escherichia coli* BL21. La protéine de fusion est la glutathion-S-transférase (GST), elle permet la purification par chromatographie d'affinité GSTrap™ (GE Healthcare) suivie par

chromatographie d'exclusion en taille après clivage enzymatique de la portion GST [15, 16, 17]. Tous les fragments sont solubilisés dans un tampon Tris 20 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; EDTA 0,1 mM, appelé par la suite TNE. Les concentrations en protéines sont déterminées par spectroscopie UV à 280 nm en utilisant les coefficients d'extinction molaire théoriques calculés à partir des séquences primaires.

## Comportement interfacial des protéines

Les expériences d'adsorption aux interfaces fluides air/liquide ou lipides/liquide permettent de caractériser soit les propriétés amphiphiles des protéines soit leurs interactions avec les lipides. La figure 2 présente respectivement des photographies (**2a** et **2b**) et schéma du dispositif de mesures (**2c**). Au centre, une cuve en Teflon® à barrières (**élément 1**) permet de former des films lipidiques c'est-à-dire des monocouches mimant un feuillet de la membrane biologique. La pression de surface de ce film est contrôlée par un tensiomètre (**élément 2**) selon la méthode de la lame de Wilhelmy. Une lame est légèrement plongée dans le liquide et connectée à un capteur de force qui mesure ainsi la tension superficielle. La pression de surface correspond à la différence entre la tension superficielle du tampon et celle de la couche superficielle de tensioactifs. Ce tensiomètre (Nima Technology, Cambridge) enregistre la pression de surface ( $\pi$ , mN/m) au cours du temps (**Figure 2c**). L'incertitude de la mesure est de 0,5 mN/m. Simultanément, nous utilisons un ellipsomètre pour mesurer l'angle de déphasage ( $\Delta$ , °) d'un faisceau laser polarisé (**élément 3**) après sa réflexion sur la surface du liquide, et détecté grâce au photomultiplicateur (**élément 4**). L'incertitude de la mesure est de 0,5°. Au départ, sur le tampon, cet angle est nul ; au fur et à mesure que les molécules s'adsorbent à l'interface, l'angle augmente. Alors que la pression de surface est directement liée à la cohésion latérale des molécules qui s'accumulent à l'interface, l'angle ellipsométrique est lié à la quantité de matière localisée à l'interface. La variation de l'angle ellipsométrique  $\delta\Delta$  correspond donc à la variation de quantité de matière à l'interface (**Figure 2c**) [15].

Les propriétés amphiphiles des protéines ont été mesurées dans une cuve remplie de tampon TNE après injection sous les barrières d'un volume approprié de solution de protéines. Ce volume est calculé afin d'atteindre la concentration finale souhaitée. Pour mettre en évidence des interactions entre la protéine et les lipides, un film monomoléculaire de lipides est préalablement formé à la

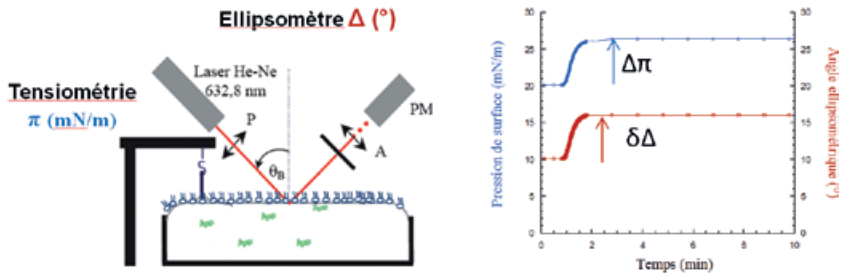


**Figure 2 :** 2a) Dispositif de mesures incluant la cuve de Langmuir (1), le tensiomètre à lame de Wilhelmy (2), la pince maintenant la lame de mica (5), les éléments de l'ellipsomètre (laser (3) et détecteur (4)).

**2b)** Agrandissement sur la cuve de Langmuir dont la surface est de 90 cm<sup>2</sup>.

surface du tampon par étalement d'une solution chloroformique de lipides. Cette monocouche modélise le feuillet interne de la membrane plasmique qui est à l'état fluide et porte des charges négatives [18]. Ainsi notre mélange est composé de dioleoylphosphatidyl choline (DOPC) et dioleoylphosphatidyl serine (DOPS) en ratio molaire 1:1. La pression de surface initiale dépend de la quantité de lipides déposée, elle est notée  $\pi_i$ .

Après injection de la protéine dans la sous-phase, en présence ou non de lipides à l'interface, la cinétique d'adsorption est enregistrée jusqu'à stabilisation. On note alors  $\pi_{max}$  la pression de surface à l'équilibre.  $\Delta\pi$  correspond à la variation de la pression de surface lors de l'adsorption ( $\pi_{max} - \pi_i$ , **Figure 2c**). Les variations de pression indiquent une insertion de la protéine entre les lipides et révèlent la



**2c)** Schéma de principe des mesures et exemple de cinétique d'absorption de protéines dans un film monomoléculaire de lipides,  $\Delta\pi$  étant la variation de pression induite par l'insertion de la protéine et  $\delta\Delta$  la variation de l'angle ellipsométrique.

présence d'interactions hydrophobes entre les fragments et les lipides. Par ailleurs, puisque la compacité des lipides peut varier *in vivo* lors des cycles de contraction/élongation de la cellule musculaire, nous avons fait varier la pression initiale des lipides sur une gamme de 10 à 35 mN/m pour détecter la pression initiale des lipides à laquelle aucune insertion de la protéine n'est possible. Après traitement mathématique des points expérimentaux (régression linéaire de droite affine), on obtient cette valeur de pression initiale qui est appelée pression maximale d'insertion, et est notée  $\pi_{IM}$ . Les expériences ont été réalisées au minimum deux fois pour chaque pression.

## Imagerie par microscopie à force atomique

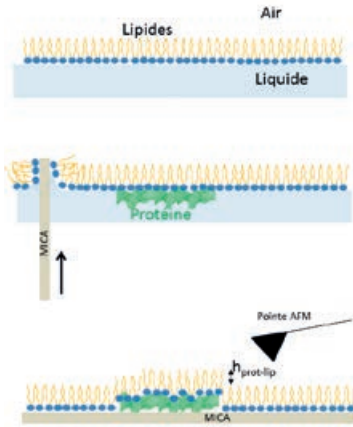
### **Généralités :**

La microscopie à force atomique (AFM) a été développée fin des années 80 après l'invention du microscope à effet tunnel en 1981 par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer ce qui leur a valu l'obtention du prix Nobel de physique en 1986. Cette microscopie permet d'obtenir la topographie d'échantillons à l'air ou en milieu liquide, à très haute résolution, atomique sur les matériaux cristallins ou moléculaire pour les échantillons biologiques [19, 20, 21].

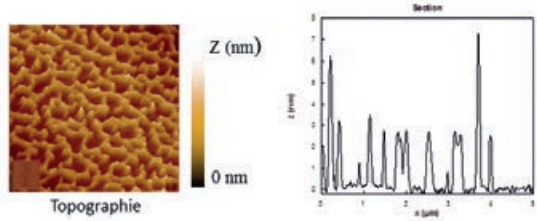
L'acquisition d'une image est réalisée en balayant la surface, ligne par ligne, à l'aide d'une pointe effilée positionnée au bout d'un microlevier sur lequel se réfléchit un faisceau laser. Suivant les forces inter-atomiques mises en jeu entre la pointe et l'échantillon, le levier fléchit déviant ainsi le faisceau laser. Par le suivi du mouvement de ce faisceau, les variations verticales sont enregistrées. Après plusieurs balayages, une image tri-dimensionnelle de la surface est générée. L'échelle de couleur associée aux images est directement liée à l'échelle en z (**Figure 3b**). Il est alors possible de tracer une section afin d'obtenir les variations de hauteur à n'importe quel endroit de l'image (**Figure 3b**).

### **Préparation des échantillons :**

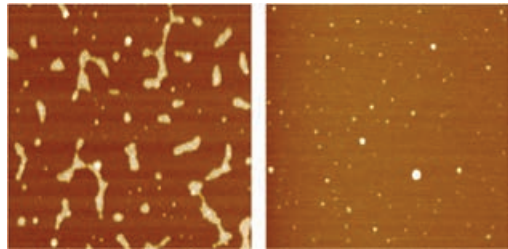
A la fin de chaque cinétique d'adsorption, le film interfacial est transféré sur une lame de mica fraîchement clivée, par la méthode de Langmuir-Blodgett (**Figure 3a**). La lame est pincée sur un support (**élément 5, Figure 2**) dont les mouvements verticaux sont contrôlés par un moteur pas à pas. L'imagerie haute résolution est



**Figure 3 :** 3a) Schéma de principe de l'absorption de protéines sous un film monomoléculaire de lipides étalés à l'interface liquide/air, et du prélèvement Langmuir-Blodgett sur une lame de mica.



**3b)** Image tridimensionnelle obtenue par microscopie à force atomique d'un échantillon de R11-15 adsorbée sur un film de lipides DOPC/DOPS à pression initiale de 20mN/m, taille de l'image 500nm\*500nm. L'image en insert montre l'homogénéité de la préparation sur une image de 5µm\*5µm.



**3c)** Images de microscopie à force atomique du fragment R4-9 en interaction avec un film DOPS/DOPS à pression initiale de 20mN/m (gauche) et de 30mN/m (droite). Image de 5µm\*5µm, échelle en Z est égale à 10nm.

effectuée en utilisant un microscope PicoPlus (Agilent Technologies, Phoenix, AZ) équipé d'un scanner (déplacement maximum 10 µm). Les images sont acquises en mode contact, sur plusieurs zones de l'échantillon et sur au minimum deux échantillons différents. La force d'interaction pointe-échantillon est contrôlée et minimisée en permanence afin de ne pas endommager l'échantillon. Les images présentées sont représentatives de l'ensemble des images obtenues sur plusieurs zones de deux échantillons identiques. Les caractéristiques morphologiques des objets de l'image sont obtenues après une analyse statistique des images avec le logiciel en libre accès Gwyddion 2.41 (<http://gwyddion.net>) [15]. Nous avons comparé l'organisation des fragments de la dystrophine humaine dans les films lipidiques de DOPC/DOPS à deux pressions initiales, 20 mN/m et 30mN/m.



## RESULTATS ET DISCUSSION

Dans un premier temps, le caractère amphiphile des protéines a été comparé en fonction de la pression de surface atteinte à l'équilibre lors de la cinétique d'absorption à l'interface liquide/air (**Tableau I**). Les fragments étudiés ne contiennent pas le même nombre de répétitions de type « spectrine » de faisceaux d'hélices  $\alpha$ . Il y en a 3 pour le fragment R1-3 [22], 5 pour les fragments R11-15 et R20-24 [17, 22] et 6 pour les fragments R4-9 et R16-21 [15]. Les pressions de surface maximales obtenues vont de 19,1 mN/m (pour R4-9 et R20-24) à 21 mN/m (pour R16-21), ce qui représente une faible variation malgré la différence de taille des protéines. Il n'y a pas de corrélation entre le nombre de répétitions présentes et la valeur de la pression de surface maximale induite par l'adsorption des protéines.

Fragments	Nombre de répétitions	% hélices $\alpha$	$\pi_{\max}$ (mN/m)
R1-3	3	80	20,3
R4-9	6	99	19,1
R11-15	5	71	20,4
R16-21	6	77	21,0
R20-24	5	91	19,1

**Tableau I** : Comparaison des propriétés interfaciales de différents fragments du domaine central de la dystrophine humaine.

Parmi tous les fragments étudiés, seul R16-21 contient une portion « charnière » qui n'est pas structurée, le taux global d'hélices  $\alpha$  est donc plus faible (77%). La comparaison avec R4-9 de même longueur ayant un plus fort taux d'hélices  $\alpha$  (99%) montre que R16-21 induit une plus forte augmentation de pression de surface ce qui signifie une plus forte cohésion latérale, protéine/protéine. Il semblerait donc que la charnière favorise une meilleure organisation de la protéine à l'interface.

D'ailleurs, les fragments qui ont les plus forts taux d'hélices  $\alpha$  (R4-9, 99% et R20-24, 91%) sont les fragments induisant les plus faibles pressions de surface maximale. Leur structuration en hélice  $\alpha$  persiste à l'interface liquide/air comme cela a été montré par mesures de spectroscopie infra-rouge de surface [22]. Il est donc probable que le repliement en faisceaux d'hélices  $\alpha$ , en induisant une protection des acides aminés hydrophobes du milieu aqueux, limite leur accessibilité à l'interface liquide/air et donc l'adsorption de ces protéines.

Dans un second temps, afin de détecter, de quantifier et de déterminer la nature des interactions entre les lipides et les fragments du domaine central de la dystrophine, des cinétiques d'adsorption des fragments sous une monocouche de lipides ont été réalisées.

À 20 mN/m de pression de surface initiale de la monocouche DOPC-DOPS, les variations induites par les fragments de dystrophine sont comprises entre 1 et 7 mN/m (**Tableau II**). L'insertion est la plus forte pour R1-3 (7 mN/m), le fragment le plus petit, ce qui facilite probablement sa mobilité et donc son insertion dans la partie hydrophobe du film lipidique. Pour les autres fragments de 5 ou 6 répétitions, il n'y a pas de corrélation entre la taille et la variation de pression de surface. R4-9 et R11-15 ont des valeurs intermédiaires (6 mN/m), alors que R16-21 présente une valeur légèrement plus faible (5 mN/m) et que R20-24 s'insère peu (1 mN/m). Les analyses des images réalisées par microscopie à force atomique (**Figure 3**) donnent un peu plus de renseignements sur l'organisation moléculaire des fragments dans les films lipidiques. En effet, deux types d'organisation apparaissent, tout d'abord certains fragments s'associent pour former des objets allongés, sorte de filaments, qui peuvent s'interconnecter pour former un réseau sur tout l'échantillon. Ceci est le cas pour les trois fragments centraux R4-9, R11-15 et R16-21. Les objets formés par R4-9 sont peu nombreux, majoritairement allongés, larges et hauts. En effet, la hauteur  $h_{\text{prot-lip}}$  des objets (plus clairs) au-dessus de la phase lipidique (zone sombre) est de  $3,3 \pm 0,2$  nm. R11-15 forme un réseau continu avec une hauteur  $h_{\text{prot-lip}}$  égale à  $1,2 \text{ nm} \pm 0,2 \text{ nm}$  et enfin R16-21 forme également des objets filamenteux mais

Fragments	Variation de pression de surface (mN/m)		$\pi_{\text{IM}}$ mN/m
	$\pi_i$ 20 mN/m	$\pi_i$ 30 mN/m	
R1-3	7	1	31
R4-9	6	0	30
R11-15	6	2	32
R16-21	5	-1	26
R20-24	1	0	nd(<30)

**Tableau II** : Comparaison des pressions de surface maximales ( $\Delta\pi$ , mN/m) induites par l'adsorption des fragments de la dystrophine sur une monocouche DOPC-DOPS pour des pressions initiales  $\pi_i$  de 20 mN/m ou de 30 mN/m, et valeurs de pression maximale d'insertion  $\pi_{\text{IM}}$ .

isolés, nombreux et ayant une hauteur  $h_{\text{prot-lip}}$  de  $2,1\text{-}+0,2$  nm. Le deuxième type d'organisation est la présence d'objets globulaires isolés. C'est le cas de R1-3 et R20-24 qui ont pourtant des affinités avec le film lipidique totalement opposées. R1-3 forme des objets arrondis très nombreux et de faible hauteur ( $h_{\text{prot-lip}} = 1,0\text{-}+0,2\text{nm}$ ) alors que les images AFM de R20-24 montrent des objets peu nombreux et plus hauts ( $h_{\text{prot-lip}} = 3,0\text{-}+0,2\text{nm}$ ). La hauteur mesurée entre le film lipidique et la protéine est d'autant plus faible que la protéine est profondément insérée. Ainsi, les fragments peuvent être classés en deux catégories, ceux apparaissant avec une hauteur inférieure à 2 nm, R1-3, R11-15 et R16-21, et ceux dont les hauteurs sont supérieures, R4-9 et R20-24. Mais la capacité d'insertion n'est pas liée à la forme des objets, globulaire pour R1-3 ou sous forme de filaments/réseau pour R4-9, R11-15 et R16-21. Cela montre que R1-3 est capable de s'insérer sous forme de molécules isolées alors que pour les 3 autres fragments des interactions longues distances protéines/protéines apparaissent. Il est intéressant de remarquer qu'à cette pression initiale des lipides, les hauteurs plus élevées des protéines peuvent être reliées à un paramètre structural qui est le pourcentage d'hélice  $\alpha$ , c'est le cas pour R4-9 et R20-24, la variation de pression induite par la protéine est alors reliée au nombre d'objets sur l'échantillon.

À 30 mN/m de pression de surface initiale du film lipidique, les fragments de dystrophine étudiés réagissent très différemment. R1-3 et R20-24 n'induisent aucune variation de la pression de surface, indiquant qu'aucune insertion de protéine n'a lieu dans la monocouche de lipides. Cependant, par mesures de spectroscopie infra-rouge de surface et par microscopie à force atomique, il a été démontré que R20-24 s'accumule en sous-phase et est capable de réorienter les têtes polaires des lipides lors d'une compression latérale du film à l'interface [22]. Les objets observés par AFM sont globulaires et ont une forte hétérogénéité en hauteur ( $h_{\text{prot-lip}} > 3,1\text{-}+0,6\text{nm}$ ) ce qui est cohérent avec une insertion peu efficace. R4-9 augmente légèrement la pression de surface, donc présente peu d'interactions latérales avec les lipides, ce qui rejoint les observations des images, il y a peu d'objets et ils sont globulaires. R11-15 est le fragment qui à cette pression initiale, induit la plus forte augmentation de 2 mN/m et les images montrent un réseau légèrement plus haut qu'à 20mN/m, ce qui signifie que les objets sont légèrement moins ancrés dans la membrane. Le fragment R16-21, quant à lui, diminue la pression de surface des lipides. Cela indique une réorganisation de la monocouche via une forte interaction avec les têtes polaires ce qui empêche la protéine R16-21 de pénétrer dans la

monocouche lipidique, en effet les fragments apparaissent sous forme globulaire et très haut ( $h_{\text{prot-lip}} = 3,6 \pm 0,2 \text{ nm}$ ). Les mesures ellipsométriques corroborent cette information puisque l'angle  $\Delta$  est de  $0,6^\circ$  et proche de la valeur de R11-15 attestant d'un cumul de matière à l'interface (**Tableau III**). Finalement, pour cette forte pression latérale, pression correspondant à la pression des membranes biologiques, seul le fragment R11-15 s'insère et forme un réseau, sa capacité à former des interactions intermoléculaires n'est pas altérée par l'augmentation de la pression latérale. Les autres interagissent peu ou pas avec les têtes polaires négatives des lipides et forment des objets globulaires hétérogènes en hauteur.

Fragments	Variation de pression de surface (mN/m)	
	$\pi_i$ 20 mN/m	$\pi_i$ 30 mN/m
R11-15	1,8	0,5
R16-21	1,2	0,6

**Tableau III** : Comparaison des variations d'angle ellipsométrique ( $\delta\Delta$ , °) induites par l'adsorption des fragments de la dystrophine sur une monocouche DOPC-DOPS pour des pressions initiales,  $\pi_i$ , de 20 mN/m et de 30 mN/m.

## CONCLUSION

Il apparait donc qu'entre le début et la fin du domaine central de la dystrophine, la variation de pression de surface induite diminue, constituant comme un gradient d'interaction avec les lipides et conduisant à une insertion de moins en moins forte des répétitions « spectrine » le long du domaine central. La comparaison entre ces fragments montre également l'importance de la flexibilité de la protéine, c'est-à-dire de la présence de parties non-structurées en hélice  $\alpha$ , qui facilitent l'ancrage et les interactions protéines/protéines sous forme de filaments. Seul le fragment R11-15 interagit avec les lipides encore fortement à 30 mN/m. Sachant que ce fragment interagit également avec les fibres d'actine du cytosquelette, l'interaction à la membrane semble être un élément important dans la fonction de ce fragment. L'hypothèse qui semble émerger de ces recherches est la suivante : la partie N-terminale lie l'actine, les premières répétitions du domaine central s'insèrent dans

la membrane jusqu'à R11-15 qui se lie également à l'actine et dont l'interaction à la membrane résiste aux contraintes latérales des lipides. Ensuite les interactions avec la membrane se font moins importantes vers l'extrémité C-terminale de la protéine qui s'associe avec le complexe protéique transmembranaire du  $\beta$ -dystroglycane. Ainsi, le lien entre les fibres d'actine et la membrane lors des cycles de contraction/élongation induisant des repliements et des variations locales de pression latérale est favorisé du côté N-terminal, alors que des interactions plus ténues vers le C-terminal pourraient permettre une adaptabilité de la protéine afin de favoriser le lien avec le complexe  $\beta$ -dystroglycane.

Le couplage d'expériences aux interfaces permet l'évaluation des interactions protéines/membrane dans une large gamme de conditions (pression latérale, nature des lipides,...) et conduit ainsi à une estimation *in vitro* de la fonctionnalité des fragments de la dystrophine. L'impact de cette recherche fondamentale est de réduire le nombre de protéines à tester *in vivo* pour restaurer les fonctions musculaires.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'Association Française contre les Myopathies pour sa contribution au financement de ces travaux, ainsi que les plateformes Biosit et ScanMAT de l'Université de Rennes.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. KOENIG M., MONACO A.P. & KUNKEL L.M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* (1988), **53** (2): 219-226.
2. DECONINCK N. & DAN B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol* (2007), **36** (1): 1-7.
3. PONS F., et al. Isolated dystrophin molecules as seen by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990), **87** (20): 7851-7855.

4. KOENIG M., et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* (1989), **45**: 498-506.
5. LE RUMEUR E., WINDER S.J. & HUBERT J.F. Dystrophin: more than just the sum of its parts. *Biochim Biophys Acta* (2010), **1804** (9): 1713-1722.
6. ERVASTI J. & CAMPBELL K. A Role for the Dystrophin-Glycoprotein Complex as a Transmembrane Linker between Laminin and Actin. *J Cell Biol* (1993), **122**: 809-823.
7. ALLEN D.G., WHITEHEAD N.P. & FROEHNER S.C. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca<sup>2+</sup>, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev* (2016), **96** (1): 253-305.
8. RYBAKOVA I., et al. Dystrophin and utrophin bind actin through distinct modes of contact. *J Biol Chem* (2006), **281**: 9996-10001.
9. SARKIS J., et al. Resisting sarcolemmal rupture: dystrophin repeats increase membrane-actin stiffness. *FASEB J* (2013), **27** (1): 359-367.
10. BELANTO J.J., et al. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014), **111** (15): 5723-5728.
11. LAI Y., et al. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest* (2009), **119** (3): 624-635.
12. KOBZIK L., et al. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* (1994), **372** (6506): 546-548.
13. DEWOLF C., et al. Interaction of dystrophin fragments with model membranes. *Biophys J* (1997), **72** (6): 2599-2604.
14. AMEZIANE-LE HIR S., et al. Dystrophin Hot-Spot Mutants Leading to Becker Muscular Dystrophy Insert More Deeply into Membrane Models than the Native Protein. *Biochemistry* (2016), **55** (29): 4018-4026.
15. AMEZIANE-LE HIR S., et al. Cholesterol favors the anchorage of human dystrophin repeats 16 to 21 in membrane at physiological surface pressure. *Biochim Biophys Acta* (2014), **1838** (5): 1266-1273.
16. LEGARDINIER S., et al. Sub-domains of the dystrophin rod domain display contrasting lipid-binding and stability properties. *Biochim Biophys Acta* (2008), **1784** (4): 672-682.
17. SARKIS J., et al. Spectrin-like repeats 11-15 of human dystrophin show adaptations to a lipidic environment. *J Biol Chem* (2011), **286** (35): 30481-30491.
18. FIEHN W., et al. Lipids and fatty acids of sarcolemma, sarcoplasmic reticulum, and mitochondria from rat skeletal muscle. *J Biol Chem* (1971), **246** (18): 5617-5620.

19. GUYOMARC'H F., et al. Milk sphingomyelin domains in biomimetic membranes and the role of cholesterol: morphology and nanomechanical properties investigated using AFM and force spectroscopy. *Langmuir* (2014), **30** (22): 6516-6524.
20. MORRIS V.J., KIRBY A.R. & GUNNING A.P. *Atomic Force Microscopy for Biologists*. 2<sup>nd</sup> edition. IMPERIAL COLLEGE PRESS (2009).
21. RANGL M., et al. Real-time Visualization of Phospholipid Degradation by Outer Membrane Phospholipase A using High-Speed Atomic Force Microscopy. *J Mol Biol* (2017), **429** (7): 977-986.
22. VIE V., et al. Specific anchoring modes of two distinct dystrophin rod sub-domains interacting in phospholipid Langmuir films studied by atomic force microscopy and PM-IRRAS. *Biochim Biophys Acta* (2010), **1798** (8): 1503-1511.