

Université de Montréal

Implication du dystroglycan et des protéines associées dans le ciblage des canaux potassiques, Kir4.1, et des canaux aqueux, AQP4, au niveau des astrocytes

Par  
Eric Guadagno

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en Sciences Biologiques

Décembre 2003

© Eric Guadagno, 2003



QH

302

U54

2004

v. 004

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Implication du dystroglycan et des protéines associées dans le ciblage des canaux potassiques, Kir4.1, et des canaux aqueux, AQP4, au niveau des astrocytes

présenté par :  
Eric Guadagno

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Annie Angers

---

Président-rapporteur

Hakima Moukhles

---

Directrice de recherche

Josette Noël

---

Membre du jury

## Sommaire

L'homéostasie du potassium ( $K^+$ ) dans le système nerveux central (SNC) permet une activité neuronale normale. Cette homéostasie est assurée par les cellules gliales dont les prolongements adjacents aux synapses, aux vaisseaux sanguins et à l'humeur vitrée présentent un co-enrichissement en canaux potassiques à rectification entrante, Kir4.1 et en canaux aquaporines spécifiques à l'eau, AQP4. Les Kir4.1 transportent l'excès de  $K^+$  extracellulaire engendré par l'activité neuronale au niveau des synapses et le déversent dans la circulation sanguine et l'humeur vitrée, tandis que l'AQP4 permet de préserver l'osmolarité entre la cellule et son environnement. Nous avons effectué des études d'immunolocalisation des Kir4.1 et de l'AQP4 sur des cultures de cellules mixtes d'hippocampe, de cellules d'astrocytaires et de cellules de Müller. Les cultures mixtes ont permis de démontrer l'implication de la laminine-1, une protéine de la matrice extracellulaire, dans l'agrégation/stabilisation des Kir4.1 et de l'AQP4 au niveau des membranes des cellules gliales. Les cultures d'astrocytes nous ont permis de montrer que l'expression des Kir4.1 à la membrane plasmique des astrocytes dépendait de la présence de neurones et enfin avec les cellules de Müller, nous avons mis en évidence la nécessité de la séquence SNV située à l'extrémité C-terminale des Kir4.1 pour l'agrégation de ces canaux induite par la laminine. Cette agrégation implique le dystroglycan et d'autres membres du complexe protéique associé à la dystrophine (PAD). Nos résultats suggèrent que la liaison de la laminine au complexe PAD via l' $\alpha$ -dystroglycan soit impliquée dans le maintien de l'homéostasie du  $K^+$  et de l'eau dans le SNC. La perturbation de cette homéostasie pourrait contribuer à la pathogenèse des troubles fonctionnels du cerveau et de la rétine reflétés par des retards mentaux et des anomalies de l'activité rétinienne associés à certaines formes de dystrophies musculaires.

Mots clés : aquaporine, homéostasie, système nerveux central, agrégation, laminine, dystrophine, dystrobrevine.

## Summary

Potassium ( $K^+$ ) homeostasis is required for normal neuronal activity in the central nervous system (CNS). Glial cells are extremely important for  $K^+$  clearance. Their processes extending in the vicinity of synapses, around blood vessels and at the vitreous body are co-enriched for inwardly rectifying potassium channels, Kir4.1, and aquaporin water channels, AQP4. The Kir4.1 channels siphon the excess of  $K^+$  accumulated in the extracellular space at the synaptic cleft following neuronal activity and release it in blood vessels and in the vitreous body, while AQP4 functions to preserve osmolarity between the cell and its environment. We undertook immunolocalization studies of Kir4.1 and AQP4 on cultures of mixed hippocampal cells, of purified astrocytes and of Müller cells. The first system led us to demonstrate the implication of laminin-1, an extracellular matrix protein, in the clustering/stabilisation of Kir4.1 and AQP4 at glial cell membranes. The second system revealed that Kir4.1 expression at the plasma membrane of astrocytes requires neurones. With the third system, we showed the importance of the SNV sequence at the C-terminus of Kir4.1 in the laminin-induced clustering of these channels. This clustering involves dystroglycan and other members of the dystrophin associated protein complex (DAP). Our data suggest that the interaction of laminin with the DAP complex via its binding to  $\alpha$ -dystroglycan is implicated in  $K^+$  buffering and water homeostasis in the CNS. Impairment of  $K^+$  and water homeostasis may contribute to the pathogenesis of brain and retina dysfunctions reflected by mental retardation and abnormal retinal activity associated with some forms of muscular dystrophy.

Key words: aquaporin, homeostasis, central nervous system, clustering, laminin, syntrophin, dystrobrevin.

## Tables des matières

Sommaire	iii
Summary	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Listes des sigles et abréviations	xiii
Dédicace	xv
Remerciements	xvi
<b>I-Introduction</b>	<b>1</b>
1. La dystrophie musculaire	2
1.1 Les dystrophies musculaires classiques : Duchenne et Becker	2
1.2 La cause de la maladie	4
1.2.1 Le gène des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker	4
1.2.2 La dystrophine/utrophine : leurs domaines d'interactions	5
1.2.3 Interaction de la dystrophine avec l'actine	7
2. Le complexe de la dystrophine et de ses protéines associées	8
2.1 La description du complexe de protéines associées à la dystrophine	8
2.2 Le dystroglycan	10
2.2.1 Le $\beta$ -dystroglycan	12
2.2.1a L'interaction entre le $\beta$ -dystroglycan et la dystrophine/utrophine	12
2.2.1b Régulation de l'interaction du $\beta$ -dystroglycan avec ses partenaires par sa phosphorylation	12
2.2.1c Rôle du $\beta$ -dystroglycan dans l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine	14
2.2.1d Le clivage du $\beta$ -dystroglycan par les métalloprotéinases	14
2.2.2 L' $\alpha$ -dystroglycan	15

2.2.2a	Le rôle de l'interaction de l' $\alpha$ -dystroglycan avec les protéines de la matrice extracellulaire dans l'agrégation des AChRs	15
2.2.2b	Le rôle de l' $\alpha$ -dystroglycan dans l'inactivation synaptique des neurotransmetteurs	17
2.2.2c	Le rôle de l' $\alpha$ -dystroglycan dans la formation de la matrice extracellulaire	18
2.2.2d	L' $\alpha$ -dystroglycan et la neurexine dans le cerveau	19
2.2.2e	L'implication du dystroglycan dans la dystrophie musculaire congénitale	20
2.2.2f	Le rôle du dystroglycan dans la rétine	24
2.2.2g	Un rôle de l' $\alpha$ -dystroglycan dans la polarité des cellules épithéliales et la communication cellulaire	24
2.2.2h	Un rôle de l' $\alpha$ -dystroglycan dans le système nerveux périphérique	25
2.2.2i	L' $\alpha$ -dystroglycan : une porte d'entrée cellulaire pour des agents pathogènes	25
2.3	Les sarcoglycans	26
2.3.1	Les sarcoglycanopathies : dystrophies musculaires congénitales	26
2.3.2	Les sarcoglycans sont importants dans la stabilisation du dystroglycan et de la dystrophine à la membrane	27
2.4	La dystrobrevine	28
2.4.1	Les isoformes de la dystrobrevine et leur expression tissulaire différentielle	28
2.4.2	La dystrobrevine se lie au complexe des protéines associées à la dystrophine et peut être associée à une myopathie	29
2.4.3	La fonction de la dystrobrevine est régulée par sa phosphorylation	30
2.5	La syntrophine	30
2.5.1	Les isoformes de la syntrophine et leur expression tissulaire différentielle	30



2.5.2	La syntrophine et ses domaines fonctionnels	31
2.5.3	Les syntrophines interagissent avec des protéines de signalisation et des canaux ioniques	32
2.5.4	Une déficience en $\beta$ -syntrophine est impliquée dans des myopathies humaines	32
3.	Homéostasie de l'eau et du potassium dans le système nerveux central : relation possible avec le complexe PAD	33
3.1	L'aquaporine-4	33
3.1.1	L'aquaporine-4 : description et expression tissulaire différentielle	33
3.1.2	L'aquaporine-4 dans le muscle	33
3.1.3	L'aquaporine-4 dans le cerveau	34
3.1.4	Une diminution de l'expression d'aquaporine-4 dans le cerveau perturbe la barrière hémato-encéphalique	34
3.1.5	L'absence d'aquaporine-4 chez des souris mutantes pour la dystrophine prévient le développement de l'œdème cérébral	35
3.2	Les canaux potassiques à rectification entrante : Kir4.1	36
3.2.1	L'importance de l'homéostasie des ions potassiques dans le cerveau et la rétine	36
3.2.2	Les Kir4.1 sont concentrés au niveau de la membrane plasmique des cellules gliales	36
3.2.3	Les Kir4.1 interagissent avec des protéines possédant des domaines PDZ	37
4.	Objectifs de l'étude	38
<b>II-Articles</b>		<b>40</b>
Premier Article		41
Abstract		43
Introduction		44
Materials and methods		46
Results		49
Discussion		54

References	59
Figure Legends	65
Figures	68
Deuxième Article	76
Abstract	78
Materials and Methods	79
Figure Legends	83
Figures	86
<b>III- Discussion et conclusion générales</b>	<b>95</b>
1. Implication du dystroglycan dans la neuro-pathogenèse associée à certaines dystrophies musculaires	96
2. Expression de l'aquaporine-4 et des Kir4.1 dans le cerveau et la rétine	97
3. Agrégation de l'aquaporine-4 et des canaux Kir4.1 induite par la laminine-1 dans les cultures mixtes de cellules d'hippocampe	98
4. Agrégation de l'aquaporine-4 et des canaux Kir4.1 induite par la laminine-1 dans des cultures pures d'astrocytes et de cellules de Müller	100
5. Implication du motif SNV des canaux Kir4.1 dans leur agrégation induite par la laminine-1	102
6. La laminine endogène versus la laminine exogène	104
7. Implication de l'agrine dans l'agrégation de l'aquaporine-4 et des Kir4.1	105
8. Rôle des PADs dans l'homéostasie du potassium et de l'eau dans le cerveau	106
9- Perspectives	107
<b>IV- Références de l'introduction et de la discussion</b>	<b>109</b>
<b>Appendices</b>	<b>xvii</b>

## Liste des tableaux

### I-Introduction

Tableau I. Classification des domaines WW basée sur la spécificité optimale des ligands	6
Tableau II. Résumé des différents complexes PAD retrouvés dans le cerveau	10
Tableau III Patron d'expression du dystroglycan chez les mammifères	11
Tableau IV Dystrophies musculaires secondaires à des mutations dans des gènes qui codent pour des glycosyltransférases	22
Tableau V Différentes dystrophies musculaires : positions et produits de leurs gènes	27

## Liste des figures

### I-Introduction

- Figure 1. Courbe de distribution standard du Q.I. de la population normale et des patients atteints de DMD 2
- Figure 2. Position des différents promoteurs du gène de la dystrophine et localisation tissulaire des isoformes de la dystrophine 6
- Figure 3. Schéma du complexe PAD dans les muscles striés 8
- Figure 4. Représentation schématique des domaines fonctionnels de l' $\alpha_1$ -syntrophine 31

### II- Articles

#### **Premier Article**

- Figure 1. Kir4.1 and AQP4 channels co-distribute with both  $\alpha$ - and  $\beta$ -dystroglycan in perivascular glia 69
- Figure 2. Kir4.1 channels co-aggregate with  $\alpha$ -dystroglycan and syntrophin and AQP4 channels co-aggregate with  $\alpha$ -dystroglycan 70
- Figure 3. Kir4.1 channels and  $\alpha_1$ -dystrobrevin have a similar immunolabeling pattern 71
- Figure 4.  $\alpha$ -dystroglycan aggregates and Kir4.1 channels are expressed by astrocytes and oligodendrocytes, respectively 72
- Figure 5. Laminin induces the aggregation of  $\alpha$ -dystroglycan, Kir4.1 and AQP4 channels 73
- Figure 6. Quantitative analysis of the laminin-induced aggregation of Kir4.1 and AQP4 channels 74

Figure 7. Laminin does not affect the size of Kir4.1 and AQP4 channel aggregates	75
--	----

## **Deuxième Article**

Figure 1. Colocalization of $\alpha$ -DG with laminin and Kir4.1 in Müller cell end-feet at the inner limiting membrane	87
Figure 2. Laminin induces $\alpha$ -DG but not $\beta$ 1-integrin clustering in Müller cells	88
Figure 3. Laminin-induced $\alpha$ -DG clusters contain agrin	89
Figure 4. Neuronal agrin does not potentiate the laminin-induced clustering of $\alpha$ -DG	90
Figure 5. Laminin clusters $\alpha$ -DG but not endogenous Kir4.1 in Müller cells	91
Figure 6. Kir4.1-export are targeted to the plasma membrane of Müller cells	92
Figure 7. Laminin clusters exogenous Kir4.1 in Müller cells	93
Figure 8. The SNV C-terminal sequence of Kir4.1 is required for the laminin-induced co-clustering of Kir4.1 with laminin and $\alpha$ -DG in Müller cells	94

## **V- Appendices**

Figure 1. La laminine-1 induit la co-agrégation de l' $\alpha$ -DG et de l'AQP4	xx
Figure 2. La laminine-1 induit l'agrégation de l' $\alpha$ -DG mais pas des Kir4.1	xxi
Figure 3. La laminine-1 induit l'agrégation du $\beta$ -DG	xxii
Figure 4. La laminine-1 induit l'agrégation de l' $\alpha$ -DG	xxiii

Figure 5. La laminine-1 induit la co-agrégation de l' $\alpha$ -DG avec l' $\alpha_1$ -DB	xxiv
Figure 6. La laminine-1 agrège l' $\alpha$ -DG mais pas l'intégrine- $\beta_1$	xxv
Figure 7. Modèle des mécanismes moléculaires à la base de l'agrégation des canaux Kir4.1 et AQP4 dans les astrocytes	xxvi

## Listes des sigles et abréviations

$\alpha$ -DG :	alpha-dystroglycan
$\beta$ -DG :	beta-dystroglycan
AChE :	acétylcholinestérase
AchR :	récepteur à l'acétylcholine
AQP4 :	aquaporine-4
BMD :	dystrophie musculaire de Becker
CMD :	<i>congenital muscular dystrophy</i>
DB :	dystrobrévine
DG :	dystroglycan
DG <sup>-SNC</sup> :	souris nulles pour le dystroglycan au niveau du système nerveux central
DMD :	dystrophie musculaire de Duchenne
Dp :	dystrophine
DRP2 :	<i>dystrophin-related protein-2</i>
ERG :	électrorétinogramme
FCMD :	<i>Fukuyama congenital muscular dystrophy</i>
FKRP :	<i>Fukutin-related protein</i>
GFAP :	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
JNM :	jonction neuromusculaire
Kir4.1 :	canaux potassique à rectification entrante 4.1
LARGE :	une <i>N</i> -acétyl-glucosamine glycosyltransférase commune
LGMD :	<i>limb-girdle muscular dystrophy</i>
MASC :	<i>myotube-associated specificity component</i>
MEB :	<i>Muscle-Eye-Brain Disease</i>
MEC :	matrice extracellulaire
MMP :	métalloprotéinases
MuSK :	<i>muscle specific kinase</i>
Myd :	souris myodystrophique
NO :	oxyde nitrique

nNOS :	oxyde nitrique synthase neuronale
PAD :	protéines associées à la dystrophine
PDZ :	PSD95- Discs Large- Zona Occludens-1
PH :	<i>Pleckstrin homology domains</i>
PLT :	potentialisation à long terme
POMGnT1 :	protéine O-mannosyl- $\beta$ 1,2-N-acetylglucosaminyltransférase-1
POMT1:	protéine O-mannosyltransférase-1
PSD-95 :	postsynaptic density protein - 95 kDa
Q.I. :	quotient intellectuel
RE :	reticulum endoplasmique
rv :	région variable
SG :	sarcoglycan
SH :	<i>src homology domain</i>
SNC :	système nerveux central
SNP :	système nerveux périphérique
SNV :	Sérine-Asparagine-Valine
SPN :	sarcospan
SU :	<i>Syntrophin Unique domain</i>
Syn :	syntrophine
WWS :	Syndrome de Walker-Warburg



*Mom et Pop, je vous dois  
l'accomplissement de ce travail, car  
sans toutes ces années de soutien de  
votre part, je n'y serais pas arrivé.*

*Merci pour tout !*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Hakima Moukhles pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir encadré pendant les deux dernières années. Nous avons développé une complicité qui a permis de travailler dans une ambiance très agréable. Je lui dois aussi une fière chandelle pour son efficacité au niveau des corrections de mon mémoire ce qui a facilité et accéléré de beaucoup l'accomplissement de ce dernier. Je lui souhaite la meilleure des chances à Vancouver.

La maîtrise est un travail d'ampleur demandant beaucoup d'énergie, d'efforts, de temps et il n'est pas rare de se buter à toutes sortes d'embûches au cours du sentier menant à l'obtention de ce diplôme ce qui résulte en des périodes difficiles. Pour ces raisons, je remercie tout spécialement Capucine, ma petite fleur, pour son soutien moral lors de mes phases de découragement, ce fut très apprécié. Un gros merci aussi à Lucie Tittley Boisvert et à Bernard Angers pour m'avoir laissé utiliser leur matériel. Je veux remercier mes amis des cycles supérieurs pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, votre compagnie a bien agrémenté mes journées de travail à l'Université. Donc, merci à Alexandre Poulain, Sandrine Joly, Mathieu Collette, Fabien Soza, Amélie Petrou, Stéphanie Lamoureux, Narcis Ghisovan, Abdellatif Nemri, Marie-Claire Binet et Marie-Claude Gagnon. Je ne peux oublier de remercier Marina Belda et Geoffroy Noël, mes deux stagiaires préférés, avec qui j'ai passé d'agréables moments et dont je garderai toujours de bons souvenirs.

Enfin, pour passer au travers de ces 18 années de scolarité, j'ai eu droit à un support extraordinaire de mes parents dans les meilleurs moments comme dans les plus difficiles. Me sentir épaulé toutes ces années par des personnes si importantes pour moi fut très réconfortant et encourageant. Merci à vous deux !

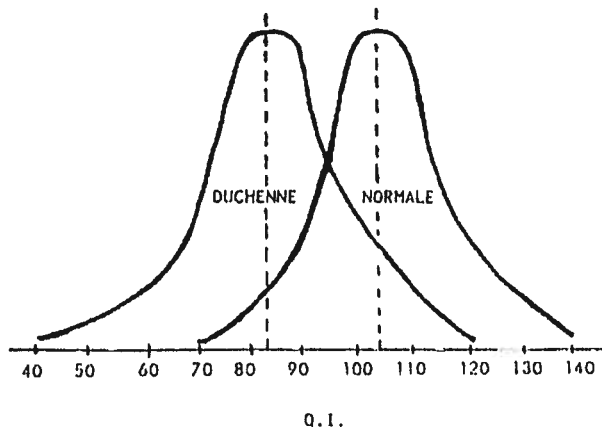
## **I-Introduction**

## 1. La dystrophie musculaire

### 1.1 Les dystrophies musculaires classiques : Duchenne et Becker

Les dystrophies musculaires de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) sont des maladies neuromusculaires récessives liées au chromosome X (Hoffman et Kunkel, 1989). La DMD est la forme la plus sévère et la plus fréquemment rencontrée avec une incidence de 1 garçon sur 3000. En ce qui concerne la BMD, elle affecte environ 1 garçon sur 30 000. La DMD se caractérise par une faiblesse musculaire progressive dont les signes cliniques peuvent être manifestes avant l'âge de 5 ans. Il n'est pas exceptionnel de voir ces patients dans un fauteuil-roulant au début de l'adolescence. En ce qui concerne la BMD, la maladie évolue plus lentement et elle permet parfois une vie non totalement invalidante.

La dystrophie musculaire affecte également le système nerveux central (SNC), puisque 30% des patients atteints de DMD souffrent de retards mentaux (Dubowitz, 1977; Felisari et al., 2000). Le quotient intellectuel (Q.I.) moyen de la population normale est d'environ 105, alors que celui des patients atteints de DMD est de 85, ce qui se traduit par un déplacement vers la gauche de la courbe de distribution standard (voir la



**Figure 1.** Courbe de distribution standard du Q.I. de la population normale et des patients atteints de DMD. Le Q.I. moyen normal est de 105, alors que celui des patients atteints de DMD est de 85. Tirée de Dubowitz (1977).

figure 1, ci-contre). Les patients considérés comme ayant des retards mentaux sont ceux dont le Q.I. est en dessous de 75 (Dubowitz, 1977). La BMD est également associée avec des retards mentaux, mais dans une

moindre mesure (North et al., 1996; Bardoni et al., 1999). Une légère atrophie cérébrale est apparente chez 67% des patients atteints de DMD et parmi eux, plusieurs présentent un Q.I. inférieur à la normale, ce qui est beaucoup moins fréquent chez les patients sans atrophie cérébrale (Yoshioka et al., 1980). L'atrophie cérébrale devient plus importante avec l'âge, ce qui indique qu'il y aurait dégénérescence cérébrale lente et progressive (Yoshioka et al., 1980). Cependant, il est à noter que les facultés intellectuelles de ces patients ne diminuent pas avec l'âge (Dubowitz, 1977; Yoshioka et al., 1980; Leibowitz et Dubowitz, 1981). Les patients présentant ces anomalies cérébrales sont affligés de handicaps moteurs sévères. Les jeunes enfants (de moins de 6 ans) atteints de DMD ont des problèmes significatifs avant même le diagnostic clinique de la faiblesse musculaire. En effet, ils manifestent des troubles de locomotion et du langage (Smith et al., 1990). Les déficits au niveau du langage sont également rencontrés chez les individus plus âgés (Sollee et al., 1985). Des problèmes d'articulation résultent en des difficultés à s'exprimer, ce qui mène à une mauvaise phonologie (Dorman et al., 1988; Smith et al., 1990). De plus, ces patients montrent des anomalies au niveau du développement cognitif, puisque des difficultés d'apprentissage en ce qui a trait à la lecture (Leibowitz et Dubowitz, 1981; Dorman et al., 1988; Billard et al., 1998), à l'épellation et aux mathématiques furent constatées (Dorman et al., 1988). Il fut également démontré qu'ils sont capables d'utiliser leur mémoire à court terme, mais que leur mémoire à long terme faisait défaut (Anderson et al., 1988). La dystrophie musculaire provoque des conditions neurologiques pouvant être associées avec l'autisme à fréquence relativement élevée (Komoto et al., 1984). D'ailleurs, une étude parue dans un journal japonais fait état de 8 cas d'autisme dans leur groupe de 94 patients atteints de DMD et de 2 cas parmi leur 43 patients atteints de BMD (Kumagai et al., 2001). Parmi les autres déficiences rencontrées, les plus fréquentes portent sur le Q.I. verbal (Leibowitz et Dubowitz, 1981), des problèmes émotifs (patients dépressifs) (Leibowitz et Dubowitz, 1981; Fitzpatrick et al., 1986) et d'attention (Sollee et

al., 1985). Ces observations suggèrent que les structures cérébrales impliquées dans ces processus soient touchées.

Les patients atteints de DMD et de BMD développent des anomalies cardiaques, dont une dilatation progressive du ventricule gauche engendrant des défaillances cardiaques et la mort des patients présentant ce symptôme (de Visser et al., 1992; de Kermadec et al., 1994; Nigro et al., 1995). Cependant, de Kermadec et al. (1994) montrent qu'il n'y a qu'un petit nombre de patients avec la DMD qui meurent de complications cardiaques (4 patients sur 72), comparativement aux patients souffrant de BMD chez lesquels c'est la principale cause de la mort (Nigro et al., 1995). Les patients atteints de BMD meurent en moyenne vers l'âge de 43 ans (Rideau et al., 1981).

Chez les patients atteints de DMD, la mort est principalement causée par des problèmes respiratoires associés à une paralysie des muscles respiratoires, ce qui entraîne des troubles de fonctionnement pulmonaire (Rideau et al., 1981; Tangsrud et al., 2001). Ces problèmes se manifestent à des stades avancés de la maladie. Une étude montre que la réduction du débit et de la force de la toux, conséquences secondaires résultant de la faiblesse musculaire, rend ces patients très susceptibles à des infections fatales des voies respiratoires (83% d'un groupe de 35 patients en sont morts) (Inkley, 1974). Cependant, le décès peut aussi être causé par une défaillance respiratoire due à une hypoventilation (Inkley, 1974). Les patients atteints de DMD meurent en moyenne vers l'âge de 20 ans.

## **1.2 La cause de la maladie**

### **1.2.1 Le gène des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker**

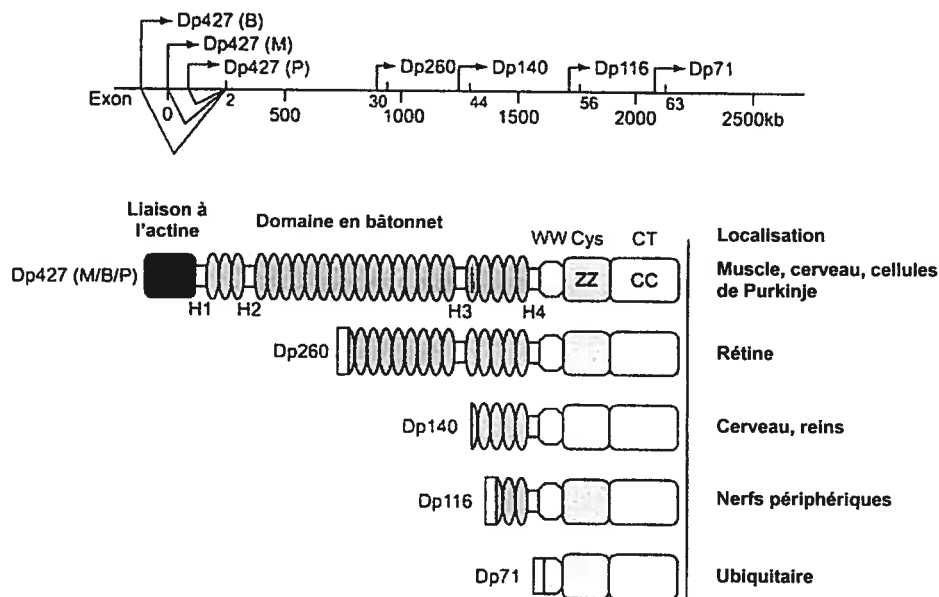
La dystrophie musculaire résulte de mutations au niveau du gène de la dystrophine qui est localisé sur le chromosome Xp21 (Hoffman et al., 1987).

Ce gène se caractérise par sa taille élevée (2300 Kb) et par son nombre impressionnant d'exons, soit 79. Ces caractéristiques expliquent la susceptibilité de ce gène à subir des mutations. La découverte du gène de la dystrophine offrit la possibilité de détecter la maladie dans les familles, de manière préventive, à l'aide de différentes sondes révélant la présence ou non de mutations dans ce gène (Forrest et al., 1987). La majorité des patients atteints de DMD présentent de larges délétions ou des duplications dans le gène de la dystrophine causant un changement dans le cadre de lecture. Ceci conduit à la formation d'un codon stop qui empêche la traduction de la séquence en aval de la mutation. Dans la BMD, les délétions sont de tailles et de positions semblables à celles retrouvées dans la DMD, mais elles ne causent pas de changement de cadre de lecture, ce qui permet de préserver les domaines fonctionnels proximaux et distaux de la protéine.

Le gène de la dystrophine possède une régulation transcriptionnelle complexe, puisque pas moins de 7 promoteurs sont responsables de sa transcription dans différents tissus (Feener et al., 1989; Mehler, 2000). Parmi ces promoteurs, trois d'entre eux (M, *muscle*; B, *brain* et P, *Purkinje cell*), situés en amont du gène, permettent la transcription de l'isoforme de 427 kDa de la dystrophine (Dp427) exprimé principalement dans le muscle et le cerveau. Les 4 autres promoteurs sont répartis à l'intérieur du gène et codent pour des transcrits tronqués de la dystrophine : Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71. La localisation de ces transcrits est résumée dans la figure 2 (page 6).

### **1.2.2 La dystrophine/utrophine : leurs domaines d'interactions**

La dystrophine a un homologue, l'utrophine, qui est exprimé de façon générale dans les mêmes tissus et dont il existe aussi plusieurs isoformes (Wilson et al., 1999). La dystrophine et l'utrophine présentent plusieurs domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'actine, une triple hélice sur-



**Figure 2.** Position des différents promoteurs du gène de la dystrophine et localisation tissulaire des isoformes de la dystrophine. Le domaine *EF Hand* (non illustré) est adjacent au domaine ZZ. Tirée et adaptée de Blake et Kröger, 2000.

enroulée permettant d'interagir avec d'autres dystrophines, un domaine WW, deux régions *EF hand* et un domaine ZZ en doigts de zinc (Way et al., 1992; Moores et Kendrick-Jones, 2000; Ilsley et al., 2002). Les domaines WW sont de petits domaines de 35-40 acides aminés semi-conservés présentant deux résidus tryptophane (W) espacés de 20-22 acides aminés. Ces domaines se lient à des ligands riches en proline (P). Les domaines WW sont classifiés selon la spécificité optimale qu'ils ont pour un ligand (voir tableau I, ci-dessous ; Ilsley et al., 2002). La dystrophine et l'utrophine possèdent un domaine WW de type I au niveau de leur C-terminal.

**Tableau I. Classification des domaines WW basée sur la spécificité optimale des ligands**

Classes	Motifs reconnus	Exemples de protéines à domaines WW
I	PPxY	Dystrophine, Nedd4 WW-3, YAP65
II	PPLP	FBP11, FE65
III	PPR	FBP30, FBP21, FE65
IV	(S/T)pP	Pin1, Nedd4 WW-2

Tiré de la revue de Ilsley et al. (2002)



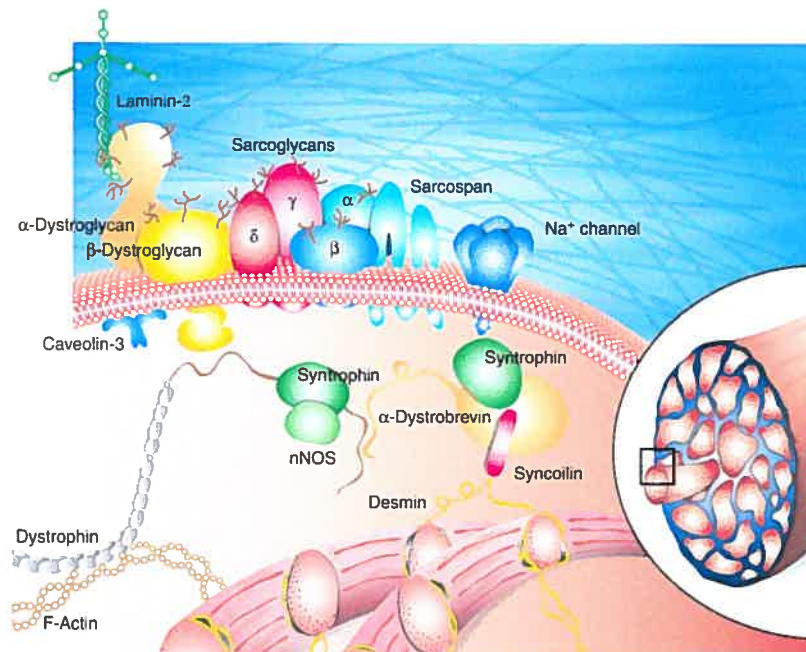
### 1.2.3 Interaction de la dystrophine avec l'actine

La dystrophine est structurellement similaire à l' $\alpha$ - et à la  $\beta$ -spectrine qui sont des protéines formant un réseau de mailles sous la membrane plasmique de plusieurs types de cellules tel que les érythrocytes et les neurones. Cet arrangement permet de réguler la distribution de protéines transmembranaires et de lier des éléments de la membrane avec d'autres composantes du cytosquelette, comme les filaments d'actine (Way et al., 1992). Dans le muscle, la dystrophine est nécessaire à la formation d'un lien fort entre des protéines du sarcolemme et le cytosquelette d'actine (Way et al., 1992; Rybakova et Ervasti, 1997; Rybakova et al., 2000). Dans le muscle squelettique, la dystrophine lie également l'actine costamérique afin de stabiliser mécaniquement le sarcolemme en répartissant le stress imposé sur ce dernier lors de la contraction musculaire (Rybakova et al., 2000). Le domaine de liaison de la dystrophine à l'actine se situe en son extrémité *N*-terminale. La liaison de la dystrophine le long des filaments d'actine (F-actine) stabilise ces derniers de façon analogue à la tropomyosine, se liant aussi le long de la F-actine (Rybakova et Ervasti, 1997). L'absence de la dystrophine cause une désorganisation des filaments d'actine (Rybakova et al., 2000). La dystrophine joue donc un rôle dans le maintien de l'intégrité de la cellule et de son cytosquelette en la protégeant du stress mécanique lors des cycles répétés de contraction-relaxation (Petrof et al., 1993). Des mutations de la dystrophine entraînent la mort progressive des fibres musculaires (Carlson, 1998). Les patients atteints de DMD présentent une augmentation, dans le sérum, du taux de créatine kinase, une enzyme musculaire (Ozawa et al., 1999). Cette augmentation serait due à la diffusion de l'enzyme à travers le sarcolemme dont l'intégrité se retrouve compromise suite à la baisse ou l'absence d'expression de dystrophine (Ozawa et al., 1999).

## 2. Le complexe de la dystrophine et de ses protéines associées

### 2.1 La description du complexe de protéines associées à la dystrophine

La dystrophine fait partie d'un complexe de protéines concentrées au niveau des creux des replis de la plaque motrice des jonctions neuromusculaires, mais qui sont aussi dispersées en dehors des jonctions (Peters et al., 1997a). Ce complexe fut nommé PAD (protéines associées à la dystrophine). Parmi les PAD, nous retrouvons, au niveau de la jonction neuromusculaire, des protéines cytosoliques dont les syntrophines ( $\alpha$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$ ) et les  $\alpha$ -dystrobrevines ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ ); des protéines transmembranaires : les sarcoglycans ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ), le sarcospan et le  $\beta$ -dystroglycan ainsi qu'une protéine extracellulaire : l' $\alpha$ -dystroglycan (voir figure 3, ci-dessous).



**Figure 3.** Schéma du complexe PAD dans les muscles striés. Tiré et adapté de Ehmsen et al. (2002).

L'absence de dystrophine entraîne une diminution d'expression des membres du complexe PAD dans le muscle, ceci fut démontré chez les

souris mdx, mutante pour la dystrophine de 427 kDa (Dp427), et chez les patients atteints de DMD (Ohlendieck et Campbell, 1991; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Pour ce qui est de l'utrophine, elle est associée à un complexe protéique similaire à celui auquel se lie la dystrophine (Matsumura et al., 1992). L'utrophine est concentré au niveau des crêtes des replis de la plaque motrice. De manière intéressante, l'utrophine demeure exprimé chez les patients atteints de DMD et chez les souris mdx, (Matsumura et al., 1992). Toutefois, son expression n'est pas suffisante pour contrecarrer le phénotype dystrophique (Matsumura et al., 1992). La dystrophine se lie à la membrane plasmique en interagissant avec le dystroglycan par l'intermédiaire de son C-terminal (James et al., 2000; Sotgia et al., 2001; Ilsley et al., 2002). Cependant, il semblerait que la dystrophine emploie également un autre mécanisme non identifié pour se lier à la membrane, car l'absence de dystroglycan ne provoque pas toujours la perte de la dystrophine à la membrane (Côté et al., 2002). La dystrophine lie aussi directement d'autres membres du complexe par son C-terminal, comme la dystrobrevine (Sadoulet-Puccio et al., 1997) et la syntrophine (Yang et al., 1995a).

Au niveau du cerveau et de la rétine, nous retrouvons également la dystrophine et certains des membres du complexe PAD dans les neurones et les cellules gliales, où ils forment des complexes distincts (Blake et al., 1999; Moukhles et al., 2000; Moukhles et Carbonetto, 2001; voir tableau II, page 10). Parmi ces protéines, nous comptons les syntrophines ( $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ), les dystrobrevines ( $\alpha_1$ ,  $\beta$ ) et le dystroglycan ( $\alpha$  et  $\beta$ ). Il n'y a pas de sarcoglycan ni de sarcospan, à l'exception de la rétine où nous retrouvons les  $\delta$  et  $\gamma$ -sarcoglycans (Claudepierre et al., 2000). Une étude sur les souris mdx révèle un métabolisme du glucose anormal dans le cerveau, de même qu'une altération des mécanismes de contrôle régulant le métabolisme d'oxydation pendant une anoxémie, puisque la consommation d'oxygène est triplée chez ces souris (Rae et al., 2002). Contrairement au muscle squelettique, le rôle

fonctionnel de la dystrophine et de ses protéines associées dans le cerveau et la rétine est encore obscur.

**Tableau II. Résumé des différents complexes PAD retrouvés dans le cerveau**

<b>Neurones</b>	<b>Cellules gliales</b>
1) $\alpha$ -dystroglycan $\beta$ -dystroglycan Dp71 $\beta$ -dystrobrevine Syntrophine	1) $\alpha$ -dystroglycan $\beta$ -dystroglycan Dp71 $\alpha_1$ -dystrobrevine Syntrophine
2) $\alpha$ -dystroglycan $\beta$ -dystroglycan Dp427 $\beta$ -dystrobrevine	2) $\alpha$ -dystroglycan $\beta$ -dystroglycan Dp140 Syntrophine

Ces résultats sont compilés à partir des travaux de Blake et al. (1999) et de Moukhles et al. (2001).

## 2.2 Le dystroglycan

Le dystroglycan (DG) fut d'abord découvert dans le cerveau, ce qui lui valu sa première appellation, la cranine (Smalheiser et Schwartz, 1987). Il fut également la première composante du complexe PAD à être clonée, en 1992 (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Le DG est exprimé dans plusieurs tissus (voir le tableau III, page 11). Le gène du DG, DAG1, est situé sur le chromosome 3p21 et est composé de deux exons et d'un seul intron (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993). Ce gène permet la transcription d'un ARNm de 5.8 kb, dont 2685 nucléotides codent pour un pro-peptide de 895 acides aminés (97 kDa) (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). La séquence du DG est bien conservée entre différentes espèces de mammifères, par exemple le DG du lapin et de l'humain contiennent tous les deux 895 acides aminés et ont 93% d'homologie, ce qui suggère une importance fonctionnelle du DG (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993). Le peptide signal, situé au N-terminal du pro-peptide, dirige son insertion dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE). Le DG est alors clivé par une protéase encore

inconnue au niveau de l'acide aminé 653 pour donner deux fragments de 26 kDa et de 72 kDa (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Smalheiser et Kim, 1995). Ces fragments sont modifiés post-traductionnellement pour donner deux protéines glycosylées, soit respectivement le  $\beta$ - et l' $\alpha$ -DG. Il existe plusieurs formes glycosylées de l' $\alpha$ -DG exprimées dans différents tissus (Gee et al., 1993; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993; Leschziner et al., 2000; Moukhles et al., 2000). Le degré de glycosylation de l' $\alpha$ -DG varie également en fonction du développement (Leschziner et al., 2000). En fait, l' $\alpha$ -DG contient 3 sites de *N*-glycosylation et plusieurs sites de *O*-glycosylation, alors que le  $\beta$ -DG ne contient qu'un site de *N*-glycosylation (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). La région C-terminale de l' $\alpha$ -DG lie, de façon non-covalente, le *N*-terminal du  $\beta$ -DG indépendamment de sa glycosylation (Sciandra et al., 2001). Dans le complexe PAD, l' $\alpha$ - et le  $\beta$ -DG font le pont entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine au niveau des jonctions neuromusculaires.

**Tableau III. Patrons d'expression du dystroglycan chez les mammifères**

Tissus		
<b>Système nerveux central</b>	<b>Système digestif</b>	<b>Reins</b>
Cortex cérébral	Dents	Tubules
Hippocampe	Glande salivaire	Membrane basale
Cervelet	Pancréas	
Moelle épinière	Petit intestin	<b>Peau</b>
Bulbe olfactif	Foie	Épiderme
Thalamus		Follicules capillaires
Plexus choroïdien	<b>Système reproducteur</b>	Glandes sudoripares
Astrocytes	Utérus	
Rétine	Glandes mammaires	<b>Tissus lymphatiques</b>
Tronc cérébral	Testicules	Rate
Ganglions de la base	Prostate	Thymus
		Ganglion lymphatique
<b>Système nerveux périphérique</b>	<b>Muscles</b>	<b>Embryon de souris</b>
Cellules de Schwann	Squelettiques	Membrane de Reichert
	Lisses	BM entre EV et E
<b>Système respiratoire</b>	Cardiaques	Cellules déciduales
Poumons	JNMs	
Trachée	JMTs	

MB, membrane basale; E, ectoderme; EV, endoderme viscéral; JNM, jonctions neuromusculaires; JMT, jonctions myotendineuses. Compilé à partir des travaux de Durbeej et al. (1998) Ibraghimov-Beskrovnaya et al. (1992), Ibraghimov-Beskrovnaya et al. (1993), Moukhles et al. (2001), Montanaro et al. (1995) et Zaccaria et al. (2001).

## 2.2.1 Le $\beta$ -dystroglycan

### 2.2.1a L'interaction entre le $\beta$ -dystroglycan et la dystrophine/utrophine

Le  $\beta$ -dystroglycan ( $\beta$ -DG) est une protéine transmembranaire de 43 kDa se liant à la dystrophine ou à l'utrophine au niveau sous-membranaire et à l' $\alpha$ -DG au niveau extracellulaire. Le  $\beta$ -DG contient deux motifs PPxY (Proline-Proline-X-Tyrosine) au niveau de sa portion cytoplasmique. Le premier commence au résidu 828 (PPEY) (E : Acide glutamique) et le deuxième au résidu 889 (PPPY) (Jung et al., 1995). Ce dernier est situé dans les 10-15 derniers acides aminés du C-terminal et est nécessaire et suffisant pour se lier au domaine WW de la dystrophine ou de l'utrophine (Jung et al., 1995). Cette liaison est stabilisée par les deux domaines accessoires *EF-hand* et ZZ situés dans la région C-terminale de la dystrophine/utrophine (Jung et al., 1995; Rentschler et al., 1999; James et al., 2000).

### 2.2.1b Régulation de l'interaction du $\beta$ -dystroglycan avec ses partenaires par sa phosphorylation

La phosphorylation du résidu tyrosine (Y) du motif PPPY du  $\beta$ -DG module son interaction avec la dystrophine/utrophine (James et al., 2000; Ilsley et al., 2002). Ainsi, quand le  $\beta$ -DG est non phosphorylé, il interagit avec la dystrophine/utrophine, alors que lorsqu'il est phosphorylé, il interagit avec des protéines à domaines SH2 (SH : *Src homology domain*) incluant c-Src, FYN, CsK, NCK et SHC, en plus d'interagir avec la protéine adaptatrice, Grb2, contenant un domaine SH2 et deux domaines SH3 (Yang et al., 1995b; Cavaldesi et al., 1999; Sotgia et al., 2001). Ces protéines sont impliquées dans des voies de signalisation, ce qui nous fait penser que le complexe PAD

aurait un rôle dans la signalisation cellulaire, en plus de son rôle structural dans le maintien de l'intégrité des fibres musculaires.

Le  $\beta$ -DG a d'autres partenaires au niveau cytoplasmique puisqu'il interagit également avec la cavéoline-3. Lorsque la cavéoline-3 est associée au  $\beta$ -DG, la phosphorylation du  $\beta$ -DG est inhibée (Sotgia et al., 2003). Les cavéolines sont les protéines principales des cavéoles et sont exprimées dans les muscles cardiaque, squelettique et lisse, en plus d'être présentes dans le cerveau, principalement au niveau des astrocytes (Ikezu et al., 1998; Sotgia et al., 2000). Les cavéoles sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires incluant l'endocytose et la transduction de signaux. Des mutations dans le gène de la cavéoline-3 causent une dystrophie dite, en anglais, *Limb Girdle Muscular Dystrophy* (LGMD) (Minetti et al., 1998). Cette dystrophie musculaire serait due au fait que la formation des cavéoles soit inhibée et que l'interaction de la cavéoline-3 avec des protéines de signalisation, comme la NO synthase neuronale (nNOS) soit interrompue (Venema et al., 1997; Minetti et al., 1998). Normalement, la cavéoline-3 régule l'activité catalytique de la nNOS (Venema et al., 1997). Des mutations dans le gène de la cavéoline-3 induisent une augmentation de l'activité de la nNOS qui est associée à une myopathie sévère (Sunada et al., 2001). La cavéoline-3 se lie directement au  $\beta$ -DG via une interaction de type WW-PPPY, mais cette liaison est indépendante de la phosphorylation du  $\beta$ -DG (Sotgia et al., 2000), contrairement à la liaison de la dystrophine/utrophine au  $\beta$ -DG. La cavéoline-3 peut bloquer l'interaction de la dystrophine avec le  $\beta$ -DG, ce qui a pour conséquence d'empêcher le recrutement de la dystrophine à la membrane (Sotgia et al., 2000). D'ailleurs, une sur-expression de la cavéoline-3 cause, chez la souris, des symptômes similaires à ceux de la DMD. Ce phénotype résulte probablement du bris du lien entre le complexe PAD et le cytosquelette d'actine.

### **2.2.1c Rôle du $\beta$ -dystroglycan dans l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine**

Aux jonctions neuromusculaires (JNMs), l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine (AChRs) est induite par l'agrine, une molécule de la matrice extracellulaire (MEC). Le  $\beta$ -DG se lie à la rapsyne, une protéine sous-membranaire essentielle à l'agrégation des AChRs induite par l'agrine (Fuhrer et al., 1999). La rapsyne se lie à la fois aux AChRs et au  $\beta$ -DG, ce qui permet la formation et la stabilisation des agrégats d'AChRs interagissant avec le complexe PAD (Apel et al., 1995; Fuhrer et al., 1999). L'interaction de la rapsyne avec le  $\beta$ -DG se fait au niveau de la région juxta-membranaire cytosolique du  $\beta$ -DG (Cartaud et al., 1998). Il est aussi possible que cette région soit impliquée dans le ciblage du DG dans les domaines de la membrane contenant des AChRs via des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides (Kahl et Campanelli, 2003).

### **2.2.1d Le clivage du $\beta$ -dystroglycan par les métalloprotéinases**

Le  $\beta$ -DG est impliqué dans l'invasion des cellules tumorales. En effet, les cellules malignes surexpriment des métalloprotéinases de la matrice (MMPs) qui coupent le lien entre la matrice extracellulaire et la membrane cellulaire en clivant, entre autres, la portion extracellulaire du  $\beta$ -DG (Losasso et al., 2000; Yamada et al., 2001). La majorité des MMPs connues (plus de 20 MMPs chez les mammifères) sont sécrétées et leurs combinaisons permettent de dégrader toutes les matrices extracellulaires (Bosman et Stamenkovic, 2003). Une fois clivé par les MMPs, le fragment de  $\beta$ -DG demeurant dans la membrane plasmique n'est plus que de 30 kDa au lieu de 43 kDa et il n'est pas en mesure de lier l' $\alpha$ -DG (Losasso et al., 2000; Yamada et al., 2001). Ce fragment peut également se retrouver dans des tissus normaux, par exemple dans les nerfs périphériques, dans les reins, dans les



poumons et dans les muscles lisses (Yamada et al., 2001). Ceci pourrait constituer un moyen de défense naturel contre des agents pathogènes dont plusieurs sont maintenant connus pour utiliser l' $\alpha$ -DG associé au  $\beta$ -DG comme récepteur cellulaire pour envahir et infecter certaines cellules (Cao et al., 1998; Rambukkana et al., 1998).

## 2.2.2 L' $\alpha$ -dystroglycan

### 2.2.2a Le rôle de l'interaction de l' $\alpha$ -dystroglycan avec les protéines de la matrice extracellulaire dans l'agrégation des AChRs

L' $\alpha$ -dystroglycan est une protéine extracellulaire de 100-200 kDa (selon son degré de glycosylation) située partout au niveau du sarcolemme y compris au niveau de la membrane postsynaptique des jonctions neuromusculaires (Leschziner et al., 2000). L' $\alpha$ -DG est lié à la membrane par des liaisons non-covalentes qu'il établit avec le  $\beta$ -DG. Il lie aussi des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) entourant les fibres musculaires comme la laminine (Smalheiser et Schwartz, 1987; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992), l'agrine (Campanelli et al., 1994) et le perlecan (Peng et al., 1999). Il est à noter que ces protéines se lient à l' $\alpha$ -DG par l'intermédiaire des domaines globulaires appelés domaines G (Henry et Campbell, 1996). L'interaction de l' $\alpha$ -DG avec la MEC contribue au rôle du complexe PAD dans le maintien de l'intégrité structurale des fibres musculaires au cours des cycles répétés de contraction-relaxation.

Au cours du développement des jonctions neuromusculaires (JNMs), les zones actives au niveau de la membrane présynaptique s'alignent avec les replis post-jonctionnels du sarcolemme. Au niveau des crêtes des replis, les AChRs sont agrégés et atteignent une densité de  $\sim 10\,000/\mu\text{m}^2$  afin de maximiser l'efficacité de la transmission synaptique, alors que les régions extra-jonctionnelles présentent une densité à peu près 1000 fois inférieure

(Fertuck et Salpeter, 1974). L'agrine est un acteur majeur de la différenciation des JNMs (Sanes et Lichtman, 1999). La liaison de l' $\alpha$ -DG à l'agrine amena des spéculations comme quoi l' $\alpha$ -DG médiait l'agrégation des AChRs induite par l'agrine pendant le développement des JNMs (Campanelli et al., 1994), puisque l'agrine provoquait l'agrégation de l' $\alpha$ -DG et que ces agrégats co-localisaient avec les agrégats d'AChRs.

Des études subséquentes montrèrent que l' $\alpha$ -DG liait l'agrine musculaire, un isoforme sécrété par les cellules musculaires n'induisant pas l'agrégation des AChRs, avec 10 fois plus d'affinité que l'agrine neuronale qui induit l'agrégation des AChRs et qui est sécrété par les motoneurones. Ces données mettaient en doute l'hypothèse d'un rôle de l' $\alpha$ -DG dans l'agrégation des AChRs (Sugiyama et al., 1994). L'activité d'agrégation de l'agrine est modulée par épissage alternatif à deux sites, Y et Z. Selon l'épissage, il peut y avoir insertion de 4 acides aminés au site Y et une insertion de 8, 11 ou 19 acides aminés au site Z. L'agrine musculaire ne contient pas d'inserts (agrine<sub>Y0Z0</sub>), contrairement à l'agrine neuronale (agrine<sub>Y4Z8</sub>). Par la suite, d'autres études ont montré que la liaison de l'agrine à l' $\alpha$ -DG n'était pas nécessaire à l'agrégation des AChRs, puisqu'un fragment de l'agrine active correspondant au site Z8 et au domaine G le plus rapproché du C-terminal induisait l'agrégation des AChRs sans se lier à l' $\alpha$ -DG (Gesemann et al., 1995; Gesemann et al., 1996; Jacobson et al., 1998). Ces données suggèrent que la transduction du signal partant de l'agrine ne passe pas directement par l' $\alpha$ -DG. En fait, dans le muscle, l'agrine interagit avec un récepteur tyrosine kinase spécifique aux muscles, MuSK (*muscle specific kinase*), en se liant à MASC (*myotube-associated specificity component*) et induit la phosphorylation de MuSK et de la sous-unité  $\beta$  des AChRs qui est nécessaire à l'agrégation des AChRs (Wallace et al., 1991; Wallace, 1994; Glass et al., 1996). La phosphorylation des AChRs serait médiée par des kinases de la famille Src agissant en aval de MuSK (Mittaud et al., 2001). L'ensemble de ces études met en évidence les mécanismes moléculaires

impliqués dans la formation de la JNM et établie un rôle critique de l'agrine dans ces mécanismes. L'agrine est également exprimée au niveau du cerveau et plus particulièrement au niveau des synapses, cependant son rôle dans la synaptogénèse est encore mal défini (Serpinskaya et al., 1999).

L' $\alpha$ -DG joue un rôle majeur au niveau des JNMs, même s'il n'est pas directement impliqué dans l'initiation de l'agrégation des AChRs. En effet, l'interaction entre la laminine et l' $\alpha$ -DG double le nombre d'agrégats de AChRs induits par l'agrine indiquant que la laminine potentialise l'effet de l'agrine (Montanaro et al., 1998). De plus, ces agrégats présentent une taille supérieure et ils sont plus denses que ceux induits par l'agrine (Montanaro et al., 1998). Ceci suggère que la laminine et l' $\alpha$ -DG soient impliqués dans la croissance et/ou la stabilisation des agrégats de AChRs par un mécanisme indépendant de MuSK (Cohen et al., 1997; Montanaro et al., 1998; Jacobson et al., 2001).

### **2.2.2b Le rôle de l' $\alpha$ -dystroglycan dans l'inactivation synaptique des neurotransmetteurs**

En plus de se lier à la laminine et à l'agrine, l' $\alpha$ -DG se lie également au perlecan, un protéoglycan de type héparan sulfate faisant partie de la matrice extracellulaire (Peng et al., 1999; Talts et al., 1999) et pouvant lui-même se lier à la laminine (Noonan et al., 1991). Le complexe perlecan- $\alpha$ -DG sert de récepteur membranaire à une acétylcholinestérase (AChE), comportant une séquence homologue au collagène qui se lie directement au perlecan. L'AChE forme des agrégats qui co-localisent avec ceux des AChRs et est recrutée afin de dégrader l'acétylcholine en choline et en acide acétique pour terminer la neurotransmission (Peng et al., 1999). La liaison du perlecan à l' $\alpha$ -DG a donc un rôle fonctionnel au niveau de la JNM, puisqu'elle initie la terminaison de la transmission nerveuse.

### 2.2.2c Le rôle de l' $\alpha$ -dystroglycan dans la formation de la matrice extracellulaire

L' $\alpha$ -DG est impliqué dans la formation de la matrice extracellulaire (MEC). La MEC est une structure qui ressemble à un feuillet dense se situant à l'interface des tissus épithélial et mésenchymal. La laminine, une protéine majeure de la MEC, est essentielle pour la formation de liens entre les cellules et la MEC ainsi qu'à l'assemblage de cette dernière en interagissant avec des récepteurs spécifiques à la surface des cellules (Timpl et Brown, 1996). Les intégrines constituent la classe la plus importante de récepteurs pour la laminine. Ce sont des dimères composés de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\beta_1$  se lie indirectement au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un complexe protéique contenant la taline, l'actinine et la vinculine et est primordiale à l'assemblage de la MEC. Son absence, chez des souris *knock out*, entraîne la mort à l'âge embryonnaire (Stephens et al., 1995). L' $\alpha$ -DG est un autre type de récepteur cellulaire de la laminine (Gee et al., 1993) et comme l'intégrine, il contribue à former un pont reliant la MEC au cytosquelette d'actine en impliquant des protéines du complexe PAD qui sont différentes de celles associées aux  $\beta_1$ -intégrines (Henry et Campbell, 1996). La liaison de la laminine à l' $\alpha$ -DG est dépendante de l'état de glycosylation de ce dernier (Ervasti et Campbell, 1993; Leschziner et al., 2000). Le lien entre la MEC et le cytosquelette participe à la morphogenèse des cellules et est essentiel à des processus cellulaires comme l'adhésion et la migration. Le DG est essentiel à la formation de la membrane de Reichert, la matrice extra-embryonnaire chez les rongeurs (Williamson et al., 1997). En effet, chez les embryons de souris *knock out* pour le DG ( $DG^{-/-}$ ), des anomalies de développement apparaissent *in utero* et les embryons meurent au jour 6.5 (Williamson et al., 1997). Les analyses révèlent qu'il y a discontinuité de la membrane de Reichert ainsi que de la membrane basale séparant l'endoderme de l'ectoderme. Dans ces membranes basales, la localisation de la laminine et du collagène IV est erronée. Une autre étude, *in*

*in vitro* cette fois-ci, vient supporter les résultats précédents. Effectivement, les corps embryonnaires formés à partir de cultures de cellules souches DG<sup>-/-</sup> présentent une absence de membrane basale et les principales composantes de la matrice extracellulaire, la laminine, le collagène IV et le perlecan présentent une localisation erronée (Henry et Campbell, 1998). Jacobson et al. (2001) ont également montré une délocalisation de la laminine, du perlecan et de l'AchE, *in vitro*, dans les myotubes DG<sup>-/-</sup> et, *in vivo*, dans les JNMs de souris chimères déficientes en DG. L'ensemble de ces résultats démontre que l'interaction entre le DG et la laminine est primordiale au dépôt et à l'assemblage normal des autres composantes de la membrane basale.

Par ailleurs, l'importance de la laminine et de son lien avec l' $\alpha$ -DG a été mis en évidence par une étude montrant que la perte de cette interaction induisait l'apoptose dans le muscle (Langenbach et Rando, 2002). La mort par apoptose est une caractéristique des cellules musculaires chez les patients atteints de dystrophie musculaire. L'apoptose serait induite en partie par l'activation des caspases, une conséquence de la déphosphorylation de protéines de la voie de signalisation PI3K/AKT, lorsque la liaison entre l' $\alpha$ -DG et la laminine est rompue (Langenbach et Rando, 2002). Donc, ce lien servirait de signal de survie à la cellule.

#### **2.2.2d L' $\alpha$ -dystroglycan et la neurexine dans le cerveau**

Au niveau du cerveau, les composantes de la matrice extracellulaire ne sont pas présentes en abondance, excepté dans les espaces péri-vasculaires où les pieds terminaux des astrocytes adhèrent. L'espace extracellulaire entre deux neurones ne contient pas de matrice extracellulaire. Ceci suggère que d'autres ligands doivent exister pour l' $\alpha$ -DG neuronal qui est exprimé au niveau des membranes postsynaptiques des synapses excitatrices et inhibitrices (Zaccaria et al., 2001; Levi et al., 2002). En effet, Sugita et al. (2001) ont montré que les neurexines  $\alpha$  et  $\beta$ , des protéines

présynaptiques, se lie à l' $\alpha$ -DG. Cette liaison se fait par des domaines G de la neurexine. Bien que nous ne connaissons pas la signification fonctionnelle de cette liaison, il est possible qu'elle assure l'adhésion entre les neurones pré- et postsynaptiques. La  $\beta$ -neurexine est connue pour lier la neuroligine, une autre protéine neuronale postsynaptique concentrée dans les synapses excitatrices (Scheiffele et al., 2000). L'expression de la neurexine et de la neuroligine est au plus haut niveau dans le cerveau au moment de la synaptogénèse (Rüegg, 2001). La neuroligine-1 est localisée au niveau des densités postsynaptiques des synapses excitatrices où elle se lie à la PSD-95 (postsynaptic density protein - 95 kDa) (Irie et al., 1997). Lors de la synaptogénèse, la neurexine est concentrée aux synapses et dans les cônes de croissances. Le contact du cône de croissance avec une cellule exprimant la neuroligine-1 induit la différenciation pré- et postsynaptique (Scheiffele et al., 2000; Dean et al., 2003). La neuroligine-1 est suffisante pour agréger la  $\beta$ -neurexine. L'agrégation de la  $\beta$ -neurexine induit le recrutement des vésicules synaptiques et donc la mise en place de l'appareil d'exocytose au niveau de la zone active (Scheiffele et al., 2000; Dean et al., 2003). Le rôle de l'interaction entre l' $\alpha$ -DG et la neurexine est inconnu, mais par analogie avec l'interaction neuroligine-1-neurexine, on pourrait penser qu'elle est impliquée dans la synaptogénèse.

### **2.2.2e L'implication du dystroglycan dans la dystrophie musculaire congénitale**

Le dystroglycan est connu depuis plus d'une décennie maintenant (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992) et les chercheurs n'ont pas réussi à identifier de mutations dans le gène codant pour cette protéine. Il est possible qu'aucune mutation de ce gène ne soit associée à des dystrophies musculaires. Pourtant des mutations dans plusieurs autres gènes du complexe PAD sont impliquées dans divers types de dystrophies musculaires. Par exemple, des mutations dans la dystrophine résultent en la

dystrophie de Becker et de Duchenne, tandis que des mutations au niveau des sarcoglycans et de la cavéoline-3 causent la dystrophie musculaire congénitale *limb-girdle* (LGMD) et enfin des mutations de la laminine-2 est responsable d'une forme de dystrophie musculaire congénitale dite « classique » (Campbell, 1995; Cohn et Campbell, 2000).

Toutefois, de récentes études ont démontré que l' $\alpha$ -DG pouvait, lui aussi, être directement impliqué dans diverses dystrophies musculaires. L' $\alpha$ -DG est fortement glycosylé et la moitié de sa masse moléculaire est due à sa glycosylation dans la région semblable à la mucine, la composante protéique du mucus. Des mutations dans des gènes codant pour des enzymes de glycosylation de l' $\alpha$ -DG comme la Fukutine, la Fukutin-related protein (FKRP), la O-mannosyltransférase-1 (POMT1), la O-mannosyl- $\beta$ 1,2-N-acétylglucosaminyltransférase-1 (POMGnT1) ou une N-acétyl-glucosamine glycosyltransférase commune (LARGE) (Beltràn-Valero de Bernabé et al., 2002; Brockington et al., 2001; Holzfeind et al., 2002; Kano et al., 2002; Kobayashi et al., 1998) (voir le résumé au tableau IV, page 22), résultent en des dystrophies musculaires congénitales (DMC) avec des retards mentaux plus sévères que ceux rencontrés chez les patients atteints de DMD (Louhichi et al., 2003; Villanova et al., 2000; Mercuri et al., 1999; Longman et al., 2003). Parmi ces retards mentaux, nous comptons de graves troubles du langage, un Q.I. en dessous de la moyenne, un délai général du développement, des difficultés d'apprentissage et un désintéressement du patient face à son environnement. De manière intéressante, ces mutations causent une hypoglycosylation de l' $\alpha$ -DG qui n'est plus en mesure de lier la laminine, l'agrine et la neurexine, ni dans le cerveau, ni dans le muscle (Michele et al., 2002). Ces études mettent en évidence un rôle du DG et plus précisément de sa glycosylation dans certaines formes de dystrophies musculaires. Par ailleurs, la N- et la O-glycosylation sont connues pour être impliquées dans le transport intracellulaire et le ciblage de certaines protéines

(Yeaman et al., 1997). La possibilité que l' $\alpha$ -DG soit soumis à un tel contrôle n'est donc pas à écarter.

**Tableau IV. Dystrophies musculaires secondaires à des mutations dans des gènes qui codent pour des glycosyltransférases**

Maladies	Gène impliqué	Fonction de la protéine	Caractéristiques cliniques	$\alpha$ -dystroglycan dans le muscle
Muscle-eye-brain disease (MEB)	POMGnT1	Synthèse de glycanes O-mannosyl	Faiblesse musculaire sévère Retards mentaux Épilepsie Migration neuronale anormale Anomalies oculaires	Absence par IHC et par WB
Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD)	Fukutine	Glycosyltransférase commune	Faiblesse musculaire proximale et axiale sévère Retards mentaux Épilepsie Migration neuronale anormale	Absence par IHC et par WB
LGMD2I et MDC1C	Fukutin-related protein (FKRP)	Glycosyltransférase commune	Faiblesse musculaire proximale et axiale variable Cardiomyopathie	De réduction à absence par IHC ; masse moléculaire réduite par WB
Souris myodystrophique ( <i>myd</i> )	LARGE	Glycosyltransférase commune	Faiblesse musculaire Migration neuronale anormale	Absence par IHC et par WB
Walker-Warburg syndrome	POMT1	O-mannosyltransférase commune	Faiblesse musculaire sévère Mort à l'enfance Absence de développement psychomoteur Migration neuronale anormale Anomalies oculaires	Absence par IHC et par WB

IHC = Immunohistochimie; WB = Immunobuvardage de type Western.  
Tiré de Muntoni et al. (2002).

Au niveau du SNC, l'hypoglycosylation de l' $\alpha$ -DG engendre des anomalies au niveau de la migration neuronale, de la morphogénèse du cerveau et de l'expression des membranes basales (Michele et al., 2002; Moore et al., 2002). Ces anomalies sont communes à trois formes de dystrophies musculaires congénitales : *Fukuyama congenital muscular dystrophy* (FCMD), Syndrome de Walker-Warburg (WWS) et la *Muscle-Eye-Brain Disease* (MEB). De plus, deux modèles animaux présentent des symptômes similaires à ces DMCs. Ces modèles sont représentés par des souris myodystrophiques portant une mutation spontanée du gène codant pour la glycosyltransférase LARGE (souris *myd*<sup>LARGE</sup>; Michele et al., 2002 ) et



par des souris dont le DG a été délété sélectivement dans le cerveau (souris DG<sup>-SNC</sup>) (Holzfeind et al., 2002; Moore et al., 2002).

Les souris *myd*<sup>LARGE</sup> et DG<sup>-SNC</sup> montrent une désorganisation des couches corticales et une mauvaise position des neurones (hétérotopie), ce qui se traduit par une absence de démarcation entre les couches I et II. De plus, les souris DG<sup>-SNC</sup> présentent des agrégats de cellules neuronales et gliales au-delà de la membrane basale piaie, ce qui suggère une migration anormale (Moore et al., 2002). Une diminution de la capacité d'ancrage des prolongements de la glie radiale, due à l'absence de DG dans leurs pieds terminaux, et un fractionnement focal de la membrane basale piaie pourraient être les causes de ce phénomène. En effet, ce genre de problèmes provoque une mauvaise localisation ou une absence des cellules de Cajal-Retzius qui permettent l'arrêt de la migration neuronale par l'expression de deux protéines, *slit* et *reeline*. Il est à noter que ces deux protéines contiennent des domaines G, semblables à ceux qui permettent à la laminine, à l'agrine, à la neurexine et au perlecan de se lier à l' $\alpha$ -DG.

Chez les souris DG<sup>-CNS</sup> et les souris *myd*<sup>LARGE</sup>, il y a perte de la fissure inter-hémisphérique du cortex cérébral et fusion des follicules du cortex cérébelleux (Moore et al., 2002; Michele et al., 2002). Ceci est parfois rencontré chez les patients atteints de la FCMD, mais plus souvent chez ceux atteints du WWS. Ces observations démontrent l'importance de l' $\alpha$ -DG et du lien qu'il établit avec certaines membranes basales au cours du développement normal du cerveau. L' $\alpha$ -DG serait également impliqué dans la neurotransmission postsynaptique dans le cerveau, puisque les PLTs (potentialisation à long terme) de l'hippocampe des souris DG<sup>-CNS</sup> sont affectées (Moore et al., 2002).

### 2.2.2f Le rôle du dystroglycan dans la rétine

Au niveau de la rétine, différents glycoformes de l' $\alpha$ -DG sont exprimés (Moukhles et al., 2000). Des études *in vivo*, faites au moyen d'électrorétinographies, ont révélé des électrorétinogrammes (ERG) anormaux au niveau de l'onde b des souris *myd*<sup>LARGE</sup> (Holzfeind et al., 2002). Cette anomalie indique des perturbations de l'activité rétinienne due à l'hypoglycosylation de l' $\alpha$ -DG (Holzfeind et al., 2002). L'onde b est générée par la transmission synaptique des photorécepteurs aux cellules bipolaires et horizontales et/ou des courants provenant des cellules de Müller, la glie radiale de la rétine. Les patients atteints de DMD présentent également des ERGs anormaux, tout comme les souris *mdx*<sup>3cv</sup>, mutantes pour plusieurs isoformes de dystrophine (Pillers et al., 1993 et 1995). De plus, la FCMD et la MEB sont aussi accompagnées de problèmes ophtalmologiques dont une myopie sévère, une cornée opaque et une dysplasie rétinienne (Toda et al., 2000).

### 2.2.2g Un rôle de l' $\alpha$ -dystroglycan dans la polarité des cellules épithéliales et la communication cellulaire

L' $\alpha$ -DG semble être très important pour l'établissement de la polarité cellulaire. En effet, une étude récente faite chez la drosophile démontre que le DG est impliqué dans l'organisation de la polarité des cellules épithéliales folliculaires pendant l'oogénèse (Deng et al., 2003). En effet, en absence d' $\alpha$ -DG, des marqueurs du côté apical des cellules épithéliales comme *Dlt* et  *$\beta$ -Heavy-Spectrin* se retrouvent aussi du côté basal de ces cellules. De plus, cette étude montre que l'absence du DG cause une désorganisation du cytosquelette d'actine basal dans les cellules n'exprimant pas de DG, de même que dans les cellules voisines de celles-ci, mettant en évidence un rôle dans la communication cellule-cellule via l' $\alpha$ -DG (Deng et al., 2003). Ce rôle

dans la régulation de la communication cellulaire fut initialement suggéré par Belkin et al. (1996).

### **2.2.2h Un rôle de l' $\alpha$ -dystroglycan dans le système nerveux périphérique**

Le dystroglycan est également exprimé dans les cellules de Schwann, les cellules gliales du système nerveux périphérique (SNP). Une délétion sélective du DG dans ces cellules résulte en des déficiences motrices et une hyperalgésie (Saito et al., 2003). La conduction de l'influx nerveux est ralentie et des changements aux nœuds de Ranvier sont observés (Saito et al., 2003). Ces derniers sont caractérisés par une réduction de l'expression des canaux sodiques et une désorganisation des micro-vilosités des cellules de Schwann. De plus, l'enroulement des feuillets de myéline est anormal chez les souris *knock out* pour le DG dans les cellules de Schwann. L'absence de l' $\alpha$ -DG entraîne une réduction considérable de l'interaction de ces cellules avec la laminine. Dans les cellules de Schwann nulles pour le DG, l'expression de plusieurs membres du complexe PAD se trouve réduite (Saito et al., 2003). L'ensemble de ces données suggère que l'expression du DG et son interaction avec les protéines de la matrice extracellulaire, via sa sous unité  $\alpha$ , est cruciale à la myélinisation et à l'architecture nodale (Yamada et al., 1996; Saito et al., 2003) et est importante pour la stabilité du complexe PAD dans les cellules de Schwann.

### **2.2.2i L' $\alpha$ -dystroglycan : une porte d'entrée cellulaire pour des agents pathogènes**

L'interaction de l' $\alpha$ -DG avec la laminine-2, qui est exprimée dans la matrice extracellulaire apposée aux cellules de Schwann, est nécessaire pour l'internalisation de *Mycobacterium leprae*, la bactérie causant la lèpre. Cette dernière envahit les cellules de Schwann et cause des dommages

significatifs dans les nerfs périphériques (Rambukkana et al., 1998). De plus, une étude faite à l'aide de cellules souches et de fibroblastes de souris (3T6) montra que l' $\alpha$ -DG sert également de récepteur cellulaire pour plusieurs *arena virus*, à savoir le virus *Lymphocytic choriomeningitis*, le virus *Lassa fever*, l'*Oliveros* et le *Mobala* (Cao et al., 1998). Les cellules nulles pour l' $\alpha$ -DG résistent à l'infection par ces virus, ce qui prouve que l' $\alpha$ -DG sert de porte d'entrée pour ces agents pathogènes.

## 2.3 Les sarcoglycans

### 2.3.1 Les sarcoglycanopathies : dystrophies musculaires congénitales

Le complexe des sarcoglycans (SGs) est composé de cinq protéines comportant un seul domaine transmembranaire, soit l' $\alpha$ -SG (50 kDa), le  $\beta$ -SG (43 kDa), le  $\delta$ -SG (35 kDa), l' $\varepsilon$ -SG (47 kDa) et le  $\gamma$ -SG (35 kDa). Les SGs interagissent entre eux par leurs domaines extracellulaires et la majorité des mutations connues dans les SGs se situent dans cette région. Une mutation dans le domaine extracellulaire de l'un des SGs se reflète par une instabilité du complexe et une expression réduite de ce dernier à la membrane plasmique (Roberds et al., 1993; McNally et al., 1996; Sakamoto et al., 1997; Duclos et al., 1998; Hack et al., 1998; Araishi et al., 1999). Le seul membre des SGs dont l'expression ne semble pas être affectée par une mutation de l'un de ses partenaires est l' $\varepsilon$ -SG, le dernier de cette famille à avoir été cloné (Ettinger et al., 1997; Duclos et al., 1998; Hack et al., 1998). Des mutations dans les gènes codant pour les différents membres du complexe des SG causent des dystrophies musculaires que l'on dénomme sarcoglycanopathies. Celles-ci sont classifiées comme étant des formes de LGMD (voir tableau V, page 27) et sont caractérisées par une élévation importante du taux de créatine kinase dans le sérum, comme chez les patients atteints de DMD (Duclos et al., 1998; Hack et al., 1998; Araishi et al., 1999; Ozawa et al., 1999). Le complexe des SGs interagit avec une autre

protéine, le sarcospan (SPN; 25 kDa). Cette protéine à 4 domaines transmembranaires a une expression réduite suite à des mutations des gènes codant pour les SG ou pour la dystrophine (Crosbie et al., 1997; Duclos et al., 1998; Araishi et al., 1999).

**Tableau V. Différentes dystrophies musculaires : positions et produits de leurs gènes**

Maladies	Locus du gène	Produit du gène
Dystrophie musculaire de Duchenne/Becker	Xp21	Dystrophine
Dystrophie Musculaire Limb-Girdle		
LGMD 1C	3p25	Cavéoline-3
LGMD 2C	13q12	$\gamma$ -Sarcoglycan
LGMD 2D	17q12-q21	$\alpha$ -Sarcoglycan
LGMD 2E	4q12	$\beta$ -Sarcoglycan
LGMD 2F	5q33-q34	$\delta$ -Sarcoglycan
Dystrophie Musculaire Congénitale (CMD)		
MCD « classique »	6q22	Laminine $\alpha$ 2

Tiré et adapté de Cohn et Campbell (2000).

### 2.3.2 Les sarcoglycans sont importants dans la stabilisation du dystroglycan et de la dystrophine à la membrane

Le complexe du DG ( $\beta$ -DG- $\alpha$ -DG) est associé avec le complexe transmembranaire des SGs-SPN, cependant la nature de cette interaction n'est pas encore bien définie. Dans le muscle, la stabilité de la liaison du  $\beta$ -DG avec l' $\alpha$ -DG et la dystrophine à la membrane dépendrait de la présence du complexe des SGs, puisque l'absence de ce complexe fragilise ces liaisons au sarcolemme (Roberds et al., 1993; Araishi et al., 1999). Le bris du lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire qui en résulte cause souvent une diminution de l'expression des autres PAD dans les muscles cardiaque et squelettique (Roberds et al., 1993; Sakamoto et al., 1997; Duclos et al., 1998; Araishi et al., 1999). D'ailleurs, dans les sarcoglycanopathies, nous retrouvons le fragment de 30 kDa du  $\beta$ -DG dans le muscle squelettique, alors qu'il n'y est pas normalement exprimé. Le clivage du  $\beta$ -DG, causé par les métalloprotéinases (MMPs), désintègre le complexe du DG, ce qui cause aussi un phénotype de dystrophie musculaire

(Yamada et al., 2001). Il est donc logique de penser que le complexe des SGs protège le  $\beta$ -DG contre le clivage par les MMPs dans les muscles squelettiques normaux en masquant le site de clivage (Yamada et al., 2001).

## 2.4 La dystrobrevine

### 2.4.1 Les isoformes de la dystrobrevine et leur expression tissulaire différentielle

Les dystrobrevines (DBs) sont des protéines sous-membranaires faisant partie du complexe PAD. Ces protéines sont codées par deux gènes différents et sont sujettes à une régulation par épissage alternatif (Sadoulet-Puccio et al., 1996; Ambrose et al., 1997; Peters et al., 1997b). Le gène codant pour l' $\alpha_1$ - , $\alpha_2$ - et  $\alpha_3$ -DB (94 kDa, 62 kDa et 40 kDa, respectivement) est localisé sur le chromosome 18q12.1-12.2. Ces trois isoformes de la DB sont différenciellement tronqués au C-terminal (Sadoulet-Puccio et al., 1996; Yoshida et al., 2000). De plus, il existe des isoformes de l' $\alpha_1$ -DB et l' $\alpha_2$ -DB provenant d'un épissage alternatif approfondi. En effet, ces isoformes comportent trois régions variables (*rv*1-3) où il peut y avoir insertion d'une séquence supplémentaire (Ambrose et al., 1997). Le gène codant pour la  $\beta$ -DB (71 kDa) est localisé sur le chromosome 2q22-23 (Peters et al., 1997b). Les régions variables (*rv*1-3) de l' $\alpha$ -DB sont conservées dans la  $\beta$ -DB qui contient une *rv* supplémentaire (*rv*-4) (Peters et al., 1997b).

Les isoformes de l' $\alpha$ -DB sont principalement exprimés au niveau des muscles squelettique et cardiaque (Sadoulet-Puccio et al., 1996; Ambrose et al., 1997; Newey et al., 2000). Toutefois, l' $\alpha_1$ -DB est aussi exprimée au niveau du cerveau (Blake et al., 1999). Pour ce qui est de la  $\beta$ -DB, elle est spécifiquement exprimée dans les tissus non-musculaires dont le cerveau, le cervelet, les reins et le pancréas (Peters et al., 1997b; Blake et al., 1999; Ueda et al., 2000). Dans le cerveau, la  $\beta$ -DB est principalement exprimée au

niveau des neurones, alors que l' $\alpha_1$ -DB est exprimée au niveau des astrocytes (Blake et al., 1999).

#### **2.4.2 La dystrobrevine se lie au complexe des protéines associées à la dystrophine et peut être associée à une myopathie**

La dystrobrevine lie le complexe PAD via un domaine super-hélicoïdal à son C-terminal en interagissant avec le même type de domaine au C-terminal de la dystrophine (Sadoulet-Puccio et al., 1997). Le seul isoforme ne pouvant se lier à la dystrophine est l' $\alpha_3$ -DB qui ne contient pas le domaine de liaison en son C-terminal (Yoshida et al., 2000). Au niveau des muscles cardiaque et squelettique, l' $\alpha$ -DB interagit également avec le complexe des SG-SPN par son N-terminal, ce qui explique, en partie, la diminution de l'expression de la DB dans les sarcoglycanopathies (Yoshida et al., 2000). La DB se lie à la syntrophine et le complexe DB-syntrophine peut interagir avec le complexe PAD. Cette interaction peut avoir lieu indépendamment d'une liaison de la DB à la dystrophine, puisque la DB peut interagir directement avec les SGs qui à leur tour se lient aux PAD (Crawford et al., 2000; Yoshida et al., 2000). Les DBs peuvent se lier à une seule syntrophine, à l'exception des isoformes d' $\alpha_1$ . et d' $\alpha_2$ -DB qui possèdent l'insert en rv-3, puisque ce dernier contient un deuxième site de liaison à la syntrophine (Newey et al., 2000). La syntrophine, pour sa part, peut aussi se lier à l'enzyme de signalisation, nNOS. Une déficience en  $\alpha_{1,2}$ -DB, dans le muscle, cause une baisse de l'expression de nNOS à la membrane plasmique. Chez les souris *knock out* pour l' $\alpha_1$ -DB, la signalisation médiée par le NO est altérée. Ceci se traduit au niveau phénotypique par une myopathie dans les muscles squelettique et cardiaque (Grady et al., 1999).

### **2.4.3 La fonction de la dystrobrevine est régulée par sa phosphorylation**

La DB contient 2 sites majeurs de phosphorylation ( aux résidus Tyr-693 et Tyr-710) situés dans le domaine C-terminal, lequel est sujet à un épissage alternatif (Balasubramanian et al., 1998). Les isoformes ne contenant pas ces sites de phosphorylation sont exprimés dans tous les tissus, alors que ceux les contenant sont exprimés seulement au niveau du muscle et du cerveau où ils sont concentrés dans les synapses (Balasubramanian et al., 1998). Ces derniers sont associés plus fermement aux membranes plasmiques et à la syntrophine (Balasubramanian et al., 1998). L'état de phosphorylation des DBs pourrait déterminer son rôle dans une ou des voies de signalisation (Balasubramanian et al., 1998).

## **2.5 La syntrophine**

### **2.5.1 Les isoformes de la syntrophine et leur expression tissulaire différentielle**

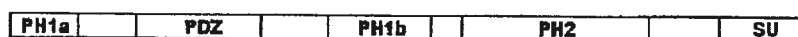
Les syntrophines (Syn) font partie d'une famille de protéines constituée de 5 membres, soit l' $\alpha_1$ - (54 kDa), la  $\beta_1$ - (58 kDa), la  $\beta_2$ - (58 kDa), la  $\gamma_1$ - (58 kDa) et la  $\gamma_2$ -Syn (60 kDa) (Adams et al., 1995; Ahn et al., 1996; Piluso et al., 2000). Chacun de ces isoformes est codé par un gène distinct (Adams et al., 1995; Ahn et al., 1996; Piluso et al., 2000). La  $\beta_1$ - et la  $\beta_2$ -Syn sont ubiquitaires, alors que l' $\alpha_1$ -Syn est exprimée principalement dans les muscles striés (squelettique et cardiaque) et dans le cerveau. Au niveau du muscle squelettique, l' $\alpha_1$ -Syn s'associe aux complexes PAD contenant la dystrophine sans être spécifiquement concentrée au niveau de la JNM (Peters et al., 1997a). La  $\beta_2$ -Syn, pour sa part, est concentrée aux JNMs où elle s'associe aux complexes PAD contenant l'utrophine (Peters et al., 1997a). La  $\beta_1$ -Syn peut interagir avec les complexes PAD contenant la



dystrophine et l'utrophine et est localisée aussi bien au niveau jonctionnel qu'extra-jonctionnel. Pour ce qui est des deux derniers membres de la famille des syntrophines, l'isoforme  $\gamma_1$ -Syn est spécifique au cerveau, alors que le  $\gamma_2$ -Syn est exprimé dans le cerveau ainsi que dans le muscle squelettique (Piluso et al., 2000).

### 2.5.2 La syntrophine et ses domaines fonctionnels

La syntrophine comporte des domaines fonctionnels dont deux domaines homologues à la pleckstrine (PH, *Pleckstrin homology domains*), un domaine PDZ (*PSD95- Discs Large- Zona Occludens-1*) et un domaine unique à la syntrophine (SU, *Syntrophin Unique domain*) (Adams et al., 1995; Ahn et al., 1996; Piluso et al., 2000). Le PH1, au N-terminal, est divisé en deux régions (PH1a et b) et la séquence entre ces deux régions contient le domaine PDZ (voir figure 4, ci-dessous). Le deuxième PH (PH2) se situe au C-terminal, adjacent au domaine SU qui est à l'extrémité du C-terminal (Adams et al., 1995; Ahn et al., 1996; Piluso et al., 2000). Les domaines PH2 et SU agissent de concert pour interagir avec la dystrophine, l'utrophine et la dystrobrevine (Adams et al., 1995; Ahn et al., 1996; Kachinsky et al., 1999; Piluso et al., 2000). Le domaine PH1 permet à la syntrophine de s'oligomériser avec d'autres syntrophines, sans impliquer le domaine PDZ, ce qui permet à la syntrophine de recruter d'autres protéines au complexe PAD par l'intermédiaire de ce domaine (Yang et al., 1995a; Oak et Jarrett, 2000).



**Figure 4.** Représentation schématique des domaines fonctionnels de l' $\alpha_1$ -syntrophine. Tirée et adaptée de Oak et al. (2001).

### **2.5.3 Les syntrophines interagissent avec des protéines de signalisation et des canaux ioniques**

Le rôle majeur des syntrophines est de recruter des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. La syntrophine peut se lier à un domaine SH3 de Grb2 par une séquence riche en proline adjacente et chevauchant la partie du domaine PH1 le plus près du N-terminal (Oak et al., 2001). De plus, la syntrophine interagit avec la nNOS, une autre protéine de signalisation. Cette interaction se fait par l'intermédiaire du domaine PDZ de la syntrophine (Adams et al., 2001) et d'un motif en épingle à cheveux positionné en aval du domaine PDZ de la nNOS (Abdelmoity et al., 2000). Chez les patients atteints de DMD, la nNOS n'est plus exprimée à la membrane plasmique (Thomas et al., 1998). Cette perte de nNOS reflète probablement la perte conjointe de syntrophine.

La syntrophine interagit avec des canaux ioniques, tel que les canaux sodiques, au niveau des muscles squelettique et cardiaque. Cette interaction requiert le domaine PDZ de la syntrophine et la séquence consensus (S/T)XV-COOH de ces canaux (Gee et al., 1998). Par ailleurs, la syntrophine interagit avec des canaux perméables à l'eau, appelés aquaporine-4 (AQP4), par son domaine PDZ (Adams et al., 2001). Toutefois, une implication directe des domaines PDZ et SXV dans cette interaction n'a pas encore été prouvée (Neely et al., 2001).

### **2.5.4 Une déficience en $\beta$ -syntrophine est impliquée dans des myopathies humaines**

Une étude des myopathies chez l'humain a révélé une déficience en  $\beta$ -Syn et en  $\alpha$ -DB chez 10% des patients, bien qu'aucune mutation ne soit trouvée dans les gènes de ces deux protéines (Jones et al., 2003). Ceci suggère que les mutations se produisent dans des gènes codant d'autres

composantes du complexe Syn-DB ou dans des gènes codant pour des protéines importantes dans la modification post-traductionnelle de la syntrophine et/ou de la dystrobrevine (Jones et al., 2003). Quoiqu'il en soit, cette étude démontre bien l'importance de la syntrophine au sein du complexe PAD.

### **3. Homéostasie de l'eau et du potassium dans le système nerveux central : relation possible avec le complexe PAD**

#### **3.1 L'aquaporine-4**

##### **3.1.1 L'aquaporine-4 : description et expression tissulaire différentielle**

L'aquaporine-4 (AQP4) est exprimée au niveau des reins, des poumons, de la rétine, des cortex cérébral et cérébelleux, de la moelle épinière et des muscles squelettiques (Jung et al., 1994; King et al., 2000; Crosbie et al., 2002). L'AQP4 est une protéine de 30-32 kDa à 6 domaines transmembranaires formant un pore spécifique à l'eau (Jung et al., 1994). Le pore est constitué de deux motifs NPA (Asparagine-Proline-Alanine), le premier est localisé dans la moitié du *N*-terminal et le second dans la moitié du *C*-terminal (Jung et al., 1994; King et al., 2000). Plusieurs aquaporines présentent une cystéine en position 189 du *C*-terminal leur conférant une sensibilité au mercure, cependant l'AQP4 n'a pas de cystéine à cette position et sa perméabilité ne semble pas affectée par la présence de mercure (Jung et al., 1994). L'AQP4 forme des oligomères exprimés au niveau de la membrane plasmique (Yang et al., 2000).

##### **3.1.2 L'aquaporine-4 dans le muscle**

Au niveau du muscle, l'AQP4 est exprimée au sarcolemme, mais pas aux JNMs (Crosbie et al., 2002). Elle peut jouer un rôle dans

l'accommodation des changements rapides du volume de la cellule et des forces hydrostatiques qui se produisent lors de la contraction musculaire pour prévenir des dommages au sarcolemme. L'expression de l'AQP4 est réduite à la membrane plasmique quand le SG ou la dystrophine sont déficients (Crosbie et al., 2002), suggérant un rôle pour ces deux protéines dans le ciblage/stabilisation de l'AQP4 à la membrane plasmique.

### **3.1.3 L'aquaporine-4 dans le cerveau**

Dans le cerveau, cette protéine est concentrée dans les astrocytes situés autour des vaisseaux sanguins et contribue à l'homéostasie de l'eau (Neely et al., 2001). Elle est responsable de la grande perméabilité à l'eau des astrocytes (Nicchia et al., 2003). L'AQP4 est maintenue à la membrane via l'interaction qu'elle entretient avec le domaine PDZ de la syntrophine, puisqu'une mutation de ce domaine entraîne une délocalisation de l'AQP4 qui se retrouve en grande partie au niveau cytoplasmique (Adams et al., 2001). Il semble donc que le domaine PDZ de la syntrophine contribue à la stabilisation de l'AQP4 à la membrane, puisque la délétion de ce domaine accélère sa vitesse de dégradation (Neely et al., 2001). Chez les souris *knock out* pour l' $\alpha$ -syntrophine, les niveaux d'expression de l'AQP4 semblent normaux, mais sa polarisation est inversée (Neely et al., 2001). En effet, dans le cervelet et le cortex, l'expression de l'AQP4 diminue dans les membranes plasmiques des astrocytes faisant face aux vaisseaux sanguins, alors qu'elle augmente considérablement dans celles faisant face au neuropil (Neely et al., 2001).

### **3.1.4 Une diminution de l'expression d'aquaporine-4 dans le cerveau perturbe la barrière hémato-encéphalique**

Chez les souris mdx, mutante pour la dystrophine, il y a une diminution progressive d'AQP4 dans le cerveau (de 70%) et dans les muscles squelettiques (jusqu'à 90%), malgré un niveau d'ARNm normal (Frigeri et al.,

2001). Cette baisse d'AQP4 est accompagnée d'un gonflement des processus astrocytaires péri-vasculaires (Frigeri et al., 2001; Nico et al., 2003). Les souris *mdx* montrent une barrière hémato-encéphalique rompue, puisque les cellules endothéliales vasculaires présentent des jonctions serrées ouvertes, entourées de processus gliaux gonflés (Nico et al., 2003).

### **3.1.5 L'absence d'aquaporine-4 chez des souris mutantes pour la dystrophine prévient le développement de l'œdème cérébral**

Des souris mutantes pour la dystrophine présentent une baisse drastique d'AQP4 dans les pieds terminaux des astrocytes, de même qu'une diminution de l' $\alpha$ -syntrophine. Ces baisses d'expression retardent l'apparition de l'œdème induit expérimentalement (Vajda et al., 2002). Une autre étude sur des souris *knock out* pour l'AQP4 montre aussi une meilleure survie à l'œdème du cerveau (Manley et al., 2000). Cette étude rapporte une baisse de 35% de l'œdème cérébral comparativement aux contrôles, 24 heures après l'induction expérimentale de l'œdème. L'œdème cérébral joue un rôle critique dans la pathophysiologie et la morbidité dans une variété de désordres du système nerveux causés par des traumatismes crâniens, des tumeurs et des infections. L'absence de l'AQP4 à la membrane induit une altération de l'expression de gènes connus pour leur implication dans l'œdème cérébral (Nicchia et al., 2003). En effet, l'expression de NGFI-B et de *c-fos* est augmentée, alors que celle de GLUT1, de l'hexokinase et de la metallothéonéine-1 est réduite (Nicchia et al., 2003). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'AQP4 est impliquée dans le développement de l'œdème du cerveau.

## **3.2 Les canaux potassiques à rectification entrante : Kir4.1**

### **3.2.1 L'importance de l'homéostasie des ions potassiques dans le cerveau et la rétine**

L'activité neuronale s'accompagne par une libération de potassium ( $K^+$ ) dans le milieu extracellulaire permettant une re-polarisation des neurones (revue dans Horio, 2001). Cependant, l'excès de  $K^+$  dans le milieu extracellulaire, qui en contient peu normalement, pourrait provoquer une augmentation de  $K^+$  dans le neurone, s'il n'est pas éliminé de l'espace extracellulaire. Une forte augmentation de  $K^+$  dans les neurones peut induire une hyperexcitabilité et une synchronisation anormale de ces derniers. Les cellules gliales sont indispensables pour réguler l'homéostasie ionique extracellulaire et ainsi éviter une perturbation de l'activité neuronale. Elles agissent en transportant le  $K^+$  extracellulaire par des canaux potassiques concentrés sur leur membrane plasmique. Le  $K^+$  qui entre dans la cellule gliale est transporté le long de cette dernière pour être déversé dans les vaisseaux sanguins et l'humeur vitrée (dans l'œil) par l'intermédiaire des canaux potassiques concentrés à la membrane plasmique de la cellule gliale. L'entrée et la sortie des ions  $K^+$  dans les cellules gliales sont couplées à des mouvements d'eau à travers la membrane plasmique via des canaux spécifiques à l'eau, comme les aquaporines.

### **3.2.2 Les Kir4.1 sont concentrés au niveau de la membrane plasmique des cellules gliales**

Les canaux potassiques à rectification entrante, Kir4.1 (43 kDa), confèrent la majeure partie de la conductance potassique aux cellules de Müller, la glie radiaire de la rétine qui constitue la principale population de cellules gliales dans ce tissu (Kofuji et al., 2000). Chez des souris *knock out* pour les Kir4.1 (Kir4.1<sup>-/-</sup>), les cellules de Müller présentent une conductance

10 fois plus faible et une dépolarisation marquée. En effet, les cellules de Müller normales ont un potentiel de repos d'environ  $-85$  mV, alors que celui des cellules Kir4.1<sup>-/-</sup> est de  $-13$  mV (Kofuji et al., 2000). Les Kir4.1 sont agrégés dans la portion distale des pieds terminaux des cellules de Müller, mais ils sont aussi concentrés le long de leurs processus et autour des vaisseaux sanguins (Ishii et al., 1997; Tian et al., 2003). Les Kir4.1 et l'AQP4 sont co-enrichis autour des vaisseaux sanguins et dans les pieds terminaux des cellules de Müller au niveau de la membrane limitante interne qui sépare la rétine de l'humeur vitrée (Connors et Kofuji, 2002; Dalloz et al., 2003). Cette distribution dépend de la présence de l'isoforme de 71 kDa de la dystrophine (Dp71) (Connors et Kofuji, 2002; Dalloz et al., 2003).

Au niveau du cerveau, les Kir4.1 sont exprimés dans les processus astrocytaires entourant les vaisseaux sanguins, mais aussi dans ceux entourant les synapses du néocortex, des couches de cellules pyramidales de l'hippocampe et du bulbe olfactif (Poopalasundaram et al., 2000; Higashi et al., 2001; Li et al., 2001).

### **3.2.3 Les Kir4.1 interagissent avec des protéines possédant des domaines PDZ**

Les Kir4.1 possèdent une séquence Sérine-Asparagine-Valine (SNV) à leur C-terminal suggérant une interaction possible avec des protéines d'ancrage de la famille de la PSD-95 (contenant des domaines PDZ) (Horio et al., 1997). Horio et al. (1997) montrèrent que la co-expression de la PSD-95 et de Kir4.1 dans une lignée cellulaire (HEK293T) provoquait l'agrégation des Kir4.1 et une augmentation significative du courant généré par ces canaux (Horio et al., 1997). De plus, ils ont observé que la SAP97, une protéine de la famille de la PSD-95, induisait l'agrégation des Kir4.1 dans des cellules de Müller en culture. Ceci signifierait que des protéines de la famille

de la PSD-95 peuvent agir comme régulateurs de la distribution et de la fonction des Kir4.1 (Horio et al., 1997).

#### 4. Objectifs de l'étude

Les Kir4.1 et l'AQP4 sont co-enrichis dans les pieds terminaux des cellules de Müller aboutissant à l'humeur vitrée et dans les processus gliaux entourant les vaisseaux sanguins. Cette distribution polarisée permet aux cellules de Müller d'expulser l'excès d'ions  $K^+$ , toxique pour les neurones, dans la circulation sanguine et dans l'humeur vitrée. Au niveau du cerveau, les astrocytes utilisent le même mécanisme pour réguler l'homéostasie du  $K^+$ . L'entrée et la sortie des ions  $K^+$  s'accompagnent d'un changement d'osmolarité, ce qui impose un couplage entre le transport de  $K^+$  et les mouvements d'eau à travers la membrane plasmique.

Les patients souffrant de DMD et BMD présentent des anomalies au niveau de l'activité rétinienne caractérisées essentiellement par une diminution de l'amplitude de l'onde b (Pillers et al., 1993). De manière similaire, des souris mutantes pour la dystrophine (Pillers et al., 1995) et des souris *knock out* pour l'AQP4 (Li et al., 2002) présentent une baisse de l'amplitude de cette onde. Rappelons que **(1)** l'onde b est générée suite à des mouvements de  $K^+$  par l'intermédiaire des canaux Kir4.1 et que **(2)** la distribution des Kir4.1 et de l'AQP4 est perturbée chez les souris mutantes pour la dystrophine. Bien que ces données suggèrent un rôle de la dystrophine dans la distribution normale des Kir4.1 et de l'AQP4, le ou les signaux extracellulaires à la base de cette distribution n'ont pas été mis en évidence.

L' $\alpha$ -DG, un composant du complexe PAD, est un récepteur pour la laminine (Smalheiser et Schwartz, 1987; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Nous savons que la laminine est exprimée dans la matrice



extracellulaire (MEC) située entre les pieds terminaux des astrocytes et les cellules endothéliales vasculaires (Sievers et al., 1994; Hagg et al., 1997; Lom et Hockberger, 1997; Wagner et Gardner, 2000) et qu'elle est co-distribuée avec l' $\alpha$ -DG à ce niveau (Tian et al., 1996). La laminine et l' $\alpha$ -DG sont également fortement exprimés au niveau de la membrane limitante interne là où sont localisés les pieds terminaux des cellules de Müller (Montanaro et al., 1995; Moukhles et al., 2000).

Sachant que la laminine est située dans la MEC et qu'elle lie l' $\alpha$ -DG avec une haute affinité, nous avons entrepris d'étudier le rôle de la matrice extracellulaire dans le ciblage des canaux Kir4.1 et AQP4 dans des domaines spécifiques des cellules gliales. Nos études visent à mettre en évidence les mécanismes moléculaires responsables de la distribution polarisée des Kir4.1 et de l'AQP4, essentielle pour l'homéostasie du  $K^+$  et de l'eau dans le système nerveux central.

Ce travail fut effectué en utilisant des cultures primaires de cellules mixtes d'hippocampe afin d'étudier les astrocytes dans un environnement contenant des neurones. De plus, nous avons également utilisé des cultures primaires d'astrocytes pures ainsi que des cultures de cellules de Müller. Ces deux derniers systèmes de culture nous ont permis d'étudier l'agrégation des Kir4.1 et de l'AQP4 en absence de cellules neuronales. Les astrocytes et les cellules de Müller sont deux populations de cellules gliales interagissant avec les protéines de la MEC et ayant pour rôle commun l'homéostasie de l'eau et du  $K^+$  dans le système nerveux central. Donc, ces systèmes de culture constituent des modèles appropriés pour nos études du rôle de la MEC dans la distribution polarisée des canaux Kir4.1 et AQP4, essentielles à cette homéostasie.

## **II- Articles**

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1. IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT ET DU PROGRAMME

Eric Guadagno,  
M.Sc. (Sciences Biologiques)

### 2. DESCRIPTION DE L'ARTICLE

**Auteurs :** Eric Guadagno et Hakima Moukhles

**Titre :** Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes

**Revue :** Glia

**Date de soumission :** 27 octobre 2003

**État :** article en revue

### 3. DECLARATION DE TOUS LES COAUTEURS AUTRES QUE L'ÉTUDIANT

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Eric Guadagno** inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : **Implication du dystroglycan et des protéines associées dans le ciblage des canaux potassiques, Kir4.1, et des canaux aqueux, AQP4, au niveau des astrocytes.**

HAKIMA MOUKHLES (DIRECTEUR)

Coauteur

Signature

14/11/2003

Date

## Premier Article

**Ordre des auteurs :** Eric Guadagno et Hakima Moukhles

**Titre :** Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes

**État de l'article :** accepté au journal *Glia* en février 2004

J'ai effectué toutes les expériences et les quantifications nécessaires à l'élaboration des figures de l'article. De plus, j'ai activement participé à la rédaction de l'article.



Eric Guadagno


**Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes**

Guadagno Eric and Moukhles Hakima\*

Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

Running title: Laminin aggregates Kir4.1 and AQP4 channels

\*Address correspondence to Dr H. Moukhles, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale centre-ville, Pavillon Marie-Victorin, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

  
Tel: (514) 343-6847

Key words: dystrophin associated proteins, potassium buffering, water homeostasis, glial cells

## Abstract

Dystroglycan (DG) is part of a multiprotein complex that links the extracellular matrix to the actin cytoskeleton of muscle fibers and that is involved in aggregating acetylcholine receptors at the neuromuscular junction. This complex is also expressed in regions of the central nervous system where it is localized both to neuronal and glial cells. DG and the inwardly rectifying potassium channels, Kir4.1, are concentrated at the interface of astroglia and small blood vessels. These channels are involved in siphoning potassium released into the extracellular space after neuronal excitation. This raises the possibility that DG may be involved in targeting Kir4.1 channels to specific domains of astroglia. To address this question, we used mixed hippocampal cultures to investigate the distribution of DG, syntrophin, dystrobrevin, Kir4.1 channels as well as aquaporin permeable water channels, AQP4. These proteins exhibit a similar distribution pattern and form aggregates in astrocytes cultured on laminin. Both DG and syntrophin colocalize with Kir4.1 channel aggregates in astrocytes. Similarly, DG colocalizes with AQP4 channel aggregates. Quantitative studies show a significant increase of Kir4.1 and AQP4 channel aggregates in astrocytes cultured in the presence of laminin when compared with those in the absence of laminin. These findings show that laminin has a role in Kir4.1 and AQP4 channel aggregation and suggest that this may be mediated via a dystroglycan-containing complex. This study reveals a novel functional role for DG in brain including K<sup>+</sup> buffering and water homeostasis.

## Introduction

Duchenne muscular dystrophy is caused by mutations in the dystrophin gene (Hoffman et al. 1987; Worton 1995). Dystrophin is a large subplasmalemmal protein expressed in many tissues including skeletal muscle and the central nervous system (reviewed in Worton 1995; Mehler 2000). Research by several groups has led to the identification of a complex of dystrophin associated proteins (DAPs). This complex has been characterized best in skeletal muscle where it consists of 1 extracellular protein:  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG), 7 transmembrane proteins:  $\beta$ -dystroglycan ( $\beta$ -DG) a cotranscript of  $\alpha$ -DG,  $\alpha$ -,  $\beta$ -  $\gamma$ -,  $\delta$ ,  $\epsilon$ -sarcoglycans and sarcospan, and at least 6 intracellular proteins, syntrophin, dystrobrevin, syncoilin, caveolin-3, Grb2 and n-NOS (reviewed in Ehmsen et al., 2002). Based on the binding of the DAP complex to extracellular matrix proteins through  $\alpha$ -DG and to actin through dystrophin/utrophin (Ibraghimov-Beskrovnya et al. 1992; Ervasti and Campbell 1993; Gee et al. 1993), it is now generally thought that this complex links the submembranous cytoskeleton of the myofiber to the surrounding basement membrane, maintaining the structural integrity of the muscle fiber during repeated cycles of contraction and relaxation. Several studies have strongly implicated DAPs in the clustering of acetylcholine receptors at the neuromuscular junction, providing clear evidence for a role of these proteins in the formation and maintenance of neuromuscular synapses (Jacobson et al. 1998; Cote et al. 1999; Adams et al. 2000; Grady et al. 2000; Jacobson et al. 2001).

Dystrophin (Lidov et al. 1990; Gorecki et al. 1992) and DG (Gorecki et al. 1994; Montanaro et al. 1995; Tian et al. 1996) are widely expressed in the central nervous system (CNS) where they form complexes both in neuronal and glial cells (Blake et al. 1999; Moukhles et al. 2000; Moukhles and Carbonetto 2001). Studies by Levi et al (2002) showed that DG colocalizes with a subset of GABAergic synapses in neuronal cultures. However, the

GABA<sub>A</sub> receptor clusters seem to be normal in DG null neurons (Levi et al. 2002). In contrast, a brain-specific deletion of DG in mice results in the loss of dystrophin in astrocytic processes and a discontinuity in the glia limitans of the cerebral cortex that may disrupt the organization of radial glia necessary for neuroblast migration (Moore et al. 2002). In addition, that deletion results in an impairment of long-term potentiation, implicating DG in a postsynaptic function in the brain.

Based on the localization of DG (Tian et al. 1996; Moukhles and Carbonetto 2001), Dp140 and (Lidov et al. 1995), utrophin (Khurana et al. 1995) and  $\alpha$ 1-dystrobrevin (Blake et al. 1999) to glial cells in brain, it has been postulated that these proteins may be involved in the adhesion of the perivascular glia to the extracellular matrix through an interaction of  $\alpha$ -DG with laminin (Tian et al. 1996). Recent data by Nico et al (2003) reported blood brain barrier break-down in mice mutant for dystrophin. These mice presented also with swollen perivascular processes accompanied by a dramatic reduction in the expression of the water permeable channel, AQP4 (Frigeri et al. 2001; Nico et al. 2003). Furthermore, in the retina of mice mutant for Dp71 there is a disrupted distribution of the inwardly rectifying potassium channels, Kir4.1, at Müller cell endfeet abutting the vitreous as well as at their processes surrounding blood vessels (Connors and Kofuji 2002) implicating Dp71 in the targeting of these glial channels that have been implicated in the regulation of extracellular K<sup>+</sup> (Kofuji et al. 2000). Studies by Nagelhus et al (1999) showed that Kir4.1 and AQP4 channels are co-enriched in the plasma membrane facing blood vessels corroborating the coupling between K<sup>+</sup> buffering and water flux reported in the nervous system (Dietzel et al. 1980; Svoboda and Sykova 1991; Li et al. 1994; Holthoff and Witte 1996). We and others have previously shown that  $\alpha$ -DG and laminin are concentrated in Müller cell endfeet in the inner limiting membrane as well as around blood vessels (Montanaro et al. 1995; Moukhles et al. 2000) and that  $\alpha$ -DG is also expressed in radial processes of Müller cells (Moukhles et al.



2000). Interestingly, this pattern is strikingly similar to that of Kir4.1 and AQP4 channels (Newman 1993; Ishii et al. 1997; Nagelhus et al. 1999) in Müller cells.

These data together with observations that laminin acts through dystroglycan to cluster acetylcholine receptors on skeletal myotubes (Montanaro et al. 1998; Cote et al. 1999; Jacobson et al. 2001) prompted us to investigate the effect of laminin on Kir4.1 and AQP4 channel distribution in hippocampal cultured cells. We show that laminin induces the aggregation of Kir4.1 and AQP4 channels and that these co-distribute with  $\alpha$ -DG and syntrophin. Our data suggest a role for laminin and a dystroglycan-containing complex in targeting and stabilizing Kir4.1 and AQP4 channels in astrocytic cells, which may be critical for K<sup>+</sup> buffering and water homeostasis in brain.

## **Materials and methods**

### **Antibodies**

Mouse mAb to  $\alpha$ -DG, VIA4.1, was raised against rabbit skeletal muscle membrane (1/100, Upstate Biotechnology, NY, USA); mouse mAb antibody to  $\beta$ -DG, 43DAG1/8D5, was raised against the 15 of the last 16 amino-acids at the C-terminus of the human dystroglycan sequence (Novocastra Laboratories, Newcastle-upon-tyne, UK); mouse mAb to syntrophin, SYN1351, was raised against *Torpedo* syntrophin and rabbit anti- $\alpha$ 1-dystrobrevin, DB638, was raised against residues 638-658 of mouse  $\alpha$ 1-dystrobrevin (1/50, generous gift from Dr S Froehner, University of Washington, WA, USA); rabbit antisera to Kir4.1 and AQP 4 were raised against residues 356-375 of rat Kir4.1 and against rat GST AQP4 corresponding to residues 249-323, respectively (1/100, Alomone Labs, Jerusalem, Israël); rabbit anti-GFAP was raised against bovine GFAP isolated from cow spinal cord (1/300, DakoCytomation, Inc., CA, USA) and mouse mAb antibody to myelin basic protein, SMI99, was raised against

residues 131-136 of human myelin basic protein (1/1000, Sternberger Monoclonals, Inc., Maryland, USA). The primary antibodies described above were visualized using fluorochrome-conjugated secondary antibodies: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (1/200, Molecular Probes).

### **Primary cell cultures**

Primary cultures were prepared from postnatal day 1 rats (P1) (Sprague Dawley, Charles River) using a method adapted from the protocol described by Ji et al (1998). Hippocampi were dissected and meninges and choroid plexus were removed. Then, they were cut in small pieces, rinsed with warm HBSS (Gibco) and incubated for 3-5 minutes with trypsin (3.0 mg/mL; Gibco) and DNase (0.6 mg/mL; Sigma) prepared in a solution containing 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES and 4 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7.4). After extensive washes with Neurobasal-A medium pre-heated at 37°C, the tissue was dissociated in Neurobasal-A medium containing 0.3% BSA and 12 mM MgSO<sub>4</sub>. Dissociated hippocampi were then plated on 18 mm round glass coverslips coated with either poly-D-lysine (0.1 mg/ml; Sigma) alone or poly-D-lysine plus laminin-1 (15 nM; Sigma) in 12-well plates at a density of 450 x 10<sup>3</sup>-500 x 10<sup>3</sup> cells per well in Neurobasal-A medium containing 2% B27 serum-free supplement (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco), 1 mM L-glutamine (Gibco) and 25 μM glutamic acid (Sigma). During the second day of culture, cytosine β-D-Arabinofuranoside (5 μM, Sigma) was added to reduce glial cell proliferation. On the fourth day of culture, the medium was replaced entirely by medium without glutamic acid and containing 2.5 μM of cytosine β-D-Arabinofuranoside. Thereafter, half of the medium was changed twice a week and immunocytochemistry experiments were performed on cells kept in culture for 3 weeks.

## **Immunolabeling**

*Brain sections.* Experiments were performed using adult male Sprague Dawley rats (Charles River) in accordance with the protocols of the animal care committee of University of Montreal. They were deeply anesthetized with a mixture of xylazine/ketamine (0.75 ml/100g, ip) and perfused intracardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS). The brains were isolated and post-fixed by immersion in 4% PFA overnight at 4°C and after several washes with PBS, they were cryoprotected in 30% sucrose prepared in 0.1 M PB. Then, they were embedded in Tissue-Tek® (O.C.T. compound, Pelco International) and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane (-80°C). Twelve to 15 µm coronal sections were cut using a cryostat and mounted on gelatin-coated slides. Sections were rinsed with PBS and incubated for 1 hour in a solution containing 10% goat serum (Sigma) and 0.3% Triton X-100. Double immunolabeling was performed by incubating the sections overnight at 4°C in the presence of primary antibodies to either  $\alpha$ -DG or  $\beta$ -DG and to Kir4.1 channels simultaneously. Other sections were incubated in the presence of antibodies to either  $\alpha$ -DG or  $\beta$ -DG and to AQP4 channels. Subsequently, they were rinsed with PBS 3 x 10 minutes and incubated in the presence of Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit for 1h30 at room temperature. To confirm the specificity of the immunolabeling, control sections were treated equivalently in the absence of the primary antibodies. The sections were mounted on glass coverslips using Immuno Fluor Mounting Medium (ICN Pharmaceuticals Inc., Canada).

*Hippocampal cultures.* Cells were rinsed with PBS and fixed for 15 minutes with 4% PFA prepared in PBS at room temperature. Then, they were permeabilized for 5 minutes with 0.25% Triton X-100 in PBS and incubated for 30 minutes in 3% BSA prepared in PBS. For double immunolabeling experiments, cells were incubated for 1 hour in the presence of the two primary antibodies simultaneously (anti- $\alpha$ -DG and anti-Kir4.1; anti-syntrophin

and anti-Kir4.1; anti- $\alpha$ -DG and anti-AQP4; anti- $\alpha$ -DG and anti-GFAP or anti-Kir4.1 and anti-myelin basic protein). Subsequently, cells were rinsed with PBS 3 x 10 minutes and incubated with both Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit for 1h at room temperature. After several washes with PBS, coverslips were mounted on glass slides. To verify the specificity of the rabbit antisera to Kir4.1 and AQP4 channels, these were pre-incubated for 1 hour with 10  $\mu$ g of the peptide used for the immunization (Alomone Labs) prior to incubating the cells. In addition, a control for the specificity of the immunolabeling that consisted of omitting the primary antibodies was included in every experiment. Images of both brain sections and cells in culture were captured with a QImaging Retiga 1300 monochrome 10-bit CCD camera mounted on a Nikon E-600 microscope using Northern Eclipse image analysis software (Empix Imaging Inc., Canada).

### **Quantitative analyses**

The number and surface area of Kir4.1 and AQP4 channel aggregates were determined on captured images that were subjected to a threshold using Northern Eclipse image analysis software. Pictures from the same experiment were captured using identical acquisition parameters and were subjected to the same threshold. Aggregates of variable fluorescence intensities were counted and only those with a surface area superior to 1  $\mu\text{m}^2$  were considered in our analyses. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 3.00 software and unpaired Student's *t-test*.

## **Results**

### **Co-localization of Kir4.1 and AQP4 with dystroglycan in brain sections**

Previous studies have shown that dystroglycan is expressed in astrocytic endfeet around blood vessels in the brain (Tian et al. 1996; Moukhles and Carbonetto 2001) suggesting a possible role for this protein in maintaining the integrity of the blood brain barrier through an interaction with extracellular

matrix proteins leading to the linkage of astrocytes to the vascular basement membrane. Several groups have reported that Kir4.1 channels are localized to perivascular glia both in the brain and retina (Nagelhus et al. 1999; Poopalasundaram et al. 2000; Higashi et al. 2001; Connors and Kofuji 2002). Similar observations have been made for water permeable channels i.e. AQP4 (Nielsen et al. 1997; Neely et al. 2001). To determine whether dystroglycan colocalizes with Kir4.1 channels, cryostat sections of adult rat brain were double immunolabeled for  $\alpha$ -DG or  $\beta$ -DG using mAbs and for Kir4.1 or AQP4 channels using rabbit antisera. We found that both  $\alpha$ -DG and  $\beta$ -DG are concentrated and colocalized with Kir4.1 (Fig. 1A, E, I, M and 1B, F, J, N) and AQP4 (Fig. 1C, G, K, O and 1D, H, L, P) around blood vessels in hippocampus. A similar colocalization was also seen throughout other brain regions such as cerebral cortex and cerebellum (data not shown). In addition to the immunoreactivity associated with blood vessels, a diffuse immunoreactivity for  $\alpha$ -DG (Fig. 1E and G),  $\beta$ -DG (Fig. 1F and H), Kir4.1 (Fig. 1I and J) and AQP4 (Fig. 1K and L) was seen in the neuropil. On the other hand, immunoreactivity for Kir4.1 and AQP4 channels was not detected in structures consisting mainly of myelin such as the corpus callosum arguing that they are not expressed by oligodendrocytes in adult rat brain. These data suggest that in addition to playing a role as a receptor for extracellular matrix proteins around blood vessels (Tian et al. 1996),  $\alpha$ -DG may also be implicated in regulating Kir4.1 and AQP4 channels distribution in perivascular astrocytes.

### **Expression of Kir4.1, AQP4, DG and associated proteins in hippocampal cells in culture**

Hippocampal cells plated on laminin-coated coverslips and kept in culture for 3 weeks were fixed and double immunolabeled for Kir4.1 or AQP4 and  $\alpha$ -DG or syntrophin. Kir4.1 (Fig. 2A and D) and AQP4 channels (Fig. 2G) were found to be concentrated in cell domains where they formed aggregates of varying shape, size and fluorescence intensity, in addition to a fainter more

diffuse cellular labeling.  $\alpha$ -DG (Fig. 2B) and syntrophin (Fig. 2E) were found to be diffusely distributed in the cells and highly concentrated at Kir4.1 aggregates (Fig. 2C and F). Similarly,  $\alpha$ -DG (Fig. 2H) co-localized with most AQP4 aggregates (Fig. 2I). To investigate the distribution of dystrobrevin, another component of the DAP complex, we immunolabeled hippocampal cultures grown on a laminin-containing substrate for  $\alpha$ 1-dystrobrevin using a rabbit antiserum. We found that in addition to a widespread immunoreactivity,  $\alpha$ 1-dystrobrevin (Fig. 3B) had an aggregated distribution pattern resembling that of Kir4.1 channels (Fig. 2A and D and Fig. 3A),  $\alpha$ -DG (Fig. 2B) and syntrophin (Fig. 2E). No specific signal for the channels or DG and associated proteins studied here was detected on the cells when the primary antibody was omitted. In addition, when the Kir4.1 and AQP4 antisera were pre-incubated for 1h with 10  $\mu$ g of the respective peptides used for the immunization, specific immunostaining for these channels could no longer be seen on the cells.

### **Expression of Kir4.1 and $\alpha$ -DG by astrocytes and oligodendrocytes**

The cells expressing aggregates of Kir4.1, AQP4,  $\alpha$ -DG, syntrophin and  $\alpha$ 1-dystrobrevin are large polygonal cells that are labeled with an antibody to GFAP, a marker for astrocytic cells. However, because both of the antibodies to GFAP and Kir4.1 channels were raised in rabbit, double immunofluorescence for GFAP and Kir4.1 channels could not be performed. As shown in figure 4C,  $\alpha$ -DG aggregates (Fig. 4B) are expressed by a GFAP positive cell (Fig. 4A) confirming that these aggregates are indeed expressed by astrocytic cells. Since Kir4.1 channels and  $\alpha$ -DG are co-aggregated (Fig. 2A-C), the expression of  $\alpha$ -DG aggregates reflects indirectly that of Kir4.1 channel aggregates on GFAP positive cells. In parallel experiments, we investigated the distribution of Kir4.1 channels in oligodendrocytes by double immunofluorescence using a rabbit antiserum to Kir4.1 channels and a mouse mAb to myelin basic protein. A very low density of myelin positive cells with an average of 3-4 cells/cover slip was seen in our cultures. In addition to

having a strong immunoreactivity for myelin associated with the cell bodies, these oligodendrocytes extended a myelin sheet formed by several branches (Fig. 4D) and expressed Kir4.1 channels (Fig. 4E and F).

### **Laminin increases the number but not the size of Kir4.1 and AQP4 aggregates**

Previous studies have shown that laminin can induce DG (Cohen et al. 1997; Montanaro et al. 1999) and AchR aggregation on muscle cells (Montanaro et al. 1998). To investigate whether  $\alpha$ -DG as well as Kir4.1 and AQP4 channel aggregation seen in astrocytic cells is induced by laminin, we cultured mixed hippocampal cells for 3 weeks on substrates containing poly-D-lysine alone or poly-D-lysine plus laminin. We found that in the absence of laminin, the immunoreactivity for  $\alpha$ -DG was punctate and uniformly distributed throughout the cells with virtually no aggregates (Fig. 5A) and that for Kir4.1 (Fig. 5B) and AQP4 channels (Fig. 5C) was mainly diffuse with several spontaneous aggregates that are more numerous for AQP4 (Fig. 5C; Fig. 6B). In Fig. 5B, the perinuclear distribution of Kir4.1 channels may reflect the localization of the protein in the Golgi apparatus. Comparison of the immunoreactivity for these proteins on cells grown in the absence (Fig. 5A-C) and the presence of laminin (Fig. 5D-F) reveals the formation of  $\alpha$ -DG aggregates and a striking increase in the number of Kir4.1 as well as AQP4 channel aggregates in cells grown on laminin.

Subsequently, we performed quantitative analyses on an average of 30 astrocytes from three different cultures. In the presence of laminin, the astrocytes presented almost a threefold increase (Fig. 6 A;  $56.14 \pm 6.59$  aggregates per astrocyte,  $p < 0.0001$ ) in the number of Kir4.1 channel aggregates compared with control cultures (Fig. 6 A;  $19.00 \pm 4.18$  aggregates per astrocyte). Similarly, AQP4 channel aggregates presented a 1.5-fold increase in the presence of laminin (Fig. 6B;  $73.00 \pm 4.42$  aggregates per astrocyte,  $p < 0.02$ ) over control (Fig. 6B;  $49.92 \pm 8.27$  aggregates per

astrocyte). These quantitative data show that laminin induces a significant increase in Kir4.1 and AQP4 channel aggregation in astrocytic cells. Based on the data relative to the co-aggregation of the channels with dystroglycan, syntrophin and dystrobrevin as illustrated in figures 2 and 3, it is very likely that the laminin-induced aggregation involves a dystroglycan-containing complex. It is noteworthy that in the absence of laminin a relatively high number of AQP4 as compared to Kir4.1 channel aggregates form (see Fig. 6) and that these are likely to be non DG-mediated since DG exhibits a punctate non-aggregated distribution pattern in the absence of laminin (see Fig. 5A).

Astrocytes expressed various numbers of Kir4.1 and AQP4 aggregates that ranged from 1 to 50 or more in the absence of laminin (Fig. 6 C and D). We arbitrarily defined 3 categories of astrocytes: those expressing 1-25 aggregates, 26-50 aggregates and more than 50 aggregates, to determine whether laminin induces an increase in the proportion of cells preferentially in one of the three categories. A high proportion of astrocytes (almost 80%) expressed 1-25 spontaneous Kir4.1 channel aggregates and none (0%) expressed more than 50 aggregates in the absence of laminin (Fig. 6C). In the presence of laminin, however, the largest proportion of astrocytes (80%) expressed more than 25 aggregates (Fig. 6C) and a minority expressed 1-25 aggregates. The number of astrocytes presenting AQP4 channel aggregates were essentially equally distributed between the three categories in the absence of laminin and almost all the cells (more than 90%) expressed more than 50 AQP4 aggregates/cell in the presence of laminin (Fig. 6D). Laminin therefore induces a significant increase in the proportion of astrocytes exhibiting high numbers of Kir4.1 as well as AQP4 channel aggregates.

Previous studies by Montanaro et al (1998) showed that in addition to increasing the number of AchR aggregates, laminin increases the size of these aggregates in skeletal myotubes. To investigate whether the increase in the number of Kir4.1 and AQP4 aggregates induced by laminin was



accompanied by a change in their size, we measured the surface area of the aggregates in cells grown in the presence or absence of laminin. The surface area of the aggregates ranged between 1 to 155  $\mu\text{m}^2$  in both conditions. We found that in the presence of laminin (Fig. 7B and D), the size distribution of Kir4.1 and AQP4 channel aggregates was essentially the same as in the absence of laminin (Fig. 7A and C) with the small aggregates (1-5  $\mu\text{m}^2$ ) outnumbering the large ones (>60-155  $\mu\text{m}^2$ ) by at least 20-fold. These results show that laminin induces an increase in the number of channel aggregates but does not affect their size.

## Discussion

### Kir4.1 and AQP4 expression in brain

Kir4.1 channels are found predominantly (Takumi et al. 1995; Poopalasundaram et al. 2000; Higashi et al. 2001) but not exclusively (Bredt et al. 1995; Li et al. 2001) in glial cells in the CNS. In the olfactory bulb, Kir4.1 channel immunoreactivity is associated with perivascular glia and in glial processes around reciprocal synapses (Higashi et al. 2001). AQP4 channels are also expressed in perivascular glia in brain (Nielsen et al. 1997; Neely et al. 2001). In accordance with these studies, we found that Kir4.1 and AQP4 channels were expressed around blood vessels in the endfeet of astrocytes and within the neuropil reflecting a possible association with astrocytic processes that wrap synapses. The co-expression of these channels around blood vessels supports a role for Kir4.1 and AQP4 channels in  $\text{K}^+$  and water funneling, respectively, through specialized astrocytic membrane domains facing the basal laminae. Moreover, their concentration at these loci suggests a contribution of extracellular matrix proteins such as laminin to their spatial distribution. Interestingly, in the present study we showed that both Kir4.1 and AQP4 channels are co-localized with  $\alpha$ -DG, a high affinity laminin binding receptor (Smalheiser and Schwartz 1987; Douville et al. 1988; Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992; Gee et al. 1993). Based on these data and on the

high expression of laminin  $\alpha 2$  in the vascular basement membrane as reported by Tian et al (1996), one may speculate that laminin works in concert with  $\alpha$ -DG to distribute Kir4.1 and AQP4 channels to specific membrane domains of the perivascular astrocytes allowing for K<sup>+</sup> siphoning and water flux during high neuronal activity.

While immunoreactivity for Kir4.1 and AQP4 channels was readily detected in perivascular astrocytes, it was absent in structures rich in myelin suggesting a lack of expression in oligodendrocytes of adult brain as previously reported by Higashi et al (2001). On the other hand, Neusch et al (2002) showed that Kir4.1 channels are expressed by myelin-synthesizing oligodendrocytes in the brain of new-born mice. Consistent with the latter studies, we show that oligodendrocytes immunoreactive for myelin expressed Kir4.1 channels in primary mixed cultures. Thus, Kir4.1 channel expression is differentially regulated during myelination and the cellular events relevant to its expression and function should be accessible for studies *in vitro*.

### **Laminin-induced Kir4.1 and AQP4 aggregation**

In the present study, we show that Kir4.1 and AQP4 channel aggregation can be initiated extracellularly by laminin.  $\alpha$ -DG is a high affinity laminin binding receptor (Smalheiser and Schwartz 1987; Douville et al. 1988; Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992; Gee et al. 1993) and integrins also bind laminin in various tissues (Belkin and Stepp 2000). Both  $\alpha$ -DG (Tian et al. 1996) and  $\beta 1$ -containing integrins are expressed in astrocytic cells (Tawil et al. 1994) and may therefore participate in laminin-induced Kir4.1 channel aggregation. In our studies, we used an antiserum that specifically recognizes  $\beta 1$ -integrin subunit (Tawil et al. 1990) and we found that laminin did not induce a change in its distribution (data not shown). In the presence of laminin,  $\beta 1$ -integrin had a diffuse pattern throughout the cells, whereas  $\alpha$ -DG underwent a rearrangement into aggregates on the surface of astrocytes. More interestingly, we found that  $\alpha$ -DG aggregates co-distributed with Kir4.1 and

AQP4 channel aggregates. The rearrangement in  $\alpha$ -DG assembly induced by laminin has been reported in muscle cells (Cohen et al. 1997; Montanaro et al. 1999) and more recently in Schwann cells (Tsiper and Yurchenco 2002). The lack of the  $\beta$ -1 integrin aggregation in the presence of laminin argues against a role for this receptor in the recruitment and aggregation of Kir4.1 channels. Previous work by Horio et al (1997) reported that Kir4.1 channels are associated with SAP97, a member of PSD95 family. Based on these data and on the fact that SAP97 interacts with talin which in turn interacts with integrins, Ishii et al (1997) speculated that the laminin-induced Kir4.1 aggregation in Müller cells was mediated by integrins. Our studies identify clearly  $\alpha$ -DG as a strong candidate for both Kir4.1 and AQP4 aggregation in astrocytes.

To investigate whether  $\alpha$ -DG rearrangement was accompanied by a redistribution of cytoskeletal partners of DG, we examined the distribution of both syntrophin and  $\alpha$ 1-dystrobrevin. Both proteins had a diffuse punctate pattern (data not shown) in the absence of laminin whereas they were concentrated in aggregates in the presence of laminin (see Fig. 2 and 3). Interestingly, Kir4.1 aggregates co-distributed with those of syntrophin and as mentioned above both Kir4.1 and AQP4 aggregates co-distributed with  $\alpha$ -DG aggregates. Because both antibodies to Kir4.1 channels and  $\alpha$ 1-dystrobrevin were raised in rabbit, we were unable to perform double immunostaining for these proteins. Nevertheless, the similarity between the two staining patterns of these proteins (see Fig. 3) indicates that they are co-localized and suggests further that the laminin-induced channel aggregation is mediated through a dystroglycan-containing complex including syntrophin and  $\alpha$ 1-dystrobrevin. We have previously identified three dystrophin-containing complexes in brain one of which includes  $\alpha$ -DG,  $\beta$ -DG, syntrophin and Dp71 (Moukhles and Carbonetto 2001). Since Dp71 is expressed both in neurons and glia (reviewed in Mehler 2000), complexes including this dystrophin isoform may be expressed in both cell types. Recent data by Connors and

Kofuji (2002) reported a disruption in the distribution of Kir4.1 channels in Müller cells lacking Dp71, implicating this dystrophin isoform in their polarized and aggregated distribution. Furthermore, in brain AQP4 channels are associated with the DAP complex including  $\beta$ -DG, Dp71 and syntrophin (Neely et al. 2001). In light of these data, it is reasonable to propose that the binding of laminin to  $\alpha$ -DG triggers the assembly of a cytoskeletal network including syntrophin,  $\alpha$ 1-dystrobrevin and Dp71 through its transmembrane partner,  $\beta$ -DG, which is responsible for the formation and stabilization of both Kir4.1 and AQP4 channel aggregates at the surface of astrocytes.

Both Kir4.1 and AQP4 channels contain an SXV sequence in their C-terminal (Jung et al. 1994; Takumi et al. 1995), and previous studies showed that Kir4.1 channels bind through that consensus sequence to the PDZ domain of a protein belonging to the PSD95 family (Horio et al. 1997). Furthermore, recent studies by Neely et al (2001) showed that syntrophin is important for the polarized localization of AQP4 in perivascular glia and that the C-terminal SSV sequence of AQP4 confers stability of this protein at the plasma membrane that may depend on an interaction with the PDZ domain of syntrophin. Based on these data and on our data showing that syntrophin co-aggregates with Kir4.1 channel in the presence of laminin, it is tempting to hypothesize that syntrophin does not only interact with AQP4 channels but also with Kir4.1 channels and that it is therefore the candidate molecule of the dystroglycan-containing complex involved in recruiting and stabilizing Kir4.1 channels at the surface of astrocytes.

In conclusion, this study suggests a role for dystroglycan and associated proteins in assembling Kir4.1 and AQP4 channels. Moreover, it shows that laminin in the basement membrane is a critical organizer that may provide a mechanism for the polarized distribution of these channels in astrocytes important for their functional role in  $K^+$  buffering and water homeostasis.

**Acknowledgments**

The authors thank Dr S. Froehner for providing antibodies and Dr S. Carbonetto for helpful comments on the manuscript. This work was supported by grants from Canada Foundation for Innovation and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to H.M).

## References

- Adams ME, Kramarcy N, Krall SP, Rossi SG, Rotundo RL, Sealock R, Froehner SC. 2000. Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *J Cell Biol* 150(6):1385-98.
- Belkin AM, Stepp MA. 2000. Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech* 51(3):280-301.
- Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW. 1999. Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol* 147(3):645-58.
- Bredt DS, Wang TL, Cohen NA, Guggino WB, Snyder SH. 1995. Cloning and expression of two brain-specific inwardly rectifying potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15):6753-7.
- Cohen MW, Jacobson C, Yurchenco PD, Morris GE, Carbonetto S. 1997. Laminin-induced clustering of dystroglycan on embryonic muscle cells: comparison with agrin-induced clustering. *J Cell Biol* 136(5):1047-58.
- Connors NC, Kofuji P. 2002. Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *J Neurosci* 22(11):4321-7.
- Cote PD, Moukhles H, Lindenbaum M, Carbonetto S. 1999. Chimaeric mice deficient in dystroglycans develop muscular dystrophy and have disrupted myoneural synapses. *Nat Genet* 23(3):338-42.
- Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD. 1980. Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp Brain Res* 40(4):432-9.
- Douville PJ, Harvey WJ, Carbonetto S. 1988. Isolation and partial characterization of high affinity laminin receptors in neural cells. *J Biol Chem* 263(29):14964-9.
- Ehmsen J, Poon E, Davies K. 2002. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* 115(Pt 14):2801-3.

- Ervasti JM, Campbell KP. 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122(4):809-23.
- Frigeri A, Nicchia GP, Nico B, Quondamatteo F, Herken R, Roncali L, Svelto M. 2001. Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *Faseb J* 15(1):90-98.
- Gee SH, Blacher RW, Douville PJ, Provost PR, Yurchenco PD, Carbonetto S. 1993. Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *J Biol Chem* 268(20):14972-80.
- Gorecki DC, Derry JM, Barnard EA. 1994. Dystroglycan: brain localisation and chromosome mapping in the mouse. *Hum Mol Genet* 3(9):1589-97.
- Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. 1992. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet* 1(7):505-10.
- Grady RM, Zhou H, Cunningham JM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR. 2000. Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin--glycoprotein complex. *Neuron* 25(2):279-93.
- Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y. 2001. An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(3):C922-31.
- Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51(6):919-28.
- Holthoff K, Witte OW. 1996. Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J Neurosci* 16(8):2740-9.

- Horio Y, Hibino H, Inanobe A, Yamada M, Ishii M, Tada Y, Satoh E, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y. 1997. Clustering and enhanced activity of an inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, by an anchoring protein, PSD-95/SAP90. *J Biol Chem* 272(20):12885-8.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355(6362):696-702.
- Ishii M, Horio Y, Tada Y, Hibino H, Inanobe A, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kurachi Y. 1997. Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Muller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci* 17(20):7725-35.
- Jacobson C, Cote PD, Rossi SG, Rotundo RL, Carbonetto S. 2001. The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J Cell Biol* 152(3):435-50.
- Jacobson C, Montanaro F, Lindenbaum M, Carbonetto S, Ferns M. 1998. alpha-Dystroglycan functions in acetylcholine receptor aggregation but is not a coreceptor for agrin-MuSK signaling. *J Neurosci* 18(16):6340-8.
- Ji RR, Bose CM, Lesuisse C, Qiu D, Huang JC, Zhang Q, Rupp F. 1998. Specific agrin isoforms induce cAMP response element binding protein phosphorylation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 18(23):9695-702.
- Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. 1994. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26):13052-6.
- Khurana TS, Kunkel LM, Frederickson AD, Carbonetto S, Watkins SC. 1995. Interaction of chromosome-6-encoded dystrophin related protein with the extracellular matrix. *J Cell Sci* 108(Pt 1):173-85.



- Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. 2000. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20(15):5733-40.
- Levi S, Grady RM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR, Craig AM. 2002. Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *J Neurosci* 22(11):4274-85.
- Li JD, Govardovskii VI, Steinberg RH. 1994. Light-dependent hydration of the space surrounding photoreceptors in the cat retina. *Vis Neurosci* 11(4):743-52.
- Li L, Head V, Timpe LC. 2001. Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. *Glia* 33(1):57-71.
- Lidov HG, Byers TJ, Watkins SC, Kunkel LM. 1990. Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature* 348(6303):725-8.
- Lidov HG, Selig S, Kunkel LM. 1995. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* 4(3):329-35.
- Mehler MF. 2000. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1):277-307.
- Montanaro F, Carbonetto S, Campbell KP, Lindenbaum M. 1995. Dystroglycan expression in the wild type and mdx mouse neural retina: synaptic colocalization with dystrophin, dystrophin-related protein but not laminin. *J Neurosci Res* 42(4):528-38.
- Montanaro F, Gee SH, Jacobson C, Lindenbaum MH, Froehner SC, Carbonetto S. 1998. Laminin and alpha-dystroglycan mediate acetylcholine receptor aggregation via a MuSK-independent pathway. *J Neurosci* 18(4):1250-60.

- Montanaro F, Lindenbaum M, Carbonetto S. 1999. alpha-Dystroglycan is a laminin receptor involved in extracellular matrix assembly on myotubes and muscle cell viability. *J Cell Biol* 145(6):1325-40.
- Moore SA, Saito F, Chen J, Michele DE, Henry MD, Messing A, Cohn RD, Ross-Barta SE, Westra S, Williamson RA and others. 2002. Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* 418(6896):422-5.
- Moukhles H, Carbonetto S. 2001. Dystroglycan contributes to the formation of multiple dystrophin-like complexes in brain. *J Neurochem* 78(4):824-34.
- Moukhles H, Roque R, Carbonetto S. 2000. alpha-dystroglycan isoforms are differentially distributed in adult rat retina. *J Comp Neurol* 420(2):182-94.
- Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26(1):47-54.
- Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME. 2001. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24):14108-13.
- Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P. 2001. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci* 21(15):5429-38.
- Newman EA. 1993. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* 13(8):3333-45.
- Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M and others. 2003. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 42(3):235-51.

- Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17(1):171-80.
- Poopalasundaram S, Knott C, Shamotienko OG, Foran PG, Dolly JO, Ghiani CA, Gallo V, Wilkin GP. 2000. Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia* 30(4):362-72.
- Smalheiser NR, Schwartz NB. 1987. Cranin: a laminin-binding protein of cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(18):6457-61.
- Svoboda J, Sykova E. 1991. Extracellular space volume changes in the rat spinal cord produced by nerve stimulation and peripheral injury. *Brain Res* 560(1-2):216-24.
- Takumi T, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S and others. 1995. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem* 270(27):16339-46.
- Tawil NJ, Houde M, Blacher R, Esch F, Reichardt LF, Turner DC, Carbonetto S. 1990. Alpha 1 beta 1 integrin heterodimer functions as a dual laminin/collagen receptor in neural cells. *Biochemistry* 29(27):6540-4.
- Tawil NJ, Wilson P, Carbonetto S. 1994. Expression and distribution of functional integrins in rat CNS glia. *J Neurosci Res* 39(4):436-47.
- Tian M, Jacobson C, Gee SH, Campbell KP, Carbonetto S, Jucker M. 1996. Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 8(12):2739-47.
- Tsiper MV, Yurchenco PD. 2002. Laminin assembles into separate basement membrane and fibrillar matrices in Schwann cells. *J Cell Sci* 115(Pt 5):1005-15.
- Worton R. 1995. Muscular dystrophies: diseases of the dystrophin-glycoprotein complex. *Science* 270(5237):755-6.

## Figure Legends

**Figure 1. Kir4.1 and AQP4 channels co-distribute with both  $\alpha$ - and  $\beta$ -dystroglycan in perivascular glia.** Coronal brain sections containing hippocampus were double immunolabeled for Kir4.1 (**I and J**) or AQP4 channels (**K and L**) and  $\alpha$ -DG (**E and G**) or  $\beta$ -DG (**F and H**). The strong immunoreactivity seen around blood vessels reflects that these proteins are concentrated in astrocytic endfeet. The merged images indicate a colocalization of both  $\alpha$ -DG and  $\beta$ -DG with Kir4.1 (**M and N**) and AQP4 channels (**O and P**). Blood vessels can be readily identified on the phase images illustrated in A-D. Scale bar = 50  $\mu$ m.

**Figure 2. Kir4.1 channels co-aggregate with  $\alpha$ -dystroglycan and syntrophin and AQP4 channels co-aggregate with  $\alpha$ -dystroglycan.** Cultures of hippocampal cells grown on coverslips coated with poly-D-lysine and laminin were double immunolabeled with rabbit antisera to Kir4.1 channels (**A and D**) or to AQP4 channels (**G**) and mouse mAbs to  $\alpha$ -DG (**B**) or to syntrophin (**E**), followed by alexa 568-conjugated anti-rabbit IgG and alexa 488-conjugated anti-mouse IgG. Immunoreactivity for Kir4.1 (**C and F**) or AQP4 channels (**I**) is displayed in red in the merge and that for  $\alpha$ -DG (**C and I**) and syntrophin (**F**) is in green. Scale bars = 25  $\mu$ m for A-F and 50  $\mu$ m for G-H.

**Figure 3. Kir4.1 channels and  $\alpha$ 1-dystrobrevin have a similar immunolabeling pattern.** Cultures of hippocampal cells grown on coverslips coated with poly-D-lysine and laminin were immunolabeled with rabbit antisera to Kir4.1 channels (**A**) and to  $\alpha$ 1-dystrobrevin ( $\alpha$ 1-DB, **B**) followed by alexa 568-conjugated anti-rabbit IgG. Note that both Kir4.1 and  $\alpha$ 1-dystrobrevin proteins form intensely immunolabeled aggregates of various

sizes onto the cell bodies as well as processes of the cells. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4.  $\alpha$ -dystroglycan aggregates and Kir4.1 channels are expressed by astrocytes and oligodendrocytes, respectively.** Cultures of hippocampal cells grown on coverslips coated with poly-D-lysine and laminin were double immunolabeled with rabbit antisera to GFAP (**A**) or to Kir4.1 channels (**E**) and with mouse mAbs to  $\alpha$ -DG (**B**) or to myelin basic protein (**D**) followed by alexa 568-conjugated anti-rabbit IgG and alexa 488-conjugated anti-mouse IgG (B). The merged image in **C** shows a GFAP positive cell (red) expressing  $\alpha$ -DG aggregates (green) and the one in **F** represents a myelin positive oligodendrocyte (green) expressing Kir4.1 channels (red). Scale bars = 50  $\mu\text{m}$  for A-C and 10  $\mu\text{m}$  for D-F.

**Figure 5. Laminin induces the aggregation of  $\alpha$ -dystroglycan, Kir4.1 and AQP4 channels.** Cultures of hippocampal cells grown in the presence of poly-D-lysine alone (-laminin; **A, B and C**) or of poly-D-lysine and laminin (+laminin; **D, E and F**) were immunolabeled for  $\alpha$ -DG (**A and D**), Kir4.1 channels (**B and E**), and AQP4 (**C and F**). Note that unlike the cells grown in the absence of laminin, those grown in the presence of laminin express numerous aggregates of  $\alpha$ -DG, Kir4.1 and AQP4 channels. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$  for A, B, C, E, F and 25  $\mu\text{m}$  for D.

**Figure 6. Quantitative analysis of the laminin-induced aggregation of Kir4.1 and AQP4 channels.** Histograms show mean  $\pm$  SEM of Kir4.1 (**A**) and AQP4 (**B**) in cells grown in the presence of poly-D-lysine and laminin (+laminin) or in the presence of poly-D-lysine alone (-laminin) of three experiments. The asterisk represents statistically significant differences from control (-laminin) as assessed by *Student t* test (\*\* $p < 0.0001$ , \* $p < 0.02$ ). In **C** and **D**, histograms represent the percentage of cells within three categories of Kir4.1 (**C**) and AQP4 aggregate numbers (**D**). Note that in the presence of

laminin (filled bars), the vast majority of the cells express more than 26 Kir4.1 aggregates and more than 50 AQP4 aggregates.

**Figure 7. Laminin does not affect the size of Kir4.1 and AQP4 channel aggregates.** Histograms show the size distribution of Kir4.1 (**A and B**) and AQP4 channel aggregates (**C and D**) in cells grown in the absence (**A and C**) or the presence of laminin (**B and D**). The number of the channel aggregates is expressed in percentage of total aggregates. Note that the majority of Kir4.1 and AQP4 channel aggregates has a surface area of 1-5  $\mu\text{m}^2$ .

**Abbreviations:** DAP, dystrophin-associated proteins; DG, dystroglycan; Dp, dystrophin; Kir4.1, inwardly rectifying potassium channel; AQP4, aquaporin water permeable channel.

## Figures

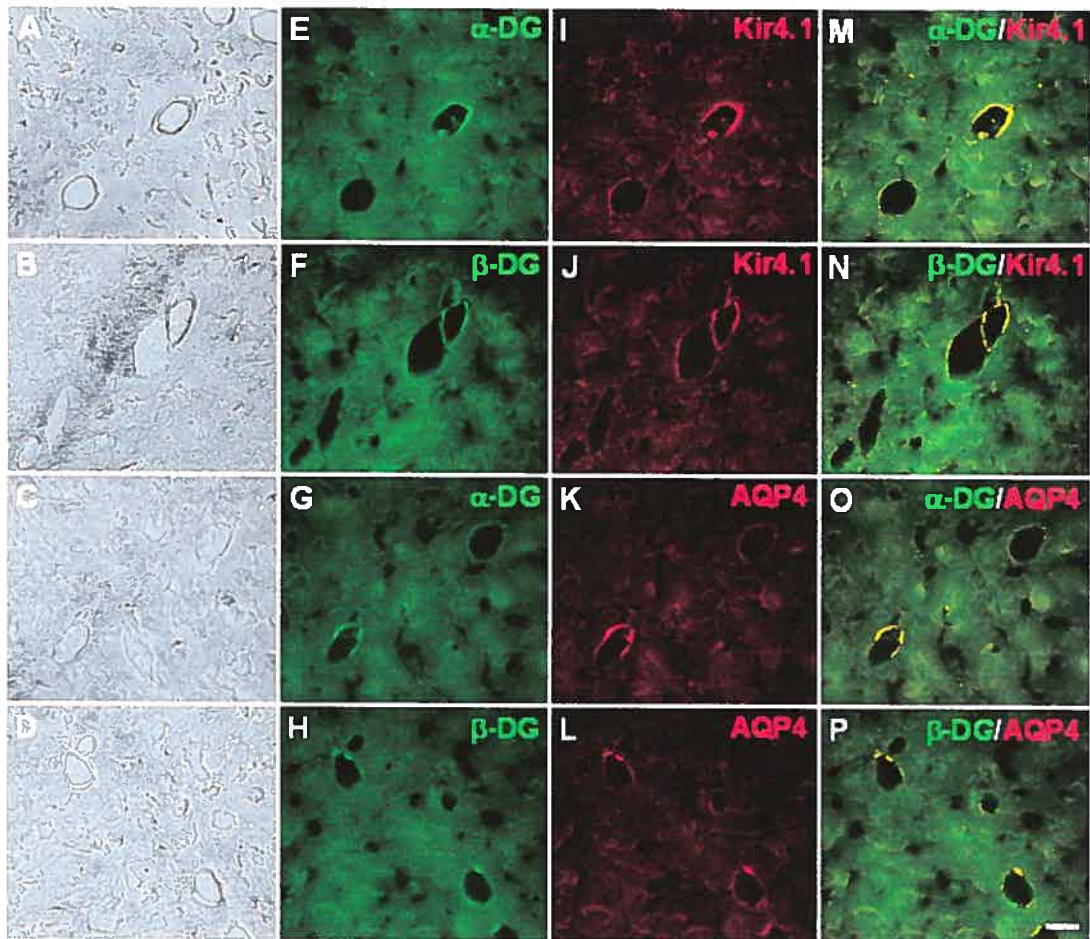


Figure 1.



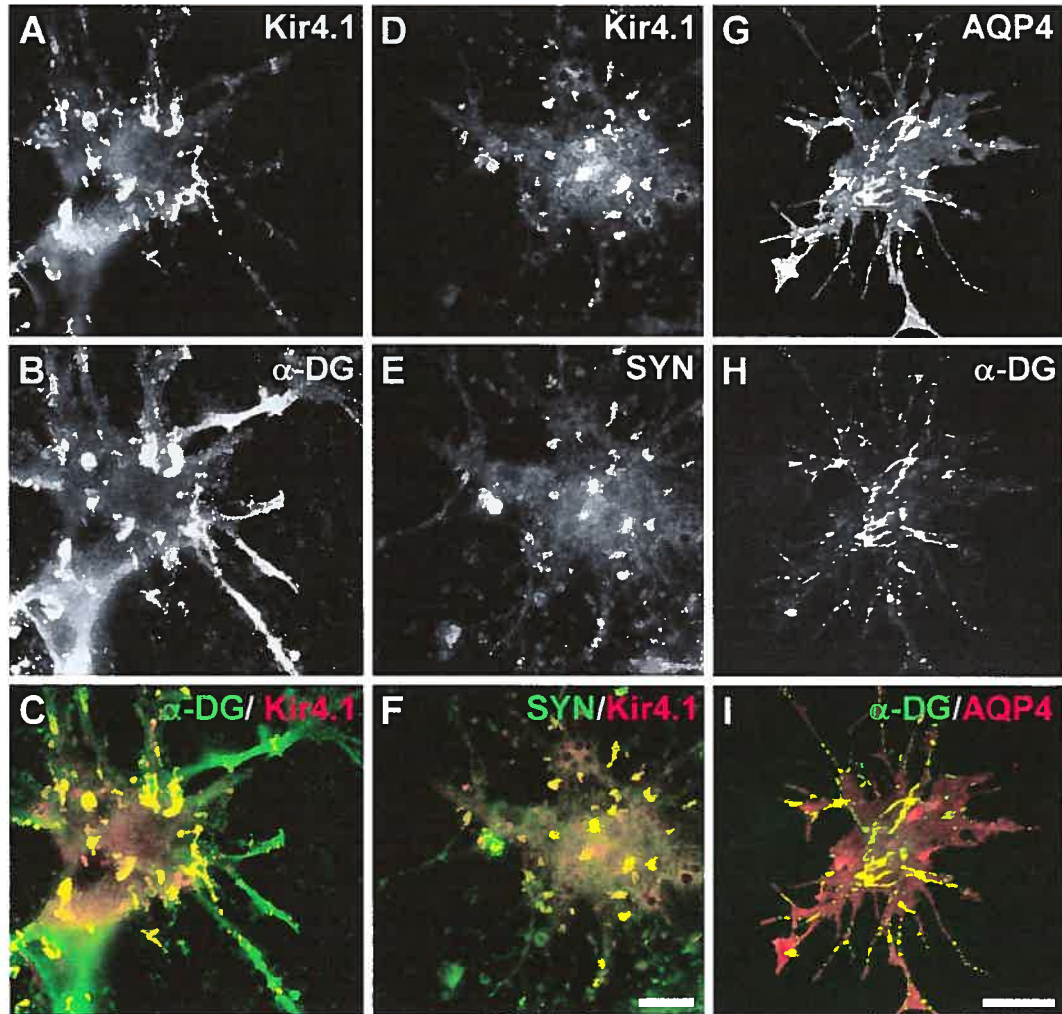
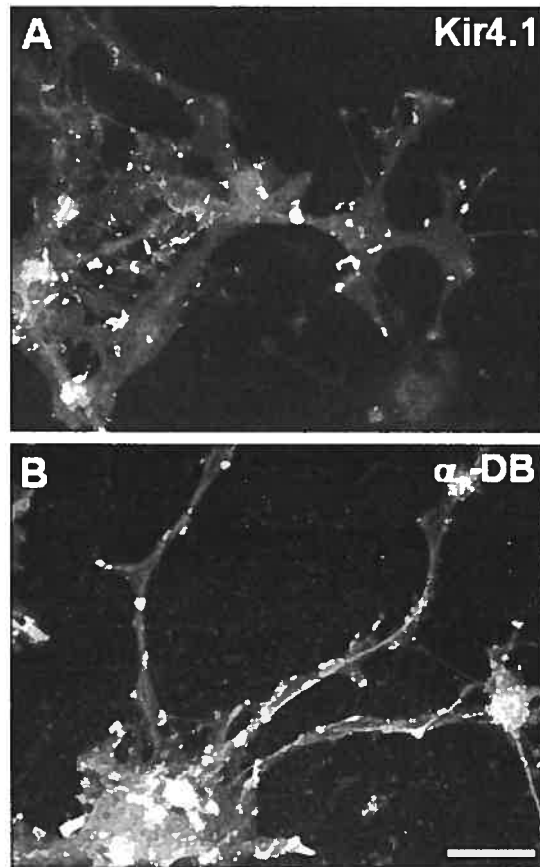


Figure 2.



**Figure 3.**

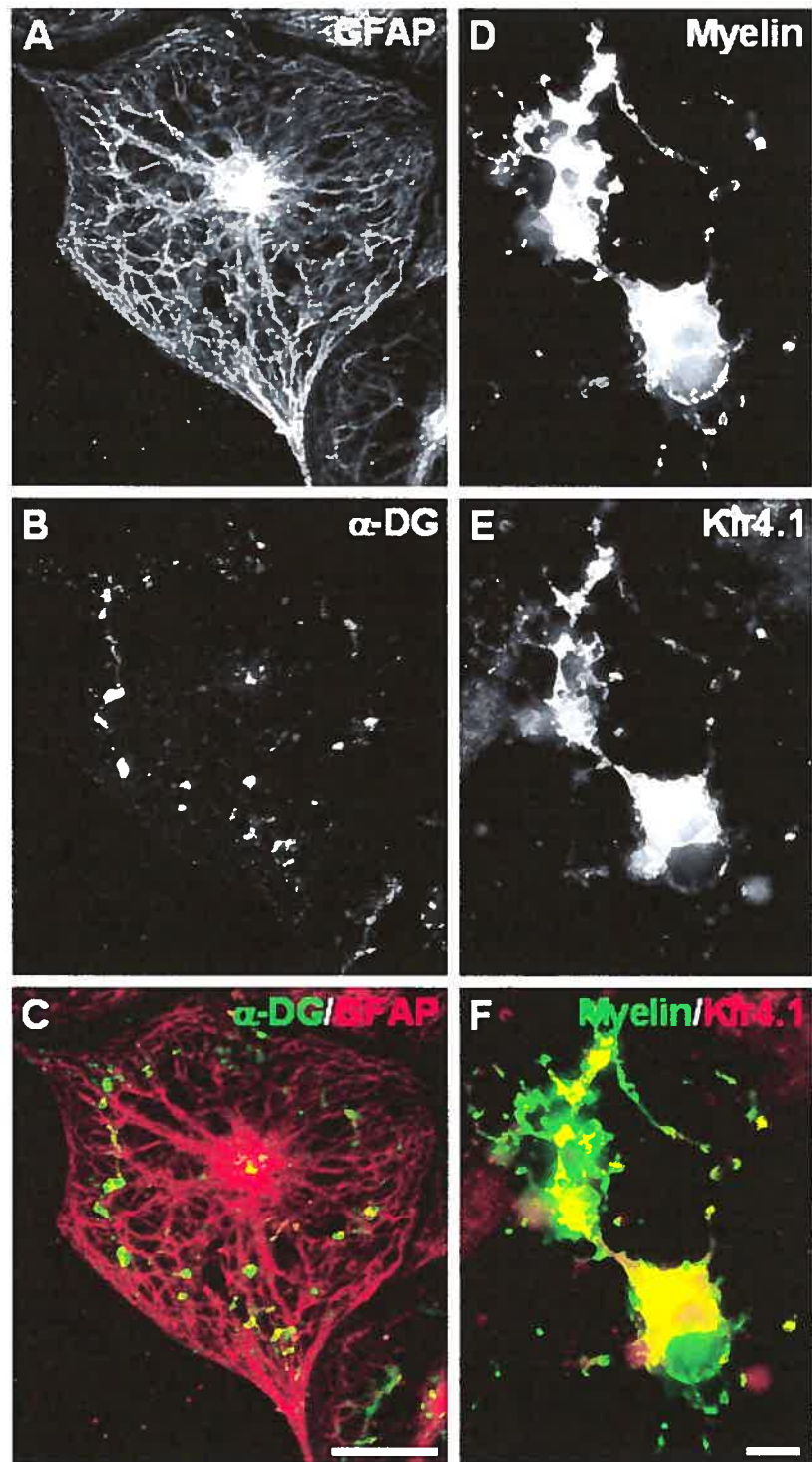


Figure 4.

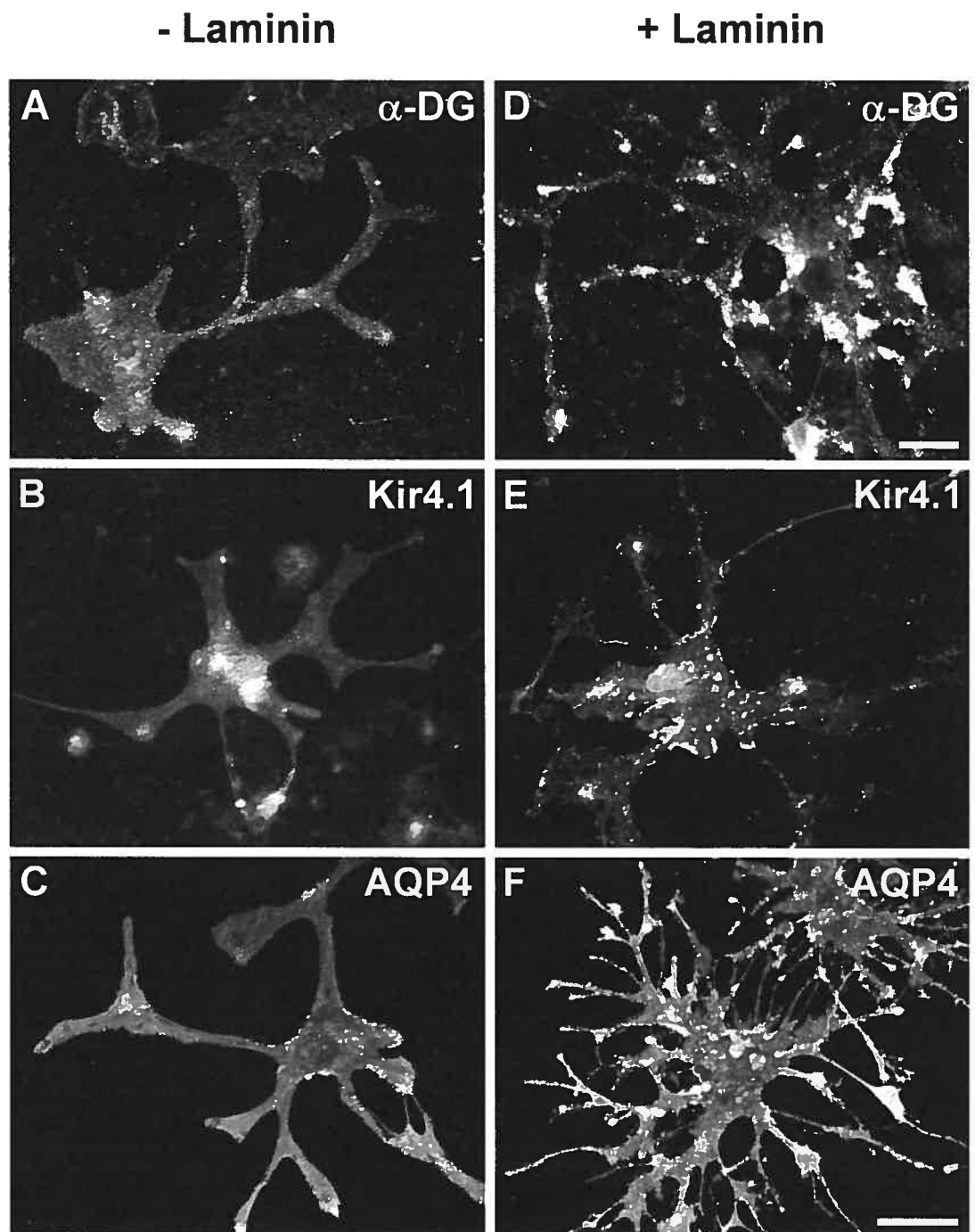


Figure 5.

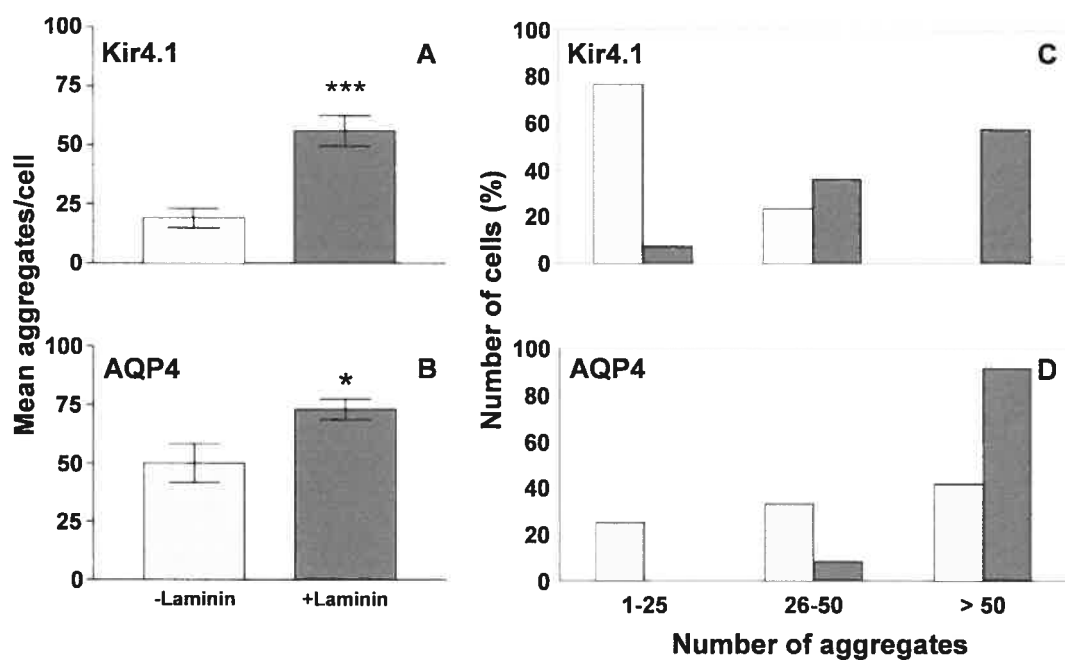


Figure 6.

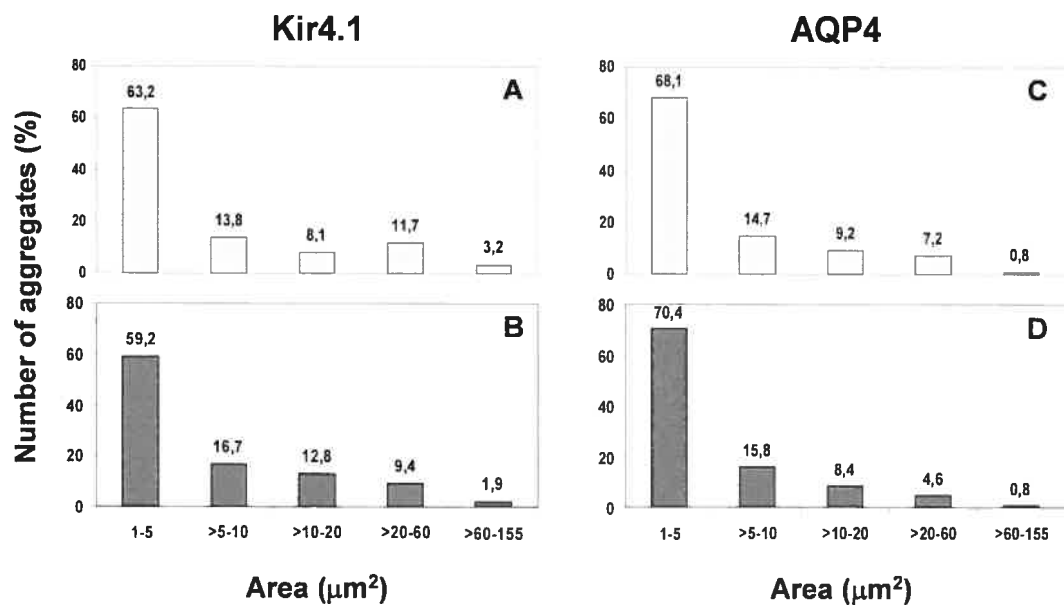


Figure 7.

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1. IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT ET DU PROGRAMME

Eric Guadagno,  
M.Sc. (Sciences Biologiques)

### 2. DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs : Marina Belda, Geoffroy Noël, Eric Guadagno, Julien Micoud et Hakima Moukhles

Titre : The SXV-domain of inwardly rectifying potassium channels, Kir4.1, is required for their laminin-induced clustering

Revue : soumission prévue pour le journal JBC (Journal of Biological Chemistry)

État : article en préparation

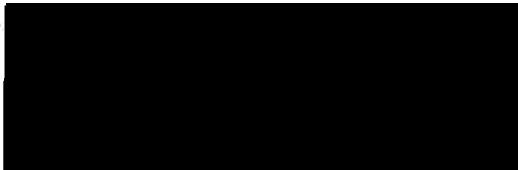
### 3. DECLARATION DE TOUS LES COAUTEURS AUTRES QUE L'ÉTUDIANT

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Eric Guadagno inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : **Implication du dystroglycan et des protéines associées dans le ciblage des canaux potassiques, Kir4.1, et des canaux aqueux, AQP4, au niveau des astrocytes.**

HAKIMA-MOUKHLES  
Coauteur



26/11/2003  
Date



24/11/03  
Date

Marina Belda



Hotmail® [REDACTED]

Inbox | Previous Page

From : "julien micoud" [REDACTED]

Subject : accord

Date : Tue, 18 Nov 2003 15:36:39 +0000

Attachment : Accorddescoauteurs2.doc (26k)

Je soussigné Julien Micoud, à titre de coauteur de l'article: The SKV-domain of inwardly rectifying potassium channels, Kir4.1, is required for their laminin-induced clustering (Marina Belda, Geoffroy Noel, Eric Guadagno, Julien Micoud et Hakima Moukhles; soumission prévue pour le journal JBC), suis d'accord pour que Eric Guadagno inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Implication du dystroglycan et des protéines associées dans le ciblage des canaux potassiques, Kir4.1, et des canaux aqueux, AQP4, au niveau des astrocytes.

le 18/11/03  
Julien Micoud



Hotmail® [REDACTED]

Inbox | Previous Page

From : [REDACTED]

Subject : Accord de Geoffroy

Date : Wed, 26 Nov 2003 19:28:10 +0100 (CET)

Mr NOËL Geoffroy  
Magistère de Biologie-Biochimie  
Ecole Normale Supérieure de Paris  
46 rue d'Ulm  
75005 Paris  
Tel:06 27 02 38 29

Le 26 Novembre 2003, à PARIS

Objet: Autorisation concernant le mémoire de maîtrise de Monsieur Eric GUADAGNO

Je, soussigné Monsieur NOËL Geoffroy, coauteur de l'article "The SKV-domain of inwardly rectifying potassium channels, Kir4.1, is required for their laminin-induced clustering", autorise Monsieur Eric GUADAGNO, étudiant en maîtrise à l'Université de Montréal, à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise.  
Geoffroy NOËL



## Deuxième article

**Ordre des auteurs :** Marina Belda, Geoffroy Noël, Julien Micoud, Eric Guadagno et Hakima Moukhles.

**Titre :** The SNV-domain of inwardly rectifying potassium channels, Kir4.1, is required for their clustering induced by laminin

**État de l'article :** en préparation – soumission prévue à *Journal of Biological chemistry*

Pour les fins de cet article, j'ai entrepris une étude s'adressant à l'importance du domaine SNV des canaux potassiques, Kir4.1, dans leur ciblage au niveau des cellules de Müller. J'ai effectué cette étude par transfection des cellules de Müller en culture et par immunocytochimie. En plus de participer à l'écriture, j'ai dû reproduire quelques expériences menées originalement par mes collègues et remodeler plusieurs des figures, suite à ces expériences.

  
Eric Guadagno

**The SNV-domain of inwardly rectifying potassium channels, Kir4.1, is required for their laminin-induced clustering**

Marina Belda, Geoffroy Noël, Julien Micoud, Eric Guadagno et Hakima Moukhles\*

Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

Running title: Kir4.1 are recruited to dystroglycan clusters via their SNV domain

\*Address correspondence to Dr H. Moukhles, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale centre-ville, Pavillon Marie-Victorin, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

[REDACTED]

Tel: (514) 343-6847

Key words: dystrophin associated proteins, potassium buffering, Müller cells, dystroglycan

## Abstract

Inwardly rectifying potassium channels, Kir4.1, are the predominant potassium channels in the retina. They are targeted to specific domains of Müller cell plasma membrane and play a critical role in retinal activity. Kir4.1 are concentrated around blood vessels and are clustered in the end-feet of Müller cells that face the vitreous body. However, the molecular mechanisms underlying this polarized targeting are not yet identified. In the present study, we show that laminin-1 induces the co-clustering of Kir4.1 with  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) in Müller cells. In addition, we show that while the SNV sequence at the extreme C-terminus of Kir4.1 is not indispensable for Kir4.1 cell surface expression, it is required for their laminin-induced clustering. These data indicate that **1)** laminin-1 together with  $\alpha$ -DG is involved in the polarized targeting of Kir4.1 and **2)** Kir4.1 interact via their SNV sequence with a dystroglycan-containing complex and suggest that the extracellular matrix plays a major role in potassium buffering in retina, contributing therefore to the regulation of its activity.

## Materials and Methods

### Antibodies

Rabbit pAb to laminin-1 which recognizes laminin  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  and  $\gamma_1$  chains and a rabbit pAb to integrin- $\beta_1$  subunit (1/1500 and 1/100, respectively; a generous gift of Dr. S. Carbonetto, McGill University, Montreal, Canada), a rabbit pAb to agrin (1/700, a generous gift of Dr. M. Ferns, McGill University, Montreal, Canada), a mouse mAb to  $\alpha$ -DG, VIA4.1, was raised against rabbit skeletal muscle membrane (1/50, Upstate Biotechnology, NY, USA) and a mouse mAb to  $\beta$ -DG 43DAG1/8D5, was raised against the 15 of the last 16 amino-acids at the C-terminus of the human dystroglycan sequence (1/25, Novocastra laboratories, Newcastle-upon-tyne, UK). The Golgi apparatus was stained with a specific marker to GM130 (1/100, Molecular Probes, Eugene, USA). The primary antibodies described above were visualized using fluorochrome-conjugated secondary antibodies: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (1/200, Molecular Probes, Eugene, USA) and a goat anti-mouse monoclonal Alexa Fluor 647 (1/250, Molecular Probes, Eugene, USA).

### Cell Cultures

We used the HPV-16 E6/E7 cells, a rat Müller cell line generated by Roque et al. (1997). These cells were transfected with a defective viral construct for human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7 proteins. Müller cells were plated on poly-D-lysine (0.1 mg/mL; Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) – coated 18 mm round glass coverslips in 12-well petri dishes at a density of 9000-12000 cells/well. The culture medium consisted of DMEM (Invitrogen, Burlington, Canada), 10% fetal bovine serum (FBS) (Medicorp Inc., Montreal, Canada), 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Burlington, Canada) and 1% MEM Vitamin (Invitrogen, Burlington, Canada) and 1mM L-Glutamine Vitamin (Invitrogen, Burlington, Canada). The cultures were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Müller cells were treated 2-3 days after plating with 15 nM

laminin Engelbreth-Holm-Swarm Mouse sarcoma (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) and with 10 nM soluble recombinant z+ agrin (C-Ag 4,8; a generous gift of Dr M. Ferns, University of California, Davis) overnight. Media devoid of soluble recombinant z+ agrin was used as a control. Different concentrations of laminin were added for the dose effect (5 nM to 15 nM).

### **Immunohistochemistry**

Eye sections were obtained from an adult female Sprague Dawley rat (Charles River Laboratories, Montreal, Canada). The protocol was agreed by the Animal Care Committee of University of Montreal. The rat was sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation and eyes were isolated. The eyes were post-fixed with 4% (wt/vol) paraformaldehyde in 0.1 M Phosphate Buffer solution (PB) for 36 hours. Then, eyes were immersed in 30% (wt/vol) sucrose prepared in PB 0.1 M for 24 hours. They were embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Pelco International, Redding, USA) and frozen in liquid nitrogen-cooled 2-Methylbutane (Fisher Scientific, Nepean, Canada). The 12 µm retina sections were cut with a Leica CM3050S cryostat. Sections were rinsed 2 times (10 min each) with phosphate buffer saline (PBS) and incubated in blocking and solubilizing buffer (2% BSA, 0.05% Triton X-100 in PBS) for 1 hour. Then, they were incubated with primary antibodies in blocking buffer for 2 hours. Eye sections were rinsed three times (15 min) in PBS and the secondary antibodies were added in PBS for 1 hour. Finally, the sections were rinsed three times (15 min) in PBS and mounted on microscope slides with Immuno-Fluor Mounting Medium (ICN Pharmaceuticals Inc., Montreal, Canada).

### **Immunocytochemistry**

Cells were rinsed with PBS and fixed for 15 min. with 4% PFA prepared in PBS at room temperature. Then, they were permeabilized for 5 minutes with 0.25% Triton X-100 in PBS and incubated for 30 minutes in 3% BSA prepared in PBS. For double immunolabeling experiments, cells were incubated for 1 hour in the presence of the two primary antibodies

simultaneously (anti- $\alpha$ -DG and anti-laminin; anti- $\alpha$ -DG and anti-agrin; anti- $\alpha$ -DG and anti-Kir4.1). Subsequently, cells were rinsed with PBS 3 x 10 minutes and incubated with both Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (or Alexa Fluor 647 anti mouse IgG for triple immunolabeling of GFP-Kir4.1 transfected cells) and Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit for 1 hour at room temperature. After several washes with PBS, coverslips were mounted on glass slides. To verify the specificity of the rabbit antisera to Kir4.1 and AQP4 channels, these were pre-incubated for 1 hour with 10  $\mu$ g of the peptide used for the immunization (Alomone Labs) prior to incubation with the cells. In addition, a control for the specificity of the immunolabeling that consisted of omitting the primary antibodies was included in every experiment. Images of both retina sections and cells in culture were captured with a QImaging Retiga 1300 monochrome 10-bit CCD camera mounted on a Nikon E-600 microscope using Northern Eclipse image analysis software (Empix Imaging Inc., Canada).

### **Transfection**

Two vectors containing fusion constructs of Kir4.1 with enhanced green fluorescence protein (EGFP) were used: the GFP-Kir4.1-export (Stockklausner and Klocker, 2003) and the  $\Delta$ SNV-GFP-Kir4.1-export. In the  $\Delta$ SNV-GFP-Kir4.1-export, the three amino acids, serine-asparagine-valine (SNV), that are expressed at the extreme C-terminus of Kir4.1 were deleted. A Kir2.0 ER export sequence of 7 amino acids was inserted at the C-terminus of these two constructs. Müller cells were plated one day before the transfection at a density of 25,000 cells/well. Then they were transiently transfected either with the vector carrying the Kir-export or the  $\Delta$ SXV-Kir4.1-export cDNA using the Effectene Transformation kit (QIAGEN, Mississauga, Canada) following the supplier's instructions. Forty eight hours following the transfection, the cells were treated with 15 nM laminin-1 overnight. The analyses were carried out by confocal microscopy.

### **Quantification of $\alpha$ -dystroglycan clusters**

Quantifications were made on 10 random fields/experiment photographed with a 40X objective and a Nikon Eclipse E600 microscope associated with a camera Qimaging Retiga 1300 monochrome 10-bit CCD (Empix Imaging Inc. Mississauga, Canada). The program Northern Eclipse version 6.0 (Empix Imaging Inc. Mississauga, Canada) was used to count the number of  $\alpha$ -dystroglycan clusters and to determine their area. We used similar criteria to Cohen et al. (1997) to differentiate clusters: macroclusters 1-20  $\mu\text{m}$  and megaclusters  $>20 \mu\text{m}$ . Analysis and graphs were obtained using GraphPad Prism 3.00 (GraphPad Software Inc.).

### **Western Blotting Analysis**

Müller cells were scraped with a policeman and proteins were extracted with extraction buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM glycine, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Laval, Canada) 10 min. on ice. Rat retinas extracts were obtained using the same extraction buffer. Next, the proteins were denatured in reducing sample buffer (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8; 2% (w/v) SDS; 10% glycérol, 0.01% bromophenol blue and 41.5 mM dithiothreitol) for 7 min. at 95°C. Samples were loaded on a 5% SDS-PAGE and after migration the proteins were transferred on a nitrocellulose membrane (0.45  $\mu\text{m}$ ; Bio-Rad, Mississauga, Canada). The nitrocellulose membrane was incubated with a rabbit polyclonal antibody to laminin that was visualized using a goat anti-rabbit-horseradish peroxidase-conjugated antibody as secondary antibody and a chemiluminescence reaction (ECL).

## Figure Legends

**Figure 1. Colocalization of  $\alpha$ -DG with laminin and Kir4.1 in Müller cell end-feet at the inner limiting membrane.** Rat retina sections were double immunolabeled for  $\alpha$ -DG (**B**) and laminin (**A**) or for  $\alpha$ -DG (**F**) and Kir4.1 (**E**). The strong immunoreactivity seen at the inner limiting membrane (ILM) reflects a concentration of these proteins at Müller cell end-feet. Moreover, these proteins colocalised (**C** and **G**). **D** and **H** represent phase images of **A** and **E**, respectively. IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer and ONL, outer nuclear layer. Scale bar= 25  $\mu$ m.

**Figure 2. Laminin induces  $\alpha$ -DG but not  $\beta$ 1-integrin clustering in Müller cells.** Müller cell cultures were incubated overnight with 15nM laminin-1 (+LAM; **D-I**). Representative fields of Müller cells double immunolabeled for  $\alpha$ -DG (**A** and **D**) and laminin (**B** and **E**) or for  $\alpha$ -DG (**G**) and  $\beta$ <sub>1</sub>-integrin (**H**) are shown.  $\alpha$ -DG forms clusters that colocalize with laminin (**F**) whereas  $\beta$ <sub>1</sub>-integrin is diffuse in the cells (**H**). Note that  $\alpha$ -DG immunoreactivity is diffuse in Müller cells not treated with exogenous laminin-1 (-LAM; **A**). In **J**, the Western blot shows that the  $\alpha$ 1-chain in laminin-1 (arrow) is not expressed in Müller cells indicating that it may be responsible for the clustering activity. In **K**, the histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 experiments. 10 fields taken randomly from each experiment were quantified. The data show that  $\alpha$ -DG clustering is laminin dose-dependent. Scale bar= 50  $\mu$ m.

**Figure 3. Laminin-induced  $\alpha$ -DG clusters contain agrin.** Müller cells treated overnight with 15nM laminin-1 were double immunolabeled for agrin (**A**) and  $\alpha$ -DG (**B**). Note that a high proportion of  $\alpha$ -DG clusters, especially the large ones, contain agrin (**C**). Scale bar= 25  $\mu$ m.



**Figure 4. Neuronal agrin does not potentiate the laminin-induced clustering of  $\alpha$ -DG.** Müller cells were treated overnight with 15nM laminin-1 (Lam) or with 15nM laminin-1 plus 10nM agrin (Lam+Agrin) and then immunolabeled for  $\alpha$ -DG (**A**). The quantification of the  $\alpha$ -DG clustering reveals that there is no significant change in the number of clusters in the laminin+agrin compared to the laminin treated cells (**B**). No changes in the number of megaclusters and macroclusters in the laminin+agrin versus the laminin treated cells were found either (**C**). Scale bar= 50  $\mu$ m.

**Figure 5. Laminin clusters  $\alpha$ -DG but not endogenous Kir4.1 in Müller cells.** Cultures of Müller cells were treated (+LAM; **D-F**) or not (-LAM; **A-C**) with 15nM laminin-1 and double immunolabeled for  $\alpha$ -DG (**A** and **D**) and Kir4.1 (**B** and **E**). Note that  $\alpha$ -DG forms clusters in the presence of laminin whereas Kir4.1 immunoreactivity remains diffuse within the cells and seems to accumulate in an endoplasmic reticulum-like structure around nuclei. Scale bar= 25  $\mu$ m.

**Figure 6. Kir4.1-export are targeted to the plasma membrane of Müller cells.** Müller cells were transfected with the GFP-Kir4.1-export cDNA (GFP-Kir4.1-exp) and immunolabeled for GM130 (**B**), a marker of the Golgi apparatus. Among the 3 transfected cells (GFP-positive) in the field illustrated in **A**, one exhibits a high GFP-Kir4.1-export plasma membrane expression (arrow) and the two others present a low expression at the plasma membrane as well as an expression in the Golgi apparatus (**B**) as evidenced in the merged image (**C**). Scale bar= 50  $\mu$ m.

**Figure 7. Laminin clusters Kir4.1-export in Müller cells.** Müller cells were transfected with the GFP-Kir4.1-export cDNA (GFP-Kir4.1-exp), treated (+LAM; **D-F**) or not (-LAM; **A-C**) with 15nM laminin-1 and immunolabeled for Kir4.1 (**B** and **E**) using a polyclonal antibody. The strong Golgi-like localization of Kir4.1 seen in absence of laminin tend to diminish in presence

of laminin. Note the presence of Kir4.1 clusters in laminin-treated cells (arrows, **D-F**). Scale bar= 25  $\mu\text{m}$ .

**Figure 8. The SNV C-terminal sequence of Kir4.1 is required for the laminin-induced co-clustering of Kir4.1 with laminin and  $\alpha$ -DG in Müller cells.** Müller cells were transfected with either the GFP-Kir4.1-export (**A-H**) or the  $\Delta$ SNV-GFP-Kir4.1-export (**I-L**). Cells transfected with the GFP-Kir4.1-export were treated (+LAM; **E-H**) or not (-LAM; **A-D**) with 15nM laminin-1 and immunolabeled for laminin (**B** and **F**) and for  $\alpha$ -DG (**C** and **G**). Note the presence of numerous GFP-Kir4.1 clusters that colocalize with those of laminin and  $\alpha$ -DG in the laminin-treated cells (arrows; **E-H**). Despite the expression of endogenous laminin (**B**), this does not induce either  $\alpha$ -DG or GFP-Kir4.1 clustering. Cells transfected with the  $\Delta$ SNV-GFP-Kir4.1-export (**I-L**) were treated with 15nM laminin-1 and immunolabeled for laminin (**J**) and for  $\alpha$ -DG (**K**). Note that  $\Delta$ SNV-GFP-Kir4.1-exp does not co-cluster with laminin and  $\alpha$ -DG (arrows; **I-L**) but that laminin and  $\alpha$ -DG co-cluster. Scale bar= 25 $\mu\text{m}$ .

**Figures**

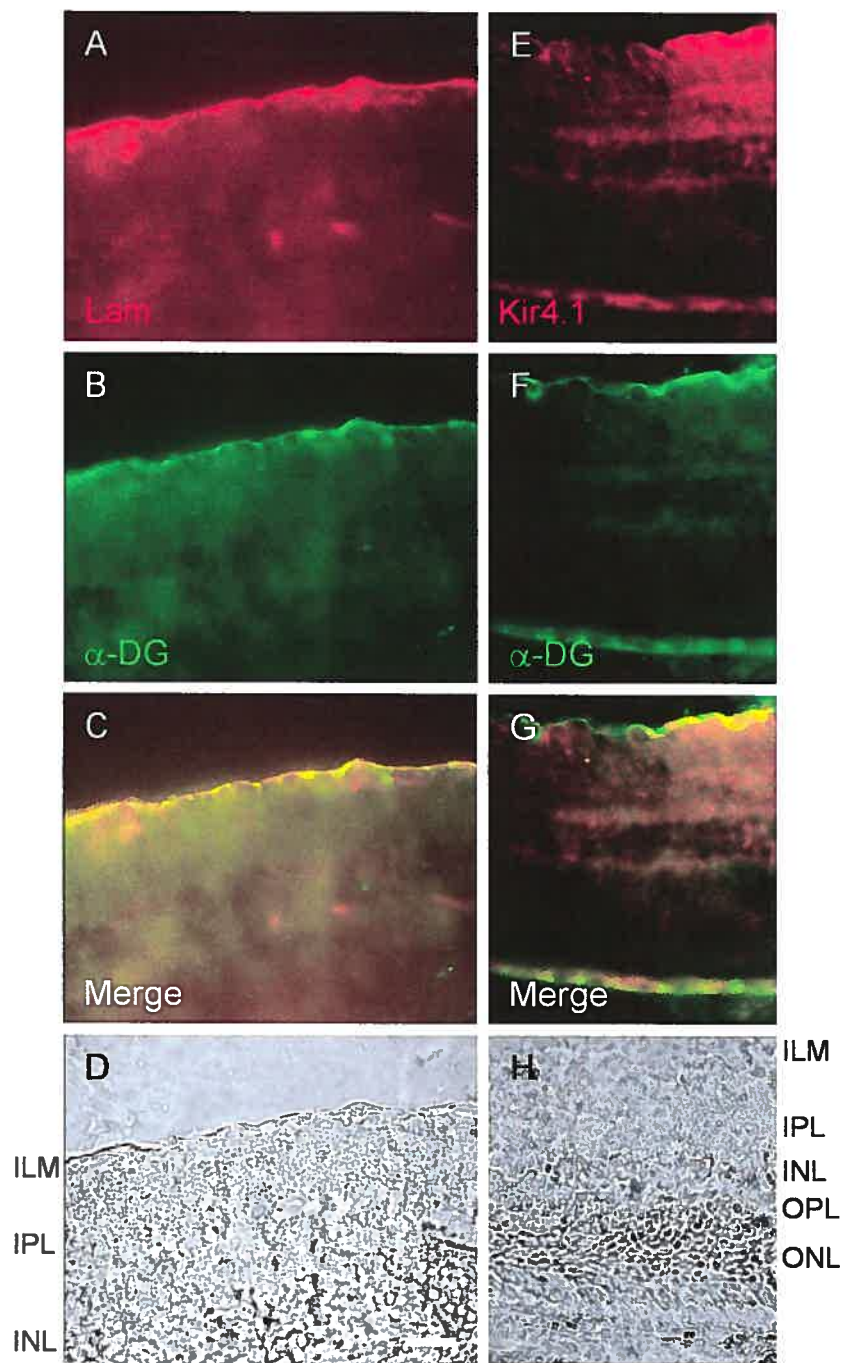


Figure 1.

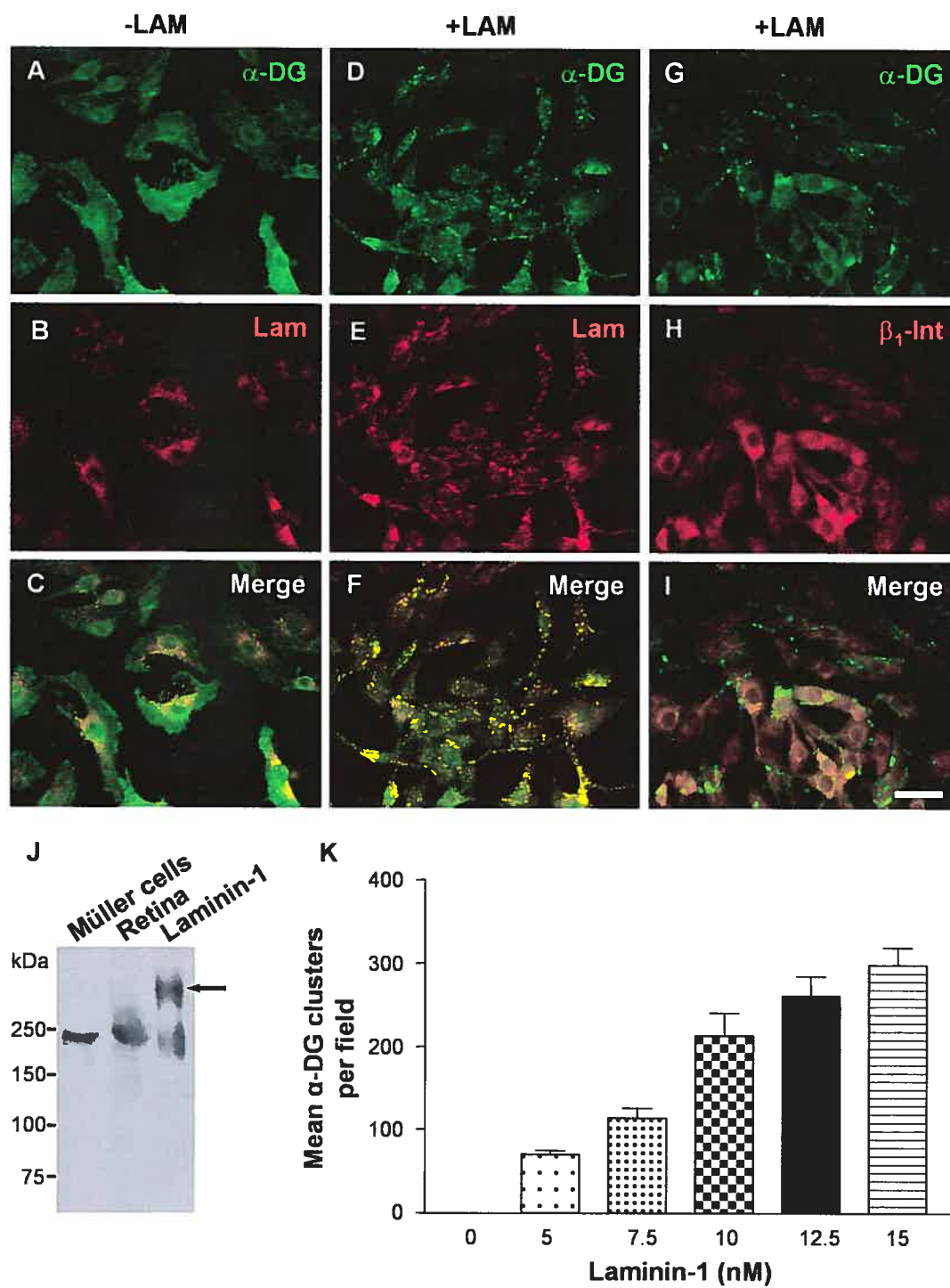


Figure 2.

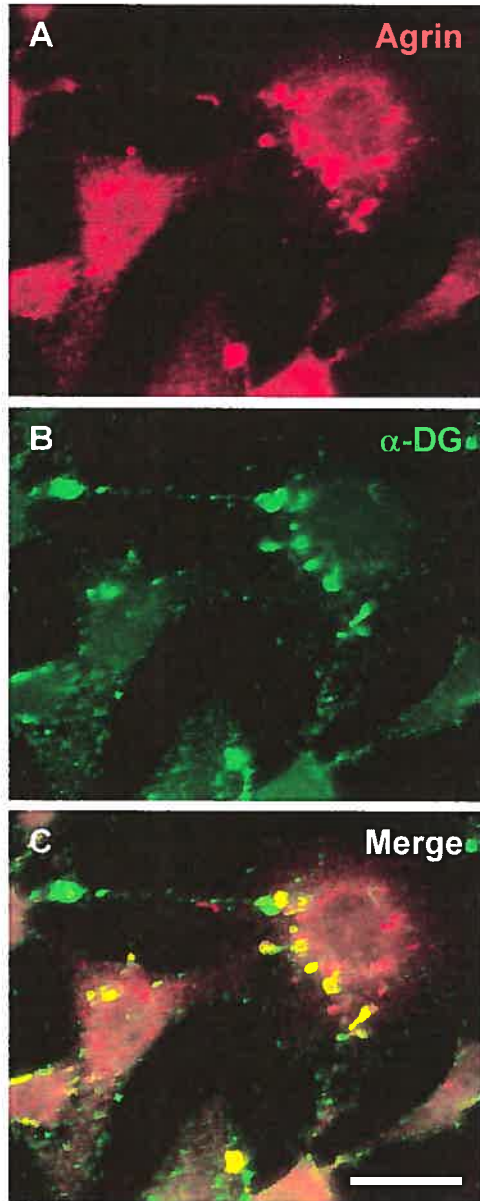


Figure 3.

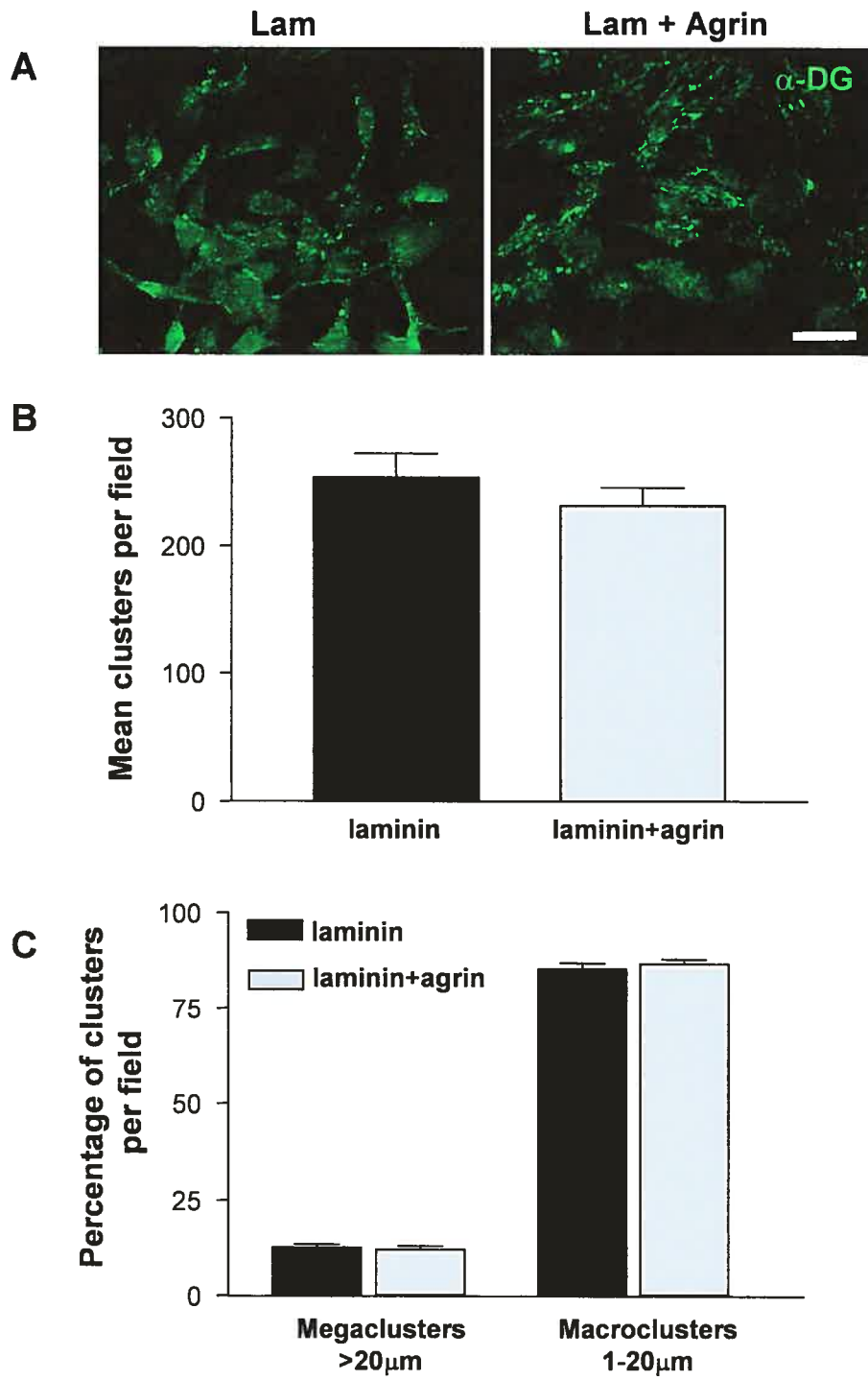


Figure 4.

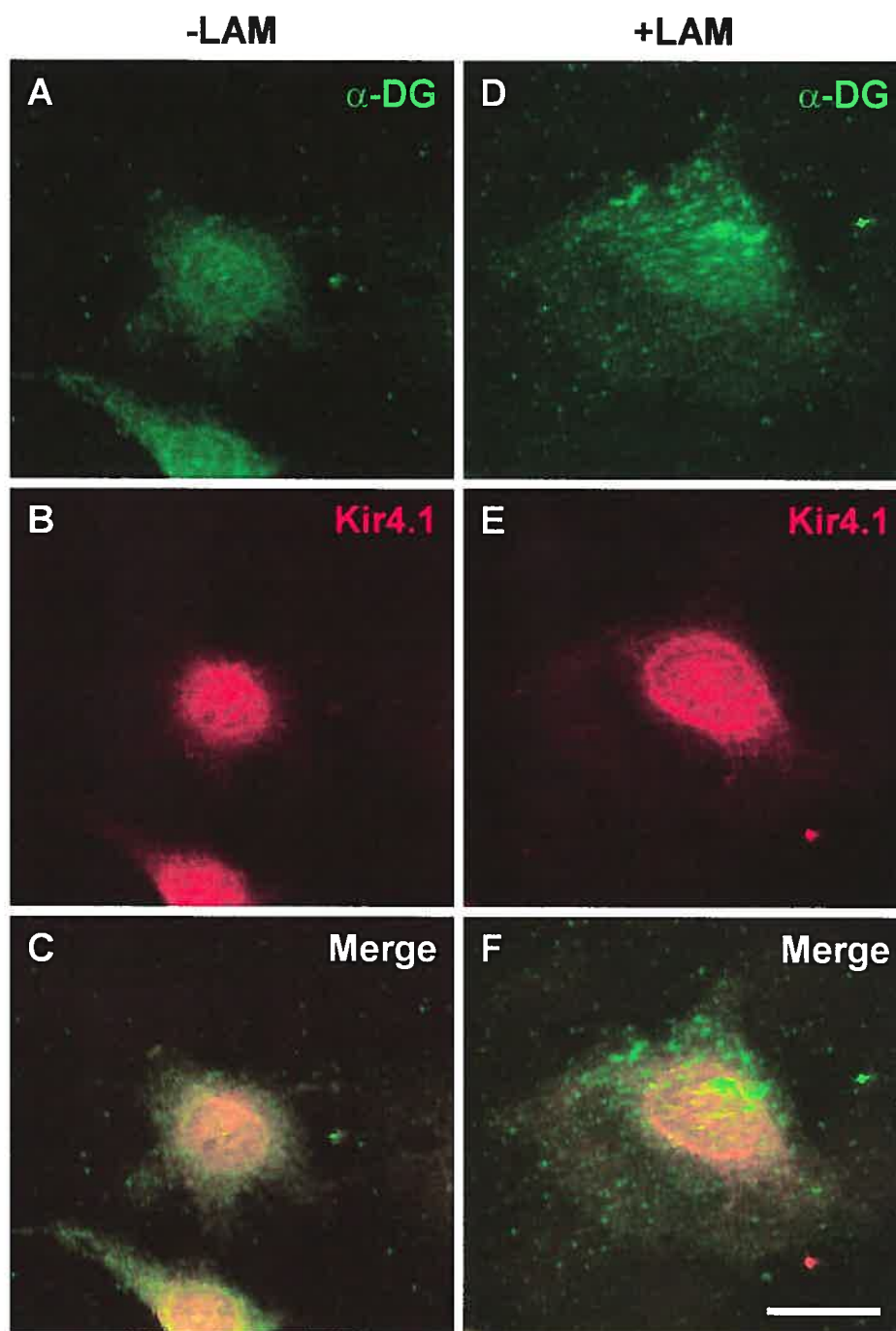


Figure 5.



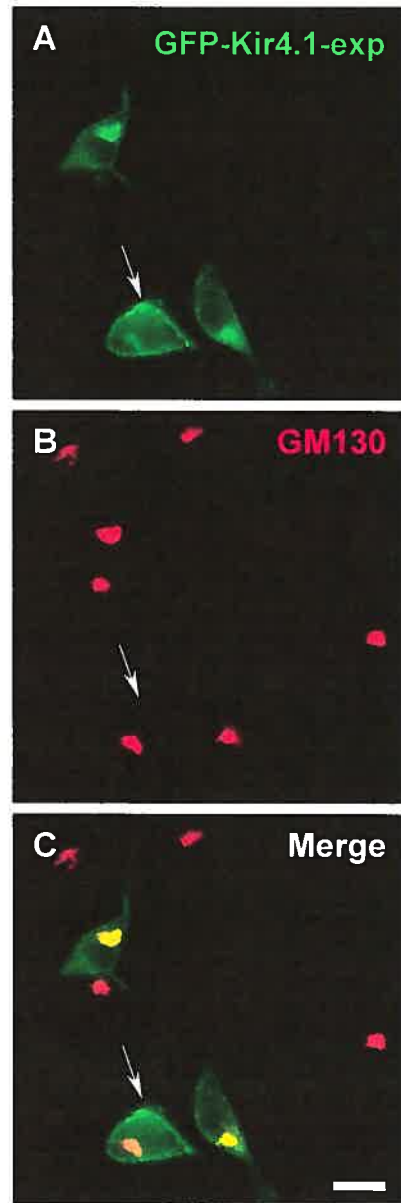


Figure 6.

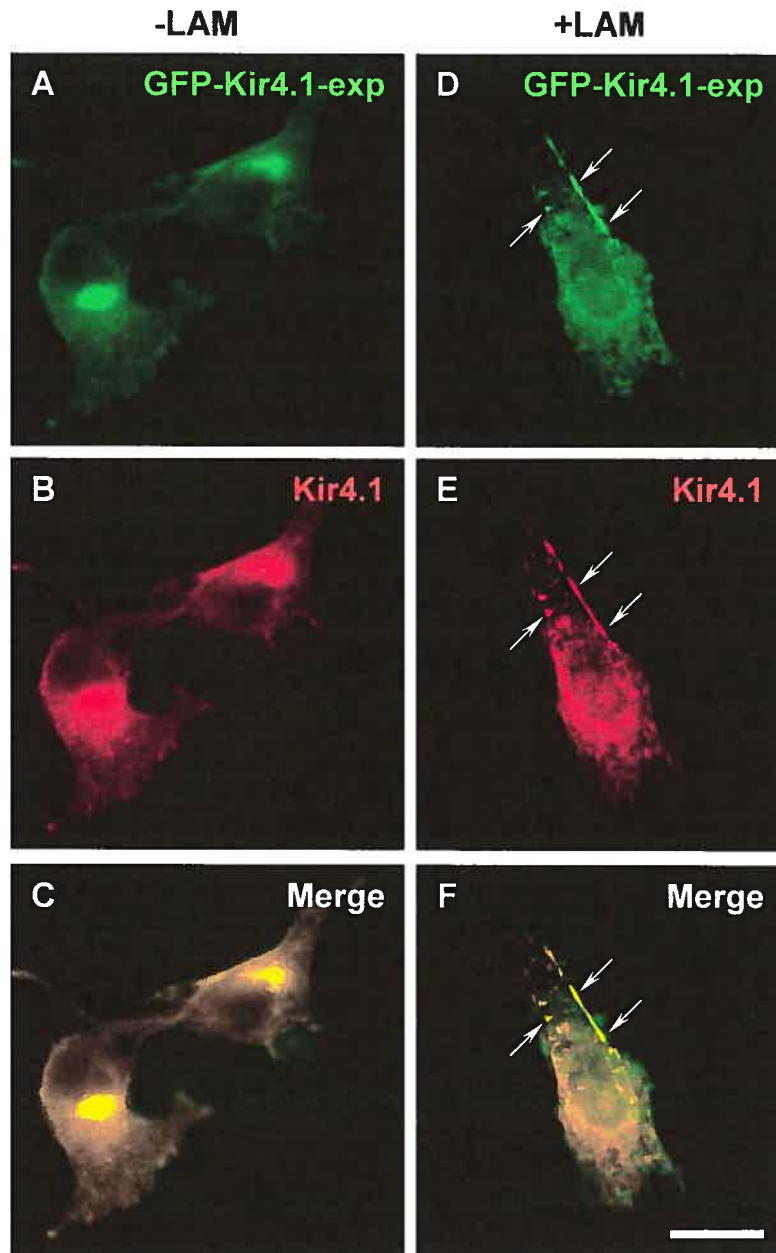


Figure 7.

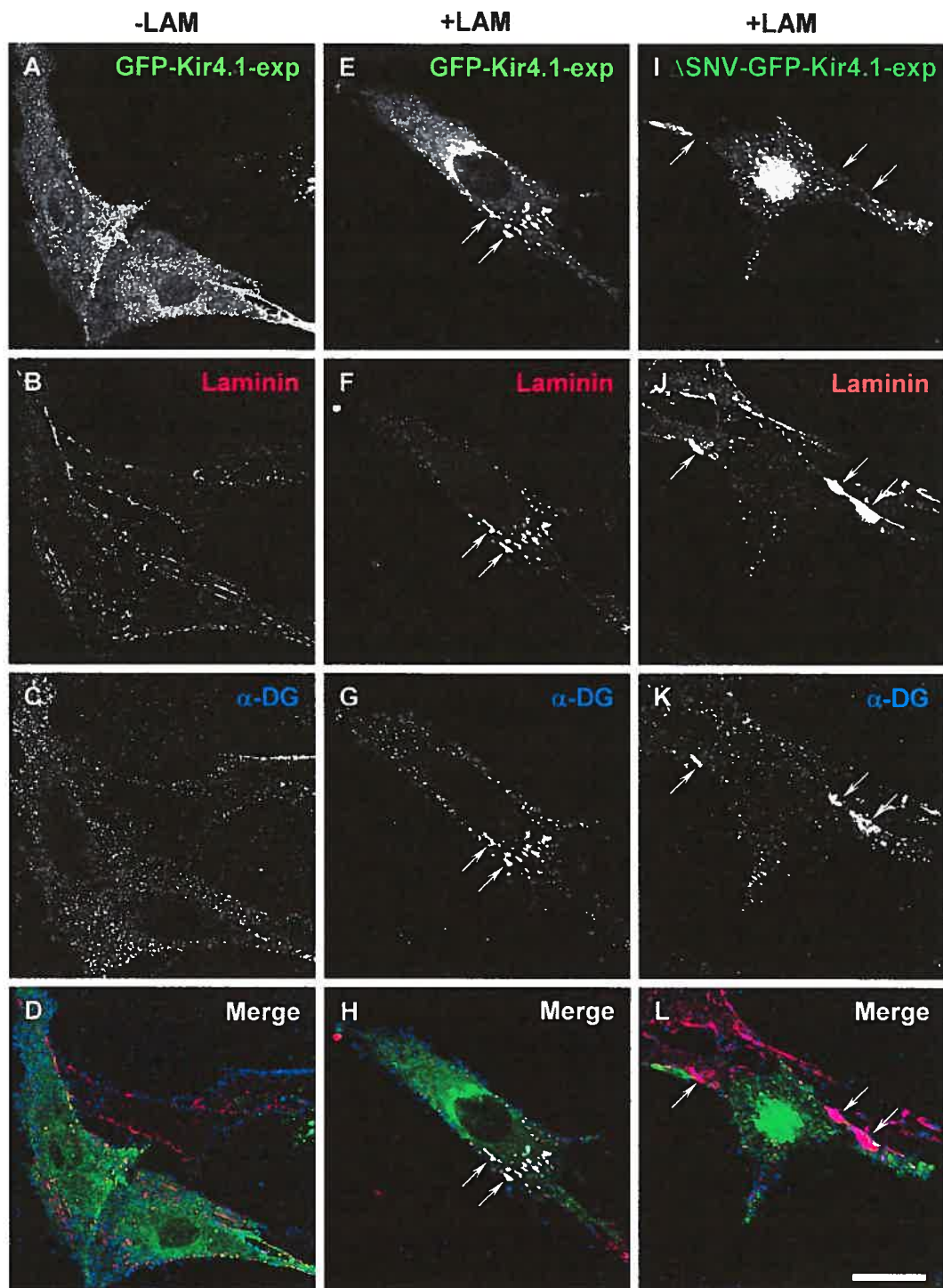


Figure 8.

### **III- Discussion et conclusion générales**

## 1. Implication du dystroglycan dans la neuro-pathogenèse associée à certaines dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires « classiques » sont celles de Duchenne et de Becker et elles sont causées par des mutations dans le gène de la dystrophine. Cependant, avec les années, plusieurs mutations de gènes autres que la dystrophine furent identifiées comme étant impliquées dans d'autres formes de dystrophies musculaires. Parmi ces mutations, plusieurs touchent des gènes codant des protéines faisant partie du complexe PAD ou des protéines importantes dans la modification post-traductionnelle de l' $\alpha$ -DG (Beltràn-Valero de Bernabé et al., 2002; Brockington et al., 2001; Holzfeind et al., 2002; Kano et al., 2002; Kobayashi et al., 1998). Selon les variantes de dystrophies musculaires, les patients peuvent être plus ou moins affectés intellectuellement en plus d'être affligés de handicaps physiques.

Des mutations dans les gènes codant des enzymes responsables de la glycosylation de l' $\alpha$ -DG résultent en des dystrophies musculaires avec des retards mentaux plus sévères que ceux rencontrés chez les patients atteints de DMD (Louhichi et al., 2003; Villanova et al., 2000; Mercuri et al., 1999; Longman et al., 2003). L'hypoglycosylation de l' $\alpha$ -DG résulte en une perte de l'interaction de cette protéine avec des composantes de la matrice extracellulaire (MEC) telles que la laminine et l'agrine (Michele et al., 2002). Dans le cerveau, la MEC est fortement exprimée à l'interface entre les pieds terminaux des astrocytes et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, alors qu'au niveau de la fente synaptique, il n'existe, pour ainsi dire, pas de MEC. Néanmoins, la fente synaptique est occupée par une matrice dense aux électrons et dont la composition protéique n'est pas encore bien définie. L' $\alpha$ -DG est exprimé à la fois au niveau péri-vasculaire sur la membrane des astrocytes (Moukhles et Carbonetto, 2001; Zaccaria et al., 2001) et au niveau synaptique sur la membrane postsynaptique des neurones (Levi et al., 2002). Au niveau des synapses, l' $\alpha$ -DG aurait pour

ligand la neurexine qui est localisée sur la membrane présynaptique des neurones (Sugita et al., 2001) et l'interaction entre ces deux protéines est perturbée, lorsque l' $\alpha$ -DG est hypoglycosylé (Michele et al., 2002). Bien que la liaison entre l' $\alpha$ -DG et la neurexine fut caractérisée, son rôle fonctionnel reste à déterminer. Au niveau de l'interface entre les cellules gliales et les cellules endothéliales vasculaires, l' $\alpha$ -DG aurait pour ligand la laminine (Tian et al., 1996) et possiblement l'agrine qui est également concentrée autour des vaisseaux sanguins (Barber et al., 1997). D'autres protéines du complexe PAD sont également exprimées au niveau synaptique et autour des vaisseaux sanguins (Blake et al., 1999; Moukhles et Carbonetto, 2001; Neely et al., 2001; Ueda et al., 2000). L'ensemble de ces données suggère que les PAD et plus particulièrement que la liaison de l' $\alpha$ -DG avec la laminine, l'agrine et la neurexine est très importante dans le fonctionnement normal des neurones et des cellules gliales du cerveau.

## **2. Expression de l'aquaporine-4 et des Kir4.1 dans le cerveau et la rétine**

L'activité neuronale s'accompagne par une libération de potassium ( $K^+$ ) dans le milieu extracellulaire permettant une re-polarisation des neurones (revu dans Horio, 2001). Toutefois, l'excès de potassium dans le milieu extracellulaire résultant de l'activité neuronale peut devenir toxique pour les neurones, s'il n'est pas éliminé. L'homéostasie du  $K^+$  dans le système nerveux central est donc cruciale pour le bon fonctionnement des neurones. Dans le cerveau et la rétine, cette homéostasie est assurée, respectivement, par les astrocytes et les cellules de Müller dont les prolongements adjacents aux synapses, aux vaisseaux sanguins et à l'humeur vitrée sont riches en canaux Kir4.1 (Higashi et al., 2001). La distribution spatiale des Kir4.1 est organisée de sorte à ce qu'ils soient concentrés dans des domaines cellulaires spécifiques favorisant leur efficacité fonctionnelle. Ainsi, l'excès de  $K^+$  extracellulaire libéré lors d'une

activation neuronale est transporté par les Kir4.1 exprimés dans les prolongements gliaux adjacents aux synapses et est déversé dans la circulation sanguine et dans l'humeur vitrée par l'intermédiaire des Kir4.1 exprimés dans les pieds terminaux des cellules gliales (Higashi et al., 2001; Connors et Kofuji, 2002; Tian et al., 2003).

Le transport de  $K^+$  dans les astrocytes et les cellules de Müller est accompagné de mouvements d'eau afin de maintenir une osmolarité constante entre ces cellules et leur environnement. Le flux d'eau à travers la membrane plasmique des astrocytes est assuré par l'AQP4. De manière intéressante, l'AQP4 et les Kir4.1 sont co-enrichis au niveau des prolongements gliaux à l'interface des vaisseaux sanguins dans le cerveau et la rétine, de même que dans les pieds terminaux des cellules de Müller aboutissant à la membrane limitante interne adjacente à l'humeur vitrée (Neely et al., 2001; Connors et Kofuji, 2002; Dalloz et al., 2003).

En accord avec des études précédentes (Amiry-Moghaddam et al., 2003a et b), nous avons montré que les Kir4.1 et l'AQP4 sont concentrés au niveau des astrocytes péri-vasculaires dans le cerveau et sont également exprimés au niveau du neuropil reflétant une association possible des canaux avec les prolongements astrocytaires entourant les synapses (voir figure 1, page 69). Nous avons aussi montré que les Kir4.1 sont concentrés au niveau de la membrane limitante interne de la rétine (voir figure 1E, page 87). La distribution spatiale des Kir4.1 et de l'AQP4, dans ces sites, a un rôle déterminant dans l'homéostasie du  $K^+$  et de l'eau dans le cerveau et la rétine.

### **3. Agrégation de l'aquaporine-4 et des canaux Kir4.1 induite par la laminine-1 dans les cultures mixtes de cellules d'hippocampe**

Les composantes des matrices extracellulaires (MEC) sont impliquées dans la spécialisation des membranes plasmiques des cellules avoisinantes.

La MEC autour des vaisseaux sanguins du SNC est riche en laminine (Sievers et al., 1994; Hagg et al., 1997; Lom et Hockberger, 1997; Wagner et Gardner, 2000). Les membranes plasmiques des astrocytes faisant face à cette matrice présentent une concentration de DG, d'AQP4 et de Kir4.1 (Tian et al., 1996; Higashi et al., 2001; Neely et al., 2001; Connors et Kofuji, 2002). Ces observations nous ont incités à étudier l'effet de la laminine sur la spécialisation de la membrane plasmique des astrocytes et plus spécifiquement sur la distribution des Kir4.1 et de l'AQP4. Au niveau des JNMs, la laminine et l'agrine sont deux acteurs importants de la spécialisation postsynaptique, puisqu'ils ont un rôle critique dans l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine. Nos études, sur les cultures primaires de cellules mixtes d'hippocampe, nous ont permis de mettre en évidence l'implication de la laminine-1 dans l'agrégation des Kir4.1 et de l'AQP4 à la membrane des astrocytes (voir figure 5, page 73). Nous avons également montré que ces canaux co-localisaient avec des membres du complexe PAD dont l' $\alpha$ -DG, la syntrophine et l' $\alpha_1$ -dystrobrevine (voir figures 2 et 3, pages 70 et 71). Ces données suggèrent que la laminine-1 participe activement à la mise en place des mécanismes moléculaires menant à l'homéostasie du  $K^+$  et de l'eau dans le cerveau et que ces derniers impliquent un complexe contenant le DG (voir figure 7 en appendices). Toutefois, la laminine est un ligand d'une autre famille de récepteurs, soit la famille des intégrines. Pour vérifier l'implication possible des intégrines dans l'agrégation de ces canaux, nous avons marqué les cellules astrocytaires préalablement traitées à la laminine pour l'intégrine- $\beta_1$  qui se lie à la laminine-1 avec une haute affinité (Tawil et al., 1990). Nos résultats montrent que contrairement à l' $\alpha$ -DG, l'intégrine- $\beta_1$  ne s'agrège pas en présence de laminine-1 et présente une distribution diffuse similaire à celle observée en absence de laminine-1 (voir figure 6 en appendice). Ces données favorisent une implication préférentielle du DG et d'autres membres du complexe PAD dans les mécanismes d'agrégation des canaux Kir4.1 et AQP4.



Les analyses quantitatives et morphométriques montrent que la laminine-1 est impliquée dans l'agrégation des canaux Kir4.1 et AQP4, mais qu'elle ne provoque pas une augmentation de la taille des agrégats par rapport à celle des agrégats spontanés observés dans les cellules cultivées en l'absence de laminine-1 (voir figures 6 et 7, pages 74 et 75). Ceci suggère que la laminine-1 joue un rôle dans la stabilisation/consolidation de ces canaux à la membrane plutôt que dans leur recrutement au niveau d'agrégats préexistants. De plus, le traitement des cellules avec la laminine-1 ne semble pas changer les niveaux d'expression des Kir4.1 dans les cultures mixtes (données non montrées). L'ensemble de ces données indique que la laminine-1 stabilise et agrège les canaux AQP4 et Kir4.1 à la membrane par l'intermédiaire de mécanismes moléculaires mettant en jeu des membres du complexe PAD dont l' $\alpha$ -DG, la syntrophine et la dystrobrevine.

#### **4. Agrégation de l'aquaporine-4 et des canaux Kir4.1 induite par la laminine-1 dans des cultures pures d'astrocytes et de cellules de Müller**

Dans des études subséquentes, nous avons utilisé des cultures primaires d'astrocytes pures ainsi que des cultures de cellules de Müller. Ces deux systèmes de culture nous ont permis d'étudier l'agrégation des Kir4.1 et de l'AQP4 en absence de cellules neuronales. Les astrocytes et les cellules de Müller constituent deux populations de cellules gliales interagissant avec les protéines de la matrice extracellulaire et ayant des fonctions communes dans le maintien de l'homéostasie de l'eau et des ions potassiques dans le cerveau et la rétine, respectivement.

Comme dans les cultures mixtes, la laminine-1 induit l'agrégation de l'AQP4 dans les cultures pures d'astrocytes (voir la figure 1 en appendices). Nous retrouvons également des membres du complexe PAD dont l' $\alpha$ -DG, le  $\beta$ -DG et l' $\alpha_1$ -DB co-localisés avec les agrégats d'AQP4 (voir les figures 1, 3, 4

et 5 en appendices). Comme ce fut le cas dans les cultures mixtes, la laminine-1 n'a eu aucun effet sur la distribution de l'intégrine- $\beta_1$  dont le marquage demeure diffus au niveau des astrocytes (voir la figure 6 en appendices). Ces résultats indiquent que l'intégrine- $\beta_1$  n'est pas impliquée dans l'agrégation de l'AQP4. Toutefois, il est possible que d'autres sous-types d'intégrines soient impliqués dans l'agrégation de l'AQP4. En effet, les astrocytes péri-vasculaires expriment aussi l'intégrine  $\alpha_6\beta_4$  (Wagner et al., 1997). L'intégrine  $\alpha_6\beta_4$  et la laminine sont responsables de la formation d'hémidesmosomes reliant les astrocytes à leur environnement (Jones et al., 1991). Nous allons donc explorer cette possibilité afin de déterminer s'il y a une collaboration possible des intégrines dans le processus d'agrégation de l'AQP4 dans les cultures d'astrocytes.

À l'inverse de l'AQP4, la laminine-1 n'induit pas l'agrégation des Kir4.1 dans les cultures pures d'astrocytes (voir figure 2 en appendices). En fait, l'expression des Kir4.1 au niveau de la membrane plasmique semble très faible dans ce système de culture. Rappelons que la laminine-1 induit l'agrégation des Kir4.1 dans les cultures mixtes de cellules d'hippocampe contenant des astrocytes et des neurones (article accepté au journal *Glia*). Il est important de noter que les astrocytes purs furent cultivés dans le même milieu que les cultures mixtes. Par conséquent, la seule différence entre ces deux systèmes de culture réside en l'absence de neurones dans les cultures pures d'astrocytes. Ces données suggèrent que l'agrégation des Kir4.1 induite par la laminine requière la participation de facteurs neuronaux. Ces derniers pourraient intervenir dans le ciblage des Kir4.1 de compartiments cytoplasmiques tel que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi à la membrane plasmique et/ou dans leur stabilisation à la membrane plasmique, une fois qu'ils y sont ciblés. À première vue, nos études sur les cultures mixtes suggèrent que les mécanismes moléculaires à la base de l'agrégation des Kir4.1 et de l'AQP4 sont identiques. Toutefois, les données issues des cultures pures d'astrocytes, quant à elles, révèlent la mise en jeu de

mécanismes moléculaires distincts dans l'agrégation de ces canaux à la membrane plasmique.

Une étude parallèle menée sur des cultures de cellules de Müller montre aussi l'absence de réponse de l'intégrine- $\beta_1$  face au traitement des cellules avec la laminine (voir figure 2H, page 88). L' $\alpha$ -DG, quant à lui, s'agrège en présence de laminine-1 et son agrégation est proportionnelle à la concentration de laminine utilisée (voir figure 2D et J, page 88). De façon similaire aux cultures pures d'astrocytes, les Kir4.1 ne s'agrègent pas suite au traitement à la laminine-1 et ne semblent pas être exprimés à la membrane plasmique (voir figure 5, page 91). Ces données renforcent l'idée d'un rôle de l'environnement neuronal dans le processus d'agrégation de ces canaux. Ce rôle serait commun à différentes populations de cellules gliales, à savoir les astrocytes et les cellules de Müller.

## **5. Implication du motif SNV des canaux Kir4.1 dans leur agrégation induite par la laminine-1**

La lignée de cellules de Müller utilisée, HPV-16 E6/E7, exprime peu les Kir4.1 endogènes à la membrane plasmique (voir figure 5, page 91). Ces derniers semblent être localisés au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Cependant, ceci reste à être vérifié par des expériences de double marquage des Kir4.1 et de la calnexine, un marqueur du RE. La faible expression des Kir4.1 à la membrane fut également rapportée par Ishii et *al.* (1997) au niveau de cultures primaires de cellules de Müller. Pour contourner ce problème engendré possiblement par l'absence de neurones rétiniens, nous avons transfecté ces cellules avec un vecteur contenant l'ADNc des Kir4.1 dans lequel une séquence d'export du RE, constituée de 7 acides aminés (Stockklauser et al., 2001), a été insérée au niveau du C-terminal. De plus, le vecteur d'expression utilisé contient la EGFP (enhanced green fluorescent protein; GFP-Kir4.1-exp); ce qui a facilité la détection des cellules de Müller

transfectées. Ainsi, dans notre étude, les cellules GFP-positives furent analysées par microscopie confocale. Les cellules transfectées avec le vecteur contiennent maintenant des Kir4.1 (exogènes) au niveau de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique (voir figure 6, page 92). Le traitement des cellules avec la laminine-1 induit la co-agrégation des GFP-Kir4.1-exp et de l' $\alpha$ -DG (voir figures 8E-G, page 94) reproduisant ainsi les résultats obtenus dans les cultures mixtes. Ces observations suggéreraient que dans un environnement *in vivo*, les Kir4.1 endogènes nécessiteraient un signal d'export du RE qui serait vraisemblablement régulé par des facteurs neuronaux. Dans l'ensemble, l'agrégation des Kir4.1 dans les cellules de Müller ferait donc appel à des mécanismes similaires à ceux mis en jeu dans les astrocytes des cultures mixtes. Donc, les mécanismes moléculaires responsables de cette agrégation seraient comparables et impliqueraient des voies de signalisation communes dans les astrocytes du cerveau et les cellules de Müller de la rétine.

Les canaux Kir4.1 possèdent un motif SNV à l'extrémité de leur domaine C-terminal qui est intracellulaire. En général, les motifs SXV dans d'autres protéines telles que les canaux sodiques et les récepteurs NMDA (Gee et al., 1998; Kornau et al., 1995), sont connus pour interagir avec des protéines contenant des domaines PDZ comme la PSD95. Des travaux précédents montrèrent l'association des Kir4.1 à la PSD95 (Horio et al., 1997). De plus, l'AQP4 contient, elle aussi, un motif de type SXV (SSV) qui pourrait interagir avec le domaine PDZ de la syntrophine (Adams et al., 2001; Neely et al., 2001). Cependant, nous ne savons pas si cette interaction est directe ou indirecte. Pour savoir si le motif SNV est nécessaire au recrutement des Kir4.1 dans les agrégats contenant l' $\alpha$ -DG suite au traitement avec la laminine-1, nous avons transfecté des cellules de Müller avec un vecteur contenant l'ADNc des canaux Kir4.1 dont la séquence SNV fut délétée ( $\Delta$ SNV-GFP-Kir4.1-exp). Ces Kir4.1 mutants ne sont pas co-localisés avec les agrégats d' $\alpha$ -DG et de laminine-1 (voir figure 8i, page 94).

La présence de la séquence SNV s'avère donc cruciale pour la co-agrégation des Kir4.1 avec l' $\alpha$ -DG suite au traitement des cellules à la laminine-1. Parmi les PAD, un des candidats susceptibles d'interagir avec les Kir4.1 et donc de les recruter au complexe PAD est la syntrophine. En effet, cette dernière est la seule PAD connue qui contient un domaine PDZ susceptible d'interagir avec la séquence SNV des Kir4.1.

## 6. La laminine endogène versus la laminine exogène

Dans nos expériences, nous traitons nos cellules avec la laminine-1 qui est composée des chaînes  $\alpha_1$  (~400 kDa),  $\beta_1$  (~200 kDa) et  $\gamma_1$  (~200 kDa). Cette isoforme de la laminine est connue pour être présente autour des vaisseaux sanguins dans le SNC (Sievers et al., 1994; Hagg et al., 1997; Lom et Hockberger, 1997; Wagner et Gardner, 2000). Dans nos cultures, les astrocytes et les cellules de Müller expriment de la laminine endogène, cependant cette dernière agrège peu ou pas les Kir4.1, l'AQP4 et les membres du complexe DAP (voir la figure 8, page 94 et les figures 1,3-5 en appendices). Nous avons effectué un immunobuvardage de type Western pour déterminer l'isoforme de laminine exprimée par les cellules de Müller (voir figure 2J, page 88). Cette expérience montre que les cellules de Müller n'expriment pas la chaîne  $\alpha_1$  et suggère que celle-ci soit responsable de l'agrégation des Kir4.1 et de l' $\alpha$ -DG induite par la laminine-1 dans ces cultures. Pour ce qui est des isoformes de la laminine possiblement exprimées de manière endogène par les cellules de Müller, les laminine 7 ( $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ ) et 9 ( $\alpha_4\beta_2\gamma_1$ ) constituent des hypothèses plausibles. En effet, ces isoformes contiennent de la laminine  $\beta_2$  qui est connue pour être produite par les cellules de Müller *in vivo* (Libby et al., 1997) et les chaînes  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  et  $\gamma_1$  possèdent des masses moléculaires avoisinant les 200 kDa, ce qui soutient les résultats obtenus avec l'immunobuvardage de type Western.

## 7. Implication de l'agrine dans l'agrégation de l'aquaporine-4 et des Kir4.1

Au niveau du muscle, l'ajout de la laminine à des myotubes préalablement traités à l'agrine potentialise l'effet de l'agrine sur l'agrégation des récepteurs AChRs (Cohen et al., 1997; Montanaro et al., 1998). Dans les cellules de Müller, l'agrine est exprimée au niveau des agrégats d' $\alpha$ -DG induit par la laminine (voir figure 3, page 89). De plus, nos études quantitatives montrent que l'agrine est exprimée dans 50% des agrégats d' $\alpha$ -DG (données non illustrées). Nous avons donc étudié l'effet possible du traitement simultané des cellules de Müller avec la laminine (15 nM) et l'agrine neuronale recombinante (10 nM) sur l'agrégation du DG. Nos résultats nous portent à croire que l'agrine ne potentialise pas l'agrégation de l' $\alpha$ -DG induite par la laminine dans les cellules de Müller (voir figure 4, page 90). Toutefois, il est important de noter que d'une part la concentration de laminine-1 utilisée conjointement à l'agrine est de l'ordre de 15 nM ce qui correspond à une concentration saturante (voir figure 2K, page 88) et que d'autre part la concentration d'agrine utilisée pourrait être insuffisante. Dans des expériences futures, nous envisageons de réduire la concentration de laminine et si nécessaire d'augmenter parallèlement la concentration d'agrine recombinante afin de mettre en évidence une potentialisation possible de la part de l'agrine sur l'agrégation de l' $\alpha$ -DG.

Pour poursuivre l'étude de l'implication possible de l'agrine dans l'agrégation de l' $\alpha$ -DG et de l'AQP4 dans les cultures d'astrocytes, nous envisageons (1) de bloquer l'agrine endogène avec un anticorps spécifique dirigé contre l'agrine et (2) d'utiliser des cultures d'astrocytes de souris *knock out* pour l'agrine ( $Ag^{-/-}$ ) (Gautam et al., 1996). Nous pourrions, par des analyses quantitatives, constater les conséquences de l'absence d'agrine sur l'agrégation de l'AQP4 dans ces cultures. De plus, dans les cultures d'astrocytes  $Ag^{-/-}$ , l'ajout d'agrine recombinante pourrait rétablir l'agrégation

des canaux AQP4 induite par la laminine, ce qui prouverait que l'agrine est un des acteurs principaux impliqués dans l'agrégation de ces canaux.

## **8. Rôle des PADs dans l'homéostasie du potassium et de l'eau dans le cerveau**

La barrière hémato-encéphalique est très affectée par l'absence de dystrophine qui entraîne également une baisse d'expression de l'AQP4 (Nico et al., 2003). De plus, la présence de Dp71 est impliquée dans la distribution des Kir4.1 et d'AQP4 dans les cellules de Müller (Connors et Kofuji, 2002; Dalloz et al., 2003). Par ailleurs, des études récentes, sur des souris *knock out* pour la syntrophine, montrent que cette dernière est importante pour la stabilisation de l'AQP4, qui est nécessaire à une conduction normale des ions  $K^+$  à travers les canaux potassiques (Amiry-Moghaddam et al., 2003a; Neely et al., 2001). De plus, l'élimination de  $K^+$  est retardée et la susceptibilité à des crises épileptiques induites est augmentée chez ces souris (Amiry-Moghaddam et al., 2003a). Ces données suggèrent que le complexe PAD puisse être impliqué dans le maintien de l'homéostasie du  $K^+$  et de l'eau dans le système nerveux central. La perte de cette homéostasie pourrait contribuer à la pathogenèse dans le cerveau et la rétine se traduisant par des retards mentaux et des anomalies de l'activité rétinienne chez certains patients dystrophiques. Nous pouvons donc imaginer, chez ces derniers, que l'incapacité du système nerveux central à se départir de son excès de potassium puisse engendrer un environnement cytotoxique pour les neurones, ce qui se traduirait par la perte de neurones. Un second mécanisme pourrait impliquer une hyperexcitabilité et une synchronisation anormale des neurones conduisant à la formation de synapses qui ne se formeraient pas en temps normal. Dans les deux cas, nous nous attendrions à ce que le réseau neuronal soit affecté, ce qui résulterait possiblement en des retards mentaux chez les patients dystrophiques.

Nos travaux montrent que le complexe PAD est mis en jeu dans les mécanismes d'agrégation/stabilisation des Kir4.1 et de l'AQP4 et ce, par la signalisation extracellulaire déclenchée par la laminine-1 via l' $\alpha$ -DG (voir figure 7 en appendices). De plus, nous savons maintenant que le ciblage des Kir4.1 à la membrane dépend de la présence de neurones. Ces études nous permettent maintenant de mieux comprendre le phénomène de la polarisation cellulaire observé dans les astrocytes périvasculaires et les cellules de Müller. La distribution polarisée des canaux AQP4 et Kir4.1 est essentielle à l'homéostasie potassique du système nerveux central constituant l'une des fonctions de la barrière hémato-encéphalique. La perturbation de cette homéostasie pourrait contribuer à la pathogenèse des troubles fonctionnels du cerveau et de la rétine reflétés par des retards mentaux et des anomalies de l'activité rétinienne associés à certaines formes de dystrophies musculaires.

## 9. Perspectives

Dans des études futures, nous entreprendrons des expériences visant à mettre en évidence le rôle possible des intégrines et plus particulièrement de l'intégrine  $\alpha_6\beta_4$  dans l'agrégation de l'AQP4 et des Kir4.1. De la même façon, une étude plus exhaustive du rôle de l'agrine neuronale dans cette agrégation s'impose afin de déterminer si cette protéine de la matrice extracellulaire connue pour se lier à l' $\alpha$ -DG est en mesure d'induire l'agrégation des Kir4.1 et de l'AQP4 et de potentialiser l'effet de la laminine-1. D'autre part, l'utilisation de souris *knock out* pour le DG serait un outil puissant pour déterminer si l'axe laminine-DG et agrine-DG sont primordiaux pour l'agrégation des canaux Kir4.1 et AQP4 ou bien si la laminine-1 et l'agrine sont en mesure d'induire cette agrégation en absence de DG et donc via d'autres récepteurs. Ensuite, pour démontrer que les Kir4.1 interagissent avec la syntrophine et que cette interaction dépend de la séquence SNV



située à l'extrémité C-terminale des Kir4.1, des expériences de co-immunoprécipitation sur une lignée stable de cellules de Müller transfectées avec les vecteurs contenant les ADNc des Kir4.1-export ou  $\Delta$ SNV-Kir4.1-export seront effectuées.

De plus, une autre avenue pour le laboratoire consisterait à explorer les voies de signalisation en aval de l'axe laminine-DG en étudiant, par exemple, l'impact de la laminine sur la distribution de nNOS et de Grb2 et sur la phosphorylation des membres du complexe. Enfin, il serait très intéressant d'analyser la production d'oxide nitrique par la nNOS dans les cellules traitées ou non avec la laminine-1.

Il est clair, d'après nos données aussi bien sur les cultures d'astrocytes que sur les cultures de cellules de Müller, que un ou des facteurs neuronaux agissent de concert avec la laminine-1 dans le processus d'agrégation/stabilisation des Kir4.1. Il nous est difficile à ce stade de notre étude d'affirmer qu'il s'agit de facteurs solubles ou d'un effet qui nécessite un contact entre les neurones et les cellules gliales. Des études visant à identifier le mécanisme d'action des neurones dans l'agrégation des Kir4.1 sont en cours dans le laboratoire.

#### **IV- Références de l'introduction et de la discussion**

- Abdelmoity A, Padre RC, Burzynski KE, Stull JT, Lau KS (2000) Neuronal nitric oxide synthase localizes through multiple structural motifs to the sarcolemma in mouse myotubes. *FEBS Letters* 482:65-70.
- Adams ME, Mueller HA, Froehner SC (2001) In vivo requirement of the  $\alpha$ -syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *The Journal of Cell Biology* 155:113-122.
- Adams ME, Dwyer TM, Dowler LL, White RA, Froehner SC (1995) Mouse alpha 1- and beta 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain. *J Biol Chem* 270:25859-25865.
- Ahn AH, Freener CA, Gussoni E, Yoshida M, Ozawa E, Kunkel LM (1996) The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem* 271:2724-2730.
- Ambrose HJ, Blake DJ, Nawrotzki RA, Davies KE (1997) Genomic organization of the mouse dystrobrevin gene: comparative analysis with the dystrophin gene. *Genomics* 39:359-369.
- Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, Nagelhus EA, Adams ME, Froehner SC, Agre P, Ottersen OP (2003a) Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13615-13620.
- Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A (2003b) An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2106-2111.
- Anderson SW, Routh DK, Ionasescu VV (1988) Serial position memory of boys with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 30:328-333.

- Apel ED, Roberds SL, Campbell KP, Merlie JP (1995) Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. *Neuron* 15:115-126.
- Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, Yoshida M, Hori T, Ozawa E (1999) Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in  $\beta$ -sarcoglycan-deficient mice. *Human Molecular Genetics* 8:1589-1598.
- Balasubramanian S, Fung ET, Haganir RL (1998) Characterization of the tyrosine phosphorylation and distribution of dystrobrevin isoforms. *FEBS Letters* 432:133-140.
- Barber AJ, Lieth E (1997) Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Dev Dyn* 208:62-74.
- Bardoni A, Sironi M, Felisari G, Comi GP, Bresolin N (1999) Absence of brain Dp140 isoform and cognitive impairment in Becker muscular dystrophy. *The Lancet* 353:897-898.
- Belkin AM, Smalheiser NR (1996) Localization of cranin (dystroglycan) at sites of cell-matrix and cell-cell contact: recruitment to focal adhesions is dependent upon extracellular ligands. *Cell Adhes Commun* 4:281-296.
- Beltràn-Valero de Bernabé D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki A-E, Cruces J, Voit T, Walsh CA, van Bokhoven H, Brunner HG (2002) Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg Syndrome. *American Journal of Human Genetics* 71:1033-1043.
- Billard C, Gillet P, Barthez MA, Hommet C, Bertrand P (1998) Reading ability and processing in Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 40:12-20.

- Blake DJ, Kröger S (2000) The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends in Neurosciences* 23:92-99.
- Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW (1999) Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *The Journal of Cell Biology* 147:645-657.
- Bosman FT, Stamenkovic I (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200:423-428.
- Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Ponting CP, Estournet B, Romero NB, Mercuri E, Voit T, Sewry CA, Guicheney P, Muntoni F (2001) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 69:1198-1209.
- Campanelli JT, Roberds SL, Campbell KP, Scheller RH (1994) A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell* 77:663-674.
- Campbell KP (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80:675-679.
- Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov EV, T NS, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MBA (1998) Identification of  $\alpha$ -dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and lassa fever virus. *Science* 282:2079-2081.
- Carlson CG (1998) The dystrophinopathies: an alternative to the structural hypothesis. *Neurobiology of Disease* 5:3-15.
- Cartaud A, Coutant S, Petrucci TC, Cartaud J (1998) Evidence for *in situ* and *in vitro* association between  $\beta$ -dystroglycan and the subsynaptic 43K rapsyn protein. *The Journal of Biological Chemistry* 273:11321-11326.

- Cavaldesi M, Macchia G, Barca S, Defilippi P, Tarone G, Petrucci TC (1999) Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. *Journal of Neurochemistry* 72:1648-1655.
- Claudepierre T, Dailoz C, Mornet D, Matsumura K, Sahel J, Rendon A (2000) Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Müller glial cells. *Journal of Cell Sciences* 113:3409-3417.
- Cohen MW, Jacobson C, Yurchenco PD, Morris GE, Carbonetto S (1997) Laminin-induced clustering of dystroglycan on embryonic muscle cells: comparison with agrin-induced clustering. *J Cell Biol* 136:1047-1058.
- Cohn RD, Campbell KP (2000) Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve* 23:1456-1471.
- Connors NC, Kofuji P (2002) Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *J Neurosci* 22:4321-4327.
- Côté PD, Moukhles H, Carbonetto S (2002) Dystroglycan is not required for localization of dystrophin, syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase at the sarcolemma but regulates integrin  $\alpha_{7B}$  expression and caveolin-3 distribution. *The Journal of Biological Chemistry* 277:4672-4679.
- Crawford GE, Faulkner JA, Crosbie RH, Campbell KP, Froehner SC, Chamberlain JS (2000) Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *The Journal of Cell Biology* 150:1399-1409.
- Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP (1997) Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 272:31221-31224.
- Crosbie RH, Dovico SA, Flanagan JD, Chamberlain JS, Ownby CL, Campbell KP (2002) Characterization of aquaporin-4 in muscle and muscular dystrophy. *Faseb J* 16:943-949.

- Dalloz C, Sarig R, Fort P, Yaffe D, Bordais A, Pannicke T, Grosche J, Mornet D, Reichenbach A, Sahel J, Nudel U, Rendon A (2003) Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet* 12:1543-1554.
- de Kermadec J-M, Bécane H-M, Chénard A, Tertrain F, Weiss Y (1994) Prevalence of left ventricular systolic dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: An echocardiographic study. *American Heart Journal* 127:618-623.
- de Visser M, de Voogt W, la Rivière GV (1992) The heart in Becker muscular dystrophy, facioscapulohumeral dystrophy, and bethlem myopathy. *Muscle & Nerve* 15:591-596.
- Dean C, Scholl FG, Choih J, DeMaria S, Berger J, Isacoff E, Scheiffele P (2003) Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 6:708-716.
- Deng W-M, Schneider M, Frock R, Castillejo-Lopez C, Gaman EA, Baumgartner S, Ruohola-Baker H (2003) Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in drosophila. *Development* 130:173-184.
- Dorman C, DesNoyers Hurley A, D'Avignon J (1988) Language and learning disorders of older boys with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 30:316-327.
- Dubowitz V (1977) Mental retardation in Duchenne muscular dystrophy. In: *Pathogenesis of human muscular dystrophy* (Rowland LP, ed), p 688. Amsterdam: Excerpta Medica.
- Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, van der Meulen J, Holt KH, Lim LE, Sanes JR, Davidson BL, Faulkner JA, Williamson R, Campbell KP (1998) Progressive muscular dystrophy in  $\alpha$ -sarcoglycan-deficient mice. *The Journal of Cell Biology* 142:1461-1471.
- Durbeej M, Henry MD, Campbell KP (1998) Dystroglycan in development disease. *Current Opinion in Cell Biology* 10.

- Ehmsen J, Poon E, Davies K. 2002. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* 115(Pt 14):2801-3.
- Ervasti JM, Campbell KP (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *The Journal of Cell Biology* 122:809-823.
- Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR (1997) epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem* 272:32534-32538.
- Feener CA, Koenig M, Kunkel LM (1989) Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338:509-511.
- Felisari G, Martinelli Boneschi F, Bardoni A, Sironi M, Comi GP, Robotti M, Turconi AC, Lai M, Corrao G, Bresolin N (2000) Loss of Dp140 dystrophin isoform and intellectual impairment in Duchenne dystrophy. *Neurology* 55:559-564.
- Fertuck HC, Salpeter MM (1974) Localization of acetylcholine receptor by <sup>125</sup>I-labeled  $\alpha$ -bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *PNAS* 71:1376-1378.
- Fitzpatrick C, Barry C, Garvey C (1986) Psychiatric disorder among boys with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 28:589-595.
- Forrest SM, Cross GS, Speer A, Gardner-Medwin D, Burn J, Davies KE (1987) Preferential deletion of exons in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Nature* 329:638-640.
- Frigeri A, Nicchia GP, Nico B, Quondamatteo F, Herken R, Roncali L, Svelto M (2001) Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *FASEB Journal* 15:90-98.
- Fuhrer C, Gautam M, Sugiyama JE, Hall ZW (1999) Roles of rapsyn and agrin in interaction of postsynaptic proteins with acetylcholine receptors. *The Journal of Neuroscience* 19:6405-6416.



- Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, Sanes JR (1996) Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85:525-535.
- Gee SH, Blacher RW, Douville PJ, Provost PR, Yurchenco PD, Carbonetto S (1993) Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *The Journal of Biological Chemistry* 268:14972-14980.
- Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC (1998) Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *The Journal of Neuroscience* 18:128-137.
- Gesemann M, Denzer AJ, Ruegg MA (1995) Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *The Journal of Cell Biology* 128:625-636.
- Gesemann M, Cavalli V, Denzer AJ, Brancaccio A, Schumacher B, Ruegg MA (1996) Alternative splicing of agrin alters its binding to heparin, dystroglycan, and the putative agrin receptor. *Neuron* 16:755-767.
- Glass DG, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, DeChiara TM, Yancopoulos GD (1996) Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85:513-523.
- Grady RM, Grange RW, Lau KS, Maimone MM, Nichol MC, Stull JT, Sanes JR (1999) Role for  $\alpha$ -dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nature Cell Biology* 1:215-220.
- Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM (1998)  $\gamma$ -Sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *The Journal of Cell Biology* 142:1279-1287.

- Hagg T, Portera-Cailliau C, Jucker M, Engvall E (1997) Laminins of the adult mammalian CNS; laminin-alpha2 (merosin M-) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes. *Brain Res* 764:17-27.
- Henry MD, Campbell KP (1996) Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 8:625-631.
- Henry MD, Campbell KP (1998) A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* 95:859-870.
- Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y (2001) An inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 281:C922-C931.
- Hoffman EP, Kunkel LM (1989) Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 2:1019-1029.
- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928.
- Holzfeind PJ, Grewal PK, Reitsamer HA, Kechvar J, Lassmann H, Hoeger H, Hewitt JE, Bittner RE (2002) Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Large<sup>myd</sup> mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle-eye-brain disorders. *Human Molecular Genetics* 11:2673-2687.
- Horio Y (2001) Potassium channels of glial cells: distribution and function. *Japanese Journal of Pharmacology* 87:1-6.
- Horio Y, Hibino H, Inanobe A, Yamada M, Ishii M, Tada Y, Satoh E, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y (1997) Clustering and enhanced activity of an inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, by an anchoring protein, PSD-95/SAP90. *J Biol Chem* 272:12885-12888.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett S, Campbell KP (1992) Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355:696-702.

- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Milatovich A, Ozcelik T, Yang B, Koepnick K, Francke U, Campbell KP (1993) Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue and isoforms and chromosomal localization. *Human Molecular Genetics* 2:1651-1657.
- Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, Okamoto T (1998) Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res* 804:177-192.
- Ilisley JL, Sudol M, Winder SJ (2002) The WW domain: Linking cell signaling to the membrane cytoskeleton. *Cellular Signalling* 14:183-189.
- Inkley SR (1974) Pulmonary function in Duchenne muscular dystrophy related to stage of disease. *The American Journal of Medicine* 56:297-306.
- Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, Südhof TC (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277:1511-1515.
- Ishii M, Horio Y, Tada Y, Hibino H, Inanobe A, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kurachi Y (1997) Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Muller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci* 17:7725-7735.
- Jacobson C, Montanaro F, Lindenbaum M, Carbonetto S, Ferns M (1998) alpha-Dystroglycan functions in acetylcholine receptor aggregation but is not a coreceptor for agrin-MuSK signaling. *J Neurosci* 18:6340-6348.
- Jacobson C, Cote PD, Rossi SG, Rotundo RL, Carbonetto S (2001) The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J Cell Biol* 152:435-450.

- James M, Nuttall A, Ilesley JL, Ottersbach K, Tinsley JM, Sudol M, Winder SJ (2000) Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of  $\beta$ -dystroglycan regulates its interaction with utrophin. *Journal of Cell Sciences* 113:1717-1726.
- Jones JC, Kurpakus MA, Cooper HM, Quaranta V (1991) A function for the integrin alpha 6 beta 4 in the hemidesmosome. *Cell Regul* 2:427-438.
- Jones KJ, Compton AG, Yang N, Mills MA, Peters MF, Mowat D, Kunkel LM, Froehner SC, North KN (2003) Deficiency of the syntrophins and alpha-dystrobrevin in patients with inherited myopathy. *Neuromuscul Disord* 13:456-467.
- Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP (1995) Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem* 270:27305-27310.
- Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:13052-13056.
- Kachinsky AM, Froehner SC, Milgram SL (1999) A PDZ-containing scaffold related to the dystrophin complex at the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 145:391-402.
- Kahl J, Campanelli JT (2003) A role for the juxtamembrane domain of  $\beta$ -dystroglycan in agrin-induced acetylcholine receptor clustering. *The Journal of Neuroscience* 23:392-402.
- Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Manyá H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T (2002) Deficiency of  $\alpha$ -dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291:1283-1286.
- King LS, Yasui M, Agre P (2000) Aquaporins in health and disease. *Molecular Medicine Today* 6:60-65.

- Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394:388-392.
- Kofuji P, Ceelen P, Zahs K, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA (2000) Genetic Inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *The Journal of Neuroscience* 20:5733-5740.
- Komoto J, Usui S, Otsuki S (1984) Infantile autism and Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 14:191-195.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Kumagai T, Miura K, Ohki T, Matsumoto A, Miyazaki S, Nakamura M, Ochi N, Takahashi O (2001) (Central nervous system involvements in Duchenne/Becker muscular dystrophy). *No To Hattatsu* 33:480-486.
- Langenbach KJ, Rando TA (2002) Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. *Muscle & Nerve* 26:644-653.
- Leibowitz D, Dubowitz V (1981) Intellect and behaviour in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 23:577-590.
- Leschziner A, Moukhles H, Lindenbaum M, Gee SH, Butterworth J, Campbell KP, Carbonetto S (2000) Neural regulation of alpha-dystroglycan biosynthesis and glycosylation in skeletal muscle. *J Neurochem* 74:70-80.

- Levi S, Grady RM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR, Craig AM (2002) Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *J Neurosci* 22:4274-4285.
- Li L, Head V, Timpe LC (2001) Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. *Glia* 33:57-71.
- Li J, Patil RV, Verkman AS (2002) Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Muller cell aquaporin-4 water channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:573-579.
- Libby RT, Xu Y, Selfors LM, Brunken WJ, Hunter DD (1997) Identification of the cellular source of laminin beta2 in adult and developing vertebrate retinae. *J Comp Neurol* 389:655-667.
- Lom B, Hockberger PE (1997) Is laminin-1 a guidance cue for cerebellar granule cell migration? *J Neurobiol* 33:72-84.
- Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-Mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, Feng L, Saran RK, Voit T, Merlini L, Sewry CA, Brown SC, Muntoni F (2003) Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet* 12:2853-2861.
- Losasso C, Di Tommaso F, Sgambato A, Ardito R, Cittadini A, Giardina B, Petrucci TC, Brancaccio A (2000) Anomalous dystroglycan in carcinoma cell lines. *FEBS Letters* 484:194-198.
- Louhichi N, Triki C, Quijano-Roy S, Richard P, Makri S, Meziou M, Estournet B, Mrad S, Romero NB, Ayadi H, Guicheney P, Fakhfakh F (2003) New FKRP mutations causing congenital muscular dystrophy associated with mental retardation and central nervous system abnormalities. Identification of a founder mutation in Tunisian families. *Neurogenetics* 2:2.

- Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6:159-163.
- Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Campbell KP (1992) Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* 360:588-591.
- McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bönnemann CG, Fanin M, Pegoraro E, Lidov HGW, Noguchi S, Ozawa E, Finkel RS, Cruse RP, Angelini C, Kunkel LM, Hoffman EP (1996) Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of  $\gamma$ -sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 5:1841-1847.
- Mehler MF (2000) Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Research Reviews* 32:277-307.
- Mercuri E, Gruter-Andrew J, Philpot J, Sewry C, Counsell S, Henderson S, Jensen A, Naom I, Bydder G, Dubowitz V, Muntoni F (1999) Cognitive abilities in children with congenital muscular dystrophy: correlation with brain MRI and merosin status. *Neuromuscul Disord* 9:383-387.
- Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kelley RI, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP (2002) Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418:417-421.
- Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F (1998) Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 18:365-368.
- Mittaud P, Marangi PA, Erb-Vögtli S, Fuhrer C (2001) Agrin-induced activation of acetylcholine receptor-bound Src family kinases requires rapsyn and correlates with acetylcholine receptor clustering. *The Journal of Biological Chemistry* 276:14505-14513.

- Montanaro F, Carbonetto S, Campbell KP, Lindenbaum M (1995) Dystroglycan expression in the wild type and mdx mouse neural retina: synaptic colocalization with dystrophin, dystrophin-related protein but not laminin. *Journal of Neuroscience Research* 42:528-538.
- Montanaro F, Gee SH, Jacobson C, Lindenbaum MH, Froehner SC, Carbonetto S (1998) Laminin and alpha-dystroglycan mediate acetylcholine receptor aggregation via a MuSK-independent pathway. *J Neurosci* 18:1250-1260.
- Moore SA, Saito F, Chen J, Michele DE, Henry MD, Messing A, Cohn RD, Ross-Barta SE, Westra S, Williamson RA, Hoshi T, Campbell KP (2002) Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* 418:422-425.
- Moores CA, Kendrick-Jones J (2000) Biochemical characterisation of the actin-binding properties of utrophin. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 46:116-128.
- Moukhles H, Carbonetto S (2001) Dystroglycan contributes to the formation of multiple dystrophin-like complexes in brain. *Journal of Neurochemistry* 78:824-834.
- Moukhles H, Roque R, Carbonetto S (2000)  $\alpha$ -Dystroglycan isoforms are differentially distributed in adult rat retina. *The Journal of Comparative Neurology* 420:182-194.
- Muntoni F, Brockington M, DJ B, Torelli S, Brown SC (2002) Defective glycosylation in muscular dystrophy. *The Lancet* 360.
- Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME (2001) Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14108-14113.
- Newey SE, Benson MA, Ponting CP, Davies KE, Blake DJ (2000) Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol* 10:1295-1298.



- Nicchia GP, Frigeri A, Liuzzi GM, Svelto M (2003) Inhibition of aquaporin-4 expression in astrocytes by RNAi determines alteration in cell morphology, growth, and water transport and induces changes in ischemia-related genes. *Faseb J* 17:1508-1510.
- Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, Roncali L (2003) Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 42:235-251.
- Nigro G, Comi LI, Politano L, Limongelli FM, Nigro V, De Rimini ML, Giugliano MAM, Petretta VR, Passamano L, Restucci B, Fattore L, Tebloev K, Comi L, De Luca F, Raia P, Esposito MG (1995) Evaluation of the cardiomyopathy in Becker muscular dystrophy. *Muscle & Nerve* 18:283-291.
- Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, Yamada Y, Hassell JR (1991) The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *The Journal of Biological Chemistry* 266:22939-22947.
- North KN, Miller G, Iannaccone ST, Clemens PR, Chad DA, Bella I, Smith TW, Beggs AH, Specht LA (1996) Cognitive dysfunction as the major presenting feature of Becker's muscular dystrophy. *Neurology* 46:461-465.
- Oak SA, Jarrett HW (2000) Oligomerization of mouse alpha 1-syntrophin and self-association of its pleckstrin homology domain 1 containing sequences. *Biochemistry* 39:8870-8877.
- Oak SA, Russo K, Petrucci TC, Jarrett HW (2001) Mouse alpha1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling. *Biochemistry* 40:11270-11278.

- Ohlendieck K, Campbell KP (1991) Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *The Journal of Cell Biology* 115:1685-1694.
- Ozawa E, Hagiwara Y, Yoshida M (1999) Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry* 190:143-151.
- Peng HB, Xie H, Rossi SG, Rotundo RL (1999) Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *The Journal of Cell Biology* 145:911-921.
- Peters MF, Adams ME, Froehner SC (1997a) Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol* 138:81-93.
- Peters MF, O'Brien KF, Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM, Adams ME, Froehner SC (1997b) beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations. *J Biol Chem* 272:31561-31569.
- Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL (1993) Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3710-3714.
- Pillers DM, Bulman DE, Weleber RG, Sigesmund DA, Musarella MA, Powell BR, Murphey WH, Westall C, Panton C, Becker LE, et al. (1993) Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet* 4:82-86.
- Pillers DM, Weleber RG, Woodward WR, Green DG, Chapman VM, Ray PN (1995) mdxCv3 mouse is a model for electroretinography of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:462-466.
- Piluso G, Mirabella M, Ricci E, Belsito A, Abbondanza C, Servidei S, Puca AA, Tonali P, Puca GA, Nigro V (2000) Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells. *J Biol Chem* 275:15851-15860.

- Poopalasundaram S, Knott C, Shamotienko OG, Foran PG, Dolly JO, Ghiani CA, Gallo V, Wilkin GP (2000) Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia* 30:362-372.
- Rae C, Griffin JL, Blair DH, Bothwell JH, Bubb WA, Maitland A, Head S (2002) Abnormalities in brain biochemistry associated with lack of dystrophin: studies of the mdx mouse. *Neuromuscular Disorders* 12:121-129.
- Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA (1998) Role of  $\alpha$ -dystroglycan as a Schwann cell receptor for mycobacterium leprae. *Science* 282:2076-2079.
- Rentschler S, Linn H, Deininger K, Bedford MT, Espanel X, Sudol M (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem* 380:431-442.
- Rideau Y, Jankowski LW, Grellet J (1981) Respiratory function in the muscular dystrophies. *Muscle & Nerve* 4:155-164.
- Roberds SL, Ervasti JM, Anderson RD, Ohlendieck K, Kahl SD, Zoloto D, Campbell KP (1993) Disruption of the dystrophin-glycoprotein complex in the cardiomyopathic hamster. *The Journal of Biological Chemistry* 268:11496-11499.
- Rüegg MA (2001) Molecules involved in the formation of synaptic connections in muscle and brain. *Matrix Biology* 20:3-12.
- Rybakova IN, Ervasti JM (1997) Dystrophin-glycoprotein complex is monomeric and stabilizes actin filaments in vitro through a lateral association. *The Journal of Biological Chemistry* 272:28771-28778.
- Rybakova IN, Patel JR, Ervasti JM (2000) The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *The Journal of Cell Biology* 150:1209-1214.

- Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM (1997) Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12413-12418.
- Sadoulet-Puccio HM, Khurana TS, Cohen JB, Kunkel LM (1996) Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Hum Mol Genet* 5:489-496.
- Saito F, Moore SA, Barresi R, Henry MD, Messing A, Ross-Barta SE, Cohn RD, Williamson RA, Sluka KA, Sherman DL, Brophy PJ, Schmeizer JD, Low PA, Wrabetz L, Feltri ML, Campbell KP (2003) Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron* 38:747-758.
- Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyooka T, Hanaoka F (1997) Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13873-13878.
- Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual Review of Neuroscience* 22:389-442.
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657-669.
- Sciandra F, Schneider M, Giardina B, Baumgartner S, Petrucci TC, Brancaccio A (2001) Identification of the  $\beta$ -dystroglycan binding epitope within the c-terminal region of  $\alpha$ -dystroglycan. *European Journal of Biochemistry* 268:4590-4597.
- Serpinskaya AS, Feng G, Sanes JR, Craig AM (1999) Synapse formation by hippocampal neurons from agrin-deficient mice. *Dev Biol* 205:65-78.

- Sievers J, Pehlemann FW, Gude S, Berry M (1994) Meningeal cells organize the superficial glia limitans of the cerebellum and produce components of both the interstitial matrix and the basement membrane. *J Neurocytol* 23:135-149.
- Smalheiser NR, Schwartz NB (1987) Cranin: a laminin-binding protein of cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6457-6461.
- Smalheiser NR, Kim E (1995) Purification of cranin, a laminin binding membrane protein. Identity with dystroglycan and reassessment of its carbohydrate moieties. *J Biol Chem* 270:15425-15433.
- Smith RA, Sibert JR, Harper PS (1990) Early development of boys with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 32:519-527.
- Sollee ND, Latham EE, Kindlon DJ, Bresnan MJ (1985) Neuropsychological Impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 7:486-496.
- Sotgia F, Bonuccelli G, Bedford M, Brancaccio A, Mayer U, Wilson MT, Campos-Gonzalez R, Brooks JW, Sudol M, Lisanti MP (2003) Localization of phospho- $\beta$ -dystroglycan (pY892) to an intracellular vesicular compartment in cultured cells and skeletal muscle fibers in vivo. *Biochemistry* 42:7110-7123.
- Sotgia F, Lee H, Bedford MT, Petrucci T, Sudol M, Lisanti MP (2001) Tyrosine phosphorylation of  $\beta$ -dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry* 40:14585-14592.
- Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, Macioce P, Sargiacomo M, Bricarelli FD, Minetti C, Sudol M, Lisanti MP (2000) Caveolin-3 directly interacts with the c-terminal tail of  $\beta$ -dystroglycan. *The Journal of Biological Chemistry* 275:38048-38058.

- Stephens LE, Sutherland AE, Klimanskaya IV, Andrieux A, Meneses J, A PR, Damsky CH (1995) Deletion of  $\beta 1$  integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes and Development* 9:1883-1895.
- Stockklausner C, Ludwig J, Ruppertsberg JP, Klocker N (2001) A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels. *FEBS Lett* 493:129-133.
- Sugita S, Saito F, Tang J, Satz J, Campbell K, Südhof TC (2001) A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *The Journal of Cell Biology* 154:435-445.
- Sugiyama J, Bowen DC, Hall ZW (1994) Dystroglycan binds nerve and muscle agrin. *Neuron* 13:103-115.
- Sunada Y, Ohi H, Hase A, Hosono T, Arata S, Higuchi S, Matsumura K, Shimizu T (2001) Transgenic mice expressing mutant caveolin-3 show severe myopathy associated with increased nNOS activity. *Hum Mol Genet* 10:173-178.
- Talts JF, Andac Z, Göhring W, Brancaccio A, Timpl R (1999) Binding of the G domains of laminin  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chains and perlecan to heparin, sulfatides,  $\alpha$ -dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *The EMBO Journal* 18:863-870.
- Tangsrud SE, Petersen IL, Lodrup Carlsen KC, Carlsen KH (2001) Lung function in children with Duchenne's muscular dystrophy. *Respiratory Medicine* 95:898-903.
- Tawil NJ, Houde M, Blacher R, Esch F, Reichardt LF, Turner DC, Carbonetto S (1990) Alpha 1 beta 1 integrin heterodimer functions as a dual laminin/collagen receptor in neural cells. *Biochemistry* 29:6540-6544.
- Thomas GD, Sander M, Lau KS, Huang PL, Stull JT, Victor RG (1998) Impaired metabolic modulation of alpha-adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15090-15095.

- Tian M, Chen L, Xie JX, Yang XL, Zhao JW (2003) Expression patterns of inwardly rectifying potassium channel subunits in rat retina. *Neurosci Lett* 345:9-12.
- Tian M, Jacobson C, Gee SH, Campbell KP, Carbonetto S, Jucker M (1996) Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 8:2739-2747.
- Timpl R, Brown JC (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays* 18:123-132.
- Toda T, Kobayashi K, Kondo-lida E, Sasaki J, Nakamura Y (2000) The Fukuyama congenital muscular dystrophy story. *Neuromuscul Disord* 10:153-159.
- Ueda H, Baba T, Terada N, Kato Y, Fujii Y, Takayama I, Mei X, Ohno S (2000) Immunolocalization of dystrobrevin in the astrocytic endfeet and endothelial cells in the rat cerebellum. *Neurosci Lett* 283:121-124.
- Vajda Z, Pedersen M, Fuchtbauer EM, Wertz K, Stodkilde-Jorgensen H, Sulyok E, Doczi T, Neely JD, Agre P, Frokiaer J, Nielsen S (2002) Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13131-13136.
- Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC (1997) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *The Journal of Biological Chemistry* 272:28187-28190.
- Villanova M, Mercuri E, Bertini E, Sabatelli P, Morandi L, Mora M, Sewry C, Brockington M, Brown SC, Ferreiro A, Maraldi NM, Toda T, Guicheney P, Merlini L, Muntoni F (2000) Congenital muscular dystrophy associated with calf hypertrophy, microcephaly and severe mental retardation in three Italian families: evidence for a novel CMD syndrome. *Neuromuscul Disord* 10:541-547.

- Wagner S, Gardner H (2000) Modes of regulation of laminin-5 production by rat astrocytes. *Neurosci Lett* 284:105-108.
- Wagner S, Tagaya M, Koziol JA, Quaranta V, del Zoppo GJ (1997) Rapid disruption of an astrocyte interaction with the extracellular matrix mediated by integrin alpha 6 beta 4 during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* 28:858-865.
- Wallace BG (1994) Staurosporine inhibits agrin-induced acetylcholine receptor phosphorylation and aggregation. *The Journal of Cell Biology* 125:661-668.
- Wallace BG, Qu Z, Haganir RL (1991) Agrin induces phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 6:869-878.
- Way M, Pope B, Cross RA, Kendrick-Jones J, Weeds AG (1992) Expression of the N-terminal domain of dystrophin in *E. coli* and demonstration of binding to F-Actin. *Federation of European Biochemical Societies* 301:243-245.
- Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP (1997) Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Human Molecular Genetics* 6:831-841.
- Wilson J, Putt W, Jimenez C, Edwards YH (1999) *Up71* and *up140*, two novel transcripts of utrophin that are homologues of short forms of dystrophin. *Hum Mol Genet* 8:1271-1278.
- Yamada H, Saito F, Fukuta-Ohi H, Zhong D, Hase A, Arai K, Okuyama A, Maekawa R, Shimizu T, Matsumura K (2001) Processing of  $\beta$ -dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Human Molecular Genetics* 10:1563-1569.
- Yamada H, Chiba A, Endo T, Kobata A, Anderson LVB, Hori H, Fukuta-Ohi H, Kanazawa I, Campbell KP, Shimizu T, Matsumura K (1996) Characterization of dystroglycan-laminin interaction in peripheral nerve. *Journal of Neurochemistry* 66:1518-1524.



- Yang B, Jung D, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP (1995a) Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J Biol Chem* 270:4975-4978.
- Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP (1995b) SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem* 270:11711-11714.
- Yang B, Verbavatz JM, Song Y, Vetrivel L, Manley G, Kao WM, Ma T, Verkman AS (2000) Skeletal muscle function and water permeability in aquaporin-4 deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C1108-1115.
- Yeaman C, Le Gall AH, Baldwin AN, Monlauzeur L, Le Bivic A, Rodriguez-Boulan E (1997) The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *The Journal of Cell Biology* 139:929-940.
- Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K, Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Sasaoka T, Ozawa E (2000) Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Human Molecular Genetics* 9:1033-1040.
- Yoshioka M, Okuno T, Honda Y, Nakano Y (1980) Central nervous system involvement in progressive muscular dystrophy. *Archives of Disease in Childhood* 55:589-594.
- Zaccaria ML, Di Tommaso F, Brancaccio A, Paggi P, Petrucci TC (2001) Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study. *Neuroscience* 104:311-324.

## **Appendices**

## Présentation des résultats en appendices

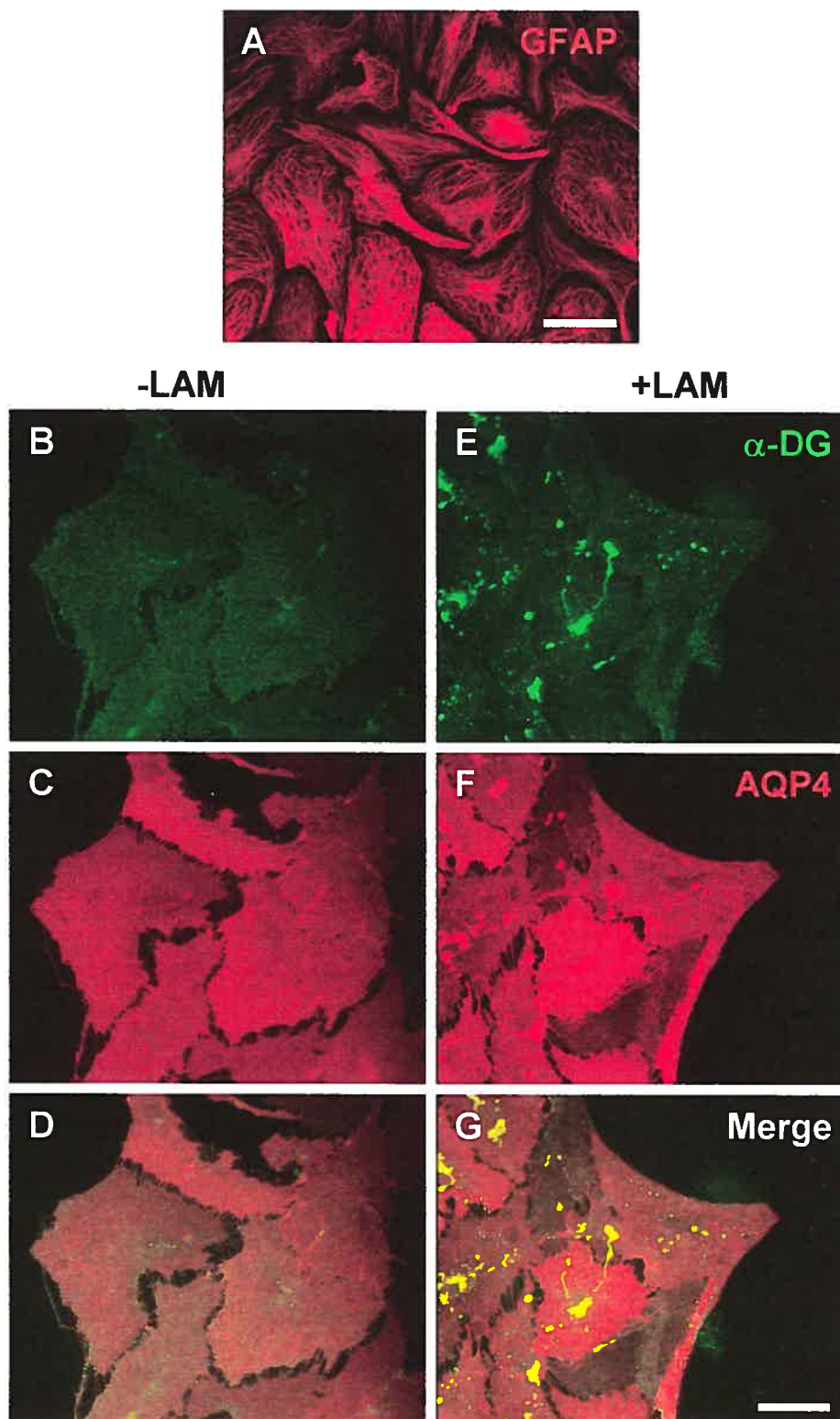
Les données présentées dans le premier et le deuxième article sont issues de notre étude sur les cultures mixtes contenant à la fois des neurones et des astrocytes et sur les cultures de cellules de Müller, respectivement. Les données présentées dans cette section concernent également l'étude du ciblage des Kir4.1 et AQP4 mais cette fois-ci dans des cultures pures d'astrocytes.

Un des avantages majeurs de ce système de culture est la possibilité d'étudier l'effet de laminine sur l'agrégation des Kir4.1 et de l'AQP4 en l'absence de facteurs provenant des neurones. On pourrait effectivement penser que l'agrégation de ces canaux au niveau des cellules gliales requiert la collaboration de facteurs neuronaux, auquel cas l'absence de ces derniers se traduirait par une réduction voire même une absence d'agrégation suite à un traitement avec la laminine.

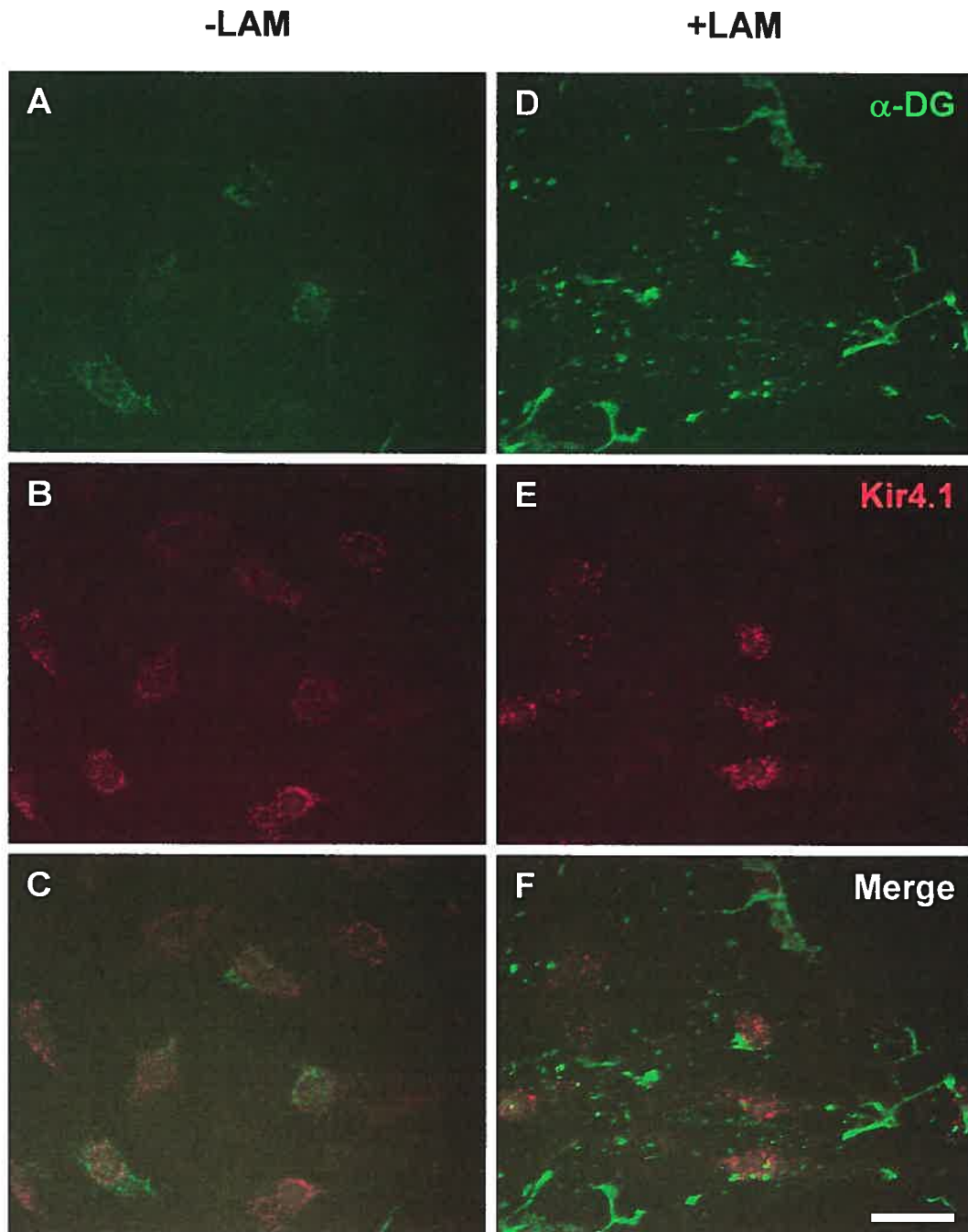
Nos études préalables sur les cultures mixtes (Guadagno et Moukhles, accepté au journal *Glia*) suggèrent que les mécanismes moléculaires à la base de l'agrégation des Kir4.1 et AQP4 sont communs puisque **(1)** la laminine induit aussi bien l'agrégation des canaux Kir4.1 qu'AQP4 et **(2)** les agrégats de Kir4.1 et AQP4 co-localisent tous les deux avec l' $\alpha$ -DG, la syntrophine et la dystrobrevine. De manière intéressante, dans les cultures pures d'astrocytes, la laminine induit l'agrégation des canaux AQP4 (voir figure 1 en appendice) mais pas des canaux Kir4.1, puisque ces derniers ne semblent pas être exprimés à la membrane plasmique (voir figure 2 en appendices). Ces données montrent que l'agrégation des Kir4.1 nécessite, en plus de la laminine, des facteurs neuronaux, lesquels semblent indispensables à l'expression des Kir4.1 à la membrane plasmique des astrocytes. Grâce à ces études, nous pouvons déduire que les mécanismes moléculaires impliqués dans l'agrégation/stabilisation des Kir4.1 sont distincts de ceux impliqués dans l'agrégation/stabilisation de l'AQP4. Il est cependant

important de noter que l'axe laminine-DG représentent le point commun entre ces mécanismes.

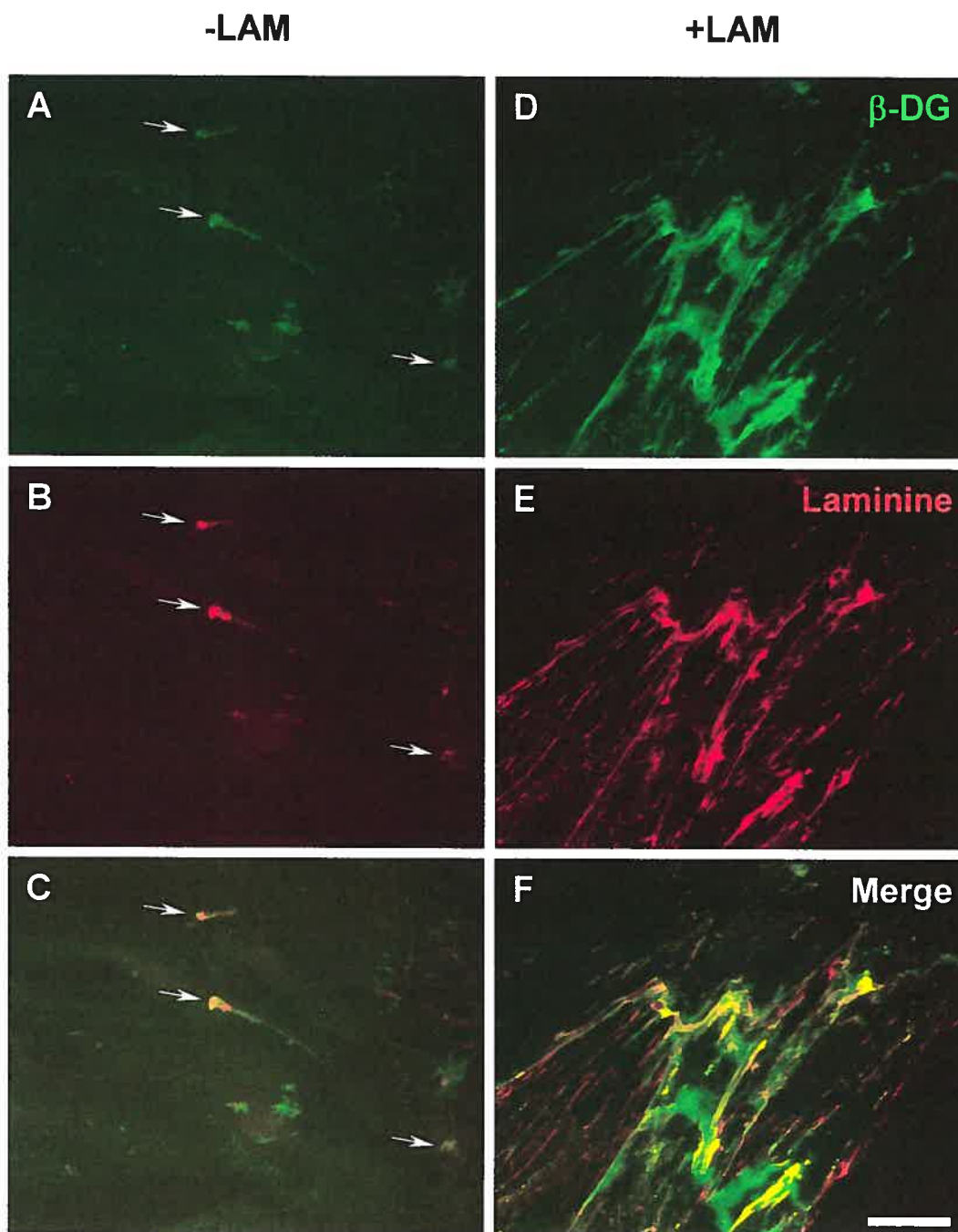
Le système de cultures pures d'astrocytes permettra au laboratoire de mener des études biochimiques plus aisément, car les astrocytes en culture se divisent et peuvent être passés plusieurs fois, ce qui permettra d'obtenir des concentrations protéiques adéquates pour effectuer, par exemple, des co-immunoprécipitations. Grâce à ce système, le laboratoire entreprendra, dans des travaux futurs, la caractérisation des voies de signalisation cellulaire impliquées dans le ciblage des Kir4.1 et de l'AQP4.



**Figure 1.** La laminine-1 induit la co-agrégation de l' $\alpha$ -DG et de l'AQP4. **A** Marquage des astrocytes pour la *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP). Notez que toutes les cellules dans ce champ représentatif sont GFAP-positives ce qui témoigne de leur identité astrocytaire. **B-D** Distribution de l' $\alpha$ -DG et de l'AQP4 en absence de laminine-1 (-LAM). **E-G** Distribution de l' $\alpha$ -DG et de l'AQP4 en présence de laminine-1 (+LAM). Échelle : 50 $\mu$ m.

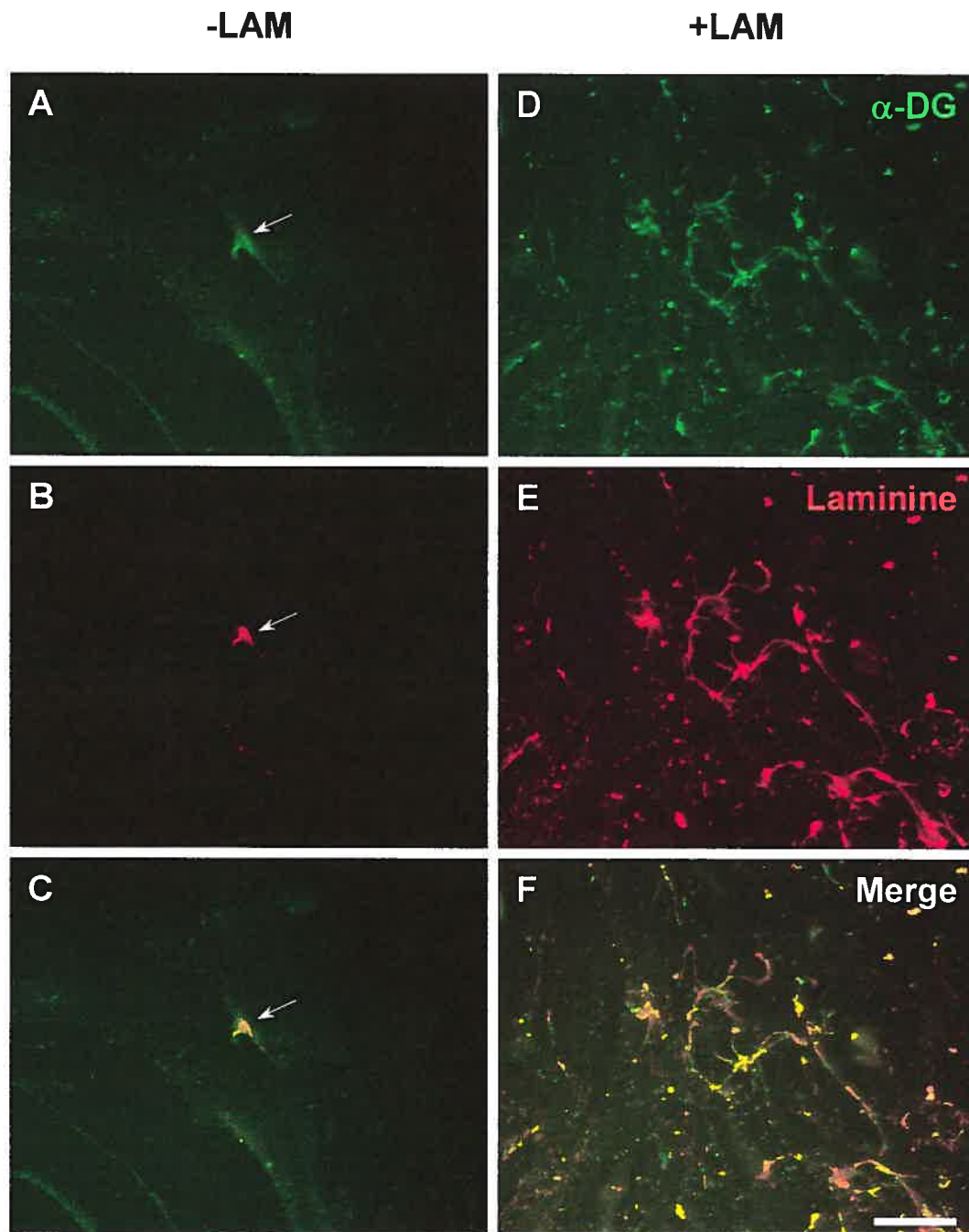


**Figure 2.** La laminine-1 induit l'agrégation de l' $\alpha$ -DG mais pas des Kir4.1. **A-C** Distribution de l' $\alpha$ -DG et des Kir4.1 en l'absence de laminine-1 (-LAM) et **(D-F)** en présence de laminine-1 (+LAM). Échelle : 50 $\mu$ m.



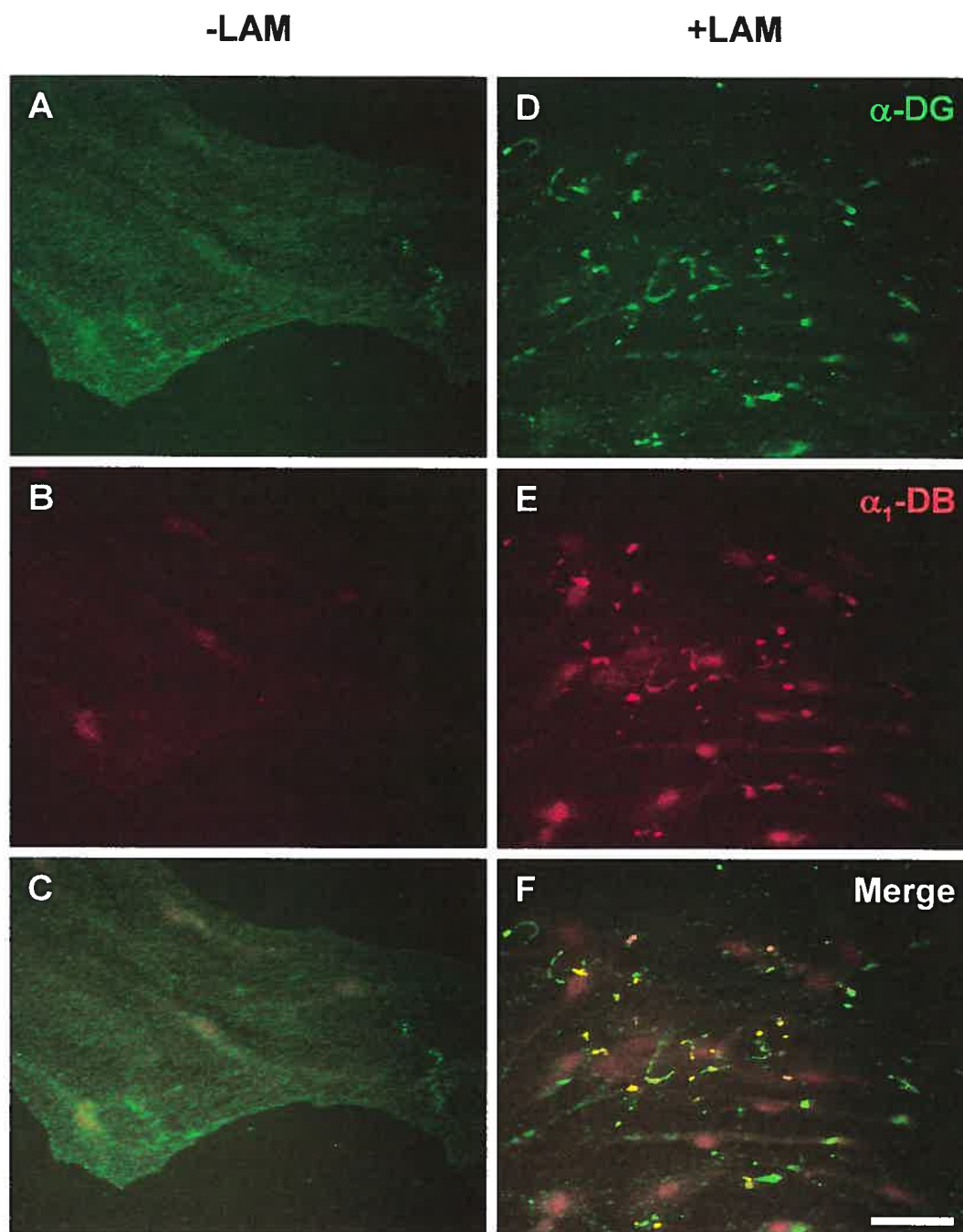
**Figure 3.** La laminine-1 induit l'agrégation du  $\beta$ -DG. En absence de laminine-1, le  $\beta$ -DG présente en majeure partie une distribution diffuse à l'exception de rares agrégats (voir les flèches, **A**) qui co-localisent avec la laminine endogène (**B**). En présence de laminine exogène, on note une forte agrégation du  $\beta$ -DG (**D**). De plus, les agrégats de  $\beta$ -DG co-localisent avec la laminine (**E**). Échelle : 50 $\mu$ m.



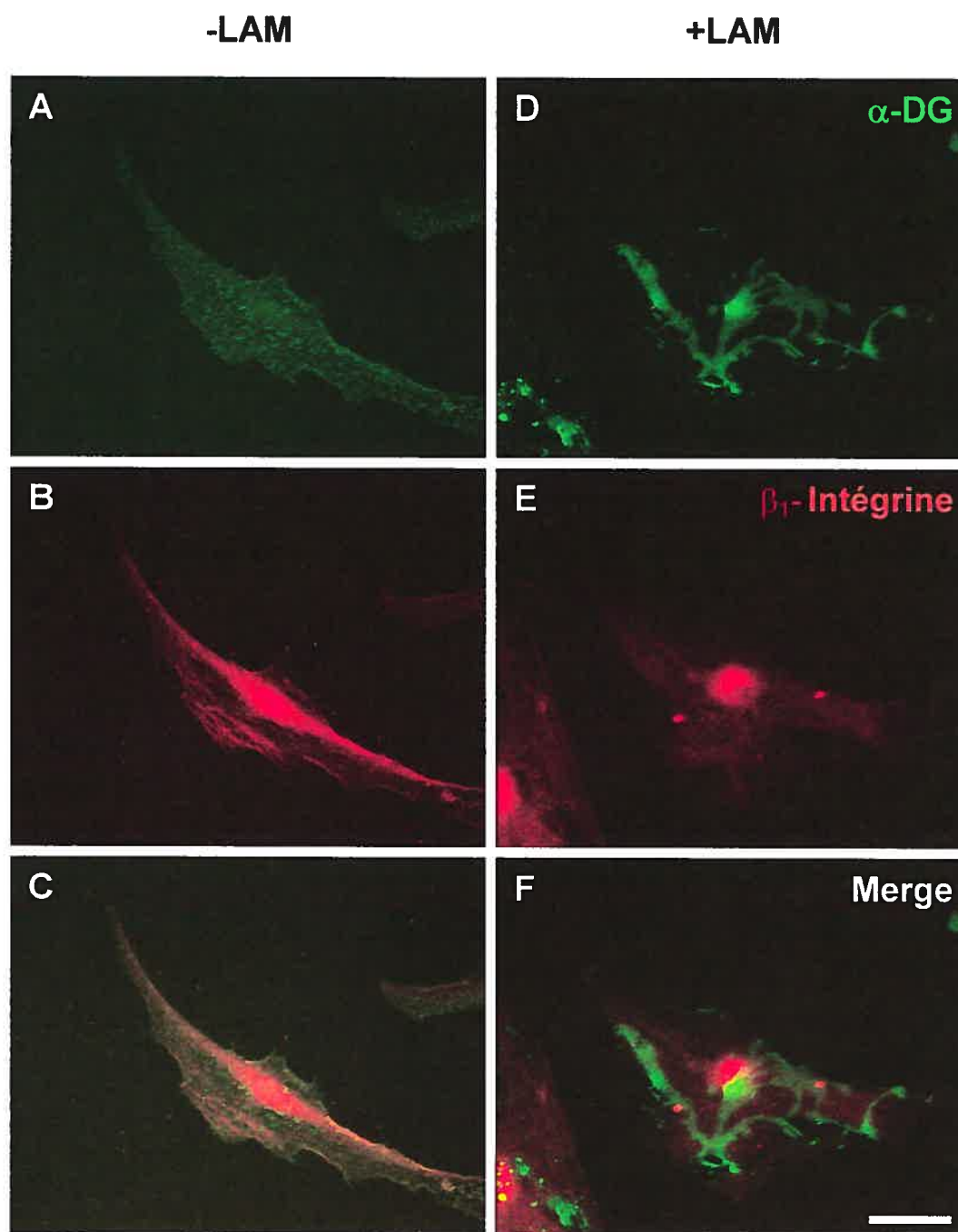


**Figure 4.** La laminine-1 induit l'agrégation de l' $\alpha$ -DG. En absence de laminine-1, l' $\alpha$ -DG présente en majeure partie une distribution diffuse à l'exception de rares agrégats (voir les flèches, **A**) qui co-localisent avec la laminine endogène (**B**). En présence de laminine exogène, on note une forte agrégation de l' $\alpha$ -DG (**D**). De plus, les agrégats d' $\alpha$ -DG co-localisent avec la laminine (**E**). Échelle : 50 $\mu$ m.

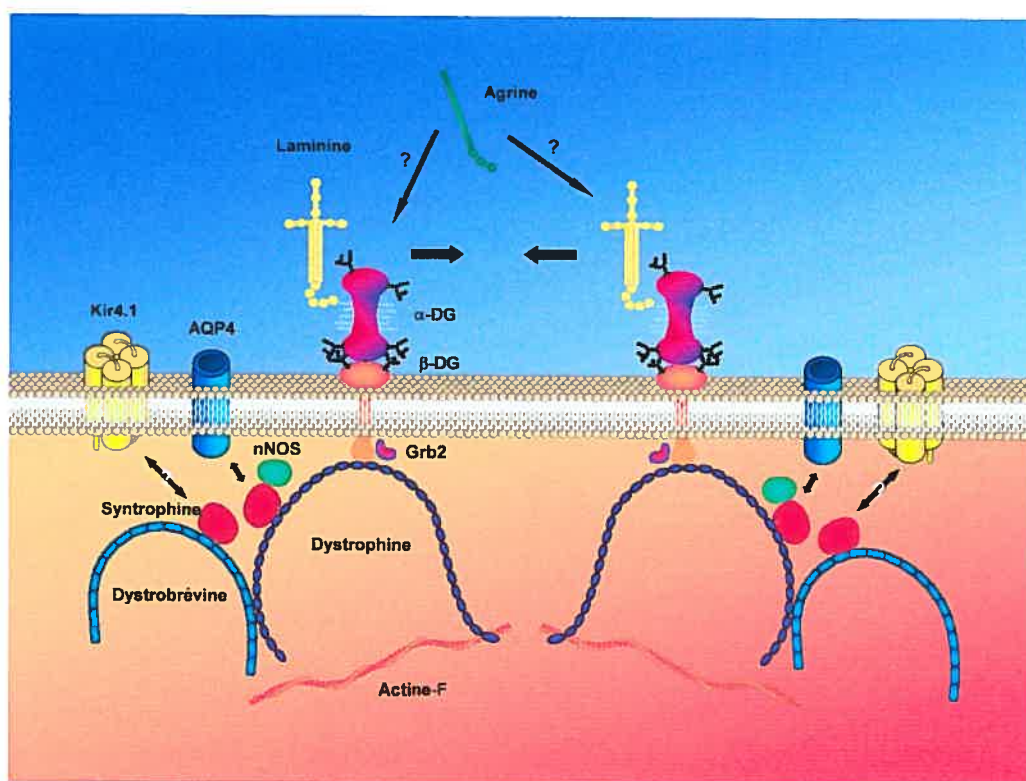




**Figure 5.** La laminine-1 induit la co-agrégation de l' $\alpha$ -DG avec l' $\alpha_1$ -DB. **A-C** Distribution de l' $\alpha$ -DG et de l' $\alpha_1$ -DB en absence de laminine-1 (-LAM). **D-F** Distribution de l' $\alpha$ -DG et l' $\alpha_1$ -DB en présence de la laminine-1 (+LAM). Échelle : 50 $\mu$ m.



**Figure 6.** La laminine-1 agrège l' $\alpha$ -DG mais pas l'intégrine- $\beta_1$ . Marquage pour l' $\alpha$ -DG et l'intégrine- $\beta_1$  en absence de laminine-1 (-LAM; **A-C**) et en présence de laminine-1 (+LAM; **D-F**). Notez que la  $\beta_1$ -intégrine présente une distribution diffuse aussi bien en l'absence qu'en présence de laminine-1, alors que l' $\alpha$ -DG est agrégé en présence de laminine-1. Échelle : 50 $\mu$ m.



**Figure 7.** Modèle des mécanismes moléculaires à la base de l'agrégation des canaux Kir4.1 et AQP4 dans les astrocytes. Lors de la diffusion latérale dans la membrane plasmique, la laminine liée à l' $\alpha$ -DG s'auto-polymérise, par l'intermédiaire de ses bras latéraux, résultant en une agrégation du complexe PAD et des canaux Kir4.1 et AQP4 associés. La contribution de l'agrine dans l'agrégation de ces canaux reste à déterminer.

