

Régulation du métabolisme musculaire par les facteurs de transcription SREBP-1 : rôle des MRFs, de SIRT1 et des céramides

Kévin Dessalle

▶ **To cite this version:**

Kévin Dessalle. Régulation du métabolisme musculaire par les facteurs de transcription SREBP-1 : rôle des MRFs, de SIRT1 et des céramides. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10269 . tel-00794521

HAL Id: tel-00794521

https://theses.hal.science/tel-00794521

Submitted on 26 Feb 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 269-2012 Année 2012

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Présentée

devant L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

L'ÉCOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ

pour l'obtention

du DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Spécialité Biochimie

par

Kévin DESSALLE

Régulation du métabolisme musculaire par les facteurs de transcription SREBP-1 : rôle des MRFs, de SIRT1 et des céramides

Directeur de thèse : Dr Etienne Lefai

Soutenue publiquement le 6 Décembre 2012 devant un jury composé de

Dr Hubert Vidal	Président
Dr Lydie Combaret	Rapporteur
Dr Vincent Ollendorff	Rapporteur
Dr Dominique Desplanches	Examinateur
Pr Damien Freyssenet	Examinateur
Dr Etienne Lefai	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Hubert Vidal qui m'a accueilli au sein du laboratoire CarMeN et qui a accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie vivement les docteurs Lydie Combaret et Vincent Ollendorff d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Je remercie le docteur Dominique Desplanches pour avoir bien voulu examiner mon travail de thèse.

Je remercie le professeur Damien Freyssenet pour avoir examiné mon travail de thèse et pour l'aide qu'il m'a apportée ainsi que toute son équipe.

Je tiens également à remercier le docteur Etienne Lefai qui m'a accepté en stage de master 2 et permis de continuer en thèse. Je te remercie pour ta patience, ta disponibilité et ton professionnalisme. Tu es un excellent encadrant qui m'a permis d'acquérir de nombreuses connaissances essentielles à ma réussite professionnelle. Ça a été un plaisir (la plupart du temps) de travailler à tes côtés. Merci.

Merci au colocataire de bureau d'Etienne, Georges Nemoz qui a toujours été de bons conseil et toujours prêt à me servir une tasse de café quand mes discussions avec Etienne devenaient longues.

Merci à Luciano, Anne-Marie, Sophie, Sylvaine et Jennifer pour leur bonne humeur et leur optimisme en toutes circonstances.

Merci à l'ensemble du laboratoire CaRMeN d'entretenir l'esprit accueillant et l'ambiance conviviale de ce laboratoire.

Merci à Anne Charrié et Karim Chikh et toute leur équipe du CBS qui m'ont consacré beaucoup de leur temps et permis de réaliser toutes les manips de radioactivité.

Je tiens à remercier particulièrement Vanessa qu'on appelle également Madame Qualité pour toutes les connaissances techniques qu'elle m'a apportées. Une des personnes les plus serviables et gentilles que je connaisse, parfois même un peu trop. Merci pour tout le travail que j'ai pu accomplir grâce à toi.

Je remercie également la dernière venue de l'équipe Stéphanie, pour les centaines de photos de myotubes et les milliers de noyaux qu'elle a comptés.

Merci à Christine, la grande gardienne des ampoules de myoblastes humains, qui m'a appris la rigueur de la culture cellulaire. Merci à MAC la virtuose du WB et ma petite préférée Nathalie pour les nombreuses dosettes de café que je t'ai « empruntées » et beaucoup d'autres choses que je ne peux pas écrire.

Je remercie l'équipe génomique expatriée du deuxième étage et malheureusement pour elle voisin du bureau des mecs. Grande Manu, tes visites à heure fixe dans notre bureau me

*permettaient de souffler et d'apprendre des tas de choses, certaines utiles, comme tous les conseils bébés et d'autres moins utiles comme l'existence de la F*******e (elle a demandé à ce que ce soit censuré). Cyrille, encore une personne impressionnante de part ses connaissances scientifiques, je te remercie de ton aide en toutes circonstances mais également de te laisser caresser quand j'avais besoin de contact. Sandra et Petite Manu merci pour votre bonne humeur et vos blagues plus que borderline.*

Je vais maintenant remercier tous mes colocataires et amis de bureau qui ont tous participé à la plus belle des émulsions, je vous remercie pour votre bonne humeur, pour votre capacité à me supporter et à rire de mes blagues.
Je remercie d'abord ceux qui sont partis trop tôt et trop jeunes, les docteurs Clément Villars et Joffrey Delarichaudy.
Clem, je te remercie du travail de sape que tu as fait sur moi, notamment sur mon langage et mon orthographe. Par contre, il n'y avait plus rien à faire sur mon style vestimentaire.
Joffrey, merci de ta mauvaise foi, tu nous auras beaucoup fait rire. Je te remercie pour tous les moments qu'on a passés ensemble à la paillasse et notamment à l'INSA, ça permettait de commencer à gratter des dizaines de plaques de culture à 22h avec le sourire.
Merci pour votre amitié et tout ce qui va avec.

Merci à l'exosomologue célèbre (c'est lui qui le dit). Je te remercie pour tous les services que tu m'as rendus mais je ne saurais pas tous les lister. Ce qu'on peut en retenir, c'est qu'un buffet de cuisine de 2m de haut rentre dans une 206. Merci pour tous les détours que tu as faits pour me ramener, même certains jours où tu avais tes cours de cassage de briquette. Merci également de m'avoir aidé à avancer la rédaction de ma thèse par des petites phrases du genre « J'ai fini ! T'en es où ? Ah c'est pas mal tu penses finir un jour ou pas ? ».

Je tiens à remercier Pierre bien qu'il ne soit qu'un bébé thésard. Il a vite réussi à intégrer le groupe et a relevé les débats du bureau en posant des BONNES questions comme « Est-ce que Superman peut se faire couper par un sabre laser ? » Auxquels il a tendance à répondre lui-même « Ouais, c'est vrai, il ne peut pas il vient de la planète Krypton ». Il n'hésite pas non plus à réalimenter le débat par des questions très pertinentes comme « Et si le sabre laser est composé de Kryptonite verte, vous pensez que ça peut le couper ? »

Je remercie le philosophe ou plutôt le pseudo-philosophe Roméo, merci de ta patience et de ton écoute (je ne me moque pas) et désolé des milliers de crasses que je t'ai faites. Mais c'était toujours très drôle et je ne m'en lasserai jamais.

Je remercie également la petite dernière Caro pour m'avoir aidé à imprimer ma thèse en gardant mon petit, sachez qu'elle est tout à fait abordable comme nounou, un petit pot de Nutella suffit. Par contre je ne la remercie pas de ce qu'elle fait du bureau des garçons en faisant le ménage, en accrochant des photos de Phoques et le pire de tout en ayant comme projet de rajouter une plante verte pour la déco, il est vraiment temps que je parte.

Nadir, je te remercie pour ta folie qui ne se voit pas de prime abord. Désolé je balance, mais l'idée d'adopter un chat au labo qu'on appellerai « Zouzou le chat » c'est toi. Et surtout merci pour ton incroyable envie d'apprendre qui est contagieuse, le seul homme que je connaisse qui soit capable de parler de Jules César, de passer à Napoléon, d'enchaîner sur la relation entre la prise de poids et le temps passé devant la télé pour finir sur la possibilité de devenir berger (véridique)

Je remercie l'homme blanc avec un cul de black, mon petit Colinou, pour son physique hors du commun.

Et je remercie particulièrement mon petit suricate, ma deuxième femme, Jujube, pour les analyses stats de mes résultats. Non, je plaisante je te remercie d'avoir été là chaque fois que j'en ai eu besoin même en pleine nuit. Merci pour les soirées KFC / films d'horreur, pour le café de 7h, pour les soirées débauches, pour les clopes que tu me « dépannais », pour les épisodes toujours téléchargés en temps et en heure……. Ça va être trop long et comme d'hab je suis à la bourre donc simplement merci de faire parti de ma vie mon poulet.

Et enfin je remercie toute ma famille et plus particulièrement ma petite famille, Shuang et Ewan, qui me donnent la force d'avancer en toutes circonstances.

Et merci à toi lecteur qui aura le courage de lire les 200 pages de ce manuscrit.

Avant-propos

Articles scientifiques :

Dessalle, K., Euthine,V., Chanon, S., Durand, D., De Larichaudy, J., Rome, S., Vidal, H., Nemoz, G., Simon, C., and Lefai, E. (2012) SREBP-1 transcription factors regulate muscle protein synthesis through myogenic regulatory factors. *PLoSONE* (accepté)

Defour, A., **Dessalle, K.**, Castro Perez, A., Poyot, T., Castells, J., Gallot Yann, S., Durand, C., Euthine, V., Gu, Y., Béchet, D., Peinnequin, A., Lefai, E. and Freyssenet, D. (2012) Sirtuin 1 regulates SREBP-1c expression in a LXR-dependent manner in skeletal muscle. *PLoSONE*

De Larichaudy, J., Zufferli, A., Serra, F., Isidori, A.M., Naro, F., **Dessalle, K**., Desgeorges, M., Piraud, M., Cheillan, D., Vidal, H., Lefai, E. and Nemoz, G.(2012) TNFα and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skeletal Muscle*

Communications scientifiques :

2012 : G2L2 (Lyon) prix poster « Le rôle des MRFs dans l'atrophie induite par SREBP-1 » Dessalle, K., Delarichaudy, J., Euthine, V., Durand, C., Simon, C., Vidal, H. et Lefai, E.

2011 : Société française de myologie (ENS Lyon) « Le rôle des MRFs dans l'atrophie induite par SREBP-1 » Dessalle, K., Delarichaudy, J., Euthine, V., Durand, C., Simon, C., Vidal, H. et Lefai, E.

2010 : G2L2 (Lausanne) « Implication de l'ubiquitine ligase Murf1 dans l'atrophie musculaire » Dessalle, K., Meunier, E., Euthine, V., Durand, C., Vidal, H. et Lefai, E.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES 11

LISTE DES ABRÉVIATIONS 14

TABLE DES ILLUSTRATIONS 18

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 21

INTRODUCTION GÉNÉRALE 23

ÉTAT DE LA LITTÉRATURE 27

1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE 27
1.1. Généralités 27
1.1.1. Structure du muscle squelettique 27
1.1.2. Sources d'énergie du muscle squelettique 30
1.1.3. L'activation des myofibrilles 31
1.1.4. Les types de fibre musculaire 31
1.2. La régulation de la masse musculaire 32
1.2.1. Généralités sur la plasticité musculaire : hypertrophie et atrophie 32
1.2.2. Effets de l'exercice 33
1.2.3. Nutrition 35
1.2.4. Inflammation 36
1.3. Modulation de la balance protéique musculaire 36
1.3.1. La synthèse protéique 37
1.3.2. La dégradation protéique 38
a) L'Ubiquitin Proteasome System (UPS) 39
b) L'autophagie 41
c) Voie calcium dépendant 43
1.4. Voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie musculaire 44
1.4.1. Voie Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 44
1.4.2. Voie Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) 47
1.4.3. Voie Nuclear Factor-kappa B (NFκB) 49
1.4.4. Voie myostatine 52
1.4.5. Le rôle des MRFs dans la fibre adulte 54

2. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SREBP-1 56
2.1. Généralités 56
2.2. Les SREBPs : une sous famille des bHLH 56
2.3. Maturation des facteurs de transcription SREBP-1 59
2.4. SREBP-1 est un régulateur clé du métabolisme lipidique 61
2.5. Les facteurs de transcription SREBP-1 dans le muscle squelettique 64
2.5.1. Régulations de SREBP-1 dans le muscle squelettique 64
a) Effet du statut nutritionnel 64
b) Rôle des Liver X Receptors (LXRs) 66
c) Rôle de Forkhead 1 (FOXO1) 67
d) Rôle de SIRT1 68
e) Rôle de l'insuline 70
2.5.2. Impact de l'exercice physique sur l'expression des FT SREBP-1 73
2.5.3. Implication de SREBP-1 dans le maintien de la fonction musculaire 75
a) Différenciation musculaire 76
b) La régulation de la masse musculaire 77

3. SIRT1 : RÉGULATEUR DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE 78
3.1. Les sirtuins 78
3.2. Régulation de SIRT1 79
3.2.1. Régulation de l'activité de SIRT1 79
a) Par le co-facteur NAD+ 79

b) L'AMPK 80
c) Par modifications post traductionnelles 81
3.2.2. Régulation de l'expression 82
a) Restriction calorique, exercice et jeûne 82
b) Régime enrichi en lipides 83
3.2.3. Le resvératrol 83
3.3. Les principales cibles de SIRT1 85
3.3.1. Les histones 86
3.3.2. Les facteurs de transcription 87
Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-α (87
a) PGC-1α) 87
b) Les récepteurs nucléaires de classe 2 89
c) FOXOs 92
d) Les Hypoxia Inducible Factors (HIF) 94
3.4. Les rôles de SIRT1 dans le muscle squelettique 96
3.4.1. SIRT1 inhibe la différenciation musculaire 96
3.4.2. SIRT1 module la masse musculaire 98
3.4.3. Régulation du métabolisme énergétique musculaire 100
a) Métabolisme lipidique 100
b) Métabolisme glucidique 102
3.4.4. Action sur le type de fibre 104

TRAVAUX PERSONNELS 107

PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE THÈSE 109

MATÉRIEL ET MÉTHODES 111

1. MODÈLES CELLULAIRES 111
1.1. Cellules musculaires humaines en culture primaire 111
1.1.1. Matériel 111
1.1.2. Mise en culture et sélection des cellules musculaires 112
1.1.3. Obtention de myotubes polynucléés 113
1.2. Lignées cellulaires 113
1.2.1. Lignée HEK 293 113
1.2.2. Lignée C2C12 114
1.2.3. Lignée L6 114

2. MODULATION DE L'EXPRESSION DE PROTÉINES D'INTÉRÊT *IN VITRO* 115
2.1. Mise au point d'adénovirus recombinants 115
2.1.1. Construction d'adénovirus recombinants (ΔE1/E3) 116
2.1.2. Clonage des gènes humains codant pour MYOG et MEF2C 117
2.1.3. Génération des adénovirus recombinant codant pour MYOG et MEF2C 117
2.1.4. Titration 118
2.1.5. Infection de cellules musculaires humaines par adénovirus recombinants 120
2.2. Les siRNA 120
2.3. Mesure de l'expression génique 122
2.3.1. Extraction 122
2.3.2. Reverse transcription 122
2.4. Dosage des ARNm cibles 122
2.5. Mesure de l'expression protéique 122
2.5.1. Quantification par Western-blot 122
a) Préparation des extraits protéiques 122
b) Western Blot 123
2.6. Analyse morphologique des myotubes 123
2.6.1. Mesure de surface par immunomarquage à la myosine 123
2.6.2. Mesure de l'indice de fusion 124

3. ÉTUDE DE PROMOTEURS 125
3.1. Mesure de l'activité promotrice par système gène rapporteur 125
3.2. Clonage du promoteur MuRF1 125
3.3. Transfection transitoire dans les cellules musculaires humaines 126

3.4. Mesure des activités promotrices 126

4. DOSAGE DU MÉTABOLISME 127
4.1. Mesure de la synthèse protéique 127
4.2. Mesure de la dégradation protéique 127
4.3. Mesure de captation du glucose 128

5. ANALYSE STATISTIQUE 129

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 131

Article n°1 131
Introduction 133
Discussion 135

Article n°2 141
Introduction 143
Discussion 145

Article n°3 149
Introduction 151
Discussion 153

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 155

1. SREBP-1 RÉGULATEUR DE LA BALANCE PROTÉIQUE 157
1.1. SREBP-1 régule la dégradation protéique 157
1.2. SREBP-1 régule la synthèse protéique 159
1.3. SREBP-1 module la quantité de noyaux sarcoplasmiques 160

2. SREBP-1 ET SIRT1 DEUX RÉGULATEURS DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE MUSCULAIRE 162
2.1. Métabolisme lipidique 162
2.2. Métabolisme glucidique 166
2.3. Masse musculaire 166

3. SREBP-1 ET LES CÉRAMIDES 167

4. PERSPECTIVES 169

BIBLIOGRAPHIE 171

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3'UTR	3' UnTranslated Region
4E-BP1	eIF4E-Binding Protein 1

A

ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine Di-Phosphate
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside
Akt / PKB	Protein Kinase B
ALA	Acide α Lipoïque
AMP	Adénosine Mono-Phosphate
AMPK	AMP-activates protein Kinase
aPKC	atypical Protein Kinase C
ARE-BP	AU-Rich Elements – Binding Protein
ARNm	ARN messager
ATGL	Adipose TriGlyceride Lipase
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ATPase	Adenosine TriPhosphatase
AVP	Arginine-8-VasoPressine

B

bHLH	basic Helix Loop Helix factor
bHLH-LZ	bHLH-Leucine Zipper
BSA	Bovine Serum Albumin

C

CAR	Coxsackie/Adenovirus Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CHIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CHREBP	CarboHydrate Responsive Element-Binding Protein
cIAP	cellular Inhibitor of APoptosis
CMV	CytoMegaloVirus
COPII	COat Protein complex II
CPT1	Carnitine PalmiToyltransferase 1
CREB	CRE-Binding Protein
CS	Citrate Synthase

D

DAPI	4',6-DiAmidino-2-Phénylindole
DGAT	DiGlyceride AcylTransferase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

E

eIF	eukaryotic Initiation Factor
ERK 1/2	Extracellular signal-Regulated Kinase ½

F

FAS	Fatty Acid Synthase
FAT	Fatty Acid Transporter
FOXO	FOrkhead transcription factor
FT	Facteur de Transcription

G

G6P	Glucose-6-Phosphatase
GASP-1	G-protein coupled receptor Associated Sorting Protein 1
GDF-8	Growth Differentiation Factor 8
GFP	Green Fluorescent Protein
GK	GlucoKinase
Glut4	Glucose transporter 4
GPAT	Glycerol 3-Phosphate Acetyl Transferase
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
GTP	Guanosine TriPhosphate

H

HDAC	Histone DésACétylase
HEK	Human Embryonic Kidney
HIF	Hypoxia Inducible Factors
HKII	HexoKinase II
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl-Co-enzyme A
hnRNP	heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein

I

IFN-γ	InterFeroN-γ
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	IGF-Binding Protein
IκB	Inhibiteurs NFκB
IKK	IκB Kinase
IMTG	IntraMuscular TriGlycerides
INSIG	INSulin-Induced Gene
IRS	Insulin Receptor Substrate

K

KO	Knock Out

L

LB	Luria-Bertani
LCAD	Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
LDHA	Lactate DeHydrogenase A
LDL	Low Density Lipoprotein
LKB1	Liver Kinase B1
L-PK	Liver-Pyruvate Kinase
LXR	Liver X Receptor
LXRE	Liver X Receptor Element

M

MAFbx	Muscle Atrophy F-box

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCAD	Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2
MEK	MAPK/ERK activity Kinase
MHC	Myosine Heavy Chain
MK	*MAPK*-activated protein Kinase
Mnk 1/2	Mitogen-activated protein kinases
MRF	Myogenic Regulatory Factors
MRF4	Myogenic Regulatory Factor 4
MSTN	MyoSTatiNe
mtTFA	mitochondrial Transcription Factor A
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MuRF1	Muscle Ring Finger 1
MyBP-C	Myosin Binding C Protein
MYF5	MYogenic Factor 5
MyLC	Myosin Light Chain protein
MYOD1	MYOblast Determination protein 1/MYOgenic Differentiation 1
MYOG	MYOGénine

N

NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (réduit)
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide PHosphate (réduit)
NAM	NicotinAMide
Nampt	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NCoR	Nuclear receptor Co-Repressor
NFkB	Nuclear Factor-kappa B
NRF1	Nuclear Respiratory Factor 1

P

PCAF	P300/CBP-Associated Factor
PCR	Poly Chain Reaction
PDH	Pyruvate DeHydrogenase
PDK4	Pyruvate Dehydrogenase lipoamide Kinase 4
PEPCK	PhosphoÉnolPyruvate CarboxyKinase
PFK	Phospho-Fructo Kinase
PGC1-α	Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-α
PI3K	PhosphatidylInositol 3-Kinase
PIP2	PhosphatidylInositol 4,5-diphosphate
PIP3	PhosphatidylInositol 3,4,5-triphosphate
PK	Pyruvate Kinase
PKB/AKT	Protein Kinase B
PKC	Protéine Kinase C
PLD	PhosphoLipase D
PPAR	Peroxysomes Proliferator-Activated Receptors

R

RE	Réticulum Endoplasmique
RHD	Rel Homology Domain
RISC	RNA Induced Silencing Complex

RXR	Retinoid X Receptor
S	
S1P	Site-1 Protease
S2P	Site-2 Protease
S6K1	S6 Kinase beta-1(notée également p70S6kinase ou p70S6K)
SAPK2	Stress-Activated Protein Kinase
SCAP	SREBP Cleavage-Activating Protein
SCD1	Stearoyl-CoA-Desaturase 1
SENP	SENtrin-specific Protease
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise
SIRT1	SIRTuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1
SMRT	Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors
SRE	Sterol Response Element
SREBP-1	Sterol Response Element Binding Protein-1
SSD	Sterol-Sensing Domain
SUMO	Small Ubiquitin MOdifiers
T	
TG	TriGlycerides
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TTP	TrisTetraProlines
U	
UCP	UnCoupling protein
UPS	Ubiquitin Proteasome System

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Architecture du muscle squelettique. 28
Figure 2 : La contraction de l'unité fonctionnelle du muscle, le sarcomère. 29
Figure 3: Schéma général des réactions intracellulaires du métabolisme énergétique dans les cellules musculaires. 30
Figure 4 : Régulation de l'initiation de la traduction. 38
Figure 5 : Le système ubiquitine protéasome. 41
Figure 6 : Implication de la voie PI3Kinase-Akt dans la régulation de la masse musculaire 46
Figure 7 : Régulation de la masse musculaire par les voies p38MAPK et ERK. 49
Figure 8 : Représentation schématique de la voie de signalisation NFκB. 51
Figure 9 : Processus de maturation de la myostatine. 52
Figure 10 : Les différentes voies d'action de la myostatine. 54
Figure 11 : Représentation schématique de la structure des protéines SREBPs et de leur homologie. 58
Figure 12 : Processus de maturation de SREBP-1 et régulation par les stérols 60
Figure 13 : Gènes et voies métaboliques régulés par SREBP-1a et SREBP-1c. 63
Figure 14 : Mécanismes de régulation de l'expression et de l'activité de SREBP-1c par LXR, FOXO1 et SIRT1 dans le muscle squelettique en réponse aux variations nutritionnelles. 69
Figure 15 : Régulation de la maturation et de l'expression de SREBP-1 par la voie PI3K/Akt. 72
Figure 16 : La réaction de désacétylation catalysée par les sirtuins. 78
Figure 17 : Cycle de régulation de SIRT1 par son co-facteur NAD+. 80
Figure 18 : Régulation de l'activité de SIRT1 par sumoylation. 82
Figure 19 : Régulation de l'expression SIRT1 83
Figure 20 : Le resvératrol régule l'expression et l'activité de SIRT1. 85
Figure 21 : Désacétylation des histones et recrutement de SIRT1. 86
Figure 22 : Architecture de la protéine PGC-1α 87
Figure 23 : Modulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription par PGC-1α. 88
Figure 24 : SIRT1 crée une boucle d'autorégulation positive de l'expression du gène PGC-1α 88
Figure 25 : SIRT1 régule l'activité transcriptionnelle des PPARs et module le métabolisme lipidique. 90
Figure 26 : Régulation de l'activité transcriptionnelle des LXRs par SIRT1 dans le foie. 92
Figure 27 : Régulation des facteurs de transcription FOXOs par SIRT1. 94
Figure 28 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de la voie HIF par SIRT1. 95
Figure 29 : Régulation de la différenciation musculaire par SIRT1. 98
Figure 30 : Régulation du métabolisme lipidique et glucidique par SIRT1dans le muscle. 103
Figure 31 : SIRT1 induit une transition des fibres musculaires. 105
Figure 32 : exemple de titration adénovirale après 10 jours d'infection. 120
Figure 33 : Effet de SREBP-1 sur la localisation de FOXO3. 137
Figure 34 : SIRT1 régule l'expression des ARNm d'HKII et de SREBP-1c. 145
Figure 35 : Effet de la surexpression de SIRT1 sur la captation du glucose. 147
Figure 36 : Implication de la synthèse des céramides dans l'atrophie induite par le TNFα. 154
Figure 37 : Régulation de la balance protéique par SREBP-1. Résultats et hypothèses. 160

Tableau 1 : Caractéristiques des 4 grands types de fibres musculaires mammaliennes. 32
Tableau 2 : Sites consensus de liaison à l'ADN des facteurs de transcription SREBP. 57
Tableau 3 : Altérations du métabolisme lipidique dans différents modèles de souris génétiquement modifiées pour SREBP-1. 61
Tableau 4 : Protéines sarcomériques réprimés par SIRT1 97

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le muscle squelettique représente près de 40% du poids corporel total d'un individu sain, et a une importance cruciale pour la locomotion, la respiration, la thermogenèse ou encore la régulation du métabolisme glucidique et lipidique.

Le muscle est un organe ayant des capacités plastiques, il peut s'adapter en réponse à des signaux tels que l'état nutritionnel ou le niveau d'activité physique. Cette plasticité repose sur plusieurs mécanismes : la régulation du volume des fibres, le type de fibre et la régénération musculaire.

Le volume des fibres dépend de la quantité de protéines fibrillaires. Cette quantité est régulée par la balance entre synthèse et dégradation des protéines musculaires. L'augmentation de la synthèse protéique conduit à une augmentation du volume des fibres : on parle alors d'hypertrophie musculaire, observée par exemple lors d'une activité musculaire soutenue. À l'opposé une diminution de la synthèse et/ou une augmentation de la dégradation protéique conduit à une diminution du volume fibrillaire, on parle alors d'atrophie musculaire, observée par exemple, en réponse à l'inactivité physique mais aussi lors du vieillissement ou dans certaines situations pathologiques.

Le muscle squelettique est un assemblage hétérogène de fibres musculaires possédant des capacités contractiles et métaboliques différentes, des fibres les plus rapides au métabolisme glycolytique aux fibres les plus lentes au métabolisme oxydatif. Le phénotype des fibres musculaires peut évoluer vers l'un ou l'autre des profils, selon le type d'activité physique ou au cours de certaines pathologies comme le diabète.

Enfin, le muscle est un tissu capable de se régénérer. A la base de la régénération musculaire agissent les cellules satellites, véritables cellules souches musculaires. Elles sont activées lors de la survenue d'une lésion, prolifèrent et fusionnent afin de reconstituer de nouvelles fibres musculaires. Les cellules satellites participent également à l'hypertrophie.

L'adaptation du muscle aux signaux physiologiques et pathologiques résulte de l'intégration de signaux extracellulaires au niveau transcriptionnel. La transduction de ces signaux passe par l'activation de facteurs de transcription conduisant à la modification de l'expression de gènes contrôlant le phénotype musculaire.

Outre son rôle dans la mobilité, le muscle squelettique joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie métabolique de l'organisme. Principal consommateur d'énergie dans l'organisme, c'est aussi un centre de stockage des glucides et des lipides (alimentaires ou issus de la synthèse endogène) ; et aussi une source d'acides aminés lors du jeûne par exemple. Le métabolisme musculaire doit donc constamment s'adapter à la demande énergétique, notamment en réponse à l'activité physique et aux variations nutritionnelles. Ces adaptations métaboliques du muscle squelettique en réponse aux changements environnementaux sont induites par voies de signalisation hormonale, telle que celles de l'insuline et de l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1), conduisant à l'activation de facteurs de transcription régulant le métabolisme musculaire au niveau transcriptionnel.

Un des acteurs de cette régulation est le facteur de transcription Sterol Response Element Binding Protein 1 (SREBP-1). SREBP-1 a été largement décrit dans le foie et le tissu adipeux comme un régulateur clé du métabolisme des lipides. SREBP-1 est également exprimé dans le muscle squelettique répondant aux variations nutritionnelles (insuline) et à l'activité musculaire (exercice, sédentarité). Dans ce tissu, il régule l'expression de plus de 1500 gènes dont certains spécifiquement musculaires. SREBP-1 régule le métabolisme lipidique et notamment la synthèse des acides-gras, le métabolisme du glucose, en régulant l'expression d'enzymes clé de la glycolyse, mais également la différenciation musculaire et la masse musculaire en réprimant l'expression des protéines structurales du muscle squelettique et les facteurs de la différenciation musculaire, les Myogenic Regulatory Factors (MRFs).

Parmi les protéines régulatrices du métabolisme musculaire on retrouve la désacétylase SIRTuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (SIRT1) qui a un rôle de senseur de l'énergie cellulaire. Lorsque les quantités d'énergie disponible diminuent par exemple suite au jeûne ou à une activité physique prolongée, l'activité et l'expression de SIRT1 sont augmentées. À l'opposé, dans des conditions énergétiques favorables, à la suite par exemple d'une prise alimentaire, l'activité de SIRT1 est inhibée.

Dans le muscle squelettique, l'augmentation de l'activité de SIRT1 stimule l'utilisation des lipides comme substrat énergétique, augmente les capacités oxydatives des fibres musculaires ou encore inhibe la synthèse lipidique.

SIRT1 et SREBP-1 sont donc deux protéines qui s'opposent dans leurs régulations et dans leurs actions sur le métabolisme lipidique. Mais elles ont un rôle similaire sur l'inhibition de la différenciation.

Les lipides sont des substrats énergétiques et sont également à l'origine de nombreux dérivés comme par exemple les sphingolipides qui ont un rôle important dans l'inflammation et l'apoptose. Dans le muscle squelettique, ces sphingolipides ont surtout été étudiés pour leur rôle dans le développement de l'insulino-résistance. Cependant, des études récentes montrent que l'espèce majoritaire des sphingolipides que sont les céramides, sont également capable d'inhiber la différenciation musculaire en agissant sur la voie mammalian Target Of Rapamycin (mTOR). La protéine mTOR est un des effecteurs de la voie de signalisation d'IGF1 et régule notamment la synthèse et la dégradation protéique. Ainsi, nous pouvons également supposer que la modulation de la synthèse des céramides peut réguler la masse et le métabolisme musculaire.

Le métabolisme musculaire des lipides est donc un élément important dans la régulation de la masse musculaire, et les anomalies observées dans les désordres liés à l'obésité et à la sédentarité comme l'insulino-résistance et le diabète de type II (DTII) pourraient avoir des conséquences sur la structure et la fonction du tissu musculaire.

Le travail de thèse présenté dans le présent manuscrit s'intéresse particulièrement aux voies impliquées dans la régulation de la masse musculaire par SREBP-1. Dans ce cadre là, nous avons étudié le rôle des MRFs dans l'atrophie induite par SREBP-1, l'impact de SIRT1 dans la régulation de SREBP-1 et également le rôle des céramides dans l'atrophie musculaire.

ÉTAT DE LA LITTÉRATURE

1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE

1.1. Généralités

Le muscle squelettique représente en moyenne 40% du poids corporel humain total. Outre les fonctions dans la locomotion, la posture et la régulation de la température corporelle, le muscle squelettique a un rôle important dans la régulation du métabolisme global.

1.1.1. Structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique est composé de fibres musculaires formant un faisceau entouré par le sarcoplasme où sont localisées notamment les mitochondries (figure 1). Ces fibres musculaires ont la forme d'un cylindre d'une dizaine de millimètres de long et d'une cinquantaine de micromètres de diamètre, ce sont des cellules polynucléées issues de la fusion de plusieurs centaines de cellules précurseurs, les myoblastes.

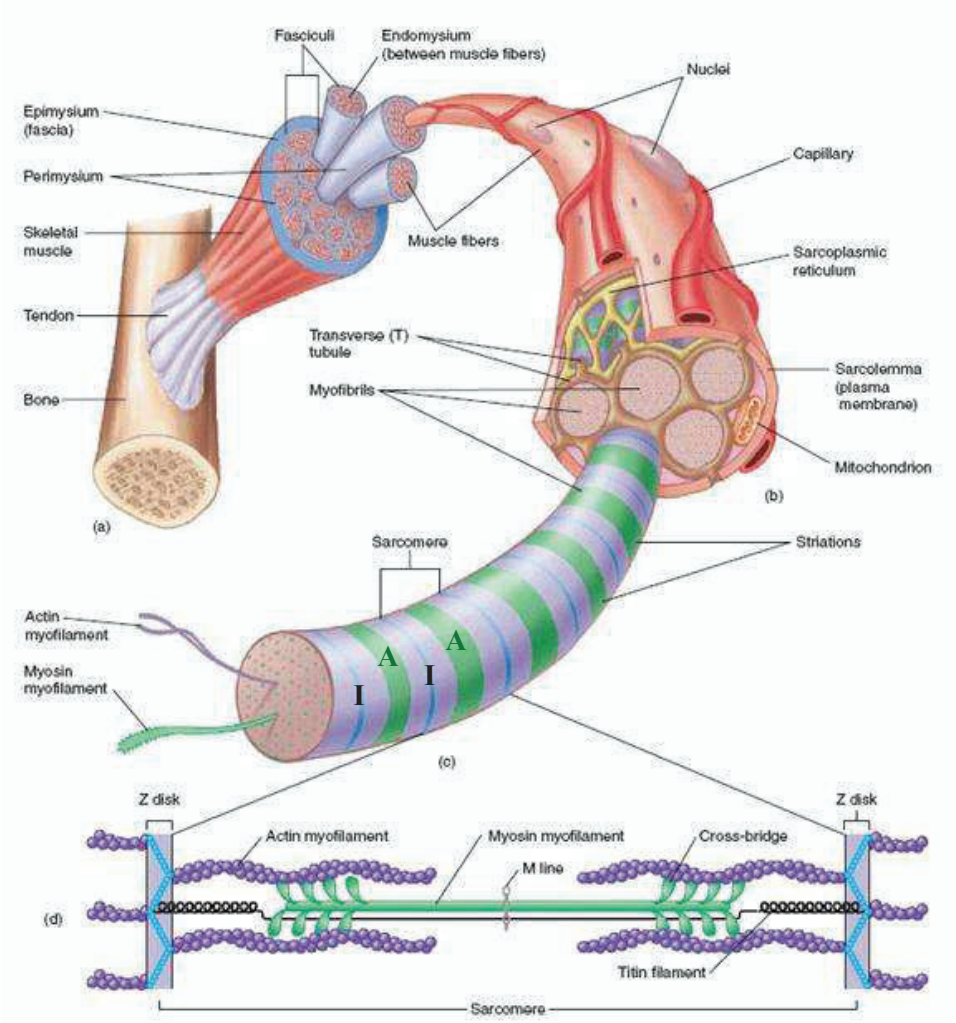


Figure 1 : Architecture du muscle squelettique.

Les myofibres sont composées de myofibrilles qui ont également une organisation complexe. Elles ont une apparence striée due à l'alternance de bandes I claires, A sombres et de lignes Z très foncées séparant en deux les bandes I. L'unité structurale est appelée sarcomère, elle est comprise entre deux bandes Z (figure 2).

Les sarcomères sont composés de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine. Ces deux filaments sont capables de glisser les uns sur les autres permettant de changer la conformation du sarcomère : relâché ou contracté (figure 2).

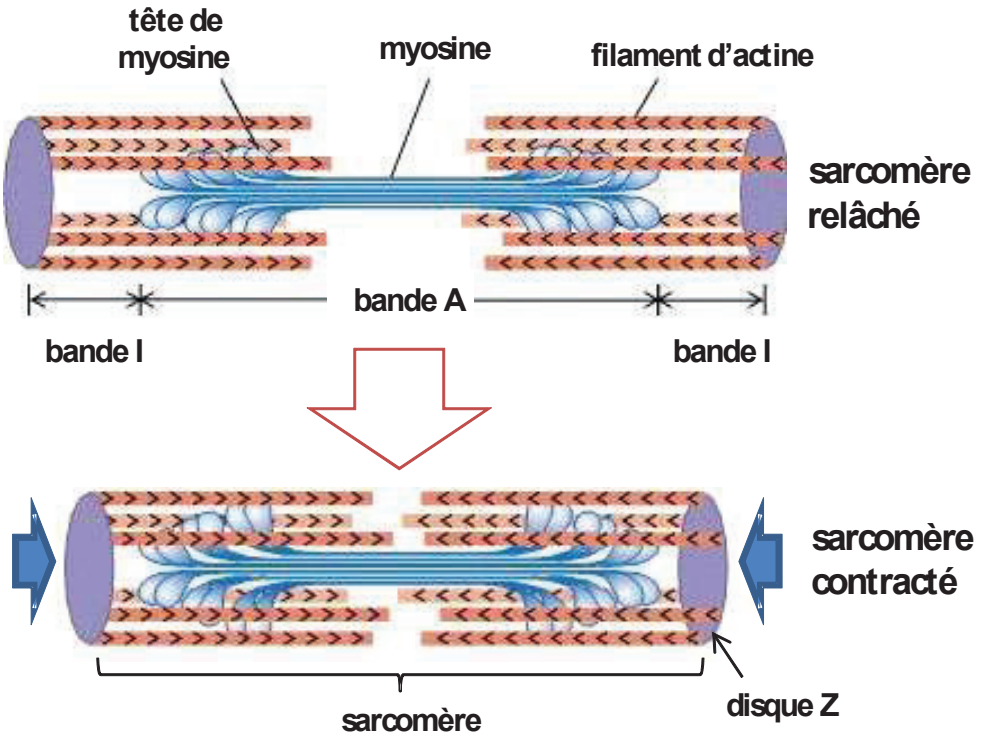


Figure 2 : La contraction de l'unité fonctionnelle du muscle, le sarcomère.

Les filaments épais de myosine sont composés de chaînes lourdes de myosine enroulées en double hélice avec de part et d'autre une tête globulaire capable d'interagir avec les filaments d'actine. Il existe quatre isoformes de la myosine chez les mammifères Myosin Heavy Chain (MyHC) : I, IIa, IIx ou IIb (Gundersen, 2011).

Les filaments fins d'actine sont ancrés au disque Z et s'étendent jusqu'au centre du sarcomère. Ils sont composés de monomères d'actine qui polymérisent pour former des chaînes linéaires d'actine F s'enroulant par paires en double hélice. Les filaments sont également composés de deux protéines modulatrices, la tropomyosine et la troponine. La tropomyosine forme des filaments au niveau du sillon de l'actine, elle masque les domaines de fixation à la myosine. La troponine est composée de trois sous-unités : une qui se lie à l'actine, une autre à la tropomyosine et une dernière qui fixe le calcium nécessaire pour la contraction musculaire.

Au sein des myofibrilles on retrouve de nombreuses autres protéines nécessaires au maintien de la structure fibrillaire et de la fonction contractile. Par exemple, la titine qui assure l'élasticité du muscle ou encore la nébuline qui stabilise les filaments d'actine.

1.1.2. Sources d'énergie du muscle squelettique

Les sources d'énergie utilisées par le muscle squelettique vont dépendre du type, de l'intensité et de la durée de l'effort musculaire ainsi que de la composition en fibres du muscle sollicité. Le système aérobique oxydatif est utilisé pour des efforts de longue durée d'intensité faible ou modérée. Au contraire, le système anaérobique est utilisé pour des efforts courts d'intensité haute ou modérée.

Trois grands systèmes sont utilisés pour générer de l'énergie : le système haute énergie phosphagène utilisant comme substrat de l' Adénosine Tri-Phosphate (ATP) ou de la phosphocréatine, le système anaérobique glycolytique utilisant comme substrat du glycogène ou du glucose sanguin et le système aérobique oxidatif utilisant comme substrat du glycogène, du glucose ou des lipides (Wells *et al.* , 2009, Guzun and Saks, 2010) (figure 3).

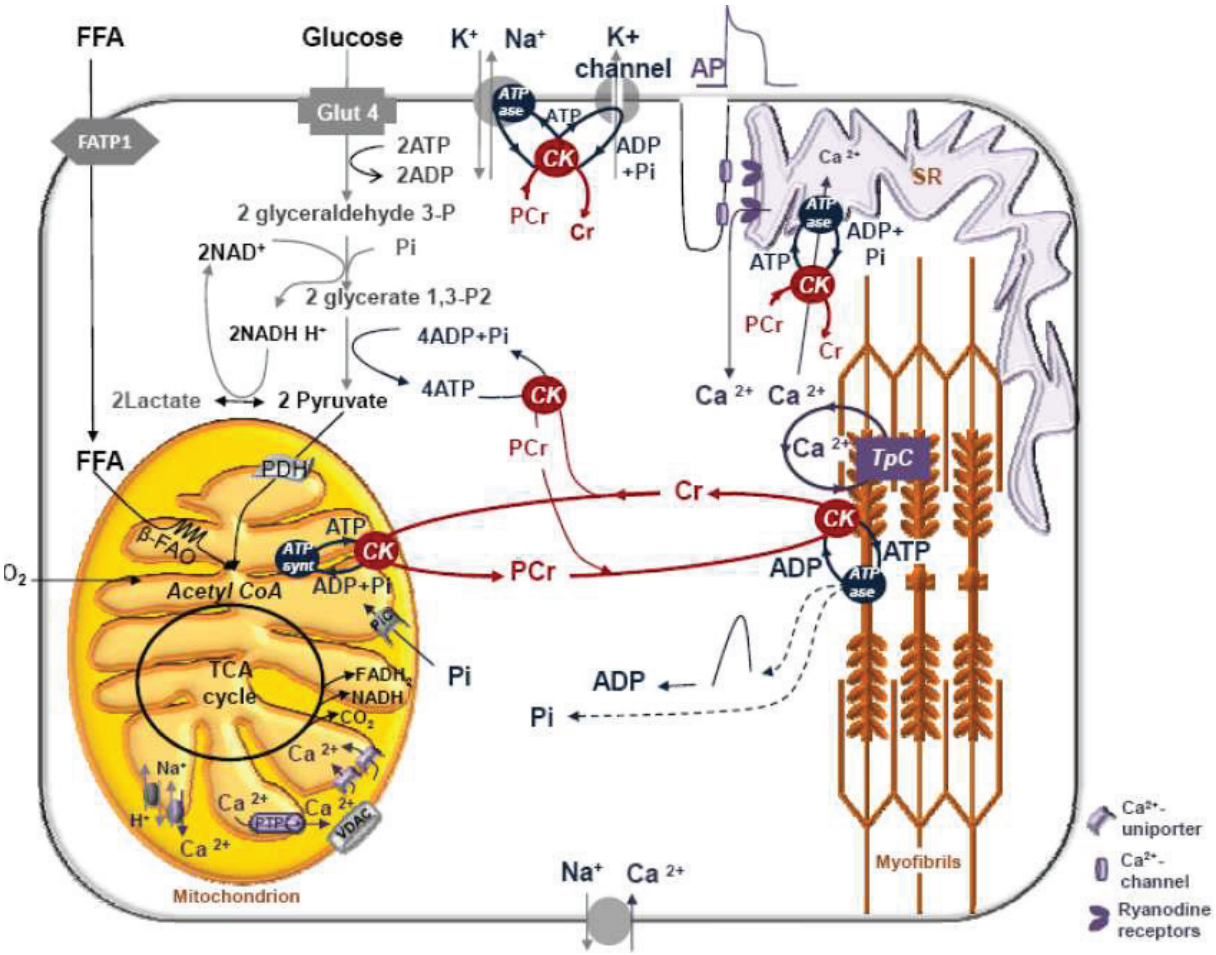


Figure 3: Schéma général des réactions intracellulaires du métabolisme énergétique dans les cellules musculaires.

D'après Guzun et al. 2010.

1.1.3. L'activation des myofibrilles

La troponine et la tropomyosine forment une unité régulatrice contrôlant les molécules d'actine du filament fin. Au repos, la concentration de calcium est maintenue basse grâce à des pompes Ca^{2+}-ATPase stockant le calcium dans le réticulum endoplasmique. En absence de calcium, la tropomyosine et la troponine ne sont pas capables de se fixer aux molécules d'actine à l'exception de quelques sites qui forment des liaisons électrostatiques faibles. Lorsque la concentration en Ca^{2+} est faible, le sarcolème se trouve sous forme relâchée. Lorsque la concentration en Ca^{2+} cytosolique augmente sous l'effet de stimuli permettant la dépolarisation de la membrane plasmique, le calcium se fixe à la troponine. Ceci entraîne un changement conformationnel de la troponine permettant la reconnaissance des sites de fixation à l'actine. La fixation de l'actine à la myosine provoque un glissement des filaments les uns sur les autres et ainsi une contraction généralisée des myofibrilles d'une même fibre musculaire (Gundersen, 2011, Schiaffino and Reggiani, 2011).

1.1.4. Les types de fibre musculaire

Du fait de leurs différences histochimiques, les muscles squelettiques vont permettre des contractions continues de faibles intensité (maintien de la posture), des contractions répétées d'intensité moyenne (locomotion) ou encore des contractions rapides et d'intensité maximale (saut).

Les fibres musculaires des mammifères sont classées en quatre groupes d'après les isoformes de MyHC et leur capacités glycolytiques et oxydatives : I, IIa, IIx et IIb (tableau 1). Suivant les muscles considérés, il y a une prédominance d'un ou plusieurs types de fibres. Les fibres de type I ont un métabolisme oxydatif permettant une résistance élevée à la fatigue des contractions lentes et continues ; elles contiennent beaucoup de mitochondries. Ces fibres composent par exemple les muscles de la posture. A l'opposé, on retrouve les fibres de type IIb dans les muscles requérant force et rapidité comme les muscles des bras. Ces fibres ont un métabolisme glycolitique. Comparées aux fibres de type I, elles ont beaucoup moins de mitochondries et un diamètre plus important (Schiaffino and Reggiani, 2011)

MyHC type	Twitch duration	Shortening velocity	Cross-sectional area	Metabolism	Endurance	Energy efficiency
I	Slow	Slow	Small	Oxidative	High	High
IIa						
IIx						
IIb	Fast	Fast	Large	Glycolytic	Low	Low

Tableau 1 : Caractéristiques des 4 grands types de fibres musculaires mammaliennes.

D'après Gundersen et al. 2011

La capacité d'adaptation des muscles squelettiques à l'exercice vient de la capacité des fibres musculaires à changer de types fibrillaires (Gundersen, 2011, Schiaffino and Reggiani, 2011) . La conversion des fibres suit généralement un ordre séquentiel I ↔ IIa ↔ IIx ↔ IIb, les fibres vont changer d'un type rapide vers lent après une augmentation de l'activité motoneuronale ou de l'exercice physique. Au contraire, une diminution de l'activité physique ou encore de l'activité motoneuronale va induire une transition des fibres lentes vers des fibres rapides (Pette and Staron, 2000).

1.2. La régulation de la masse musculaire

1.2.1. Généralités sur la plasticité musculaire : hypertrophie et atrophie

Le muscle est un organe plastique dont la masse varie en fonction des situations physiologiques (exercice, inactivité, nutrition) ou pathologiques (cancer, diabète, immobilisation) (Stewart and Rittweger, 2006, Harridge, 2007). L'hypertrophie se produit lors de la croissance post-natale mais également en réponse à une activité musculaire accrue ou à l'entraînement sportif. Au contraire, l'atrophie musculaire se développe lors du jeûne, d'une immobilisation prolongée, de lésions nerveuses ou au cours de pathologies associées à un état de cachexie telles que le cancer, le Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA), ou le diabète (Singleton and Feldman, 2001, Schiaffino *et al.* , 2007, Sandri, 2008).

Les protéines myofibrillaires représentant 85% du volume d'une fibre musculaire, toute situation modifiant l'équilibre entre la synthèse et la dégradation protéique va entraîner un gain ou une perte de masse musculaire (Hoppeler, 1986, Sandri, 2008). Ainsi, l'hypertrophie est la résultante d'une forte induction de la synthèse protéique alors que l'atrophie résulte d'une rapide diminution de la synthèse et d'une augmentation marquée de

la dégradation protéique. Au sein du muscle squelettique l'augmentation de la dégradation protéique est essentiellement due à l'activation du système Ubiquitin Proteasome System (UPS) et à l'augmentation de l'expression des atrogènes, Muscle Ring Finger 1 (MuRF1) et Atrogin-1. L'augmentation de l'expression de ces atrogènes permet d'augmenter le marquage des protéines à dégrader par le protéasome, qui est une étape clé pour la dégradation des protéines musculaires par le système UPS (Murton *et al.* , 2008). Les cellules satellites participent également au processus hypertrophique au cours de la croissance et en réponse à l'exercice, en fusionnant les fibres existantes afin de toujours maintenir le ratio ADN/protéine constant (Roy *et al.* , 1999, Adams, 2006).

1.2.2. Effets de l'exercice

Les muscles squelettiques sont très sensibles aux charges mécaniques. Ainsi, une augmentation d'effort physique chronique va induire une prise de masse musculaire. (Harridge, 2007)

Les effets hypertrophiques sont spécifiques des muscles sollicités, de la durée, de l'intensité et de l'exercice considéré (pliométrique, concentrique ou excentrique). Le mécanisme exact de cette prise de masse est complexe étant donné que l'exercice physique module l'expression de plusieurs centaines de gènes dans le muscle et que les gènes ciblés varient en fonction du type d'activités réalisées (Mahoney *et al.* , 2004, Mahoney *et al.* , 2005, Mahoney *et al.* , 2008).

Cependant, il est connu que l'exercice physique augmente spécifiquement la synthèse protéique, notamment *via* l'activation de la voie de signalisation mTOR (Chen *et al.* , 2002, Kimball *et al.* , 2002, Kubica *et al.* , 2005, Drummond *et al.* , 2009, Spangenburg, 2009). D'autres études montrent que l'activité physique réprime l'activité d'un régulateur négatif de la masse musculaire, la myostatine, favorisant l'hypertrophie musculaire (Hansen *et al.* , 2011).

L'exercice physique agit également sur l'apoptose et la dégradation protéique dans les fibres musculaires. Une activité physique régulière, consistant dans ces études à des exercices de course sur tapis régulière allant de 7 jours à 12 semaines d'entraînement, a été démontrée

comme anti apoptotique en diminuant la fragmentation de l'ADN, l'expression de la caspase 3 ou encore le clivage de la caspase 8 (Song *et al.* , 2006, Marzetti *et al.* , 2008, Ljubicic *et al.* , 2009)

Au contraire, des exercices pliométriques ou excentriques intenses augmentent l'expression des protéines pro-apoptotique (Biral *et al.* , 2000, Sudo and Kano, 2009).

Les mêmes observations ont été faites sur l'expression des atrogènes MuRF1 et Atrogin-1. Des exercices intenses de type pliométrique ou excentrique activent fortement l'expression de ces atrogènes, pour dégrader les protéines des myofibrilles endommagées, et augmentent l'expression des gènes liés à la régénération (Sandri *et al.* , 1995, Reid, 2005, Jensen *et al.*).

Par conséquent, des exercices d'intensité élevée (dépendant de la capacité de l'individu) provoquant des microlésions des fibres musculaires, activent le système Ubiquitin Proteasome System (UPS) de dégradation des protéines et l'apoptose afin de dégrader les fibres lésées. Puis suivis d'une étape de régénération, ils permettent alors une adaptation des muscles aux contraintes avec un gain de force et de masse (Sandri *et al.*, 1995, Reid, 2005). Lors d'exercices d'endurance moyennement intenses, on note une diminution de l'activation des voies de dégradation. Ce type d'exercice agit surtout sur la fatigabilité du muscle (mitochondries, motoneurones) et la composition des fibres musculaires (types aérobique / glycolytique)(Quadrilatero *et al.* , 2011).

Il est important de noter que les effets trophiques de l'activité physique sont également liés aux ressources énergétiques et donc à l'apport calorique post et pré effort.

A l'opposé de l'activité physique, l'inactivité physique chronique induit des désordres métaboliques, et est la deuxième cause de mort aux Etats-Unis selon le Centers of Disease Control (Mokdad *et al.* , 2004)

L'immobilisation forcée est une méthode utilisée pour étudier l'inactivité physique poussée. Les méthodes de dénervation ou d'alitement ont mis en évidence que la perte de masse musculaire, dans ces conditions, est due essentiellement à une diminution de la synthèse protéique de 46%, puisque en même temps le système de dégradation est réprimé (Ferrando *et al.* , 1996, Ferrando *et al.* , 1997, Leger *et al.* , 2009, Symons *et al.* , 2009).

Chez l'animal immobilisé, la perte de muscle commence dans les 72 premières heures d'immobilisation et peut atteindre 30 à 60% de la masse initiale selon la durée et le muscle étudié (Taillandier *et al.* , 1996, Coutinho *et al.* , 2004, Tesch *et al.* , 2008). Chez l'homme adulte, après 4 à 6 semaines d'alitement, la perte de volume des fibres musculaires peut atteindre 12 et 8% dans respectivement les muscles *gastrocnemius* et *vastus lateralis* (Adams *et al.* , 2003b, de Boer *et al.* , 2008).

Au niveau structural, l'inactivité physique entraîne une réduction du nombre ou de la taille des fibres musculaires lentes oxydatives (fibres de type I) (Fitts *et al.* , 2000, Adams *et al.*, 2003b). Par exemple, chez des sujets adultes, 2 à 5 semaines d'immobilisation réduisent la surface des fibres d'environ 50% (en fait de 10 à 70% suivant la durée d'immobilisation et le type de fibres, les fibres lentes étant les plus touchées) (Thomason and Booth, 1990). Cette réduction de taille et de surface des fibres semble unanimement retrouvée et serait la principale cause de l'atrophie musculaire et de la réduction de force qui en résulte (Thomason and Booth, 1990, Berg *et al.* , 1997, Hortobagyi *et al.* , 2000).

1.2.3. Nutrition

Le muscle squelettique adapte son métabolisme au statut nutritionnel. Cette adaptation est possible par la présence au sein de la cellule de protéines médiatrices de l'état nutritionnel tel que l'AMP-activates protein Kinase (AMPK), SIRT1 ou encore mTOR.
Suite à une prise alimentaire, la quantité de nutriment, d'insuline ou encore d'IGF1 augmentent, permettant d'activer la voie pro-anabolique Protein Kinase B (PKB ou Akt) / mTOR (Oldham and Hafen, 2003).

Au contraire, dans le cas de jeûne ou de restriction calorique, deux senseurs du niveau énergétique du muscle sont activés, l'AMPK et SIRT1. Ils sont activés respectivement par l'augmentation du ratio Adénosine Mono-Phosphate (AMP)/ATP et par l'augmentation de la quantité de Nicotinamide Adenine Dinucleotide oxydé (NAD+). Ces deux protéines vont réprimer les voies anaboliques (Mounier *et al.* , 2009). Dans le cas d'une privation longue, l'AMPK active les voies cataboliques du muscle pour générer de l'énergie (Nakae *et al.* , 2008). Ces deux protéines, du « sensing énergétique », permettent d'intégrer les stimuli de

l'état énergétique des cellules musculaires, et *via* la signalisation intracellulaire d'adapter le métabolisme musculaire aux conditions énergétiques (Mounier *et al.* , 2011).

Dans des conditions non pathologiques, le muscle squelettique est capable d'adapter ses sources énergétiques aux disponibilités (glucose, acide gras) en modulant les voies métaboliques. Dans toutes les études d'alitement, une oxydation plus importante des carbohydrates au détriment de l'oxydation lipidique a été observée. Cette perte de flexibilité métabolique favorise l'utilisation du glucose et des protéines musculaires comme substrat énergétique. De plus, l'accumulation de lipides induit une insulino-résistance provoquant une diminution de l'activation de la voie Akt (Bergouignan *et al.* , 2011).

1.2.4. Inflammation

Chez l'homme, l'augmentation du catabolisme musculaire est largement attribué aux cytokines pro-inflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor α (TNFα), l'Interleukine-6 (IL-6) et l'Interféron-γ (IFN-γ) dans les cas de cancer, d'insuffisance cardiaque congestive, de SIDA, d'obstruction pulmonaire chronique, ou encore de sarcopénie (Evans *et al.* , 2008, Evans, 2010, Dodson *et al.* , 2011).

Les cytokines sont des glycoprotéines sécrétées par différents types cellulaires, dont les cellules gliales, les cellules endothéliales et épithéliales, mais en majorité par les cellules immunitaires de l'hôte en réponse à une infection (macrophages et monocytes surtout), et, dans les cancers, par les cellules tumorales elles-mêmes. L'expression chronique de ces cytokines induit une diminution de l'anabolisme protéique et une augmentation du catabolisme protéique. Ainsi, cette inflammation provoque une atrophie musculaire et induit de forts désordres métaboliques (Dodson *et al.*, 2011).

1.3. Modulation de la balance protéique musculaire

Le renouvellement protéique joue un rôle important dans la régulation de la masse musculaire, mais aussi dans le maintien des capacités métaboliques et mécaniques du muscle. Le contenu protéique est donc très finement régulé par la modulation des taux de synthèse protéique et de dégradation protéique. Dans des conditions normales, les quantités de

protéines synthétisées et dégradées sont équivalentes sur une journée, la balance nette anabolisme protéique / catabolisme protéique est à l'équilibre. La modification de cet équilibre par la nutrition, l'activité physique ou par des situations pathologiques comme le cancer ou encore le SIDA, va conduire à une augmentation ou à une diminution de la masse musculaire.

1.3.1. La synthèse protéique

La synthèse débute dans le cytoplasme à partir des ARN messagers (ARNm) issus de la transcription des gènes, des ribosomes, des acides aminés fixés sur les ARN de transfert (ARNt) et de nombreux facteurs protéiques spécifiques des différentes étapes : c'est la traduction des protéines, c'est-à-dire la synthèse proprement dite des protéines à partir de l'ARNm. Les 3 étapes de la traduction sont l'initiation, l'élongation, et la terminaison.

L'initiation correspond à l'assemblage des sous-unités 40S et 60S du ribosome au niveau du codon d'initiation (AUG) de l'ARNm et à la fixation de l'ARNt chargé avec la méthionine (qui est toujours le premier acide aminé lors de la synthèse d'une protéine).

Cette étape est contrôlée par un certain nombre de protéines, dont le facteur Eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2) qui est impliqué dans la fixation de l'ARNt initiateur à la sous-unité 40S du ribosome pour former le complexe de pré-initiation 43S (Jackson *et al.* , 2010) (figure 4).

Une autre protéine régulatrice de cette voie est la protéine eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1), qui agit comme un inhibiteur de l'initiation de la traduction. Sous sa forme non phosphorylée, ce facteur se lie au facteur d'initiation eIF4E l'empêchant alors de jouer son rôle dans l'initiation de la traduction. En effet, ce n'est que sous sa forme libre qu'il peut s'associer avec eIF4G pour former le complexe eIF4F, composant actif de l'initiation de la traduction (figure 4). La phosphorylation de 4E-BP1 provoque la libération de eIF4E et donc la formation du complexe eIF4F (Wang and Proud, 2006). Ce complexe permet la reconnaissance et l'association de l'ARNm avec le complexe de pré-initiation 43S, ce qui initie la traduction (Jackson *et al.*, 2010) (figure 4). Ainsi, il existe une corrélation entre la stimulation de la synthèse protéique musculaire et l'augmentation de la phosphorylation de 4E-BP1 (Yoshizawa *et al.* , 1998). Enfin, on peut citer comme régulateur de cette étape, la protéine ribosomale S6 Kinase beta-1 (S6K1 ou p70S6kinase ou p70S6K). Cette kinase de 70 kDa est elle-même activée par phosphorylation. Elle a comme substrat la protéine ribosomale

S6, qui est un élément constitutif de la sous-unité 40S du ribosome (Kimball and Jefferson, 2001) (figure 4).

L'élongation permet l'allongement de la chaîne polypeptidique par la répétition du cycle consistant à accrocher l'aminoacyl-ARNt spécifique du codon suivant dans le ribosome, à former la liaison peptidique, et à avancer le ribosome sur l'ARNm (Jackson *et al.*, 2010). Parmi les facteurs régulateurs de cette étape, la protéine eIF2 est l'une des mieux décrites. Elle intervient au cours de l'étape de translocation, c'est-à-dire lorsque le ribosome se déplace le long de l'ARNm. Sa régulation passe par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation complexe (Wang *et al.* , 2001). Sous sa forme phosphorylée, eIF2 est inactive et liée à la Guanosine TriPhosphate (GTP) ; sa déphosphorylation par eIF2B entraine son activation. Le facteur eIF2B est inhibé par phosphorylation par la Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3β) (Welsh *et al.* , 1998).

La terminaison est l'étape pendant laquelle le polypeptide complet est relargué dans le cytoplasme où il subira des modifications post-traductionnelles (Jackson *et al.*, 2010).

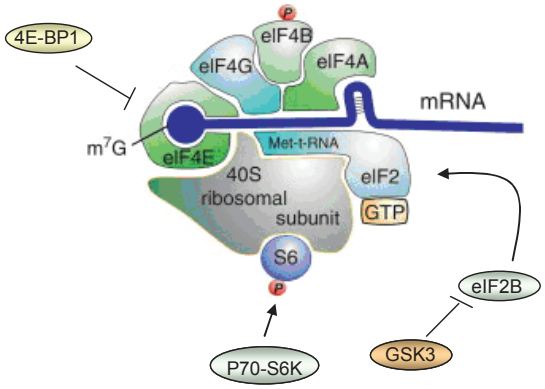


Figure 4 : Régulation de l'initiation de la traduction.

1.3.2. La dégradation protéique

La dégradation des protéines, appelée protéolyse musculaire, est un processus permettant de dégrader les protéines en leurs constituants de base : les acides aminés. Elle est réalisée selon trois mécanismes différents mais complémentaires : la voie lysosomale, la voie calcium-dépendante et la voie ubiquitine-protéasome-dépendante.

a) L'Ubiquitin Proteasome System (UPS)

Des mesures de protéolyse sur des muscles incubés montrent que le système UPS est responsable de 80% de la dégradation protéique musculaire (Mitch and Goldberg, 1996, Attaix *et al.* , 1998). L'UPS permet de cibler des protéines musculaires pour les dégrader par le protéasome (figure 5). Une augmentation d'un des composants de ce système permet d'augmenter la dégradation protéique.

◊ *La poly-ubiquitinylation des protéines à dégrader*

La première étape consiste à lier des résidus ubiquitines aux protéines à dégrader, faisant entrer en jeu trois grandes classes d'enzymes. L'ubiquitin activating enzyme E1 fixe une molécule d'ubiquitine en créant un pont thioester et en faisant intervenir l'utilisation d'une molécule d'ATP. Le résidu ubiquitine est ensuite transféré sur l'ubiquitine conjugating enzyme E2 en créant une nouvelle liaison thioester entre l'ubiquitine et un résidu cystéine de l'enzyme E2. Enfin une ubiquitine ligase E3 permet la fixation du résidu ubiquitine sur la protéine à dégrader, cette dernière étape étant répétée au moins 4 fois pour polyubiquitinyler la protéine à dégrader (Murton *et al.*, 2008) (figure 5).

Chez les mammifères, il existe 2 isoformes de l'enzyme E1, plus de 30 isoformes de l'enzyme E2 et plus d'une centaine d'isoformes E3 responsables du marquage spécifique des protéines pour la dégradation par le protéasome. En 2001, des études faites chez des souris mise à jeun ont montré une augmentation de l'expression des ARNm de deux ubiquitines ligases E3 dans les muscles atrophiés. L'expression de ces deux ubiquitines ligases spécifiques du muscle, Atrogin-1 (MAFbx) et MuRF1 (TRIM63) est augmentée dans la plupart des modèles d'atrophie musculaire comme la dénervation, l'urémie, la septicémie, le diabète ou l'administration de dexaméthasone. Les facteurs de transcription FOrkhead (FOXO) sont les principaux activateurs de l'expression de ces atrogènes (Glass, 2010).

L'ubiquitine ligase MuRF1 permet d'associer des molécules d'ubiquitine et donc le marquage spécifique de protéines musculaires pour la protéolyse par le protéasome comme la troponine I, la titine, les MyHC (Myosin Heavy Chain proteins), les chaînes légères de myosine (Myosin Light Chain proteins 1 et 2, MyLC-1 et MyLC-2), les protéines C liant la

myosine (myosin binding proteins, MyBP-C) ou encore de la nébuline (Witt *et al.* , 2005, Eddins *et al.* , 2011).

Bien qu'Atrogin-1 augmente la dégradation des protéines musculaires, à ce jour, les seules protéines spécifiquement marquées pour la dégradation par Atrogin-1 sont MYOblast Determination protein 1/MYOgenic Differentiation 1 (MYOD1) et le facteur d'initiation de la traduction eIF3F (Tintignac *et al.* , 2005, Csibi *et al.* , 2009).

En orientant ces différentes protéines vers la dégradation par le protéasome, cette enzyme peut donc également être considérée comme un répresseur de l'anabolisme musculaire (Attaix and Baracos, 2010).

◊ *Dégradation par le protéasome*

Le protéasome 26S est composé d'un noyau cylindrique 20S lié à une ou deux extrémités du complexe 19S régulant l'entrée des protéines marquées pour la dégradation.

Le noyau cylindrique 20S est formé par quatre bagues empilées, contenant chacune sept sous-unités. À l'intérieur de ce cylindre se trouvent les sites catalytiques impliqués dans l'hydrolyse des liaisons peptidiques.

La partie 19S aux extrémités reconnaît les protéines polyubiquitinées et permet la translocation des protéines, par un système Adenosine TriPhosphatase (ATPase) dépendant, dans la machinerie protéolytique. Une fois dégradée en acides aminés par les péptidases du protéasome, l'ubiquitine est recyclée par l'action des enzymes dé-ubiquitinases Rpn11, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 (USP14) et ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 37 (UCH37) qui clivent les liaisons ubiquitines (Murton *et al.*, 2008).

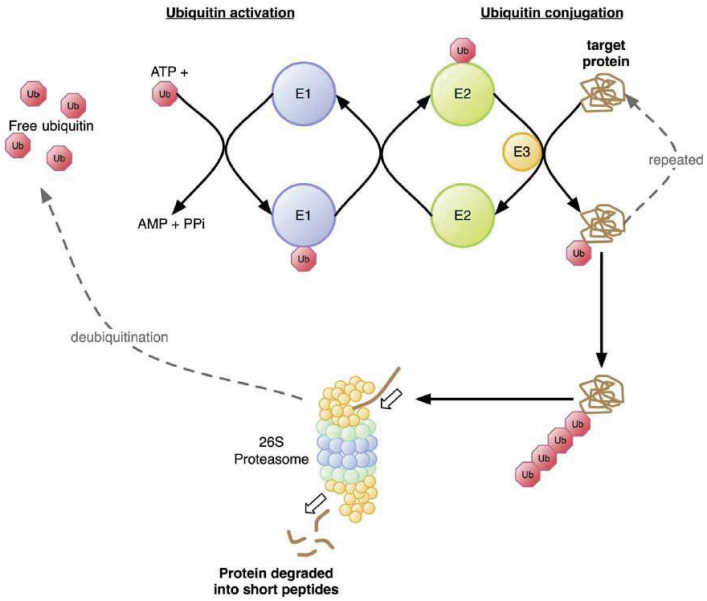


Figure 5 : Le système ubiquitine protéasome.

D'après Murton et al. 2008

b) L'autophagie

Le système autophagique lysosomal est un système faisant intervenir deux types de vésicules, l'autophagosome qui capture dans un premier temps les substrats, et le lysosome, qui dans une étape ultérieure, engloutie l'autophagosome et le dégrade avec ses constituants.
Il existe 3 types différents d'autophagies : la microautophagie, l'autophagie réalisée par des protéines chaperonnes et la macroautophagie qui représente la forme principale (Mizushima and Komatsu, 2011).

La microautophagie est localisée directement au niveau du lysosome, qui "absorbe" des protéines cytosoliques par invagination de sa membrane. La microautophagie est impliquée dans la dégradation de protéines à longue durée de vie dans de nombreux types cellulaires.

L'autophagie réalisée par des protéines chaperonnes se fait quant à elle par la translocation directe des substrats à dégrader dans la lumière du lysosome, au travers de la membrane par l'intermédiaire d'un translocon, sans qu'il n'y ait formation de vésicule au préalable. Ce mécanisme possède une spécificité d'action et seules les protéines solubles sont dégradées, ce qui exclut les organites tels que les mitochondries. Par ailleurs, tous ses substrats doivent posséder un motif de ciblage spécifique qui leur permet d'être reconnus et acheminés par les chaperonnes jusqu'à la membrane lysosomale.

La macroautophagie, que l'on appelle plus communément « autophagie », est la forme la mieux caractérisée des trois. Etant la seule voie qui puisse dégrader massivement des macromolécules et des organites, elle représente une voie de dégradation alternative à celle du protéasome. La macroautophagie est active à un niveau basal dans la plupart des cellules dans le but de permettre le renouvellement des protéines à longue durée de vie, et de certains organites comme par exemple les mitochondries ou les peroxysomes. Cette voie est stimulée en situation de stress et constitue alors un mécanisme de survie de la cellule. Elle représente un processus adaptatif, grâce au recyclage des acides aminés et l'élimination des macromolécules et des structures cellulaires endommagées (Mizushima and Komatsu, 2011). L'autophagie consiste dans un premier temps en la formation d'une vacuole qui s'allonge et séquestre des composants cytoplasmiques. La vésicule ainsi formée, appelée autophagosome, est délimitée par une double membrane phospholipidique. Elle fusionne avec les lysosomes et se nomme alors "autophagolysosome" afin de libérer le matériel séquestré dans le lumen pour être dégradé par hydrolyse. L'autophagie est le seul processus de dégradation majeur chez les eucaryotes par lequel les organites cellulaires sont dégradés. Dite non sélective, elle est directement impliquée dans l'élimination d'agrégats protéiques, la protection contre les tumeurs et la défense contre les invasions virale et bactérienne, et joue un rôle primordial dans le développement et la différenciation. Par ailleurs, l'hétérophagie est un autre système de digestion précédant la dégradation lysosomale. Elle correspond à la digestion de substances exogènes qui rentrent dans la cellule soit par endocytose soit par phagocytose. Les vésicules d'endocytose fusionnent avec les endosomes qui eux-mêmes fusionnent avec les lysosomes primaires pour former les lysosomes matures (Mizushima and Komatsu, 2011).

Les lysosomes sont de petites vésicules renfermant plus de 40 hydrolases (RNAses, DNAses, lipases, glycosidases et protéases) (Bechet *et al.* , 2005). Les protéases lysosomales, appelées cathepsines, ne contribuent pas de façon majoritaire à la dégradation des protéines myofibrillaires car elles sont peu représentées dans le muscle (Tiao *et al.* , 1994, Attaix *et al.* , 2005). Les cathepsines majeures dans le muscle squelettique sont les cathepsines L, B, H et la cathepsine D (Bechet *et al.*, 2005). Elles sont principalement impliquées dans la dégradation de protéines membranaires ou extracellulaires (Jackman and Kandarian, 2004). Les cathepsines dégradent les protéines par autophagie (micro autophagie ou macro autophagie) ou par hétérophagie. L'autophagie est induite dans des conditions de stress, de carence en acides aminés, et de traitement par la rapamycine (antibiotique de la famille des macrolides) ou par des hormones stéroïdiennes (Munafo and Colombo, 2001).

Bien que relativement peu impliquées dans la protéolyse musculaire totale, certaines cathepsines, comme la cathepsine L, sont considérées comme de bons marqueurs de l'atrophie musculaire. L'expression de la cathepsine L est augmentée très tôt au cours des atrophies musculaires quel que soit le modèle d'atrophie utilisé (Taillandier *et al.*, 1996, Komamura *et al.* , 2003).

c) Voie calcium dépendant

La voie protéolytique calcium dépendante implique deux grands types de cystéine protéases : les calpaïnes ubiquitaires et les calpaïnes tissu-spécifiques. Il existe à ce jour 14 calpaïnes identifiées chez les mammifères, les principales étant les μ- et m-calpaïnes (ubiquitaire et respectivement activées par des concentrations en calcium de l'ordre du μM et du mM) et la calpaïne 3 (spécifique du muscle) (Goll *et al.* , 2003). L'activité protéolytique de la Calpaïne-3 dans la fibre musculaire est dirigée contre certaines protéines du sarcomère, et des costamères comme la titine ce qui entraîne une rupture du cytosquelette d'Actine et la désorganisation des adhérences focales (Sorimachi *et al.* , 1997). Les calpaïnes sont inactives en l'absence de stimuli cataboliques. Le calcium est le principal activateur de ces enzymes : sa fixation sur les calpaïnes entraine un changement de conformation de l'enzyme à l'origine de son activation. Ainsi, il a pu être démontré qu'un apport massif de calcium entrainait une forte protéolyse musculaire *via* cette voie des calpaïnes (Baracos *et al.* , 1986). D'autres facteurs comme les phospholipides peuvent aussi réguler l'activation des calpaïnes par différents mécanismes, par exemple en diminuant la concentration en calcium nécessaire à l'autolyse des μ- et m-calpaïnes (Zalewska *et al.* , 2004, Shao *et al.* , 2006). Enfin, il existe un inhibiteur endogène spécifique des calpaïnes, la calpastatine (Goll *et al.*, 2003). Les calpaïnes réalisent une protéolyse ménagée de leurs substrats, ce qui peut modifier leur état d'activation, leur localisation et leur fonction. Ces enzymes sont généralement activées à la suite de dommages cellulaires et lorsque la concentration en calcium intracellulaire devient élevée. Cependant, elles ne sont pas systématiquement activées en cas de perte musculaire et elles ne sont pas directement responsables de la dégradation des protéines contractiles majeures (actine et myosine), mais interviendraient plutôt dans la déstructuration des sarcomères (Huang and Forsberg, 1998, Hasselgren and Fischer, 2001, Attaix *et al.*, 2005).

1.4. Voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie musculaire

Les différentes voies de signalisation régulant la masse musculaire vont réguler :

- la synthèse protéique en agissant sur la formation du complexe initiateur de la traduction et sur la stabilité des ARNm,
- la dégradation protéique en activant majoritairement le système UPS,
- la régénération des fibres musculaires.

1.4.1. Voie Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt

La voie PI3Kinase/Akt joue un rôle central dans la régulation de la masse musculaire. Son activation permet à la fois de stimuler la synthèse protéique en activant la traduction et de prévenir la dégradation protéique en inhibant l'expression des acteurs du système ubiquitine protéasome, UPS (Frost *et al.* , 2007) (figure 6). La voie PI3K/Akt favorise donc le développement de l'hypertrophie musculaire et est activée par différents facteurs anaboliques tels que les facteurs de croissance, les nutriments ainsi que l'activité musculaire (Rommel *et al.* , 2001, Sakamoto *et al.* , 2002, Vary and Lynch, 2006). Parmi ces facteurs, le plus puissant inducteur de la voie PI3K/Akt est le facteur de croissance IGF-1. L'IGF-1 est très étudié dans le muscle pour ses effets hypertrophiants. La perfusion locale d'IGF-1 dans le muscle induit une forte hypertrophie (Adams and McCue, 1998). D'autre part la surexpression spécifiquement musculaire d'IGF-1 dans des souris induit une hypertrophie et rétablit la fonction musculaire dans des modèles de souris atteintes de dystrophie de Duchenne (Pari and St Jeor, 1990, Gregorevic *et al.* , 2002, Schertzer *et al.* , 2006).

IGF-1 possède une homologie structurale avec l'insuline, il peut donc se fixer sur son propre récepteur ou sur le récepteur de l'insuline, il facilite la captation du glucose et des acides gras libres, il augmente la synthèse et diminue la dégradation protéique (Stewart and Rotwein, 1996, Kooijman, 2006, Nindl and Pierce, 2010). L'IGF-1 est sécrété par le foie après fixation sur les récepteurs hépatiques d'hormones de croissance (Hong and Forsberg, 1994). Il circule principalement sous forme complexée aux protéines IGF-Binding Proteins (IGFBPs) (Ohlsson *et al.* , 2009). Son expression est régulée par de nombreux signaux (testostérone, exercice, hormone de croissance) et inhibée par les glucocorticoïdes et les cytokines pro-inflammatoires.

Le muscle secrète également une forme d'IGF-1 qui a beaucoup moins d'affinité pour les protéines IGFBPs réduisant ainsi ses capacités endocrines (Duan and Xu, 2005, Laviola *et al.* , 2007). L'IGF-1 secrété par le muscle a donc une action essentiellement autocrine/paracrine. Comme les formes circulantes d'IGF-1 ne sont pas impliquées dans l'hypertrophie induite par l'exercice (DeVol *et al.* , 1990, Walker *et al.* , 2004), l'hypertrophie musculaire associée à l'exercice physique et l'IGF-1, est donc due à la production locale d'IGF-1 permettant de cibler le muscle sollicité.

La PI3K, activée en réponse à la fixation d'IGF-1 sur son récepteur ou sur le récepteur à l'insuline, phosphoryle le phospholipide membranaire phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) et permet ainsi le recrutement à la membrane et l'activation d'Akt.

Les deux effecteurs principaux des effets hypertrophiques de la voie PI3K/Akt sont la GSK3β et la kinase mTOR qui toutes deux contrôlent la synthèse protéique (figure 6).

La GSK3β bloque l'action du facteur d'initiation de la traduction eIF2B et est inhibée par Akt, activent ainsi la synthèse protéique. L'expression d'un dominant négatif de GSK3β induit une hypertrophie marquée (Welsh *et al.*, 1998, Rommel *et al.*, 2001, Cohen and Goedert, 2004).

La kinase mTOR stimule la traduction des protéines, d'une part en inhibant le répresseur du facteur d'initiation eIF4E, 4E-BP1, et d'autre part en activant la kinase des protéines ribosomales S6, la P70S6K (Bodine *et al.* , 2001, Weigl, 2012). La phosphoprotéine inhibitrice 4E-BP1, sous forme hypophosphorylée, se fixe à eIF4E et empêche le recrutement et l'assemblage du complexe eIF4F. La phosphorylation de 4EBP1 par mTOR et sa dissociation d'eIF4E, augmente fortement la formation du complexe eIF4F et ainsi la synthèse protéique (Weigl, 2012). D'autre part, la phosphorylation de S6K1 par mTOR permet l'activation par phosphorylation de multiples protéines impliquées dans l'initiation de la traduction comme eIF4A et eIF4B (Weigl, 2012) (figure 6).

En plus de contrôler la traduction, Akt bloque la dégradation des protéines musculaires par le système ubiquitine/protéasome et bloque l'activation du système autophagique lysosomal. L'étude du profil génique de différents modèles d'atrophie met en évidence deux gènes codant pour les ubiquitine ligases Atrogin-1 et MuRF-1, fortement exprimés dans les muscles atrophiques (Glass, 2010). De plus, le KO de ces deux atrogènes

rend les souris transgéniques résistantes à l'atrophie musculaire induite par dénervation. MuRF1 et Atrogin-1 apparaissent comme responsables de la dégradation des protéines myofibrillaires par le système UPS. Leur expression en situation d'atrophie musculaire est ainsi inhibée par un traitement à l'IGF-1 ou une surexpression d'Akt (Stitt *et al.* , 2004, Lang *et al.* , 2007). Le mécanisme par lequel Akt contrôle l'expression des atrogènes implique les facteurs de transcription FOXO (Sandri *et al.* , 2004). *In vivo*, FOXO3 suffit à induire l'expression de MuRF-1 et Atrogin-1, et provoque l'atrophie lorsqu'il est transfecté dans un muscle squelettique (Sandri *et al.*, 2004, van der Vos and Coffer, 2011). Akt inhibe l'activité de FOXO par phosphorylation, provoquant son exclusion du noyau et l'inhibition de l'expression des atrogènes. Akt inhibe ainsi la dégradation des protéines myofibrillaires (figure 6).

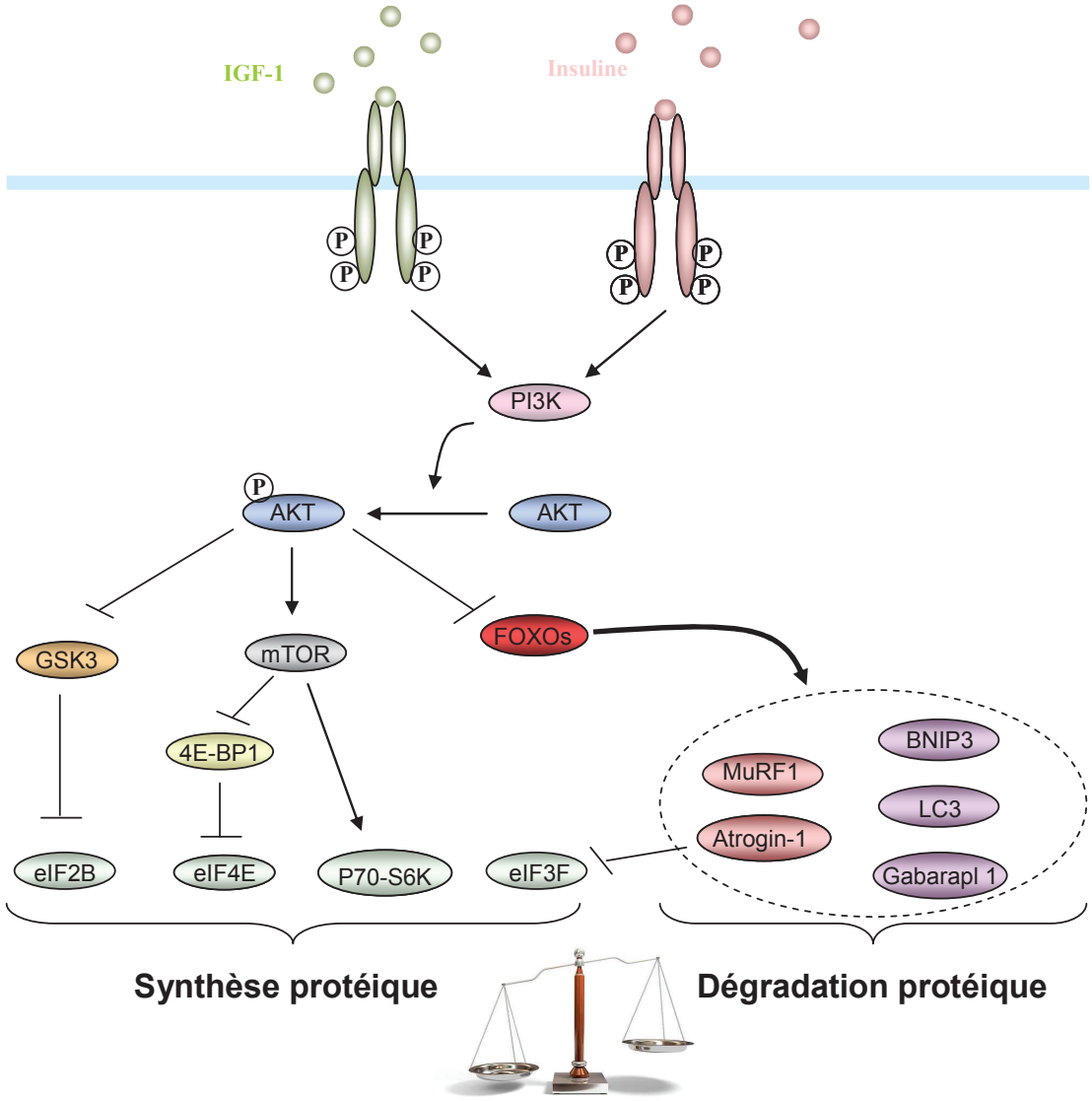


Figure 6 : Implication de la voie PI3Kinase-Akt dans la régulation de la masse musculaire

1.4.2. Voie Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK)

Les MAPK sont des protéines ubiquitaires qui en réponse à divers stimuli vont réguler plusieurs mécanismes cellulaires fondamentaux comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'inflammation et l'adaptation à des stress environnementaux (Widegren *et al.* , 2001). La voie MAPK regroupe plusieurs cascades de signalisation conduisant à des réponses cellulaires adaptées, les deux principales voies étant celles impliquant les Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) et la Stress-Activated Protein Kinase SAPK2/p38 (Kyriakis and Avruch, 2012) (figure 7). De nombreux facteurs, dont la disponibilité est affectée par l'exercice ou encore par le statut énergétique, vont moduler ces voies. Parmi ces facteurs on retrouve les facteurs de croissance, les cytokines, la calcinémie intracellulaire ou encore l'hypoxie (Widegren *et al.*, 2001, Shaw and Cantley, 2006). Ces deux grandes voies de signalisation vont agir en coopération pour réguler la synthèse protéique, la dégradation protéique et la régénération musculaire (figure 7).

Dans le muscle squelettique, l'exercice module l'activité et/ou la quantité des kinases ERK et p38 (Widegren *et al.*, 2001). L'activité kinase d'ERK1/2 augmente rapidement dans le muscle sollicité et retourne rapidement à l'état basal après l'arrêt de l'exercice. La phosphorylation de p38 par l'exercice est observée dans tous les muscles squelettiques. Ainsi, l'activation de p38 semble être due à des facteurs systémiques (Widegren *et al.*, 2001).

La modulation de l'activité de ces kinases permet l'adaptation du muscle à l'exercice. L'expression d'ERK1/2 est également augmentée dans le muscle squelettique de souris soumises à un régime enrichi en lipides (Fatani *et al.* , 2012)

L'activation de la voie p38 *in vivo* et *in vitro,* augmente l'expression des gènes de l'autophagie Atg 6/7/12 et augmente l'expression des atrogènes MuRF1 et Atrogin-1, *via* la diminution de la phosporylation de FOXO3 (Li *et al.* , 2005, Jin and Li, 2007, Kim *et al.* , 2009, McClung *et al.* , 2010). Par conséquent, l'activation de la voie p38 augmente la dégradation protéique.

Au contraire, la cascade ERK 1/2 diminue l'activité transcriptionnelle de FOXO3 par phosphorylation inhibant ainsi l'expression des atrogènes et de la voie lysosomale (Yang *et al.* , 2008, van der Vos and Coffer, 2011) (figure 7).

La cascade de signalisation ERK, notamment activée par l'IGF1, active par phosphorylation les membres de la famille des p90RSK et des Mitogen-activated protein

kinases activate the serine/threonine kinases 1/2 (Mnk 1/2) qui sont des kinases capable d'activer les facteurs de l'initiation de la traduction eIF4B, eIF4E, eIF4G et eEf2K.
L'activation de la voie ERK va donc conduire à une augmentation de la synthèse protéique.

La cascade p38MAPK, activée notamment par les cytokines, va activer les protéines MAPK-activated Protein Kinase-2 (MK2). Les MK2 vont phosphoryler et ainsi moduler l'activité des AU-rich element binding proteins comme les TrisTetraProlines (TTPs) ou encore les Heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins (hnRNPs) (figure 7). Comme leurs noms l'indiquent, les ARE-BPs vont se fixer sur les séquences AU-rich element d'ARNm, ces motifs sont notamment retrouvés dans les régions 3' UnTranslated Region (3'UTR) de nombreuses protéines pro inflammatoire comme IL2, IL10, IFNγ ou encore le TNFα (Dean *et al.* , 2004, Ronkina *et al.* , 2010). Les mécanismes ne sont pas entièrement décryptés mais globalement la phosphorylation des ARE-BP, par MK2, va permettre la dissociation des ARE-BPs de l'ARNm qui pourra ensuite être traduit en protéine (Dean *et al.*, 2004, Ronkina *et al.*, 2010). L'activation de cette voie par les cytokines permet d'entretenir l'état inflammatoire en favorisant la synthèse de cytokines.

La voie p38MAPK est également un régulateur important de la myogenèse et donc de la régénération dans la fibre différenciée (Keren *et al.* , 2006, Lluis *et al.* , 2006) (figure 7). Les capacités régénératives du muscle adulte passent notamment par l'activation des cellules satellites et leur fusion aux fibres existantes. La voie p38MAPK active la différenciation des cellules satellites et augmente la transcription des gènes musculaires en augmentant l'activité transcriptionnelle de MYOD1 et de Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) (Keren *et al.*, 2006, Lluis *et al.*, 2006). Cependant, *in vitro*, p38MAPK inhibe l'activité transcriptionnelle de Myogenic Regulatory Factor 4 (MRF4) qui intervient dans le dernier stade de la différenciation (Weston *et al.* , 2003, Suelves *et al.* , 2004).

Ainsi la voie p38MAPK a également un rôle important dans la régulation de la myogenèse.

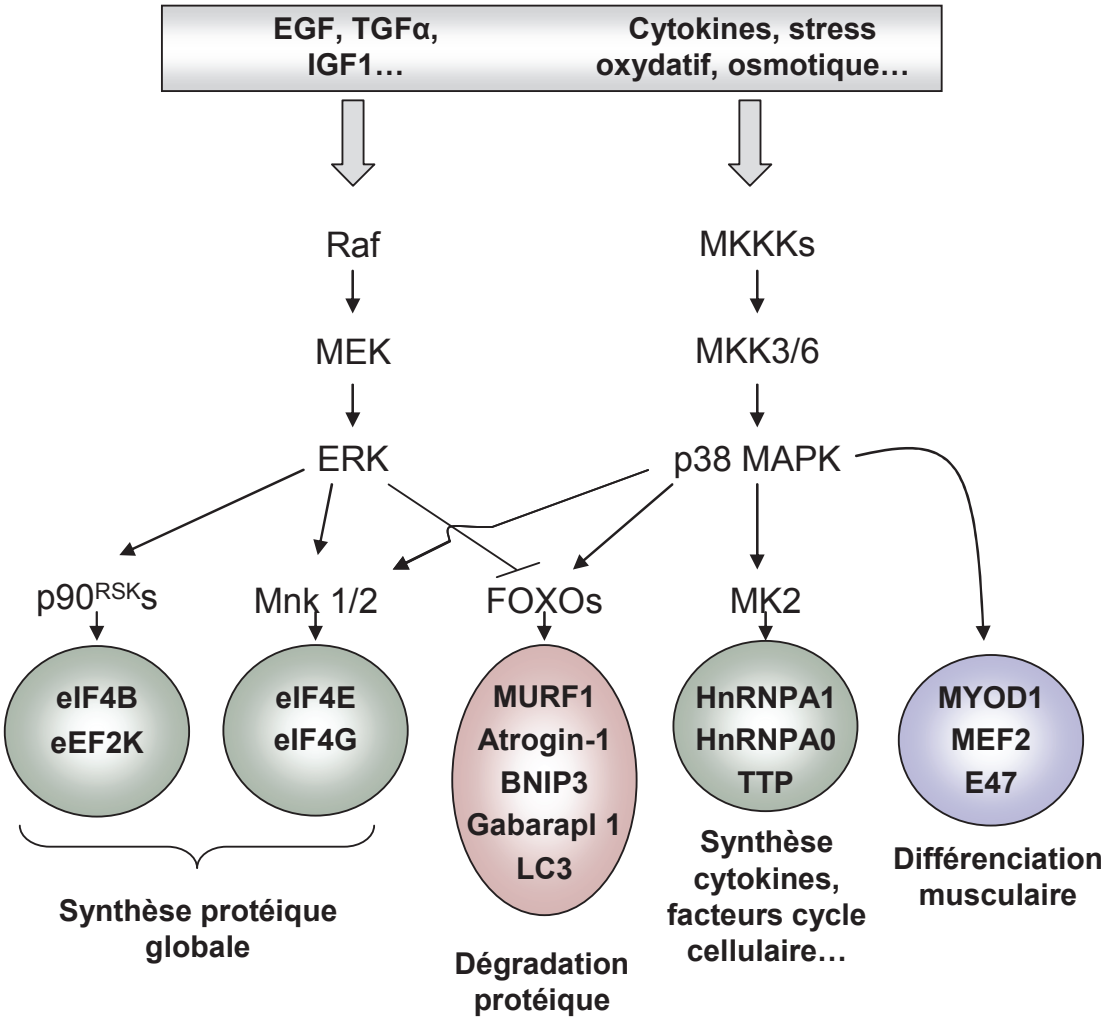


Figure 7 : Régulation de la masse musculaire par les voies p38MAPK et ERK.

1.4.3. Voie Nuclear Factor-kappa B (NFκB)

Les NFκB représentent une famille de cinq facteurs de transcription qui peuvent être différenciés en deux groupes. Le premier groupe inclue RelA (p65), RelB et c-Rel, qui sont synthétisés sous forme mature et caractérisés par la présence du domaine N-terminal Rel homology (RHD) essentiel pour la dimérisation permettant sa fixation à l'ADN et ainsi la modulation de l'expression de ses gènes cibles. Le deuxième groupe comprend NFκB1 (p50) et NFκB2 (p52), ces protéines étant synthétisées sous forme de précurseurs : respectivement p105 et p100. Différents membres de la famille NFκB se dimérisent pour permettre leur fixation à l'ADN. Avant activation, la plupart des dimères NFκB sont retenus dans le cytoplasme par leur fixation avec les Inhibiteurs NFκB (IκBs). Il existe 7 IκBs chez les mammifères, IκBα, IκBβ, IκBeps, IκBγ, Bcl3, et les précurseurs p100 et p105. L'interaction d'IκBs avec les membres NFκB masque le domaine de localisation nucléaire du complexe

NFκB, empêchant ainsi la translocation du complexe dans le noyau et maintient le complexe dans le cytoplasme sous forme inactive (Hayden and Ghosh, 2004, 2008). La voie NFκB est activée par de nombreux stimuli, des infections virales et bactériennes, des cytokines, des mitogènes, des facteurs de croissance ou encore des stress oxydatif et biomécaniques (Kumar *et al.* , 2004).

La voie classique NFκB, activée par le TNFα, fait intervenir les complexe IκB Kinase β et γ (IKKβ et γ) (figure 8). Une fois activés, ces complexes permettent la phosphorylation des inhibiteurs IκBs qui pourront alors être dégradés libérant l'hétérodimère actif.

La voie alternative fait intervenir le complexe IKKα. Une fois activé, ce complexe permet la phosphorylation du précurseur p100 permettant son clivage et la libération de la forme active p52 (Li and Verma, 2002, Aggarwal, 2003, Hayden and Ghosh, 2008).

Ces deux voies sont activées dans le muscle selon les stimuli, et leur activation peut induire une atrophie musculaire en augmentant l'expression de plusieurs composants du système UPS, l'expression de protéines pro-inflammatoires et en interférant avec le processus de myogenèse, empêchant ainsi la régénération des muscles atrophiés.

Plusieurs études rapportent que la voie NFκB active l'expression de protéines du système UPS. La génération de souris transgéniques possédant une forme constitutivement active de IKKβ induit une augmentation drastique de l'atrogène MuRF1 accompagnée d'une forte atrophie musculaire (Cai *et al.* , 2004). Lorsque ces souris constitutivement actives pour IKKβ sont croisées avec des souris Knock Out (KO) MuRF1, les descendants sont en partie protégés de l'atrophie musculaire. À l'inverse, la délétion d'IKKβ spécifiquement dans le muscle diminue fortement l'expression de MuRF1 et l'atrophie musculaire en réponse à la dénervation (Mourkioti *et al.* , 2006).

L'activation de la voie NFκB régule également l'expression de protéines pro-inflammatoires comme les cytokines, les chémokines et les molécules d'adhésion cellulaire. Parmi elles, certaines sont également des activateurs de la voie NFκB, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif (Kumar *et al.*, 2004). Des études montrent que la délétion spécifique d'IKKβ bloque la régénération musculaire en limitant la réponse inflammatoire (Mourkioti *et al.*, 2006).

Le modèle d'inactivité physique par décharge des membres postérieurs de souris entraîne une forte perte de masse musculaire ainsi qu'une augmentation de l'activité NFκB. L'analyse des complexes NFκB/ADN a mis en évidence la présence de p50, c-Rel et Bcl-3 (Hunter *et al.* , 2002). Ces protéines font partie de la voie classique NFκB qui est généralement activée en réponse aux cytokines. L'atrophie musculaire induite par l'immobilisation est prévenue chez des souris KO pour p50 ou Bcl3 (Hunter and Kandarian, 2004, Judge *et al.* , 2007). Par contre, l'induction de l'atrophie par l'immobilisation n'est pas prévenue chez des souris KO pour le gène c-Rel. Ainsi, dans ce modèle d'atrophie musculaire, p50 et Bcl3 sont les composants majeurs de l'activation de la voie NFκB.

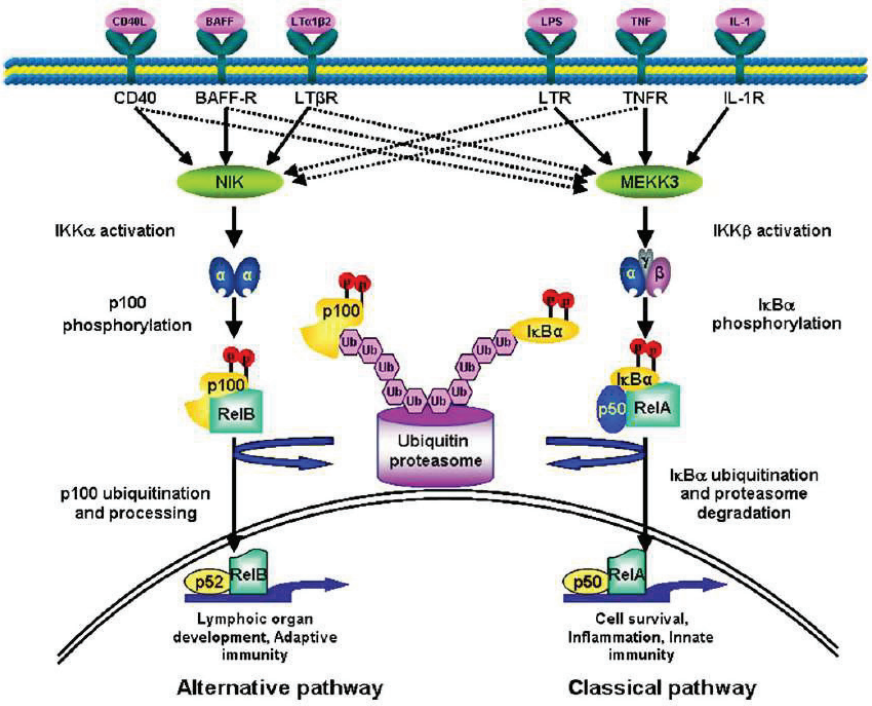


Figure 8 : Représentation schématique de la voie de signalisation NFκB.

D'après Murton et al. 2008.

1.4.4. Voie myostatine

La myostatine ou Growth Differentiation Factor-8 (GDF-8) est un régulateur négatif de la masse musculaire. Cette cytokine spécifiquement musculaire a été découverte en 1997 en identifiant une mutation du gène de la myostatine chez les bœufs « Belgian blue » responsable de leur phénotype hypermusclé (Kambadur *et al.* , 1997, McPherron *et al.* , 1997, McPherron and Lee, 1997). Ils ont ensuite confirmé chez la souris que l'invalidation du gène de la myostatine reproduit le phénotype hypermusclé (McPherron *et al.*, 1997).

L'expression de cette protéine est augmentée dans les cas de sarcopénie, d'atrophie induite par les glucocorticoïdes, de privation et est diminuée lors d'entraînement physique (Yarasheski *et al.* , 2002, Ma *et al.* , 2003, Matsakas *et al.* , 2005, Allen *et al.* , 2010).

La myostatine est synthétisée sous forme de précurseur, son activation va nécessiter deux clivages protéolytiques libérant un propeptide et une partie C-terminale. Cette dernière s'homodimérise pour donner la forme mature de la myostatine (Lee, 2004) (figure 9).

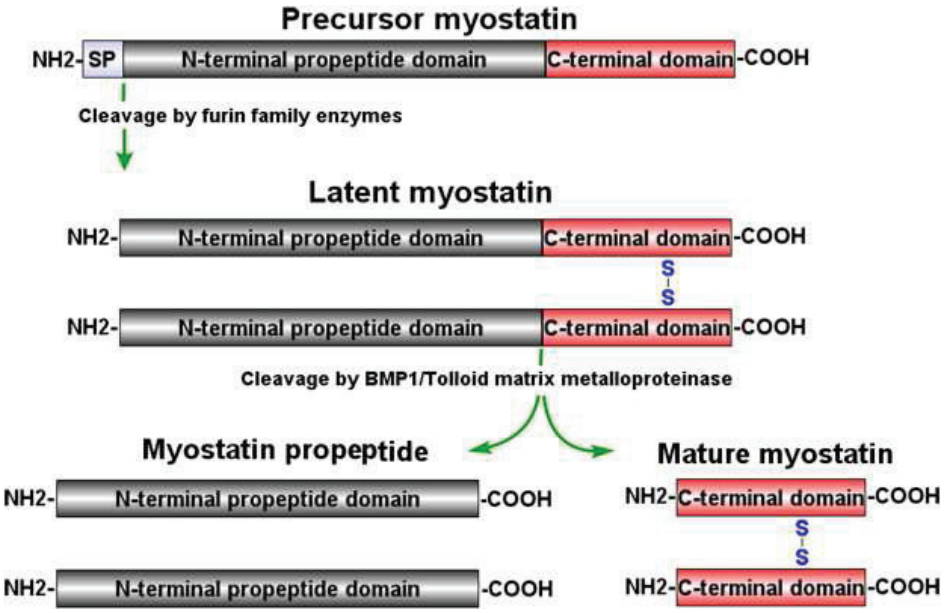


Figure 9 : Processus de maturation de la myostatine.

D'après Huang et al. 2011

La myostatine circule dans le sang sous forme de précurseur, sous forme active (libre) ou complexée à des protéines modulatrices de son activité (follistatine, son propre propeptide ou encore la G-protein coupled receptor Associated Sorting Protein 1 GASP-1) (Hill *et al.* ,

2002, Hill *et al.* , 2003). Au regard de ses effets anti anaboliques, l'expression, la maturation et l'activité de la myostatine est extrêmement régulée.

La fixation de la myostatine sur son récepteur Activine IIA/IIB va conduire à l'activation par phosphorylation de Smad2/3 et à sa translocation dans le noyau une fois complexé à Smad4. Ce complexe va notamment réprimer la différenciation musculaire en inhibant l'expression de MYOD1, MYogenic Factor 5 (MYF5) et MYOGénine (MYOG) (Langley *et al.* , 2002, McFarlane *et al.* , 2006).

La fixation de la myostatine sur ses récepteurs va également agir sur les voies MAPK et IGF1 (Elkina *et al.* , 2011) (figure 10).

L'activation de la voie p38 MAPK conduit à l'augmentation de la dégradation protéique et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Li *et al.*, 2005, Jin and Li, 2007). De plus, les effets bénéfiques de l'activation de la voie p38MAPK sur la différenciation musculaire, en augmentant l'activité transcriptionnelle des MRFs, sont abolies puisque la myostatine inhibe l'expression des MRFs *via* la voie des Smads (Langley *et al.*, 2002) (figure 10). La fixation de la myostatine active également la voie ERK1/2. Les travaux de Yang *et al*. 2006 montrent que dans des C2C12, l'administration de myostatine augmente la phosphorylation d'ERK1/2 *via* MAPK/ERK activity Kinase (MEK) ; et lorsque les myoblastes C2C12 sont traités avec un inhibiteur de MEK, ils démontrent que l'ajout de myostatine n'inhibe plus la différenciation (Yang *et al.* , 2006). Par conséquent, cette étude suggère que l'inhibition de la différenciation musculaire par la myostatine est due au moins en partie à l'activation de la voie MEK/ERK (Yang *et al.*, 2006).

Le traitement de myotubes humains avec de la myostatine diminue la phosphorylation d'Akt (McFarlane *et al.*, 2006). Au contraire, la mutation délétère de la myostatine *in vivo* et *in vitro* induit une augmentation de la phosphorylation d'Akt et donc une augmentation de son activité (Morissette *et al.* , 2009, Lipina *et al.* , 2010). Ainsi, *via* l'inhibition de l'activité Akt, la myostatine augmente la dégradation protéique et diminue la synthèse protéique.

Ainsi la myostatine, en modulant les grandes voies de régulation de la masse musculaire, inhibe la synthèse protéique, la myogenèse et augmente la dégradation protéique (McPherron *et al.*, 1997, Elkina *et al.*, 2011) (figure 10).

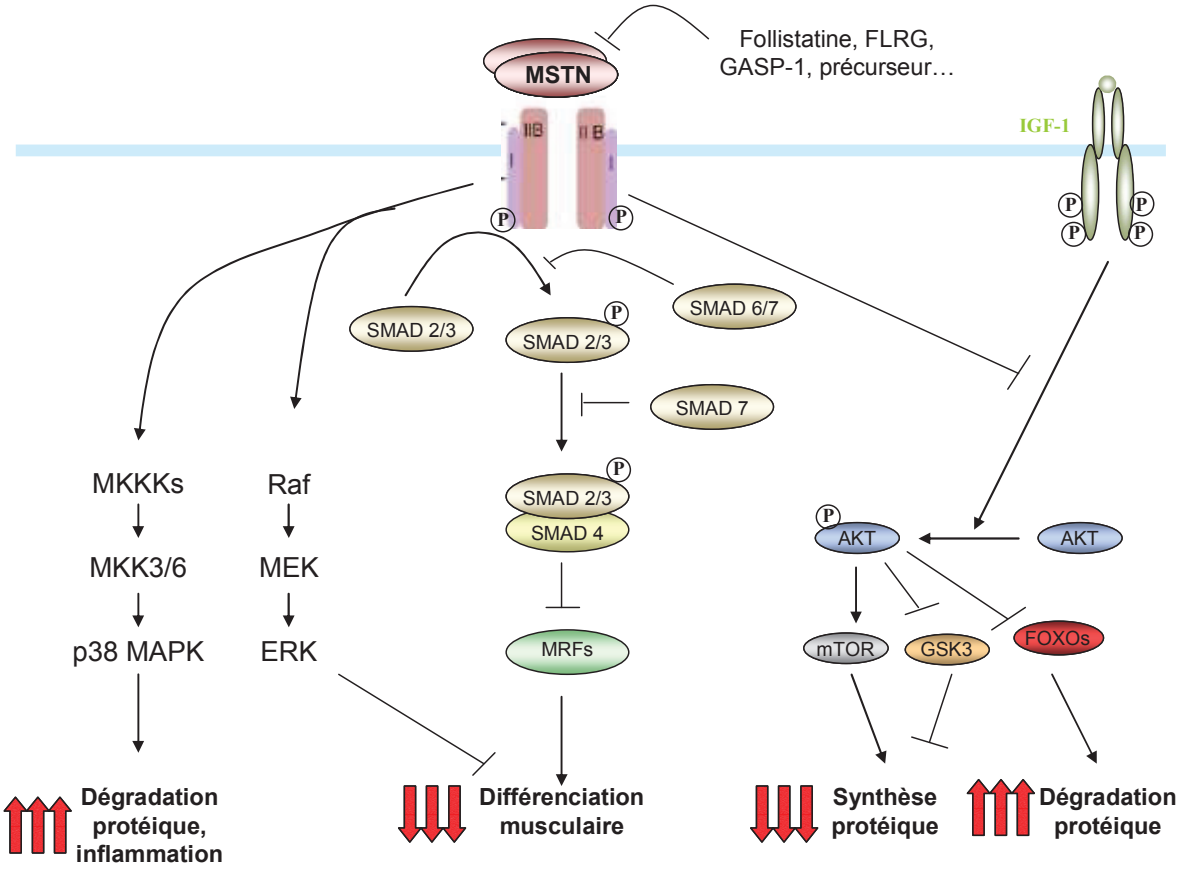


Figure 10 : Les différentes voies d'action de la myostatine.

D'après Elkina et al. 2011.

1.4.5. Le rôle des MRFs dans la fibre adulte

La persistance de l'expression des MRFs dans le muscle squelettique adulte, même à de faibles niveaux pour MYOD1, Myf5 et MYOG, suggère qu'ils continuent de moduler l'expression des gènes muscle-spécifiques et pourraient contribuer à la plasticité musculaire (Walters *et al.* , 2000, Hespel *et al.* , 2001). Des expériences menées sur des modèles animaux prouvent leur implication dans les processus de catabolisme et d'anabolisme musculaire (Favier *et al.* , 2008, Legerlotz and Smith, 2008).

Les MRFs régulent l'expression des protéines sarcomériques telles que la titine, très longue protéine, servant de matrice à la formation des filaments de myosine, les troponines I, C et T, permettant la régulation de la contraction musculaire par le calcium, la nébuline, assurant la stabilité des filaments d'actine, ou la desmine, assurant la stabilité du sarcomère lors de la contraction (Clark *et al.* , 2002). Ainsi, MYOD1 régule l'expression des gènes codant pour les chaînes légères de la myosine, la desmine, les troponines I mais également la

créatine kinase et plusieurs sous-unités du récepteur à l'acétyle-choline (Piette *et al.* , 1990, Lin *et al.* , 1991, Wentworth *et al.* , 1991, Li and Capetanaki, 1993).

L'augmentation de la charge musculaire est bien connue pour induire l'hypertrophie. Bien que ces données soient controversées, l'expression de MYOD1, MRF4 et MYOG est augmentée au cours de ce modèle d'hypertrophie, avec toutefois des différences selon le type de muscle étudié, le protocole expérimental et sa durée (Loughna and Brownson, 1996, Carson and Booth, 1998, Lowe *et al.* , 1998, Haddad and Adams, 2006, Bamman *et al.* , 2007). L'expression de MYOD1 apparaît très sensible au stress mécanique et à la contraction musculaire ; très basse dans le muscle au repos, elle augmente dans les 24h suivant un exercice d'endurance comme de résistance (Yang *et al.* , 2005). La myogénine, elle aussi, voit son expression stimulée par l'exercice, et l'expression de MRF4 est induite par une supplémentation orale en créatine, favorisant l'hypertrophie musculaire (Adams *et al.* , 1999, Hespel *et al.*, 2001). L'élévation de l'expression des MRFs au cours de la prise de masse musculaire pourrait s'expliquer exclusivement par l'activation des cellules satellites participant à l'hypertrophie. Cependant, lorsque les cellules satellites sont détruites par irradiation γ, l'expression des MRFs dans les fibres musculaires n'est pas altérée et l'exercice induit encore une hypertrophie musculaire (Lowe and Alway, 1999). Au cours du processus hypertrophique, l'expression des MRFs est donc bien induite au sein des noyaux des fibres musculaires et participe à la prise de masse musculaire en régulant l'expression des protéines sarcomériques.

Les MRFs modulent la masse musculaire en régulant la régénération musculaire par différenciation et recrutement des cellules satellites aux fibres existantes et en régulant la synthèse des protéines musculaires dans la fibre différenciée (Ishido *et al.* , 2004).

2. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SREBP-1

2.1. Généralités

Ces facteurs de transcription ont été découverts en 1993 par deux équipes différentes. L'équipe de Bruce Spriegelman identifie une protéine de la famille des basic Helix Loop Helix (bHLH) dont l'expression est modulée au cours de la détermination et de la différentiation des cellules adipocitaires. Cette protéine est capable d'activer un des gènes clés de l'adipogenèse, la Fatty Acyl Synthase (FAS) (Tontonoz *et al.* , 1993).

L'équipe de Joe Goldstein et Mike Brown mit en évidence un motif de 10pb sur le promoteur du gène du récepteur aux Low Density Lipoprotein (LDL) responsable de sa régulation transcriptionnelle par les stérols désignés Sterol Response Element (SRE). Ils ont ensuite purifié la protéine se fixant sur ce motif et l'ont appelé Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP) (Briggs *et al.* , 1993).

Par la suite, trois membres de la famille SREBP ont été identifiés : SREBP-1a et SREBP-1c codées par un même gène SREBF1, et SREBP-2 codée par le gène SREBF2 (Hua *et al.* , 1995b). Les deux isoformes de SREBP-1, 1a et 1c, sont issues d'un épissage alternatif et leur expression peut être modulée indépendamment l'une de l'autre puisque le gène contient deux promoteurs distincts (Hua *et al.*, 1995b, Shimomura *et al.* , 1997).

Ces facteurs de transcription, impliqués dans la synthèse du cholestérol et des acides gras, sont exprimés dans la plupart des tissus. SREBP-1c, isoforme régulée par le statut nutritionnel, est abondamment exprimée dans le foie, le tissu adipeux et le cerveau. Elle est également exprimée à un niveau plus faible dans les muscles. Comparativement, SREBP-1a est plus faiblement exprimée, mais de façon ubiquitaire dans tous les tissus (Raghow *et al.* , 2008).

2.2. Les SREBPs : une sous famille des bHLH

La famille HLH a été identifiée par le clonage et l'analyse des protéines E12 et E47 qui se dimérisent et se fixent aux séquences promotrices grâce au domaine Helix Loop Helix (HLH) (Murre *et al.* , 1989). De nombreux facteurs de transcription HLH possèdent

également un domaine basique du coté de l'hélice N-terminale formant la famille bHLH, et certains possèdent un motif leucine zipper du côté C-terminal participant à la dimérisation formant la famille bHLH-Leucine Zipper (bHLH-LZ) (Simionato *et al.* , 2007). Le domaine basique permet la reconnaissance d'un site palindromique de fixation à l'ADN appelé E-Box 5'-CANNTG-3'. Chaque membre de la famille bHLH va avoir une affinité particulière pour la séquence E-box suivant les nucléotides centraux (Murre *et al.* , 1994).

Les trois protéines SREBPs forment une famille à part entière pour leur particularité à moduler l'expression de gènes cibles en se fixant sur les motifs SRE et pour leur synthèse sous forme de précurseur inactif accroché à la membrane du réticulum endoplasmique (Sato, 2010).

Les facteurs de transcription SREBPs font partie d'une sous famille des bHLH-LZ. La comparaison par alignement de séquences des SREBPs avec d'autres protéines bHLH-LZ, a mis en évidence la présence d'une tyrosine à la place d'une arginine chez les autres bHLH-LZ (Kim *et al.* , 1995). La présence de cette tyrosine permet aux protéines SREBPs de fixer sous forme de dimère, *in vitro*, non seulement, les sites E-box de fixation à l'ADN, mais également les motifs SRE 5'-ATCACCCCAC-3' (Kim *et al.*, 1995). Ces sites SRE ont été identifiés en premier sur le promoteur du récepteur LDL, par des études de mutation de la séquence promotrice modifiant l'affinité de fixation de SREBP-1 (Dawson *et al.* , 1988, Briggs *et al.*, 1993). Plusieurs autres motifs plus ou moins proches du consensus SRE ont été identifiés par la suite sur les séquences promotrices de gènes régulés par SREBP (Smith *et al.* , 1990, Edwards *et al.* , 2000, Osborne, 2000) (tableau 2). La capacité des protéines SREBPs à fixer ces séquences SRE est une des deux spécificités justifiant leur appartenance à cette sous famille bHLH-LZ.

Motifs de liaison des protéines SREBP	Séquence 5'-3'	Gènes identifiés avec le consensus fonctionnel
SRE-1	ATCACCCCAC	HMG-coA synthase et réductase, récepteur au LDL, FAS
E-Box	CANNTG	L-PK, S-14
SRE-3	CTCACACGAG	FPP
SRE-like	TCAGGCTAG	ACL
SRE (région avec 2 sites SRE palindromiques)	TCACCC	ACC2, ME

Tableau 2 : Sites consensus de liaison à l'ADN des facteurs de transcription SREBP.

Leur deuxième spécificité est leur synthèse sous la forme de précurseurs inactifs liés à la membrane du réticulum endoplasmique.

Chaque précurseur inactif de SREBP est organisé en trois domaines :

- un domaine N-terminal de 480 acides aminés, comprenant le domaine de transactivation, une région riche en sérine et proline, et le motif bHLH-LZ, domaine de dimérisation et de fixation à l'ADN (Sato *et al.* , 1994).
- un domaine intermédiaire en forme d'épingle à cheveux constitué de deux segments transmembranaires hydrophobiques interrompus par une courte boucle de 30 acides aminés située dans la lumière du réticulum endoplasmique (Hua *et al.* , 1995a).
- un domaine C-terminal de 590 acides aminés, impliqué dans la régulation de la maturation de SREBP par les stérols (figure 11).

Le domaine N-terminal correspond à la forme mature active appelée aussi forme nucléaire.

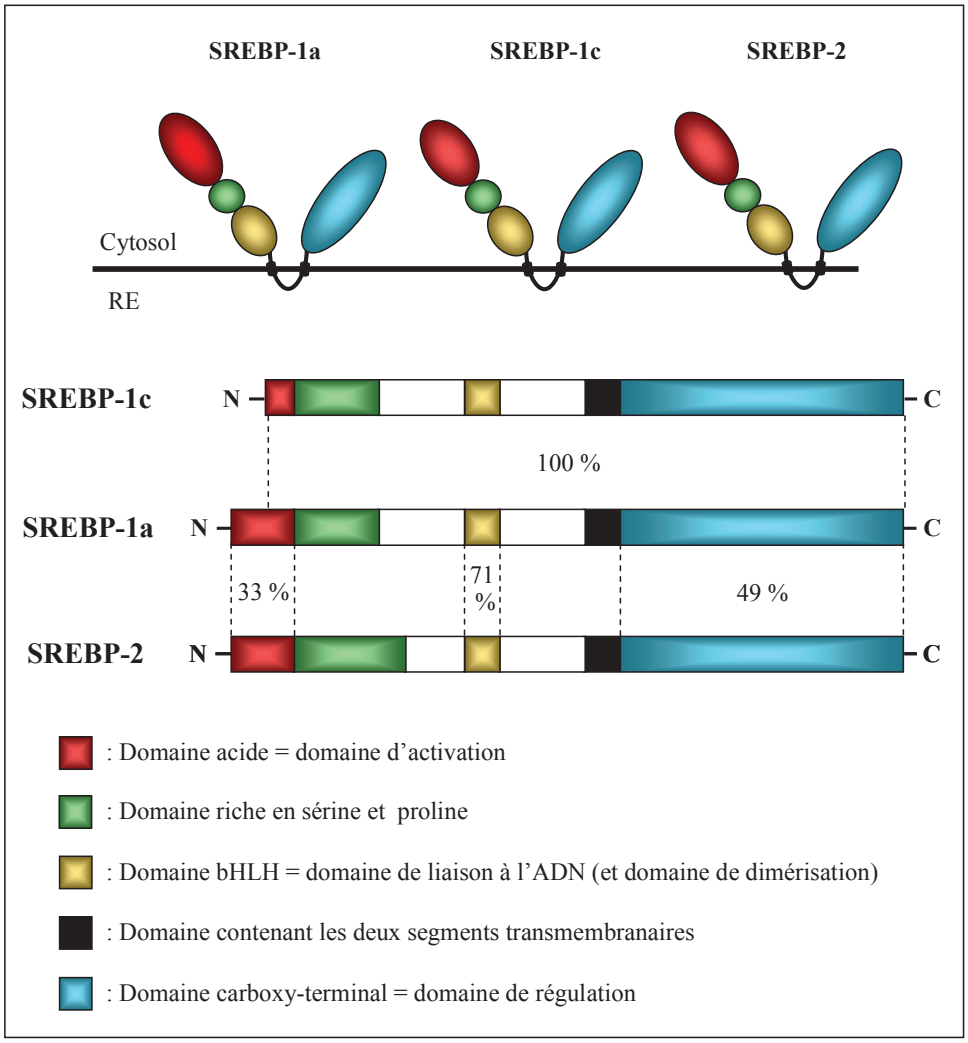


Figure 11 : Représentation schématique de la structure des protéines SREBPs et de leur homologie.

D'après Schimano, 2001.

2.3. Maturation des facteurs de transcription SREBP-1

Les protéines SREBPs sont synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs liés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) où le domaine C-terminal de SREBP interagit avec la protéine SREBP cleavage-activating protein (SCAP). Ce complexe est ensuite reconnu par les vésicules COPII, permettant le transport de SCAP- SREBP du RE vers l'appareil de golgi (Yang *et al.* , 2002). Chez les mammifères, le complexe SCAP- SREBP est séquestré à la membrane du réticulum endoplasmique par les protéines Insulin-induced gene (INSIG) (Yang *et al.*, 2002). L'interaction d'INSIG avec SCAP prévient le transport du complexe SCAP-SREBP par COPII. Il y a deux protéines INSIG chez les mammifères, INSIG1 et 2, dont leur expression et leur interaction sont finement régulées (Horton *et al.* , 2003a, Yabe *et al.* , 2003) (figure 12).

Une fois transportée à la membrane de l'appareil de Golgi, la forme mature de SREBP est libérée suite à un clivage protéolytique en deux étapes (Wang *et al.* , 1994, Sakai *et al.* , 1996). Le premier clivage par la sérine protéase Site-1 Protease (S1P) a lieu dans la boucle hydrophile. Ce clivage sépare SREBP en deux fragments qui restent ancrés à la membrane du Golgi (Duncan *et al.* , 1997). Le deuxième clivage est catalysé par la sérine protéase Site-2 Protease (S2P) au niveau du domaine N-terminal, libérant la forme nucléaire active (Duncan *et al.* , 1998) (figure 12).

Une fois libérés dans le cytoplasme, les facteurs de transcription SREBP-1 sont transportés dans le noyau. Le transport nucléo cytoplasmique du fragment N-terminal de SREBP-1, qui est la forme active des facteurs de transcription SREBP-1, est une étape cruciale de régulation de l'expression génique des cellules eucaryotes (Lee *et al.* , 2003). Le transport du cytoplasme vers le noyau des facteurs de transcription SREBP-2 se fait par l'interaction du domaine dimérisé HLH-LZ de SREBP2 avec la protéine importine-β (Lee *et al.*, 2003). Si seul le transport nucléaire de SREBP-2 a été aussi bien caractérisé, une étude montre que SREBP-1c est également transporté dans le noyau par interaction directe avec l'importine β (Guillemain *et al.* , 2004). De plus, la forte homologie entre les domaines bHLH-LZ des trois isoformes suggère un transport nucléaire identique.

La protéine SCAP fonctionne comme un senseur du niveau de cholestérol intramembranaire. Les stérols bloquent le complexe SCAP-SREBP dans la membrane du RE

par interaction directe sur le domaine N-terminal de SCAP au niveau d'un domaine Sterol-Sensing Domain (SSD) (Nohturfft *et al.* , 1998, Nohturfft *et al.* , 1999, Yang *et al.* , 2000). L'interaction des stérols avec SCAP induit un changement conformationnel, favorisant la liaison de SCAP avec les protéines INSIGs (Peng *et al.* , 1997, Yabe *et al.* , 2002, Adams *et al.* , 2003a, Feramisco *et al.* , 2005). En absence de cholestérol, SCAP subit un changement conformationnel induisant sa dissociation des protéines INSIGs, qui sont alors dégradées par ubiquitinilation par GP78. Le complexe SCAP-SREBP est alors incorporé au sein des vésicules COPII pour être transporté à la membrane de l'appareil de Golgi et suivre sa maturation (figure 12).

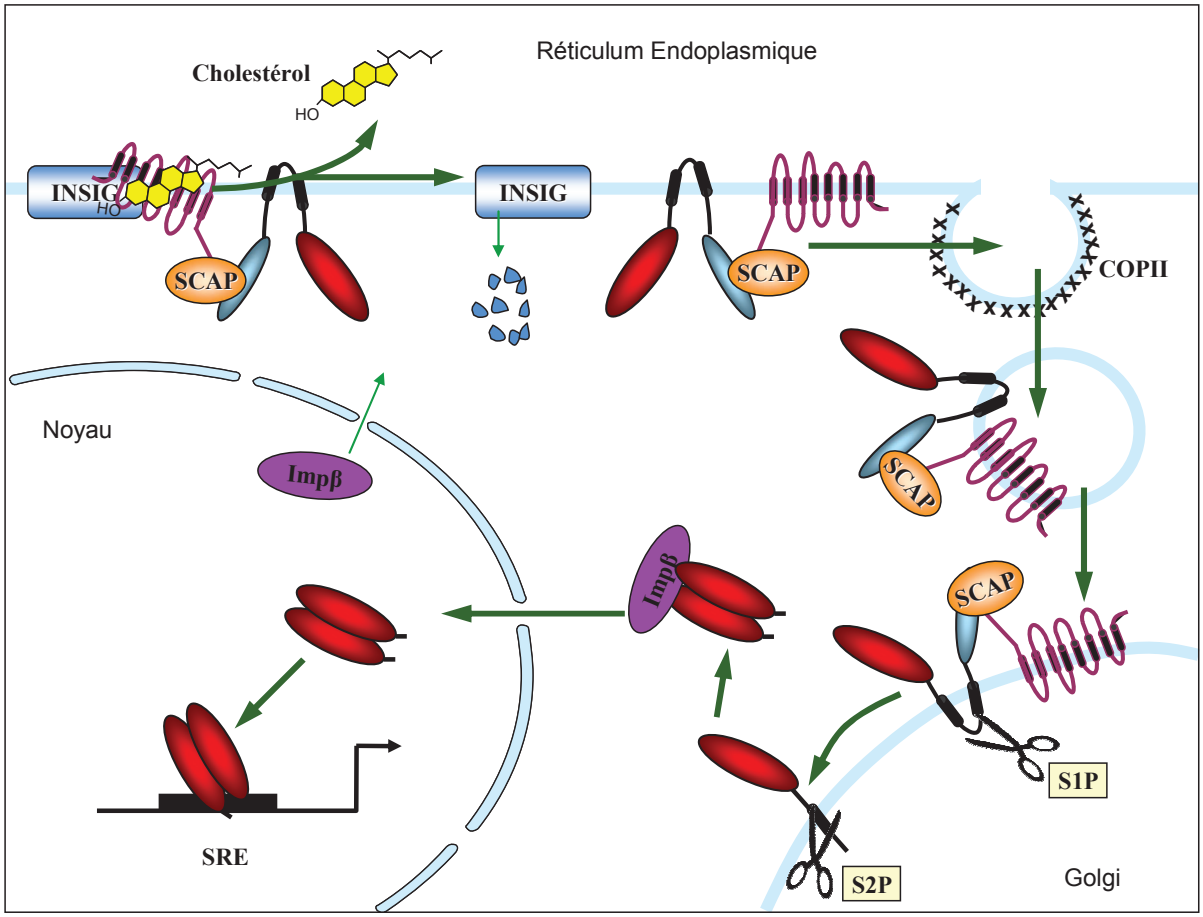


Figure 12 : Processus de maturation de SREBP-1 et régulation par les stérols

2.4. SREBP-1 est un régulateur clé du métabolisme lipidique

Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que les facteurs de transcription SREBP-1 sont fondamentalement impliqués dans l'homéostasie du cholestérol et la lipogenèse (Horton, 2002, Horton *et al.* , 2002b, a). Outre le récepteur au LDL, ils régulent l'expression de plus de trente gènes nécessaires à la synthèse endogène du cholestérol, des acides-gras, des triglycérides et des phospholipides (Horton *et al.*, 2003a). Exprimés de façon supra-physiologique, ils sont capables d'activer l'expression à la fois des enzymes lipogéniques et cholestérogéniques.

Cependant, malgré leur forte homologie, leur mécanisme commun de maturation et de reconnaissance à l'ADN, les isoformes 1a et 1c ont des fonctions spécifiques. Le développement de souris transgéniques a permis de démontrer les rôles respectifs de 1a et 1c (tableau 3).

Manipulation	Niveaux d'expression de SREBP	Synthèse de cholestérol	Synthèse d'acides gras	Foie	Plasma
souris KO					
SREBP-1	↓ 1a, ↓ 1c, ↑ 2	↑↑↑	↓ 40%	x 3 cholestérol	↓ cholestérol/triglycérides
SREBP-1c	↓ 1a, ↓ 1c, ↑ 2	↑	↓ 50%	x 3 cholestérol	↓ trigycérides
souris trangéniques					
SREBP-1a	↑ 1a	x 5	x 26	x 6 cholestérol	↓ cholestérol
				x 22 triglycérides	↓↓ triglycérides
SREBP-1c	↑ 1c		x 4	x 4 triglycérides	↓ triglycérides

↑ : augmentation ; ↑↑↑ : forte augmentation ; ↓ : diminution ; ↓↓ : forte diminution.

Tableau 3 : Altérations du métabolisme lipidique dans différents modèles de souris génétiquement modifiées pour SREBP-1.

Le KO de SREBP1 est partiellement létal, 15 à 45% des souris survivent. De façon surprenante, ces souris déficientes en SREBP-1a et/ou SREBP1c présentent une synthèse de cholestérol accrue, due à une augmentation compensatrice de SREBP-2 (Shimano *et al.* , 1997b).

Afin d'étudier le rôle respectif des isoformes SREBP-1a et 1c, des souris transgéniques surexprimant la forme nucléaire de SREBP-1a ou SREBP-1c ont été créées.

La surexpression de la forme nucléaire de SREBP-1a dans le foie des souris augmente l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol comme la 3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl-Co-enzyme A (HMG-CoA) synthase, la HMG-CoA réductase et la squalène synthase ; et les gènes impliqués dans la lipogenèse, notamment la FAS, la Stearoyl-CoA-Desaturase 1 (SCD1) et la Glycerol 3-Phosphate Acetyl Transferase (GPAT). L'activation préférentielle de la synthèse d'acides gras, 26 fois augmentée par rapport à celle du cholestérol, multipliée par quatre, provoque une accumulation très importante de triglycérides dans le foie de ces souris, entraînant une stéatose (Shimano *et al.* , 1996, Horton *et al.* , 2003b).

La surexpression de SREBP-1c induit une augmentation de la synthèse d'acides gras, mais n'a aucun effet sur la synthèse de cholestérol. SREBP-1c active l'expression des mêmes gènes lipogéniques que SREBP-1a, mais de façon plus faible. SREBP-1a est un activateur transcriptionnel plus puissant, grâce à son domaine transactivateur plus long, mais il est très faiblement exprimé dans les tissus. Cette observation suggère que SREBP-1a pourrait être responsable du maintien de l'activité basale de synthèse de cholestérol et d'acides gras (McPherson and Gauthier, 2004). SREBP-1c possède un domaine transactivateur moins puissant mais il est exprimé de façon plus forte dans les tissus et active de façon plus spécifique les gènes codant pour les enzymes de la lipogenèse. En plus des gènes lipogéniques, SREBP-1c est capable d'activer l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique comme la GlucoKinase (GK) dans le foie et l'HexoKinase II (HKII) dans le muscle squelettique (Foretz *et al.* , 1999, Gosmain *et al.* , 2004, Gosmain *et al.* , 2005).

Enfin, SREBP-1a et 1c activent l'expression de deux enzymes, l'ATP-citrate lyase et l'Acetyl CoA synthetase, impliquées dans la production d'Acetyl-CoA, précurseur des acides-gras et du cholestérol. SREBP -1c active également l'expression de gènes impliqués dans la génération du NADPH, cofacteur indispensable à la synthèse lipidique (Eberle *et al.* , 2004).

Ces différentes fonctions de SREBP-1a et SREBP-1c pourraient résulter d'une différence d'affinité pour les promoteurs des gènes cibles. Les promoteurs de tous les gènes cholestérogéniques cibles de SREBP-1 connus à ce jour contiennent une séquence SRE classique, identique à celle mise en évidence pour le récepteur au LDL. Tandis que le promoteur des gènes lipogéniques contient des séquences dite SRE-like, similaires mais non

rigoureusement identiques à SRE-1. Des expériences de transfections cellulaires ont montré des affinités différentes de SREBP-1a et SREBP-1c pour les promoteurs contenant des SRE ou des E-Box. En résumé, SREBP-1a active efficacement les promoteurs contenant les SRE alors que SREBP-1c est inactif sur ces promoteurs. Au contraire, SREBP-1a et SREBP1c se lient efficacement sur les motifs E-Box. Les deux isoformes fixent les séquences SRE-like sur les gènes lipogéniques mais avec différentes efficacités (Shimano, 2001, Amemiya-Kudo *et al.* , 2002). Cette différence d'affinité expliquerait la spécificité de SREBP-1c pour les gènes lipogéniques et glycogéniques et de SREBP-1a pour les gènes lipogéniques et cholestérogéniques (figure 13).

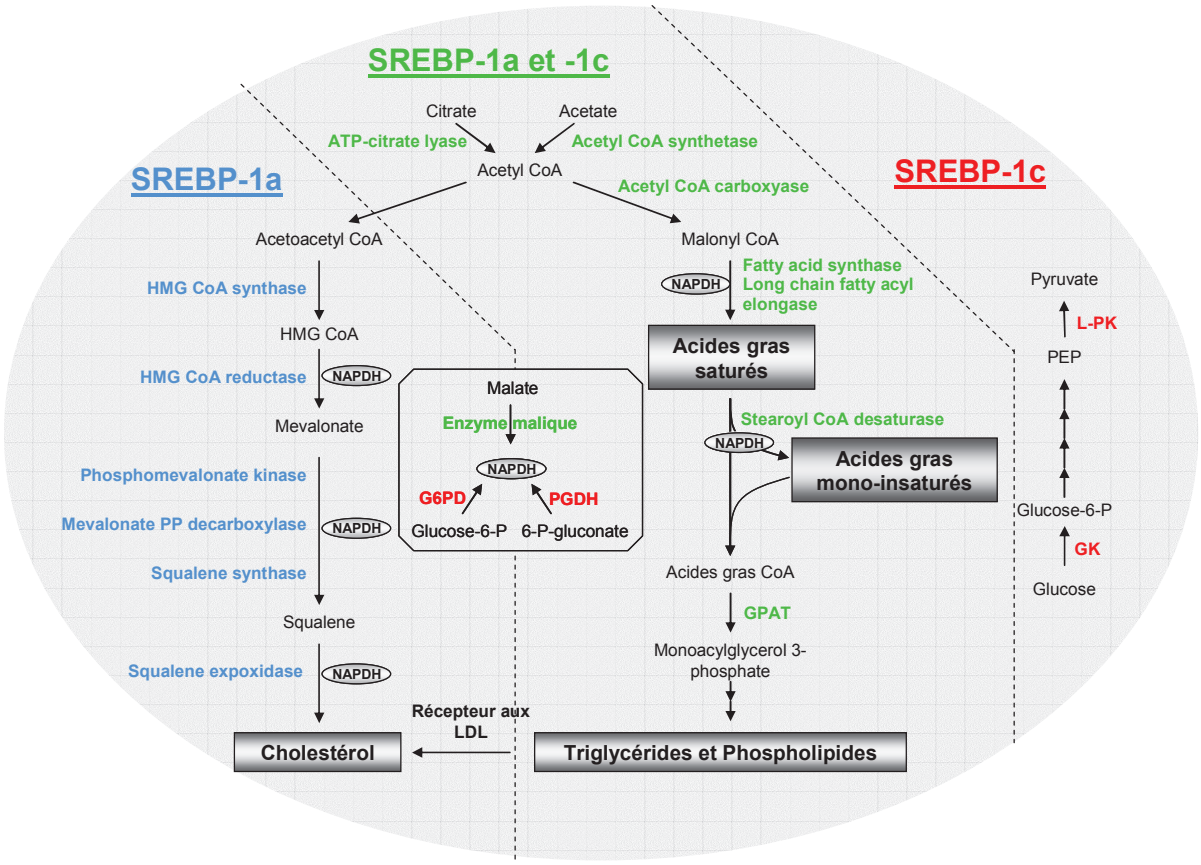


Figure 13 : Gènes et voies métaboliques régulés par SREBP-1a et SREBP-1c

2.5. Les facteurs de transcription SREBP-1 dans le muscle squelettique

Les facteurs de transcription SREBP-1 jouent un rôle majeur dans la régulation de la synthèse lipidique et du stockage lipidique. Ils activent la transcription de nombreuses enzymes de la lipogenèse. Ils sont donc très exprimés dans le foie et le tissu adipeux, organes à forte capacité lipogénique. Le muscle squelettique n'est pas considéré comme un organe hautement lipogénique. Pourtant, son métabolisme lipidique est très actif : c'est un site majeur d'oxydation des acides gras et de stockage de triglycérides. Les facteurs de transcription SREBP-1 pourraient avoir un rôle dans le métabolisme énergétique musculaire, et notamment SREBP-1c dont l'expression varie avec l'exercice physique et le statut nutritionnel.

2.5.1. Régulations de SREBP-1 dans le muscle squelettique

a) Effet du statut nutritionnel

Outre la régulation du processus de maturation, SREBP-1 est fortement régulé au niveau transcriptionnel. Cette régulation transcriptionnelle se porte essentiellement sur SREBP-1c, SREBP-1a étant exprimé à faible niveau et de façon constitutionnelle dans la plupart des organes.

La première observation d'une régulation transcriptionnelle de SREBP-1c *in vivo* se fait à la suite de protocoles alimentaires dans le cadre desquels des rats sont mis à jeun 24 ou 48h puis nourris de nouveau. Ces changements de statut nutritionnel régulent l'expression de SREBP-1c dans le foie, dans le tissu adipeux et dans le muscle squelettique (Horton *et al.* , 1998, Kim *et al.* , 1998, Bizeau *et al.* , 2003).

Un jeûne de 48h provoque une diminution drastique du niveau en ARNm de SREBP-1c dans le muscle squelettique de rat. La diminution la plus forte se produit après 24h de jeûne. Dans le muscle des rats nourris de nouveau, l'expression de SREBP-1c est fortement stimulée dès 3h de libre accès à la nourriture, un pic étant atteint après 12h. L'expression protéique de SREBP-1c suit les niveaux d'ARNm, la quantité de précurseur comme la quantité de SREBP-1c nucléaire diminue pendant le jeûne et augmente de 2 à 4 fois lors de la réalimentation. Par contre aucune variation de SREBP-1a n'est observée en réponse au statut

nutritionnel, ni au niveau ARNm ni au niveau protéique (Bizeau *et al.*, 2003, Commerford *et al.* , 2004, Gosmain *et al.*, 2005, Kamei *et al.* , 2008). *In vivo*, SREBP-1c semble être la seule isoforme sensible à l'état nutritionnel dans le muscle squelettique, comme précédemment observé dans le foie et le tissu adipeux (Horton *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 1998).

Cette réponse de SREBP-1c au statut nutritionnel est identique quelque soit la composition en fibres du muscle. Démontrée chez l'animal, cette régulation postprandiale de l'expression de SREBP-1c est également observée dans le muscle squelettique humain (Tsintzas *et al.* , 2006). SREBP-1c se comporte donc comme un senseur du statut énergétique du muscle squelettique.

Les variations d'expression de SREBP-1c en réponse aux changements nutritionnels, s'accompagnent de variations dans l'expression de plusieurs de ses gènes cibles. Ainsi, au cours du jeûne, l'expression de la FAS et de HKII dans le muscle squelettique s'écroule (Gosmain *et al.*, 2005). L'expression de la FAS, de l'Acetyl-CoA carboxylase (ACC) et de HKII augmente clairement au cours de la réalimentation. Ces mêmes enzymes voient leur expression varier de manière identique lors de la surexpression d'un dominant positif de SREBP-1c dans des myotubes (Guillet-Deniau *et al.* , 2002). Ainsi, SREBP-1c est impliqué dans la régulation positive comme dans la régulation négative des gènes du métabolisme des lipides et des carbohydrates en réponse à l'alimentation.

De nombreux gènes, dont l'expression évolue en réponse aux variations nutritionnelles, possèdent au niveau de leur promoteur un site SRE (Ducluzeau *et al.* , 2001, Tsintzas *et al.*, 2006). Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont montré que SREBP-1c se liait au promoteur de FAS, codant pour une enzyme clé de la lipogenèse, et HKII, codant pour une enzyme impliquée dans le métabolisme glucidique (Gosmain *et al.*, 2004). Dans le muscle, la liaison de SREBP-1c sur ces promoteurs est modulée en fonction de l'état nutritionnel ; très faible au cours du jeûne, l'association de SREBP-1c et des promoteurs de FAS et HKII est nettement augmentée au cours de la réalimentation des rats (Gosmain *et al.*, 2005). SREBP-1c peut donc réguler directement les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des carbohydrates en fonction du statut nutritionnel.

b) Rôle des Liver X Receptors (LXRs)

Deux facteurs de transcription ont été clonés et décrits comme de puissants activateurs du promoteur murin de SREBP-1c. Il s'agit des récepteurs nucléaires LXR (Yoshikawa *et al.* , 2001). L'expression de SREBP-1c est abolie chez les souris KO pour LXR α et LXR β, indiquant que ce facteur est le régulateur transcriptionnel principal de SREBP-1 (Repa *et al.* , 2000). L'analyse des promoteurs murin et humain de *SREBF1* révèle la présence de LXRE, sites de fixation des LXR, semblables à ceux mis en évidence sur le promoteur de l'ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1), un gène cible connu des LXRs (Repa *et al.*, 2000, Dif *et al.* , 2006). L'administration d'un agoniste LXR chez le rongeur, ainsi que le traitement *in vitro* de cellules hépatiques, induisent l'expression de SREBP-1 et l'expression de ses gènes cibles FAS, ACC1 et SCD1 (Schultz *et al.* , 2000, Nakatani *et al.* , 2005). Cette induction est abolie par la mutation des sites LXRE sur le promoteur de *SREBF1*, indiquant que SREBP-1c est régulé par la liaison directe de LXR sur son promoteur. De plus, le traitement par un agoniste des LXRs permet la fixation des LXRs sur le promoteur du gène *SREBF1* augmentant l'expression de SREBP-1c. Au cours du jeûne, la liaison de LXR sur ce promoteur est fortement diminuée, indiquant que LXR pourrait participer à la régulation de SREBP-1c par l'état nutritionnel (Nakatani *et al.*, 2005).

Dans le muscle squelettique de souris, LXRα et LXRβ sont exprimés à des niveaux identiques. L'administration d'agoniste LXR chez des souris, induit une augmentation de presque 10 fois du taux d'expression de SREBP-1c dans le quadriceps. L'expression des gènes de la FAS et de SCD-1, gènes cibles de SREBP-1c, est également induite par traitement avec un agoniste LXR de cellules musculaires murines C2C12 (Muscat *et al.* , 2002).

Les facteurs LXR se lient à l'ADN des promoteurs de leurs gènes cibles sous forme d'hétéro-dimères avec les récepteurs à l'acide rétinoïque Retinoic X Receptor (RXR). Ainsi la co-expression de RXR et LXR active de façon synergique le promoteur de SREBP-1c (Yoshikawa *et al.*, 2001). L'administration orale d'agoniste RXR induit l'expression de SREBP-1c dans le foie, l'intestin et le tissu adipeux blanc chez la souris. La quantité de la forme nucléaire de SREBP-1c est également augmentée de façon parallèle à la quantité d'ARNm. L'agoniste RXR n'induit par contre aucune modification d'expression de SREBP-1a (Repa *et al.*, 2000).

Trois isoformes de RXR α, β et γ, existent. Dans le muscle squelettique, RXRγ est préférentiellement exprimé parmi les trois isoformes. Comme SREBP-1c dans le muscle de rat, son expression s'effondre lors du jeûne et réaugmente au cours de la réalimentation, alors que l'expression de RXRα et RXRβ n'est pas modulée au cours du jeûne (Kamei *et al.*, 2008).

Parmi toutes les isoformes de LXR et RXR, seule l'expression de RXRγ est corrélée positivement à l'expression de SREBP-1c dans le muscle au cours des changements de statut nutritionnel. *In vitro*, RXRα et RXRγ sous forme d'hétéro-dimères avec LXRα activent le promoteur régulant l'expression de SREBP-1c et induisent une augmentation du niveau d'ARNm correspondant. Des souris transgéniques déficientes en RXRγ ou au contraire le surexprimant, présentent respectivement une diminution et une augmentation de l'expression de SREBP-1c dans leur muscle squelettique (Kamei *et al.*, 2008). Ces données indiquent que RXRγ, sous forme d'hétérodimère avec LXR, peut réguler l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique en fonction du statut nutritionnel (figure 14).

c) Rôle de Forkhead 1 (FOXO1)

La surexpression in-vivo de la forme constitutive active de FOXO1 diminue de plus de 60 % l'expression de SREBP-1c sans moduler l'activité des LXRs. Des études de Chip montrent que FOXO1 se fixe sur le promoteur de SREBP1c empêchant la fixation des protéines clés de l'activation transcriptionnelle du promoteur du gène *SREBF1* (Deng *et al.* , 2012).

A l'inverse de SREBP-1c et RXRγ, l'expression de FOXO1 est fortement induite par le jeûne et diminue au cours de la réalimentation. *In vitro*, FOXO1 inhibe l'activation transcriptionnelle de SREBP-1c induite par la fixation de l'hétérodimère RXR/LXR (figure 14). L'expression de SREBP-1c est fortement diminuée dans le muscle de souris transgénique surexprimant FOXO1. L'expression de RXRγ est également diminuée chez ces souris (Kamei *et al.*, 2008).

Au cours du jeûne, FOXO1 supprime donc l'expression de SREBP-1c par deux mécanismes, d'une part en inhibant l'expression de RXRγ et d'autre part en empêchant la transactivation par RXRγ/LXR ou RXRα/β/LXR.

Lors de la réalimentation, l'expression de FOXO1 chute, l'expression de RXRγ augmente. RXRγ sous forme d'hétérodimère avec LXR se fixe sur le promoteur de SREBP-1, active sa transcription et ainsi l'expression de SREBP-1c (Kamei *et al.*, 2008).

d) Rôle de SIRT1

SIRT1 est une désacétylase dont l'activité et l'expression est augmentée au cours du jeûne. Dans le foie, la surexpression de SIRT1 augmente l'ubiquitinylation et la dégradation par le protéasome des LXRs, ce mécanisme de dégradation des LXRs semble être important pour permettre un nouveau cycle de transcription des gènes cibles de LXRs. La dégradation des LXRs permet la fixation d'une nouvelle protéine LXR sur le promoteur de ces gènes cibles comme SREBP-1c, ainsi la surexpression de SIRT1 augmente l'expression de SREBP-1c (Li *et al.* , 2007) (figure 14). Ces résultats sont confirmés par des études d'inhibition et de KO SIRT1 dans le foie où l'expression de SREBP-1c est diminuée (Wang *et al.* , 2010).

Cependant, au cours du jeune l'expression de SREBP-1c est fortement inhibée, il semblerait donc que l'augmentation de l'activité et de l'expression de SIRT1 par le jeûne ne soit pas suffisante pour augmenter l'expression de SREBP-1c.

SIRT1 est également capable de désacétyler SREBP-1. Dans le foie de souris, au cours du jeûne, l'augmentation de l'activité et de l'expression de SIRT1 augmente la désacétylation de SREBP-1c. Cette désacétylation diminue l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c et sa stabilité résultant en une diminution de l'expression des gènes cibles de SREBP-1c (Ponugoti *et al.* , 2010, Walker *et al.* , 2010) (figure 14). À l'inverse, dans des conditions post prandiales (cellules HepG2 traitées avec de l'insuline et du glucose), l'expression et l'activité de SIRT1 sont inhibées. L'activité de SREBP-1c n'est alors plus réprimée par SIRT1, permettant l'expression des gènes cibles de SREBP-1c (Ponugoti *et al.*, 2010).

Au cours du jeûne, l'activité transcriptionnelle et l'expression de SREBP-1c sont fortement réprimées dans tous les organes, afin d'inhiber l'anabolisme lipidique qui consomme de l'énergie et qui réduit la disponibilité des substrats énergétiques (figure 14). Dans le foie, SIRT1 participe à la répression de l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c notamment en réponse au jeûne. Par conséquent, SIRT1 pourrait également inhiber l'activité transcriptionnelle de SREBP-1 dans le muscle squelettique.

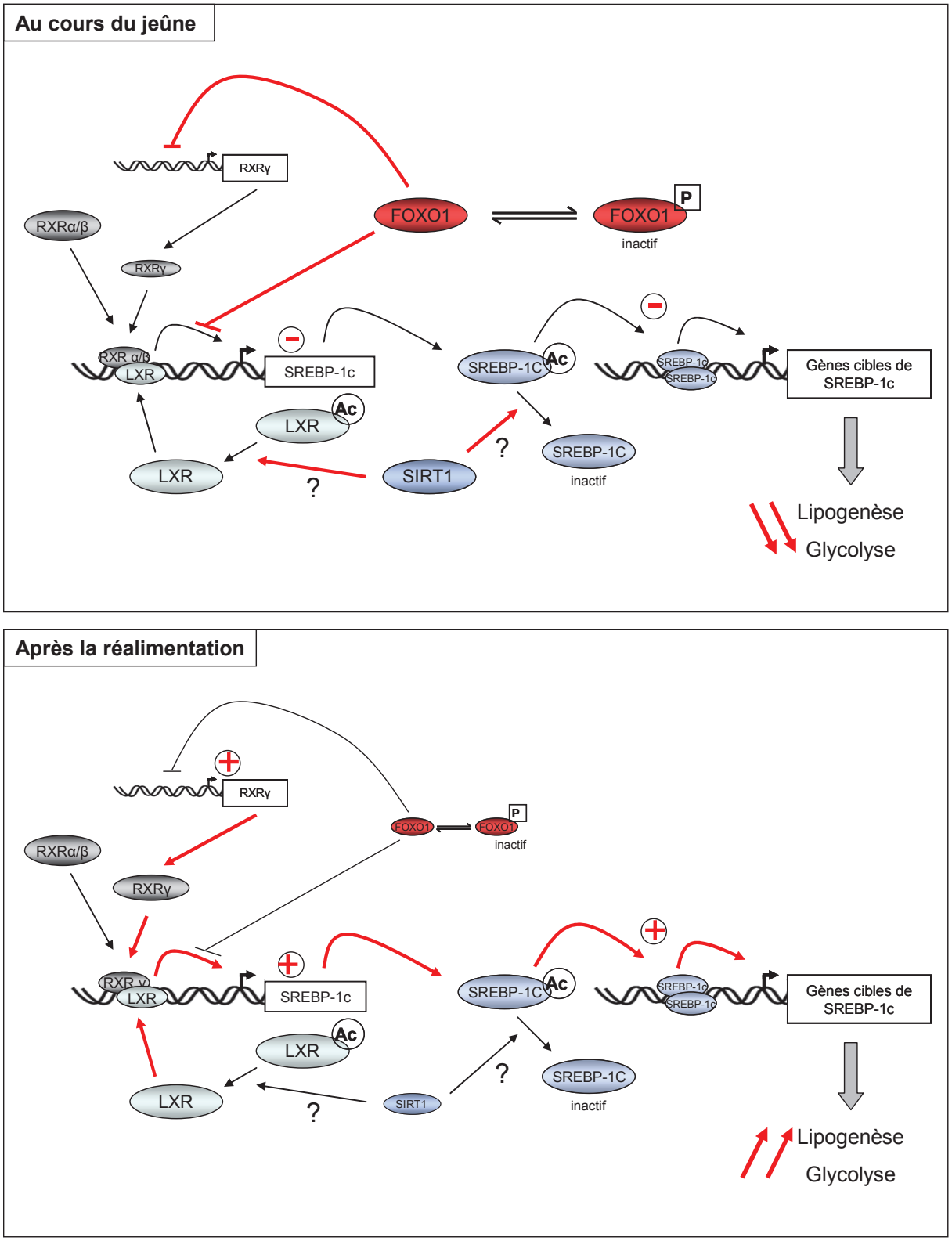


Figure 14 : Mécanismes de régulation de l'expression et de l'activité de SREBP-1c par LXR, FOXO1 et SIRT1 dans le muscle squelettique en réponse aux variations nutritionnelles.

e) Rôle de l'insuline

◊ *Effet transcriptionnel de l'insuline*

Dans le foie, le tissu adipeux et les muscles humains, l'expression de SREBP-1c et l'accumulation nucléaire de SREBP-1c sont régulées par les changements d'état nutritionnel, de façon parallèle à la sécrétion d'insuline (Ferre and Foufelle, 2007). De plus, SREBP-1c est fortement induit par un régime riche en carbohydrates stimulant la sécrétion d'insuline (Ferre and Foufelle, 2007). L'expression de SREBP-1c dans le foie de rat rendu diabétique par la streptozotocine est diminuée et est rétablie par l'ajout d'insuline, confirmant le rôle de l'insuline sur l'expression de SREBP-1c *in vivo* (Shimomura *et al.* , 1999b).

L'insuline, *via* sa voie de signalisation, et SREBP-1c stimulent la lipogénèse et la glycolyse en activant l'expression de la FAS, l'ACC, la SCD et la GK et en inhibant l'expression des gènes de la PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase (PEPCK), Glucose-6-Phosphatase (G6P), et Insulin receptor substrate-2 (IRS-2) (Raghow *et al.*, 2008). Ainsi SREBP-1 apparaît comme un médiateur des effets de l'insuline sur le métabolisme lipidique.

Une des premières études suggérant un rôle majeur de SREBP-1c dans l'action de l'insuline montre que la surexpression de SREBP-1c dans des adipocytes mime l'effet de l'insuline sur les promoteurs des gènes de la FAS et de la leptine (Kim *et al.*, 1998). Le traitement par l'insuline d'adipocytes et d'hépatocytes en culture augmente l'expression génique de SREBP-1c, ainsi que l'expression protéique des formes précurseurs et nucléaires de SREBP-1c (Kim *et al.*, 1998, Foretz *et al.*, 1999).

Dans les muscles squelettiques également, l'expression de SREBP-1c est activée par l'insuline. En effet, des myotubes en culture, issus de cellules musculaires humaines ou de rat, traités par l'insuline présentent une augmentation de l'expression de l'ARNm de SREBP-1c. L'effet de l'insuline sur l'expression de SREBP-1c est dose-dépendant (Nadeau *et al.* , 2004). Une augmentation similaire de l'expression protéique est observée, aussi bien au niveau de la fraction membranaire, contenant le précurseur, qu'au niveau de la fraction nucléaire, contenant la forme mature (Guillet-Deniau *et al.*, 2002, Gosmain *et al.*, 2004). Chez l'homme, l'insuline induit également l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique de sujets sains soumis à un clamp hyperinsulinémique-euglycémique de trois heures (Ducluzeau *et al.*, 2001, Sewter *et al.* , 2002).

Des études sur le promoteur du gène *SREBF1* ont montré que l'effet de l'insuline est dû à la présence de deux motifs SRE conservés. Par immuno-précipitation de chromatine, ils ont montré que l'insuline augmente la fixation de SREBP-1 sur son propre promoteur et donc sa transcription (Dif *et al.*, 2006).

L'insuline, en réponse notamment aux taux de glucose dans le sang, va moduler l'expression transcriptionnelle et le processus d'activation de SREBP-1c et par répercussion l'expression transcriptionnelle de SREBP-1a (Dif *et al.*, 2006).

Les effets de l'insuline sur l'expression de SREBP-1c sont principalement médiés par Akt et mTORC1. Des études ont montré que lorsque mTORC1 est inhibé par la rapamycine l'expression de SREBP-1c en réponse à l'insuline est fortement diminuée (Li *et al.* , 2010). Par ailleurs, Li *et al.* ont montré que cet effet sur l'expression de SREBP-1c ne passe pas par la S6K.

Cependant, l'activation transcriptionnelle de SREBP-1c par l'insuline apparaît faible par rapport à la très forte induction des gènes tels que la FAS. En fait, d'autres mécanismes d'activation de SREBP-1c par l'insuline sont mis en jeu.

◊ *Voie Akt/mTOR*

La voie de signalisation de l'insuline permet également de réguler la maturation de SREBP-1, en agissant sur différentes protéines.

En effet, l'insuline diminue l'expression de INSIG-2 dans le foie de souris et les hépatocytes de rats, alors qu'elle tend à augmenter l'expression de INSIG-1 (Yabe *et al.*, 2002, Yabe *et al.*, 2003, Engelking *et al.* , 2004). En diminuant la quantité d'INSIG-2, l'insuline favoriserait le passage des complexes SCAP-SREBP dans l'appareil de Golgi et ainsi la libération de SREBP mature (figure 15).

L'accumulation de SREBP-1 dans le noyau dépend également de la p70S6K qui est une cible de mTORC1. Une étude faite dans des hépatocytes de rat en culture primaire montre que la rapamycine bloque l'expression du gène SREBP-1c par l'insuline mais que les gènes cibles de SREBP-1c sont encore modulés. A l'inverse, l'inhibition de la p70S6K n'a pas d'effet sur l'induction de l'expression de SREBP-1c par l'insuline (Li *et al.*, 2010). Ces résultats montrent que la PI3K régule l'expression et la maturation de SREBP-1c, avec un rôle spécifique de la p70S6K sur la régulation de la maturation de SREBP-1c.

D'autre part, Akt inhibe l'activité de la GSK3β. La GSK3β phosphoryle SREBP-1 sur la Ser430 et Thr426 créant un site d'ubiquitinylation pour l'ubiquitine ligase E3, Fbw7 ; et donc sa dégradation par le système UPS (Sundqvist *et al.* , 2005, Porstmann *et al.* , 2008).

Par conséquent, l'activation d'Akt par l'insuline provoque une accumulation de SREBP mature dans le noyau, d'une part en stimulant sa maturation dans le RE, d'autre part, en inhibant sa dégradation dans le noyau.

Des études faites dans des modèles murins DT2 (Goto-Kakizaky) ou obèse (ob/ob) montrent que dans ces modèles la suractivation de la voie IRS-2/PI3K, induite par l'hyperinsulinémie, conduit à l'augmentation de l'expression et de la quantité nucléaire de SREBP-1c. Ces travaux montrent que l'activation de l' atypical Protein Kinase C (aPKC) par la voie IRS-2/PI3K augmente l'expression et la quantité nucléaire de SREBP-1c hépatique, expliquant l'augmentation de l'expression de SREBP-1c dans le foie de souris diabétiques ou obèse responsable en partie de l'accumulation de lipide hépatique (Sajan *et al.* , 2009a, Sajan *et al.* , 2009b) (figure 15).

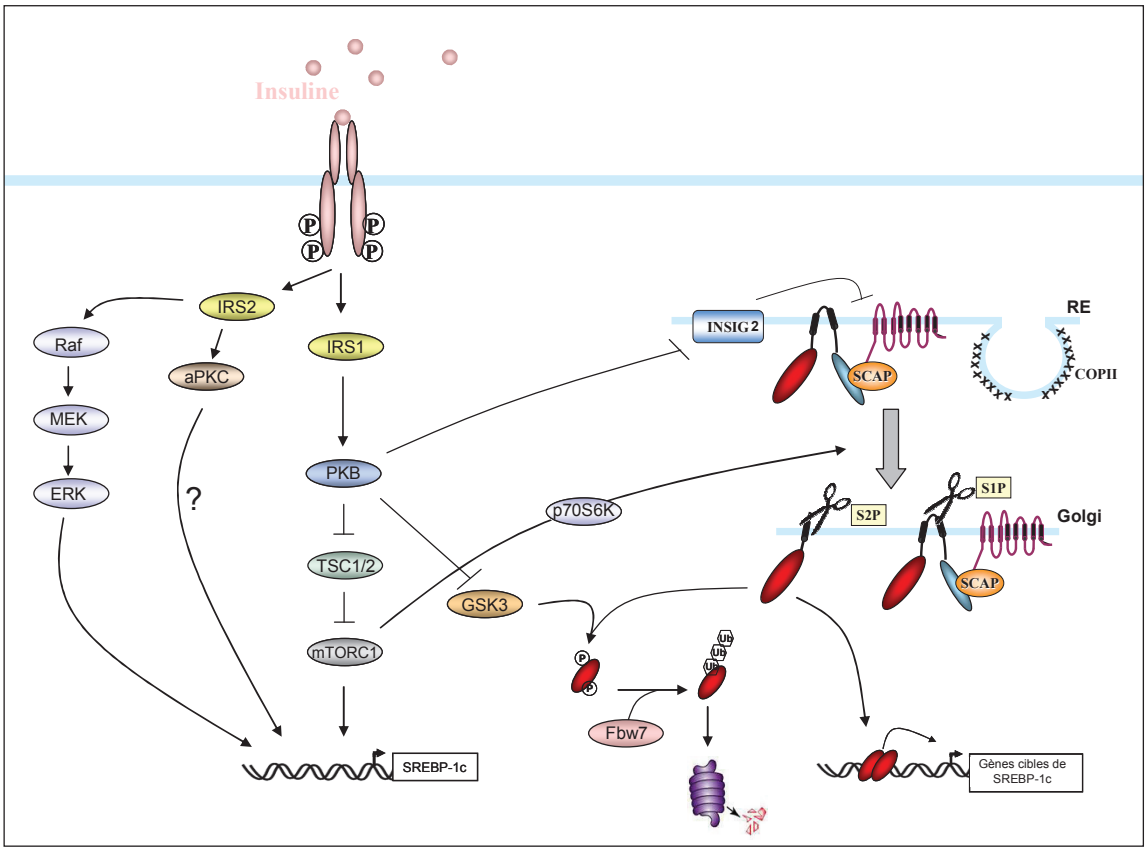


Figure 15 : Régulation de la maturation et de l'expression de SREBP-1 par la voie PI3K/Akt.

◊ *Voie MAPK*

Nadeau *et al.* montrent que SREBP-1 peut être activé par l'insuline dans le muscle squelettique par la voie des MAPKinases (figure 15). Dans cette étude, le traitement de cellules musculaire de rats L6 par la Wortmannin ou le LY294002, inhibiteurs de la voie PI3Kinase, n'a pas d'effet significatif sur l'activation de SREBP-1 par l'insuline, ni au niveau de l'expression génique, ni au niveau de l'expression protéique membranaire et nucléaire. Par contre, lorsque ces mêmes cellules sont traitées par un inhibiteur de la voie des MAPKinases, PD98059, l'insuline échoue à augmenter la quantité d'ARNm codant pour SREBP-1c, la quantité de précurseurs membranaires et la quantité de protéines matures. L'activation de l'expression de SREBP-1 par l'insuline dans les myocytes répond donc toujours à l'insuline en présence d'inhibiteur de la voie PI3Kinase mais est complètement bloquée en présence d'inhibiteur de la voie des MAPKinases (Nadeau *et al.*, 2004). L'effet de l'insuline sur SREBP-1c dans le muscle squelettique est donc dépendant de l'activation des MAPKinases.

2.5.2. Impact de l'exercice physique sur l'expression des FT SREBP-1

SREBP-1c est l'isoforme de SREBP dont la régulation par l'exercice est la plus étudiée, car, contrairement à SREBP-1a exprimé de façon constitutive *in vivo*, l'expression de SREBP-1c est sensible aux variations métaboliques.

Les données sur l'impact de l'activité physique sur l'expression de SREBP-1 dans les muscles squelettiques sont variées et contradictoires. Les études sur l'expression de SREBP-1 dans le muscle ont été notamment réalisées pour comprendre le lien entre l'activité physique et la quantité de lipides intra-musculaire.

L'accumulation de lipides intracellulaires pourrait être à l'origine de l'insulino-résistance musculaire associée à l'obésité et au DT2. En effet, les muscles de patients obèses, DT2 ou insulino-résistants présentent des taux élevés d'IntraMuscular TriacylGlycerol (IMTG). De façon surprenante, un taux élevé d'IMTG est également retrouvé dans le muscle d'athlètes entraînés en endurance, marathoniens, coureurs de longues distances, alors que ces sujets présentent une insulino-sensibilité grandement améliorée par rapport à des sujets sédentaires (Kiens *et al.* , 1993)

L'augmentation des IMTG par l'exercice est reportée par plusieurs groupes (Morgan *et al.* , 1969, Hoppeler *et al.* , 1985, Pruchnic *et al.* , 2004, Nadeau *et al.* , 2006). Cependant, le mécanisme par lequel l'exercice favorise l'accumulation lipidique intracellulaire est encore mal compris.

Une des possibilités avancées, est la stimulation de la lipogenèse *de novo* dans le muscle squelettique par SREBP-1c. Ainsi, deux équipes montrent un effet positif de l'exercice sur l'expression de SREBP-1c. D'abord, Ikeda *et al.* (Ikeda *et al.* , 2002). montrent qu'un exercice prolongé, 6 heures de course sur tapis roulant réparties en 8 séquences de 45 minutes, provoque une élévation de l'expression musculaire de SREBP-1c dans le muscle squelettique de rat. De plus, Ikeda *et al.* ainsi que Nadeau *et al.* (Nadeau *et al.*, 2006), montrent qu'un entraînement en endurance sur plusieurs semaines, augmente la stimulation de l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique en réponse à l'exercice, par rapport à des rongeurs non entraînés. L'expression de SREBP-1c dans le muscle des animaux entraînés reste plus élevée jusqu'à 22h après l'exercice. L'expression des gènes cibles de SREBP-1c, tels que *FAS*, *ACC1*, *SCD1* ou *DiGlyceride AcylTransferase-1 (DGAT-1)*, est stimulée au cours de l'exercice, de façon parallèle à SREBP-1c.

L'insulinémie ne varie pas au cours de ces exercices. L'insuline ne participe donc pas aux effets de l'exercice sur l'activation de l'expression de SREBP-1c. Dans le muscle squelettique, l'expression de SREBP-1c peut être stimulée par la voie des MAPKinases. Or, cette voie est également activée au cours de l'exercice. En effet, la phosphorylation des protéines kinases ERK-1/2 augmente dans le muscle squelettique humain au cours d'exercices aigües et de courses de marathon (Widegren *et al.* , 1998, Yu *et al.* , 2001, Yu *et al.* , 2003). Il s'agit d'un effet local et non systémique de la contraction musculaire, se produisant uniquement dans le membre ayant subit l'exercice (Widegren *et al.*, 1998). Cette observation est confirmée *in vitro* sur des muscles isolés de rat, soumis à une stimulation électrique (Ryder *et al.* , 2000, Wretman *et al.* , 2001). La contraction pourrait donc stimuler l'expression de SREBP-1c par la voie des MAPKinases. L'entraînement pourrait ainsi favoriser l'accumulation d'IMTG, *via* l'activité lipogénique de SREBP-1c.

Cette hypothèse est toutefois contestée par plusieurs études chez l'homme. Ainsi, chez des sujets sains non entraînés, un exercice à 50% de VO2 max pendant deux heures dans une première étude, ou une heure de vélo stationnaire dans une seconde étude, n'induit aucun changement dans l'expression musculaire de SREBP-1c (Tunstall *et al.* , 2002, Russell *et al.* , 2005). De façon concordante, un entraînement en endurance de 9 jours sur

des sujets sains, n'améliore pas l'expression de SREBP-1c en réponse à l'exercice (Tunstall *et al.*, 2002).

Toutes ces études sont néanmoins difficilement comparables, le type d'exercice, leur durée et l'entraînement subit par les sujets étant, à chaque fois, différents. Ikeda *et al.* montrent que l'activation de l'expression de SREBP-1c en réponse à l'exercice dépend de la durée de celui-ci. Si 6 h de course sur tapis roulant permettent un doublement de l'expression musculaire de SREBP-1c, une heure seulement du même exercice n'a aucun effet (Ikeda *et al.*, 2002). De plus, la réponse de SREBP-1c à l'exercice peut nécessiter un délai pour se mettre en place, et donc n'apparaître que bien après l'exercice. Ainsi, une étude soumet une seule jambe de sujets sains à un exercice de 90 minutes. Tout de suite après l'exercice, Boonsong *et al.* observent dans cette jambe une diminution de l'expression de SREBP-1c par rapport à la jambe au repos. Mais, 24h après l'exercice, la jambe entraînée présente une expression de SREBP-1c plus élevée que la jambe au repos (Boonsong *et al.* , 2007).

Chez des sujets obèses les IMTG sont très élevés. Le mécanisme mis en cause est l'augmentation de l'expression de SREBP-1c en réponse à l'hyperinsulinémie provoquée par l'insulino-résistance périphérique. Quel est l'effet de l'exercice sur le métabolisme musculaire de ces sujets? C'est la question à laquelle répond une récente étude, dans laquelle des sujets obèses ou en surpoids, dyslipidémiques et sédentaires sont soumis à un entraînement en endurance. Comme attendu, l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique des sujets obèses ou en surpoids est plus élevée que dans celui de sujets sains. L'entraînement en endurance améliore l'insulino-sensibilité de ces sujets. Le taux de IMTG ainsi que l'expression de SREBP-1c sont diminués dans le muscle squelettique des sujets obèses entraînés (Smith *et al.* , 2009). Ainsi, chez des sujets obèses insulino-résistants, l'exercice diminue l'expression basale de SREBP-1c dans le muscle squelettique.

2.5.3. Implication de SREBP-1 dans le maintien de la fonction musculaire

Les facteurs de transcription SREBP-1 apparaissent comme des régulateurs géniques puissants dans le muscle puisque la surexpression de SREBP-1 dans des myotubes humains

en culture primaire modifie significativement l'expression de 1315 gènes pour SREBP-1a et 514 gènes pour SREBP-1c (Rome *et al.* , 2008). L'analyse de ces gènes a mis en évidence deux classes de gènes régulés par SREBP-1 et significativement sur représentés parmi le listing de gènes régulés, les gènes dit « muscle contraction » et « muscle développement ». Ainsi SREBP-1 apparaît comme un régulateur non seulement du métabolisme lipidique musculaire mais également comme un régulateur de la fonction musculaire (Rome *et al.*, 2008).

a) Différenciation musculaire

La différenciation des cellules musculaires est une étape cruciale au cours du développement du tissu musculaire mais également dans le muscle adulte. En effet dans le muscle adulte le recrutement de cellules satellites et leur différenciation en myotube permet la régénération du tissu musculaire (Relaix and Zammit, 2012). Des études faites au laboratoire dans des myoblastes humain en culture primaire montrent qu'au cours de la différenciation l'expression de SREBP-1 varie. L'expression de SREBP-1 augmente pour atteindre un pic d'expression lorsque les cellules arrivent à confluence, puis dès le premier stade de la différenciation l'expression de SREBP-1 chute brutalement et continue de diminuer tout au long de la différenciation (Lecomte *et al.* , 2010).

Pour déterminer le rôle de la régulation de l'expression de SREBP-1 au cours de la différenciation musculaire, SREBP-1a et 1c ont été surexprimés dans des myotubes humains. La surexpression de SREBP-1 bloque la différenciation musculaire en diminuant fortement l'expression des facteurs de différenciation myogéniques, MEF2C, MYOD1 et MYOG. *In-vivo* la surexpression de SREBP-1 dans le muscle tibial de souris diminue le diamètre moyen des fibres musculaire qui pourrait être la résultante d'une diminution des capacités régénératives induit par la diminution des MRFs par SREBP-1 (Lecomte *et al.*, 2010).

D'autre part, ces mêmes travaux ont montré que la surexpression de SREBP-1 augmente l'expression de deux répresseurs transcriptionnels bHLHB2 et bHLHB3 en augmentant l'activité de leurs promoteurs par fixation sur les sites SRE. La surexpression de ces répresseurs transcriptionnels reproduit les effets de SREBP-1 sur l'inhibition de l'expression des gènes musculaires ; et l'inhibition de bHLHB2 et bHLHB3 bloque en partie l'inhibition de la différenciation induite par SREBP-1 et lutte contre l'inhibition de l'expression des MRFs par SREBP-1 (Lecomte *et al.*, 2010).

Ainsi SREBP-1 inhibe la différenciation musculaire en inhibant l'expression des MRFs *via* l'augmentation de l'expression des bHLHB2/3.

b) La régulation de la masse musculaire

Dans des myotubes humains en culture primaire la surexpression de SREBP-1 module l'expression de nombreuses protéines impliquées directement dans le maintient de la masse musculaire, comme les MRFs, les atrogènes ou encore les protéines structurales de la fibre musculaire (troponine, titine, myosine) (Rome *et al.*, 2008). Dans ce modèle cellulaire, la surexpression de SREBP-1 diminue fortement la surface moyenne des myotubes. Et dans le muscle tibial de souris, la surexpression de SREBP-1 diminue le poids total du muscle infecté et le diamètre moyen des fibres musculaire. Donc *in vivo* et *in vitro* la surexpression de SREBP-1 induit une atrophie musculaire en inhibant l'expression des protéines musculaires (Lecomte *et al.*, 2010).

Lorsque SREBP-1 est surexprimé dans des myotubes humains en présence de siRNA bHLHB2 ou bHLHB3, les effets atrophiques de SREBP-1 sont en partie inhibés. De plus, la surexpression de bHLHB2 et bHLHB3 reproduit les effets sur l'inhibition des protéines contractiles et sur l'expression des MRFs mais pas les effets de SREBP-1 sur l'expression des atrogènes. Ainsi l'atrophie musculaire induite par SREBP-1 est en partie expliquée par l'augmentation de l'expression de bHLHB2 et bHLHB3 (Lecomte *et al.*, 2010).

Paradoxalement, la surexpression de SREBP-1 a des effets contradictoires sur la voie atrogénique FOXO1. La surexpression de SREBP-1 diminue l'expression de FOXO1 et d'Atrogin-1 alors qu'il augmente fortement l'expression de MuRF1. Ainsi une partie des effets atrophiques de SREBP-1 pourrait être dû à l'augmentation de l'expression de MuRF1 de façon bHLHB2 et bHLHB3 indépendante (Lecomte *et al.*, 2010).

3. SIRT1 : RÉGULATEUR DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

3.1. Les sirtuins

Les sirtuins sont des protéines de la famille des Histones DésAcétylases de classe 3 (HDAC3) (Haigis and Sinclair, 2010). Ces protéines régulent l'expression des gènes en désacétylant les résidus lysine acétylés des histones, des facteurs de transcription et d'autre protéines (Imai *et al.* , 2000, Das *et al.* , 2009, Haigis and Sinclair, 2010). A la différence des autres HDAC, la réaction de désacétylation par les sirtuins nécessite l'utilisation du cofacteur NAD+. Les sirtuins consomment une molécule de NAD+ pour chaque résidu lysine désacétylé, produisant une molécule de nicotinamide (NAM) et de 2'-O-acetyl-ribose (Grubisha *et al.* , 2005) (figure 16). Ainsi, l'activité des sirtuins est directement dépendante de la quantité de NAD+ disponible. Chez la levure, les vers, la drosophile et les mammifères, les sirtuins sont régulées par le statut énergétique (Nemoto *et al.* , 2004).

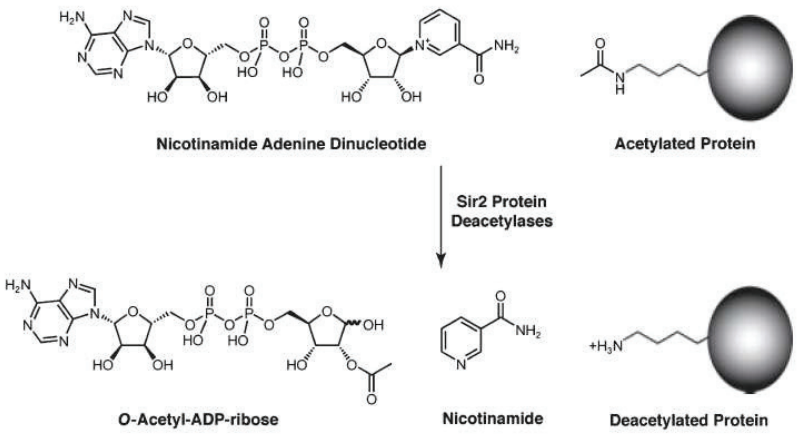


Figure 16 : La réaction de désacétylation catalysée par les sirtuins.
d'après Grubisha et al. 2005.

Originellement, les sirtuins ont été identifiées chez la levure qui présente cinq isoformes (Sir2 et Hst1 à 4). Sir2 est celle qui a suscité le plus d'intérêt, suite aux travaux de l'équipe de Guarente montrant que Sir2 influence la durée de vie des levures. Dans ces travaux, ils ont montré que la mutation délétère de Sir2 diminue la durée de vie moyenne des levures de 50%. A l'inverse l'intégration d'une deuxième copie du gène Sir2 dans ces cellules haploïdes augmentent la durée de vie de 30% (Kaeberlein *et al.* , 1999).

Chez les mammifères il existe 7 isoformes (SIRT1 à 7) dont SIRT1, l'isoforme la plus étudiée pour sa forte homologie de séquence avec Sir2. Hormis SIRT1, qui est exprimée dans le noyau et dans le cytoplasme, les sirtuins sont majoritairement exprimées dans le cytoplasme pour SIRT2, la mitochondrie pour SIRT3, 4 et 5 et dans le noyau pour SIRT6 et 7 (Houtkooper *et al.* , 2012).

Chez les mammifères, la désacétylation des protéines par les sirtuins permet de réguler l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose, la prolifération cellulaire, l'inflammation, la sénescence, la différenciation, le métabolisme lipidique, glucidique et musculaire (Vinciguerra *et al.* , 2010, Pardo and Boriek, 2011, Houtkooper *et al.*, 2012).

3.2. Régulation de SIRT1

L'expression et l'activité de cette enzyme varient en réponse aux changements énergétiques cellulaires, tels que ceux induits par la restriction calorique, l'exercice physique ou encore le jeûne. Ces changements vont induire des réponses cellulaires permettant d'adapter le métabolisme énergétique aux nouvelles conditions.

3.2.1. Régulation de l'activité de SIRT1

a) Par le co-facteur NAD+

SIRT1 est une désacétylase NAD+ dépendante, l'activité enzymatique de SIRT1 est donc dépendante de la disponibilité en NAD+. Son activité va dépendre du ratio NAD+/NADH et de la concentration en NAD+ (figure 17).

Le ratio NAD+/NADH cellulaire dépend en grande partie de l'utilisation de la forme réduite par la chaine respiratoire pour générer de l'ATP et de la réduction du cofacteur NAD+ en NADH par les voies cataboliques.

La modification du statut nutritionnel de la cellule module la synthèse de NAD+ et le ratio NAD+/NADH impactant sur l'activité enzymatique de SIRT1.

Lors de phases de restriction calorique, de jeûne ou d'exercice, la quantité NAD+ disponible augmente entrainant une augmentation de l'activité de SIRT1. A l'inverse, chez des animaux soumis à un régime enrichi en lipides, le ratio NAD+/NADH diminue entrainant une baisse de l'activité SIRT1 (Houtkooper *et al.* , 2010).

b) L'AMPK

L'AMPK est également un senseur du niveau énergétique cellulaire, dont l'activité est régulée par le ratio AMP/ATP. SIRT1 et l'AMPK sont capables de s'activer mutuellement. D'une part SIRT1 désacétyle la Liver kinase B1 (LKB1) qui va phosphoryler et activer l'AMPK, et d'autre part, l'AMPK augmente l'activité de la Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) par phosphorylation induisant la synthèse de NAD+ et ainsi augmentant l'activité de SIRT1 (Fulco and Sartorelli, 2008, Lan *et al.* , 2008) (figure 17).

Ainsi, lors par exemple d'un exercice physique prolongé, le ratio ADP/ATP et NAD+/NADH augmentent permettant donc une augmentation forte de l'activité désacétylase de SIRT1.

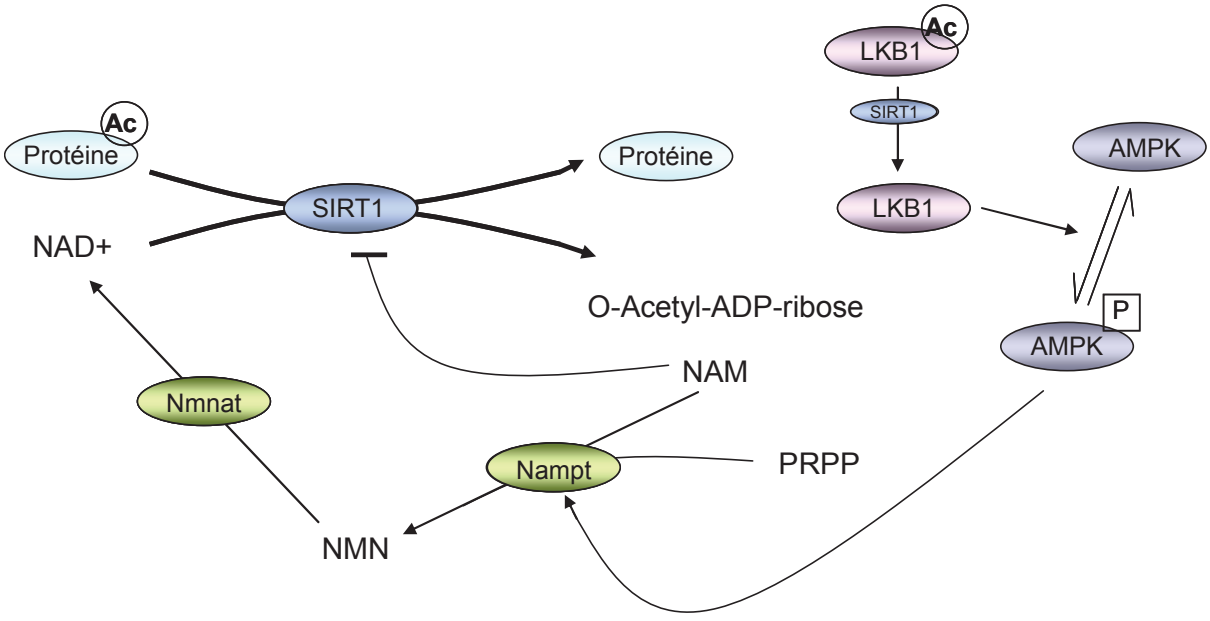


Figure 17 : Cycle de régulation de SIRT1 par son co-facteur NAD+.

c) Par modifications post traductionnelles

◊ *Phosphorylation*

Sur SIRT1, 13 sites de phosphorylation ont été identifiés, qui sont activés en réponse à différentes kinases (Sasaki *et al.* , 2008).

Lors d'un stress oxydatif (hypoxie) SIRT1 est phosphorylé sur les résidus Ser27, Ser47 et Thr530. Sous cette forme, la localisation nucléaire et l'activité enzymatique de SIRT1 sont stimulées, augmentant la désacétylation d'une de ses protéines cibles l'histone H3, mais pas du facteur pro apoptotique p53 (Nasrin *et al.* , 2009).
Alors que lors d'un stress génotoxique (utilisation d'étoposide inhibiteur de topoïsomerase 2), SIRT1 est phosphorylé par deux kinases sur le résidu Thr522, cette phosphorylation promeut la désacétylation de p53 (Guo *et al.* , 2010).

L'activité désacétylase de SIRT1 peut donc être augmentée spécifiquement pour une ou plusieurs protéines cibles en fonction du ou des sites phosphorylés.

◊ *Sumoylation*

La sumoylation est une modification post traductionnelle essentielle pour la stabilité protéique ou la régulation de la transcription. Le processus consiste à lier une molécule Small Ubiquitin-related MOdifiers (SUMO) sur un résidu lysine d'une protéine. Cette réaction est catalysé par trois enzymes : E1 activating enzyme, E2 conjugating enzyme et E3 ligases (Bettermann *et al.* , 2012). La réaction inverse de désumoylation est catalysée par les désumoylases SENtrin-specific Protease (SENP) faisant partie d'une famille de cystéine-protéases spécifique des SUMOs.

SIRT1 possède un site de sumoylation sur la lysine 734, *in vitro* la sumoylation de SIRT1 augmente son activité désacétylase (Yang *et al.* , 2007).

En réponse à des stress pro-apoptotiques (H_2O_2 ou UV) SENP1 s'associe à SIRT1 pour la désumoyler et ainsi l'inactiver. Sous cette forme inactive SIRT1 n'inhibe plus p53 et n'a donc plus d'effet anti apoptotique (Yang *et al.*, 2007) (Figure 18).

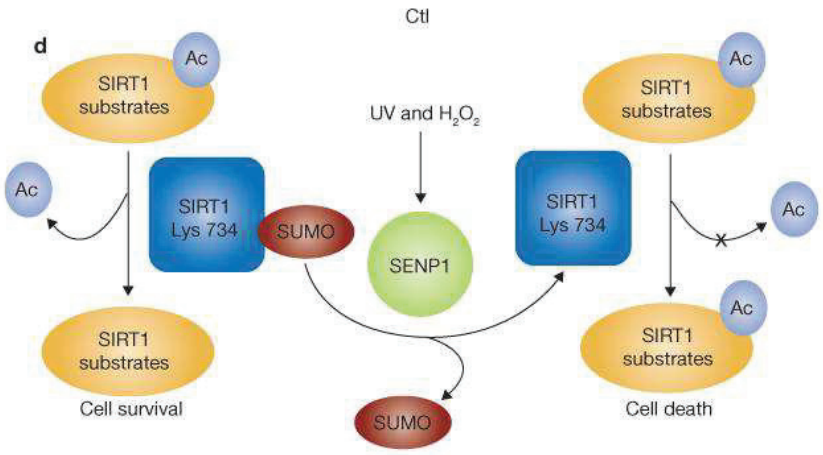


Figure 18 : Régulation de l'activité de SIRT1 par sumoylation.

d'après Yang et al. 2007.

3.2.2. Régulation de l'expression

L'étude du promoteur du gène de SIRT1 a permis de mettre en évidence la présence et la fonctionnalité de plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription dont p53, FOXO1, CRE-Binding protein (CREB), CarboHydrate Responsive Element-Binding Protein (CHREBP) et Peroxysomes Proliferator-Activated Receptors (PPARs) (Houtkooper *et al.*, 2012).

a) Restriction calorique, exercice et jeûne

Chez la souris, la restriction calorique, le jeûne ou encore l'exercice augmente l'expression de SIRT1. Les modifications du statut énergétique vont moduler l'activité des facteurs de transcription p53, FOXO1, PPARα, PPARβ et CREB qui vont augmenter l'expression de SIRT1 en augmentant la transcription du gène SIRT1 (Houtkooper *et al.*, 2012) (figure 19).

Beaucoup de cibles directes de SIRT1 sont également des régulateurs de l'expression de SIRT1, créant ainsi des boucles de rétrocontrôle. Parmi ces cibles on retrouve p53, la mutation invalidante de p53 diminue l'augmentation de l'expression de SIRT1 lors de la restriction calorique (Nemoto *et al.*, 2004).

b) Régime enrichi en lipides

Chez des souris soumis à un régime enrichi en lipide, l'expression de SIRT1 est réprimée notamment *via* PPARγ et CHREBP. Leur fixation sur le promoteur du gène de SIRT1 va inhiber son expression (Houtkooper *et al.*, 2012). (figure 19).

L'expression de SIRT1 est également réprimée par des miRNA. Chez des souris soumis à un régime riche en lipides, l'expression de SIRT1 est réprimée par la fixation de mir34a (Lee *et al.* , 2010). Plus de 16 miRNA sont capables de se fixer sur l'ARNm de SIRT1 (Yamakuchi, 2012). Dans des cellules de cerveau, de foie et endothéliales mir34a module l'expression de SIRT1 impactant respectivement sur la différenciation neurale, le métabolisme hépatique et la sénescence des cellules endothéliales (Yamakuchi, 2012) (figure 19).

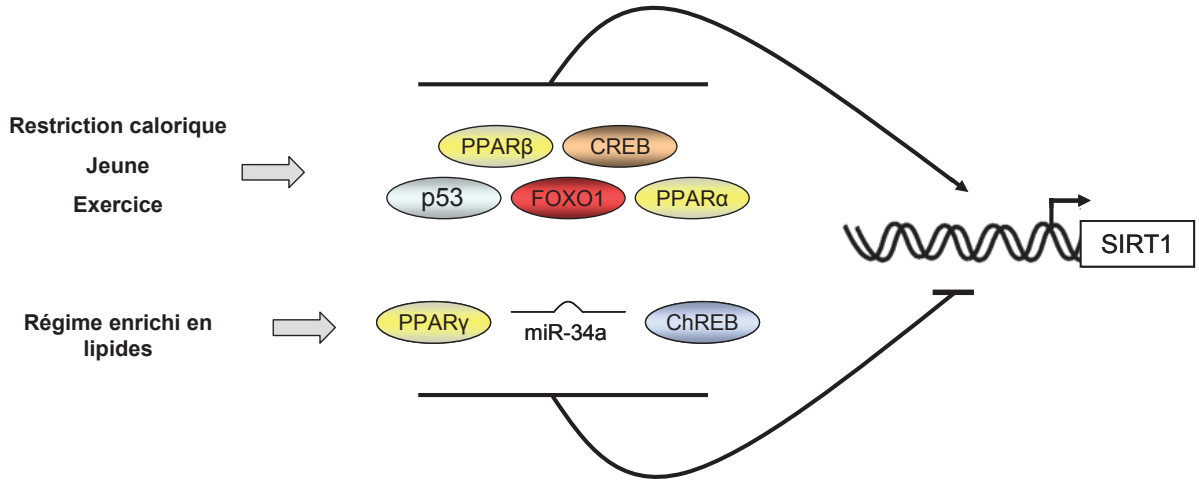


Figure 19 : Régulation de l'expression SIRT1

3.2.3. Le resvératrol

Le resvératrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) est une molécule polyphénolique présente dans de nombreuses plantes et fruits. Cette molécule a connu un regain d'intérêt en 1992 lorsqu'elle a été avancée comme la molécule responsable des effets cardioprotecteurs du vin rouge. Depuis ce jour de nombreuses études ont montré que le resvératrol permet de prévenir et de ralentir la progression de maladies tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et l'ischémie (Nakata *et al.* , 2012).

En 2003, basé sur l'idée que SIRT1 médie les effets bénéfiques de la restriction calorique notamment sur l'augmentation de la durée de vie chez la levure, l'équipe d'Howitz a recherché des molécules pouvant augmenter l'activité de SIRT1 (Howitz *et al.* , 2003). Ces études ont montré que le resvératrol est capable d'augmenter l'activité désacétylase de SIRT1 *in vitro*.

En 2006, l'analyse comparative des profils d'expression génique de souris en restriction calorique ou soumis à un régime enrichi en lipides avec administration de resvératrol, a révélé que plus de la moitié des voies régulées par la restriction calorique sont également régulées par le resvératrol (Baur *et al.* , 2006).

Ainsi, ces études ont mis en évidence la possibilité d'un lien entre restriction calorique, resvératrol et SIRT1. Dans les années suivantes, plusieurs équipes ont montré que le resvératrol augmente la quantité de protéines SIRT1 dans tous les tissus (Hu *et al.* , 2011). Confirmant l'hypothèse d'un lien entre SIRT1 et resvératrol.

Chez des souris soumis à un régime enrichi en lipides l'administration de resvératrol lutte contre l'accumulation de triglycérides dans le foie et l'insulino-résistance induite par ce régime (Lomb *et al.* , 2010, Hu *et al.*, 2011). Lorsque des souris déficientes en SIRT1 ou des souris mutées pour le site catalytique de SIRT1 sont soumis à ce régime enrichi en lipide, le resvératrol ne protège plus de l'insulino-résistance et de l'accumulation de triglycérides dans le foie (Hu *et al.*, 2011).

Ainsi les effets bénéfiques du resvératrol sur le métabolisme sont dus en partie à l'augmentation de l'activité et de l'expression de SIRT1 permettant l'augmentation du catabolisme lipidique (figure 20).

Chez des souris déficientes en AMPK, l'administration de resvératrol n'a plus d'effet bénéfique sur le métabolisme cellulaire suggérant que le resvératrol augmente l'activité et l'expression de SIRT1 *via* l'AMPK. Au contraire, dans des HepG2 et des cellules musculaires en culture, l'inhibition de l'activité SIRT1 par la nicotinamide bloque l'activation de l'AMPK par le resvératrol, suggérant que le resvératrol active l'AMPK *via* SIRT1 (Hu *et al.*, 2011). (figure 20).

Comme expliqué précédemment, l'AMPK et SIRT1 sont capables d'augmenter mutuellement leur activité enzymatique. Les études faites sur les effets du resvératrol et l'implication de SIRT1 et de l'AMPK sont contradictoires, mais attestent que l'invalidation de l'une ou l'autre de ces protéines bloque les effets bénéfiques du resvératrol.

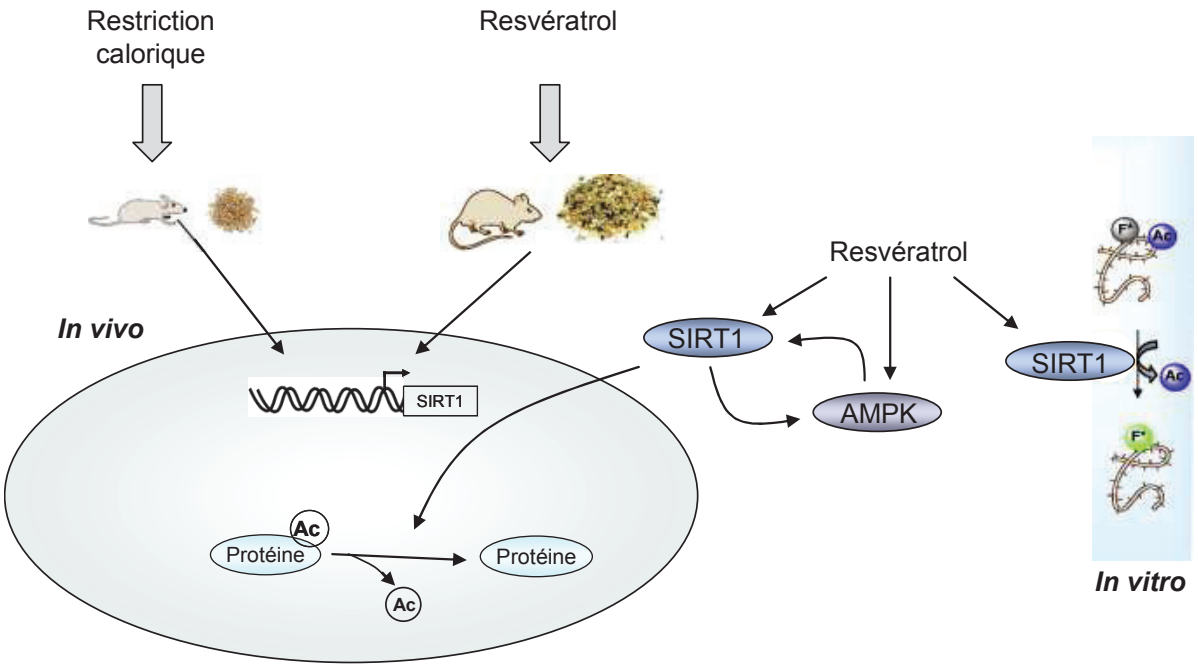


Figure 20 : Le resvératrol régule l'expression et l'activité de SIRT1.

3.3. Les principales cibles de SIRT1

En 1999, l'équipe de Guarente a montré que, chez la levure, Sir2 inhibe la transcription des gènes en désacétylant les histones H3 et H4 (Imai *et al.*, 2000). Dans des cellules humaines les mêmes observations ont été faites, la surexpression de SIRT1 augmente la désacétylation des histones H3 (Das *et al.*, 2009).

Plus récemment des études ont montré que SIRT1 module également l'acétylation et ainsi l'activité de nombreux facteurs de transcription et co-facteurs dont la liste ne cesse d'augmenter. Parmi ces facteurs on retrouve FOXO1, FOXO3, Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-α (PGC-1α), p53, NF-κB, Hypoxia Inducible Factors 2α (HIF2α), HIF1α, LXRs, SREBP-1c (Feige *et al.* , 2008, Haigis and Sinclair, 2010).

Le nombre de facteurs de transcription régulés par SIRT1 ainsi que sa capacité à réprimer l'expression génique *via* la désacétylation des histones témoignent du rôle important de cette enzyme dans les processus d'adaptation aux changements métaboliques.

3.3.1. Les histones

Chez les eucaryotes, la transcription des gènes peut être régulée par la conformation de la chromatine. Dans le noyau, l'ADN est empacté dans une structure dont l'unité de base est le nucléosome. Le nucléosome est composé de quatre associations de dimères d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) autour duquel l'ADN est enroulé. Sous cette forme empacté, l'ADN n'est pas accessible à la machinerie de transcription. Pour que l'ADN soit transcrit, la chromatine doit être sous forme « relâchée ». La structure de la chromatine est régulée par acétylation, phosphorylation, méthylation ou encore par ubiquitinylation des histones (Martinet and Bertrand, 2011, Rajendran *et al.* , 2011). L'augmentation de l'acétylation des histones favorise une structure dite « relâchée » et donc la transcription des gènes.

La désacétylation des histones H3 et H4 par SIRT1, observée chez la levure, la drosophile et dans des cellules humaines, inhibe la transcription de régions génomiques (Imai *et al.*, 2000, Das *et al.*, 2009).

Dans le noyau, SIRT1 est capable de se lier avec certains facteurs de transcription. Lorsque SIRT1 est recruté par un facteur de transcription sur une région promotrice, il peut désacétyler les histones de la région, et aussi inhiber la transcription des gènes cibles de ce facteur de transcription. SIRT1 est par exemple capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de MYOD1, en désacétylant les histones des régions ciblées par MYOD1 (Fulco *et al.* , 2003, Zhao *et al.* , 2005) (Figure 21).

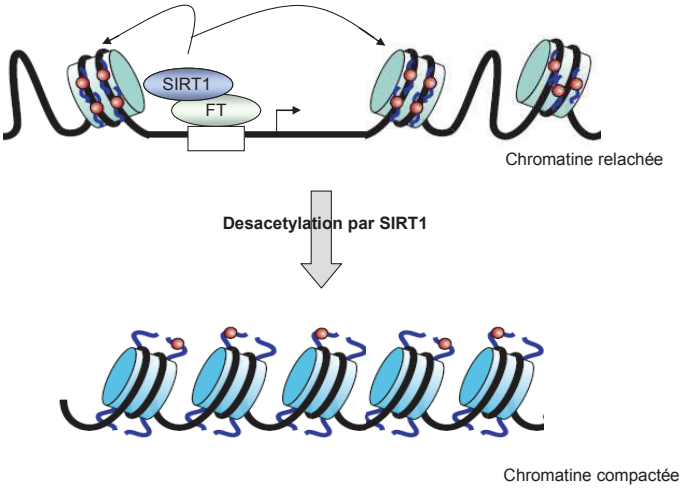


Figure 21 : Désacétylation des histones et recrutement de SIRT1.

3.3.2. Les facteurs de transcription

a) Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-α (PGC-1α)

PGC-1α est un co-activateur transcriptionnel impliqué dans le contrôle de l'homéostasie énergétique en modulant la transcription des gènes du métabolisme glucidique, lipidique, mitochondriale ou encore musculaire (Rodgers *et al.* , 2008). Ce co-activateur est exprimé dans les tissus où la dépense énergétique est élevée comme le tissu adipeux brun, le cœur, le foie et les muscles squelettiques. La protéine PGC-1α possède de nombreux domaines fonctionnels, lui permettant de créer des interactions et des complexes avec de nombreux facteurs de transcription (Figure 21).

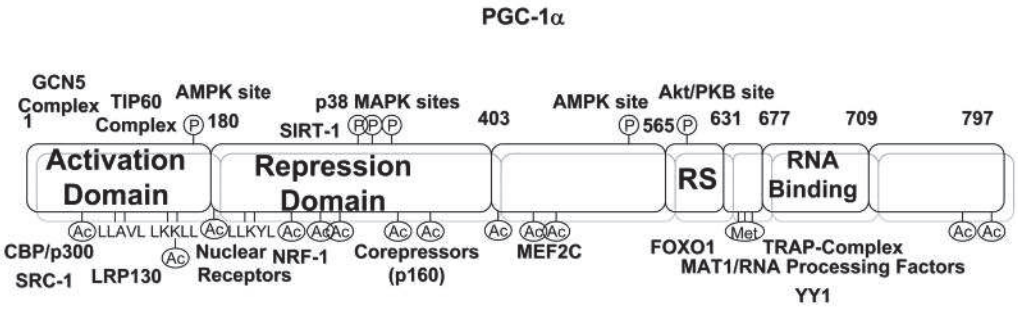


Figure 22 : Architecture de la protéine PGC-1α

D'après Rodgers et al. 2008.

La capacité de PGC-1α à réguler l'activité des facteurs de transcription en formant un complexe est modulée entre autre par son niveau d'acétylation (Rodgers *et al.*, 2008).

Dans le foie, le muscle et le tissu adipeux, SIRT1 augmente l'activité de PGC-1α directement par désacétylation (Rodgers *et al.*, 2008, Gurd, 2011). La désacétylation de PGC-1α par SIRT1 augmente ses capacités de fixation aux facteurs de transcription tels que FOXO1, HIF2α, PPARs, MEF2c ou encore Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF1) (Rodgers *et al.*, 2008) (figure 23).

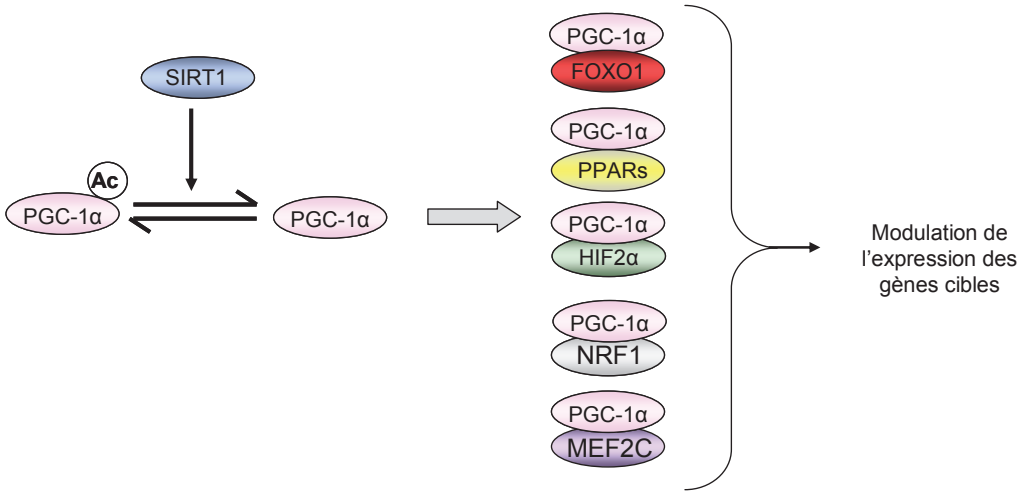


Figure 23 : Modulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription par PGC-1α.

Dans les muscles squelettiques et dans des myotubes C2C12, SIRT1 active également l'expression de PGC-1α (Amat *et al.* , 2009). Le MRF MYOD1 se fixe sur le promoteur PGC-1α permettant la fixation de SIRT1 sur ce même promoteur. En présence de MYOD1, SIRT1 interagit avec le promoteur PGC-1α et permet le recrutement de PGC-1α sur son propre promoteur (figure 24). Ainsi, SIRT1 active une boucle d'autorégulation positive de PGC-1α en présence de MYOD1 (Amat *et al.*, 2009).

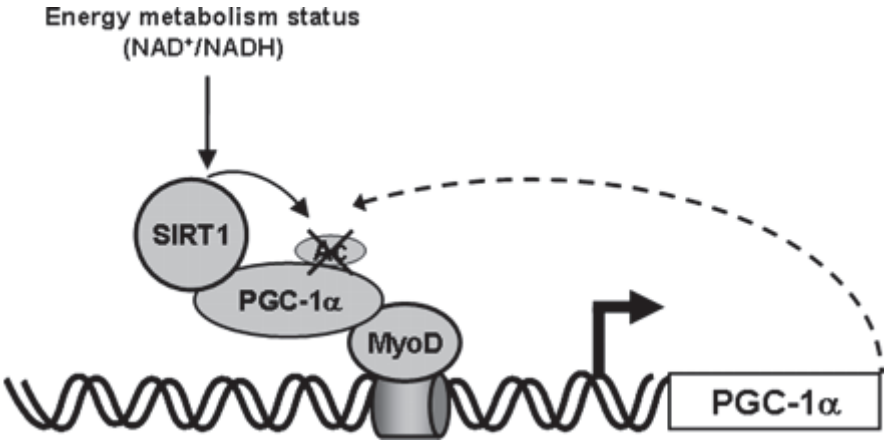


Figure 24 : SIRT1 crée une boucle d'autorégulation positive de l'expression du gène PGC-1α

d'après Amat et al. 2009

b) Les récepteurs nucléaires de classe 2

Les récepteurs nucléaires de classe 2 sont des facteurs de transcription actifs sous forme d'hétérodimères avec le récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque (RXR). Cette classe de récepteur nucléaire comprend notamment les PPARs et les LXRs (Thoresen *et al.* , 2011).

◊ *Les PPARs*

Il existe trois isoformes des PPARs : PPARα (NR1C1), PPARβ/δ (NR1C2) et PPARγ (NR1C3)

Ces facteurs de transcriptions contrôlent l'expression des gènes du métabolisme lipidique. Ils sont présents dans la plupart des tissus, cependant PPARα est principalement retrouvé dans le foie, PPARγ dans le tissu adipeux alors que PPARβ est abondamment exprimé dans tous les tissus et notamment dans le muscle squelettique (Evans *et al.* , 2004).

PPARα et β active le catabolisme lipidique en augmentant l'oxydation lipidique dans le foie, le muscle et/ou dans le tissu adipeux.

Les effets de SIRT1 sur la régulation de l'activité des PPARs sont principalement médiés par l'activation de PGC-1α (Rodgers *et al.*, 2008, Houtkooper *et al.*, 2012). La fixation de PGC-1α avec les PPARα et β augmente les effets transcriptionnels de PPAR α et β (Evans *et al.*, 2004, Picard *et al.* , 2004, Purushotham *et al.* , 2009, Houtkooper *et al.*, 2012) (figure 25).

Il existe cependant des effets directs de SIRT1 sur les PPARs, une équipe a montré que SIRT1 est capable d'interagir directement avec PPARα par fixation. Et que cette interaction augmente la transcription des gènes cibles de PPARα (Purushotham *et al.*, 2009).

A l'opposé de PPARα et β, PPARγ active l'anabolisme lipidique. Dans le foie, il active la lipogenèse et le stockage de lipides, dans le tissu adipeux il active l'adipogenèse, la lipogenèse et le stockage lipidique (Evans *et al.*, 2004) (figure 25).

Comme pour les autres PPARs, PGC-1α est capable de se fixer à PPARγ, mais cette fixation inhibe l'activité transcriptionnelle de PPARγ (Evans *et al.*, 2004, Picard *et al.*, 2004, Purushotham *et al.*, 2009, Houtkooper *et al.*, 2012). Dans des cellules adipocytaires, SIRT1 permet la formation d'un complexe répresseur impliquant le nuclear receptor co-repressor (NCoR) et le silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT). Ce

complexe se fixe au récepteur nucléaire PPARγ et bloque l'activation de la transcription des gènes cibles de PPARγ (Picard *et al.*, 2004) (figure 25).

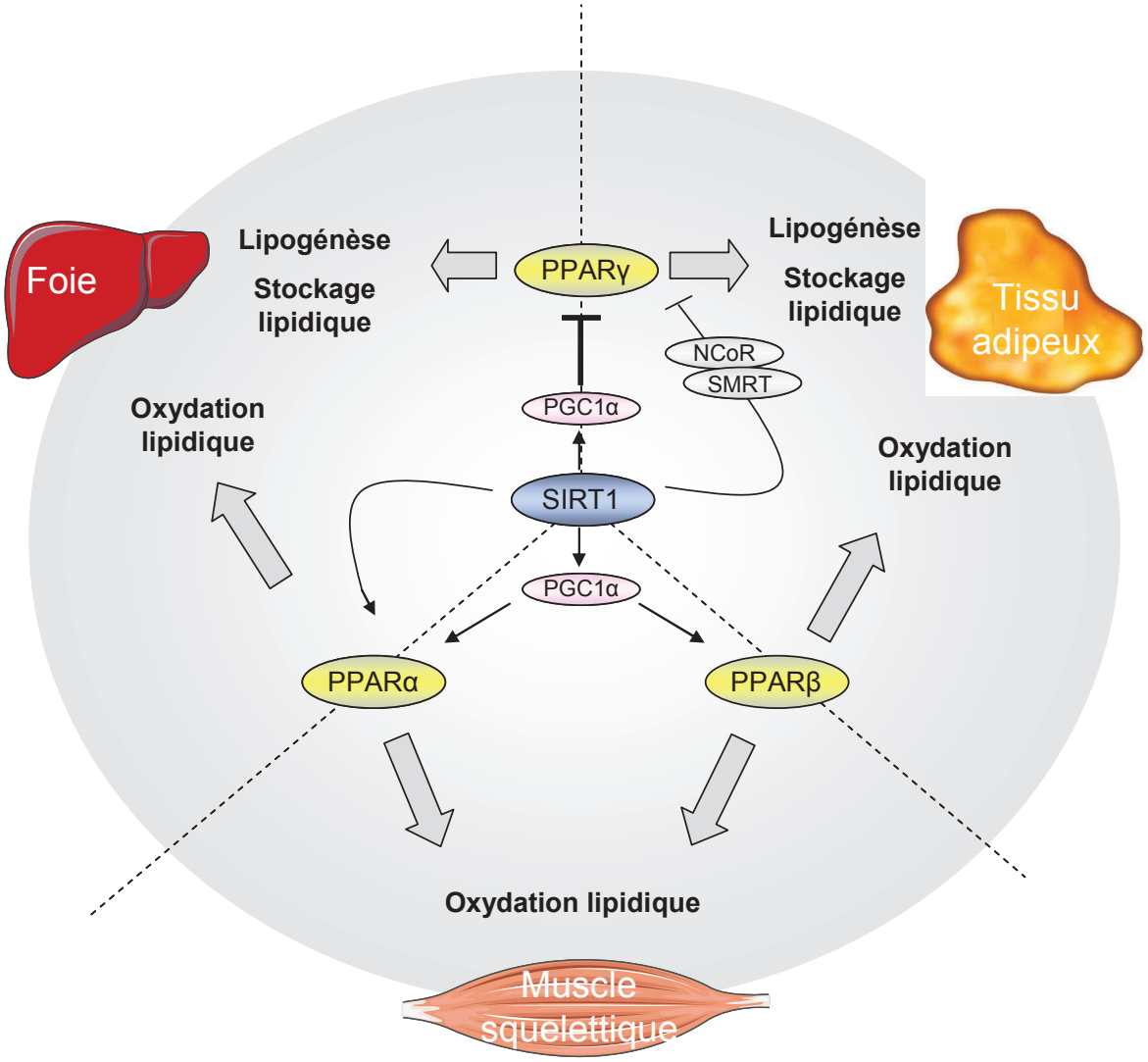


Figure 25 : SIRT1 régule l'activité transcriptionnelle des PPARs et module le métabolisme lipidique.

SIRT1, en modulant l'activité transcriptionnelle de PPARα/β et γ, adapte l'utilisation et le stockage des lipides aux conditions énergétiques. En réponse à l'exercice physique, le jeûne et la restriction calorique, SIRT1 favorise l'oxydation lipidique. A l'inverse, un régime enrichi en lipides inhibe l'activité et l'expression de SIRT1 favorisant ainsi le stockage lipidique et la lipogenèse (Evans *et al.*, 2004, Picard *et al.*, 2004, Purushotham *et al.*, 2009, Houtkooper *et al.*, 2012).

◊ *LXRs (Liver X Receptors)*

Il existe deux isoformes des LXR, LXRα et LXRβ. LXRα est fortement exprimé dans le foie et le tissu adipeux alors que LXRβ a une expression constitutive et ubiquitaire (Peet *et al.* , 1998). Les LXRs sont des facteurs clés du contrôle de l'anabolisme lipidique en activant l'expression d'enzymes lipogéniques (Ducheix *et al.* , 2011). Dans le foie, les LXRs activent la synthèse des acides gras et des triglycérides en augmentant la transcription des gènes SREBP1c, ACC, SCD1, FAS, GPAT, DGAT. Ils sont également impliqués dans le métabolisme glucidique en augmentant l'expression de la Liver-Pyruvate Kinase (L-PK), de la GK et du transporteur de glucose GLUT4 en réponse à l'insuline (Ducheix *et al.*, 2011). Dans des myotubes humains en culture, l'activation des LXRs régule le métabolisme glucidique en augmentant la captation et l'oxydation du glucose, et régule le métabolisme lipidique en augmentant la lipogénèse, la captation d'acides gras et l'accumulation de triglycérides (Thoresen *et al.*, 2011) (figure 26).

Les protéines LXRα et β sont des cibles de SIRT1. Des études faites dans des HEK293 et des hépatocytes de souris déficientes en SIRT1 montrent que SIRT1 désacétyle les LXRs et augmente l'expression de leurs gènes cibles (Li *et al.*, 2007). La désacétylation des LXRs permet leur ubiquitinylation au niveau de la lysine (auparavant acétylé) et la prise en charge par le protéasome pour sa dégradation. Paradoxalement, l'augmentation de la dégradation des LXRs augmente la transcription des gènes cibles des LXRs, en augmentant le recrutement de nouvelles protéines LXRs sur les promoteurs de ses gènes cibles (Li *et al.*, 2007) (figure 26).

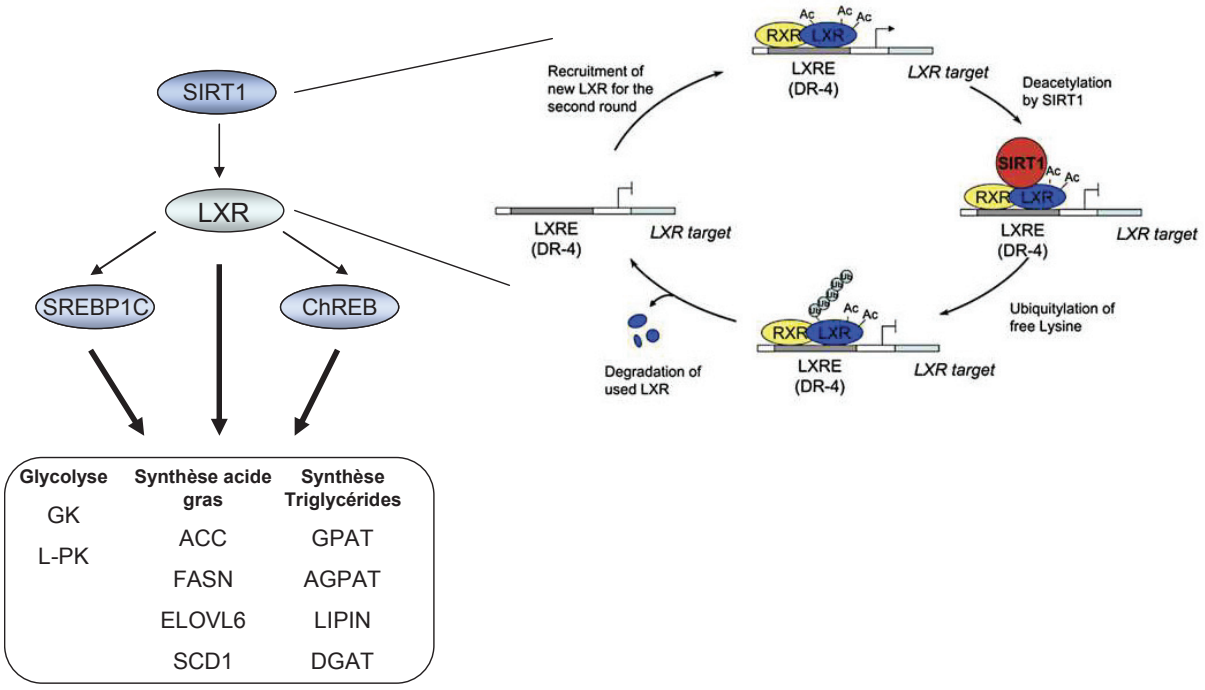


Figure 26 : Régulation de l'activité transcriptionnelle des LXRs par SIRT1 dans le foie.

D'après Li et al. 2007.

c) FOXOs

Les facteurs de transcriptions FOXOs sont impliqués notamment dans l'atrophie musculaire et le métabolisme glucidique, leur activité est régulée par modification post traductionnelles. Sous forme phosphorylée, les facteurs de transcription FOXOs sont localisés dans le cytoplasme où ils sont inactifs. Lorsqu'ils ne sont pas phosphorylés ils sont localisés dans le noyau où ils vont activer l'expression de gènes cibles (Nakae *et al.*, 2008). L'activité des facteurs FOXOs est également régulée par leurs niveaux d'acétylation. Les effets de la désacétylation des facteurs de transcription FOXOs sur leur activité sont encore débattus.

Dans des hépatocytes, la surexpression de SIRT1 augmente la localisation nucléaire de FOXO1 permettant la transcription des gènes cibles de FOXO1 (Frescas *et al.* , 2005).

D'autres études montrent que la désacétylation de PGC-1α par SIRT1, permet la formation d'un complexe PGC-1α-FOXO1 (Puigserver *et al.* , 2003). Sous cette forme de complexe, la phosphorylation de FOXO1 par Akt est inhibée (Matsuzaki *et al.* , 2005). Donc *via* PGC-1α, SIRT1 augmente l'activité transcriptionnelle de FOXO1 en bloquant sa phosphorylation (Puigserver *et al.*, 2003).

Dans des cellules Hela, la surexpression de SIRT1 inhibe l'activité de FOXO3 directement par désacétylation (Motta *et al.* , 2004). L'équipe de Wang a montré dans ce même modèle que la désacétylation de FOXO3 par SIRT1 induit l'ubiquitinylation de FOXO3 et sa dégradation par le système UPS (Wang *et al.* , 2012). Ainsi l'activité et la quantité de protéines FOXO3 sont diminuées par SIRT1.

Dans le muscle squelettique de souris, l'électroporation de plasmides codant pour l'acetyl transférase p300 augmente l'acétylation de FOXO1 et 3. Cette étude montre que l'acétylation de FOXO3 par p300 diminue son activité alors que l'acétylation de FOXO1 augmente son activité (Senf *et al.* , 2011).

Dans des myotubes de rat, l'atrophie induite par la dexaméthasone s'explique en partie par une augmentation de l'acétylation et de l'activité transcriptionnelle de FOXO1. L'ajout de resvératrol à des cellules traitées à la déxamethasone diminue l'atrophie musculaire en désacétylant FOXO1 (Alamdari *et al.* , 2012). De plus si l'expression de SIRT1 est inhibée par des siRNA les effets bénéfiques du resvératrol sur l'atrophie musculaire sont annulés. Donc, dans des myotubes murins, SIRT1 inhibe l'atrophie en inhibant par désacétylation FOXO1 (Alamdari *et al.*, 2012).

Chez des souris transgéniques surexprimant PGC-1α spécifiquement dans le muscle l'activation de FOXO3 par la dénervation est abolie (Sandri *et al.* , 2006). Ainsi, en activant l'expression de PGC-1α SIRT1 inhibe l'activité FOXO3.

D'après ces études, SIRT1 diminue l'activité des facteurs de transcription FOXO3 dans le muscle et le foie, alors qu'il augmente l'activité FOXO1 dans le foie et diminue l'activité FOXO1 dans le muscle squelettique (figure 27).

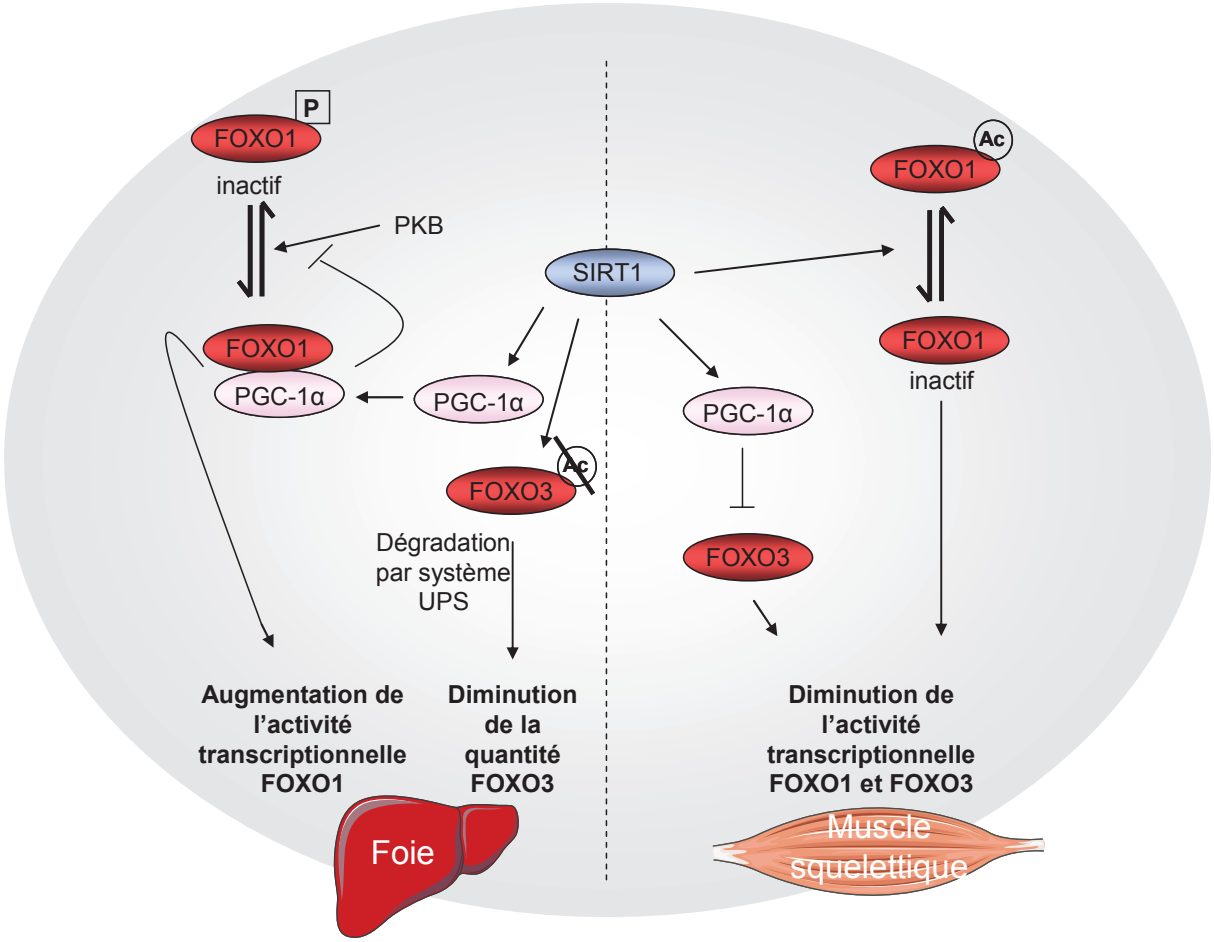


Figure 27 : Régulation des facteurs de transcription FOXOs par SIRT1.

d) Les Hypoxia Inducible Factors (HIF)

La famille HIF comprend 3 isoformes HIFα (HIF1α HIF2α et HIF3α) et trois isoformes HIFβ (HIF1β, HIF2β et HIF3β). Les HIFs sont des facteurs de transcription permettant une réponse transcriptionnelle aux situations de stress hypoxique.

Les HIFs possèdent un domaine permettant l'hétérodimérisation entre une sous unité HIFα O2-labile et une sous unité HIFβ stable (Semenza, 2012). Sous cette forme d'hétérodimère, ils modulent l'expression de leurs gènes cibles en se fixant sur les motifs Hypoxia Response Element des séquences promotrices (Keith *et al.* , 2012).

Le principal rôle chez les vertébrés d'HIF1α est d'activer la transition du métabolisme oxydatif vers un métabolisme glycolytique en régulant l'expression de la pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), la lactate dehydrogenase A (LDHA), l'HK, la phospho fructo kinase (PFK), la BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 (BNIP3) et la

BNIP3 like (BNIP3L). Au contraire, HIF2α réprime le métabolisme glycolytique en régulant l'expression de ces mêmes gènes (Semenza, 2012).

Dans des hépatocytes, SIRT1 réprime l'expression des gènes de la glycolyse en réprimant l'activité d'HIF1α par désacétylation. (Kim *et al.* , 2006, Keith *et al.*, 2012).

Dans des myotubes humains et dans des hépatocytes, la surexpression de SIRT1 augmente l'activité de HIF2α par désacétylation. Au contraire, l'utilisation de siRNA SIRT1 diminue l'activité d'HIF2α (Rasbach *et al.* , 2010, Chen *et al.* , 2012a).

De plus, dans des myotubes, SIRT1 active l'expression d'HIF2α via l'activation de PGC-1α (Rasbach *et al.*, 2010).

Dans des conditions de stress hypoxique, l'expression et l'activité de SIRT1 sont diminuées ainsi dans ces conditions HIF1α est actif et HIF2α inactif permettant l'activation du métabolisme glycolytique. A l'inverse, dans des conditions non-hypoxiques, l'activité de SIRT1 bloque l'activation du métabolisme glycolytique en inactivant et activant respectivement HIF1α et HIF2α (Lim *et al.* , 2010) (figure 28).

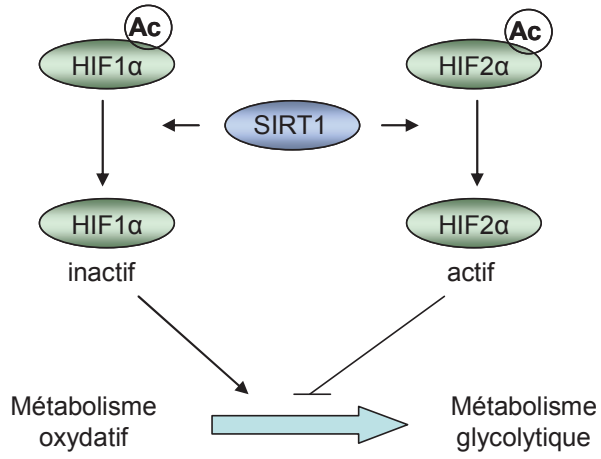


Figure 28 : Régulation de l'activité transcriptionnelle de la voie HIF par SIRT1.

3.4. Les rôles de SIRT1 dans le muscle squelettique

3.4.1. SIRT1 inhibe la différenciation musculaire

In vitro lors de la différenciation de myoblastes en myotubes, le ratio NAD+/NADH et l'expression de SIRT1 diminue suggérant que la diminution de l'activité SIRT1 est nécessaire pour permettre la différenciation musculaire (Fulco *et al.*, 2003). En effet la surexpression de SIRT1 dans des myoblastes inhibe leur différenciation en myotube en inhibant l'expression des gènes de la contraction, de la structure et du métabolisme musculaire (tableau 4). Ces résultats mettent également en avant l'inhibition de facteurs de la régulation de la différenciation comme MEF2C et MYOG (tableau 4). A l'inverse, l'inhibition de SIRT1 par des siRNA active le programme de différenciation musculaire de myoblastes de souris et de myoblastes humain en culture primaire (Fulco *et al.* , 2008).

La différenciation musculaire est initiée par un programme génique dont l'un des principaux acteurs est MYOD1. Pour être pleinement actif, MYOD1 est acétylé par l'acetyl transférase P300/CBP-Associated Factor (PCAF) et SIRT1 régule l'activité transcriptionnelle de MYOD1 en modulant son niveau d'acétylation (Sartorelli *et al.* , 1999). Pour ces raisons, l'équipe de Fulco a étudié l'impact de la surexpression de SIRT1 sur l'activité transcriptionnelle de MYOD1. Par des méthodes de cosurexpression et d'immuno précipitation de chromatine (CHIP) dans des cellules musculaires, ils ont montré que SIRT1 inhibe l'activité transcriptionnelle de MYOD1 par la formation d'un complexe PCAF/MYOD1/SIRT1 (Fulco *et al.*, 2003). Le complexe MYOD1/SIRT1/PCAF se fixe sur les régions promotrices des gènes cibles de MYOD1 dont la myogénine et la myosine, et agit en désacétylant les histones de ces régions, et ainsi l'inhibition de l'expression de ces gènes (Fulco *et al.*, 2003).

	SIRT1 overexpression	
Structural-Cytoskeletal	12hr*	36hr*
L48989: troponin T3, skeletal, fast	−4	
AJ242874: slow skeletal muscle troponin I (Tnni1 gene)	−2	
M29793: slow/cardiac troponin C (cTnC)	−3.26	
L47600: troponin T isoform A3b mRNA	−2.5	
M91602: myosin light chain 2		−6.5
M19436: myosin light chain, alkali, cardiac atria	−2.2	
AJ002522: myosin heavy chain 2X	−4.5	−2.6
M12289: myosin heavy chain, skeletal muscle, perinatal		−2
M74753: myosin heavy chain, skeletal muscle, embryonic	−2	−3.3
X12973: myosin alkali light chain (exon 1) (fast skeletal muscle isoform)	−2	
U68267: myosin binding protein H (MyBP-H)	−3	
M15501: actin, α, cardiac	−4.4	
M12347: actin, α1, skeletal muscle	−3.26	
AF093775: α-actinin 3 (Actn3)	−2	−2.3
AJ011118: skeletal muscle and cardiac protein		−2.2
X13297: vascular smooth muscle α-actin		
AJ223362: Mus musculus mRNA for slow myosin heavy chain-β		−2
L38971: integral membrane protein 2		−3.3

* **Average fold change at 12 and 36 hours in differentiation medium relative to control cells.**

Tableau 4 : Protéines sarcomériques réprimés par SIRT1

D'après Fulco et al. 2003.

L'activité transcriptionnelle de MEF2C est également réprimée par SIRT1 (Zhao *et al.*, 2005). La désacétylation de la lysine en position 424 de MEF2C par SIRT1 permet la sumoylation de MEF2C sur la lysine 424 par un complexe Ubc9 (SUMO E2 conjugating enzyme) / HDAC4. Cette sumoylation inhibe l'activité transcriptionnelle de MEF2 (Zhao *et al.*, 2005).

La restriction glucidique inhibe également la différenciation musculaire. En 2008, des études *in vitro* ont montré que l'inhibition de la différenciation de myoblastes par la restriction glucidique est due à l'activation de SIRT1 par l'AMPK (Fulco *et al.*, 2008, Suwa *et al.* , 2011). En effet, lorsque l'activité de l'AMPK est inhibée, les cellules C2C12 en restriction calorique se différencient normalement. De même, lorsque l'activité de SIRT1 est inhibé par la nicotinamide les cellules en restriction glucidique se différencient normalement malgré l'activation de l'AMPK (Fulco *et al.*, 2008). De plus, la restriction calorique sur des myoblastes primaires dérivés de souris hétérozygotes SIRT1 sont résistants à l'inhibition de la différenciation induite par la restriction glucidique (Fulco *et al.*, 2008) (figure 29).

Dans des cellules musculaires en réponse à la restriction calorique, SIRT1 inhibe le programme de différenciation des myoblastes en inhibant l'activité transcriptionnelle de MYOD1 et probablement en inhibant l'expression de MEF2C et MYOG (Fulco *et al.*, 2003).

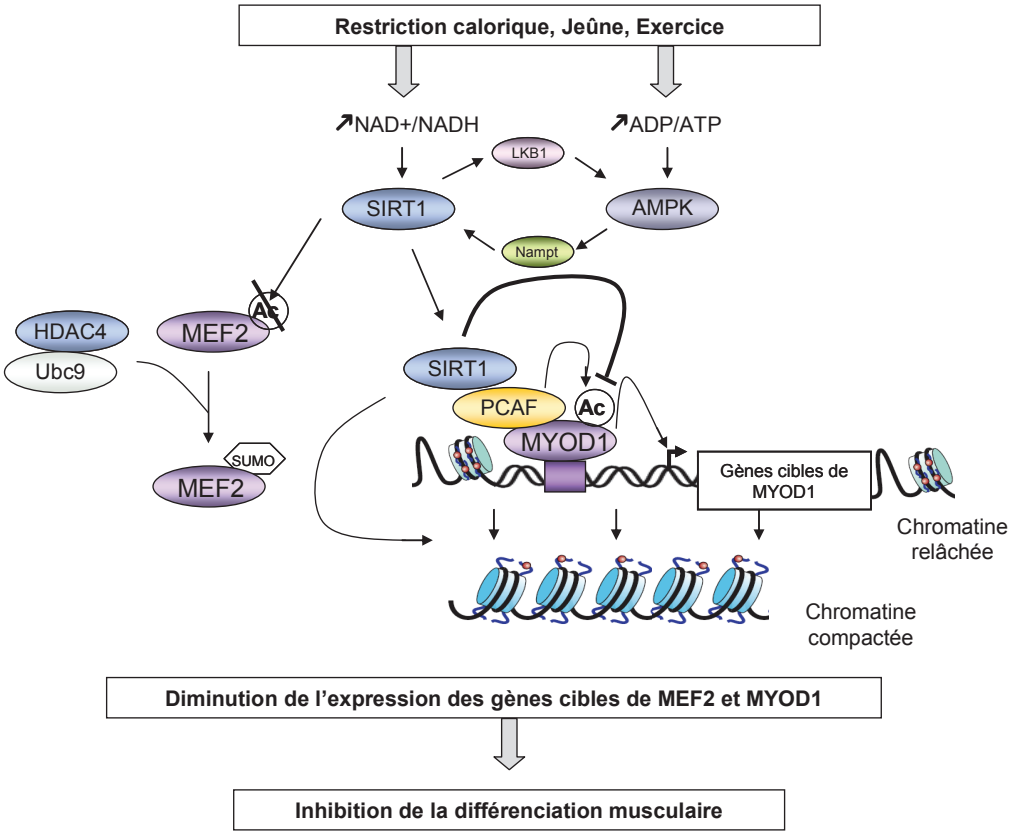


Figure 29 : Régulation de la différenciation musculaire par SIRT1.

3.4.2. SIRT1 module la masse musculaire

Dans le muscle squelettique, l'augmentation de l'expression et de l'activité de SIRT1 par le resvératrol inhibe l'activité transcriptionnelle de FOXO1 par désacétylation (Alamdari *et al.*, 2012). Le traitement à la dexaméthasone de myotubes de rat induit une forte atrophie musculaire *via* en partie l'augmentation de l'activité transcriptionnelle par acétylation de FOXO1. Le traitement de ces cellules avec du resvératrol diminue l'atrophie musculaire et l'acétylation de FOXO1. Et lorsque ces cellules sont traitées préalablement avec des siRNA, inhibant spécifiquement l'expression de SIRT1, l'atrophie musculaire observée ainsi que l'acétylation de FOXO1 n'est plus réprimée (Alamdari *et al.*, 2012).

Donc SIRT1 permet de lutter contre l'atrophie musculaire en réprimant l'activité transcriptionnelle de FOXO1.

Chez des souris transgéniques surexprimant PGC-1α spécifiquement dans le muscle l'activation de FOXO3 par la dénervation est abolie (Sandri *et al.*, 2006). Ainsi, SIRT1 en activant l'expression de PGC-1α, lutte contre l'atrophie musculaire en inhibant FOXO3.

Dans le muscle, la voie NFκB est une des voies impliquées dans la perte de masse musculaire dans des conditions physiologiques et physiopathologiques (Bakkar and Guttridge, 2010). L'activation de la voie NFκB active la dégradation des protéines musculaires, l'inflammation et bloque la régénération des myofibres (Li *et al.* , 2008). La voie de signalisation classique de NFκB est activée par le TNFα permettant l'activation des facteurs de transcription p50 et p65, formant un dimère capable de moduler l'expression des gènes impliqués dans l'atrophie musculaire. De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de la voie NFκB dans le dévelopement de la dystrophie de Duchenne. Par exemple il a été montré que l'inhibition de la voie NFκB chez des souris muscular dystophy X linked (mdx) permet de lutter contre la perte de masse musculaire (Li *et al.*, 2008, Bakkar and Guttridge, 2010).

Des études faites dans des cellules rénales et épithéliales ont montré que SIRT1 désactyle p65 diminuant ainsi son activité transcriptionnelle (Yeung *et al.* , 2004). Dans cette même étude, ils ont montré que SIRT1 est retrouvée au niveau du promoteur du gène cellular Inhibitor of Apoptosis 2 (cIAP2) qui est une cible de NFκB. Ainsi SIRT1 inhibe l'activité transcriptionnelle de p65 en le désacétylant et en désacétylant les histones H3 des promoteurs de ses gènes cibles comme cIAP2 (Yeung *et al.*, 2004, Salminen and Kaarniranta, 2009). D'autres travaux montrent que l'administration de resvératrol chez des souris mdx permet de lutter contre la perte de muscle (Hori *et al.* , 2011).

Par conséquent, ces différentes études suggèrent que l'augmentation de l'activité et de l'expression de SIRT1, par exemple par le resvératrol, pourrait lutter contre la perte de masse musculaire observée chez des patients atteints de dystrophie de Duchenne. Ce qui envisage un nouveau rôle de SIRT1 dans la régulation de la masse musculaire *via* l'inhibition de la voie NFκB.

A ce jour aucune étude n'a montré l'impact direct de l'activation de SIRT1 sur l'atrophie musculaire. Les résultats actuels ont essentiellement démontré les effets de l'activation de SIRT1 sur l'adaptation du métabolisme musculaire en modifiant le type de fibre plutôt que sur la régulation de la masse musculaire elle-même. Cependant étant donné les effets de SIRT1 sur la voie NFκB, sur les FOXOs et sur les MRFs, il semble très probable que SIRT1 a un effet sur la régulation de la masse musculaire, et malgré l'inhibition des MRFs, il semblerait que SIRT1 ai plutôt un rôle anti atrophique.

3.4.3. Régulation du métabolisme énergétique musculaire

a) Métabolisme lipidique

Le muscle squelettique participe au métabolisme lipidique global en utilisant les acides gras comme substrat énergétique et en stockant les acides gras sous forme de triglycérides. L'utilisation des acides gras comme substrat énergétique est particulièrement importante lorsque les substrats préférentiels du muscle (glycogène et glucose) diminuent, au cours d'un jeûne, de la restriction calorique ou d'exercice en endurance (sans apports calorique), ceci afin de maintenir les fonctions musculaires sans impacter le taux de glucose sanguin (Lomb *et al.*, 2010, Watt and Hoy, 2012). En réponse à la disponibilité en substrats énergétiques le métabolisme lipidique musculaire va être régulé, cette régulation passe essentiellement par la modulation de l'expression et/ou de l'activité des enzymes impliquées dans le transport lipidique, l'oxydation lipidique, le stockage d'acides gras sous forme d'IMTG ou encore la synthèse *de novo* d'acides gras.

SIRT1, de part sa fonction de senseur énergétique, joue un rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique en réponse aux modifications des réserves énergétiques.

Dans des myotubes C2C12 l'administration d'acide α lipoïque (ALA) augmente le ratio NAD+/NADH et donc augmente l'activité SIRT1 (Chen *et al.* , 2012b). Dans cette étude les auteurs ont montré que l'ALA augmente l'activité de SIRT1, la phosphorylation de l'AMPK et la désacétylation de LKB1, formant une boucle d'activation de SIRT1 (Fulco *et al.*, 2008, Lan *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2012b). Dans des myotubes C2C12, l'accumulation d'IMTG, provoquée par l'incubation en milieu enrichi en glucose, est diminuée par l'activation de SIRT1 par l'ALA. Cette étude montre que SIRT1 lutte contre l'accumulation de triglycérides en augmentant l'oxydation lipidique et en inhibant la synthèse de novo (Chen *et al.*, 2012b). *In vivo*, chez des souris soumises à un régime enrichi en lipides, l'activation de SIRT1 par le resvératrol diminue l'accumulation d'IMTG en augmentant la β-oxydation et la captation de lipides (Chen *et al.* , 2011, Chen *et al.*, 2012b).

L'activation de l'expression et de l'activité de SIRT1 par des exercices physiques prolongés, le jeûne, la restriction calorique ou encore par le traitement au resvératrol ou à l'ALA, augmente l'utilisation des acides gras comme substrats énergétiques, permettant de

lutter contre l'accumulation de lipides et l'appartition de désordres métaboliques (Purushotham *et al.*, 2009, Gurd, 2011, Houtkooper *et al.*, 2012).

SIRT1 va agir à plusieurs niveaux pour augmenter l'utilisation des lipides. SIRT1 augmente la captation des acides gras et la lipolyse des triglycérides en augmentant l'expression de la lipase Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) et de Cluster of Differentiation 36 (CD36) appelé également Fatty Acid Transporter (FAT) (Chen *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2012b).

Dans le muscle squelettique, l'activation de PGC-1α par SIRT1 favorise l'entrée des acides gras dans le sarcoplasme et la β oxydation en augmentant l'expression et/ou l'activité de la Carnitine palmitoyltransferase I (CPT1), de la Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) et de la Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD) (Wu *et al.* , 1999, Gerhart-Hines *et al.* , 2007, Chen *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2012b)

La β oxydation permet d'obtenir des acetyl-CoA qui vont être utilisés par le cycle de Krebs. Pour entrer dans le cycle de Krebs, la citrate synthase (CS), dont l'activité est également augmentée par l'activation de PGC-1α par SIRT1, va catalyser la formation de citrate à partir d'une molécule d'oxaloacétate et d'acetyl-CoA (Gerhart-Hines *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2011).

Outre l'augmentation de la captation et de l'oxydation des lipides, SIRT1 augmente également les capacités oxydatives de la mitochondrie. Il augmente l'utilisation des co-facteurs réduits en activant l'expression du cytochrome C, des cytochromes oxydase II et IV, Cox5b de la chaine respiratoire mitochondriale (Chen *et al.*, 2011). SIRT1 active également la biogénèse mitochondriale en augmentant l'activité du facteur NRF1, NRF2 et mitochondrial Transcription Factor A (mtTFA), permettant la réplication de l'ADN mitochondriale (Wu *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2012b, Price *et al.* , 2012). Des études dans des myotubes C2C12 montrent que SIRT1 active PGC-1α augmentant l'activité transcriptionnelle mais pas l'expression de NRF1/2, ainsi SIRT1 active l'expression des gènes de la biogenèse mitochondriale en activant PGC-1α (Wu *et al.*, 1999, Gerhart-Hines *et al.*, 2007).

A l'inverse NCoR1 est un co répresseur de l'expression des gènes mitochondriaux. (Houtkooper *et al.*, 2012). Son activité est augmentée par un régime enrichi en lipides et est diminuée par la surexpression de PGC-1α ou de SIRT1 (Yamamoto *et al.* , 2011).

Ainsi, dans des conditions de restriction calorique et de jeûne, SIRT1 active PGC-1α et PPARα favorisant l'oxydation lipidique en augmentant la quantité et les capacités oxydatives des mitochondries (Gurd, 2011) (figure 30).

Dans le muscle squelettique, SIRT1 agit sur le métabolisme lipidique à plusieurs niveaux, il augmente la captation lipidique, l'oxydation lipidique, les capacités oxydatives des mitochondries, et diminue également l'anabolisme lipidique. En effet, dans des myotubes en culture il est admis que l'augmentation du milieu en glucose provoque une accumulation de triglycérides provenant de la synthèse *de novo* des acides gras. Ainsi, il n'est pas étonnant d'observer une inhibition de la synthèse d'acides gras par SIRT1 qui est activée au cours de la restriction calorique. Dans des myotubes en culture, SIRT1 inhibe également la synthèse des acides gras en réprimant l'expression de la FAS et via l'activation de l'AMPK inhibe l'activité de l'ACC par phosphorylation. SREBP-1 est un inducteur fort de la synthèse lipidique, à ce titre, il a été montré que chez des souris soumis à un régime enrichi en lipides l'augmentation de l'expression de SREBP-1c est en partie responsable de l'accumulation de lipides dans le foie (Shimano *et al.* , 1997a, Shimomura *et al.* , 1999a, Leavens *et al.* , 2009). Etant donné que l'augmentation de l'activité de SIRT1 lutte contre l'accumulation de lipides dans le foie et dans les muscles squelettiques et que dans le foie SIRT1 inhibe l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c, il est envisageable que SIRT1 inhibe l'anabolisme lipidique en inhibant SREBP-1c et que ce même mécanisme soit retrouvé dans le muscle squelettique.

b) Métabolisme glucidique

Dans le muscle, en réponse à l'exercice et à la restriction calorique, SIRT1 augmente l'expression et l'activité de PGC-1α, participant à l'augmentation de l'expression et de la translocation membranaire du transporteur Glut4 (Michael *et al.* , 2001, Suwa *et al.*, 2011).

L'exercice physique augmente l'activité d'HKII parallèlement à l'expression de PGC-1α et à l'expression et l'activité de SIRT1 (Suwa *et al.* , 2008). Les mêmes auteurs montrent que l'injection 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) (activateur de l'activité de l'AMPK) dans l'EDL de rat augmente l'expression de SIRT1, de PGC-1α ainsi que l'activité de l'héxokinase II (Suwa *et al.*, 2011). Ils posent donc l'hypothèse que

SIRT1 *via* PGC-1α augmente l'activité d'HKII. Une fois dans la cellule musculaire, le glucose sera stocké ou oxydé. Les travaux de Gehart-Hines montre que SIRT1 diminue l'oxydation du glucose, d'une part en inhibant la Phospho-Fructo Kinase (PFK) et Pyruvate Kinase (PK) ; et d'autre part en activant PGC-1α qui augmente l'expression de la Pyruvate Dehydrogenase lipoamide Kinase 4 (PDK4) enzyme inhibitrice de l'activité de la Pyruvate Dehydrogenase (PDH) et donc inhibe l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs (Wende *et al.* , 2005, Gerhart-Hines *et al.*, 2007) (figure 30).

Ainsi, parallèlement à l'augmentation de l'oxydation lipidique, SIRT1 inhibe la glycolyse tout en augmentant la captation de glucose et donc probablement le stockage du glucose sous forme de glycogène.

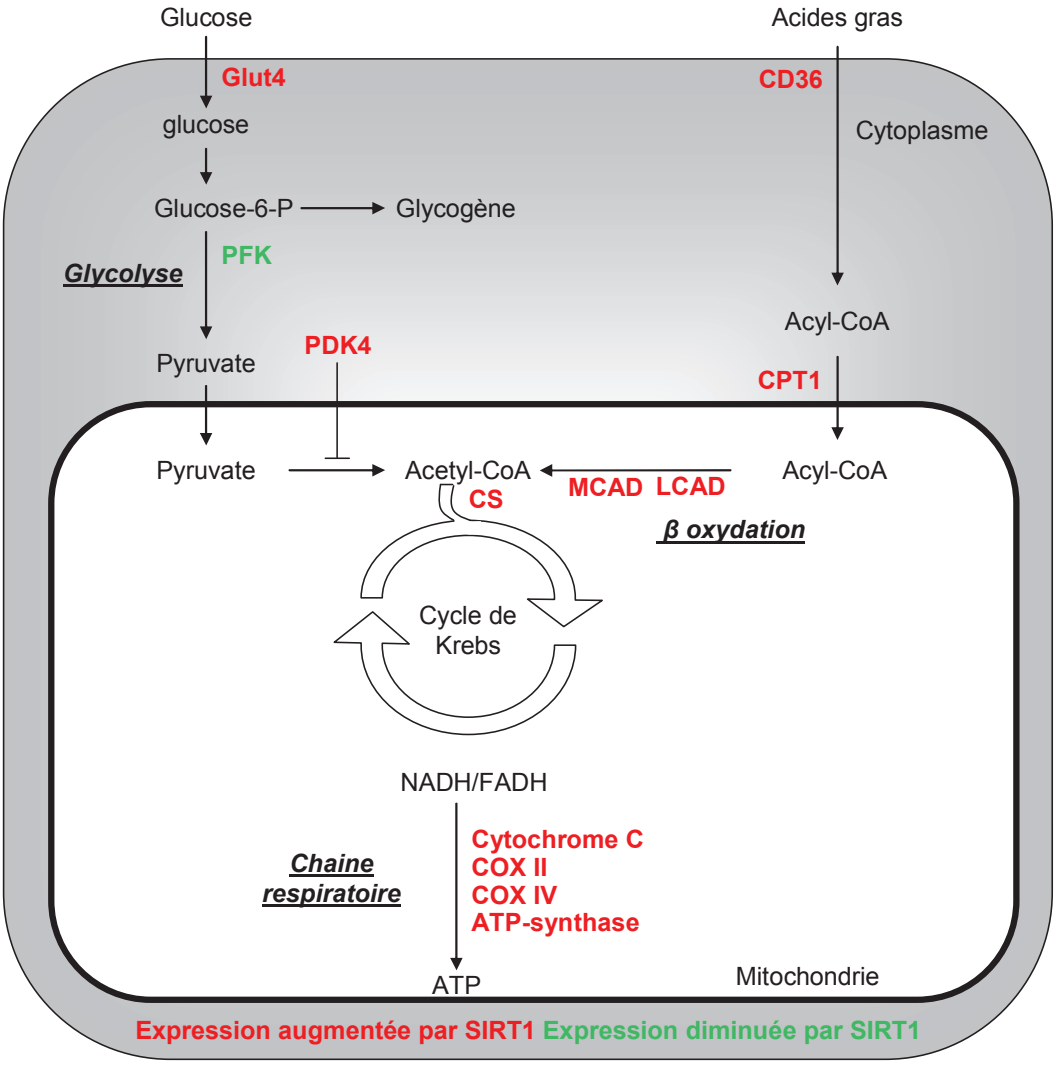


Figure 30 : Régulation du métabolisme lipidique et glucidique par SIRT1dans le muscle.

3.4.4. Action sur le type de fibre

En réponse à l'activité physique, les muscles squelettiques s'adaptent en modifiant leur composition fibrillaire. Le type de fibre va évoluer d'un type II, dite fibre rapide glycolytique, vers un type I, dite fibres lentes oxydatives (Suwa *et al.*, 2011). Les fibres musculaires sont classées en quatre type chez les mammifères en fonction de leur composition en myosine et de leurs capacités oxydatives (Gundersen, 2011).

Comme expliqué précédemment, l'augmentation de l'activité et de l'expression de SIRT1 dans le muscle va augmenter les capacités oxydatives du muscle en augmentant la quantité de mitochondries. SIRT1 *via* PGC-1α augmente les capacités oxydatives des myotubes, caractéristiques des fibres de type I (Wu *et al.*, 1999, Suwa *et al.*, 2011).

In vivo dans le muscle squelettique, l'expression de PGC-1α et de SIRT1 est plus élevée dans les muscles composés majoritairement de fibres de type I (Holloszy, 2008, Gibala, 2009, Gurd, 2011, Gurd *et al.* , 2011)

La génération de souris transgéniques exprimant PGC-1α spécifiquement dans les fibres musculaires de type II a permis d'identifier le rôle de PGC-1α dans la conversion des fibres de type II en type I (figure 31). Les souris transgéniques ont intégré une séquence d'ADN permettant l'expression de PGC-1α sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase qui est essentiellement exprimé dans les fibres de type II. Ainsi ces souris transgéniques expriment fortement PGC-1α dans le *plantaris*, riche en fibre de type II, alors qu'il n'est pas détectable dans le *soleus* riche en fibre I (Lin *et al.* , 2002). Cette étude montre que PGC-1α augmente l'expression des enzymes mitochondriales augmentant les capacités oxydatives du muscle et augmente l'expression des protéines sarcomériques spécifiques des fibres de type I, comme la myoglobine et la troponine de type I (Lin *et al.*, 2002).

A l'inverse, des souris déficientes en PGC-1α spécifiquement dans le muscle squelettique ont une composition plus importante en fibre de type II. Suite à des exercices d'endurance ces souris présentent une inflammation accompagnée de dommages musculaire (Handschin *et al.* , 2007). Dans des conditions d'exercice en endurance PGC-1α est primordiale dans le processus d'adaptation du muscle squelettique.

HIF2a dont l'expression est augmentée par PGC-1α a été identifié comme un facteur clé pour la transition des fibres « rapides » de type II vers des fibres « lentes » de type I

(figure 31). La surexpression de HIF2α dans des myotubes en culture primaire augmente l'expression de la MHCI, de la myoglobine et de la troponine I et inhibe l'expression de MHCIIa et MHCIIb (Rasbach *et al.*, 2010). Le traitement de myotubes avec un inhibiteur de l'activité SIRT1 comme la nicotinamide diminue l'expression de HIF2α par PGC-1α (Rasbach *et al.*, 2010). SIRT1 est également capable d'augmenter l'activité de HIF2a directement par désacétylation (Chen *et al.*, 2012a).

Ainsi en réponse à l'exercice, l'augmentation de l'expression de SIRT1 dans le muscle squelettique induit une transition des fibres de type II glycolytiques vers des fibres de types I oxydatives en augmentant notamment l'activité d'HIF2α *via* l'activation de PGC-1α.

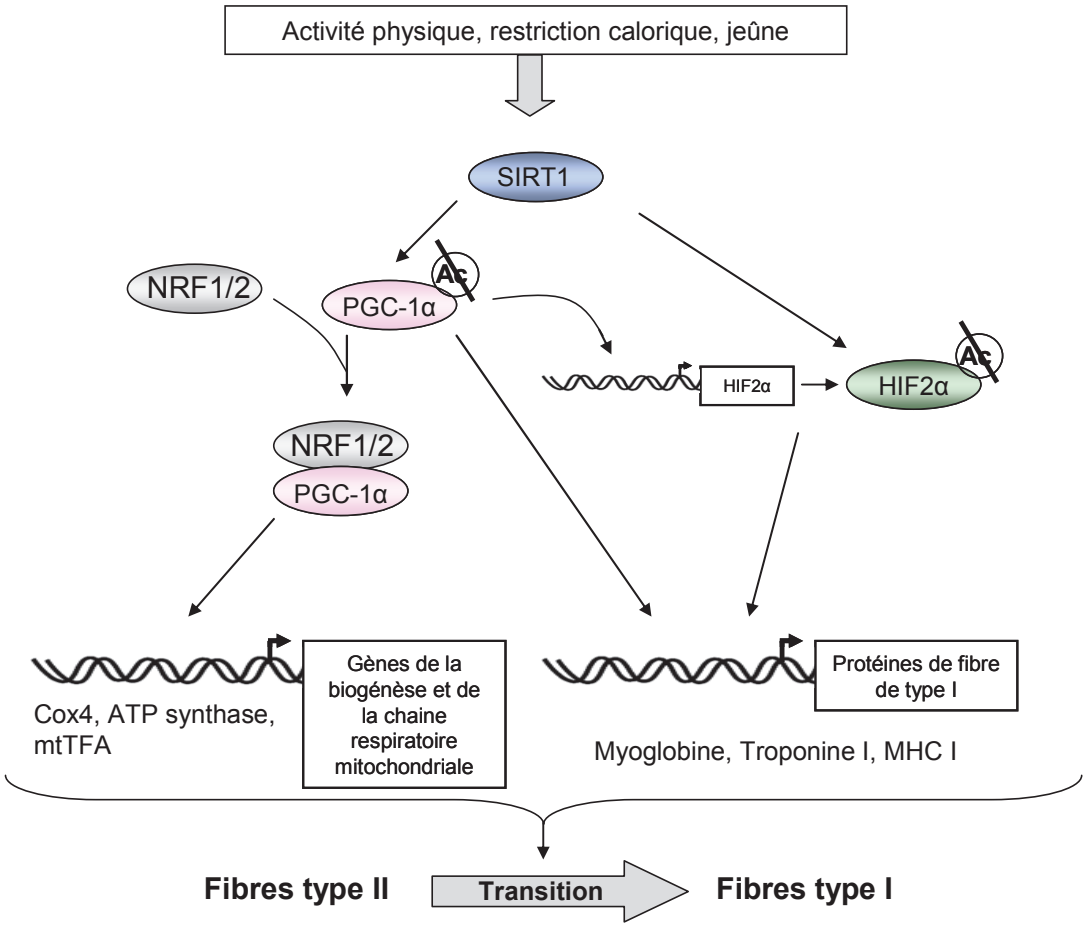


Figure 31 : SIRT1 induit une transition des fibres musculaires.

TRAVAUX PERSONNELS

PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE THÈSE

Les facteurs de transcription SREBP-1 ont été identifiés en 1993, dans le foie en tant que facteurs induisant la réponse génique aux stérols, et dans le tissu adipeux en tant que facteurs de différenciation adipocytaire (Briggs *et al.*, 1993, Tontonoz *et al.*, 1993). Les facteurs de transcription SREBP-1 ont été depuis bien décrits dans ces deux tissus pour leur implication dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique. L'expression de SREBP-1 est régulée par l'insuline et participe aux effets géniques de l'insuline en modulant la captation du glucose, la glycolyse, la synthèse des acides gras et la synthèse des triglycérides. Le muscle squelettique, de part ses besoins en substrats et ses capacités de stockage, joue un rôle prépondérant dans la régulation du métabolisme glucolipidique. Il a été montré que chez des personnes insulino-résistantes et obèses les variations d'expression de SREBP-1 en réponse à l'insuline dans le muscle sont altérées, participant à l'installation et au développement de maladies métaboliques comme le diabète de type II.

Afin de déterminer l'impact de la régulation de l'expression musculaire de SREBP-1 dans le muscle squelettique, nous avons généré au laboratoire des modèles expérimentaux de surexpression des formes actives de SREBP-1 *in vivo* et *in vitro*. Les résultats ont démontré que dans le muscle squelettique, en plus de son action sur le métabolisme glucolipidique, SREBP-1 régule l'expression de nombreux gènes spécifiquement musculaires, et notamment les MRFs. Ces travaux ont montré que d'une part, la surexpression de SREBP-1 inhibe la différenciation musculaire de myoblastes humains en culture primaire, *via* l'inhibition des MRFs ; et d'autre part, elle induit une atrophie musculaire *in vivo* (dans le muscle squelettique de souris) et *in vitro* (Lecomte *et al.*, 2010) .

Les travaux présentés ici ont eu pour but de déterminer le mécanisme d'induction de l'atrophie musculaire par SREBP-1, en mesurant la synthèse et la dégradation protéique ainsi qu'en déterminant l'implication de la régulation des MRFs et des atrogènes par SREBP-1. Ces travaux ont été resoumis après révision dans PLoSOne.

Les protéines SIRT1 sont des senseurs énergétiques. Ces protéines permettent de réguler la synthèse des acides gras, l'oxydation des lipides, la captation du glucose ou encore la glycolyse dans le muscle squelettique. De plus, dans le muscle squelettique, SIRT1 régule

le phénotype musculaire et potentiellement la masse musculaire. Au contraire de SREBP-1c, l'activité et l'expression de SIRT1 sont augmentées par des conditions de jeûne ou encore de restriction calorique.

Étant donné les rôles connexes de SREBP-1 et SIRT1 sur le métabolisme musculaire et leurs régulations opposées, nous avons étudié la régulation de l'expression de SREBP-1c par SIRT1 par des approches *in vivo* et *in vitro*. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en deuxième auteur dans PLoSOne (Defour *et al.* , 2012).

Enfin, nous avons étudié le rôle de la régulation de la synthèse des céramides par le TNFα dans l'atrophie musculaire. En démontrant le rôle des sphingolipides et plus particulièrement des céramides dans la régulation de la masse musculaire, nous renforçons les liens entre la régulation du métabolisme lipidique et la régulation de la masse musculaire. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans Skelet Muscle (De Larichaudy *et al.* , 2012).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MODÈLES CELLULAIRES

1.1. Cellules musculaires humaines en culture primaire

Nous disposons au laboratoire d'une banque de cellules musculaires humaines conservées dans l'azote liquide. Ce sont en fait des cellules satellites isolées à partir de prélèvements musculaires réalisés par biopsies lors d'interventions chirurgicales. Une fois mises en culture, ces cellules satellites prolifèrent puis se différencient en myotubes, recréant ainsi *in vitro* les étapes de la différenciation musculaire.

1.1.1. Matériel

Deux types de milieu sont utilisés pour la culture des cellules musculaires humaines :
- un milieu de prolifération composé d'Ham-F10 (Invitrogen) supplémenté de 2% d'Ultroser G (Biosepra), 2% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVFd) et 1% d'antibiotique, pénicilline, streptomycine et antimycotique, fungizone (Invitrogen),
- un milieu de différenciation, composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) contenant 1g/L de glucose, supplémenté de 2% de SVFd et 1% d'antibiotique-antimycotique.

Les cellules sont cultivées dans des flasques F25 de type Primaria™ (le traitement Primaria™ consiste à donner au plastique une charge opposée à celle des membranes cellulaires afin d'augmenter l'adhérence des cellules), puis ensemencées dans des plaques de culture dont les puits sont recouverts de collagène I (Becton-Dikinson Bioscience).

1.1.2. Mise en culture et sélection des cellules musculaires

Des prélèvements musculaires sont effectués lors d'interventions chirurgicales (traumatismes d'origine non musculaire), sur des déchets opératoires obtenus chez des patients volontaires, conformément à l'accord du Comité d'Ethique des Hospices Civils de Lyon.

Les cellules sanguines sont éliminées par lavage avec du milieu de prolifération. Les tissus non musculaires sont éliminés par dissection. Le prélèvement est fragmenté puis digéré à 37°C en présence de trypsine. La suspension cellulaire ainsi obtenue est lavée dans du PBS pour éliminer les résidus de la biopsie, puis culottées par centrifugation. Le culot cellulaire est repris dans du milieu de prolifération et les cellules ensemencées dans des flasques F25 Primaria.

La sélection des cellules musculaires est réalisée au moyen de l'anticorps 5.1H11 décrit par Walsh et Ritter (Walsh and Ritter, 1981). Cet anticorps est dirigé contre un antigène de surface spécifique des cellules musculaires. Il a été obtenu par immunisation de souris avec des cellules satellites humaines.

Après prolifération de la population cellulaire totale, les cellules trypsinées sont mises en contact de l'anticorps 5.1H11 dans 15 mL de milieu de culture de l'hybridome (Developmental Studies Hybridoma Bank, n° 93208) pendant 45 minutes.

La sélection des cellules liées à l'anticorps 5.1H11 est réalisée à l'aide de billes magnétiques couplées à des anticorps IgG de souris (Milteny). Au cours d'une incubation de 15 minutes, les billes se fixent à l'anticorps 5.1H11 lui-même lié aux cellules musculaires. La purification des cellules est ensuite réalisée par sélection magnétique.

Les cellules sélectionnées sont ensemencées dans des F25 Primaria™ et incubées à 37°C, 5% CO2 en présence de milieu de prolifération.

1.1.3. Obtention de myotubes polynucléés

Après isolement et sélection, les cellules sont ensemencées dans des plaques dont les puits sont recouverts de collagène de type I. L'état de confluence est contrôlé par observation microscopique. L'état de confluence ainsi qu'une diminution de la concentration en sérum du milieu de culture (1% de SVFd) va induire la différenciation des myoblastes.

Cette étape se caractérise par un allongement et un alignement des cellules puis par la fusion des myoblastes formant ainsi des myotubes polynucléés contractiles. Le processus de différenciation débute dès la confluence et l'obtention de fibres polynucléées est effective 48h après induction de la différenciation. Les différentes études sont menées 5 à 7 jours après induction de la différenciation.

Au cours de la différenciation, des études par immunocytofluorescence ont montré une expression significative de la myosine ainsi que la présence de l'antigène de surface spécifique des cellules musculaires (5.1H11) utilisé pour la sélection.

D'autres part, des travaux réalisés au laboratoire ont montré que les myotubes différenciés exprimaient les ARNm de plusieurs gènes du métabolisme à des niveaux similaires à ceux observés dans le muscle squelettique (HKII, glycogène synthase, transporteur d'acides gras, UCP-2, récepteurs nucléaires PPARα,β,γ, LXRα, β, et le facteur de transcription SREBP-1c) (Roques and Vidal, 1999, Chevillotte *et al.* , 2001, Gosmain *et al.*, 2004).

1.2. Lignées cellulaires

1.2.1. Lignée HEK 293

Les cellules HEK 293 (Human Embryo Kidney 293) dérivent de cellules embryonnaires humaines de rein, issues d'un fœtus sain avorté. Ces cellules ont été immortalisées par transformation avec de l'ADN fragmenté d'adénovirus de type 5 (Graham *et al.* , 1977). Leur origine cellulaire étant mal définie, ces cellules ne représentent pas un modèle d'étude physiologique particulier (c'est-à-dire qu'elles ne sont pas un bon modèle d'étude de la physiologie rénale ou de tout autre processus physiologique). Par contre, leur

grande capacité à proliférer et leur facilité à être transfectées en font un outil très intéressant en biologie moléculaire.

Elles sont également utilisées pour l'amplification d'adénovirus. Les adénovirus que nous utilisons comme vecteurs d'expression sont rendus inoffensifs par délétion de plusieurs gènes clés de la réplication. Les HEK293 expriment un certain nombre de ces gènes adénoviraux, notamment E1 et E3, et permettent la réplication des adénovirus incomplets. Elles sont dites complémentantes.

Les HEK 293T sont une sous-lignée de HEK exprimant l'antigène SV40 Large T (Simian Vacuolating Virus 40), nécessaire à l'amplification des plasmides transfectés contenant l'origine de réplication du SV40 (ex : PCDNA3).

Les HEK sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 4,5 g/L de glucose, supplémenté de 5% de SVFd et de 1% d'antibiotique-antimycotique, à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO2.

1.2.2. Lignée C2C12

Les C2C12 isolées par Yaffe sont aussi une lignée myogénique bien connue établie à partir de cellules satellites extraites de la patte de souris C3H après stimulation de la régénération musculaire par écrasement (Yaffe and Saxel, 1977). Elles sont amplifiées dans du DMEM contenant 4,5 g/L de glucose, supplémenté de 10% de SVFd et de 1% d'antibiotique-antimycotique, à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO2. Une fois à 80-90% de confluence, le milieu est changé par un milieu appauvri en sérum (2% de sérum de cheval) pour leur différenciation (Tollefsen *et al.* , 1989). Après 5 à 7 jours, on obtient des myotubes différenciés matures.

1.2.3. Lignée L6

Les cellules utilisées sont des myoblastes L6 (sous-clone C5) isolés en 1968 par Yaffe (Yaffe, 1968). Il s'agit d'une lignée myogénique établie à partir de cellules de rats nouveaux-nés, aux propriétés de différenciation *in-vitro* bien connues qui a conservé sa capacité à fusionner pour former des myotubes différenciés. Les cellules L6 constituent un modèle

privilégié pour l'étude de la différenciation des cellules musculaires. Elles présentent les mêmes caractéristiques biochimiques et différenciatives que des cellules embryonnaires fraichement prélevées et mises en culture (Shainberg *et al.* , 1971).

Ce sont des cellules adhérentes. On les ensemence à une concentration d'environ 2 à 3 millions de cellules par flacon de 150 cm^2 où elles vont former un tapis jointif à confluence. Elles sont mises en culture dans un milieu nutritif DMEM riche en glucose (4,5g/l, supplémenté en L-Glutamine (200mM), en pénicilline (100U/ml) / streptomycine (100µg/ml) donnant le milieu complet, auquel on ajoute 10% de sérum de veau fœtal (SVFd) décomplémenté en conditions prolifératives, et 1% de SVFd en conditions de différenciation.

Pour induire leur différenciation, les cellules sont ensemencées à raison de 5.10^4 cellules par cm^2 dans des boîtes 6 puits, en milieu DMEM 1% SVFd plus de l'Arginine-8-Vasopressine (AVP) 10^{-7} M (l'AVP est une hormone neurohypophysaire stimulatrice de la différenciation myogénique *in vitro*), (Nervi *et al.* , 1995) et cultivées pendant 5 à 6 jours. Le milieu est renouvelé tous les 2 jours ; on obtient des myotubes matures stables durant quelques semaines aux caractéristiques proches de fibres musculaires matures.

2. MODULATION DE L'EXPRESSION DE PROTÉINES D'INTÉRÊT *IN VITRO*

2.1. Mise au point d'adénovirus recombinants

Les adénovirus sauvages sont responsables d'affections légères chez l'homme, comme des infections respiratoires chez les personnes âgées ou chez les enfants.

Ces virus, découverts en 1953 par W.P. Rowe, avaient été initialement isolés à partir des tissus adénoïdiens (amygdales), d'où le nom adénovirus.

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à capside icosaédrique d'un diamètre d'environ 80 nanomètres. La capside comporte 252 capsomères : 12 pentons aux sommets de l'icosaèdre et 240 hexons situés sur les arêtes et les faces. Chaque penton porte un spicule

glycoprotéique, appelée fibre, terminée par une sphère de 4 nm de diamètre qui possède une activité hémagglutinante. Cette fibre permet la liaison du virus à la surface de la cellule hôte via un récepteur.

Le principal récepteur humain pour les adénovirus est le Coxsackie/Adenovirus Receptor (CAR). La fixation du virus à ce récepteur et à une molécule d'intégrine entraîne son endocytose dans la cellule. Une fois entré dans la cellule, le virus se fixe aux microtubules cellulaires pour migrer vers les pores nucléaires, *via* lesquels l'ADN viral est relargué dans le noyau, après désintégration de la capside.

Le génome est un ADN bicaténaire d'environ 36 Kb. On distingue au sein du génome des régions codant pour des protéines précoces dites E et des protéines tardives dites L, suivant qu'elles sont exprimées en début ou fin de réplication du virus.

Il existe 4 régions codant pour les protéines E : les produits du gène E1 (E1A et E1B) sont impliqués dans la réplication du virus. La région E2 contient des gènes de la réplication de l'ADN et de l'expression des régions tardives. Les protéines de la région E3 sont impliquées dans la réponse immunitaire, et celles de E4 dans le métabolisme de l'ARNm viral.

2.1.1. Construction d'adénovirus recombinants (ΔE1/E3)

En biologie moléculaire, les adénovirus sont utilisés comme vecteur de gène d'intérêt, permettant la surexpression de protéines, notamment dans des cellules difficilement transfectables par les méthodes classiques. Les adénovirus les plus couramment utilisés sont les adénovirus humains de classe 5.

Afin d'éviter leur propagation, les adénovirus utilisés en laboratoire sont rendus incapables de réplication par la délétion de la région E1. La région E3, non essentielle lors de la culture *in vitro* de l'adénovirus, est également délétée afin de permettre l'insertion de transgènes comprenant jusqu'à 8Kb.

L'adénovirus utilisé au laboratoire, VmAdcDNA3, a été mis au point par l'équipe du Dr S. Rusconi (Chaussade *et al.* , 2003) à l'université de Fribourg en Suisse. Il est issu d'un adénovirus humain de type 5 recombinant ΔE1/E3. Une région de recombinaison homologue

avec le plasmide pCDNA3.1 a été ajoutée au niveau de la région E1 délétée. Il s'agit de deux éléments correspondant à une portion de 363bp en 5'du promoteur CMV (cytomégalovirus) et un segment de la région 3'comprenant le signal de polyadénylation du plasmide PCDNA3. Ces deux éléments sont séparés par une séquence contenant un site de restriction SwaI. Ainsi la recombinaison doit, d'une part, supprimer le site de restriction SwaI mais également entraîner la reformation du promoteur CMV, ce qui peut être vérifié par PCR.

Les gènes d'intérêts doivent donc d'abord être clonés dans le pCDNA3 avant d'être transférés par recombinaison homologue dans le VmAdcDNA3.

2.1.2. Clonage des gènes humains codant pour MYOG et MEF2C

Nous possédions déjà au labo des adénovirus codant pour les formes nucléaires de SREBP-1a et SREBP-1c (Rome *et al.*, 2008), codant pour SIRT1 (Frojdo *et al.* , 2011) et de l'adénovirus surexprimant MYOD1 qui nous a été donné par l'équipe du Dr Miike Teruhisa (Fujii *et al.* , 2006)

Le gène humain de MEF2C a été généré par Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Nous l'avons ensuite transféré par restriction-ligation dans le pCDNA3.1 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Le vecteur d'expression de pCMV- MYOG a été réalisé en clonant l'amplicon du gène généré par PCR à partir d'ADN génomique humain.

Les produits de PCR ont été ensuite clonés dans un plasmide pGEMT (Promega, Charbonnière, France), puis transférés par restriction-ligation dans le pCDNA3.1 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

2.1.3. Génération des adénovirus recombinant codant pour MYOG et MEF2C

Une fois le gène d'intérêt cloné dans le pCDNA3, celui-ci est transféré dans le génome adénoviral par recombinaison homologue. Pour cela, 200ng de VmAdcDNA3 est linéarisé par l'enzyme de restriction SwaI. 600ng des clones pCDNA3+ gène d'intérêt sont également linéarisés par une enzyme de restriction ne coupant pas dans la cassette « promoteur CMV-Gène-polyA ß-Globine » du plasmide.

Des bactéries compétentes Rec+ (exprimant la recombinase), Escherichia coli BJ5183, sont co-transformées par le VmAdcDNA3 linéarisé et le pCDNA3+insert linéarisé, puis étalées sur des boîtes de pétri recouvertes de milieu LB traité à l'ampicilline.

Une PCR est réalisée sur les clones sélectionnés afin de vérifier la recombinaison, devant permettre la reformation du promoteur CMV. Les amorces utilisées sont :

- primer A : 5'- GACGGATGTGGCAAAAGTGA- 3', s'hybridant à l'extrémité 5' de l'adénovirus,
- primer B : 5'-ATGGGGTGGAGACTTGGAAATC-3', s'hybridant à la région du promoteur CMV complétée par recombinaison.

Un fragment de 700bp est généré à partir des clones positifs. Un clone positif est ensuite amplifié dans des bactéries Escherichia coli XL1-Blue.

Le plasmide ainsi obtenu est digéré par l'enzyme de restriction PacI, ce qui permet l'exclusion de la cassette bactérienne de la construction, et la transfection des cellules HEK293.

La production *in vitro* du virus recombinant n'est possible que dans les cellules HEK 293, qui sont des cellules modifiées génétiquement pour pouvoir complémenter les génomes viraux par la production des protéines E1 et permettre ainsi la multiplication des adénovirus. Ces cellules sont donc transfectées, par méthode au phosphate de calcium, avec le plasmide coupé PacI. Les effets cytopathiques, provoqués par la production adénovirale au sein des cellules, sont observés pour évaluer le degré d'infection cellulaire.

Lorsque les cellules sont sur le point d'être lysées, environ 36 à 40h après l'infection, elles sont récoltées par trypsination et centrifugation, puis lysées par cycles de congélation-décongélation successifs, afin de récupérer la solution adénovirale. La capacité de l'adénovirus ainsi produit à induire une surexpression de la protéine d'intérêt (ici, MYOG, MEF2C, SIRT1 ou MYOD1) est vérifiée par Western Blot, après 48h d'infection cellulaire au -80°C.

2.1.4. Titration

La titration de la solution adénovirale consiste à déterminer le titre infectieux de la solution, c'est-à-dire, la concentration de la solution en adénovirus viables (capables

d'infecter une cellule). Des dilutions en cascade croissantes de la solution mère de l'adénovirus à titrer sont réalisés dans du milieu DMEM sans sérum. Les dilutions sont réalisées au $10^{ème}$ de 10^{-4} à 10^{-13}. 100µl de chaque dilution est mis en contact de HEK 293 ensemencées en plaque 96 puits. Le principe est qu'avec les dilutions croissantes, on arrive à un point où le milieu ajouté ne contient plus de particules adenovirales. Ainsi nous pouvons, par observation des plages de lyse (marqueurs de la présence de particules adénovirales) déterminer le titre infectieux.

Chaque colonne de la plaque 96 puits reçoit 100µl de la même solution adénovirale diluée dans le DMEM permettant d'obtenir 8 répétitions. Chaque ligne reçoit une solution DMEM de plus en plus diluée en particules adénovirales et la première et la dernière colonne reçoivent du milieu DMEM sans dilution adénovirale servant de contrôle.

Les cellules sont suivies sur 10 jours afin de déterminer s'il y a des plages de lyse, signes de la présence d'au moins une particule adénovirale. En déterminant les puits contenants au moins une particule adénovirale et les puits sans particule adénovirale on détermine grâce à la formule suivante le titre infectieux de la solution mère adénovirale.

$$\text{Titre (pfu/ml)} = 10^{\,1 + Z\,(X - 0.5)}$$

Avec $Z = \log(facteur_dilution)$, pour des dilutions successives au $10^{ème}$, Z=1.

$$\text{Et avec } X = \sum_{d=1}^{nombre_dilutions} \frac{nombre_puits_positifs_d}{8}$$

Une fois infecté, chaque puits de chaque plaque 96 puits est observé au microscope pour juger de la présence de plage de lyse. Cette technique est utilisée pour titrer les adénovirus suivants : Ad-SREBP-1a, Ad-SREBP-1c, Ad-MYOD1, Ad-MYOG, Ad-MEF2C et Ad-SIRT1.

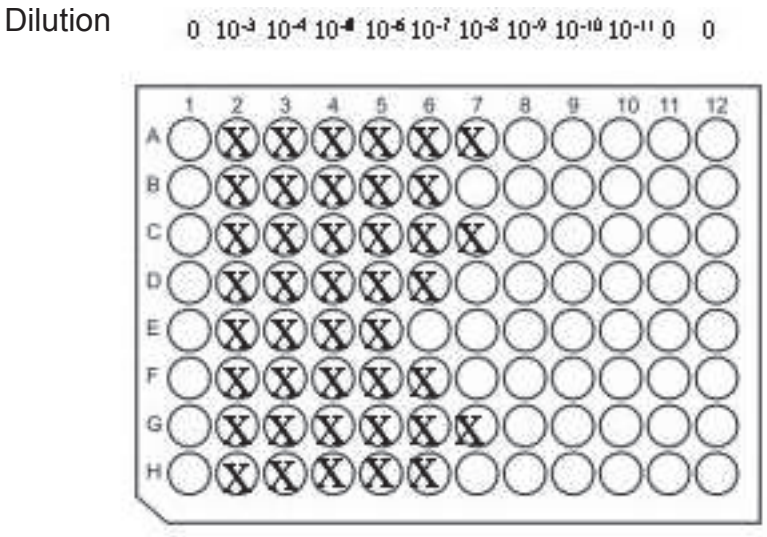


Figure 32 : exemple de titration adénovirale après 10 jours d'infection.

Dans cet exemple X= (1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 0.875 + 0.375 + 0 + 0) = 7.25

et $Z = \log(10) = 1$

Titre = $10^{1 + 1\,(7.25 - 0.5)} = 10^{1 + 1\,(6.75)} = 10^{1 + 6.75} = 10^{7.75} = 5.6 \times 10^{7}$ pfu/ml.

2.1.5. Infection de cellules musculaires humaines par adénovirus recombinants

Les myotubes humains et les C2C12 différenciés sont infectés par adénovirus recombinants. En plaque 6 puits, les cellules sont infectées avec 5.107 UI d'adénovirus par puits et en 12 puits avec 2.107 UI d'adénovirus. Une infection par un adénovirus surexprimant la GFP est réalisée comme contrôle négatif de l'infection. Les différentes études sont réalisées après 48h d'infection.

2.2. Les siRNA

Les small interfering RNA sont des ARNs qui interagissent avec les ARNm pour empêcher la synthèse de la protéine correspondante. Ils sont codés naturellement par le génome des mammifères afin de réguler l'expression d'autres gènes, ils sont alors appelés micro-ARN. Le mécanisme implique deux grandes étapes, les molécules d'ARN sont d'abord transformées en petits fragments d'ARN double brin d'une vingtaine de nucléotides par une enzyme de la famille des RNase III, Dicer, puis l'un de ces brins est incorporé dans un

complexe protéique RISC (RNA Induced Silencing Complex) dans lequel il sert de guide pour la reconnaissance des séquences cibles. Si la complémentarité entre le siRNA et l'ARNm cible est parfaite, le complexe RISC clive l'ARNm cible qui est alors dégradé et n'est donc plus traduit en protéine.

L'introduction, dans une cellule, de petits ARNs double brin synthétiques, ou siRNA, permet d'inhiber l'expression de n'importe quel gène, du moment que l'on connaisse sa séquence.

Cette méthode est ici utilisée pour inhiber l'expression des protéines SREBP-1a et 1c dans les cellules musculaires humaines en culture primaire.

Des siRNAs dirigés contre les ARNm codant pour SREBP-1 ont été synthétisés par la société Qiagen (Courtaboeuf, France). Un siRNA allstars négatif, également commercialisé par Qiagen, est utilisé comme contrôle.

L'utilisation de ces siRNA a pour but de déterminer l'impact de l'inhibition de l'expression de SREBP-1 sur la dégradation et la synthèse des protéines.

Des cellules musculaires humaines sont donc, en parallèle, transfectées par les si-RNAs décrits ci-dessus et infectées par les adénovirus recombinants surexprimant MEF2C, MYOD1, MYOG ou la GFP. Les cellules musculaires humaines sont ensemencées dans des plaques 6 puits recouverts de collagène I, et traitées sous forme de myotubes. Les cellules sont tout d'abord transfectées à l'aide de Hiperfect transféction reagent (Qiagen), mélange de lipides neutres et de lipides cationiques, selon le protocole fourni par le fabricant. Brièvement, une solution de siRNA à 5nM dans du milieu de culture DMEM est incubée en présence de transfectant Hiperfect pendant 10 minutes à température ambiante, afin de permettre la formation de micelles contenant les siRNAs.

Ce mélange est ensuite ajouté au milieu de culture des cellules à 15nM. Les cellules sont mises à incuber à 37°C, 5% CO2. 24h plus tard, le milieu de culture des cellules est changé et l'infection par les adénovirus recombinants est réalisée comme indiqué ci-avant. Le degré d'inhibition de l'expression SREBP-1 est déterminé par Western-blot.

2.3. Mesure de l'expression génique

2.3.1. Extraction

L'extraction des ARN totaux à partir de cellules musculaires humaines en culture primaire, de C2C12 ou de L6, est réalisée à l'aide de TRIzol® reagent (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur.
Les ARN sont ensuite dosés par spectrophotométrie à 260nm.

2.3.2. Reverse transcription

La RT est réalisée sur 1µg d'ARN totaux, de manière non spécifique, en présence de SuperScript II® RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen), d'un mélange d'oligodT et d'hexamères oligonucléotidiques non spécifiques.

2.4. Dosage des ARNm cibles

Les ARN messagers sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel, en utilisant des amorces spécifiques des ADNc étudiés.

La PCR quantitative est réalisée sur 5µL du produit de RT dilué au 1/60ème mélangé à 15 µL de milieu réactionel ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, Courtaboeuf, France), à l'aide d'un Rotor-Gene 6000™ (Corbett Research, Mortlake, Australia).

2.5. Mesure de l'expression protéique

2.5.1. Quantification par Western-blot

a) Préparation des extraits protéiques

Les cellules sont directement lysées à 4°C, dans un tampon de lyse de composition suivante : PBS, SDS 0,1%, sodium déoxycholate 0,5%, Nonidet NP40 1%, EDTA 5mM,

Na_3VO_4 1mM, NaF 20mM, DTT 1mM auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France).

Les protéines sont quantifiées par la méthode de Bradford, à l'aide du kit BioRad Protein Assay (Bio-Rad laboratory, Marne-la-Coquette, France).

b) Western Blot

Les échantillons protéiques sont dénaturés à 100°C pendant 5 minutes en présence de tampon Laemli 1X : Tris-HCL 50 mM, Glycérol 12%, SDS 1%, βmercaptoéthanol 4%, Bleu de BromoPhénol 0,01%, pH 6,8.

Les protéines sont ensuite séparées selon leur masse moléculaire sur un gel d'acrylamide-bis-acrylamide de type SDS-PAGE puis transférées sur membrane PVDF (Fluorure de polyvinylidène).

La membrane est incubée une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, puis en présence d'un anticorps secondaire couplé à la Horseradish Peroxidase pendant 1h à température ambiante.

La présence de protéines est révélée par chimiluminescence liée à l'activité Peroxydase grâce au kit Enhanced Chemiluminescence System (Pierce, Rockford, IL, USA). Le signal est détecté par autoradiographie et quantifié grâce au logiciel Image J distribué par le NIH. La quantité de protéine totale est normalisée par rapport à l'intensité de la coloration au bleu de Coomassie.

2.6. Analyse morphologique des myotubes

2.6.1. Mesure de surface par immunomarquage à la myosine

Pour tester l'effet de différents traitements sur la taille des myotubes, on effectue un marquage par immunofluorescence de la myosine, qui est exprimée sélectivement par les myotubes différenciés, permettant un marquage homogène de la totalité de la surface des myotubes et non des myoblastes. Les cellules sont examinées grâce à un microscope à fluorescence ZEISS Axiovert 200 muni d'un objectif LD-A plan 20x/0.30 PHI ∞/40 couplé à une camera axiocam MRm fonctionnant sous le logiciel Axiovision 4.1 image acquisition

software (Carl Zeiss). On mesure ensuite leur surface d'après la méthode de Sultan, grâce au logiciel d'imagerie Image J. La moyenne des mesures de 10 champs pris au hasard pour chaque condition est calculée.

Les cellules sont lavées au PBS, puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 3,7% pendant 20 minutes. Les cellules sont lavées 3 fois au PBS puis perméabilisées avec une solution de triton 0,1% dans du PBS durant 10 minutes à 4°C. Après un nouveau cycle de lavages, les cellules sont mises en présence d'une solution de saturation BSA 1% pendant 20 minutes à température ambiante pour bloquer le marquage aspécifique. Ensuite, on incube 1 heure avec l'anticorps primaire MF-20 anti-myosine dilué au 1/50e à température ambiante. Après lavage avec une solution BSA 1% dans du PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'AlexaFluor 555, dilué au 1/500e dans une solution de PBS contenant 0,1% BSA. Suivi d'un dernier cycle de lavage. Les noyaux sont révélés par un marquage au DAPI (4.5-diamidino-2-phenylindole) contenu dans le milieu de montage Vectashield. Ce montage sous lamelle de verre permet de conserver les échantillons jusqu'à l'examen par microscopie de fluorescence.

2.6.2. Mesure de l'indice de fusion

Pour déterminer l'impact de la surexpression de SREBP-1a, SREBP-1c, et/ou MEF2C, MYOD1 et MYOG sur la différenciation des myotubes, nous avons mesuré l'indice de fusion.

L'indice de fusion est calculé en divisant le nombre de noyaux présents dans les myotubes par le nombre de noyaux totaux dans le champ observé. Grâce au marquage des myotubes à la myosine et au marquage des noyaux par le DAPI, on détermine la quantité de noyaux présents dans les myotubes divisé par le nombre de noyaux totaux.
Pour chaque condition expérimentale, en moyenne 1000 noyaux sont comptés.

3. ÉTUDE DE PROMOTEURS

3.1. Mesure de l'activité promotrice par système gène rapporteur

Un gène rapporteur ou gène marqueur est un gène codant pour une protéine dont l'activité est bien caractérisée et facilement détectable. Ce gène est ajouté à une construction génomique afin d'en révéler les modifications. Dans le cadre d'une étude de l'activité promotrice d'un gène, une portion du promoteur de ce gène est clonée en amont du gène rapporteur. L'activité de la protéine codée par le gène rapporteur est donc directement proportionnelle à l'activité promotrice du gène d'intérêt.

Dans notre étude, le promoteur du gène MuRF1 est cloné en amont du gène de la luciférase. La luciférase de type Firefly est exprimée par la luciole Photinus pyralis et catalyse l'oxydation de la luciférine en produisant de la lumière, dont l'intensité peut-être mesurée.

3.2. Clonage du promoteur MuRF1

Deux fragments chevauchants de la séquence du promoteur du gène codant pour MuRF1 ont été générés par PCR, à partir d'ADN génomique humain grâce aux amorces suivantes :

5'- CTCATCCATCTGTCACGTTG – 3'

5'- GGATGAGTGATCTGTTTCCC -3'

Ce couple d'amorce nous a permit d'obtenir le fragment -445pb/-1337pb.

5'-TTGCAGTGAGCAGAGATCGTG-3'

5'-AAGCTTTGCTCTAAGTAGACCTGG-3'

Ce couple d'amorce nous a permit d'obtenir le fragment -539pb/+90pb.

Les produits de PCR ont été ensuite clonés dans un plasmide pGEMT (Promega, Charbonnière, France). Puis à l'aide d'enzymes de restriction, ces deux fragments ont été sous-clonés dans le plasmide rapporteur pGL3-Enhancer (Promega), en amont du gène de la luciférase, formant ainsi le plasmide rapporteur. Nous permettant d'obtenir la construction

pMuRF1 -1337/+90 pGL3e et par délétions successives les constructions plasmidiques pMuRF1-540/+90pGL3e et pMuRF1-237/+90 pGL3e.

3.3. Transfection transitoire dans les cellules musculaires humaines

Les cellules musculaires humaines en culture primaire sont ensemencées dans des plaques 12 puits recouverts de collagène I, et transfectées sous forme de myotubes après en moyenne 5 jours de différenciation.

La transfection transitoire est réalisée grâce au transfectant commercial ExGen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France), selon les recommandations du fournisseur.

Chaque puits de culture cellulaire reçoit 1µg de la construction promotrice. Afin de tester la stimulation de leur activité promotrice par SREBP-1a ou 1c, chaque puits reçoit également 5.107 UI d'adénovirus SREBP-1a ou SERBP-1c. Enfin, pour normaliser le signal luminescent en fonction de la quantité de cellule, les cellules sont cotransfectées avec 5 ng de pRL-CMV (Promega), vecteur d'expression de la luciferase Renilla, sous contrôle du promoteur CMV.

3.4. Mesure des activités promotrices

Le promoteur du gène MuRF1 a été cloné en amont du rapporteur de la luciférase Firefly, alors que le vecteur de co-transfection exprime la luciférase Renilla, issue de la pansée de mer Renilla reniformis, catalysant l'oxydation de la coelenterazine, en émettant une lumière de longueur d'onde différente de celle produite par la luciférase Firefly. Ces deux luciférases ont donc des propriétés enzymatiques et des substrats différents, ce qui permet de mesurer séparément l'abondance relative de chacune.

Les deux activités Luciférase sont mesurées 48h après transfection à l'aide du kit Dual-Luciferase® Reporter Assay system (Promega) sur un luminomètre à plaque Centro LB 960 (Berthold Technology, Thoiry, France).

Pour chaque transfection, l'activité Luciférase issue des constructions promotrices MuRF1 est rapportée à la valeur de l'activité Renilla correspondante.

4. DOSAGE DU MÉTABOLISME

4.1. Mesure de la synthèse protéique

La mesure du taux de synthèse protéique dans les myotubes infectés 48h par différents adénovirus est inspirée de la méthode de Gulve (Gulve and Dice, 1989). Les myotubes humains en culture primaire sont différenciés, puis infectés avec un ou plusieurs adénovirus. Au temps défini précédemment, on remplace le milieu de traitement par le milieu de marquage supplémenté par 2 µCi/ml de [3H]-L-Tyrosine qui sera incorporée par les cellules pour la synthèse protéique, et par 2mM de tyrosine froide, ce qui optimise l'incorporation. Après 2h de marquage, les cellules sont lavées 5 fois au PBS puis grattées dans de l'acide tri-chloro-acétique (TCA) 10% sur glace. L'homogénat obtenu est vortexé, centrifugé 10 minutes à 12 000g pour séparer le culot contenant les protéines néosynthétisées précipitées, et le surnageant, contenant la tyrosine marquée non incorporée dans les protéines. Le culot est alors ressolubilisé dans du tampon de lyse et neutralisé avec 1M NaOH. Un aliquot est prélevé à ce moment pour le dosage de protéines selon Bradford. La mesure de la radioactivité se fait dans des pots à scintillation avec 200µl d'échantillon pour 3 ml de liquide scintillant Ultima Gold AB dans un compteur à scintillation Packard. La synthèse protéique est exprimée en radioactivité intégrée (dpm) par µg de protéines.

4.2. Mesure de la dégradation protéique

Le taux de dégradation protéique est évalué, après marquage des cellules par la tyrosine tritiée, par le rapport entre la radioactivité TCA-soluble dans le milieu (tyrosine libre issue des protéines dégradées) à un temps défini, et la radioactivité incorporée initiale (regroupant la radioactivité de la fraction cellulaire, et celle des fractions TCA-soluble et insoluble du milieu). Pour cela, les myotubes humains différenciés sont incubés avec une solution de [3H]-L-Tyrosine 2µCi/ml dans DMEM contenant 1 g/L de glucose, supplémenté de 2% de SVFd et 1% d'antibiotique-antimycotique, à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO2. La radioactivité non-incorporée est ensuite rincée par 3 lavages au PBS. Les cellules sont ensuite placées en milieu de chasse (DMEM 1g/L de glucose 1% SVFd avec 2mM de tyrosine non-radioactive pour prévenir la réincorporation de tyrosine tritiée issue de la

dégradation protéique) pendant 2 heures pour permettre la dégradation des protéines de courte durée de vie. Les cellules sont alors lavées, et après 48 h d'incubation des échantillons de 0,2 ml de milieu sont prélevés et additionnés de TCA (10%). Après 1 h à 4°C, ils sont centrifugés à 12 000g 10 minutes. Les culots sont dissous dans 0,5 ml de tampon de lyse et neutralisés avec NaOH. Les cellules sont lavées et homogénéisées dans le tampon de lyse. La radioactivité des trois fractions (homogénat cellulaire, culot TCA et surnageant TCA) est mesurée comme ci-dessus.

4.3. Mesure de captation du glucose

Des cellules C2C12 sont ensemencées dans des plaques 12 puits avec du DMEM contenant 4,5 g/L de glucose, supplémenté de 10% de SVFd et 1% d'antibiotique-antimycotique, à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO2. Une fois à 80-90% de confluence, le milieu est changé par un milieu appauvri en sérum (2% de sérum de cheval) pour leur différenciation (Tollefsen *et al.*, 1989). Après 5 à 7 jours, on obtient des myotubes différenciés matures. Les cellules sont infectées avec les adénovirus SIRT1 ou en contrôle GFP. Après 48h d'infection, le milieu est aspiré et les cellules sont stimulées à l'insuline ou non. La stimulation à l'insuline se fait pendant 20min à 37°C 5% CO2 par l'ajout d'1ml par puits de milieu X-DPBS (PBS sans CaMg contenant 0,5mM de MgCl2, 0,9mM de CaCl2, 0,2% de BSA) contenant 10^{-7}M d'insuline. La stimulation à l'insuline permet d'augmenter la captation du glucose qui est très faible en basal.

Puis les cellules sont incubées 10min à 37°C 5% CO2 avec 500µl de milieu de marquage X-DPBS contenant 285nM (1µCi) de ^{3}H-2DG et de 1mM de 2-Déoxyglucose froid.

Le milieu de marquage est ensuite retiré et les cellules sont lavées deux fois au PBS et lysées avec 500µl d'une solution de NaOH 0,05N.

La mesure de la radioactivité se fait dans des pots à scintillation sur 400µl d'échantillon auxquels on ajoute 4 ml de liquide scintillant Ultima Gold AB dans un compteur à scintillation Packard. Les 100µl de lysat cellulaire restant sont utilisés pour le dosage protéique selon la méthode Bradford.

La captation du glucose s'exprime en µmol de glucose par mg de protéines.

Pour les calculs, la radioactivité de 20µl de solution de marquage est comptée, permettant de déterminer la quantité de radioactivité par mole de glucose (marqué et froid).

Puis, grâce aux équations ci-dessous, on détermine la quantité de glucose incorporé par mg de protéine.

Calcul de la concentration en protéines totale (µg/ml) **(A)** (selon le dosage Bradford).

Calcul de la quantité de protéines totale dans 500µl de lyse :

(B) = (A) / 2

Calcul du comptage total TC1 pour 1µl de Glucose radioactif 1mM :

(TC1) = TC20 / 20

Calcul de la quantité de glucose marqué dans 400µl (en cpm/pts) (C):

(C) = mesure du glucose marqué / Comptage total (TC1)

Calcul de la quantité de glucose marqué dans 500µl (D) :

(D) = ((C) /400) x 500

Calcul de la quantité de glucose marqué par rapport à la quantité de protéines (en µmol glucose/mg protéines) :

(E) = (D) x1000 / (B)

5. ANALYSE STATISTIQUE

Pour comparer les différences obtenues, nous avons utilisé des analyses de variance à un critère de classification (anova). Les comparaisons multiples *a posteriori* ont été réalisées avec la correction PLSD de Fischer avec un niveau de significativité global de 0,05. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Statview (v5.0, SAS institute inc., Cary NC, USA).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

ARTICLE N°1

Les facteurs de transcription SREBP-1 régulent la synthèse des protéines musculaires *via* les facteurs de régulation myogénique.

SREBP-1 transcription factors regulate muscle protein synthesis through myogenic regulatory factors. *PLoS One* (accepted for publication)

Dessalle, K., Euthine, V., Durand, D., De Larichaudy, J., Rome, S., Vidal, H., Nemoz, G., Simon, C., and Lefai, E.

Introduction

Les facteurs de transcription SREBP-1 ont été très étudiés pour leur rôle dans le métabolisme lipidique. Récemment, des études conduites au laboratoire ont montré que la surexpression *in vivo* et *in vitro* des formes matures de SREBP-1 induit une atrophie musculaire en régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la fonction et dans le développement musculaire. Cette étude a mis en évidence l'implication des répresseurs transcriptionnels bHLHB2 et bHLHB3 dans les effets atrophiques de SREBP-1 (Lecomte *et al.*, 2010). Les répresseurs transcriptionnels bHLHB2 et bHLHB3 régulent divers processus biologiques notamment en réprimant l'expression des MRFs (Yamada and Miyamoto, 2005).

La différenciation musculaire est sous le contrôle de deux familles de facteurs de transcription : les MRFs, MYOD1, Myf5, MRF4 et MYOG, et les protéines MEF2 appartenant à la famille des protéines MADS (Molkentin and Olson, 1996). Les MRFs interagissent avec les protéines MEF2, notamment MEF2C, pour induire l'expression des gènes muscle-spécifiques.

Les MRFs sont exprimés dans le muscle adulte. Suite à une activité physique intense, la masse musculaire augmente notamment par la régulation de la différenciation et de la fusion des cellules satellites aux fibres existantes. Ce phénomène de régénération musculaire en réponse à l'exercice physique implique l'activation du programme de différenciation des cellules satellites, contrôlé par l'expression des MRFs (Carson and Booth, 1998, Adams *et al.*, 1999, Yang *et al.*, 2005, Legerlotz and Smith, 2008).

Outre leur rôle dans la régénération musculaire, l'expression des MRFs dans les noyaux sarcomériques suggère un rôle dans la fibre différenciée elle-même.

Chez la souris, des études ont montré que lorsque les cellules satellites sont supprimées par irradiation γ, l'expression des MRFs en réponse à l'exercice est maintenue ainsi que la prise de masse musculaire (Lowe and Alway, 1999). Par conséquent, l'expression des MRFs dans la fibre différenciée peut réguler la masse musculaire en agissant sur l'expression des protéines musculaires.

Dans les modèles expérimentaux du laboratoire, l'accumulation nucléaire de SREBP-1 conduit à l'inhibition coordonnée des MRFs et de MEF2C dans les myoblastes et les myotubes (Rome *et al.*, 2008, Lecomte *et al.*, 2010). La répression de l'expression des MRFs et de MEF2C explique l'inhibition de la différenciation des myoblastes par SREBP-1. Dans les myotubes humains, cet effet sur les MRFs pourrait également expliquer les effets atrophiques de SREBP-1 sur les fibres différenciées.

Le maintien de la masse musculaire adulte résulte d'un équilibre finement régulé entre synthèse et dégradation protéique (Sandri, 2008). Le système UPS a été décrit comme le principal acteur de la dégradation des protéines musculaires. La modulation de l'expression des atrogènes, Atrogin-1 et MuRF1, qui sont des E3-ubiquitines ligase, permet de réguler le marquage des protéines à dégrader par le protéasome.

Indépendamment des répresseurs transcriptionnels bHLHB2 et bHLHB3, la surexpression de SREBP-1 module l'expression des atrogènes MuRF1 et Atrogin-1 (Lecomte *et al.*, 2010). Dans la plupart des modèles d'atrophie, l'expression des atrogènes est augmentée de façon concertée. Étonnamment, dans notre modèle d'atrophie, MuRF1 est fortement induit par SREBP-1, au contraire d'Atrogin-1 qui est fortement inhibé (Lecomte *et al.*, 2010).

SREBP-1 pourrait donc agir à plusieurs niveaux pour réguler la masse musculaire, à la fois sur la synthèse protéique en régulant l'expression des MRFs et sur la dégradation protéique en régulant l'expression des atrogènes.

Afin de décrypter le mécanisme par lequel SREBP-1 régule la masse musculaire, nous avons étudié les effets de la modulation de l'expression de SREBP-1 dans des myotubes humains sur les vitesses de synthèse et de dégradation protéique, sur l'expression de plusieurs protéines sarcomériques, et nous avons caractérisé les mécanismes moléculaires de la régulation des atrogènes par SREBP-1. Nous avons de plus étudié le rôle des MRFs dans l'action de SREBP-1 et mis en évidence leur rôle central dans ces mécanismes.

Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que la surexpression de SREBP-1a ou SREBP-1c dans des myotubes humains en culture primaire diminue la synthèse protéique de 30% et la dégradation protéique de 10%. A l'opposé, l'inhibition de l'expression endogène de SREBP-1 augmente la synthèse et la dégradation protéique.

Il apparaît ainsi clairement que l'atrophie musculaire induite par SREBP-1 est due à la diminution de la synthèse protéique.

Dans notre modèle, la diminution de la synthèse protéique est due à l'inhibition de l'expression des MRFs. Le maintien de l'expression de MYOD1, MYOG ou MEF2C dans les myotubes humains surexprimant SREBP-1 lutte contre la diminution de la synthèse protéique, contre la diminution de l'expression de la troponine et de la myosine, et donc contre l'atrophie des myotubes.

Afin de déterminer l'impact de la surexpression des MRFs et de MEF2C sur l'état de différenciation de notre modèle cellulaire, nous avons réalisé des mesures d'index de fusion. Ces mesures montrent que la surexpression des MRFs ou de MEF2C n'augmente pas cet indice de fusion, attestant de l'incapacité des myoblastes résiduels à se différencier. Ces mesures montrent donc que les effets bénéfiques des MRFs et de MEF2C, sur ce modèle d'atrophie musculaire, ne sont pas dus au recrutement et à la fusion des myoblastes restants aux myotubes.

Nos résultats prouvent que le maintien de l'expression des MRFs ou de MEF2C lutte contre l'atrophie induite par SREBP-1 en permettant l'expression des protéines sarcomériques et non en augmentant la fusion des myoblastes aux myotubes.

Comme l'ont démontré Lowe et Alway, les MRFs permettent de maintenir l'expression de protéines sarcomériques et une partie des effets hypertrophiques de l'exercice s'explique par l'augmentation de l'expression des MRFs par les noyaux des fibres musculaires (Lowe and Alway, 1999).

Il est probable que ce soit l'absence de l'un ou plusieurs MRFs qui soit à l'origine de l'atrophie induite par SREBP-1 et qu'une augmentation du niveau endogène d'expression d'un seul MRF ne soit pas suffisante pour induire une hypertrophie. Il est probable également

qu'une expression combinée de MYOG, MYOD1 et MEF2C puisse engendrer une hypertrophie musculaire.

Les mesures d'index de fusion montrent que la surexpression de SREBP-1a ou SREBP-1c diminue le nombre de noyaux présents dans les myotubes. Par contre, la surexpression de SREBP-1 et MYOD1, MYOG ou MEF2C ne diminue pas le nombre de noyaux par myotubes. La diminution du nombre de noyaux par myotube n'est pas engendrée par une action directe de SREBP-1. Au cours de l'hypertrophie musculaire, la quantité de noyaux par fibre peut augmenter *via* le recrutement et la fusion des cellules satellites. L'effet opposé a également été montré : au cours de l'atrophie musculaire, le nombre de noyaux diminue par apoptose. Mais récemment, la diminution du nombre de noyaux au cours de l'atrophie musculaire a été remise en question. Des études de suspension de souris ont montré qu'au cours de ce type d'atrophie, le nombre de noyaux ne varie pas et que lorsque les souris reprennent une activité normale, la masse des muscle postérieurs réaugmente sans toutefois augmenter le nombre de noyaux par fibre. Les données actuelles attestent plutôt le fait que le nombre de noyaux ne varie pas au cours de l'atrophie musculaire. Dans notre modèle expérimental d'atrophie *in vitro*, la diminution du nombre de noyaux est probablement due à une diminution trop importante du cytoplasme conduisant à la mort cellulaire.

Dans notre modèle d'atrophie induite par SREBP-1, la dégradation protéique est diminuée. A l'inverse, elle est augmentée lors de l'inhibition de l'expression endogène de SREBP-1. Nous montrons que l'expression d'Atrogin-1 est fortement inhibée par SREBP-1 au contraire de l'expression de MuRF1 et que ces régulations ne sont pas dépendantes des MRFs ni des bHLHB.

De plus, la surexpression de SREBP-1 augmente la phosphorylation de FOXO1 et FOXO3, inhibant ainsi les capacités de ces facteurs de transcription à activer l'expression des gènes Atrogin-1 et MuRF1. En plus du niveau de phosphorylation déterminé par Western-blot, nous avons confirmé la diminution des ratios FOXO3 nucléaire / FOXO3 cytoplasmique en réponse à la surexpression de SREBP-1 par immunomarquage des protéines FOXO3 (figure 33). La voie Akt augmente la phosphorylation de FOXO et en parallèle augmente la maturation et la synthèse de SREBP-1. Dans la cellule, l'augmentation de la maturation et de l'expression de SREBP-1 par la voie mTOR est corrélée avec l'augmentation de la

phosphorylation de FOXO. Dans notre étude nous montrons que la surexpression de SREBP-1 augmente la phosphorylation de FOXO.

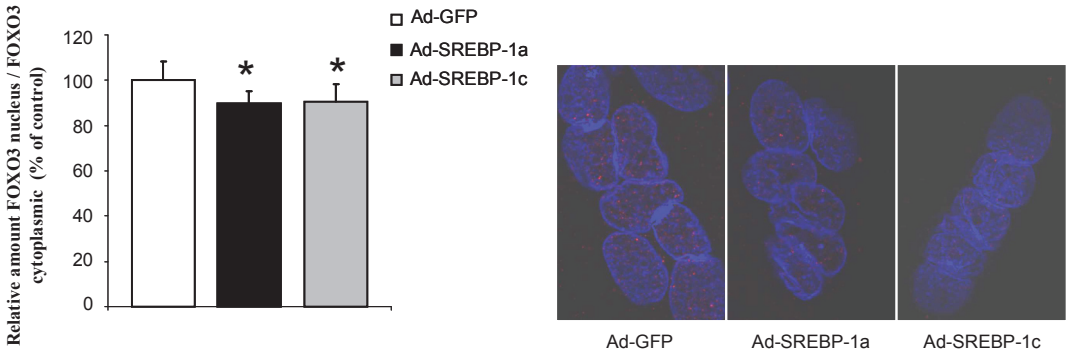


Figure 33 : Effet de SREBP-1 sur la localisation de FOXO3.

Bien que SREBP-1 soit capable d'inhiber l'expression de MuRF1 en inhibant l'activité transcriptionnelle de FOXO, l'étude du promoteur du gène codant pour MuRF1 montre que SREBP-1 augmente l'activité du promoteur de MuRF1 dans des myotubes humains. Nos résultats ont mis en évidence la région promotrice impliquée dans l'activation du promoteur par SREBP1. Cette région comprend notamment des sites Ebox et un site de fixation SRE (Amemiya-Kudo *et al.*, 2002).

Dans notre modèle d'atrophie, l'augmentation de l'expression de MuRF1 n'est pas suffisante pour augmenter la dégradation protéique. La régulation de l'expression des atrogènes est un bon marqueur de l'activation du système UPS dans la plupart des systèmes d'atrophie musculaire, mais ce système peut également être régulé par l'expression des composants du protéasome. De plus, bien que le système UPS soit le plus impliqué dans la régulation de la dégradation des protéines musculaires, il n'est pas le seul système de dégradation protéique au sein du muscle.

Pour mieux définir le mécanisme de régulation de la dégradation protéique par SREBP-1, il semble important d'envisager une régulation des autres systèmes de dégradation et également une régulation du système UPS autre que *via* la régulation des atrogènes.

L'activation de SREBP-1 implique plusieurs niveaux de régulation, incluant l'expression génique, le clivage protéique du précurseur, le transport nucléaire de la forme mature et le contrôle de son activité transcriptionnelle (Nadeau *et al.*, 2004, Gosmain *et al.*, 2005, Dif *et al.*, 2006, Nadeau *et al.*, 2006). Les facteurs de croissance comme l'insuline et

l'IGF1 ont été décrits comme des activateurs de SREBP-1 dans différents types cellulaires. Dans le muscle, la maturation de SREBP-1 est fortement stimulée par l'insuline, *via* l'activation de la voie PI3K/PKB et la voie des MAPK. SREBP-1 lui-même participe à l'activation de la voie PI3K/PKB en activant l'expression de la sous-unité p55 (Kallin *et al.* , 2007). Le rôle de l'insuline et des facteurs de croissance dans le développement de l'hypertrophie musculaire a été clairement démontré. Ainsi, l'effet atrophique de SREBP-1 pourrait participer à un contrôle négatif régulant l'hypertrophie induite par les facteurs de croissance.

ARTICLE N°2

Sirtuine 1 régule l'expression de SREBP-1c de façon LXR-dépendante dans le muscle squelettique.

Sirtuin 1 regulates SREBP-1c expression in a LXR-dependent manner in skeletal muscle. *PLoS One*. 2012;7(9):e43490. Epub 2012 Sep 11.

Defour A, **Dessalle K**, Castro Perez A, Poyot T, Castells J, Gallot YS, Durand C, Euthine V, Gu Y, Béchet D, Peinnequin A, Lefai E et Freyssenet D.

Introduction

SIRT1, comme SREBP-1c, est impliqué dans la régulation du métabolisme gluco-lipidique, dans la différenciation musculaire et dans la régulation de la masse musculaire.

Dans le muscle squelettique, l'augmentation de l'expression de SIRT1 ou de SREBP-1c inhibe la différenciation musculaire en inhibant respectivement l'activité tanscriptionnelle de MEF2C et MYOD1 et en inhibant l'expression de MYOG, MYOD1 et MEF2C (Fulco *et al.*, 2003, Zhao *et al.*, 2005). SREBP-1c est également impliqué dans l'atrophie musculaire. En effet, nous avons montré dans l'article n°1 que SREBP-1 induit une atrophie en inhibant l'expression des MRFs résultant en une diminution de l'expression des protéines sarcomériques.

Concernant SIRT1, de nombreux travaux montrent que l'augmentation de son activité permet de réorienter le métabolisme en augmentant l'utilisation des lipides comme substrats énergétiques. SIRT1 augmente la transition des fibres musculaires de type II vers un type I et régule la masse musculaire en réprimant l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription FOXO1/3, en inhibant la voie du TNFα et en modulant l'activité transcriptionnelle et l'expression des MRFs.

Ces résultats attestent plutôt d'un effet bénéfique de SIRT1 sur le métabolisme musculaire et sur le maintien de la masse musculaire, bien que SIRT1 soit potentiellement capable d'induire l'atrophie musculaire en inhibant l'activité transcriptionnelle de MYOD1 et MEF2C.

L'expression de SREBP-1c et de SIRT1 sont respectivement dépendantes du statut nutritionnel et énergétique. Lors de périodes de jeûne ou de restriction calorique, l'expression de SIRT1 augmente au contraire de l'expression de SREBP-1c qui diminue. À l'opposé, lors d'une augmentation de l'apport calorique, l'activité de SIRT1 est inhibée et l'expression de SREBP-1c est augmentée. Ces deux protéines ont des effets globalement opposés sur la régulation du métabolisme musculaire et sur la régulation de la masse musculaire.

Dans le foie, le rôle de SIRT1 sur l'expression et l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c est bien défini. Par contre, dans le muscle squelettique, qui est un organe majeur

de la régulation du métabolisme général, peu de choses sont connues sur la régulation de SREBP-1c par SIRT1.

Ainsi, nos travaux ont eu pour but de déterminer le rôle de SIRT1 sur l'expression de SREBP1c dans le muscle. Ces travaux ont été menés afin de comprendre comment ces deux protéines sont capables d'intégrer les *stimuli* des statuts énergétique et nutritionnel pour permettre l'adaptation du tissu musculaire aux conditions énergétiques et nutritionnelles.

Discussion

La mutation délétère de SIRT1 chez des souris augmente l'expression de SREBP1c dans les muscles squelettiques en comparaison avec des souris hétérozygotes pour cette mutation. D'autre part, notre étude montre que la surexpression de SIRT1 augmente l'expression de SREBP-1c dans des myotubes C2C12. De plus, nous avons montré que dans le muscle gastrocnémien des souris KO SIRT1, l'acétylation des récepteurs nucléaires LXR est plus élevée. Or, il est connu que l'acétylation des LXR module leur activité transcriptionnelle. Ainsi nous avons déterminé, par l'utilisation de constructions rapportrices de l'activité du promoteur du gène SREBP-1c, que SIRT1 augmente l'expression de SREBP-1c en augmentant l'activité transcriptionnelle des LXRs. En effet, nous avons montré dans des myotubes C2C12 que la mutation des sites LXRE de fixation à l'ADN bloque l'augmentation de l'activité du promoteur de SREBP-1c. SIRT1 régule l'activité transcriptionnelle des LXRs, permettant ainsi de réguler la transcription des gènes codant pour SREBP-1c via la fixation des LXRs sur les motifs conservés LXRE du promoteur du gène SREBP-1c.

L'activation de SREBP-1c augmente l'expression des gènes de la synthèse lipidique, de la captation du glucose et de la glycolyse. Ainsi, en augmentant l'expression de SREBP-1c, SIRT1 est capable d'activer la synthèse lipidique et la glycolyse. Ce qui est contradictoire avec les effets de SIRT1 sur le métabolisme lipidique, puisqu'il est admis que l'augmentation de l'activité de SIRT1 induit une augmentation de l'oxydation lipidique et une diminution de la synthèse lipidique.

Cependant, dans notre étude, nous avons étudié la régulation transcriptionnelle de SREBP-1c. Or, nos derniers résultats montrent que la surexpression de SIRT1 dans des myotubes humains en culture primaire diminue l'expression d'HKII qui est une cible directe de SREBP-1c (figure 34).

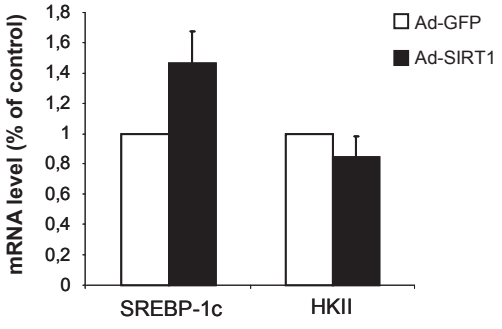


Figure 34 : SIRT1 régule l'expression des ARNm d'HKII et de SREBP-1c

Comme reporté dans l'étude de Ponugoti *et al.*, SREBP-1c est également une cible directe de SIRT1. Le jeûne chez la souris induit une augmentation de l'expression de SIRT1 associée à une diminution de l'acétylation de SREBP-1c et à une diminution de l'expression des gènes cibles de SREBP-1c dans le foie de souris. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'inhibition de SIRT1 dans le foie de souris à jeun augmente le niveau d'acétylation de SREBP-1c, résultant en une augmentation de l'expression des gènes cibles de SREBP-1c. (Ponugoti *et al.*, 2010). Les études faites chez des vers et dans le foie de souris montrent que SIRT1 diminue la stabilité des protéines SREBP-1c par désacétylation (Ponugoti *et al.*, 2010, Walker *et al.*, 2010). La délétion de SIRT1 spécifiquement dans le foie de souris augmente fortement la synthèse lipidique induisant une stéatose hépatique. Cette déplétion conduit donc à un niveau élevé de SREBP-1c actif, expliquant l'activation de la lipogenèse.

Au regard de ces données dans le foie de souris, il est probable que SIRT1 soit capable de réguler le niveau d'acétylation et donc l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c dans le muscle squelettique. Cette hypothèse semble se vérifier étant donné nos résultats complémentaires sur l'expression d'HKII et selon les rôles respectifs de SIRT1 et SREBP-1c dans le muscle squelettique.

En accord avec la littérature, nous avons montré que la surexpression de SIRT1 augmente la captation du glucose dans des myotubes C2C12 (figure 35). Suite à l'exercice physique et à la restriction calorique, l'augmentation de l'expression et de l'activité de SIRT1 et de PGC-1α pourrait participer à l'augmentation du recrutement et de l'expression du transporteur Glut4 (Michael *et al.*, 2001, Suwa *et al.*, 2011). Cependant, nous montrons également que dans des myotubes humains, SIRT1 diminue l'expression d'HKII (figure 35), participant aussi à la réorientation du métabolisme, inhibant l'utilisation du glucose et stimulant l'oxydation lipidique. Par conséquent, SIRT1 augmente la captation du glucose mais diminue l'expression d'HKII, diminuant ainsi l'utilisation du glucose par la cellule. En effet, si le glucose n'est pas phosphorylé par HKII, il ressort de la cellule. Toutefois, nous n'avons mesuré que la quantité d'ARNm d'HKII en réponse à SIRT1. Il est possible que SIRT1 agisse sur la régulation de la stabilité de la protéine ou encore sur l'activité d'HKII.

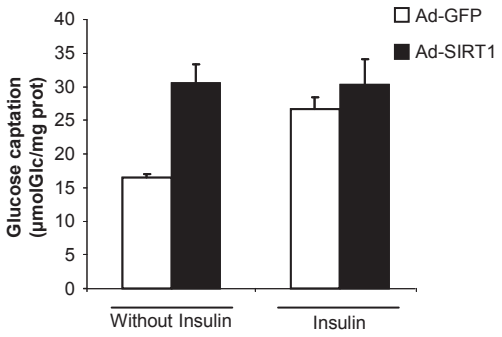


Figure 35 : Effet de la surexpression de SIRT1 sur la captation du glucose.

Dans le muscle squelettique, les effets bénéfiques de SIRT1 sur le métabolisme lipidique sont avérés. Il a été démontré que l'activation de SIRT1 permet d'inhiber l'accumulation de lipides intramusculaires induites *in vivo* par un régime enrichi en lipides ou *in vitro* par un milieu enrichi en glucose. Les facteurs de transcription SREBP-1 sont eux impliqués dans la synthèse lipidique. Il a été montré que chez des personnes obèses ou insulino-résistantes, l'expression basale de SREBP-1c est plus élevée et que leurs muscles squelettiques accumulent des lipides. Par conséquent, il est probable que dans les muscles squelettiques SIRT1 puisse inhiber l'accumulation de lipides en inhibant l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c et ainsi lutter contre l'installation de l'insulino-résistance musculaire induite en partie par l'accumulation de lipides.

ARTICLE N°3

Implication du métabolisme sphingolipidique dans l'atrophie musculaire induite par le TNFα et la greffe de tumeur.

TNFα and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skeletal Muscle*. 2012 Jan 18;2(1):2.

De Larichaudy J, Zufferli A, Serra F, Isidori AM, Naro F, **Dessalle K**, Desgeorges M, Piraud M, Cheillan D, Vidal H, Lefai E et Némoz G.

Introduction

Notre équipe s'intéresse également au rôle des céramides dans des modèles expérimentaux d'atrophie musculaire induite par le TNFα.

Le TNFα est une molécule pléïotrope qui a de multiples effets sur le muscle conduisant à une forte atrophie musculaire. Dans le muscle, le TNFα inhibe la différenciation et la prolifération cellulaire, bloquant ainsi dans le muscle adulte la régénération musculaire en inhibant notamment l'expression des MRFs (Ji *et al.* , 1998, Argiles *et al.* , 2000). Il interfère également avec le métabolisme protéique, il active fortement la dégradation protéique et inhibe la synthèse protéique en agissant sur le transport des acides aminés (Argiles *et al.*, 2000).

Le TNFα permet également d'activer la voie de synthèse des céramides qui est un messager sphingolipidique impliqué dans la réponse au stress. Les sphingolipides sont connus pour leur rôle dans l'inflammation et l'apoptose. Dans le muscle, la plupart des travaux ont porté sur l'impact de l'accumulation de céramides dans le développement de la résistance à l'insuline notamment en inhibant la voie de signalisation à l'insuline (Summers, 2006). Cependant, d'autres travaux ont récemment mis en avant l'effet inhibiteur des céramides sur la myogenèse en régulant l'activité de l'un des effecteurs de la PKB, mTOR.

Ainsi, l'objectif de ces travaux a été de démontrer le rôle des céramides dans l'atrophie musculaire, et de caractériser la voie de signalisation par laquelle l'augmentation intramusculaire de céramides aboutit à une atrophie musculaire en déséquilibrant la balance de synthèse/dégradation protéique.

Discussion

Dans ces travaux, le traitement de myotubes des lignées L6 et C2C12 durant trois jours successifs avec des concentrations de TNFα voisines de celles observées dans le sang de patients cachectiques, s'est avéré un modèle pertinent pour mimer les effets physiopathologiques du TNFα (Michalaki *et al.* , 2004). En effet, dans ce modèle d'atrophie musculaire, la surface des myotubes murins est diminuée par l'augmentation de la dégradation protéique *via* l'augmentation de l'activation de FOXO3 ; et par la diminution de la synthèse protéique *via* l'inhibition de l'activation de la S6K. De plus, nous montrons dans ce modèle une diminution de l'activité créatine kinase (de 20% en moyenne).

Afin de déterminer le rôle des céramides dans ce modèle d'atrophie musculaire, nous avons étudié les effets d'inhibiteurs de la synthèse des céramides (myriocine, GW4869 et/ou OMS). Nos résultats montrent que l'inhibition de la synthèse des céramides protège des effets atrophiques du TNFα en maintenant la taille, la fonction (activité créatine kinase), et le potentiel contractile (contenu en myosine) des myotubes L6. La formation de céramides participe donc à l'atrophie provoquée par le TNFα, et les céramides peuvent être considérés comme des seconds messagers atrophiques formés en réponse à la fixation du TNFα sur son récepteur. Comme attendu, nous montrons que le TNFα augmente la quantité totale de céramides dans des myotubes L6 et que le traitement des myotubes avec des céramides reproduit les effets atrophiques du TNFα.

Dans le muscle squelettique, l'accumulation de céramides est connue pour participer à l'insulino-résistance en réprimant la voie de signalisation à l'insuline notamment en activant la PKC (Summers, 2006). Dans notre modèle d'atrophie musculaire, nous montrons que l'inhibition de la synthèse des céramides augmente l'expression et l'activité de la S6K, l'expression d'eIF3F, l'activité d'Akt et inhibe l'expression d'Atrogin-1 et l'activité de 4EBP1. En accord avec la littérature, nous montrons que l'augmentation de la synthèse des céramides par le TNFα, en réprimant la voie anabolique Akt/mTOR, induit une diminution de la synthèse protéique et une augmentation de la dégradation protéique.

Les céramides sont également connus pour leur capacités à réprimer l'activité et l'expression de la PLD, qui est un activateur de mTOR (Venable and Obeid, 1999, Sun and

Chen, 2008). L'influence négative des céramides produits dans notre modèle d'atrophie sur tous les effecteurs de la voie mTOR pourrait donc passer par une inhibition de la PLD. Nos résultats montrent que d'une part, le TNFα réprime l'expression de la PLD *via* la synthèse des céramides et que d'autre part, l'ajout d'acide phosphatidique, qui mime une activation de PLD, supprime l'effet atrophique du TNFα. Par conséquent, les effets atrophiques des céramides peuvent s'expliquer par une diminution de l'expression de la PLD.

In vivo, l'implantation d'un carcinome C26 chez la souris induit une forte cachexie. Nous avons observé dans ce modèle une forte augmentation de l'expression des atrogènes dans le tissu musculaire et de leurs cibles directes, les ubiquitines ligases MurF1 et Atrogine-1 (Lecker *et al.* , 2004, Murton *et al.*, 2008) (figure 36). Nous avons de plus observé que, outre ces caractéristiques classiques, le développement de la tumeur induit une augmentation de plus de 50% du contenu du tissu musculaire en céramides, confirmant les résultats obtenus *in vitro*, et établissant pour la première fois un lien entre la cachexie et un remaniement du métabolisme sphingolipidique dans le muscle.

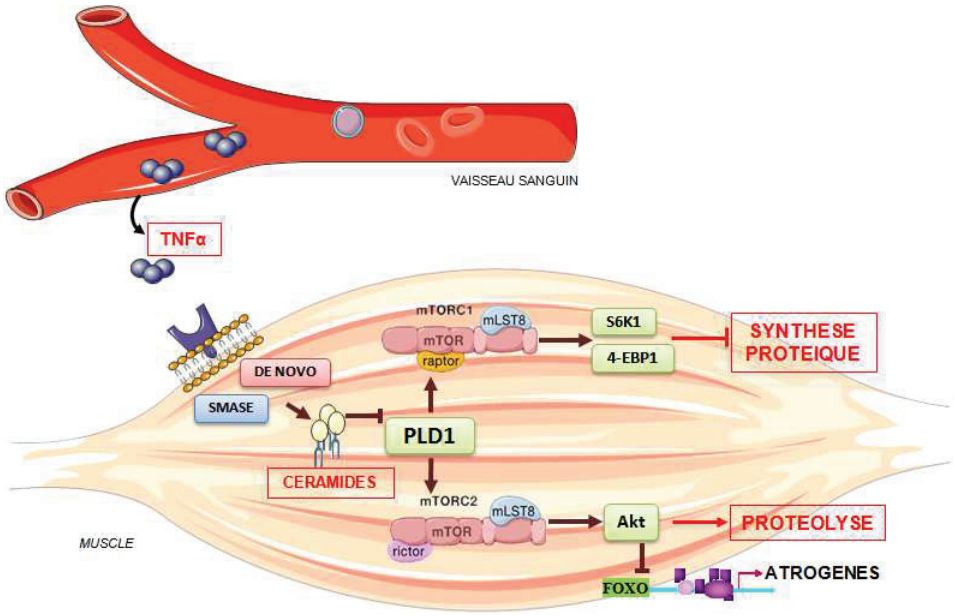


Figure 36 : Implication de la synthèse des céramides dans l'atrophie induite par le TNFα.

L'ensemble de ces résultats nous permet d'affirmer que les sphingolipides, et en particulier les céramides, ont un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie protéique du muscle. Ainsi, le métabolisme sphingolipidique apparaît comme une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'atrophie musculaire.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

1. SREBP-1 RÉGULATEUR DE LA BALANCE PROTÉIQUE

La masse musculaire résulte de l'équilibre de la balance entre synthèse et dégradation protéique. Dans les situations d'atrophie, l'augmentation de la dégradation peut s'accompagner d'une baisse de la synthèse protéique. Dans les situations d'hypertrophie, l'augmentation de la synthèse protéique peut être accompagnée par l'activation de la myogénèse, avec la prolifération de myoblastes à partir des cellules satellites résidentes, myoblastes qui vont alors fusionner aux myotubes existants.

Les travaux de cette thèse ont porté notamment sur la modulation de l'expression du facteur de transcription SREBP-1 dans le muscle, afin d'étudier son rôle sur l'équilibre de la balance protéique musculaire, et les mécanismes moléculaires en jeu dans la régulation de la masse musculaire et du métabolisme associé.

1.1. SREBP-1 régule la dégradation protéique

Les deux principaux acteurs de la protéolyse au cours de l'atrophie musculaire sont les ubiquitine-ligases Atrogin-1 et MuRF-1, dont l'expression est principalement régulée par les facteurs de transcription FOXOs (Sandri, 2004). L'expression de ces deux facteurs atrogéniques est en effet fortement activée au cours de situations d'atrophie comme la décharge, la dénervation, l'administration de glucocorticoïdes ou la cachexie associée au cancer ou au diabète. Parmi les cibles directes décrites d'Atrogin-1 et MuRF-1, on trouve la troponine I, la titine, les chaînes lourdes de myosine (MyHC), les chaines légères de myosine (MyLC-1 and MyLC-2), et les protéines de (MyBP-C) ou encore la nébuline, ainsi que MYOD1 (Tintignac *et al.*, 2005, Witt *et al.*, 2005, Csibi *et al.*, 2009, Eddins *et al.*, 2011).

Les travaux réalisés au cours de cette étude ont montré que la surexpression de SREBP-1 dans des myotubes humains diminue l'activité transcriptionnelle de FOXO1 et de FOXO3 avec une augmentation de leur niveau de phosphorylation qui conduit à leur

exclusion du noyau. De façon concordante, l'expression d'Atrogin-1 est fortement inhibée dans ce contexte. A l'inverse, l'expression de MuRF1 est fortement augmentée, suggérant un mécanisme d'activation indépendant des facteurs de transcription FOXOs.

L'activation de la voie NFκB est connue pour activer spécifiquement l'expression de MuRF1 indépendamment d'Atrogin-1(Cai *et al.*, 2004), mais n'est pas responsable de l'induction de MuRF1 observée en réponse à SREBP-1. En effet, nous avons montré que cette activation est directe et résulte d'une fixation des protéines SREBP-1 sur le promoteur de MuRF1.

La voie de signalisation Akt / mTOR régule positivement l'expression et la maturation de SREBP-1, et négativement l'activité transcriptionnelle des FOXOs (Yabe *et al.*, 2002, Yabe *et al.*, 2003, Engelking *et al.*, 2004, Sandri *et al.*, 2004, Sundqvist *et al.*, 2005, Porstmann *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2010). Lorsque cette voie est activée, SREBP-1 augmente dans le noyau alors que les protéines FOXOs en sont exclues. Inversement, une absence d'activation de cette voie ralentit l'accumulation de SREBP-1 dans le noyau et permet en parallèle l'augmentation du contenu nucléaire en FOXOs. Le niveau d'activation de la voie Akt/mTOR conditionne donc les proportions relatives de ces deux facteurs de transcription dans le noyau.

Dans le modèle d'atrophie induite par SREBP-1, l'inhibition de l'activité FOXO pourrait s'expliquer par l'activation de la voie Akt/mTOR. En effet, parmi les cibles de SREBP-1, le gène de la sous-unité p55 de la PI3K est très fortement induit (Rome *et al.*, 2008). Cette augmentation provoque un déséquilibre stœchiométrique entre les différentes sous-unités régulatrices (p85, p55, et p50) qui pourrait modifier l'activité de cette enzyme et entraîner une activation significative d'Akt. Les travaux engagés au laboratoire sur cet aspect méritent donc d'être poursuivis afin de déterminer si la quantité nucléaire de SREBP-1 peut modifier l'activité de cette voie de signalisation, créant ainsi une boucle de régulation.

1.2. SREBP-1 régule la synthèse protéique

Dans le muscle squelettique, l'activation de la voie Akt/mTOR permet d'augmenter la synthèse protéique en régulant l'activité et l'expression des facteurs de l'initiation de la traduction (eIF2B, eIF4E, eIF3F) ou encore la kinase p70S6K (Welsh *et al.*, 1998, Bodine *et al.*, 2001, Rommel *et al.*, 2001, Cohen and Goedert, 2004, Weigl, 2012).

Dans la fibre musculaire différenciée, l'expression des gènes muscle-spécifiques est sous le contrôle des MRFs, en coopération avec les facteurs MEF2. Ainsi l'expression, entre autres, des protéines sarcomériques Troponine, Myosine, Créatine kinase et Desmine nécessite la liaison à leur promoteur des MRFs (Lassar *et al.* , 1989, Lin *et al.*, 1991, Wentworth *et al.*, 1991, Edmondson and Olson, 1993, Li and Capetanaki, 1993). Une étude récente montre que l'expression de MEF2C est nécessaire au maintien de l'intégrité du sarcomère dans le muscle adulte (Potthoff *et al.* , 2007). De plus, une étude chez la souris montre que les effets hypertrophiques de l'exercice sont en partie médiés par l'expression des MRFs au sein de la fibre différenciée (Lowe and Alway, 1999).

Si leur rôle dans la fibre différenciée est encore discuté, il semble cependant établi que la persistance de leur expression est nécessaire à la synthèse des protéines sarcomériques.

La surexpression de SREBP-1 dans le muscle inhibe l'expression des MRFs *via* l'induction des répresseurs transcriptionnels bHLHB2 et B3 (Lecomte *et al.*, 2010). Nos travaux montrent que le maintien de l'expression de MYOD, MYOG ou MEF2C dans des myotubes surexprimant SREBP-1 est suffisant à prévenir l'atrophie en préservant la synthèse protéique. Même si nous n'avons pas réalisé d'expériences en restaurant de façon conjointe l'expression des différents MRFs dont l'expression est diminuée par SREBP-1, nous pouvons cependant suggérer que les MRFs ont un rôle déterminant dans la fibre musculaire différenciée pour l'activation de la régulation de la synthèse protéique.

Dans des situations d'atrophie musculaire où l'expression des MRFs est inhibée, il serait donc intéressant de déterminer quels sont les niveaux d'expression de SREBP-1. En effet, il est possible que l'augmentation de l'expression et/ou de l'activité de SREBP-1 puisse participer à l'inhibition de l'expression des MRFs et ainsi à l'atrophie musculaire observée.

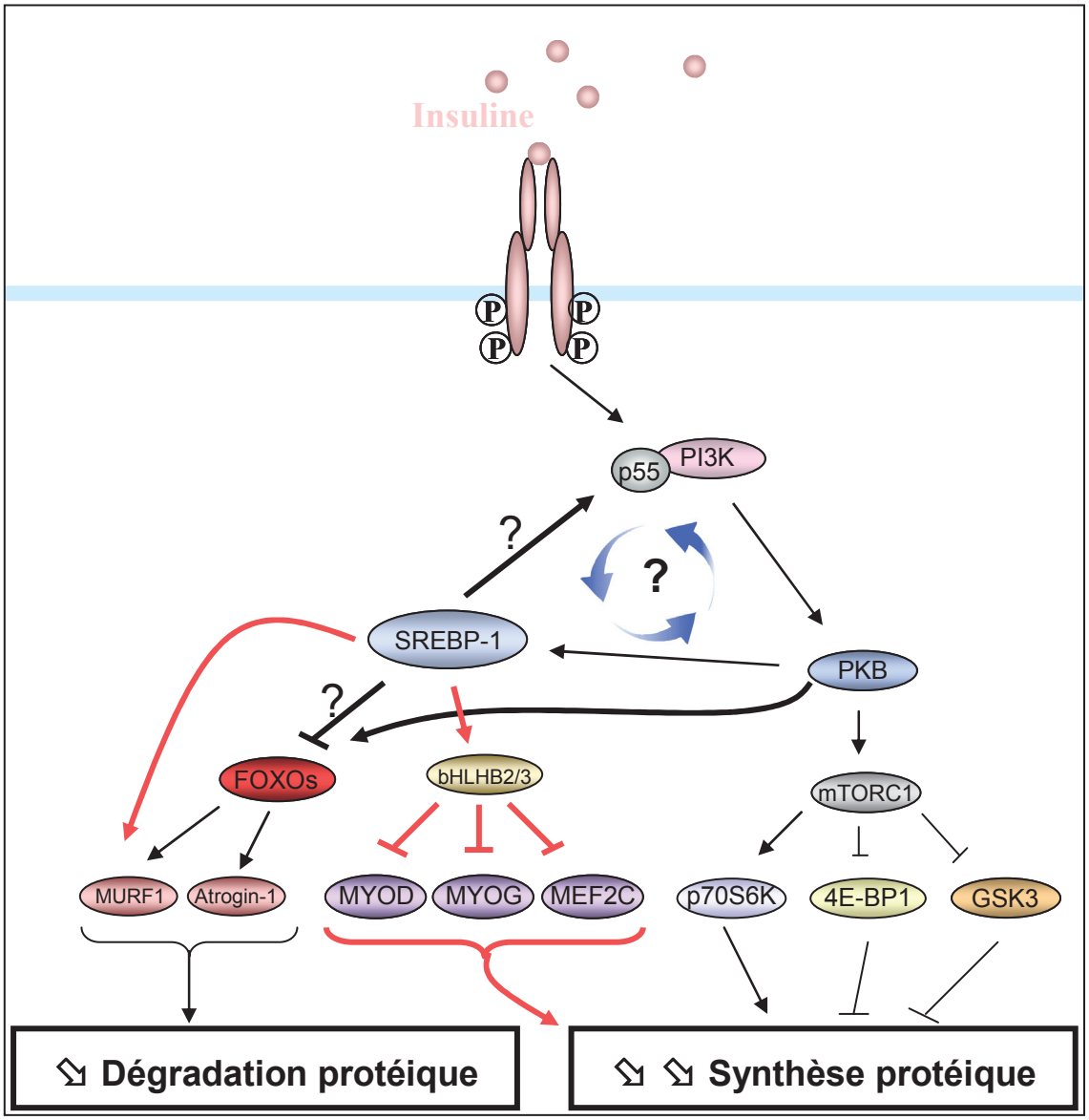


Figure 37 : Régulation de la balance protéique par SREBP-1. Résultats et hypothèses.

1.3. SREBP-1 module la quantité de noyaux sarcoplasmiques

A partir de 1960, de nombreux travaux ont porté sur la relation entre la taille des fibres musculaires et le nombre de noyaux. Ces différents travaux ont abouti au concept de domaine myonucléaire, selon lequel la taille de la cellule musculaire dépend du nombre de noyaux. Chaque noyau sarcoplasmique a un « volume territorial » c'est-à-dire un domaine de juridiction correspondant au volume cytoplasmique par noyau (Van der Meer *et al.* , 2011).

En accord avec ce concept, de nombreuses études montrent qu'au cours de l'hypertrophie le nombre de noyaux augmente par l'activation et la fusion des cellules

satellites (Winchester and Gonyea, 1992, Allen *et al.* , 1995, Allen *et al.* , 1999). Au cours de l'atrophie, les effets inverses sont observés, avec une diminution du nombre de noyaux par apoptose (Tews *et al.* , 1997, Viguie *et al.* , 1997, Yoshimura and Harii, 1999).

Plus récemment, ces travaux ont été remis en question puisque dans plusieurs cas d'atrophie musculaire le domaine myonucléaire n'est pas constant. Les données actuelles attestent plutôt d'un nombre de noyaux constant au cours de l'atrophie induite par exemple par la décharge ou par la dénervation (Gundersen and Bruusgaard, 2008, Bruusgaard *et al.* , 2012).

En fait, la conservation du nombre de noyaux au cours de l'atrophie ou de l'hypertrophie va dépendre du type d'intervention : un exercice induisant une destruction-régénération des fibres ou un exercice en endurance, une activation de la voie IGF-1, ou les effets de la myostatine ayant des effets sélectifs sur l'activation des cellules satellites (Van der Meer *et al.*, 2011).

La régulation de la masse musculaire passe essentiellement par la modulation de la synthèse et/ou de la dégradation protéique. Toutefois, suite à une activité physique, l'augmentation de l'expression des MRFs au sein des cellules satellites permet d'activer la différenciation et la fusion de ces cellules aux fibres existantes. Ce processus de régénération entraîne une augmentation du volume fibrillaire mais aussi une augmentation du nombre de noyaux apportés par la fusion des myoblastes.

Les mesures d'indice de fusion montrent que dans notre modèle expérimental d'atrophie induite par SREBP-1, le nombre de noyaux par myotube est diminué. Une des hypothèses est que l'atrophie induite par la surexpression de SREBP-1 s'accompagne d'apoptose conduisant à la disparition de noyaux dans les cellules.

Le maintien de l'expression des MRFs prévient cette diminution de l'index de fusion induite par SREBP-1, alors que la surexpression seule des MRFs ne l'augmente pas, excluant ainsi une augmentation de la fusion et de la différenciation des myoblastes persistants en culture.

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le maintien de l'expression des MRFs dans la fibre musculaire différenciée est également indispensable à la préservation du nombre de noyaux dans chaque cellule.

2. SREBP-1 ET SIRT1 DEUX RÉGULATEURS DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE MUSCULAIRE

2.1. Métabolisme lipidique

Le muscle squelettique utilise principalement comme substrats énergétiques du glucose et des lipides. Les substrats lipidiques utilisés par le muscle squelettique sont les acides gras apportés par la circulation sanguine ou stockés dans le muscle sous forme de triglycérides et contenus dans des gouttelettes lipidiques (triglycérides intramyocitaires ou IMTG). Pour être utilisés par le muscle, les lipides circulants sont hydrolysés par la LPL, libérant des acides gras libres qui sont captés par le muscle grâce à des transporteurs spécifiques (FATP, CD36), puis activés par l'acyl-CoA synthase. Sous la forme d'AG-CoA, les acides gras vont être soit oxydés pour donner de l'énergie, soit estérifiés pour être stockés sous forme d'IMTG (Watt and Hoy, 2012).

Lorsque les substrats énergétiques préférentiels du muscle (glucose et glycogène) diminuent au cours d'un jeûne, d'une restriction calorique ou d'un exercice en endurance (sans apports caloriques), l'intégration des signaux extracellulaires de cette diminution permet d'augmenter l'expression et l'activité des enzymes impliquées dans la captation des lipides, la lipolyse des triglycérides et l'oxydation lipidique (Watt and Hoy, 2012). Par conséquent, le catabolisme lipidique est activé, permettant d'alimenter le muscle en énergie à partir des réserves lipidiques intracellulaires, mais également des acides gras circulants provenant du tissu adipeux ou du foie. À l'inverse, dans des conditions énergétiques favorables, par exemple suite à une prise alimentaire, le muscle squelettique, comme le foie et le tissu adipeux, est dans une phase d'anabolisme lipidique. Ces organes intègrent les signaux extracellulaires permettant d'augmenter l'activité et/ou l'expression des principales enzymes de la captation des acides gras et de la synthèse des triglycérides.

Dans les tissus insulino-sensibles, l'expression et la maturation des facteurs de transcription SREBP-1c sont augmentées en réponse à l'insuline (Ducluzeau *et al.*, 2001, Sewter *et al.*, 2002, Dif *et al.*, 2006). En modulant l'expression de nombreuses enzymes, les facteurs de transcription SREBP-1 vont réorienter le métabolisme vers la synthèse et le stockage des lipides : ils activent la synthèse des acides gras saturés et mono-insaturés, la formation de monoacyl glycerol 3 phosphate et ainsi favorisent la synthèse de triglycérides et

de phospholipides. En parallèle, ils favorisent la glycolyse et la captation du glucose (Horton, 2002, Horton *et al.*, 2002b, a, Horton *et al.*, 2003a).

L'augmentation de l'expression et de la maturation de SREBP-1 suite à une prise alimentaire va permettre d'augmenter le stockage d'énergie dans le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique.

L'insulino-résistance se caractérise par une hypertriglycéridémie, avec une augmentation de la quantité de triglycérides et d'acides gras circulants, et par une augmentation de la quantité de lipides intra myocitaires liée à l'augmentation du recrutement, de la quantité de transporteurs CD36 présents à la membrane du myotube et à une diminution de l'oxydation lipidique (Aguer *et al.* , 2011, Samuel and Shulman, 2012).

En situation d'insulino-résistance, l'augmentation de l'expression et de la maturation de SREBP-1c est altérée, et la réponse sur l'anabolisme lipidique est donc déficiente (Ducluzeau *et al.*, 2001, Sewter *et al.*, 2002). Cependant, les données de la littérature divergent quant au niveau d'expression basal de SREBP-1c. Si Sewter et al. montrent une diminution de l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique de patients DT2, une autre équipe montre que chez des personnes obèses, sédentaires et dyslipidémiques, un entraînement physique en endurance de deux semaines diminue fortement l'expression basale de SREBP-1c ainsi que l'insulino-résistance. Ces travaux suggèrent donc que l'expression basale de SREBP-1c est corrélée positivement avec l'insulino-résistance (Smith *et al.*, 2009). En fait, chez le sujet sain, l'expression musculaire de SREBP-1 est cyclique et subit des variations de grandes amplitudes suivant l'insulinémie, évoluant en fonction du statut nutritionnel de l'individu. Chez les sujets DT2 et obèses, l'insulino-résistance abolit les variations d'expression de SREBP-1 en fonction du statut nutritionnel. L'expression de SREBP-1 devient chronique.

SREBP-1c est activé par l'insuline dans le muscle squelettique soit par la voie IRS-1/PI3Kinase/AKT, soit par la voie IRS-2/MAPKinases (Nadeau *et al.*, 2004, Gosmain *et al.*, 2005, Dif *et al.*, 2006, Nadeau *et al.*, 2006). L'insulino-résistance résulte d'un défaut de phosphorylation d'IRS-1 entraînant l'inhibition de la voie PI3Kinase/AKT en réponse à l'insuline. L'absence de réponse de l'expression de SREBP-1c aux variations de l'insulinémie serait due à ce défaut d'activation de la voie PI3Kinase/AKT. En revanche, la voie

MAPKinases, *via* IRS-2, continue d'être régulée par l'insuline, dans le muscle squelettique des sujets insulino-résistants. En conséquence, l'élévation de l'expression basale de SREBP-1c, chez les sujets obèses et DT2 serait liée à l'activation de la voie MAPKinases provoquée par l'hyperinsulinémie chronique observée chez ces sujets. Ainsi, les patients DT2 et obèses sont soumis à une surexpression chronique de SREBP-1c.

Chez des personnes obèses, la quantité de lipides stockée sous forme d'IMTG est d'environ 3,5% du volume musculaire, contre environ 0,5% chez le sujet sain (Amati *et al.* , 2011). Cette augmentation de IMTG a été reportée comme impliquée dans l'installation de l'insulino-résistance par l'induction de la lipotoxicité. Cependant, il a été montré que chez des athlètes entraînés en endurance, la quantité de IMTG est également augmentée alors que ces sportifs ont une très grande sensibilité à l'insuline (Kiens *et al.*, 1993, Amati *et al.*, 2011) .

Des études réalisées chez des sujets insulino-résistants, et également dans des modèles murins, ont montré que ce n'est pas la quantité d'IMTG qui participe à l'installation de l'insulino-résistance mais l'accumulation d'intermédiaires du métabolisme lipidique. En effet, contrairement aux personnes entraînées en endurance, les personnes insulino-résistantes accumulent des céramides ou encore des DAG (Liu *et al.* , 2007, Schenk and Horowitz, 2007, Perreault *et al.* , 2010) Chez ces personnes insulino-résistantes, la régulation de la lipogénèse et les capacités d'oxydation lipidique du muscle sont altérées, résultant en une accumulation d'intermédiaires du métabolisme lipidique (DAG, céramides) qui sont capables d'activer des protéines kinases (PKC, CAPK) qui vont ensuite phosphoryler IRS1 sur les résidus sérine et ainsi perturber la voie de signalisation de l'insuline (Muoio, 2010, Amati *et al.*, 2011, Watt and Hoy, 2012).

Les protéines SIRT1 sont des désacétylases dont l'expression et l'activité sont augmentées lors de la diminution de l'énergie disponible (restriction calorique, jeûne, exercice prolongé) et à l'inverse sont inhibées lors de l'augmentation de l'énergie disponible (prise alimentaire). L'augmentation de l'activité de SIRT1 va permettre d'augmenter les capacités oxydatives du muscle, la captation de glucose, et va inhiber la synthèse des lipides. Globalement, les protéines SIRT1 et SREBP-1 ont des actions opposées sur la régulation du métabolisme énergétique musculaire : SIRT1 favorise le catabolisme lipidique afin de générer de l'énergie alors que SREBP-1 favorise l'anabolisme lipidique afin de stocker les excédants caloriques. Les protéines SIRT1 ont été bien étudiées pour leur rôle bénéfique dans le cas de

désordres métaboliques. Dans le foie, il a été montré que chez des souris soumises à un régime enrichi en lipides, l'administration de resvératrol lutte contre la survenue de stéatose hépatique en partie en augmentant l'activité et l'expression de SIRT1. Lorsque l'expression de SIRT1 est inhibée dans le foie, l'administration de resvératrol ne prévient plus la stéatose hépatique induite par un régime enrichi en lipides (Wang *et al.* , 2009). Un mécanisme impliqué dans l'installation de stéatose hépatique est l'activation de la lipogenèse par SREBP-1c (Shimano *et al.*, 1997a, Shimomura *et al.*, 1999a, Leavens *et al.*, 2009). Dans le foie, SIRT1 est capable d'inhiber l'activité de SREBP-1c, et donc de prévenir l'accumulation de lipides (Ponugoti *et al.*, 2010).

Dans le deuxième article, nous avons étudié les effets de SIRT1 sur l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique. Nous avons montré que SIRT1 augmente l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique *via* l'augmentation de l'activité transcriptionnelle des LXRs.

Nous posons l'hypothèse, appuyée par des résultats complémentaires (diminution de l'expression HKII par la surexpression de SIRT1) et les études faites par Ponugoti et Walker dans le foie de souris, que SIRT1, même s'il augmente l'expression de SREBP-1c, diminue l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c dans le muscle squelettique en le désacétylant (Ponugoti *et al.*, 2010, Walker *et al.*, 2010). Lors d'une activité physique prolongée, d'un jeûne ou encore d'une restriction calorique, SIRT1 pourrait réprimer l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c dans le muscle squelettique (et également de SREBP-1a, qui est constitutivement exprimé) permettant ainsi d'inhiber la synthèse lipidique, la synthèse de triglycérides et également l'atrophie musculaire.

Par conséquent, l'augmentation de l'activité de SIRT1 est une piste intéressante pour lutter contre la perte de flexibilité du métabolisme lipidique observée chez les patients diabétiques de type II. En effet, l'augmentation de l'activité de SIRT1 par exemple par le resvératrol pourrait permettre d'augmenter l'oxydation lipidique, de diminuer la lipogenèse en inhibant SREBP-1c. Cette diminution de l'activité transcriptionnelle de SREBP-1 dans le muscle squelettique permettrait de lutter contre l'accumulation de lipides intramyocitaires, et contre la génération d'intermédiaires lipidiques délétères luttant ainsi contre l'insulino-résistance.

2.2. Métabolisme glucidique

Nous avons montré dans les résultats complémentaires du deuxième article que la surexpression de SIRT1 augmente la captation du glucose dans des myotubes C2C12.

De plus, nous montrons que la surexpression de SIRT1 dans des myotubes humains diminue l'expression d'HKII. Ainsi SIRT1 d'un coté augmente la captation du glucose dans la cellule musculaire, et d'un autre coté pourrait diminuer l'utilisation du glucose en réprimant la phosphorylation du glucose par l'HK II. L'enzyme HKII est également une cible de SREBP-1. Ainsi il est possible que SIRT1 inhibe l'expression d'HKII *via* l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de SREBP-1 (Gosmain *et al.*, 2004).

Cependant, Suwa *et al.* montrent que SIRT1 pourrait augmenter l'activité d'HKII *via* PGC-1α (Suwa *et al.*, 2008, 2011).

Il paraît donc important de déterminer l'impact de SIRT1 sur l'activité d'HKII afin de mieux comprendre comment SIRT1 régule la captation du glucose et de déterminer le possible rôle de SREBP-1 dans la régulation d'HKII.

2.3. Masse musculaire

À ce jour, les études faites sur SIRT1 ont essentiellement démontré les effets de l'activation de SIRT1 sur l'adaptation du métabolisme musculaire en modifiant le type de fibre plutôt que sur la régulation de la masse musculaire en elle-même. Aucune étude n'a mesuré l'impact de SIRT1 sur la régulation de la masse musculaire. Cependant, comme SIRT1 inhibe l'activité transcriptionnelle de FOXO dans le muscle et bloque l'activation de la voie NFκB, il semblerait que SIRT1 puisse avoir une action anti-atrophique sur le muscle squelettique (Yeung *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2008, Salminen and Kaarniranta, 2009, Bakkar and Guttridge, 2010, Hori *et al.*, 2011, Alamdari *et al.*, 2012).

De plus, nous pensons que SIRT1 est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de SREBP-1. Ainsi, un des mécanismes anti-atrophiques de SIRT1 pourrait être l'inhibition de l'activité de SREBP-1.

Les effets de SIRT1 sur la régulation de la masse musculaire sont encore largement inconnus, il serait donc intéressant de déterminer l'impact de SIRT1 sur la régulation de la masse musculaire.

3. SREBP-1 ET LES CÉRAMIDES

Dans le muscle squelettique, les acides gras libres vont être stockés sous la forme d'IMTG. Il a été montré que chez des personnes insulino-résistantes, ce n'est pas l'accumulation d'IMTG qui favorise le maintien de désordres métaboliques, mais la présence de métabolites lipidiques tels que les céramides (Kiens, 2006, Moro *et al.* , 2009). Chez les athlètes, la quantité d'IMTG est très élevée, mais les muscles squelettiques n'accumulent pas de céramides (Kiens *et al.*, 1993, Amati *et al.*, 2011).

Les céramides sont des sphingolipides très étudiés pour leur rôle dans l'insulino-résistance et l'inflammation. Plusieurs études montrent que les céramides sont directement responsables de l'insulino-résistance musculaire. Il a été montré que l'augmentation de la quantité de céramides bloque la signalisation à l'insuline, notamment en activant PKC qui va alors inhiber la phosphorylation d'Akt. (Muoio, 2010).

L'inflammation chronique de bas grade associée au développement de l'obésité est due à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les adipocytes subissant une surcharge lipidique. Ainsi, une importante élévation de l'expression de TNFα est observée chez les patients obèses et dans tous les modèles animaux d'obésité (Hotamisligil, 1999, Pedersen *et al.* , 2003, Dirks and Leeuwenburgh, 2006). Or les effets atrophiques du TNFα sont connus de longue date. Il provoque une perte musculaire sévère sur de nombreux modèles animaux, son expression est également associée au développement de cachexie au cours d'un cancer, et il inhibe également la myogenèse. Son action passe par l'activation de la voie NFκB et l'expression du facteur atrogénique MuRF-1 (Hunter *et al.*, 2002, Cai *et al.*, 2004, Coletti *et al.* , 2005, Dirks and Leeuwenburgh, 2006, Tisdale, 2008).

Dans un modèle expérimental d'atrophie induite par le TNFα, nous avons montré que l'atrophie résulte en partie de l'augmentation de la synthèse des céramides (article n°3). Nous avons montré que l'augmentation de la quantité de céramides conduit à l'inhibition de la voie

Akt/mTOR, induisant une augmentation de la dégradation protéique et une diminution de la synthèse protéique. Ces travaux montrent que les céramides, en plus de participer à l'insulino-résistance, induisent également une atrophie musculaire.

Plusieurs études montrent que le TNFα peut activer l'expression de SREBP-1c en favorisant son clivage dans le foie, les adipocytes ou les cellules endothéliales (Chatterjee, 1999, Inadera *et al.* , 2002, Endo *et al.* , 2007). L'élévation du taux de TNFα chez les patients obèses pourrait conduire à l'élévation de l'expression de SREBP-1 dans le muscle de ces patients, pouvant participer au développement de la sarcopénie et à l'insulino-résistance associées.

Un régime enrichi en lipides induit une augmentation de l'expression de SREBP-1c, une accumulation de triglycérides et également une accumulation de céramides impliquée dans l'installation de l'insulino-résistance. Au contraire, lorsque l'expression de SREBP-1 est diminuée, l'accumulation de triglycérides et de céramides est diminuée (Tovar and Torres, 2010).

Dans des cas d'insulino-résistance, l'expression chronique de SREBP-1 conduit à une accumulation d'IMTG, et donc favorise la synthèse des céramides (Watt and Hoy, 2012).

De plus, la maturation des facteurs de transcription SREBP-1 est régulée par les céramides. Dans des cellules CHO, la synthèse des céramides augmente l'expression et l'activité de SREBP-1. Inversement, lorsque la voie de synthèse des céramides est inhibée, l'expression des gènes cibles de SREBP-1 est diminuée (Worgall *et al.* , 2004).

Ainsi, il serait intéressant de déterminer l'impact des modulations de SREBP-1 sur la synthèse des céramides dans le muscle squelettique, ceci afin d'identifier un lien éventuel avec l'insulino-résistance.

Comme expliqué précédemment, le TNFα est capable d'augmenter l'expression de SREBP-1. Il est donc envisageable qu'au cours d'une inflammation de bas grade, l'expression de TNFα stimule la synthèse des céramides augmentant l'expression et l'activité de SREBP-1. Ce système formerait une boucle d'auto-entretien du système inflammatoire en augmentant l'anabolisme lipidique *via* SREBP-1 conduisant sur une amplification des désordres métaboliques chez l'obèse.

4. PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de décrypter les mécanismes d'induction de l'atrophie par SREBP-1, et de démontrer leur régulation par les protéines SIRT1. Au regard de mes travaux et de la littérature, il paraît important de mieux caractériser les anomalies de régulation de SREBP-1 (maturation, activité, expression) dans des cas de pathologies métaboliques (surnutrition, dyslipidémie, obésité). Dans ce cadre, l'exploration de modèles animaux avec des niveaux musculaires de SREBP-1 variables apparaît comme pertinente pour comprendre comment SREBP-1 est capable d'induire des dysfonctionnements musculaires (insulino-résistance, inflammation, atrophie musculaire).

Il convient également de replacer l'impact de SREBP-1 sur le contrôle de la fonction musculaire dans un contexte physiopathologique. SREBP-1 agit au carrefour de la régulation métabolique et de la régulation du phénotype musculaire. Plusieurs travaux montrent l'implication de SREBP-1 dans les mécanismes de l'insulino-résistance liée aux maladies métaboliques, telles que le diabète et l'obésité. Des altérations de la fonction musculaire peuvent survenir au cours de ces maladies, de l'apparition d'une fatigabilité musculaire accrue au développement d'une sarcopénie sévère. L'effet atrophique de SREBP-1 pourrait être impliqué dans l'apparition des dysfonctions musculaires au cours de ces maladies métaboliques.

Il serait intéressant d'étudier, dans des modèles animaux, ainsi que chez des patients insulino-résistants, quels seraient les effets de la restauration de l'expression cyclique de SREBP-1, de l'augmentation de l'activité de SIRT1 ou encore de l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse des céramides sur le métabolisme musculaire, sur le contenu lipidique et sur l'insulino-résistance.

Une augmentation de la fatigabilité musculaire est observée chez les patients obèses et DT2 (Merrill *et al.* , 1997, Halvatsiotis *et al.* , 2002, Ljubisavljevic *et al.* , 2010). Cette fatigabilité musculaire accrue s'accompagne d'une réduction des capacités oxydatives du muscle. Elle est due à une transition de phénotype des fibres musculaires d'un type lent oxydatif à un type rapide glycolytique (Gaster *et al.* , 2001, Oberbach *et al.* , 2006). La transition s'accompagne d'un changement de l'expression des MRFs, principaux régulateurs

du phénotype des fibres musculaires (Harridge, 2007). Dans ce type de modèle, il serait intéressant de déterminer comment SREBP-1 est impliqué dans la transition métabolique des fibres musculaires et quel pourrait être l'impact de l'augmentation de l'activité de SIRT1.

Enfin, nous avons montré que l'augmentation de la synthèse des céramides induit une atrophie musculaire. Comprendre comment les céramides et SREBP-1 se régulent mutuellement apporterait des éléments importants pour comprendre le développement de l'inflammation, du diabète ou encore de l'atrophie musculaire dans les situations d'insulino-résistance et/ou d'obésité.

BIBLIOGRAPHIE

A

Adams CM, Goldstein JL, Brown MS. Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003a;100:10647-52.

Adams GR. Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. Appl Physiol Nutr Metab. 2006;31:782-90.

Adams GR, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. J Appl Physiol. 2003b;95:2185-201.

Adams GR, Haddad F, Baldwin KM. Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles. J Appl Physiol. 1999;87:1705-12.

Adams GR, McCue SA. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. J Appl Physiol. 1998;84:1716-22.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol. 2003;3:745-56.

Aguer C, Foretz M, Lantier L, Hebrard S, Viollet B, Mercier J*, et al.* Increased FAT/CD36 cycling and lipid accumulation in myotubes derived from obese type 2 diabetic patients. PLoS One. 2011;6:e28981.

Alamdari N, Aversa Z, Castillero E, Gurav A, Petkova V, Tizio S*, et al.* Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism. Biochem Biophys Res Commun. 2012;417:528-33.

Allen DL, Cleary AS, Lindsay SF, Loh AS, Reed JM. Myostatin expression is increased by food deprivation in a muscle-specific manner and contributes to muscle atrophy during prolonged food deprivation in mice. J Appl Physiol. 2010;109:692-701.

Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. J Appl Physiol. 1995;78:1969-76.

Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. Muscle Nerve. 1999;22:1350-60.

Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD. J Biol Chem. 2009;284:21872-80.

Amati F, Dube JJ, Alvarez-Carnero E, Edreira MM, Chomentowski P, Coen PM*, et al.* Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? Diabetes. 2011;60:2588-97.

Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hasty AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T*, et al.* Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterogenic genes. J Lipid Res. 2002;43:1220-35.

Argiles JM, Alvarez B, Carbo N, Busquets S, Van Royen M, Lopez-Soriano FJ. The divergent effects of tumour necrosis factor-alpha on skeletal muscle: implications in wasting. Eur Cytokine Netw. 2000;11:552-9.

Attaix D, Aurousseau E, Combaret L, Kee A, Larbaud D, Ralliere C*, et al.* Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle. Reprod Nutr Dev. 1998;38:153-65.

Attaix D, Baracos VE. MAFbx/Atrogin-1 expression is a poor index of muscle proteolysis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010;13:223-4.

Attaix D, Ventadour S, Codran A, Bechet D, Taillandier D, Combaret L. The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. Essays Biochem. 2005;41:173-86.

B

Bakkar N, Guttridge DC. NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. Physiol Rev. 2010;90:495-511.

Bamman MM, Petrella JK, Kim JS, Mayhew DL, Cross JM. Cluster analysis tests the importance of myogenic gene expression during myofiber hypertrophy in humans. J Appl Physiol. 2007;102:2232-9.

Baracos V, Greenberg RE, Goldberg AL. Influence of calcium and other divalent cations on protein turnover in rat skeletal muscle. Am J Physiol. 1986;250:E702-10.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A*, et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature. 2006;444:337-42.

Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37:2098-114.

Berg HE, Larsson L, Tesch PA. Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest. J Appl Physiol. 1997;82:182-8.

Bergouignan A, Rudwill F, Simon C, Blanc S. Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. J Appl Physiol. 2011;111:1201-10.

Bettermann K, Benesch M, Weis S, Haybaeck J. SUMOylation in carcinogenesis. Cancer Lett. 2012;316:113-25.

Biral D, Jakubiec-Puka A, Ciechomska I, Sandri M, Rossini K, Carraro U*, et al.* Loss of dystrophin and some dystrophin-associated proteins with concomitant signs of apoptosis in rat leg muscle overworked in extension. Acta Neuropathol. 2000;100:618-26.

Bizeau ME, MacLean PS, Johnson GC, Wei Y. Skeletal muscle sterol regulatory element binding protein-1c decreases with food deprivation and increases with feeding in rats. J Nutr. 2003;133:1787-92.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R*, et al.* Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nat Cell Biol. 2001;3:1014-9.

Boonsong T, Norton L, Chokkalingam K, Jewell K, Macdonald I, Bennett A*, et al.* Effect of exercise and insulin on SREBP-1c expression in human skeletal muscle: potential roles for the ERK1/2 and Akt signalling pathways. Biochem Soc Trans. 2007;35:1310-1.

Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. J Biol Chem. 1993;268:14490-6.

Bruusgaard JC, Egner IM, Larsen TK, Dupre-Aucouturier S, Desplanches D, Gundersen K. No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. J Appl Physiol. 2012;113:290-6.

C

Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., Melendez PA, Oh BC, Lidov HG*, et al.* IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. Cell. 2004;119:285-98.

Carson JA, Booth FW. Myogenin mRNA is elevated during rapid, slow, and maintenance phases of stretch-induced hypertrophy in chicken slow-tonic muscle. Pflugers Arch. 1998;435:850-8.

Chatterjee S. Neutral sphingomyelinase: past, present and future. Chem Phys Lipids. 1999;102:79-96.

Chaussade C, Pirola L, Bonnafous S, Blondeau F, Brenz-Verca S, Tronchere H*, et al.* Expression of myotubularin by an adenoviral vector demonstrates its function as a phosphatidylinositol 3-phosphate [PtdIns(3)P] phosphatase in muscle cell lines: involvement of PtdIns(3)P in insulin-stimulated glucose transport. Mol Endocrinol. 2003;17:2448-60.

Chen LL, Zhang HH, Zheng J, Hu X, Kong W, Hu D*, et al.* Resveratrol attenuates high-fat diet-induced insulin resistance by influencing skeletal muscle lipid transport and subsarcolemmal mitochondrial beta-oxidation. Metabolism. 2011;60:1598-609.

Chen R, Xu M, Hogg RT, Li J, Little B, Gerard RD*, et al.* The acetylase/deacetylase couple creb binding protein/sirtuin 1 controls hypoxia inducible factor 2 signaling. J Biol Chem. 2012a.

Chen WL, Kang CH, Wang SG, Lee HM. alpha-Lipoic acid regulates lipid metabolism through induction of sirtuin 1 (SIRT1) and activation of AMP-activated protein kinase. Diabetologia. 2012b;55:1824-35.

Chen YW, Nader GA, Baar KR, Fedele MJ, Hoffman EP, Esser KA. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. J Physiol. 2002;545:27-41.

Chevillotte E, Rieusset J, Roques M, Desage M, Vidal H. The regulation of uncoupling protein-2 gene expression by omega-6 polyunsaturated fatty acids in human skeletal muscle cells involves multiple pathways, including the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta. J Biol Chem. 2001;276:10853-60.

Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. Annu Rev Cell Dev Biol. 2002;18:637-706.

Cohen P, Goedert M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov. 2004;3:479-87.

Coletti D, Moresi V, Adamo S, Molinaro M, Sassoon D. Tumor necrosis factor-alpha gene transfer induces cachexia and inhibits muscle regeneration. Genesis. 2005;43:120-8.

Commerford SR, Peng L, Dube JJ, O'Doherty RM. In vivo regulation of SREBP-1c in skeletal muscle: effects of nutritional status, glucose, insulin, and leptin. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;287:R218-27.

Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Oishi J, Salvini TF. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. Braz J Med Biol Res. 2004;37:1853-61.

Csibi A, Leibovitch MP, Cornille K, Tintignac LA, Leibovitch SA. MAFbx/Atrogin-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. J Biol Chem. 2009;284:4413-21.

D

Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK. CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. Nature. 2009;459:113-7.

Dawson PA, Hofmann SL, van der Westhuyzen DR, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1. J Biol Chem. 1988;263:3372-9.

de Boer MD, Seynnes OR, di Prampero PE, Pisot R, Mekjavic IB, Biolo G*, et al.* Effect of 5 weeks horizontal bed rest on human muscle thickness and architecture of weight bearing and non-weight bearing muscles. Eur J Appl Physiol. 2008;104:401-7.

De Larichaudy J, Zufferli A, Serra F, Isidori AM, Naro F, Dessalle K*, et al.* TNF-alpha- and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. Skelet Muscle. 2012;2:2.

Dean JL, Sully G, Clark AR, Saklatvala J. The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. Cell Signal. 2004;16:1113-21.

Defour A, Dessalle K, Castro Perez A, Poyot T, Castells J, Gallot YS*, et al.* Sirtuin 1 Regulates SREBP-1c Expression in a LXR-Dependent Manner in Skeletal Muscle. PLoS One. 2012;7:e43490.

Deng X, Zhang W, I OS, Williams JB, Dong Q, Park EA*, et al.* FoxO1 inhibits sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene expression via transcription factors Sp1 and SREBP-1c. J Biol Chem. 2012;287:20132-43.

DeVol DL, Rotwein P, Sadow JL, Novakofski J, Bechtel PJ. Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. Am J Physiol. 1990;259:E89-95.

Dif N, Euthine V, Gonnet E, Laville M, Vidal H, Lefai E. Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. Biochem J. 2006;400:179-88.

Dirks AJ, Leeuwenburgh C. Tumor necrosis factor alpha signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction. J Nutr Biochem. 2006;17:501-8.

Dodson S, Baracos VE, Jatoi A, Evans WJ, Cella D, Dalton JT*, et al.* Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. Annu Rev Med. 2011;62:265-79.

Drummond MJ, Fry CS, Glynn EL, Dreyer HC, Dhanani S, Timmerman KL*, et al.* Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis. J Physiol. 2009;587:1535-46.

Duan C, Xu Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. Gen Comp Endocrinol. 2005;142:44-52.

Ducheix S, Lobaccaro JM, Martin PG, Guillou H. Liver X Receptor: an oxysterol sensor and a major player in the control of lipogenesis. Chem Phys Lipids. 2011;164:500-14.

Ducluzeau PH, Perretti N, Laville M, Andreelli F, Vega N, Riou JP*, et al.* Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. Diabetes. 2001;50:1134-42.

Duncan EA, Brown MS, Goldstein JL, Sakai J. Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the lumenal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. J Biol Chem. 1997;272:12778-85.

Duncan EA, Dave UP, Sakai J, Goldstein JL, Brown MS. Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. J Biol Chem. 1998;273:17801-9.

E

Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. Biochimie. 2004;86:839-48.

Eddins MJ, Marblestone JG, Suresh Kumar KG, Leach CA, Sterner DE, Mattern MR*, et al.* Targeting the ubiquitin E3 ligase MuRF1 to inhibit muscle atrophy. Cell Biochem Biophys. 2011;60:113-8.

Edmondson DG, Olson EN. Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. J Biol Chem. 1993;268:755-8.

Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. Biochim Biophys Acta. 2000;1529:103-13.

Elkina Y, von Haehling S, Anker SD, Springer J. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2011;2:143-51.

Endo M, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H. TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). Exp Biol Med (Maywood). 2007;232:614-21.

Engelking LJ, Kuriyama H, Hammer RE, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL*, et al.* Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. J Clin Invest. 2004;113:1168-75.

Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. Nat Med. 2004;10:355-61.

Evans WJ. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. Am J Clin Nutr. 2010;91:1123S-7S.

Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D*, et al.* Cachexia: a new definition. Clin Nutr. 2008;27:793-9.

F

Fatani S, Abubakari AR, Itua I, Wong C, Thomas C, Naderali EK. Effects of diet-induced obesity on protein expression in insulin signaling pathways of skeletal muscle in male Wistar rats. Int J Gen Med. 2012;5:573-82.

Favier FB, Benoit H, Freyssenet D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. Pflugers Arch. 2008;456:587-600.

Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC*, et al.* Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. Cell Metab. 2008;8:347-58.

Feramisco JD, Radhakrishnan A, Ikeda Y, Reitz J, Brown MS, Goldstein JL. Intramembrane aspartic acid in SCAP protein governs cholesterol-induced conformational change. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:3242-7.

Ferrando AA, Lane HW, Stuart CA, Davis-Street J, Wolfe RR. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. Am J Physiol. 1996;270:E627-33.

Ferrando AA, Tipton KD, Bamman MM, Wolfe RR. Resistance exercise maintains skeletal muscle protein synthesis during bed rest. J Appl Physiol. 1997;82:807-10.

Ferre P, Foufelle F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. Horm Res. 2007;68:72-82.

Fitts RH, Desplanches D, Romatowski JG, Widrick JJ. Spaceflight effects on single skeletal muscle fiber function in the rhesus monkey. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000;279:R1546-57.

Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:12737-42.

Frescas D, Valenti L, Accili D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. J Biol Chem. 2005;280:20589-95.

Frojdo S, Durand C, Molin L, Carey AL, El-Osta A, Kingwell BA*, et al.* Phosphoinositide 3-kinase as a novel functional target for the regulation of the insulin signaling pathway by SIRT1. Mol Cell Endocrinol. 2011;335:166-76.

Frost RA, Nystrom GJ, Jefferson LS, Lang CH. Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;292:E501-12.

Fujii I, Matsukura M, Ikezawa M, Suzuki S, Shimada T, Miike T. Adenoviral mediated MyoD gene transfer into fibroblasts: myogenic disease diagnosis. Brain Dev. 2006;28:420-5.

Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA*, et al.* Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. Dev Cell. 2008;14:661-73.

Fulco M, Sartorelli V. Comparing and contrasting the roles of AMPK and SIRT1 in metabolic tissues. Cell Cycle. 2008;7:3669-79.

Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y*, et al.* Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. Mol Cell. 2003;12:51-62.

G

Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schroder HD, Handberg A. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? Diabetes. 2001;50:1324-9.

Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R*, et al.* Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. EMBO J. 2007;26:1913-23.

Gibala M. Molecular responses to high-intensity interval exercise. Appl Physiol Nutr Metab. 2009;34:428-32.

Glass DJ. Signaling pathways perturbing muscle mass. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2010;13:225-9.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. Physiol Rev. 2003;83:731-801.

Gosmain Y, Dif N, Berbe V, Loizon E, Rieusset J, Vidal H*, et al.* Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. J Lipid Res. 2005;46:697-705.

Gosmain Y, Lefai E, Ryser S, Roques M, Vidal H. Sterol regulatory element-binding protein-1 mediates the effect of insulin on hexokinase II gene expression in human muscle cells. Diabetes. 2004;53:321-9.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol. 1977;36:59-74.

Gregorevic P, Plant DR, Leeding KS, Bach LA, Lynch GS. Improved contractile function of the mdx dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. Am J Pathol. 2002;161:2263-72.

Grubisha O, Smith BC, Denu JM. Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases. FEBS J. 2005;272:4607-16.

Guillemain G, Da Silva Xavier G, Rafiq I, Leturque A, Rutter GA. Importin beta1 mediates the glucose-stimulated nuclear import of pancreatic and duodenal homeobox-1 in pancreatic islet beta-cells (MIN6). Biochem J. 2004;378:219-27.

Guillet-Deniau I, Mieulet V, Le Lay S, Achouri Y, Carre D, Girard J*, et al.* Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. Diabetes. 2002;51:1722-8.

Gulve EA, Dice JF. Regulation of protein synthesis and degradation in L8 myotubes. Effects of serum, insulin and insulin-like growth factors. Biochem J. 1989;260:377-87.

Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. Biol Rev Camb Philos Soc. 2011;86:564-600.

Gundersen K, Bruusgaard JC. Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost? J Physiol. 2008;586:2675-81.

Guo X, Williams JG, Schug TT, Li X. DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. J Biol Chem. 2010;285:13223-32.

Gurd BJ. Deacetylation of PGC-1alpha by SIRT1: importance for skeletal muscle function and exercise-induced mitochondrial biogenesis. Appl Physiol Nutr Metab. 2011;36:589-97.

Gurd BJ, Yoshida Y, McFarlan JT, Holloway GP, Moyes CD, Heigenhauser GJ*, et al.* Nuclear SIRT1 activity, but not protein content, regulates mitochondrial biogenesis in rat and human skeletal muscle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011;301:R67-75.

Guzun R, Saks V. Application of the principles of systems biology and Wiener's cybernetics for analysis of regulation of energy fluxes in muscle cells in vivo. Int J Mol Sci. 2010;11:982-1019.

H

Haddad F, Adams GR. Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. J Appl Physiol. 2006;100:1188-203.

Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. Annu Rev Pathol. 2010;5:253-95.

Halvatsiotis P, Short KR, Bigelow M, Nair KS. Synthesis rate of muscle proteins, muscle functions, and amino acid kinetics in type 2 diabetes. Diabetes. 2002;51:2395-404.

Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK*, et al.* Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. J Biol Chem. 2007;282:30014-21.

Hansen J, Brandt C, Nielsen AR, Hojman P, Whitham M, Febbraio MA*, et al.* Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. Endocrinology. 2011;152:164-71.

Harridge SD. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. Exp Physiol. 2007;92:783-97.

Hasselgren PO, Fischer JE. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. Ann Surg. 2001;233:9-17.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. Genes Dev. 2004;18:2195-224.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. Cell. 2008;132:344-62.

Hespel P, Op't Eijnde B, Van Leemputte M, Urso B, Greenhaff PL, Labarque V*, et al.* Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. J Physiol. 2001;536:625-33.

Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM*, et al.* The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. J Biol Chem. 2002;277:40735-41.

Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, Wolfman NM. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. Mol Endocrinol. 2003;17:1144-54.

Holloszy JO. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. J Physiol Pharmacol. 2008;59 Suppl 7:5-18.

Hong D, Forsberg NE. Effects of serum and insulin-like growth factor I on protein degradation and protease gene expression in rat L8 myotubes. J Anim Sci. 1994;72:2279-88.

Hoppeler H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. Int J Sports Med. 1986;7:187-204.

Hoppeler H, Howald H, Conley K, Lindstedt SL, Claassen H, Vock P*, et al.* Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. J Appl Physiol. 1985;59:320-7.

Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K*, et al.* Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. J Pharmacol Exp Ther. 2011;338:784-94.

Hortobagyi T, Dempsey L, Fraser D, Zheng D, Hamilton G, Lambert J*, et al.* Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. J Physiol. 2000;524 Pt 1:293-304.

Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. Biochem Soc Trans. 2002;30:1091-5.

Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:5987-92.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest. 2002a;109:1125-31.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2002b;67:491-8.

Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS*, et al.* Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003a;100:12027-32.

Horton JD, Shimomura I, Ikemoto S, Bashmakov Y, Hammer RE. Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. J Biol Chem. 2003b;278:36652-60.

Hotamisligil GS. The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. J Intern Med. 1999;245:621-5.

Houtkooper RH, Canto C, Wanders RJ, Auwerx J. The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. Endocr Rev. 2010;31:194-223.

Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13:225-38.

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG*, et al.* Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature. 2003;425:191-6.

Hu Y, Liu J, Wang J, Liu Q. The controversial links among calorie restriction, SIRT1, and resveratrol. Free Radic Biol Med. 2011;51:250-6.

Hua X, Sakai J, Ho YK, Goldstein JL, Brown MS. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. J Biol Chem. 1995a;270:29422-7.

Hua X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. Genomics. 1995b;25:667-73.

Huang J, Forsberg NE. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:12100-5.

Hunter RB, Kandarian SC. Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. J Clin Invest. 2004;114:1504-11.

Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A, Mitchell-Felton H, Essig DA, Kandarian SC. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. Faseb J. 2002;16:529-38.

I

Ikeda S, Miyazaki H, Nakatani T, Kai Y, Kamei Y, Miura S*, et al.* Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. Biochem Biophys Res Commun. 2002;296:395-400.

Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature. 2000;403:795-800.

Inadera H, Nagai S, Dong HY, Matsushima K. Molecular analysis of lipid-depleting factor in a colon-26-inoculated cancer cachexia model. Int J Cancer. 2002;101:37-45.

Ishido M, Kami K, Masuhara M. Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles. Acta Physiol Scand. 2004;180:281.

J

Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. Am J Physiol Cell Physiol. 2004;287:C834-43.

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11:113-27.

Jensen JH, Conley LN, Hedegaard J, Nielsen M, Young JF, Oksbjerg N*, et al.* Gene expression profiling of porcine skeletal muscle in the early recovery phase following acute physical activity. Exp Physiol. 2012.

Ji SQ, Neustrom S, Willis GM, Spurlock ME. Proinflammatory cytokines regulate myogenic cell proliferation and fusion but have no impact on myotube protein metabolism or stress protein expression. J Interferon Cytokine Res. 1998;18:879-88.

Jin B, Li YP. Curcumin prevents lipopolysaccharide-induced atrogin-1/MAFbx upregulation and muscle mass loss. J Cell Biochem. 2007;100:960-9.

Judge AR, Koncarevic A, Hunter RB, Liou HC, Jackman RW, Kandarian SC. Role for IkappaBalpha, but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292:C372-82.

K

Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms. Genes Dev. 1999;13:2570-80.

Kallin A, Johannessen LE, Cani PD, Marbehant CY, Essaghir A, Foufelle F*, et al.* SREBP-1 regulates the expression of heme oxygenase 1 and the phosphatidylinositol-3 kinase regulatory subunit p55 gamma. J Lipid Res. 2007;48:1628-36.

Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome Res. 1997;7:910-6.

Kamei Y, Miura S, Suganami T, Akaike F, Kanai S, Sugita S*, et al.* Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of retinoid X receptor/liver X receptor and forkhead-O1 transcription factor. Endocrinology. 2008;149:2293-305.

Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. Nat Rev Cancer. 2012;12:9-22.

Keren A, Tamir Y, Bengal E. The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. Mol Cell Endocrinol. 2006;252:224-30.

Kiens B. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. Physiol Rev. 2006;86:205-43.

Kiens B, Essen-Gustavsson B, Christensen NJ, Saltin B. Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. J Physiol. 1993;469:459-78.

Kim J, Won KJ, Lee HM, Hwang BY, Bae YM, Choi WS*, et al.* p38 MAPK Participates in Muscle-Specific RING Finger 1-Mediated Atrophy in Cast-Immobilized Rat Gastrocnemius Muscle. Korean J Physiol Pharmacol. 2009;13:491-6.

Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G*, et al.* Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. J Clin Invest. 1998;101:1-9.

Kim JB, Spotts GD, Halvorsen YD, Shih HM, Ellenberger T, Towle HC*, et al.* Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. Mol Cell Biol. 1995;15:2582-8.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab. 2006;3:177-85.

Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS. Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. J Appl Physiol. 2002;93:1168-80.

Kimball SR, Jefferson LS. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2001;4:39-43.

Komamura K, Shirotani-Ikejima H, Tatsumi R, Tsujita-Kuroda Y, Kitakaze M, Miyatake K*, et al.* Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. Cardiovasc Drugs Ther. 2003;17:303-10.

Kooijman R. Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. Cytokine Growth Factor Rev. 2006;17:305-23.

Kubica N, Bolster DR, Farrell PA, Kimball SR, Jefferson LS. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2Bepsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. J Biol Chem. 2005;280:7570-80.

Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. J Mol Med (Berl). 2004;82:434-48.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. Physiol Rev. 2012;92:689-737.

L

Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. J Biol Chem. 2008;283:27628-35.

Lang CH, Huber D, Frost RA. Burn-induced increase in atrogin-1 and MuRF-1 in skeletal muscle is glucocorticoid independent but downregulated by IGF-I. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007;292:R328-36.

Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. J Biol Chem. 2002;277:49831-40.

Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD*, et al.* MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. Cell. 1989;58:823-31.

Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F. The IGF-I signaling pathway. Curr Pharm Des. 2007;13:663-9.

Leavens KF, Easton RM, Shulman GI, Previs SF, Birnbaum MJ. Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance. Cell Metab. 2009;10:405-18.

Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J*, et al.* Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. Faseb J. 2004;18:39-51.

Lecomte V, Meugnier E, Euthine V, Durand C, Freyssenet D, Nemoz G*, et al.* A new role for sterol regulatory element binding protein 1 transcription factors in the regulation of muscle mass and muscle cell differentiation. Mol Cell Biol. 2010;30:1182-98.

Lee J, Padhye A, Sharma A, Song G, Miao J, Mo YY*, et al.* A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. J Biol Chem. 2010;285:12604-11.

Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:61-86.

Lee SJ, Sekimoto T, Yamashita E, Nagoshi E, Nakagawa A, Imamoto N*, et al.* The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. Science. 2003;302:1571-5.

Leger B, Senese R, Al-Khodairy AW, Deriaz O, Gobelet C, Giacobino JP*, et al.* Atrogin-1, MuRF1, and FoXO, as well as phosphorylated GSK-3beta and 4E-BP1 are reduced in skeletal muscle of chronic spinal cord-injured patients. Muscle Nerve. 2009;40:69-78.

Legerlotz K, Smith HK. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. Muscle Nerve. 2008;38:1087-100.

Li H, Capetanaki Y. Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. Nucleic Acids Res. 1993;21:335-43.

Li H, Malhotra S, Kumar A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. J Mol Med (Berl). 2008;86:1113-26.

Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. Nat Rev Immunol. 2002;2:725-34.

Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:3441-6.

Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, Guarente L. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. Mol Cell. 2007;28:91-106.

Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL*, et al.* TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. Faseb J. 2005;19:362-70.

Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. Mol Cell. 2010;38:864-78.

Lin H, Yutzey KE, Konieczny SF. Muscle-specific expression of the troponin I gene requires interactions between helix-loop-helix muscle regulatory factors and ubiquitous transcription factors. Mol Cell Biol. 1991;11:267-80.

Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O*, et al.* Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature. 2002;418:797-801.

Lipina C, Kendall H, McPherron AC, Taylor PM, Hundal HS. Mechanisms involved in the enhancement of mammalian target of rapamycin signalling and hypertrophy in skeletal muscle of myostatin-deficient mice. FEBS Lett. 2010;584:2403-8.

Liu L, Zhang Y, Chen N, Shi X, Tsang B, Yu YH. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. J Clin Invest. 2007;117:1679-89.

Ljubicic V, Joseph AM, Adhihetty PJ, Huang JH, Saleem A, Uguccioni G*, et al.* Molecular basis for an attenuated mitochondrial adaptive plasticity in aged skeletal muscle. Aging (Albany NY). 2009;1:818-30.

Ljubisavljevic M, Qureshi A, Nagelkerke N. The effects of neuropeptide Y on skeletal muscle contractile properties in streptozotocin diabetic rats. Mol Cell Biochem. 2010;333:27-32.

Lluis F, Perdiguero E, Nebreda AR, Munoz-Canoves P. Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. Trends Cell Biol. 2006;16:36-44.

Lomb DJ, Laurent G, Haigis MC. Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism. Biochim Biophys Acta. 2010;1804:1652-7.

Loughna PT, Brownson C. Two myogenic regulatory factor transcripts exhibit muscle-specific responses to disuse and passive stretch in adult rats. FEBS Lett. 1996;390:304-6.

Lowe DA, Alway SE. Stretch-induced myogenin, MyoD, and MRF4 expression and acute hypertrophy in quail slow-tonic muscle are not dependent upon satellite cell proliferation. Cell Tissue Res. 1999;296:531-9.

Lowe DA, Lund T, Alway SE. Hypertrophy-stimulated myogenic regulatory factor mRNA increases are attenuated in fast muscle of aged quails. Am J Physiol. 1998;275:C155-62.

M

Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N*, et al.* Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003;285:E363-71.

Mahoney DJ, Carey K, Fu MH, Snow R, Cameron-Smith D, Parise G*, et al.* Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. Physiol Genomics. 2004;18:226-31.

Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. Faseb J. 2005;19:1498-500.

Mahoney DJ, Safdar A, Parise G, Melov S, Fu M, MacNeil L*, et al.* Gene expression profiling in human skeletal muscle during recovery from eccentric exercise. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;294:R1901-10.

Martinet N, Bertrand P. Interpreting clinical assays for histone deacetylase inhibitors. Cancer Manag Res. 2011;3:117-41.

Marzetti E, Groban L, Wohlgemuth SE, Lees HA, Lin M, Jobe H*, et al.* Effects of short-term GH supplementation and treadmill exercise training on physical performance and skeletal muscle apoptosis in old rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;294:R558-67.

Matsakas A, Friedel A, Hertrampf T, Diel P. Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. Acta Physiol Scand. 2005;183:299-307.

Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:11278-83.

McClung JM, Judge AR, Powers SK, Yan Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. Am J Physiol Cell Physiol. 2010;298:C542-9.

McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N*, et al.* Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. J Cell Physiol. 2006;209:501-14.

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature. 1997;387:83-90.

McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:12457-61.

McPherson R, Gauthier A. Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. Biochem Cell Biol. 2004;82:201-11.

Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. Am J Physiol. 1997;273:E1107-12.

Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ*, et al.* Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:3820-5.

Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. Br J Cancer. 2004;90:2312-6.

Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. N Engl J Med. 1996;335:1897-905.

Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. Cell. 2011;147:728-41.

Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL. Actual causes of death in the United States, 2000. Jama. 2004;291:1238-45.

Molkentin JD, Olson EN. Defining the regulatory networks for muscle development. Curr Opin Genet Dev. 1996;6:445-53.

Morgan TE, Short FA, Cobb LA. Effect of long-term exercise on skeletal muscle lipid composition. Am J Physiol. 1969;216:82-6.

Morissette MR, Cook SA, Buranasombati C, Rosenberg MA, Rosenzweig A. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. Am J Physiol Cell Physiol. 2009;297:C1124-32.

Moro C, Galgani JE, Luu L, Pasarica M, Mairal A, Bajpeyi S*, et al.* Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94:3440-7.

Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W*, et al.* Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. Cell. 2004;116:551-63.

Mounier R, Lantier L, Leclerc J, Sotiropoulos A, Foretz M, Viollet B. Antagonistic control of muscle cell size by AMPK and mTORC1. Cell Cycle. 2011;10:2640-6.

Mounier R, Lantier L, Leclerc J, Sotiropoulos A, Pende M, Daegelen D*, et al.* Important role for AMPKalpha1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. Faseb J. 2009;23:2264-73.

Mourkioti F, Kratsios P, Luedde T, Song YH, Delafontaine P, Adami R*, et al.* Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. J Clin Invest. 2006;116:2945-54.

Munafo DB, Colombo MI. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. J Cell Sci. 2001;114:3619-29.

Muoio DM. Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused? Biochim Biophys Acta. 2010;1801:281-8.

Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME*, et al.* Structure and function of helix-loop-helix proteins. Biochim Biophys Acta. 1994;1218:129-35.

Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. Cell. 1989;56:777-83.

Murton AJ, Constantin D, Greenhaff PL. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. Biochim Biophys Acta. 2008;1782:730-43.

Muscat GE, Wagner BL, Hou J, Tangirala RK, Bischoff ED, Rohde P*, et al.* Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors. J Biol Chem. 2002;277:40722-8.

N

Nadeau KJ, Ehlers LB, Aguirre LE, Moore RL, Jew KN, Ortmeyer HK*, et al.* Exercise training and calorie restriction increase SREBP-1 expression and intramuscular triglyceride in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;291:E90-8.

Nadeau KJ, Leitner JW, Gurerich I, Draznin B. Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes. J Biol Chem. 2004;279:34380-7.

Nakae J, Oki M, Cao Y. The FoxO transcription factors and metabolic regulation. FEBS Lett. 2008;582:54-67.

Nakata R, Takahashi S, Inoue H. Recent advances in the study on resveratrol. Biol Pharm Bull. 2012;35:273-9.

Nakatani T, Katsumata A, Miura S, Kamei Y, Ezaki O. Effects of fish oil feeding and fasting on LXRalpha/RXRalpha binding to LXRE in the SREBP-1c promoter in mouse liver. Biochim Biophys Acta. 2005;1736:77-86.

Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, Wall D, Pearson KJ, de Cabo R*, et al.* JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. PLoS One. 2009;4:e8414.

Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. Science. 2004;306:2105-8.

Nervi C, Benedetti L, Minasi A, Molinaro M, Adamo S. Arginine-vasopressin induces differentiation of skeletal myogenic cells and up-regulation of myogenin and Myf-5. Cell Growth Differ. 1995;6:81-9.

Nindl BC, Pierce JR. Insulin-like growth factor I as a biomarker of health, fitness, and training status. Med Sci Sports Exerc. 2010;42:39-49.

Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL. Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:12848-53.

Nohturfft A, DeBose-Boyd RA, Scheek S, Goldstein JL, Brown MS. Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:11235-40.

O

Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R*, et al.* Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2006;29:895-900.

Ohlsson C, Mohan S, Sjogren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O*, et al.* The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. Endocr Rev. 2009;30:494-535.

Oldham S, Hafen E. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. Trends Cell Biol. 2003;13:79-85.

Osborne TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. J Biol Chem. 2000;275:32379-82.

P

Pardo PS, Boriek AM. The physiological roles of Sirt1 in skeletal muscle. Aging (Albany NY). 2011;3:430-7.

Pari GS, St Jeor SC. Human cytomegalovirus major immediate early gene product can induce SV40 DNA replication in human embryonic lung cells. Virology. 1990;179:785-94.

Pedersen M, Bruunsgaard H, Weis N, Hendel HW, Andreassen BU, Eldrup E*, et al.* Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes. Mech Ageing Dev. 2003;124:495-502.

Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. Curr Opin Genet Dev. 1998;8:571-5.

Peng Y, Schwarz EJ, Lazar MA, Genin A, Spinner NB, Taub R. Cloning, human chromosomal assignment, and adipose and hepatic expression of the CL-6/INSIG1 gene. Genomics. 1997;43:278-84.

Perreault L, Bergman BC, Hunerdosse DM, Playdon MC, Eckel RH. Inflexibility in intramuscular triglyceride fractional synthesis distinguishes prediabetes from obesity in humans. Obesity (Silver Spring). 2010;18:1524-31.

Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Microsc Res Tech. 2000;50:500-9.

Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R*, et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. Nature. 2004;429:771-6.

Piette J, Bessereau JL, Huchet M, Changeux JP. Two adjacent MyoD1-binding sites regulate expression of the acetylcholine receptor alpha-subunit gene. Nature. 1990;345:353-5.

Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M*, et al.* SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. J Biol Chem. 2010;285:33959-70.

Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leevers S*, et al.* SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. Cell Metab. 2008;8:224-36.

Potthoff MJ, Arnold MA, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity and postnatal muscle function by Mef2c. Mol Cell Biol. 2007;27:8143-51.

Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ*, et al.* SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. Cell Metab. 2012;15:675-90.

Pruchnic R, Katsiaras A, He J, Kelley DE, Winters C, Goodpaster BH. Exercise training increases intramyocellular lipid and oxidative capacity in older adults. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004;287:E857-62.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F*, et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. Nature. 2003;423:550-5.

Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. Cell Metab. 2009;9:327-38.

Q

Quadrilatero J, Alway SE, Dupont-Versteegden EE. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. Appl Physiol Nutr Metab. 2011;36:608-17.

R

Raghow R, Yellaturu C, Deng X, Park EA, Elam MB. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. Trends Endocrinol Metab. 2008;19:65-73.

Rajendran R, Garva R, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:368276.

Rasbach KA, Gupta RK, Ruas JL, Wu J, Naseri E, Estall JL*, et al.* PGC-1alpha regulates a HIF2alpha-dependent switch in skeletal muscle fiber types. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:21866-71.

Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005;288:R1423-31.

Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. Development. 2012;139:2845-56.

Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I*, et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev. 2000;14:2819-30.

Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. FEBS Lett. 2008;582:46-53.

Rome S, Lecomte V, Meugnier E, Rieusset J, Debard C, Euthine V*, et al.* Microarray analyses of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle. Physiol Genomics. 2008;34:327-37.

Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN*, et al.* Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nat Cell Biol. 2001;3:1009-13.

Ronkina N, Menon MB, Schwermann J, Tiedje C, Hitti E, Kotlyarov A*, et al.* MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. Biochem Pharmacol. 2010;80:1915-20.

Roques M, Vidal H. A phosphatidylinositol 3-Kinase/p70 ribosomal S6 protein kinase pathway is required for the regulation by insulin of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase gene expression in human muscle cells. J Biol Chem. 1999;274:34005-10.

Roy RR, Monke SR, Allen DL, Edgerton VR. Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. J Appl Physiol. 1999;87:634-42.

Russell AP, Hesselink MK, Lo SK, Schrauwen P. Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. Faseb J. 2005;19:986-8.

Ryder JW, Fahlman R, Wallberg-Henriksson H, Alessi DR, Krook A, Zierath JR. Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal

muscle. Involvement Of the mitogen- and stress-activated protein kinase 1. J Biol Chem. 2000;275:1457-62.

S

Sajan MP, Standaert ML, Nimal S, Varanasi U, Pastoor T, Mastorides S*, et al.* The critical role of atypical protein kinase C in activating hepatic SREBP-1c and NFkappaB in obesity. J Lipid Res. 2009a;50:1133-45.

Sajan MP, Standaert ML, Rivas J, Miura A, Kanoh Y, Soto J*, et al.* Role of atypical protein kinase C in activation of sterol regulatory element binding protein-1c and nuclear factor kappa B (NFkappaB) in liver of rodents used as a model of diabetes, and relationships to hyperlipidaemia and insulin resistance. Diabetologia. 2009b;52:1197-207.

Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. Cell. 1996;85:1037-46.

Sakamoto K, Hirshman MF, Aschenbach WG, Goodyear LJ. Contraction regulation of Akt in rat skeletal muscle. J Biol Chem. 2002;277:11910-7.

Salminen A, Kaarniranta K. NF-kappaB signaling in the aging process. J Clin Immunol. 2009;29:397-405.

Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. Cell. 2012;148:852-71.

Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. Physiology (Bethesda). 2008;23:160-70.

Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolov M, Rizzi C, Arslan P, Monti D*, et al.* Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. FEBS Lett. 1995;373:291-5.

Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH*, et al.* PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:16260-5.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A*, et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. Cell. 2004;117:399-412.

Sartorelli V, Puri PL, Hamamori Y, Ogryzko V, Chung G, Nakatani Y*, et al.* Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. Mol Cell. 1999;4:725-34.

Sasaki T, Maier B, Koclega KD, Chruszcz M, Gluba W, Stukenberg PT*, et al.* Phosphorylation regulates SIRT1 function. PLoS One. 2008;3:e4020.

Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. Arch Biochem Biophys. 2010;501:177-81.

Sato R, Yang J, Wang X, Evans MJ, Ho YK, Goldstein JL*, et al.* Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1). J Biol Chem. 1994;269:17267-73.

Schenk S, Horowitz JF. Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. J Clin Invest. 2007;117:1690-8.

Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS. Systemic administration of IGF-I enhances oxidative status and reduces contraction-induced injury in skeletal muscles of mdx dystrophic mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;291:E499-505.

Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. Physiol Rev. 2011;91:1447-531.

Schiaffino S, Sandri M, Murgia M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. Physiology (Bethesda). 2007;22:269-78.

Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L*, et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. Genes Dev. 2000;14:2831-8.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell. 2012;148:399-408.

Senf SM, Sandesara PB, Reed SA, Judge AR. p300 Acetyltransferase activity differentially regulates the localization and activity of the FOXO homologues in skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 2011;300:C1490-501.

Sewter C, Berger D, Considine RV, Medina G, Rochford J, Ciaraldi T*, et al.* Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha. Diabetes. 2002;51:1035-41.

Shainberg A, Yagil G, Yaffe D. Alterations of enzymatic activities during muscle differentiation in vitro. Dev Biol. 1971;25:1-29.

Shao H, Chou J, Baty CJ, Burke NA, Watkins SC, Stolz DB*, et al.* Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. Mol Cell Biol. 2006;26:5481-96.

Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. Nature. 2006;441:424-30.

Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. Prog Lipid Res. 2001;40:439-52.

Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. J Clin Invest. 1996;98:1575-84.

Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. J Clin Invest. 1997a;99:846-54.

Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS*, et al.* Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. J Clin Invest. 1997b;100:2115-24.

Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. J Biol Chem. 1999a;274:30028-32.

Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999b;96:13656-61.

Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. J Clin Invest. 1997;99:838-45.

Simionato E, Ledent V, Richards G, Thomas-Chollier M, Kerner P, Coornaert D*, et al.* Origin and diversification of the basic helix-loop-helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics. BMC Evol Biol. 2007;7:33.

Singleton JR, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I in muscle metabolism and myotherapies. Neurobiol Dis. 2001;8:541-54.

Smith IJ, Huffman KM, Durheim MT, Duscha BD, Kraus WE. Sex-specific alterations in mRNA level of key lipid metabolism enzymes in skeletal muscle of overweight and obese subjects following endurance exercise. Physiol Genomics. 2009;36:149-57.

Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. J Biol Chem. 1990;265:2306-10.

Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. Antioxid Redox Signal. 2006;8:517-28.

Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. Biochem J. 1997;328 (Pt 3):721-32.

Spangenburg EE. Changes in muscle mass with mechanical load: possible cellular mechanisms. Appl Physiol Nutr Metab. 2009;34:328-35.

Stewart CE, Rittweger J. Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006;6:73-86.

Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. Physiol Rev. 1996;76:1005-26.

Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO*, et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. Mol Cell. 2004;14:395-403.

Sudo M, Kano Y. Myofiber apoptosis occurs in the inflammation and regeneration phase following eccentric contractions in rats. J Physiol Sci. 2009;59:405-12.

Suelves M, Lluis F, Ruiz V, Nebreda AR, Munoz-Canoves P. Phosphorylation of MRF4 transactivation domain by p38 mediates repression of specific myogenic genes. EMBO J. 2004;23:365-75.

Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. Prog Lipid Res. 2006;45:42-72.

Sun Y, Chen J. mTOR signaling: PLD takes center stage. Cell Cycle. 2008;7:3118-23.

Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X, Lukiyanchuk V, Jin J, Harper JW*, et al.* Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). Cell Metab. 2005;1:379-91.

Suwa M, Nakano H, Radak Z, Kumagai S. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. Metabolism. 2008;57:986-98.

Suwa M, Nakano H, Radak Z, Kumagai S. Short-term adenosine monophosphate-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside treatment increases the sirtuin 1 protein expression in skeletal muscle. Metabolism. 2011;60:394-403.

Symons TB, Sheffield-Moore M, Chinkes DL, Ferrando AA, Paddon-Jones D. Artificial gravity maintains skeletal muscle protein synthesis during 21 days of simulated microgravity. J Appl Physiol. 2009;107:34-8.

T

Taillandier D, Aurousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P*, et al.* Coordinate activation of lysosomal, Ca 2+-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. Biochem J. 1996;316 (Pt 1):65-72.

Tesch PA, von Walden F, Gustafsson T, Linnehan RM, Trappe TA. Skeletal muscle proteolysis in response to short-term unloading in humans. J Appl Physiol. 2008;105:902-6.

Tews DS, Goebel HH, Schneider I, Gunkel A, Stennert E, Neiss WF. DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle. Neuropathol Appl Neurobiol. 1997;23:141-9.

Thomason DB, Booth FW. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. J Appl Physiol. 1990;68:1-12.

Thoresen GH, Hessvik NP, Bakke SS, Aas V, Rustan AC. Metabolic switching of human skeletal muscle cells in vitro. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2011;85:227-34.

Tiao G, Fagan JM, Samuels N, James JH, Hudson K, Lieberman M*, et al.* Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. J Clin Invest. 1994;94:2255-64.

Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. J Biol Chem. 2005;280:2847-56.

Tisdale MJ. Catabolic mediators of cancer cachexia. Curr Opin Support Palliat Care. 2008;2:256-61.

Tollefsen SE, Sadow JL, Rotwein P. Coordinate expression of insulin-like growth factor II and its receptor during muscle differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86:1543-7.

Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. Mol Cell Biol. 1993;13:4753-9.

Tovar AR, Torres N. The role of dietary protein on lipotoxicity. Biochim Biophys Acta. 2010;1801:367-71.

Tsintzas K, Jewell K, Kamran M, Laithwaite D, Boonsong T, Littlewood J*, et al.* Differential regulation of metabolic genes in skeletal muscle during starvation and refeeding in humans. J Physiol. 2006;575:291-303.

Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M*, et al.* Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;283:E66-72.

V

Van der Meer SF, Jaspers RT, Degens H. Is the myonuclear domain size fixed? J Musculoskelet Neuronal Interact. 2011;11:286-97.

van der Vos KE, Coffer PJ. The extending network of FOXO transcriptional target genes. Antioxid Redox Signal. 2011;14:579-92.

Vary TC, Lynch CJ. Meal feeding enhances formation of eIF4F in skeletal muscle: role of increased eIF4E availability and eIF4G phosphorylation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;290:E631-42.

Venable ME, Obeid LM. Phospholipase D in cellular senescence. Biochim Biophys Acta. 1999;1439:291-8.

Viguie CA, Lu DX, Huang SK, Rengen H, Carlson BM. Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. Anat Rec. 1997;248:346-54.

Vinciguerra M, Fulco M, Ladurner A, Sartorelli V, Rosenthal N. SirT1 in muscle physiology and disease: lessons from mouse models. Dis Model Mech. 2010;3:298-303.

W

Walker AK, Yang F, Jiang K, Ji JY, Watts JL, Purushotham A*, et al.* Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. Genes Dev. 2010;24:1403-17.

Walker KS, Kambadur R, Sharma M, Smith HK. Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men. Med Sci Sports Exerc. 2004;36:787-93.

Walsh FS, Ritter MA. Surface antigen differentiation during human myogenesis in culture. Nature. 1981;289:60-4.

Walters EH, Stickland NC, Loughna PT. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. J Muscle Res Cell Motil. 2000;21:647-53.

Wang F, Chan CH, Chen K, Guan X, Lin HK, Tong Q. Deacetylation of FOXO3 by SIRT1 or SIRT2 leads to Skp2-mediated FOXO3 ubiquitination and degradation. Oncogene. 2012;31:1546-57.

Wang GL, Fu YC, Xu WC, Feng YQ, Fang SR, Zhou XH. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2009;380:644-9.

Wang RH, Li C, Deng CX. Liver steatosis and increased ChREBP expression in mice carrying a liver specific SIRT1 null mutation under a normal feeding condition. Int J Biol Sci. 2010;6:682-90.

Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. EMBO J. 2001;20:4370-9.

Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. Physiology (Bethesda). 2006;21:362-9.

Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. Cell. 1994;77:53-62.

Watt MJ, Hoy AJ. Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012;302:E1315-28.

Weigl LG. Lost in translation: regulation of skeletal muscle protein synthesis. Curr Opin Pharmacol. 2012;12:377-82.

Wells GD, Selvadurai H, Tein I. Bioenergetic provision of energy for muscular activity. Paediatr Respir Rev. 2009;10:83-90.

Welsh GI, Miller CM, Loughlin AJ, Price NT, Proud CG. Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. FEBS Lett. 1998;421:125-30.

Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, Kelly DP. PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. Mol Cell Biol. 2005;25:10684-94.

Wentworth BM, Donoghue M, Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N. Paired MyoD-binding sites regulate myosin light chain gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:1242-6.

Weston AD, Sampaio AV, Ridgeway AG, Underhill TM. Inhibition of p38 MAPK signaling promotes late stages of myogenesis. J Cell Sci. 2003;116:2885-93.

Widegren U, Jiang XJ, Krook A, Chibalin AV, Bjornholm M, Tally M*, et al.* Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. Faseb J. 1998;12:1379-89.

Widegren U, Ryder JW, Zierath JR. Mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle: effects of exercise and muscle contraction. Acta Physiol Scand. 2001;172:227-38.

Winchester PK, Gonyea WJ. A quantitative study of satellite cells and myonuclei in stretched avian slow tonic muscle. Anat Rec. 1992;232:369-77.

Witt SH, Granzier H, Witt CC, Labeit S. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. J Mol Biol. 2005;350:713-22.

Worgall TS, Juliano RA, Seo T, Deckelbaum RJ. Ceramide synthesis correlates with the posttranscriptional regulation of the sterol-regulatory element-binding protein. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:943-8.

Wretman C, Lionikas A, Widegren U, Lannergren J, Westerblad H, Henriksson J. Effects of concentric and eccentric contractions on phosphorylation of MAPK(erk1/2) and MAPK(p38) in isolated rat skeletal muscle. J Physiol. 2001;535:155-64.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V*, et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell. 1999;98:115-24.

Y

Yabe D, Brown MS, Goldstein JL. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:12753-8.

Yabe D, Komuro R, Liang G, Goldstein JL, Brown MS. Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:3155-60.

Yaffe D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1968;61:477-83.

Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. Nature. 1977;270:725-7.

Yamada K, Miyamoto K. Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. Front Biosci. 2005;10:3151-71.

Yamakuchi M. MicroRNA Regulation of SIRT1. Front Physiol. 2012;3:68.

Yamamoto H, Williams EG, Mouchiroud L, Canto C, Fan W, Downes M*, et al.* NCoR1 is a conserved physiological modulator of muscle mass and oxidative function. Cell. 2011;147:827-39.

Yang JY, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X*, et al.* ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. Nat Cell Biol. 2008;10:138-48.

Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R*, et al.* Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. Cell. 2002;110:489-500.

Yang T, Goldstein JL, Brown MS. Overexpression of membrane domain of SCAP prevents sterols from inhibiting SCAP.SREBP exit from endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 2000;275:29881-6.

Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N, Zhu D. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. Cancer Res. 2006;66:1320-6.

Yang Y, Creer A, Jemiolo B, Trappe S. Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle. J Appl Physiol. 2005;98:1745-52.

Yang Y, Fu W, Chen J, Olashaw N, Zhang X, Nicosia SV*, et al.* SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. Nat Cell Biol. 2007;9:1253-62.

Yarasheski KE, Bhasin S, Sinha-Hikim I, Pak-Loduca J, Gonzalez-Cadavid NF. Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. J Nutr Health Aging. 2002;6:343-8.

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA*, et al.* Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. EMBO J. 2004;23:2369-80.

Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuzaka T*, et al.* Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. Mol Cell Biol. 2001;21:2991-3000.

Yoshimura K, Harii K. A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. J Surg Res. 1999;81:139-46.

Yoshizawa F, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. Am J Physiol. 1998;275:E814-20.

Yu M, Blomstrand E, Chibalin AV, Krook A, Zierath JR. Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. J Physiol. 2001;536:273-82.

Yu M, Stepto NK, Chibalin AV, Fryer LG, Carling D, Krook A*, et al.* Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. J Physiol. 2003;546:327-35.

Z

Zalewska T, Thompson VF, Goll DE. Effect of phosphatidylinositol and inside-out erythrocyte vesicles on autolysis of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. Biochim Biophys Acta. 2004;1693:125-33.

Zhao X, Sternsdorf T, Bolger TA, Evans RM, Yao TP. Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. Mol Cell Biol. 2005;25:8456-64.