

Université Jean Monnet – Saint Etienne
Faculté de médecine Jacques Lisfranc

Thèse de Doctorat d'université

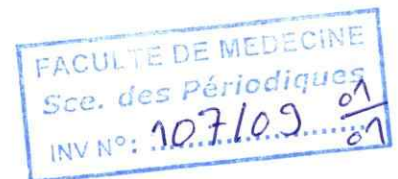
Ecole Doctorale n°488 : Sciences, Ingénierie, Santé
Spécialité : Biologie, Médecine et Santé
Option : Motricité Humaine et Handicap



**Régulation de la masse musculaire :
Rôle fonctionnel de la myostatine**

Adel AMIROUCHE

Présentée et soutenue publiquement le 26 janvier 2009
Devant le jury composé de :



M ^{me} Anne BONNIEU, UMR 866 INRA, Montpellier	Rapporteur
M ^{me} Dominique DESPLANCHES, UMR 5123 CNRS, Lyon	Rapporteur
M ^{lle} Anne-Cécile DURIEUX, INSERM 582, Paris	Examineur
M Henri BENOIT, EA4338, Saint Etienne	Examineur
M Mohamed REHAILIA, Université Jean Monnet, Saint Etienne	Examineur
M Damien FREYSSENET, EA4338, Saint Etienne	Directeur de thèse

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	6
AVANT-PROPOS.....	8
CHAPITRE I : MYOSTATINE	10
I.1 Généralités.....	10
I.2 Structure : gène et protéine	11
I.3 Mutation naturelle et expérimentale de la myostatine	13
I.3.1 Mutation naturelle	13
I.3.2 Modèles transgéniques.....	14
I.3.3 Modulation ectopique de l'expression de la myostatine <i>in vivo</i>	15
I.4 Régulation de la prolifération et de la différenciation des myoblastes.....	17
I.4.1 Régulation de l'activation des cellules satellites	17
I.4.2 Régulation de la prolifération.....	18
I.4.3 Régulation de la différenciation	19
I.5 Expression de la myostatine dans d'autres tissus	20
I.5.1 Tissu adipeux	20
I.5.1 Tissu osseux	21
I.6 La voie de signalisation de la myostatine.....	22
I.7 Régulation de l'activité de la myostatine	24
I.7.1 Le propeptide (région N-terminale de la myostatine)	24
I.7.2 La follistatine et follistatin-related gene (<i>FLRG</i>)	24
I.7.3 GASP-1	25
I.7.4 Titin-Cap	26
I.7.5 Décorine	26
I.8 Implication de la myostatine dans la régulation de la masse musculaire	27
I.8.1 Immobilisation	27
I.8.2 Exercice.....	28
I.8.3 Régénération	28
I.9 Pathologie et perspectives thérapeutiques de la myostatine	29
I.9.1 Approche pharmacologique	29
I.9.2 Approche génétique	30
CHAPITRE II : LA PROTEOLYSE.....	32
II.1 Régulation de la protéolyse musculaire ubiquitine-protéasome	32
II.1.1 Fonctionnement du système ubiquitine-protéasome	32
II.1.1.a Ubiquitination	32
II.1.1.b Le protéasome 26S.....	33
II.1.2 Régulation de la protéolyse musculaire ubiquitine-protéasome	34
II.1.2.a Rôle de la voie PI3K/Akt/mTOR dans la régulation de la protéolyse	35
II.1.2.b Rôle de la voie NF- κ B dans la régulation de la protéolyse	36
II.2 Rôle des calpaïnes dans la protéolyse musculaire	38
II.2.1 Structure et fonctionnement des calpaïnes.....	38

II.2.1.a Calpaïnes 1 et 2	38
II.2.1.b Calpaïne 3	39
II.2.2 Mécanisme d'activation et de régulation des calpaïnes	40
II.2.2.a Calpaïnes 1 et 2	40
II.2.2.b Calpaïne 3	41
II.2.3 L'implication physiologique et physiopathologique des calpaïnes	42
II.2.3.a Calpaïnes 1 et 2	42
II.2.3.b Calpaïne 3	44
III.1 La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.....	45
III.2 Régulation de l'initiation de la traduction.....	46
III.3 mTOR carrefour de la régulation de la traduction et de la protéolyse.....	47
III.3.1 Description générale	48
III.3.2 mTORC1 et le contrôle de la traduction	48
III.3.3 mTORC2 et le contrôle de la protéolyse	50
III.3.4 Régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.....	50
III.4 Implication de la voie PI3K/Akt/mTOR dans la régulation de la masse musculaire	51
OBJECTIFS.....	53
IV. MATERIELS ET METHODES	54
Réactifs utilisés	55
IV.1 Récupération de plasmide sur papier whatman.....	56
IV.2 Transformation de bactéries compétentes.....	57
IV.3 Miniprep d'ADN (QIAGEN®)	58
IV.3 Miniprep d'ADN (QIAGEN®)	58
IV.4 Vérification des plasmides ADN nu par des enzymes de restriction et électrophorèse en gel d'agarose	60
IV.5 Préparation de stabs	62
IV.6 Megaprep d'ADN EndotoxinFree	63
IV.7 Gigaprep d'ADN EndotoxinFree.....	65
IV.8 Transfert de gène in vivo.....	67
IV.8.1 Injection intramusculaire.....	67
IV.8.2 Prélèvement tissulaire et conditionnement des échantillons	68
IV.8.3 Conditionnement histologique	68
IV.9 Analyse histomorphologique.....	69
IV.9.1 Estimation de la surface de section transversale	69
IV.9.2 Estimation de nombre de fibres.....	69
IV.9.3 Mesure de la surface des fibres musculaires	69
IV.10 Extraction protéique à partir de prélèvement musculaire.....	70
IV.10.1 Extraction avec le tampon d'extraction NaKP	70
IV.10.2 Extraction Protéique avec le tampon d'extraction complet.....	71
IV.10.3 Extraction avec le tampon Urée	72

IV.11 Dosage de la concentration en protéines musculaires totales.....	73
IV.12 Coloration histochimique: Hemalun – Eosine – Safran (HES).....	74
IV.13 Activité enzymatique citrate synthétase.....	75
IV.14 Activité enzymatique lactate déshydrogénase.....	76
IV.15 Activités enzymatiques sous-unité 20 S du protéasome.....	77
IV.15.1 Activité chymotrypsin-like.....	77
IV.15.2 Activité Trypsine-like.....	78
IV.15.3 Activité Caspase-like.....	79
IV.16 Activité enzymatique caspase-3.....	80
IV.17 Immunoblotting.....	81
IV.17.1 Electrophorèses SDS page (Sodium dodécyl sulfate).....	81
IV.17.2 Transfert liquide des protéines sur membrane.....	82
IV.17.5 Marquage de la membrane avec l'anticorps secondaire.....	84
IV.17.6 Réaction de révélation.....	84
IV.17.7 Développement du film.....	85
V. RESULTATS.....	87
V.1 Article 1.....	88
VI. DISCUSSION.....	108
VI.1 Intérêt du modèle expérimental.....	108
VI.1.1 Efficacité de transfection, un paramètre critique du modèle.....	108
VI.1.2 Effet de la myostatine sur les cellules satellites dans notre modèle.....	109
VI.2 Expression transitoire de la myostatine et atrophie musculaire.....	110
VI.3 La surexpression de la myostatine régule négativement l'expression des protéines muscle-spécifiques.....	110
VI.4 La surexpression de la myostatine et les systèmes de protéolyse cellulaire.....	111
VI.5 Myostatine et marqueurs de l'apoptose.....	112
VI.6 La surexpression de la myostatine induit une diminution de la voie PI3K/Akt/mTOR.....	112
VI.6.3 Dialogues entre les voies de signalisation Smad et PI3K/Akt/mTOR.....	113
VI.6.3.a Mécanismes mis en jeu par la myostatine pour réguler la voie PI3K/Akt/mTOR.....	113
VI.6.3.b Amplification de la signalisation Smad par l'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR.....	114
VII. CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	116
VIII. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	117
IX. ANNEXES.....	134
IX.1 Articles publiés dans une revue internationale à comité de lecture.....	135
IX.1 Communication lors de congrès internationaux et nationaux.....	135

Régulation de la masse musculaire : rôle fonctionnel de la myostatine

La myostatine, membre de la famille transforming factor- β , est un régulateur négatif de la croissance musculaire lors du développement embryonnaire et la croissance postnatale par son action inhibitrice sur la prolifération et la différenciation des myoblastes. Cependant, des études ont aussi décrit une augmentation de l'expression de la myostatine dans des situations de perte de masse musculaire chez l'individu adulte, suggérant que la myostatine puisse aussi exercer son action sur des fibres musculaires matures. La technique d'électrotransfert de gène nous a permis d'étudier les effets de la surexpression de la myostatine dans le muscle strié squelettique mature chez le rat mâle Sprague Dawley. Sept et 14 jours après électrotransfert, une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine myostatine induisait une atrophie musculaire associée à une baisse significative de la surface de la section transversale du muscle *tibialis anterior* et des fibres musculaires. Par contre, aucune modification du nombre de fibres musculaires était observée. Des analyses RT-PCR et western blot ont permis de montrer que l'expression de protéines muscle-spécifiques (MyoD, myogénine, chaînes lourdes de myosine, troponine, desmine) était significativement abaissée. Par contre, le système protéolytique ubiquitine-protéasome (expression des ubiquitines ligases MuRF-1 et Mafbx, activités du protéasome) n'était pas affecté par la surexpression de la myostatine. Enfin, la signalisation de la voie Akt/mTOR, voie de régulation des synthèses protéiques, était significativement réduite comme en témoignait la diminution significative du niveau de phosphorylation des protéines Akt^{Thr308}, TSC2^{Thr1462}, protéine ribosomale S6^{Ser235/236}, et 4E-BP1^{Thr37/46}. Nos données montrent que l'expression ectopique de la myostatine s'accompagne d'une atrophie musculaire qui pourrait être en partie due à une réduction de l'expression des protéines muscle-spécifiques et à une désactivation de la voie de signalisation Akt/mTOR.

Mots clés : Atrophie, électrotransfert de gène, muscle strié squelettique, protéolyse, traduction

Regulation of skeletal muscle mass: functional role of myostatin

Myostatin, a member of transforming factor- β family, is a negative regulator of skeletal muscle growth during embryonic development and postnatal growth by inhibiting myoblast proliferation and differentiation. However, studies have also described an increase in myostatin expression in situations of muscle mass loss in adulthood, suggesting that myostatin also exerts its action on mature skeletal muscle fibers. In this study, we have explored the mechanisms elicited by an acute increase in myostatin expression in mature skeletal muscle fibres by using *in vivo* gene electrotransfer of a myostatin gene expression vector. Myostatin gene electrotransfer, which caused an increase in myostatin mRNA and protein level, induced atrophy of the *tibialis anterior* muscle. Seven and 14 after myostatin gene electrotransfer, *tibialis anterior* muscle section and muscle fiber cross-sectional area were significantly reduced in myostatin electrotransfected *tibialis anterior* muscles. RT-PCR and western blot analyses showed that this effect was due to a marked down-regulation of muscle-specific gene expression (MyoD, Myogenin, myosin heavy chain, troponin, desmin). By contrast, the ubiquitin-proteasome pathway (expression of MuRF-1 and Mafbx ubiquitin ligases, activities of the proteasome) was not affected by the overexpression of myostatin. Finally, signal transduction through the Akt/mTOR pathway, the pathway that regulates protein synthesis, was significantly reduced as evidenced by the decrease in the phosphorylation of Akt^{Thr308}, TSC2^{Thr1462}, ribosomal protein S6^{Ser^{235/236}}, and 4E-BP1^{Thr37/46}. Our data show that myostatin overexpression-induced muscle atrophy could be partly due to a reduction in the expression of muscle-specific genes and a deactivation of the Akt/mTOR signaling pathway.

Keywords: Atrophy, gene electrotransfer, proteolysis, skeletal muscle, translation