

UNIVERSITE MONTPELLIER I

UFR STAPS

INRA-UMR 866

Dynamique Musculaire et Métabolisme

THESE

Présenté pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER I

Ecole Doctorale n°463 : Sciences du Mouvement Humain

BALANCE PROTEIQUE ET PHENOTYPE MUSCULAIRE

Gwénaëlle BEGUE

Présentée et soutenue publiquement le 12 avril 2013

Devant le jury composé de Madame et Messieurs :

Mme Lydie COMBARET	Docteur, UMR 1019, INRA Clermont-Ferrand-Theix	Rapporteur
Mr Marc FRANCAUX	Professeur, Faculté des sciences de la motricité, Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Mr Henri BENOIT	Professeur, UFR STAPS de Grenoble	Examineur
Mr Robin CANDAU	Professeur, UMR 866-INRA Montpellier, UFR STAPS Montpellier	Directeur
Mr Guillaume PY	Professeur, UMR 866-INRA Montpellier, UFR STAPS Montpellier	Directeur

REMERCIEMENTS

Rédiger ce manuscrit a été un travail de longue haleine dont pour moi la partie délicate aura été celle-ci, les remerciements. Tant de personnes ont contribué à la concrétisation de ce travail de près ou de loin que je m'excuse d'avance de ne pas citer tout le monde. A tous les oubliés de ces pages, ne m'en voulez pas et croyez en ma sincère reconnaissance.

Tout d'abord, je remercie les membres du jury : Lydie Combaret pour ses précieux conseils pendant ces 3 ans ainsi que d'avoir acceptée d'être rapporteur du manuscrit; Marc Francaux et Henri Benoit pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Bien sûr, ce travail n'aurait pu aboutir sans la confiance et le soutien de mes deux directeurs de thèse Robin Candau et Guillaume Py. Merci robin pour ta gentillesse, ta bonne humeur, nos échanges sur l'entraînement et ta folie de modélisation !

« Mais Guillaumeeeee »...tu l'auras entendu des milliers de fois cette réplique! Je me demande toujours comment tu as fait pour supporter mon caractère bien trempé, mes sauts d'humeur et mon perfectionnisme souvent trop exagéré. Ah si, peut être mes confections culinaires presque hebdomadaires auront contribué à t'amadouer, toi et ton appétit dévorante! Sans oublier mon rôle de « post-it », « pense-bête », combien de RDV ou de tâches indispensables aurais-tu manqué sans moi ? Bref, j'ai eu de la chance de tomber sur toi, guillaume, une personne généreuse, d'une extrême gentillesse et pleine d'humilité. Je ne te remercierai jamais assez pour ces 5 supers années (master+thèse) de binôme, de complicité et de partage. Au plaisir de continuer ma route à tes côtés !

Durant cette longue aventure je ne peux omettre le bureau 22 et tout d'abord ceux qui m'ont appris mes 1^{er} techniques de paillasse avec sérieux et dérision : mes compères Aymeric et Olivier. C'est grâce à vous que j'ai continué dans cette voie de la biologie moléculaire...après réflexion...surtout grâce à l'ambiance décontractée que le bureau dégageait ! Merci pour nos fous rires, nos soirées arrosées avec notre consœur Dr Rodriguez (Olé !) et merci pour avoir toujours mangés avec retenue mes gâteaux, cakes, tartes...heureusement que je me servais la 1^{er} !!

A François dit « FF » pour les « pétages de plombs » de 17h, ton humour incessant, nos sorties course, notre complémentarité de choc pour les run&bike et ces derniers temps nos « Gwen party » avec l'adorable colonel. Ta complicité, ton écoute et tes conseils m'ont été plus que précieux pendant cette dernière année de thèse difficile. Sans être rationnelle, est-ce dû à notre signe astrologique commun que sans parole mais avec un simple regard, une attitude...on a toujours su se comprendre ? Malgré tout, je maintiens le cap sur toi en devenant colonel adjoint, ne l'oublie pas !

Florian Britto plus communément appelé le « roux », ton humour décalé et nos apéros (surtout !). Dédette, merci de m'avoir pris sous ton aile de technicienne à mes débuts et de m'avoir supporté pendant 5 années ! Barbara, brillante technicienne, toujours de bons conseils mais aussi une compagne et concurrente culinaire (après mon départ tu vas devoir t'activer aux fourneaux !) mais avant tout une amie précieuse.

UMR 866, merci : Anne, Vincent, Béa, Elo, Lio, Karen, Christelle R et B, Marie, Evelyne, Suzy.....

Cette thèse n'aurait pas non plus abouti sans ma 2^e famille : l'athlétisme brillamment coachée par Gilles. Tu m'as accueilli à bras ouverts et ne les a jamais refermés même ces dernières années où j'ai déserté un peu le stade, les compétitions et mis de côté le petit haut niveau auquel grâce à toi j'ai pu goûter. J'ai quelques regrets de ne pas avoir pu continuer ce petit bout de chemin de la haute performance mais ne te remercierai jamais assez d'avoir toujours été là, de m'avoir soutenue, encouragée et portée tant du côté course que du côté étude. Merci à la femme du coach ; à Claude, Stéphane, Delph, la team Garcia (Lulu, Agathe, Tif, Coco, Elise ...)... ces « sparring partners » d'exceptions !

Grosse pensée à Laurence, une super cadre technique équipe de France !

A Hélène et Tom rencontrés en stage.

A Franck mon collègue de master, le grand fou de trails mais avant tout un confident très précieux.

« STAPS un jour, STAPS toujours », Pepe, Amélie, Amandine « big up » !

Cette thèse est aussi celle de ma famille de « sang » : mon père, ma mère, mes grands-parents ML et JL. Malgré des périodes d'incompréhensions et de crises, vous ne m'avez jamais lâchée, toujours poussée et maintenu votre confiance en moi. Merci de m'aimer.

Mon petit néné, entre nous pas de longs discours mais des mots justes...dans les moments où j'en ai eu le plus besoin.

Merci mon frère.

A ma « goulou », mon « Dumbo », ma « pin-up » mais avant tout ma petite sœur, c'est dans nos différences que tu m'as apportées et m'apporte toujours. Merci sœurette.

Enfin, Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à cette thèse.

BALANCE PROTEIQUE ET PHENOTYPE MUSCULAIRE

Le maintien de la masse musculaire est étroitement lié à la balance entre la synthèse et la dégradation des protéines. L'exercice physique est un puissant régulateur de la balance protéique et plus particulièrement l'exercice en résistance. S'intéresser à la balance protéique après un exercice s'inscrit dans une compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant aux phénomènes d'hypertrophie et/ou d'atrophie musculaire. Nos travaux mettent en évidence que l'hypertrophie obtenue dans le muscle FDP après 10 semaines d'un entraînement en résistance chez le rat, est en lien avec l'activation chronique de la voie IL-6/STAT3 après chaque exercice aigu, en partie au sein du pool de cellules satellites activées. En phase proliférative, les cellules dont la voie de signalisation STAT1/STAT3 est activée, répriment l'expression des facteurs myogéniques comme MyoD et retournent ainsi à l'état quiescent, concourant à augmenter le pool de réserve. Ces mécanismes participent à la synthèse protéique par l'apport de nouveau matériel génétique au sein des fibres musculaires conduisant à une augmentation de leur surface de section ainsi qu'à leur conversion phénotypique avec l'entraînement. L'exercice en résistance favorisant la protéolyse, nos travaux ont cherché à caractériser les systèmes protéolytiques (autophagique-lysosomal, ubiquitine-protéasome) impliqués dans la balance protéique post-exercice. Les marqueurs moléculaires étudiés (activités enzymatiques du protéasome et de la cathepsine L, expression protéique et génique de LC3B, des E3 ligases...) ne permettent pas d'expliquer clairement les +30% de protéolyse obtenus une heure après des contractions excentriques sur muscle EDL isolé de rat en condition à jeun. Des perspectives d'étude des systèmes des calpains, des caspases et/ou des métalloprotéases matricielles sont alors à envisager.

Mots clés : exercice, hypertrophie, IL-6, cellules satellites, autophagique-lysosomal, ubiquitine-protéasome

PROTEIN BALANCE AND MUSCULAR PHENOTYPE

The maintain of muscle mass is closely controlled by protein synthesis and degradation balance. Physical activity and mainly resistance exercise is a powerful stimulus to positive muscle protein balance. To understand how protein balance is regulated after exercise, cellular and molecular mechanisms leading to muscular hypertrophy and/or atrophy have to be elucidated. Our works point out that FDP muscular hypertrophy after 10 weeks of resistance training in rat is partly due to the chronically activation of IL-6/STAT3 signaling pathway, occurring in the activated satellite cell pool, after each single exercise bout. Once activated and engaged in the myogenic program, cells in which STAT1/STAT3 signaling pathway is activated, could downregulate MyoD and return to a quiescent state, leading to increase satellite cell reserve's pool. These events participate to enhance protein synthesis by the incorporation of new genetic material into muscle fiber leading to increase their cross sectional area and phenotypic shift after training. As resistance exercise increases proteolysis, our works attempt to characterize the proteolysis systems (lysosomal-autophagic, ubiquitin-proteasome) involved in protein balance after exercise. The molecular markers measured (chymotrypsin-like and cathepsin L activities, protein and gene expressions of LC3B, E3 ligases...) could not explain the +30% of proteolysis obtained one hour after resistance eccentric contractions on EDL muscle of starved rats. Further studies based on calpains, caspases and metalloproteinase activities and/or expressions should bring us valuable information.

Keywords : exercise, hypertrophy, IL-6, satellite cells, lysosomal-autophagic, ubiquitin-proteasom

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS -----	23
INTRODUCTION GENERALE -----	27
ETAT DE LA LITTERRATURE -----	35
PREMIERE PARTIE IMPLICATION DE LA VOIE IL-6/STAT3 DANS L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRE INDUITE PAR UN ENTRAINEMENT EN RESISTANCE -----	37
I- Influence de l'entraînement en résistance sur le tissu musculaire -----	37
a. Effet de l'entraînement en résistance sur le phénotype musculaire -----	37
i. <i>Phénotype contractile</i> -----	37
ii. <i>Phénotype métabolique</i> -----	39
b. Entraînement en résistance et hypertrophie musculaire -----	41
i. <i>Chez l'homme</i> -----	41
ii. <i>Chez l'animal</i> -----	43
II- Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'hypertrophie induite d'exercice -----	45
a. Introduction -----	45
b. Régulation de la balance protéique musculaire -----	47
i. <i>Rôle de la synthèse protéique</i> -----	47
1. Traduction des protéines par la voie de signalisation PI3K/Akt-----	47
2. Voie de l'IGF-1-----	49
3. IGF-1 et MAPKs-----	51
4. Myostatine et régulation négative de la masse musculaire-----	53
5. Régulation de la traduction par les microARNs -----	55
ii. <i>Régulation de la protéolyse</i> -----	57
c. Régulation du nombre de noyaux -----	59
i. <i>Les cellules satellites et les MRFs</i> -----	61
ii. <i>Implication des cellules satellites dans l'hypertrophie induite d'exercice</i> ----	63
iii. <i>Voies de signalisation impliquées dans l'activation des cellules satellites à la suite d'un exercice</i> -----	67

d. Vision intégrée des mécanismes conduisant à l'hypertrophie induite par un entraînement en résistance-----	71
III- Interleukine-6 et exercice musculaire -----	73
a. Cytokines et exercice -----	73
b. IL-6 : une myokine-----	75
c. Signalisation musculaire de l'IL-6 dans les phénomènes hypertrophiques -----	79
i. <i>Rôle de la voie IL-6/STAT3 dans l'hypertrophie musculaire</i> -----	79
ii. <i>Voie JAK/STAT3</i> -----	79
DEUXIEME PARTIE : ROLE DES DIFFERENTS SYTEMES PROTEOLYTIQUES DANS LA BALANCE PROTEIQUE INDUITE PAR UN EXERCICE EN RESISTANCE ET AU COURS D'UN TRAITEMENT AU CLENBUTEROL -----	87
I- Métabolisme protéique et protéolyse musculaire -----	87
a. Notions de balance et turnover protéique-----	87
b. Régulation de la protéolyse musculaire -----	89
i. <i>Le système ubiquitine-proteasome</i> -----	89
ii. <i>Le système autophagique-lysosomal (LAS)</i> -----	93
iii. <i>Le système calcium-dépendant : les calpaines</i> -----	97
iv. <i>Les caspases</i> -----	101
v. <i>Les metalloprotéinases matricielles</i> -----	103
II- influence de l'exercice de résistance et/ou de la nutrition sur la balance protéique-----	105
a. Effet de l'exercice de résistance sur la dégradation protéique-----	105
i. <i>Système Ubiquitine Protéasome et exercice de résistance</i> -----	105
1. Rôle de l'UPS dans la protéolyse induite par l'exercice en résistance -----	105
2. Voies signalétiques impliquées dans la régulation de l'UPS par l'exercice -----	109
ii. <i>Activation du système Autophagique-Lysosomal avec l'exercice</i> -----	111
1. Rôle de l'autophagie dans la protéolyse induite d'exercice-----	111
2. Voies potentielles de régulation de l'autophagie par l'exercice -----	113
3. Activation et régulation du système lysosomal en situation d'exercice -----	115
iii. <i>Activation du système des calpaines avec l'exercice</i> -----	117
iv. <i>Activation du système des caspases avec l'exercice</i> -----	117
v. <i>Activation des MMPs avec l'exercice ?</i> -----	121

b.	Rôle des acides aminés essentiels sur la balance protéique après un exercice -----	123
i.	<i>Acides aminés essentiels et balance protéique</i> -----	123
ii.	<i>Voie signalétiques impliquées dans la stimulation de la balance protéique par les acides aminés branchés</i> -----	125
MATERIELS ET METHODES -----		131
I- Plans expérimentaux -----		133
a.	Etude n°1 : Implication de la voie IL-6/STAT3 dans l'hypertrophie musculaire induite par un entraînement en résistance -----	133
i.	<i>Protocole d'entraînement en résistance</i> -----	133
ii.	<i>Protocole d'exercice aigu en résistance</i> -----	135
b.	Etude n°2 : Implication des calpaines dans la médiation des effets hypertrophiques du clenbutérol chez la souris -----	135
c.	Etude n°3 : Implication des différents systèmes protéolytiques dans la protéolyse induite par un exercice en résistance et/ou le jeûne-----	137
i.	<i>Expériences ex vivo, sur muscle isolé</i> -----	137
1.	Protocole de contractilité -----	137
2.	Approche expérimentale-----	137
ii.	<i>Expériences In vivo : modèle d'exercice en résistance chez le rat</i> -----	143
iii.	<i>Expériences In vitro : Culture cellulaire L6</i> -----	143
II- Mise en évidence de la typologie et de l'hypertrophie musculaire : Etude n°1 et 2 --		145
a.	Contenu en protéine et ADN : étude n°1 -----	145
i.	<i>Extraction protéique et de l'ADN</i> -----	145
ii.	<i>Dosage des protéines totales et myofibrillaires</i> -----	147
iii.	<i>Dosage du contenu en ADN</i> -----	147
b.	Technique d'immunohistochimie-----	147
i.	<i>Coupes musculaires</i> -----	147
ii.	<i>Immunohistochimie des chaînes lourdes de myosines (MHC) : études 1 et 2</i> -----	149
iii.	<i>Immunofluorescence pSTAT3 et Pax7 : étude n°1</i> -----	149
iv.	<i>Co-marquage immunofluorescent BrdU et laminine : étude n°1</i> -----	151

III- Technique d'électroporation des plasmides : surexpression de la calpastatine (Etude n°2)	151
a. Développement et extraction du plasmide	151
b. Electroporation des plasmides	153
IV- Mesure de la balance protéique : Etude n°3	153
a. Dosage de la L-tyrosine par spectrofluorimétrie : mesure de la protéolyse	153
b. Incorporation de L-[C ¹⁴]-phénylalanine : Mesure de la synthèse protéique	155
V- Activités enzymatiques : Calpaines, Chymotrypsine-like du protéasome, cathépsine L (Etudes 2 et 3)	159
a. Activité chymotrypsine-like et cathépsine L : Etude 3	159
i. <i>Extraction des protéines cytosoliques</i>	159
ii. <i>Mesure de l'activité chymotrypsine-like (sous-unité β5) du protéasome par fluorescence</i>	159
iii. <i>Mesure de l'activité de la cathepsine L lysosomale par fluorescence</i>	161
b. Activité calpaine : Etude n°2	163
VI- Quantification protéique par Western blot : Etudes 1 à 3	163
a. Extraction protéique	163
b. Electrophorèse	165
c. Transfert	165
d. Saturation	167
e. Anticorps primaires et secondaires	167
f. Révélation et quantification	167
VII- Etudes n°1 et n°3 : Expression génique par RT-qPCR	167
a. Extraction des ARNs	167
b. Transcription Inverse (RT)	169
c. PCR quantitative en temps réel (qPCR)	169
i. <i>Principe général</i>	169
ii. <i>Conditions expérimentales</i>	171
VIII- Analyses statistiques	173

RESULTATS	175
ETUDE 1 : IMPLICATION DE LA VOIE IL-6/STAT3 DANS L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRE INDUITE PAR UN ENTRAINEMENT EN RESISTANCE -----	179
I- Caractéristiques de l'entraînement en résistance -----	179
a. Evolution des charges d'entraînement -----	179
b. Mesures de performance -----	179
II- Modifications phénotypiques induites par l'entraînement -----	181
a. Evolution de la masse corporelle -----	181
b. Modification phénotypique du muscle <i>Soleus</i> -----	181
i. <i>Contenu protéique et ADN</i> -----	181
ii. <i>Analyse histochimique</i> -----	181
c. Modification phénotypique du muscle <i>Extensor Digitorum Longus</i> -----	181
d. Modification phénotypique du muscle <i>Flexor Digitorum Profundus</i> -----	183
i. <i>Contenu protéique et ADN</i> -----	183
ii. <i>Analyse histochimique</i> -----	183
1. Phénotype musculaire -----	183
2. Domaine myonucléaire -----	185
III- Marqueurs de l'activation de la voie IL-6/STAT3 après un exercice aigu et 10 semaines d'entraînement dans le muscle FDP -----	189
a. Etat d'activation des protéines STAT1, STAT3 et ERK1/2 -----	189
b. Impact de l'exercice et de l'entraînement en résistance sur les gènes cibles de STAT3-----	189
IV- Implication des cellules satellites en réponse à l'activation de la voie IL- 6/STAT3 dans l'exercice aigu et l'entraînement en résistance -----	193
a. Localisation nucléaire de pSTAT3 -----	193
b. Etat de prolifération des cellules satellites après un exercice aigu -----	193
c. Expression génique des facteurs de régulation myogéniques-----	193

ETUDE 3 : ROLE DES DIFFERENTS SYTEMES PROTEOLYTIQUES DANS LA PROTEOLYSE INDUITE PAR UN EXERCICE EN RESISTANCE -----	199
I- Expérimentations préliminaires -----	199
II- Détermination de l'implication des différents systèmes protéolytiques dans la dégradation protéique induite par des contractions excentriques en résistance sur muscle isolé de rat -----	201
a. Mesure de protéolyse induite d'exercice en condition à Jeun -----	201
i. <i>Mesure de protéolyse totale 1 heure après l'exercice -----</i>	<i>201</i>
ii. <i>Mesure de protéolyse spécifique des différents systèmes de dégradation --</i>	<i>201</i>
b. Marqueurs moléculaires des différents systèmes protéolytiques -----	205
i. <i>Ubiquitine-Protéasome-----</i>	<i>205</i>
1. Profil d'ubiquitination-----	205
2. Activité enzymatique chymotrypsine-like (β 5) -----	205
3. Expression génique des E3 ligases -----	205
ii. <i>Autophagie -----</i>	<i>207</i>
1. Quantification protéique des Atgs -----	207
2. Expression génique des Atgs -----	207
iii. <i>Système lysosomal-----</i>	<i>207</i>
iv. <i>Autres systèmes -----</i>	<i>209</i>
c. Mesure de protéolyse induite d'exercice en condition non à jeun -----	211
III- Etude de la synthèse protéique à la suite de contractions excentriques en résistance sur EDL isolé de rat -----	213
a. Mesure physiologique de la synthèse protéique 1 heure après l'exercice-----	213
b. Marqueurs moléculaires de la synthèse protéique-----	213
IV- Etude préliminaire de la balance protéique à la suite d'un exercice <i>In vivo</i> en résistance chez le rat -----	213
V- Etude préliminaire <i>in vitro</i> de la dégradation protéique en condition d'atrophie sur des myotubes de rat (L6)-----	215
DISCUSSION-----	219
ETUDE 1 : IMPLICATION DE LA VOIE IL-6/STAT3 DANS L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRE INDUITE PAR UN ENTRAINEMENT EN RESISTANCE -----	221

Article 1: Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy -----	235
ETUDE 2: ROLE DES CALPAINES DANS LE REMODELAGE MUSCULAIRE INDUIT PAR UN TRAITEMENT CHRONIQUE AU CLENBUTEROL CHEZ LA SOURIS -----	237
Article 2: Calpastatin overexpression in the skeletal muscle of mice prevents clenbuterol induced muscle hypertrophy and phenotypic shift -----	241
ETUDE 3: ROLE DES DIFFERENTS SYTEMES PROTEOLYTIQUES DANS LA PROTEOLYSE INDUITE PAR UN EXERCICE EN RESISTANCE -----	243
I- Contexte scientifique -----	243
II- Protéolyse et exercice excentrique -----	243
a. Mesures physiologiques de protéolyse -----	245
b. Marqueurs moléculaires des systèmes protéolytiques -----	249
i. <i>Participation du système ubiquitine-protéasome dans la protéolyse induite d'exercice</i> -----	249
ii. <i>Implication du système de l'autophagie dans la balance protéique induite d'exercice</i> -----	251
iii. <i>Système lysosomal et exercice</i> -----	253
iv. <i>Conclusions et perspectives</i> -----	253
III- Rôle de la protéine Vps34 dans la balance protéique post-exercice -----	255
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES -----	259
ANNEXES -----	265
Articles dans des revues internationales à comité de lecture -----	267
Communications orales et affichées dans les congrès nationaux et internationaux -----	267
ANNEXE 1 : Remodelage musculaire induit par différents protocoles d'exercice chez l'Homme et le Rat -----	269
ANNEXE 2 : Synthèse des systèmes protéolytiques activés avec l'exercice -----	275
REFERENCES -----	285

LISTE DES ABREVIATIONS

3-MA : 3-méthyladénine

AAB : *Acide Aminé Branché*

AAE : *Acides Aminés Essentiels*

ADN : *Acide DésoxiriboNucléique*

AMPK : *AMP-activated protein kinase*

ARNm : *Acide RiboNucléique messenger*

ARNt *Acide RiboNucléique de Transfert*

Atg : *Autophagy related Genes*

ATP : *Adénosine Triphosphate*

Bcl : *B cell-lymphoma*

BPCO : *Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive*

BrdU : *Bromodeoxyuridine*

BSA : *Bovine Serum Albumine*

caspases : *cysteine-dependent aspartate-directed proteases*

Cb : *Clenbutérol*

CMA : *Chaperone Mediated Autophagy - Autophagie médiée par les protéines chaperonnes*

Cpst : *Calpastatine*

CsA : *CyclosporineA*

CSA *Cross Sectionnal Area- Surface de Section d'une fibre*

EDL : *Extensor Digitorum Longus*

eEF : *Eukariotic Elongation Factor*

eIF : *Eukariotic Initiation Factor*

EOR : *Espèce Oxygénées Réactive*

eRF : *Eukariotic Release Factor*

ERK1/2 : *Extracellular signal-regulated kinase*

FDP : *Flexor Digitorum Profundus*

Foxo : *Forkhead box protein O*

GH : *Growth Hormon-Hormone de Croissance*

GSK3 β : *glycogen synthetase kinase 3 beta*

hsc : *heat-shock cognate protein*

IGF-1 : *Insulin like Growth Factor 1*

IL-6 : *Interleukine-6*

JAK : *Janus Kinase*

JNK : *Jun-N-terminal kinases*

KO : *Knockout*

LAMP : *Lysosomes Associated Membrane Protein*

LAS : *Système Autophagique-Lysosomal*

LC3 : *microtubule-associated protein light chain 3*

LIF : *Leukemia Inhibitory Factor*

MAFbx : *Muscle Atrophy F-box protein*

MAP4K3 : *mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3*
 MAPKs : *Mitogen Activated Protein Kinases*
 m-calpain : *calpain 2*
 MGF : *Mechano-growth Factor - Facteur Mécanique de Croissance*
 MHC : *Chaîne Lourde de Myosine*
 miARN : *micro Acide RiboNucléique*
 MMP : *Métalloprotéinase ou Métalloprotéase Matricielle*
 MRF : *Myogenic Regulator Factor -Facteur de Régulation Myogénique*
 Mstn : *Myostatine*
 mTOR : *Mammalian target of rapamycin*
 MuRF-1 : *Muscle Ring Finger protein 1*
 NFAT : *Nuclear Factor of Activated T cells*
 NF- κ B : *Nuclear Factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells*
 p94 : *Calpain 3*
 PAF : *Paraformaldéhyde*
 Pax : *Paired Box transcripteur factor*
 PDK : *3' phosphoinositol-dependent protein kinase*
 PE : *Phosphatidyléthanolamine*
 PI3K : *Phosphatidylinositol-3-kinase*
 PKB : *Protein Kinase B/ Akt*
 PLD1 : *Phospholipase D1*
 PRAS40 : *proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa*
 pSTAT3 : *STAT3 phosphorylée*
 PTEN : *phosphatase and tensin-like protein*
 R : *Récupération*
 RM : *Répétition Maximale*
 Ryr : *Récepteurs à la Ryanodine*
 SC : *Satellite Cell -Cellule Satellite*
 SOCS3 : *Suppressor of Cytokine Signaling 3*
 SOL : *Soléaire*
 SRF : *Serum Response Factor*
 STAT3 : *Signal Transducer and Activator of Transcription-3*
 TA : *Tibialis Anterior*
 TIMP : *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases*
 TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha*
 TSC : *Tuberous Sclerosis protein*
 Ub : *Ubiquitine*
 UPS : *Système Ubiquitine Protéasome*
 Vps34 : *Vacuolar protein sorting 34*
 vs : *versus*
 μ -calpain : *calpain 1*

INTRODUCTION GENERALE

Le muscle strié squelettique grâce à sa capacité de production de force est le tissu responsable du mouvement humain volontaire mais assure également le maintien postural du corps. Les cellules du muscle aussi appelées fibres musculaires ou myocytes sont multinuclées suite à la fusion de plusieurs cellules mononuclées issues de la lignée myogénique, les myoblastes. Au sein de ces fibres, l'appareillage contractile est regroupé en myofibrilles dont les acteurs majeurs sont l'actine et la myosine. Lorsque ces deux myofilaments coulissent l'un par rapport l'autre, les myofibrilles se raccourcissent entraînant le raccourcissement des fibres et donc du muscle entier. Le raccourcissement du muscle appelé contraction concentrique s'accompagne systématiquement de la production d'une force.

Après la naissance, les capacités d'adaptations des muscles squelettiques sont possibles en "quantité" et en "qualité" regroupées sous le terme de plasticité musculaire. Cette plasticité dont est doté le muscle lui permet d'adapter la taille et la composition de ses fibres en fonction des sollicitations qu'il subit. Par exemple, des modalités bien précises d'exercice physique ou une alimentation hyper protéinée peuvent conduire à une augmentation de la synthèse protéique musculaire voire une hypertrophie contrairement à certaines pathologies, la sédentarité ou le vieillissement qui peuvent générer une perte de masse musculaire ou atrophie. Ces changements de taille du muscle sont souvent accompagnés d'une modification de son phénotype contractile et métabolique. La masse musculaire représente 40% du poids corporel, le tissu adipeux 20%, la peau 7%, le foie et le cerveau 2,5% chacun, le cœur et les reins 0,5%. Le muscle squelettique étant indispensable à la motricité ainsi qu'à la posture, le maintien de la masse musculaire est alors un facteur important pour une bonne autonomie et qualité de vie. En effet, la perte musculaire associée à l'âge qui commence après l'âge de 55 ans, est l'un des facteurs les plus importants de perte d'autonomie chez les personnes âgées augmentant également les risques de chute et de fracture. La baisse cumulée de la masse musculaire atteint 40% de 20 à 80 ans mais elle peut également se produire avant notamment lorsqu'une maladie chronique apparaît. Ainsi, dans un contexte économique où l'enjeu est la réduction des coûts de santé publique, la compréhension des mécanismes de régulation de la masse musculaire est une préoccupation majeure. Les protéines musculaires représentant 85% du volume total de la fibre, le maintien de la masse musculaire est étroitement lié à la balance entre la synthèse et la dégradation des protéines. Ainsi, la régulation de la masse musculaire est en lien avec une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables des modifications du métabolisme protéique

De récents progrès ont été faits dans la compréhension des voies de signalisation conduisant à l'hypertrophie ou l'atrophie musculaire. Ainsi, il est très clairement démontré que l'activation ou l'inhibition de la voie canonique phosphatidylinositol-3-kinase (*PI3K*)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) induit une hypertrophie ou une atrophie du muscle via une modification de la balance entre la synthèse et la dégradation des protéines musculaires. Par ailleurs,

l'augmentation de la synthèse protéique musculaire n'est pas uniquement due à la voie canonique PI3K/Akt/mTOR mais est la résultante de plusieurs voies signalétiques dont leur action simultanée ou alternative sont complémentaires et mènent à la réponse maximale. Ainsi, la voie des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) à travers les protéines Extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) et p38 MAPK et plus récemment la voie de l'interleukine-6 (IL-6)/Janus Kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT3) ont été montrées comme étant des voies supplémentaires contribuant aux phénomènes anaboliques dans certaines conditions. Parmi ces acteurs, les facteurs de croissance (Insulin like Growth Factor 1 (IGF-1), hormone de croissance...), l'exercice physique conduisent à l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR alors que certaines pathologies (cancer, myopathies secondaires...), un statut nutritionnel inadéquat (jeûne, anorexie...), le vieillissement vont concourir à la diminution de son activation et à l'augmentation de l'implication de voies signalétiques régulant le catabolisme musculaire. Ces dernières activent des systèmes de dégradation des protéines différemment impliqués selon les stimuli: les calpaines, le système ubiquitine-protéasome (UPS) et le système autophagique-lysosomal (LAS).

Parmi ces stimuli, l'exercice physique à lui-seul est un puissant régulateur de la balance protéique et plus particulièrement l'exercice en résistance. Il permet de stimuler la synthèse protéique en partie via PI3K/Akt/mTOR jusqu'à 48 heures après un exercice et lorsque celui-ci est répété, notamment dans un contexte d'entraînement, il conduit à une hypertrophie des muscles sollicités après seulement quelques semaines. Cependant, un tel exercice active les mécanismes de dégradation des protéines qui sont exacerbés lorsque le statut « nutritionnel » de la cellule est inadéquat notamment lorsque certains acides aminés essentiels font défaut. Si les mécanismes régulant la synthèse protéique après un exercice ont fait l'objet de nombreuses études, les différents systèmes de dégradation des protéines et leur régulation sont largement moins décrits. Ainsi, comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant la masse musculaire présente un intérêt majeur à la fois dans le monde sportif et médical. Dans un objectif de performance, la compréhension des voies signalétiques impliquées dans la balance protéique pourrait permettre de proposer des stratégies nutritionnelles adaptées pour optimiser les effets de l'entraînement en résistance. Par ailleurs, l'exercice de résistance étant un puissant stimulus anabolique, il est de plus en plus envisagé comme traitement thérapeutique complémentaire aux agents pharmacologiques, dans des pathologies associées à des fontes musculaires (cachexie cancéreuse, sarcopénie de la personne âgée). A cet égard, les travaux de ces dernières années ont vu émerger une cytokine comme nouveau médiateur potentiel dans l'induction de l'hypertrophie musculaire, l'interleukine-6. A l'exercice l'IL-6 est produite par le muscle actif et peut

agir de manière autocrine et paracrine sur l'homéostasie du glucose. Cependant, certaines données récentes suggèrent son implication dans l'hypertrophie induite d'exercice.

Le travail de thèse présenté ici sera divisé en trois études. Tout d'abord, l'intérêt sera porté sur le rôle de la voie de signalisation IL-6/STAT3 dans l'hypertrophie musculaire induite par un entraînement en résistance ainsi que sur ses mécanismes cellulaires et moléculaires d'action. La revue de littérature concernant la **1^{er} étude** sera composée de trois chapitres principaux qui exposeront le remodelage musculaire induit par un exercice en résistance puis les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à l'hypertrophie et enfin l'implication de la voie IL-6/STAT3 dans l'hypertrophie musculaire. Ensuite, l'intérêt sera porté sur la balance protéique après un exercice de résistance et un traitement au β 2-agoniste, le clenbutérol (Cb) et plus particulièrement sur l'implication des différents systèmes de dégradation des protéines. La revue littérature des **études 2 et 3** s'attachera dans un 1^{er} temps à décrire les principaux systèmes de dégradation protéiques puis les mécanismes moléculaires de leur régulation par l'exercice en terminant par l'importance de la nutrition dans la régulation de la balance protéique.

ETAT DE LA LITTERRATURE

**PREMIERE PARTIE IMPLICATION DE LA VOIE IL-6/STAT3 DANS
L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRE INDUITE PAR UN ENTRAÎNEMENT EN
RESISTANCE**

I- INFLUENCE DE L'ENTRAÎNEMENT EN RESISTANCE SUR LE TISSU MUSCULAIRE

L'une des propriétés les plus remarquables du muscle est sa faculté à s'adapter aux différentes sollicitations qu'il subit notamment à l'échelle de ses constituants protéiques et structuraux. Cette plasticité musculaire lui permet d'adapter son équipement en protéines contractiles (isoformes des chaînes lourdes de myosine-MHC) ou métaboliques (enzymes oxydatives et glycolytiques) en fonction de paramètre qualitatif (intensité) et quantitatif (fréquence) de l'activité de contraction. Ces réponses physiologiques du muscle à l'entraînement sont radicalement différentes entre un entraînement en endurance, en force ou en résistance. Ces trois types d'entraînement peuvent être distingués en considérant que pour un individu donné et une modalité d'exercice, il existe une intensité maximale de contraction. Ainsi, un exercice peut être dit de force lorsque l'exercice est réalisé entre 80-100% du maximum, de résistance entre 60-80% et d'endurance pour une intensité d'exécution inférieure à 60%. L'intensité de la contraction musculaire étant différente, la durée d'exécution du mouvement sera alors inversement proportionnelle. Ainsi, les exercices d'endurance représentent ceux dont les durées d'exécution sont les plus importantes. Les adaptations du muscle à ce type d'exercice ont très rapidement intéressé les scientifiques et ce n'est que plus récemment que l'on étudie les réponses du muscle aux exercices de force et résistance. Alors que l'entraînement en endurance ne détermine que de faibles variations de masse musculaire, au contraire l'entraînement en force et plus spécifiquement en résistance sont à l'origine de l'hypertrophie marquée des muscles actifs. De ce fait, les travaux de thèse présentés ont été menés à partir de protocoles d'entraînement en résistance, modèle physiologique pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'hypertrophie musculaire.

a. Effet de l'entraînement en résistance sur le phénotype musculaire

i. Phénotype contractile

Le phénotype contractile est déterminé par la vitesse de contraction couplée à la force développée par la fibre musculaire. Ces deux paramètres dépendent majoritairement des isoformes des chaînes lourdes de myosine (MHC) présentes dans la fibre. La vitesse de contraction de la fibre étant étroitement liée à l'activité ATPasique portée par la tête de myosine, l'étude de la composition en MHC du muscle est un bon critère pour caractériser son phénotype contractile. On distingue alors des fibres lentes riches en MHC de type I qui développent des forces plus faibles que des fibres rapides riches en MHC de type II. Il existe aussi plusieurs isoformes des MHC de type II que l'on distingue

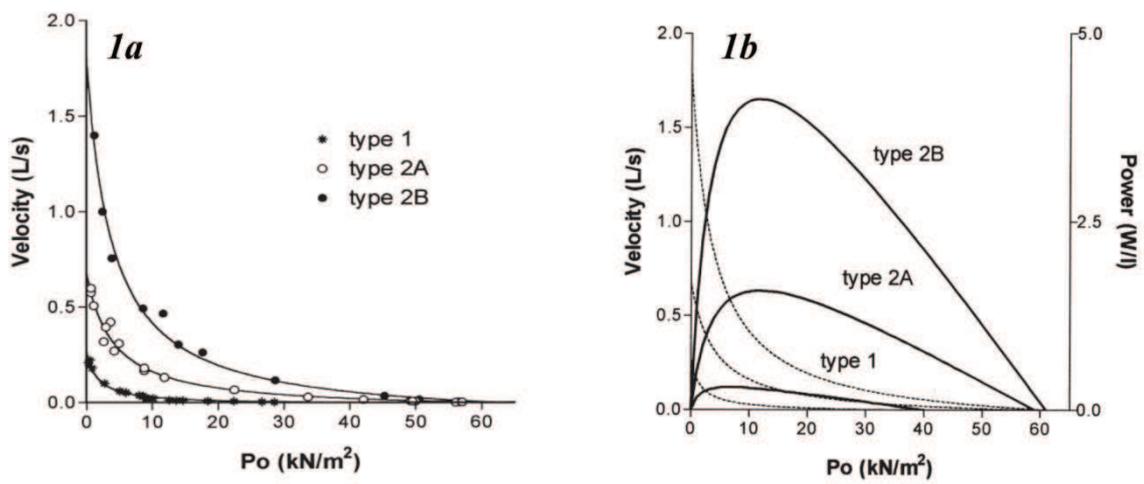


Figure 1 : Courbes force-vitesse (*1a*) et force-puissance (*1b*) des trois types de fibres I, IIa et IIb chez l'homme. D'après Bottinelli et al., 1999.

en fonction de leur vitesse de contraction, par ordre croissant : IIa, IIx et IIb chez le rongeur, l'isoforme IIb n'existant pas chez l'homme. Il a noté que l'isoforme IIb est souvent employée à tort chez l'homme à la place de IIx. Par ailleurs, les fibres de type rapide ayant des vitesses de raccourcissement maximal supérieures aux fibres lentes (*Figure 1a*), la composition du muscle en types de fibres joue un rôle important sur les performances en force (*Figure 1b*). De plus, une fibre pouvant exprimer plusieurs isoformes de MHC, il existe une grande variété de propriétés mécaniques possibles du muscle. L'entraînement en résistance va induire une conversion des fibres rapides glycolytiques de type IIx en fibres rapides glycolytique et oxydative (« fibres intermédiaires ») de type IIa chez l'homme, quel que soit le muscle étudié pourvu qu'il ait été sollicité de façon majeure dans l'exercice [1, 2]. Des adaptations similaires sont retrouvées chez le rongeur qui se traduisent par une transition des fibres de type IIb vers des formes plus lentes de type IIx et IIa [3, 4]. Bien que la transition phénotypique soit identique chez le rongeur et chez l'homme, les données chez le rongeur n'ont pas toujours été obtenues à la suite de protocoles d'entraînement en résistance : Caiozzo *et al.*, 1997 et Haddad *et al.*, 1998 ont utilisé un modèle de contractions involontaires contrôlées par un ergomètre ; seuls Lee *et al.*, 2004 ont réalisé un protocole de résistance sur une échelle d'escalade qui présente l'inconvénient d'être peu physiologique, les rats étant stimulés par des décharges électriques. Dans ce contexte, une partie de ce travail de thèse s'est attaché à développer un modèle d'entraînement en résistance physiologique chez le rat reflétant la transition phénotypique obtenue chez l'homme.

A l'inverse des fibres de types rapides, les modifications sur les fibres de type I sont très dépendantes du type d'entraînement en résistance. Ainsi, selon les protocoles aucune modification ou une diminution des fibres de type I ont été rapportée [2, 4, 5]. Enfin, cette transition du phénotype contractile du rapide vers un phénotype intermédiaire semble assez rapide et apparaître dès la deuxième semaine d'un entraînement de résistance de deux séances par semaine [6].

ii. Phénotype métabolique

Le phénotype métabolique fait référence aux voies métaboliques sollicitées pour la fourniture d'énergie (ATP) et donc à l'équipement biochimique pour resynthétiser l'ATP. On distingue deux grandes filières pour la production d'ATP à partir de substrats glucidiques ou lipidiques qui sont la filière anaérobie lactique et la filière aérobie. La première voie consiste en la dégradation du glucose en lactate dans le cytosol alors que l'oxydation du glucose et des lipides se poursuit dans la mitochondrie pour la deuxième voie. Le phénotype métabolique d'un muscle peut alors être estimé à partir du dosage de l'activité des enzymes spécifiques de chacune des deux filières ou des substrats utilisés. On distingue alors les fibres glycolytiques utilisant la voie anaérobie, des fibres oxydatives utilisant la voie aérobie pour produire l'énergie. Au-delà de cette dichotomie, aucune fibre n'est strictement oxydative ou glycolytique. Par ailleurs, le phénotype

métabolique est assez bien corrélé au phénotype contractile, les fibres lentes de type I étant les plus oxydatives, les fibres rapides de type IIa intermédiaires, et les fibres rapides de type IIx et IIb très glycolytiques.

De manière générale, l'entraînement en résistance ne se traduit par aucune amélioration des capacités oxydatives musculaires puisque l'activité des enzymes oxydatives musculaires telles que la citrate synthase ou la succinate déshydrogénase sont le plus souvent non modifiées et parfois diminuées [7, 8]. Des données récentes ont permis de montrer une augmentation des flux de transport et de captation du glucose ainsi que de l'expression des transporteurs du glucose GLUT-4 [9-11], une augmentation de l'enzyme impliquée dans la transformation du pyruvate en lactate, la lactate-deshydrogénase-A (LDH-A), fortement corrélées au métabolisme glycolytique [12, 13]. De plus, une augmentation de la capacité à transporter du lactate à travers la membrane, en particulier dans le sens de l'extrusion de cet ion [14], va également dans le sens d'une meilleure tolérance de l'augmentation du potentiel glycolytique induit par l'entraînement en résistance (*Annexe 1*).

En résumé, contrairement à l'entraînement en endurance, un entraînement en résistance mené chez l'homme ou le rat n'entraîne pas le passage d'un phénotype lent vers le rapide mais permet l'obtention d'un phénotype intermédiaire à travers l'augmentation des fibres de type IIa. De ce fait un muscle oxydatif (soléaire par exemple) sera davantage glycolytique après un exercice de résistance alors qu'un muscle rapide (Extensor Digitorum Longus ou EDL, Plantaris) verra son potentiel oxydatif augmenté. Ce changement phénotypique ne semble pas être majoritairement lié au type de muscles mais semble varier suivant le protocole d'entraînement employé chez l'homme (nombreuses répétitions à charges modérées ou peu de répétitions à charges plus élevées). Cette différence de résultat est peu fréquente chez le rongeur, les protocoles de résistance s'apparentant davantage à de la stimulation électrique ou des exercices plutôt de force isométrique.

b. Entraînement en résistance et hypertrophie musculaire

i. Chez l'homme

L'augmentation de la masse musculaire observée en réponse à un entraînement en résistance résulte principalement d'une hypertrophie des fibres musculaires, autrement dit d'une augmentation de la surface de section de la fibre (CSA). Un certain nombre d'études ont pu décrire des augmentations de l'ordre de 10 à 30 % de la CSA au terme d'un entraînement de 10 à 12 semaines chez des populations initialement sédentaires [1, 8, 15-17]. Cette augmentation de la surface de section suite à un entraînement de résistance affecte tous les types de fibres mais plus particulièrement les fibres IIa et IIx avec des augmentations d'au moins 25% alors que la CSA des fibres lentes serait moins touchée (15%) (*Annexe 1*). Le phénomène

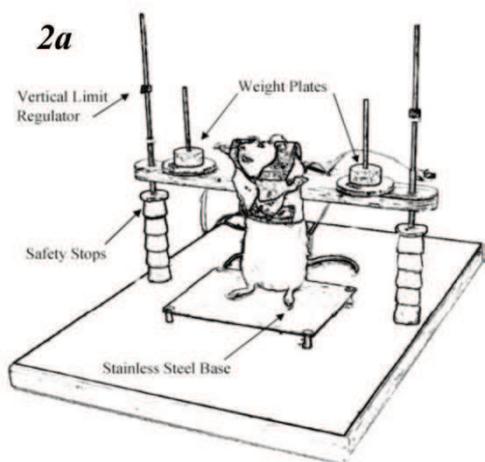


Figure 2 : Modèles d'entraînement en résistance chez le rat. Appareil de squats (2a) et échelle d'escalade (2b)

hypertrophique peut être encore plus marqué chez les populations d'athlètes entraînés en force depuis plusieurs années: Kadi *et al.* (1999) [18] ont montré une hypertrophie de plus de 80 % de la surface de section transversale des fibres musculaires de type IIa et IIX comparativement à une population sédentaire dans le muscle trapèze [18]. L'importance de l'hypertrophie pourrait dépendre alors de la plasticité musculaire initiale qui semble étroitement liée au contenu initial en cellules satellites [15]. Les protocoles ayant permis d'obtenir ces hypertrophies ont été réalisés sur des appareils de musculation de type extension du genou, squat, presse pour les membres inférieurs et des exercices de tirages (rowing) ou développé-couché pour les membres supérieurs. Classiquement, les exercices sont réalisés entre 3-4 séries de 8-10 répétitions entrecoupés de 1 à 3 minutes (min) de récupération entre les séries. Chaque répétition est effectuée entre 70-80% de la répétition maximale (RM). Cette dernière est définie comme la charge maximale qui peut être soulevée en une fois. Ces exercices sont réalisés 3-4 fois par semaine entre 8-12 semaines, temps nécessaire pour obtenir une hypertrophie de l'ensemble des types de fibres (*Annexe 1*).

ii. Chez l'animal

Si l'on s'intéresse à l'hypertrophie musculaire induite par un entraînement en résistance chez le rat, les données restent très peu fournies puisque les modèles d'entraînement en résistance chez le rat restent marginaux. On peut tout de même citer deux modèles, l'un davantage critiquable que l'autre : le modèle de squat de Tamaki *et al.* (1992) [19] (*Figure 2a*) et le modèle d'échelle d'escalade de Lee *et al.* (2004) [20] (*Figure 2b*). Après 4 semaines d'entraînement en squat, Barauna *et al.* (2005) [21], Barauna *et al.* (2007) [22] ont pu obtenir une hypertrophie cardiaque contrairement à l'étude de Krisan *et al.* (2004) [9] dans laquelle aucune hypertrophie des muscles des pattes arrière n'a été obtenue après 12 semaines d'entraînement. Cette absence d'hypertrophie peut s'expliquer par deux raisons : le faible volume de contraction (3 x 10 répétitions à 75%, 3 fois par semaine) mais également l'aspect peu physiologique du modèle, les rats subissant des décharges électriques (10V). Par ailleurs, ce modèle étant très attirant par sa proximité avec les modèles chez l'homme, nous avons essayé de le reproduire à l'identique avec l'intention de modifier le protocole d'entraînement pour obtenir une hypertrophie des pattes arrière. Malgré des stimulations électriques importantes, des heures de familiarisation et beaucoup de patience, les rats ont toujours refusé d'effectuer correctement des squats. Bien qu'utilisant une stimulation électrique, l'échelle d'escalade [20] est beaucoup plus physiologique que le 1^{er} modèle et démontra une augmentation de CSA de 20% d'un muscle des pattes avant (Flexor Hallucis Longus) après 8 semaines d'entraînement.

Jusqu'à présent, les études s'intéressant aux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'hypertrophie induite par augmentation de l'activité contractile, ont toujours été menées sur des modèles animaux de surcharge par ablation de muscles antagonistes [23, 24]. Ce modèle est éloigné

d'un protocole d'entraînement en résistance à proprement parlé au moins sur le plan de la stimulation neuronale de type tonique sur le(s) muscle(s) devant compenser les muscles de la posture enlevés.

En résumé, l'entraînement en résistance détermine un profond remodelage phénotypique du tissu musculaire chez l'homme. D'un point de vue histologique, cela se traduit par une hypertrophie musculaire par augmentation de la surface de section des fibres musculaires de préférences rapides. A une échelle plus microscopique, les protéines représentatives du phénotype contractile (MHC) ou métaboliques (enzymes glycolytique ou oxydatives) attestent d'une transition vers un phénotype « intermédiaire » c'est-à-dire rapide-oxydatif dû en partie à l'augmentation des MHC de type IIa. Un modèle physiologique d'entraînement chez le rat reste à envisager pour confirmer les adaptations obtenues chez l'homme et permettre des études approfondies des mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents.

II- MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS L'HYPERTROPHIE INDUITE D'EXERCICE

a. Introduction

Si l'entraînement en résistance permet une hypertrophie des muscles sollicités, en opposition la réduction de l'activité musculaire qu'elle soit expérimentale (dénervation, suspension des pattes arrières du rongeur, alitement), physiologique (vieillesse) ou physiopathologique (cancer, pathologie neuromusculaire, septicémie...) conduit à une atrophie musculaire [25]. Ces adaptations au stress mécanique et/ou métabolique s'expliquent par des modifications de l'expression génique conduisant à un gain ou à une perte de masse musculaire. Les protéines myofibrillaires représentant 80% du volume de la fibre [26], tout mécanisme stimulant l'expression génique de ces protéines pourrait avoir un effet hypertrophiant. Ainsi, toute situation qui modifiera la balance entre la synthèse et la dégradation des protéines (protéolyse) aura un impact sur la masse musculaire. En effet, des études chez l'homme ou chez le rat ont pu montrer une augmentation de la synthèse protéique de 3 à 48 heures après un exercice de résistance [27, 28]. Cependant, de tels exercices induisent également une augmentation de la protéolyse de telle façon que la balance protéique (différence entre synthèse protéique et protéolyse) est négative immédiatement après l'exercice, les phénomènes de dégradation protéique étant stimulés de manière plus précoce [27]. Il existe un moyen simple de rendre cette balance protéique positive : la prise alimentaire. Les acides aminés essentiels (AAE) présents dans l'alimentation contribuent à eux seuls à stimuler la synthèse protéique induite par l'exercice [29, 30]. Il est alors compréhensible qu'une alimentation déséquilibrée, carencée, le jeûne ou encore que des pathologies telles que le cancer, le VIH, la Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) induisent des pertes de masse musculaire en modifiant l'utilisation des

substrats énergétiques. Les acides aminés sont alors utilisés comme fournisseur d'énergie, détournés de leur métabolisme initial, un déséquilibre dans la balance protéique survient conduisant à une perte de masse musculaire. L'inactivité a également des effets opposés à l'exercice puisque la synthèse protéique est réduite après 14 jours d'alitement [31] ou encore lors d'une suspension par les pattes arrière du rongeur augmentant également la protéolyse [32].

Toute perte ou gain de masse musculaire est donc conditionné par des variations de la balance protéique, résultat de modifications au niveau de la transcription et de la traduction des protéines myofibrillaires mais également au niveau de l'activation des différents systèmes de dégradation : ubiquitine-proteasome, autophagique-lysosomal et les calpaines. Enfin, l'augmentation du nombre de noyaux au sein de la fibre musculaire peut contribuer à l'accroissement des capacités de synthèse en augmentant la capacité transcriptionnelle non-sélective de la cellule. La régulation de la synthèse protéique par l'incorporation de nouveaux noyaux implique la participation des cellules satellites au phénomène hypertrophique [33].

b. Régulation de la balance protéique musculaire

i. Rôle de la synthèse protéique

1. Traduction des protéines par la voie de signalisation PI3K/Akt

Il est très clairement reconnu l'implication de la voie PI3K/Akt dans la régulation de la masse musculaire. Le stress mécanique, les facteurs de croissance (IGF-1, insuline) ou les acides aminés vont induire la phosphorylation de PI3K [34] permettant la fixation de la protéine sérine-thréonine kinase Akt ou PKB (*Protein Kinase B*) au niveau de la membrane puis sa phosphorylation par la kinase 3' phosphoinositol-dependent protein kinase (PDK). Lorsque Akt est activée, plusieurs de ses substrats peuvent être phosphorylés, dont certains participent à la régulation de la synthèse protéique.

La protéine clé et principale cible d'Akt est mTOR qui peut être phosphorylée via l'inhibition des protéines *Tuberous Sclerosis protein 1/2* (TSC1/2) et PRAS40 (proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa) [35, 36]. mTOR est à l'origine de la modulation de deux voies différentes : la voie de PHAS-1 et la voie de la protéine kinase ribosomale S6 (p70^{S6K}), toutes les deux impliquées dans le contrôle de facteurs de traduction appelés « eukariotic initiation (eIF), elongation (eEF) and release (eRF) factors ». L'inhibition de PHAS-1 ou 4EBP1, régulateur négatif de l'initiation de la traduction, permet la phosphorylation de eIF4E pour la formation du complexe eIF4E-eIF4G alors que l'activation de p70S6k induit la phosphorylation de S6 et eIF4B [37].

Une seconde cible d'Akt, la protéine glycogène synthétase kinase 3 bêta (GSK3 β) a été montrée comme pouvant moduler l'hypertrophie [39]. La phosphorylation de GSK3 β par Akt permet de lever l'inhibition que GSK3 β exerce sur le facteur d'initiation de l'élongation, eIF2B [40, 41]. Ainsi, l'inhibition de GSK3 β peut induire une hypertrophie par stimulation de la synthèse protéique mTOR indépendante.

Un consensus est largement établi sur l'activation de la voie PI3K/Akt à la suite d'un exercice en résistance [42]. Les travaux de Bolster *et al.* (2003) chez le rat montrent une activation rapide et transitoire de la phosphorylation de Akt, mTOR et de l'ensemble des molécules cibles 4EBP1, S6, eIF2b après un protocole de stimulation électrique à haute fréquence (simulation d'un exercice de résistance). De plus, l'étude de Kubica *et al.* (2005) confirme l'implication de cette voie puisque l'administration d'un inhibiteur spécifique de la protéine mTOR à des rats, la rapamycine, abolie totalement l'activation de cette voie après une stimulation électrique. Ainsi, l'état de phosphorylation des facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction (S6, 4EBP1, eIF2B) est admis comme marqueurs de l'activation de la synthèse protéique [44, 45]. Ils sont fréquemment mesurés, de par leur technique de mesure plus facile en Western blot par comparaison à la mesure directe du taux de synthèse protéique. Même s'il est prouvé que l'exercice de résistance augmente la synthèse protéique via l'activation de la voie PI3K/Akt, les signaux à l'origine de cette activation restent à éclaircir. On cherche toujours à comprendre si la contrainte mécanique elle-même peut activer cette voie ou encore si l'effet de l'exercice est médié par certains facteurs de croissance, le lactate ou encore les acides aminés.

2. Voie de l'IGF-1

Depuis quelques années, il est reconnu que l'exercice induit la production locale d'IGF-1 par le muscle qui elle-même contribue à augmenter de façon rapide et transitoire les concentrations plasmatiques d'IGF-1 [24, 46, 47]. Les études ont tout d'abord cherché à caractériser l'origine de cette IGF-1 plasmatique. En effet, le foie est la principale source de l'IGF-1 circulante qui agit de manière endocrine dans la médiation des effets de l'hormone de croissance (GH) mais le muscle est également une source de production de l'IGF-1 dont l'action est autocrine/paracrine et qui peut en partie être régulée par la GH. La surexpression ou l'administration exogène d'IGF-1 dans le muscle n'induisent pas d'augmentation de la concentration plasmatique d'IGF-1 mais permettent une hypertrophie musculaire [48, 49]. En revanche, l'administration systémique d'IGF-1 ou à l'inverse sa diminution dans un modèle murin déficient pour le gène de l'IGF-1 hépatique (souris LID), n'entraînent pas de modification de la masse musculaire [50, 51]. Il semble donc que l'IGF1 musculaire et non hépatique participe à l'hypertrophie musculaire. Cette hypothèse est supportée par une étude sur des rats dépourvus d'hypophyse qui présentent les mêmes augmentations musculaires d'ARNm de

l'IGF-1 dans un modèle de surcharge [52]. Plus récemment, Matheny *et al.* (2009) se sont intéressés à la régulation de l'axe GH/IGF-1 dans l'hypertrophie induite par un 16 d'entraînement en résistance sur le modèle de l'échelle d'escalade chez les souris LID. L'augmentation de la masse musculaire obtenue après 16 semaines d'entraînement en résistance sur le plantaris était identique entre les deux génotypes de souris et associés à une augmentation musculaire de l'ARNm de l'IGF-1. Ainsi, l'hypertrophie musculaire induite d'exercice n'est pas liée à la libération d'IGF1 hépatique dans le sang mais est en partie due à une action autocrine/paracrine de l'IGF-1 produite par le muscle lui-même à la suite de l'exercice. L'augmentation de la production d'IGF-1 musculaire locale est le résultat d'une augmentation de la transcription du variant IGF-1Eb chez le rat et IGF-1Ec chez l'homme du gène de l'IGF1. Ce variant est appelé mechano-growth factor (MGF) puisque sa production est sensible à la contraction du muscle alors que le variant IGF-1Ea, forme exprimée à la fois dans le foie et les muscles, est moins régulé au niveau du muscle à la suite d'un exercice en résistance [47, 54, 55]. Les protocoles d'exercice en résistance sont relativement différents entre les études et peuvent expliquer les différences obtenues sur la production d'IGF-1 musculaire. Bien qu'aucun consensus ne soit établi, il apparaît que des contractions réalisées en excentriques soient à l'origine d'une production plus importante d'IGF-1 [54-56]. Par ailleurs, la régulation transcriptionnelle de l'IGF-1 a été retrouvée augmentée dès 2h30 après un exercice de résistance [47] et peut perdurer jusqu'à 4 jours [55]. Sachant que l'action hypertrophique de l'IGF-1 s'opère via les voies PI3K/Akt/mTOR et PI3K/Akt/GSK3 β [57], on comprend ainsi que l'entraînement en résistance puisse induire une hypertrophie musculaire par activation de la voie PI3k/Akt via le facteur IGF-1.

3. IGF-1 et MAPKs

Par ailleurs, la stimulation de la synthèse protéique par l'exercice via l'IGF-1 implique une voie Akt indépendante : la voie des MAPKs. Chez les mammifères, quatre MAPKs ont été décrites : extracellular signal-regulated kinases 1 et 2 (ERK1 et -2), the Jun-N-terminal kinases (JNK1, -2, and -3), la p38 (α , β , γ , et δ) et extracellular signal-regulated kinases 5 (ERK5) [58]. ERK1/2 est activée chez le rat après un exercice d'endurance [59] ou de résistance [24], après des contractions in-situ [60-62] ou encore dans un modèle de surcharge [63] mais également chez l'homme après un exercice d'endurance [64-66], de résistance [67-70] ou excentrique [71]. L'activation de la voie de signalisation ERK1/2 ne semble pas liée au phénotype musculaire [72] ni même au type d'exercice (endurance vs résistance). En effet, que ce soient ERK1/2, p38 ou JNK, ces trois MAPKs sont activées à la suite d'un exercice [71, 73, 74] mais ERK1/2 apparaît davantage régulée après un exercice de résistance plutôt que d'endurance [75]. La régulation de ERK1/2 après un exercice de résistance pourrait participer au phénomène hypertrophique. En effet,

l'inhibition de ERK1/2 bloque l'hypertrophie induite par une infusion musculaire d'IGF-1 [76] ainsi que l'augmentation de la synthèse protéique après un exercice de résistance [77]. De plus, ERK1/2 est responsable de l'activation de mTOR par inhibition de TSC2 pour stimuler la synthèse protéique [77, 78]. Même si les mécanismes restent à éclaircir, l'exercice de résistance peut induire une hypertrophie de manière Akt indépendante via l'IGF-1 et l'activation de la protéine ERK1/2.

4. Myostatine et régulation négative de la masse musculaire

Depuis une dizaine d'année, un consensus est établi sur le rôle de la protéine myostatine (Mstn) dans la régulation de la masse musculaire. L'inhibition de son activité par administration d'inhibiteurs ou par délétion du gène chez des souris (*mstn*^{-/-}) s'accompagne toujours d'une augmentation importante de la taille des fibres [79-83]. Son action s'effectuerait en partie directement sur les fibres musculaires au niveau de l'inhibition de la synthèse protéique en induisant une atrophie des fibres [83-85]. En effet, de nombreuses études ont montré que la synthèse protéique est sensible à la myostatine. *In vivo*, l'augmentation de la synthèse protéique a été rapportée chez des rats en période néo-natale recevant une dose chronique d'un inhibiteur de la myostatine, la follistatine [86], chez des souris *mstn*^{-/-} ainsi que chez des souris adultes traitées avec des anticorps anti-myostatine [87, 88]. Différentes études *In vivo* ou *in vitro* ont pu également mettre en évidence un dialogue entre la myostatine et la voie signalétique Akt/mTOR.[83, 85, 89-91]. Par ailleurs, des travaux indiquent que l'inhibition *in vitro* des protéines cibles directes de la myostatine Smad2 et 3 favorise l'hypertrophie musculaire via la protéine mTOR [89]. Ces résultats suggèrent que les voies de signalisation de la myostatine et Akt peuvent se croiser à différents niveaux comme les protéines Smad et mTOR dans la stimulation de la synthèse protéique. Aucune étude n'a encore montrée très clairement l'implication de la myostatine dans l'hypertrophie induite d'exercice mais en revanche son expression génique et protéique sont diminuées dès une heure post exercice de résistance chez l'homme [92-95] et 24 heures après des stimulations électriques chez le rat [55]. L'exercice de résistance induit donc une inhibition de la myostatine au niveau transcriptionnel et traductionnel [95] qui pourrait concourir au phénomène hypertrophique en activant la synthèse protéique de la fibre musculaire et/ou la prolifération des cellules satellites, point développé ultérieurement.

En résumé :

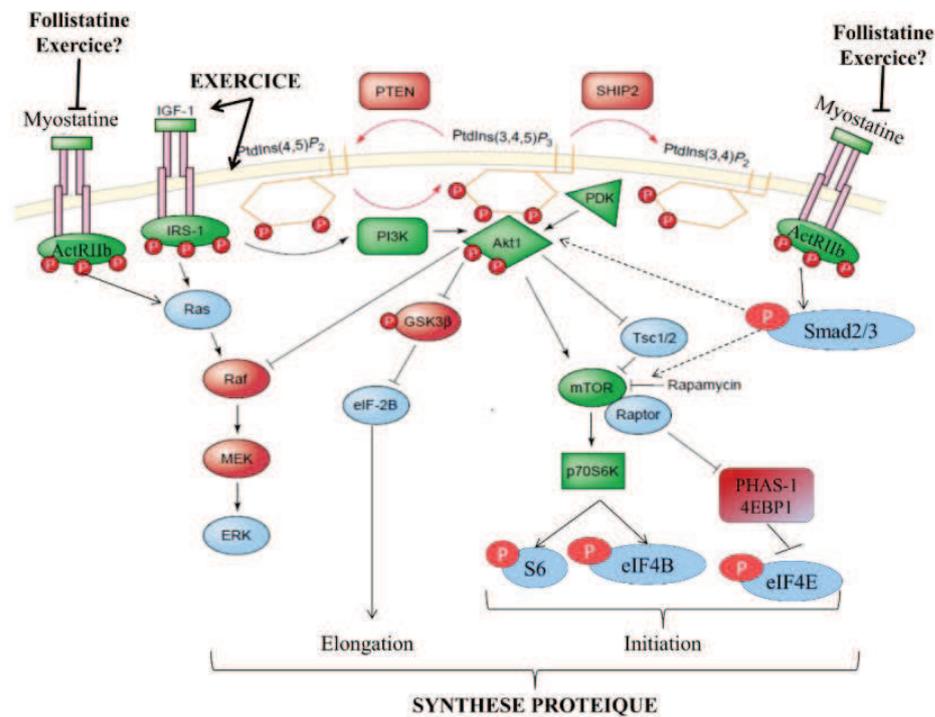


Figure 3 : Voies de signalisation de la synthèse protéique induite par l'exercice

5. Régulation de la traduction par les microARNs

Les micro ARNs (miARNs) sont de petits ARNs non-codants (19-22 nucléotides) jouant un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de certains gènes. Ces miARNs peuvent cliver ou inhiber la traduction d'ARNs cibles, influençant directement le contenu en protéine de la cellule. Plusieurs gènes peuvent être la cible d'un seul miARN [96]. Les miARNs peuvent être ubiquitaires ou tissu-spécifique ainsi miR-1, -133a,-133, -206, -499 sont muscles spécifiques. Peu de données existent sur les mécanismes d'actions et les gènes cibles de ces miARNs dans le muscle (myomiR) mais de plus en plus de scientifiques s'y intéressent notamment parce qu'ils participeraient à la croissance du muscle ainsi qu'à sa régénération [97]. De ce fait, les miARNs présentent une nouvelle voie dans le traitement de certaines pathologies mais pourraient également expliquer les adaptations musculaires induites d'exercice. Par exemple, ces myomiARNs sont modulés suite à une surcharge fonctionnelle [98] par l'exercice d'endurance chez l'homme [99] et chez la souris [100] mais également par l'exercice de résistance [101]. L'étude McCarthy&Esser (2007) [98] montre l'implication des myomiARNs dans l'hypertrophie induite par la surcharge fonctionnelle. Après 7 jours de surcharge fonctionnelle, le muscle plantaris présente une augmentation de 45% de sa masse associée à une diminution de l'expression de miR-1 et -133a et une

augmentation de miR-206. Par ailleurs, les auteurs suggèrent l'implication de miR-206 dans la mise en place du phénotype lent celui-ci étant plus exprimé dans le muscle soléaire (SOL) que dans le plantaris. Dans cette perspective, ils ont pu mettre en évidence un lien entre l'expression des MHC de type I et miR-499 et -208, suggérant l'existence d'une famille de myomiARNs modulant le phénotype contractile [102, 103]. Suite à un exercice en résistance, l'expression de miR-1 peut être diminuée alors que celle de miR-133a ne semble pas être modifiée [104]. Récemment, Davidsen *et al.* (2011) [101] ont permis une avancée dans la compréhension des différences interindividuelles dans les adaptations musculaires après un entraînement. Après 12 semaines d'un entraînement en résistance, les sujets ont été classés en deux groupes sur la base de l'hypertrophie obtenue au niveau des muscles sollicités : « bons répondeurs » et « moins répondeurs ». Parmi les 21 myomiARNs analysés (les plus exprimés au sein du tissu musculaire), l'expression de 15 myomiARNs n'a pas été modifiée par l'entraînement (miR-1 ; miR-133a ; miR-206...). Cette différence de résultat avec les études de McCarthy&Esser (2007) [98] et Drummond *et al.* (2008) [104] peut s'expliquer par une activation de ces myomiARNs uniquement dans la phase initiale de surcharge. En revanche, l'expression de miR-378, -29 et 26a sont réduites chez les « mauvais répondeurs » mais inchangés chez les « bons répondeurs » alors que l'expression de miR-451 est augmentée seulement chez les « moins répondeurs ». Par ailleurs, l'expression de miR-378 est très bien corrélée au gain de masse musculaire ($R=0,71$; $p=0.01$) alors que miR-126 tend à être positivement corrélé à la quantité de MHC de type I ($R=0,46$; $p=0.06$). Cette étude met clairement en évidence la contribution des micros ARNs dans le remodelage musculaire induit par l'exercice en résistance et est la première à montrer le potentiel important de la génomique dans l'explication des réponses interindividuelles à l'exercice. Par ailleurs, de telles avancées pourraient être utilisées en médecine dans le cadre de prédiction individuelle ou dans la prescription des traitements sur la base d'une cartographie de l'expression de micros ARNs d'intérêt. Enfin, le rôle biologique des myomiARNs à la suite d'un exercice ainsi que leurs gènes cibles restent largement à explorer tout comme les mécanismes de régulation de leur transcription. Ils ouvrent des perspectives intéressantes dans l'explication de la régulation des protéines musculaires à la suite d'un exercice.

ii. Régulation de la protéolyse

L'augmentation de la masse musculaire est en partie en lien étroit avec le maintien d'une balance protéique positive c'est-à-dire avec une synthèse protéique supérieure à une protéolyse. La dégradation des protéines musculaires est un processus physiologique qui permet d'une part la plasticité du muscle en dégradant des protéines non-fonctionnelles ou peu adaptées à la demande contractile et d'autre part en éliminant les protéines vieillissantes. Les phénomènes de synthèse prendront ensuite le relais pour remplacer les protéines dégradées. Ces phénomènes se déroulant en même temps, le terme de « turnover protéique » est employé pour désigner la vitesse de

renouvellement des protéines. Alors qu'en période postprandiale (jusqu'à 3-4 heures après un repas) la balance protéique est augmentée chez le sujet jeune et sain, le sujet âgé présente une altération de cette balance puisque la synthèse protéique est moins stimulée et la protéolyse peu inhibée [105]. Progressivement, cette diminution du turnover protéique conduit à une perte de masse musculaire avec l'avancée en âge et au phénomène de sarcopénie. L'importance du rôle joué par la protéolyse se retrouve également dans certaines pathologies notamment dans les cancers souvent associés à des cachexies (30-80%)[106]. Ces cachexies sont définies comme un syndrome associant entre autres anorexie, inflammation, insulino-résistance ainsi qu'une augmentation majeure des phénomènes cataboliques [107, 108]. La régulation des systèmes de dégradation des protéines est donc un élément critique dans le maintien de la masse musculaire et particulièrement dans les phénomènes atrophiques. Même si l'exercice de résistance est considéré comme un puissant stimulus anabolique, il induit également une augmentation de la dégradation protéique. De ce fait, la régulation de cette protéolyse induite d'exercice peut être un élément déterminant dans l'hypertrophie induite par un entraînement en résistance. Plusieurs systèmes protéolytiques dont le système autophagique-lysosomal, le système ubiquitine-proteasome, les calpaines et certaines protéases sont responsables de la dégradation des protéines dans le muscle. Selon les situations (exercice, pathologie, vieillissement, jeûne...), leur implication et leur régulation peut être différente [105, 109]. En effet, il apparaît que le système ubiquitine-proteasome (UPS) soit le principal système impliqué dans la protéolyse de la sarcopénie du sujet âgé [110] ainsi que dans celle des cachexies cancéreuses [107, 111]. Enfin, très peu de données existent sur l'implication des différents systèmes protéolytiques dans la protéolyse induite d'exercice. Ce dernier point fera l'objet d'étude de la deuxième partie de cette thèse. Les mécanismes d'action et les voies signalétiques de régulation des systèmes protéolytiques seront également développés dans l'état de la littérature spécifique à cette deuxième partie.

c. Régulation du nombre de noyaux

Le potentiel de synthèse protéique d'une fibre musculaire est intimement lié à son nombre de noyaux. En effet, l'augmentation du nombre de noyaux permet une capacité de transcription potentiellement plus importante qui aboutit *in fine* à augmenter la capacité de synthèse des protéines. *In vivo*, les fibres musculaires multinuclées sont à un état permanent de différenciation (sorties du cycle cellulaire) et donc incapables d'une activité post-mitotique (i.e division cellulaire) [112]. Ainsi, en complément de cellules non-myogéniques (fibroblastes, cellules immunitaires...), les myofibres sont accompagnées de cellules souches quiescentes : les cellules satellites (SCs). Activées, ces cellules peuvent fusionner avec les fibres musculaires existantes et concourir à l'apport de noyaux donc de matériel génétique. Différents stimuli concourent à l'activation des cellules satellites via l'activation de voies de signalisation impliquant entre autres PI3K/Akt/mTOR.

i. Les cellules satellites et les MRFs

Les cellules satellites sont des précurseurs myogéniques situées entre le sarcolemme et la lame basale de la fibre musculaire [113]. Quiescentes à l'âge adulte, elles sont responsables de la croissance post-natale [23, 114], jouent également un rôle critique dans le processus de régénération musculaire à la suite d'une lésion [115, 116] ou encore peuvent être activées à la suite d'un exercice [15, 117, 118]. Les cellules satellites activées s'engagent dans une étape de prolifération au cours de laquelle elles se multiplient augmentant ainsi leur nombre ou pool. Ces cellules satellites activées (i.e engagées dans le programme myogénique) devenues myoblastes vont se différencier puis fusionner en myotubes avec les fibres musculaires préexistantes conduisant à l'incorporation de nouveaux noyaux. Toutes les cellules satellites ne se différencient pas, certaines quittent le cycle cellulaire après l'étape de prolifération pour retourner dans leur état quiescent, conduisant in fine à l'augmentation de leur pool [119, 120] (Figure 3). Les étapes du cycle des cellules satellites sont contrôlées par l'expression de facteurs de transcription tels que paired box transcription factor (Pax) et les myogenic regulatory factors (MRFs) MyoD, Myf5, Myogénine et MRF4, séquentiellement activés ou réprimés. Le rôle de ces différents facteurs de transcription dans le cycle cellulaire a été découvert il y a une dizaine d'année mais n'est actuellement pas totalement élucidé. En effet, les cellules satellites quiescentes ou en prolifération expriment le facteur Pax7. Pax7 joue un rôle dans la prolifération des myoblastes mais retarde également leur différenciation en régulant l'expression du facteur MyoD [119, 121]. Au contraire, les facteurs MyoD et Myf5 sont exprimés par des myoblastes indifférenciés en phase proliférative et leur expression détermine l'engagement des cellules dans la différenciation. L'expression de MyoD détermine un potentiel de différenciation de telle façon que la délétion du gène MyoD (souris MyoD $-/-$) augmente, en phase proliférative, la proportion de cellules satellites retournant à l'état de quiescence [122, 123]. Myf5 participerait plutôt à réguler le taux de prolifération puisque la délétion du gène (souris Myf5 $-/-$) conduit à une diminution de l'amplification du nombre de myoblastes [124]. Enfin, le facteur myogénine serait essentiel dans la phase précoce de différenciation alors que MRF4 participe davantage dans la dernière phase de maturation [125-127]. Plus récemment, une dynamique du cycle cellulaire apparaît à travers l'expression et/ou la coexpression successive de Pax7 et des MRFs, indicateur de l'état fonctionnel des cellules satellites in vitro et In vivo [119, 128, 129]. Les cellules à l'état de quiescence expriment uniquement Pax7 (Pax7⁺) mais lorsqu'elles s'engagent en phase proliférative, elles coexpriment Pax7, MyoD et Myf5 (Pax7⁺/MyoD⁺ ou Pax7⁺/Myf5⁺). Zammit et al. (2004) [119], Yoshida et al. (1998) [122] suggèrent qu'une partie des cellules Pax7⁺/Myf5⁺ ou Pax7⁺/MyoD⁺ ont la capacité de retourner à l'état de quiescence alors que la diminution de l'expression de Pax7 est déterminante pour l'engagement de ces cellules dans la phase de différenciation (Pax7⁻/MyoD⁺) [121]. A cette étape, les cellules peuvent soit

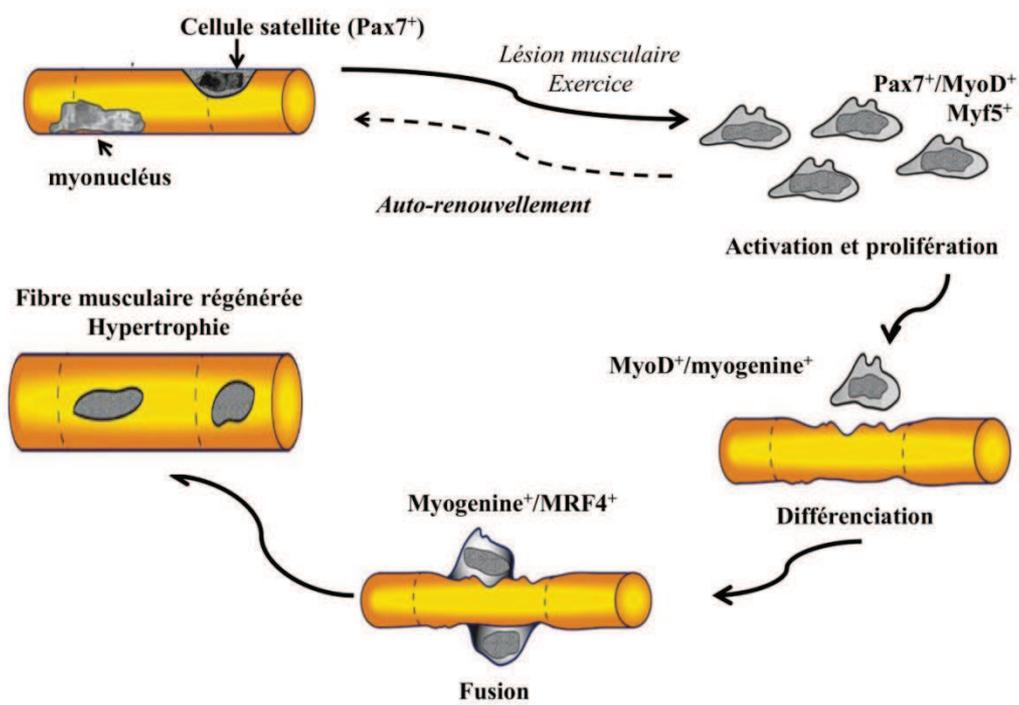


Figure 4. Réponse des cellules satellites à la suite d'un traumatisme musculaire.
Modifié d'après Hawke&Garry, 2001

exprimer Pax7⁺/MyoD et contribuer à l'augmentation du pool des cellules quiescentes, soit exprimer Pax7⁻/MyoD⁺ et s'engager dans la phase de différenciation. Dans cette dernière phase, les cellules deviennent MyoD⁺/myogénine⁺ (Figure 4). Si le profil d'expression de ces facteurs de transcription ne diffère pas entre les phénotypes musculaires suggérant que les mécanismes de régulation du nombre de noyaux sont identiques entre les muscles, une différence existe sur le nombre de cellules satellites. Ainsi, Schultz et al. (2006) [129] montrent que les muscles oxydatifs possèdent un nombre plus importants de cellules satellites que les muscles glycolytiques. Il semble aussi que MyoD soit davantage exprimé dans les muscles rapides alors que myogénine soit plus exprimée dans les muscles lents [130, 131]. L'activation et la répression successives de ces facteurs de transcription sont régulés par des stimuli extracellulaires [128] tels que la protéine myostatine, des facteurs de croissance (IGF1, Fibroblast Growth Factor), certaines cytokines (IL-6, IL-4...) impliquant des voies de signalisation différentes.

ii. Implication des cellules satellites dans l'hypertrophie induite d'exercice

La participation des cellules satellites dans l'hypertrophie induite par un entraînement en résistance est attestée par de nombreuses études à travers les mesures de l'activité de ces cellules mais aussi de l'incorporation de nouveaux noyaux (myonuclei) au sein de la fibre, chez l'animal ou chez l'homme. Il est couramment rapporté qu'après plusieurs semaines d'un programme d'entraînement en résistance induisant une hypertrophie musculaire de plus de 25%, le nombre de noyaux par fibre musculaire soit augmenté [15, 18, 132, 133] indiquant la participation des cellules satellites. En revanche, certaines études n'ont pas rapporté d'augmentation du nombre de myonuclei à la suite d'un entraînement de résistance [118] résultant d'une hypertrophie inférieure à 20%. L'ensemble de ces résultats suggère que jusqu'à une certaine limite, l'augmentation de la surface de section des fibres peut être obtenue sans l'ajout de nouveaux noyaux et par le seul effet d'une activation de la synthèse protéique. L'existence d'une relation entre le nombre de myonuclei et la taille de la fibre a donné naissance au concept de domaine myonucléaire représentant la quantité de cytoplasme sous la charge d'un seul noyau. Les travaux de Charifi *et al.* (2003) [117] et de Petrella *et al.* (2008) [15] chez l'homme ont permis de proposer une valeur critique de 2000 μm^2 de l'aire myonucléaire, au moins dans le vaste latéral du quadriceps, au-delà de laquelle la fibre ne peut s'hypertrophier à moins d'ajouter de nouveaux noyaux. En plus de l'activation des cellules satellites, un entraînement de résistance d'au moins 8 semaines peut conduire à l'augmentation de leur pool, adaptation qui persiste jusqu'à 3 mois à compter du désentraînement [18, 118, 133]. D'un point de vue méthodologique, l'activation des cellules satellites est obtenue à partir de l'analyse des marqueurs myogéniques notamment à travers l'expression des facteurs MyoD et myogénine mais aussi des marqueurs plus globaux du cycle cellulaire non spécifiques des cellules myogéniques tels que c-Myc, CyclinD1 contrôlant l'étape de prolifération ou p21 impliquée dans la différenciation. Après un exercice de

résistance, l'expression génique de ces marqueurs est rapidement régulée dès 6-12 heures jusqu'à 3 jours post-exercice aussi bien chez le rat [134, 135] que chez l'homme [12, 136]. L'expression génique de myogénine est retrouvée systématiquement augmentée alors que l'augmentation de l'expression de MyoD est plus discrète [136-138] voire nulle [139] ou avec une tendance à la diminution [12, 135] entre 6-12 heures post-exercice. L'augmentation de l'expression génique de myogénine est très bien corrélée avec son expression protéique [135] ainsi qu'avec l'augmentation de l'expression génique de p21 [12, 136]. Ces résultats vont dans le sens d'une activation de la différenciation des myoblastes immédiatement après l'exercice de résistance. Par ailleurs, Drummond *et al.* (2010) [135] ont mesuré une expression génique de MyoD augmentée à 6 et 12 heures post-exercice alors que l'expression protéique diminue pour retrouver un niveau basal 48 heures post-exercice. Il semble donc que la régulation traductionnelle de MyoD soit plus tardive que myogénine suggérant qu'à la suite d'un exercice aigu, les myoblastes se différencient, fusionnent et peuvent participer ensuite à la réparation des fibres lésées ; aucune hypertrophie ne pouvant être obtenue après un seul exercice. On peut également émettre l'hypothèse qu'une augmentation de l'expression protéique de MyoD puisse être retardée dans le temps (plus de 48 heures) et de façon plus probable si l'exercice est répété lors d'un programme d'entraînement qui induit une hypertrophie importante. Le seul pool de réserve de SCs ne peut plus être suffisant, la prolifération de celles-ci est alors indispensable. En effet, l'étude de McKay *et al.* (2009) [140] rapporte une augmentation du nombre de cellules satellites Pax7⁺ dès 24 heures et jusqu'à 72 heures post-exercice. La moitié de ces cellules est en état de prolifération alors que les autres sont quiescentes. Ce nombre de cellules Pax7⁺ en prolifération est augmenté dès 4 heures post-exercice, l'activation de la prolifération précède donc l'augmentation du pool de cellules satellites retrouvées à partir de 24 heures. Les résultats de cette étude suggèrent donc que l'augmentation de la prolifération à la suite d'un exercice aigu concourt de manière préférentielle à l'augmentation du pool de cellules satellites donc à la perte de l'expression du facteur MyoD. L'expression génique de MyoD n'est donc pas ou peu modifiée 6 à 48 heures après l'exercice puisqu'une partie des myoblastes en prolifération semble participer au renouvellement du pool de SCs (attestée par l'augmentation de Pax7) alors que l'autre partie des myoblastes entre rapidement en différenciation (attestée par l'expression génique de myogénine rapidement augmentée).

Bien qu'il soit difficile de définir précisément l'étape du cycle cellulaire dans lequel sont engagées les cellules satellites, ces dernières sont activées à la suite d'un exercice aigu de résistance. Plus largement, un exercice aigu de résistance active la prolifération et la différenciation des cellules, stimulus qui lorsqu'il est répété (entraînement) permet d'obtenir une hypertrophie musculaire [141].

iii. Voies de signalisation impliquées dans l'activation des cellules satellites à la suite d'un exercice

Les voies canoniques Notch et Wnt sont importantes dans la régulation de la myogénèse post-natale mais également dans l'activation des cellules satellites à la suite de traumatismes musculaires [142, 143]. Notch bloque l'expression et l'activité du facteur myogénique MyoD ce qui inhibe la différenciation des cellules [144, 145]. A l'inverse, la voie Wnt induit la différenciation puis la fusion en modulant l'expression des MRFs. Des études suggèrent que l'activité de Notch prédomine pendant la phase proliférative puis qu'une transition s'opère vers une activation de la voie Wnt pour induire la différenciation et la fusion des myoblastes [146]. Dans un modèle de surcharge, Armstrong&Esser (2005) [147] ont montré l'activation de la voie Wnt impliquant la formation du complexe β -catenin-Lef-1 et l'activation de facteurs de prolifération cibles c-Myc et CyclinD1 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. La voie Wnt pourrait donc être un bon candidat dans la médiation des effets hypertrophiques de l'exercice, cependant peu d'études s'y sont intéressées. Immédiatement après un exercice d'endurance de 60min chez le rat, le marqueur β -caténine de la voie Wnt est activé en partie via l'inhibition de GSK3 β et en lien avec la déplétion glycogénique [148]. L'étude de Leal *et al.* (2011) [149] suggère l'implication de cette voie après 8 semaines d'un exercice de résistance hypertrophiant, à travers une augmentation de la protéine β -caténine et de l'expression des gènes cibles de cette voie (LEF-1, CyclinD1). Ces données suggèrent des perspectives d'études intéressantes dans l'activation de la voie Wnt après un exercice de résistance et son rôle dans la régulation de la masse musculaire par les cellules satellites [149].

L'effet hypertrophique de l'IGF-1 sur le muscle s'exerce à la fois sur la stimulation de la synthèse protéique mais implique également les cellules satellites [150, 151]. L'IGF-1 et plus spécifiquement MGF stimule la prolifération et la différenciation des cellules myogéniques via PI3K/Akt/mTOR mais également ERK1/2 [60, 152]. L'étude de Coolican *et al.* (1997) [152] montre *in vitro* que la voie ERK1/2 est indispensable pour l'étape de prolifération alors que la voie PI3K joue davantage un rôle dans l'étape de différenciation. ERK1/2 est alors responsable de l'activation de facteurs de transcription régulateurs du cycle cellulaire (c-Myc) ou encore des proto-oncogènes c-jun et c-fos impliquée dans la prolifération des cellules, l'apoptose et la réparation de l'ADN [153, 154]. Le rôle spécifique de la voie ERK1/2 après un exercice reste encore à éclaircir mais de nombreux résultats suggèrent qu'en parallèle de sa participation à la synthèse protéique, la voie de signalisation de ERK1/2 est impliquée dans prolifération ainsi que dans les dernières étapes de la différenciation des cellules [155-157].

Si le rôle de la myostatine comme régulateur négatif de la masse musculaire est clairement admis, des débats existent sur ses différentes cibles cellulaires et particulièrement l'effet de son inhibition sur l'activation des cellules satellites. Plusieurs études rapportent son implication dans la prolifération et la différenciation des myoblastes et des cellules satellites en culture. Ces résultats en relation avec le

phénotype hypermusclé des souris *mstn*^{-/-} suggèrent un rôle de la myostatine dans la maintenance des cellules satellites à l'état de quiescence [158-160]. Cependant, les résultats de Amthor *et al.* (2009) [161] et plus récemment ceux de Lee *et al.* (2012) [162] remettent en question l'implication des cellules satellites dans l'hypertrophie induite par une inhibition de la myostatine. En effet, l'inhibition de la myostatine chez des souris dont l'activité des cellules satellites est déficiente (*Sdc4*^{-/-} et *Pax7*^{-/-}) induit toujours une hypertrophie musculaire sans fusion des cellules satellites aux fibres musculaires préexistantes. Les auteurs émettent l'hypothèse que la myostatine puisse agir directement sur les myofibres induisant une signalisation secondaire pour l'inhibition des cellules satellites ou encore en rendant la fibre musculaire moins permissive à la fusion de ces cellules [162]. Comme évoqué précédemment, la myostatine est diminuée après un exercice de résistance mais aucune étude n'a relié l'inhibition de la myostatine post-exercice à l'hypertrophie induite par un entraînement.

Certaines cytokines telles que IL-4 et IL-6 peuvent être sécrétées par le muscle et moduler la prolifération et la différenciation des cellules satellites [128]. Les facteurs de transcription et les gènes cibles de ces cytokines dans des modèles d'hypertrophie sont peu connus. Parmi les facteurs de transcription, *serum response factor* (SRF) serait responsable des productions d'IL-6 et IL-4 par le muscle [163, 164] et de leur action paracrine sur la prolifération et la fusion des cellules satellites [165, 166]. L'action de l'IL-6 sur les cellules satellites peut également impliquer la voie JAKs/STAT3 [165, 167]. Ces dernières données sont intéressantes puisque l'IL-6 peut être produite localement par le muscle à la suite d'une contraction [168, 169] et que le facteur de transcription STAT3 est également activé à la suite d'un exercice en résistance [170, 171]. Les voies SRF/IL-6, SRF/IL-4 ou encore IL-6/STAT3 ouvrent des perspectives dans l'étude des mécanismes d'implication des cellules satellites à la suite d'un exercice de résistance.

La protéine Ca²⁺/calmoduline dépendante, calcineurine, peut également être un acteur dans la mise en place des mécanismes responsables d'une hypertrophie musculaire. En effet, des cultures *in vitro* de myoblastes ont démontré que la calcineurine participe à la différenciation des cellules satellites par l'activation de myogénine et MyoD [172-175] mais également par médiation des effets de l'IGF-1 via les facteurs de transcription *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) et GATA2 [176, 177]. *In vivo*, l'administration d'inhibiteurs de la calcineurine tels que la cyclosporineA (CsA) ou FK506, bloquent l'hypertrophie induite par une surcharge fonctionnelle dans les différents types de fibres [178, 179] mais aussi la croissance des fibres musculaires en récupération d'atrophie [180, 181]. Cependant, *In vivo*, son implication dans l'hypertrophie musculaire par des inhibiteurs spécifiques reste très controversée [182, 183] probablement en raison de doses de CsA employées trop faibles. De plus, la surexpression ou la sous-expression du gène de la calcineurine chez des souris ne montrent aucune altération de la croissance du muscle, du nombre et de la taille des fibres [182, 184]. Talmadge *et al.* (2004) [185] ont cependant montré une hypertrophie du soléaire mais pas des muscles rapides dans un modèle de souris transgénique ayant une calcineurine suractivée. Ces études semblent indiquer une

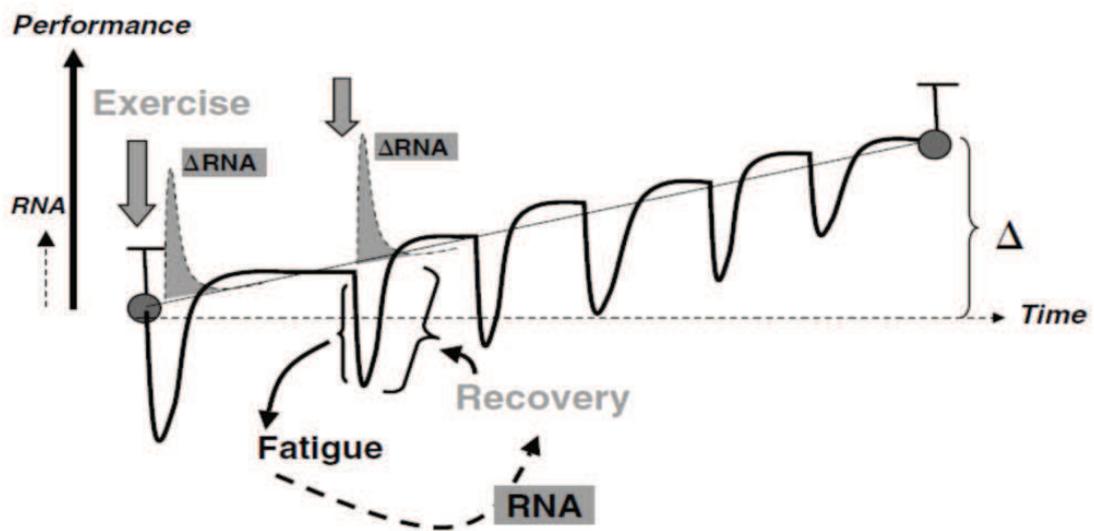


Figure 5. Micro-adaptations de la régulation transcriptionnelle avec un entraînement. *D'après Fluck 2006*

implication de la calcineurine lorsque les cellules satellites contribuent au phénomène d'hypertrophie (surcharge fonctionnelle) mais également une influence de la calcineurine sur la masse musculaire selon l'activité contractile du muscle. L'implication de la calcineurine à la suite d'un exercice corrobore ces hypothèses. Celle-ci est davantage activée à la suite d'un exercice d'endurance plutôt qu'un exercice de résistance en raison d'une concentration intracellulaire en calcium plus importante [186-188]. Seuls Lamas *et al.* (2010) [189] ont montré une augmentation de l'activité de la calcineurine mais pas de sa transcription après 8 semaines d'un entraînement de résistance sans pour autant le relier à l'hypertrophie musculaire obtenue. De façon intéressante, la production d'IL-6 musculaire est en partie dépendante de l'activation de la calcineurine mais après un exercice d'endurance chez le rat [186], de plus discuté précédemment, l'IL-6 peut également contribuer aux phénomènes d'hypertrophie musculaire [165]. L'hypothèse d'un rôle de l'IL-6 dans la médiation des effets hypertrophiques de la calcineurine via l'activation de la différenciation des cellules satellites peut être envisagée mais son activation après un exercice de résistance reste peu évidente.

En résumé, si de nombreuses voies de signalisation ont été caractérisées dans l'activation des cellules satellites dans l'hypertrophie musculaire, ces données ont été obtenues dans des modèles non-physiologiques (modèles de souris *knockout* (KO), de surcharge par ablation des muscles synergiques, modèle pharmacologique). L'implication des cellules satellites dans l'hypertrophie induite d'exercice est très clairement admise [15, 118] et même si le rôle de la voie de l'IGF-1 a été bien décrite dans ses adaptations, d'autres voies de signalisation impliquées restent largement à élucider. Ainsi, les voies des MAPKs, de la myostatine et plus récemment des Wnts et de l'IL-6 sont actuellement des perspectives d'étude après un exercice de résistance.

d. Vision intégrée des mécanismes conduisant à l'hypertrophie induite par un entraînement en résistance

Une hypertrophie musculaire significative est obtenue après un minimum de 4 semaines d'entraînement et de 3 séances par semaine. Selon les protocoles d'entraînement et leur durée, l'hypertrophie est plus ou moins importante et résulte donc d'une accumulation de signaux cellulaires induits par chaque session d'exercice aigu [141]. Les mécanismes pouvant être impliqués dans cette hypertrophie ont été successivement détaillés mais leur implication ne suit pas ce schéma très linéaire. Selon le modèle proposé par Fluck (2006) [141], chaque session d'entraînement (exercice aigu) induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle pendant la période de récupération pouvant conduire à la traduction de protéines spécifiques (*Figure 5*). Si l'on considère l'entraînement en résistance, il peut s'agir de l'augmentation des ARNms des chaînes lourdes de myosine de type IIa/IIx, des facteurs myogéniques (MyoD, myogénine), des facteurs IGF-1, IL-6...L'accumulation progressive de ces transcrits à la suite de chaque session peut conduire à leur traduction en protéine objectivable par une

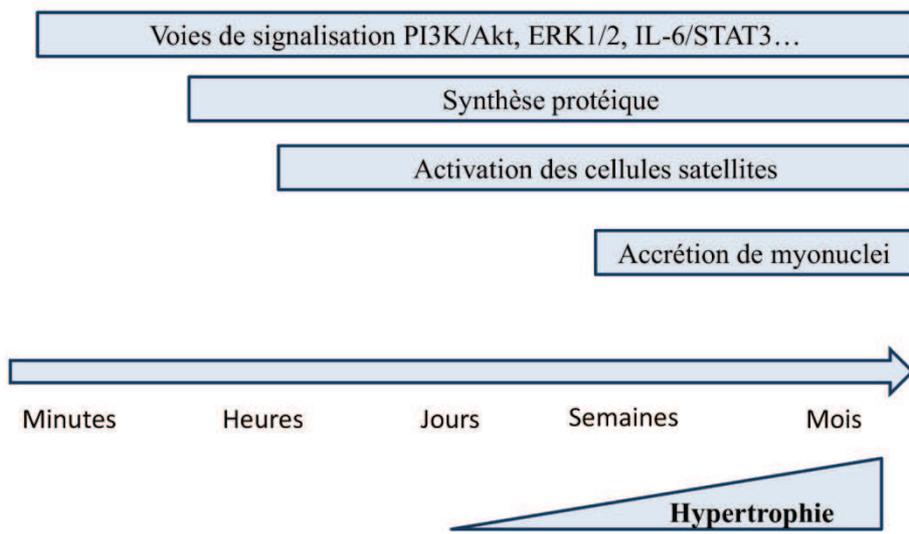


Figure 6. Mécanismes impliqués dans l'hypertrophie induite par un exercice de résistance. *Modifié d'après Freyssenet 2005*

augmentation de l'expression protéique. Même si la quantité d'ARN peut augmenter après chaque exercice aigu, la régulation de certains gènes est diminuée, conduisant progressivement à la diminution de leurs transcrits et donc la diminution de l'expression de ces protéines. Ces adaptations transcriptionnelles expliquent les changements phénotypiques et structuraux obtenus après des semaines.

Dans le cadre d'un exercice de résistance, l'augmentation de l'expression de protéines spécifiques telles que l'IGF-1, IL-6 ou la diminution d'autres telles que myostatine, notch...vont induire des cascades de transduction et par phosphorylation successive conduire à une activation de la synthèse protéique via entre autres les protéines PI3K/Akt/mTOR ou encore ERK1/2. Si dans un 1^{er} temps, de tels signaux induisent seulement une activation ou une désactivation de ces protéines par phosphorylation ou déphosphorylation ; la stimulation répétée de ces voies participera dans un second temps à l'augmentation du contenu de la forme totale de ces protéines conduisant à l'augmentation du contenu en protéines musculaires. L'augmentation du contenu en protéines totales est suffisante pour induire une augmentation de la taille de la fibre musculaire d'au moins 25% qui se traduit par une augmentation du domaine myonucléaire précédemment défini. Si le stimulus de l'exercice perdure, le processus d'hypertrophie de la fibre ne peut se poursuivre que par l'ajout de nouveaux myonuclei émanant des SCs. Le domaine myonucléaire retrouve alors des valeurs basales. L'incorporation de ces myonuclei concourt à l'apport de matériel génétique et donc permet de maintenir une réponse transcriptionnelle supérieure (*Figure 6*).

Durant des années, les scientifiques ont pensé que le phénomène hypertrophique pouvait connaître une limitation notamment chez des athlètes très entraînés en musculation (bodybuilder) en raison d'un épuisement du pool de cellules satellites. Des données récentes ont pu mettre en évidence la propriété d'auto-renouvellement des cellules satellites, un épuisement du pool de ces cellules est donc potentiellement évitable. De plus, il est apparu que l'entraînement en résistance active ce processus de renouvellement, ce qui concourt à une augmentation du pool de ces cellules après des semaines d'entraînement. Il reste à savoir s'il existe une limite au phénomène hypertrophique et jusqu'à quelle mesure l'auto-renouvellement de ces cellules y participe.

III- INTERLEUKINE-6 ET EXERCICE MUSCULAIRE

a. Cytokines et exercice

Les cytokines sont de petites protéines impliquées dans la communication entre le système neuroendocrinien et le système immunitaire. L'exercice induit des changements considérables du système immunitaire qui ont conduit à étudier le rôle des cytokines dans les modifications immunitaires à la suite d'une contraction musculaire. Ces recherches ont permis de découvrir qu'une quantité importante de cytokines est augmentée après l'exercice notamment lorsque ce dernier est long et intense [190, 191]. Chez un sujet sain au repos, les cytokines sont absentes ou en faible quantité

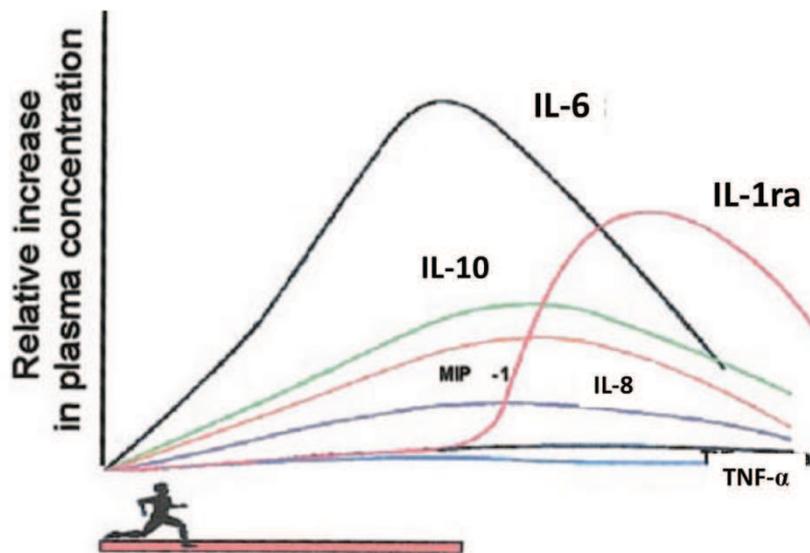


Figure 7. Evolution des concentrations plasmatiques de plusieurs cytokines en réponse à un exercice. *D'après Febbraio et Pedersen 2002*

dans le plasma mais l'IL-6, le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), l'interleukine-10 (IL-10), l'*interleukin-1 receptor antagonist* (IL-1ra) ou l'interleukine-8 (IL-8) peuvent apparaître au cours ou au décours d'un exercice (*Figure 7*). Parmi ces cytokines, l'IL-6 présente le pic plasmatique le plus important mais aussi le plus précoce contrairement au TNF- α qui est rarement augmenté sauf après un marathon [167]. Le pic plasmatique d'IL-6 apparaît immédiatement à l'arrêt de l'exercice puis diminue rapidement pour retrouver des concentrations basales. L'amplitude du pic plasmatique dépend du type d'exercice. L'IL-6 est considéré comme une cytokine inflammatoire, sa sécrétion a tout d'abord été reliée aux dommages musculaires induit par un exercice excentrique [192, 193]. Cependant, en comparaison aux exercices concentriques, le pic plasmatique d'IL-6 n'est pas plus important mais est retardé et diminue plus lentement à la suite d'un exercice excentrique. Ces données suggèrent que les lésions musculaires ne sont pas responsables de la production d'IL-6 mais au contraire, cette production semble sensible à l'intensité de l'exercice plutôt que le mode d'exercice. Les exercices de longues durées présentent les pics plasmatiques d'IL-6 les plus importants probablement en lien avec la déplétion glycoligénique du muscle [167]. En effet, l'ingestion de glucose au cours de l'exercice diminue le pic plasmatique d'IL-6 [194,195] alors que cette réponse est davantage augmentée lorsque les réserves en glycoènes musculaires sont faibles [168]. Un des rôles biologique de L'IL-6 a donc été identifié : cette cytokine pourrait être une molécule signal des réserves énergétiques et particulièrement de la disponibilité en glycoène. L'IL-6 joue en effet un rôle endocrine dans la production hépatique du glucose [196] mais posséderait également des effets sur le métabolisme des lipides en favorisant la lipolyse [197, 198] et donc la mise à disposition de substrats énergétiques pour le muscle en contraction.

b. IL-6 : une myokine

L'hypothèse que les cellules immunitaires soient responsables de la production d'IL-6 après un exercice a été remis en cause puisque la quantité d'ARNm codant l'IL-6 n'est pas augmentée dans les monocytes à la suite d'un exercice [199, 200]. Il est maintenant très clair que la principale source de l'IL-6 circulante après un exercice est le muscle lui-même. En effet, les ARNm de l'IL-6 sont augmentés dans les muscles actifs immédiatement après un exercice d'endurance chez l'homme et le rat [168, 186, 201], un exercice de résistance chez l'homme [140, 171] ou un protocole d'électrostimulation chez le rat [202]. Par ailleurs, la mesure de la différence artério-veineuse de la concentration d'IL-6 du muscle actif confirme qu'une partie de la libération d'IL-6 plasmatique émane principalement du muscle et en moindre mesure de facteurs systémiques liés à l'exercice [201, 203]. Bien que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes [204] peuvent dans certaines conditions produire de l'IL-6 ; le myocyte apparaît comme la principale source de production de l'IL-6 systémique après un exercice [169, 205].

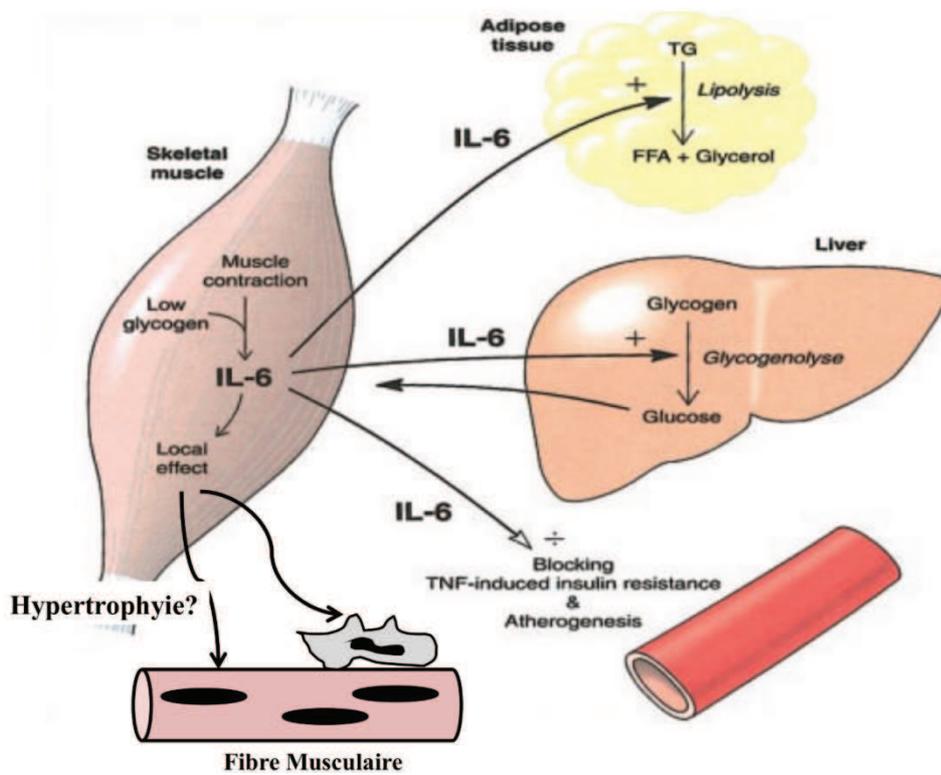


Figure 8. Rôles biologiques de l'interleukine-6 (IL-6) pendant et au décours d'un exercice physique. Modifié d'après Febbraio & Pedersen 2002

Les études portant sur la production d'IL-6 en lien avec un exercice de résistance sont très récentes ainsi le contrôle de la transcription du gène de l'IL-6 a été uniquement étudié à la suite d'un exercice d'endurance. La stimulation de la transcription de l'IL-6 serait médiée par la p38 MAPK, activée par la déplétion glycolytique induite par l'exercice d'endurance [206]. Ce type d'exercice engendre également des concentrations élevées en calcium responsables de l'activité augmentée de la calcineurine et du facteur de transcription cible NFAT. Cette dernière explique en partie la transcription de l'IL-6 [207] dont les effets seraient en partie dépendants de la p38 MAPK [186]. Le contrôle de la transcription du gène de l'IL-6 à la suite d'un exercice d'endurance implique donc pour une part un dialogue entre la voie Ca^{2+} /NFAT et la voie p38 MAPK-glycolytique dépendante. (*Figure 8*) Cependant, il n'existe pas encore de données sur le contrôle transcriptionnel de l'IL-6 après un exercice de résistance. Ce type d'exercice induisant des mouvements rapides et amples de Ca^{2+} et n'étant pas associée à des déplétions glycolytiques sévères, le contrôle transcriptionnel doit être différent de celui d'un exercice d'endurance. Ainsi, la voie de la calcineurine ne semble pas être une perspective d'étude intéressante. Quant à la p38 MAPK, l'hypothèse qu'elle soit impliquée est envisageable si l'on considère qu'elle puisse être activée par d'autre stimulus que la déplétion glycolytique et/ou induire des facteurs de transcription différents. Le promoteur du gène de l'IL-6 a été décrit par Dendorfer *et al.* (1994) [208] qui ont mis en évidence des sites de fixation pour les facteurs de transcription tels que *glucocorticoid receptor* (GR) ; AP-1, capable de fixer le complexe c-fos/c-jun ; la famille des GATA protéines ; NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) ; CREB, senseur de l'AMPc ; la famille des Ets (Ets1, Elk-1...)... Par ailleurs, certaines études ont mesuré des expressions géniques augmentées pour c-fos [170, 171], les MAPKs [75] dont les facteurs de transcription CREB, c-fos/c-jun, Elk-1 sont les cibles [74]. L'ensemble de ces données suggère que la stimulation génique de l'IL-6 à la suite d'un exercice de résistance pourrait être induite par la voie des MAPKs et leur facteur de transcription cible c-fos/c-jun, CREB mais également la voie impliquant le facteur de transcription SRF évoqué précédemment.

En résumé, l'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire induite dans des réponses immunitaires mais également définie comme une « myokine » car produite par le muscle lui-même à la suite d'une contraction musculaire. L'IL-6 est impliquée dans la mise à disposition des substrats énergétiques lors d'un exercice d'endurance mais pourrait jouer un rôle dans des modèles d'hypertrophie musculaire (*Figure 8*).

c. Signalisation musculaire de l'IL-6 dans les phénomènes hypertrophiques

i. Rôle de la voie IL-6/STAT3 dans l'hypertrophie musculaire

La voie signalétique de l'IL-6 est ainsi envisagée comme une voie supplémentaire pouvant contribuer à l'intégration des signaux des phénomènes hypertrophiques par activation des cellules satellites dans certaines conditions. En effet, Serrano *et al.* (2008) [165] ont montré sur un modèle de souris IL-6^{-/-}, ayant subi une surcharge compensatoire, une absence d'hypertrophie du plantaris de ces souris contrairement aux souris sauvages qui après cette même surcharge présentaient une hypertrophie musculaire ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'IL-6. Cette implication dans l'hypertrophie musculaire se ferait de manière paracrine en agissant sur les cellules satellites. Dans ce modèle, l'action sur les étapes de prolifération et de migration des myoblastes de l'IL-6 interviendrait par la voie des JAKs via la phosphorylation de STAT3 [165]. Par ailleurs, Trenerry *et al.* (2007) [170] ont montré pour la première fois, une augmentation de la phosphorylation de STAT3 ainsi qu'une translocation nucléaire de cette protéine dans les 2 heures qui ont suivi un exercice d'extension du genou. Par la suite, McKay *et al.* (2009) [140] ont pu confirmer l'activation de la voie IL-6/STAT3 à la suite d'un exercice traumatisant ainsi que Trenerry *et al.* (2011) [171] 3 heures après un exercice de résistance. La voie IL-6/STAT3 est donc activée très rapidement à la suite d'un exercice de résistance mais aucune étude n'a encore montrée son implication dans l'hypertrophie induite par un entraînement en résistance. Cependant, l'étude de Serrano *et al.* (2008) [165] ainsi que des études *in vitro* établissent clairement un rôle de la protéine STAT3 et plus précisément de la voie JAK/STAT3 dans la prolifération et la différenciation des myoblastes [209, 210]. Ces données permettent d'émettre l'hypothèse de l'existence d'un lien entre l'activation de la voie IL-6/STAT3 à la suite d'un exercice en résistance et l'implication des cellules satellites dans l'hypertrophie musculaire après des semaines d'entraînement. L'étude de Toth *et al.* (2011) [211] est une avancée en faveur de cette hypothèse puisque la voie IL-6/STAT3 serait exclusivement activée dans les cellules satellites pour induire la prolifération de celles-ci dès une heure après un exercice traumatisant. L'activation précoce des cellules satellites pourrait être juste le marqueur de leur participation au phénomène de régénération musculaire, l'exercice étant associé à une augmentation de la créatine kinase ainsi que de l'infiltration de macrophages et neutrophiles 48 heures post-exercice [140, 211]. Ainsi, l'implication de l'IL-6 dans l'hypertrophie musculaire induite par un entraînement de résistance doit encore être précisée ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires en lien avec la voie JAK/STAT3 et l'implication des cellules satellites.

ii. Voie JAK/STAT3

L'IL-6 partage son récepteur membranaire gp130 avec d'autres cytokines telles que *leukemia inhibitory factor* (LIF), *ciliary neurotrophic factor*

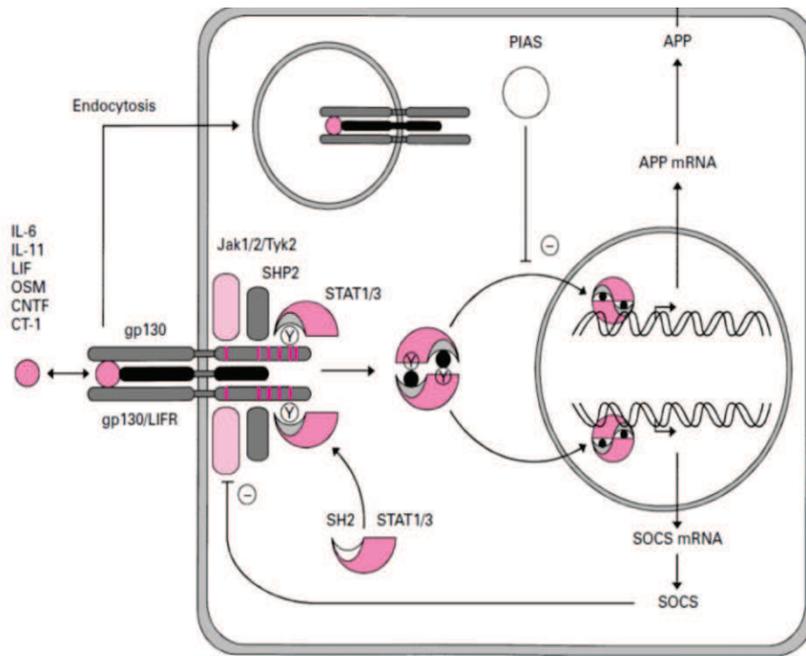


Figure 9. Voie signalétique de l'inhibition des cytokines de la famille de l'IL-6. D'après Heinrich 1998. Plusieurs signaux dont la dégradation du récepteur gp130 par endocytose, la famille des SOCS ou d'autres protéines telle que PIAS, peuvent conduire à la régulation négative des cytokines apparentées à l'IL-6

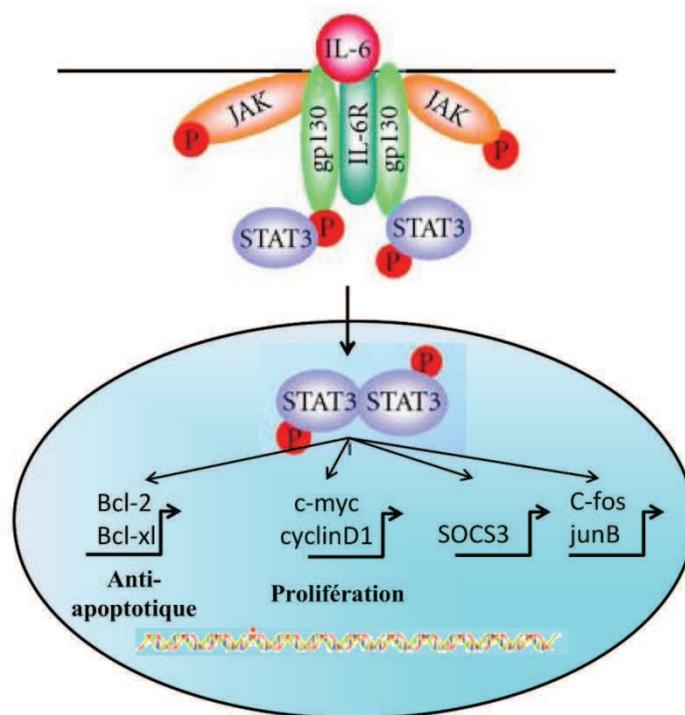


Figure 10. Voie de signalisation de l'IL-6/STAT3

(CNTF), *oncostatin M* (OSM), IL-11 et la cardiotrophin-1, l'ensemble constituant ainsi la famille des cytokines de l'IL-6. La signalisation induite suite à l'activation du récepteur gp130 implique les protéines JAKs et les facteurs de transcription de la famille des STATs [212, 213]. L'activation de JAK1/2 par l'IL-6 induit la phosphorylation de STAT1/3 donc son activation qui permet son homo ou hétéro-dimérisation et la translocation nucléaire de STAT3 [165, 209, 214, 215] (*Figure 9*). La protéine STAT3 phosphorylée (pSTAT3) est responsable de la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans diverses fonctions biologiques incluant la prolifération, la différenciation et la survie des myoblastes [216]. Ces réponses sont médiées par

l'expression des régulateurs du cycle cellulaire c-Myc et CyclinD1 [165, 217, 218], des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x1 (B cell-lymphoma) [219], des gènes c-fos et junB [220, 221], le facteur VEGF [222] et enfin le *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) [223, 224] (*Figure 10*)

In vitro, la voie de signalisation JAK2/STAT2/STAT3 est requise pour la différenciation myogénique [210]. STAT3 semble pouvoir interagir avec MyoD et ainsi le complexe STAT3-MyoD serait responsable de la stimulation de la différenciation des myoblastes [225]. Au contraire, l'activation de la voie de signalisation JAK1/STAT1/STAT3 serait responsable de la prolifération des myoblastes et inhiberait la différenciation précoce de ceux-ci par un phénomène d'inhibition de la transcription de MyoD [209] (*Figure 11*)

Les données *in vivo* sur les mécanismes moléculaires impliquées dans l'activation de STAT3 sont peu abondantes. Ainsi, si Serrano *et al.* (2008) [165] ont bien mis en évidence que l'activation de la voie IL-6/STAT3 et des gènes cibles CyclinD1 et c-Myc sont nécessaires pour la prolifération des cellules satellites dans l'induction d'une hypertrophie musculaire. Dans un modèle de régénération musculaire chez le rat, STAT3 est activé dès 3 heures après la blessure dans les cellules satellites activées, les myoblastes en prolifération ainsi que les myofibres « survivantes ». Ces données relient celles retrouvées chez l'homme à la suite d'un exercice induisant des lésions musculaires pour lequel STAT3 est activée dès 1 heure presque exclusivement dans les cellules satellites en prolifération [211]. Ce rôle de STAT3 dans la prolifération des myoblastes est renforcé par l'expression augmentée de Myf5 (marqueur de la prolifération), l'absence de modification de l'expression de MRF4 (marqueur de la différenciation) et une augmentation des cellules positives pour c-Myc 24 heures après l'exercice. Par ailleurs, les auteurs n'ont pas retrouvé d'augmentation de la phosphorylation de JAK2, ce qui rejoint les résultats des études *in vitro* pour lesquelles la voie JAK2/STAT3 est principalement impliquée dans la différenciation des myoblastes. L'ensemble de ces résultats confirme *in vivo* l'implication de la voie IL-6/STAT3 et particulièrement le rôle important joué par la protéine STAT3 dans l'activation et la prolifération des cellules satellites. Cependant, rien n'est précisé concernant les mécanismes en amont de STAT3 et l'implication des protéines JAK1/2 et STAT1/2, ni même son implication dans l'hypertrophie induite par un entraînement de résistance de plusieurs semaines

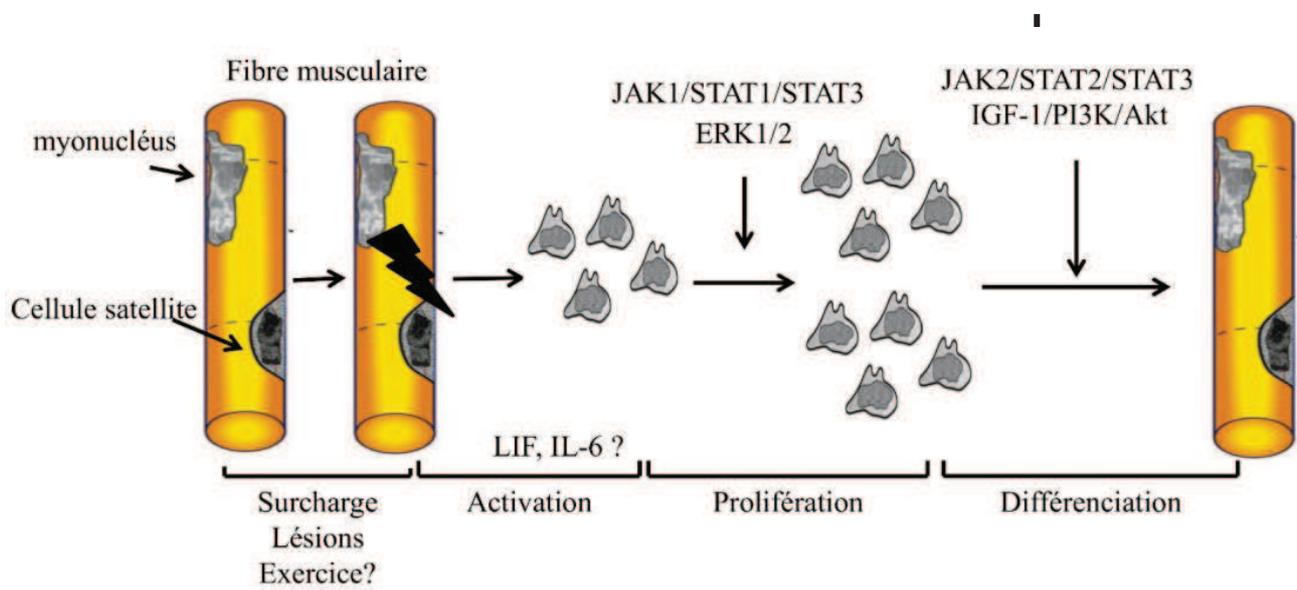


Figure 11. Modèle d'activation de la voie de signalisation JAK/STAT3 dans la prolifération et la différenciation des cellules satellites.

OBJECTIFS

Dans ce contexte, le travail de cette première partie de thèse (**Etude n°1**) s'intéresse à la participation de la voie de signalisation IL-6/JAK/STAT3 dans l'intégration des signaux conduisant à une hypertrophie musculaire après plusieurs semaines d'un entraînement de résistance. L'adaptation d'un modèle d'exercice en résistance chez le rat permettra de :

Obtenir (ou non) des changements phénotypiques et une hypertrophie musculaire identiques aux adaptations habituellement retrouvées chez l'homme après un entraînement de résistance de plusieurs semaines

Confirmer (ou non) l'implication de la protéine STAT3 après un exercice aigu de résistance et étudier son activation après un entraînement de plusieurs semaines

Déterminer la participation ou non de l'IL-6 et plus particulièrement de la voie de signalisation IL-6/STAT3 dans l'hypertrophie musculaire induite par l'entraînement

Identifier les événements moléculaires et cellulaires impliquant la voie JAK1, 2/STAT3 dans la prolifération et la différenciation des cellules satellites dans les adaptations aiguës et chroniques d'un exercice de résistance

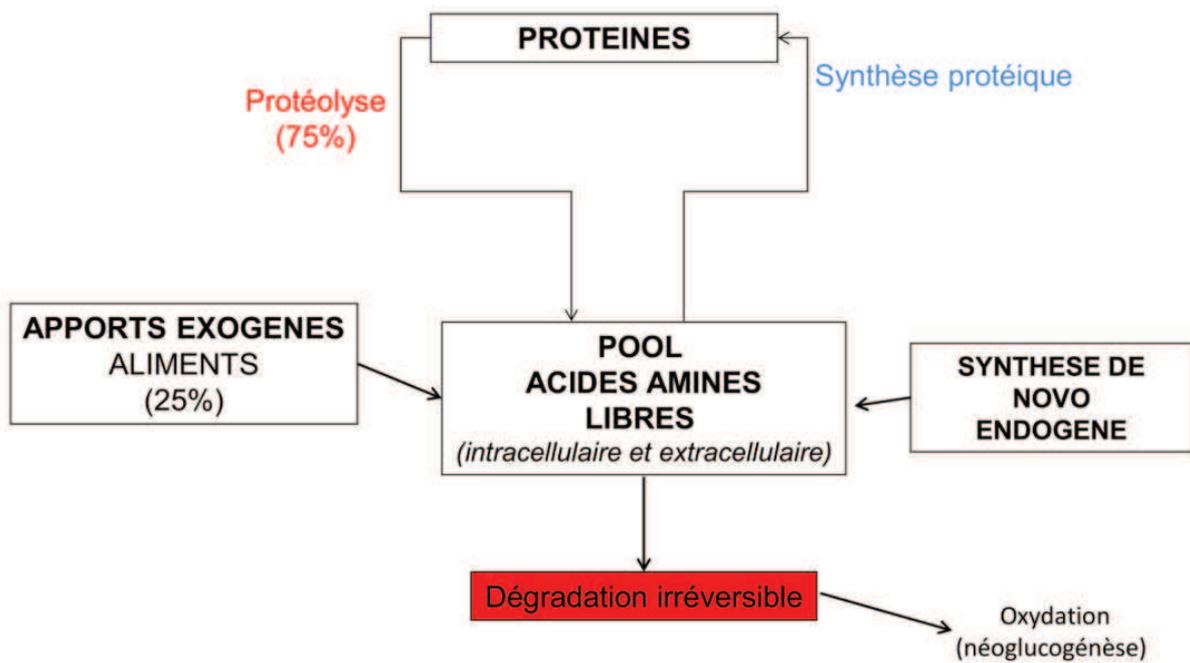


Figure 12. Turnover Protéique

**DEUXIEME PARTIE : ROLE DES DIFFERENTS SYTEMES PROTEOLYTIQUES
DANS LA BALANCE PROTEIQUE INDUITE PAR UN EXERCICE EN
RESISTANCE ET AU COURS D'UN TRAITEMENT AU CLENBUTEROL**

I- METABOLISME PROTEIQUE ET PROTEOLYSE MUSCULAIRE

S'intéresser à la balance protéique après un exercice s'inscrit dans une compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant aux phénomènes d'hypertrophie et/ou d'atrophie musculaire. En effet, la conservation de la masse musculaire est directement liée aux phénomènes de synthèse protéique évoquée dans la première partie mais également aux phénomènes de dégradation protéique. Or l'exercice peut être un puissant stimulus de la synthèse protéique, ce qui explique qu'il soit l'objet d'étude en tant qu'outil thérapeutique des atrophies musculaires. Cependant, l'exercice favorise également la dégradation protéique ce qui conduit à définir la notion de balance protéique qui englobe les variations entre ces deux phénomènes dans la compréhension de la conservation de la masse musculaire.

a. Notions de balance et turnover protéique

Les protéines étant un assemblage d'acides aminés, leur synthèse se fait à partir d'un pool (1% des acides aminés constituant l'organisme) divisé en un pool d'acides aminés libres extracellulaires ainsi qu'en un pool intracellulaire représentant 95% des acides aminés libres. Les phénomènes de synthèse et de dégradation se déroulant au sein de la cellule, les acides aminés libres extracellulaires pénètrent dans la cellule à l'aide de transporteurs. Afin d'être utilisés à l'étape de traduction dans la synthèse protéique, les acides aminés libres intracellulaires doivent être activés ou « chargés » par un ARN de transfert (ARNt). Parmi l'ensemble des 20 acides aminés, certains ne sont pas synthétisables par l'organisme et ne peuvent être fournis que par l'alimentation, ils sont au nombre de 8 et appelés acides aminés essentiels (AAE). Au sein des AAE, les acides aminés Isoleucine, Leucine et Valine sont distingués en acides aminés branchés (AAB) en lien avec leur configuration spatiale. L'absence ou la faible disponibilité en AAB peut perturber voire arrêter la synthèse protéique. On comprend alors toute l'importance d'un apport alimentaire protéique adéquat pour répondre à cette demande particulièrement exacerbée dans les pathologies associées à des pertes de masse musculaire. Par ailleurs, la protéolyse (ou dégradation protéique) libère des acides aminés dans le pool intracellulaire ainsi la synthèse protéique et protéolyse sont simultanés et participent au renouvellement protéique ou turnover (*Figure 12*). L'équilibre entre ces deux derniers phénomènes est donc responsable de la conservation de la masse musculaire. En considérant que le pool d'acides aminés libres ne varie pas, la différence entre les apports et les pertes protéiques appelée balance azotée correspond directement à la différence entre la synthèse et la dégradation protéique appelée

balance protéique. Ainsi, une synthèse protéique plus importante que la dégradation (balance protéique positive) résulte en un gain protéique net (accrétion protéique) improprement appelé anabolisme protéique. A contrario, une protéolyse supérieure à la synthèse (balance protéique négative) résultera en une diminution de la masse protéique appelée catabolisme protéique. Additionné à ces deux phénomènes, il existe une dégradation irréversible des acides aminés qui correspond à l'oxydation de ces derniers pour participer principalement à la fourniture d'énergie (néoglucogénèse). Dans ce cas les acides aminés dégradés sont totalement perdus pour le métabolisme protéique (*Figure 12*). Ainsi, la perte de ces acides aminés doit être compensée par un apport protéique alimentaire. De ce fait, le renouvellement des protéines musculaires représente environ 20 % du renouvellement protéique total et celui du foie environ 10 %. La masse hépatique étant très inférieure à la masse musculaire, ce taux n'est que de 10%, en revanche ses protéines sont renouvelées beaucoup plus rapidement. Enfin, les protéines de la peau et du tube digestif constituent les deux autres participants importants (environ 15 % chacun) du turnover protéique global.

b. Régulation de la protéolyse musculaire

Toute perte ou gain de masse musculaire est donc conditionné par des variations de la balance protéique, résultat de modifications au niveau de la synthèse protéique dont les mécanismes de régulation ont été évoqués dans la première partie mais également au niveau de l'activation des différents systèmes de dégradation, principalement : ubiquitine-protéasome (UPS), autophagique-lysosomal (LAS), les calpaines et les caspases. Contrairement à la synthèse protéique, les mécanismes d'activation de la protéolyse et plus particulièrement la compréhension de la part des différents systèmes protéolytiques dans la dégradation protéique musculaire restent largement à élucider. De nombreuses questions subsistent concernant le fonctionnement de chacun des systèmes et l'adressage des protéines conduisant in fine à leur dégradation par tel ou tel système. Des hypothèses ainsi que des premiers résultats de recherche suggèrent une spécificité des 4 systèmes quant aux protéines à dégrader mais également des interactions et/ou des activations séquentielles de chacun d'eux variant selon les stimuli (sarcopénie, cachexie, exercice, glucocorticoïdes, jeûne...). Les enjeux étant également une meilleure compréhension du fonctionnement séparé de chacun des 3 systèmes majeurs afin de déterminer leur rôle dans la dégradation protéique musculaire totale suite à différents stimuli. La compréhension de cette régulation complexe permettant d'envisager par la suite des stratégies pour contrecarrer leur activation exacerbée dans les situations de perte de masse musculaire.

i. Le système ubiquitine-protéasome

L'UPS est un composant majeur de la machinerie protéolytique des cellules eucaryotes particulièrement impliqué dans les phénomènes d'atrophie du muscle.[226, 227] Le fonctionnement de

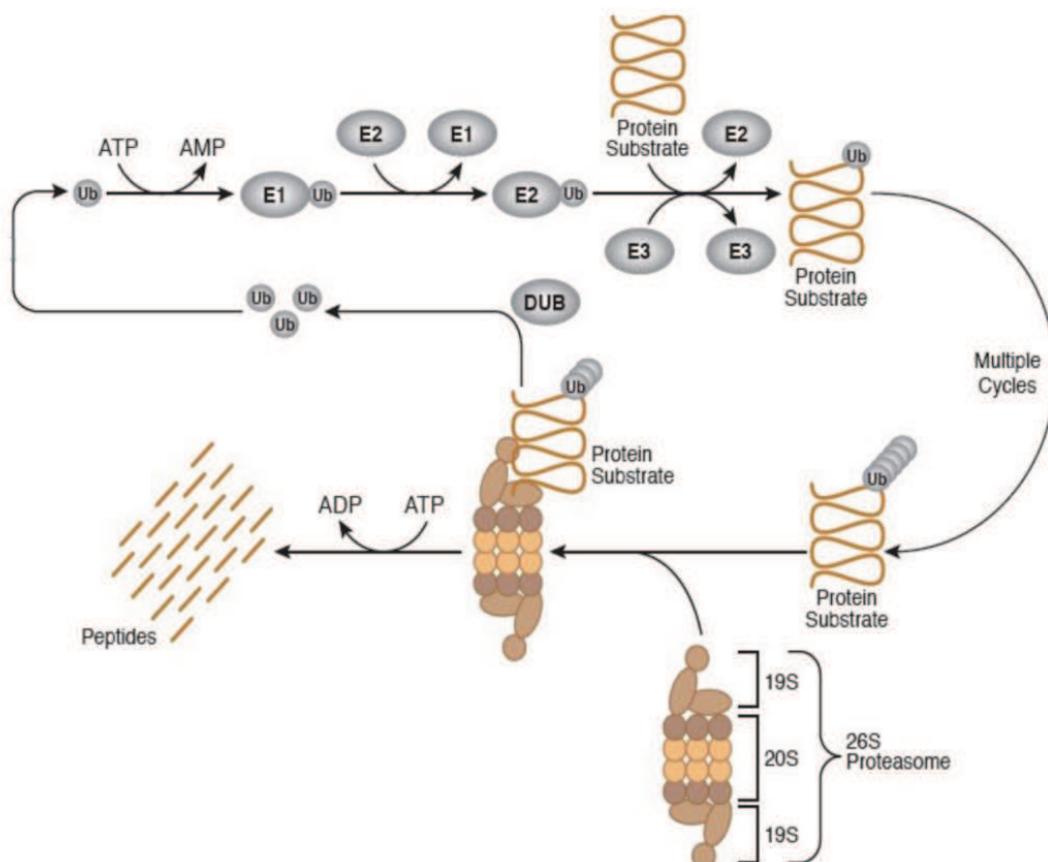


Figure 13. Le système Ubiquitine-Protéasome
www.cellsignaling.com

l'UPS est ATP-dépendant et responsable de la dégradation de protéines préalablement marquées par une ou plusieurs molécules d'ubiquitine (Ub). Ce processus d'ubiquitination est coordonné par trois types d'enzymes appelées des ligases (E1, E2 et E3), chargées *in fine* d'amener les protéines à dégrader vers le complexe protéasome 26S. Ce dernier est composé de deux sous-unités régulatrices ATP-dépendantes (19S) et d'une sous-unités catalytique ATP-indépendante (20S). Les protéines ubiquitinées sont alors reconnues et ingérées par la sous-unité 19S du protéasome 26S de manière ATP-dépendante pour être ensuite dégradées par la partie catalytique 20S de manière ATP-indépendante. (Figure 13). Cette dernière est divisée en une sous-unité α , support structural, et une sous-unité β responsable des activités trypsine-like ($\beta 1$), caspase-like ($\beta 2$) et chymotrypsine-like ($\beta 5$) [228].

Dans certaines situations d'atrophie, l'UPS serait impliqué dans la dégradation des myofibrilles après que celles-ci aient subies une dégradation partielle probablement par les calpaines [229] ou les caspases [230]. De nombreuses évidences dans des modèles animaux de situations cataboliques suggèrent l'implication de l'UPS à travers l'augmentation de la transcription de ligases, l'accumulation de protéines poly-ubiquitinées [226, 230] ainsi que l'inhibition de la protéolyse lorsque l'activité du protéasome est bloquée [231]. Depuis 2001, les E3 ligases musculaires MAFbx/atrogin-1 (*muscle atrophy F-box protein*) et MuRF-1 (*muscle ring finger protein 1*) sont caractérisées pour être largement impliquées dans de nombreux modèles d'atrophie tels que : septicémie [232, 233], diabète [234], dénervation [235], traitement aux glucocorticoïdes [236], mais également à la suite d'exercices excentriques [237, 238] ou de résistance [92, 239]. De plus, les modèles de souris KO MAFbx^{-/-} ou MuRF-1^{-/-} sont résistantes, respectivement 56% et 36%, à l'atrophie induite par la dénervation [235] suggérant que ces E3 ligases sont en partie responsables de la dégradation protéique UPS-dépendante dans les situations cataboliques [35]. En effet, MAFbx pourrait contrôler la synthèse protéique et la croissance musculaire en dégradant principalement le facteur d'initiation eIF3f, ou encore les facteurs myogéniques MyoD et myogénine [240-242]. MuRF-1 dégraderait principalement des protéines sarcomériques et contractiles (MHC-II, actine) ainsi que des protéines métaboliques comme la créatine kinase [236, 243, 244]. Ainsi au sein du muscle, MAFbx participe à la diminution de la synthèse protéique ainsi qu'à la diminution de la différenciation musculaire alors que MuRF-1 participe à la dégradation des protéines contractiles, l'ensemble de ces actions conduisant à l'atrophie du muscle. Récemment mis en évidence, la régulation transcriptionnelle de MAFbx et MuRF-1 serait médiée par la cytokine TNF- α via la p38 MAPK [232] ainsi que par la voie de signalisation NF- κ B [245], modulateur de la réponse immunitaire [246]. Par ailleurs, MAFbx et MuRF-1 semblent être régulées de façon indépendante par ces 2 voies de signalisation (TNF- α et NF- κ B). La transcription de ces ubiquitine-ligases serait également sous le contrôle des facteurs de transcription de la famille Foxo (*forkhead box protein O*) notamment Foxo 1 et 3 [234, 247, 248] dont l'activation est inhibée par Akt [35, 249, 250].

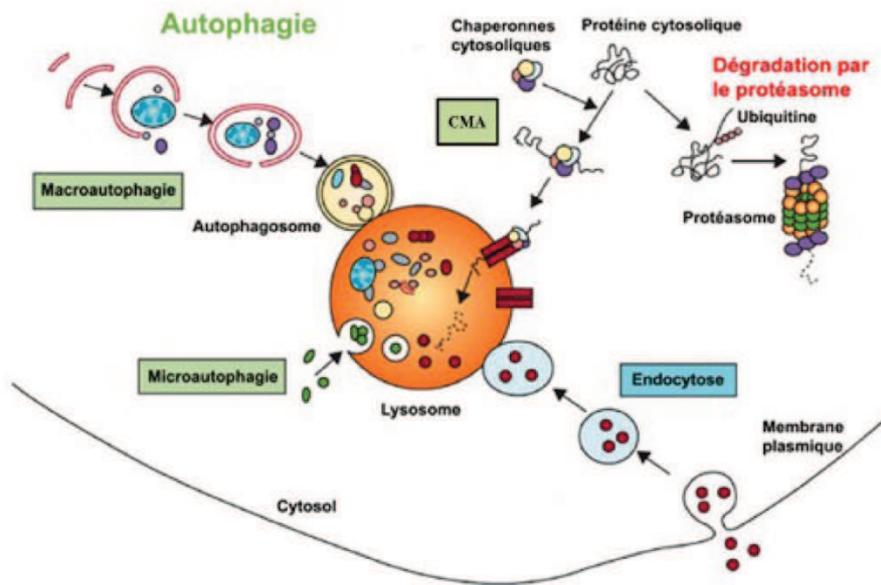


Figure 14. Le système autophagique-lysosomal

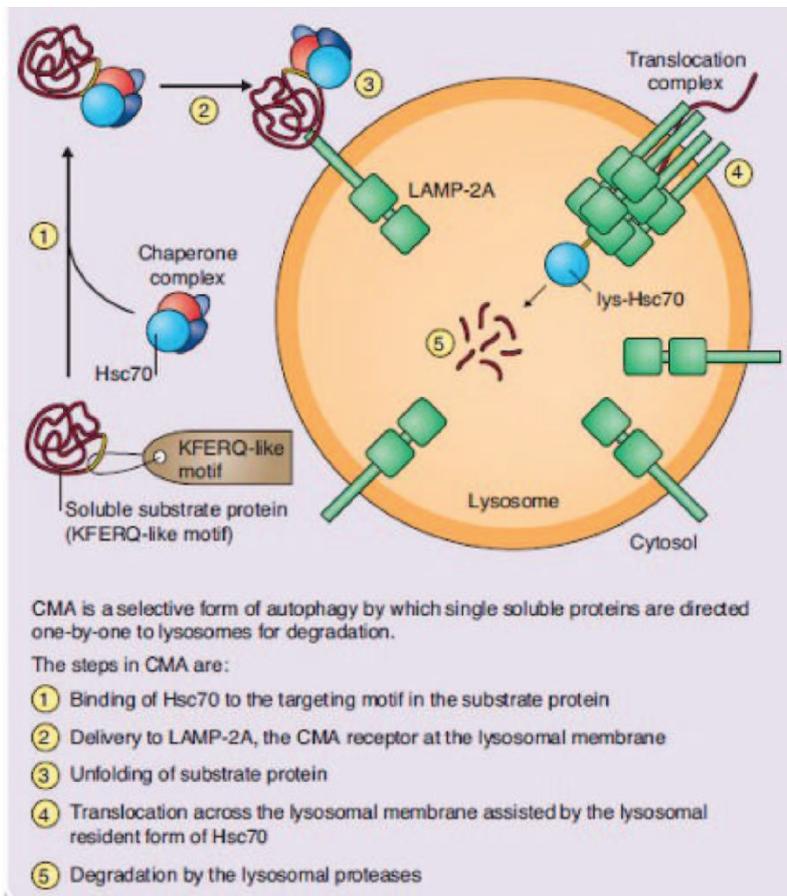


Figure 15. Mécanismes de dégradation protéique par les protéines chaperonnes (CMA) D'après Cuervo et al. 2011

ii. Le système autophagique-lysosomal (LAS)

Le lysosome est un système cellulaire en charge de dégrader des protéines cytosoliques, des agrégats protéiques, des pathogènes ainsi que des organelles tels que les mitochondries ou peroxisomes. Sa membrane en forme de vésicule, est composée de phospholipides et de glycoprotéines enzymatiques comme les pompes à proton responsables du pH acide des lysosomes (pH 4-5) et des protéines LAMP (*Lysosomes associated membrane protein*) uniquement présentes sur des lysosomes matures ainsi que des phosphatases acides présentes au niveau des lysosomes primaires. Ces vésicules lysosomales contiennent de nombreuses hydrolases (protéases, phosphatases, glycosidases...) qui fonctionnent à pH acide et jouent un rôle primordial dans la dégradation de différentes macromolécules [251]. Contrairement aux autres systèmes de dégradation (calpaines, UPS, caspases), les enzymes hydrolases sont séparées des autres constituants cytoplasmiques par la membrane du lysosome. Ainsi, les macromolécules à dégrader sont amenées jusqu'au lysosome principalement par endocytose, phagocytose ou autophagie (*Figure 14*).

1. L'autophagie

L'autophagie est un des systèmes majeur permettant la reconnaissance, la séquestration puis la délivrance 1) des protéines au lysosome pour leur dégradation par les hydrolases suite à un stress environnemental (jeûne, hypoxie...), 2) des organites cellulaires (endommagés, surnuméraires ou pathogènes). Classiquement, on distingue la microautophagie (peu présente dans le muscle squelettique), la macroautophagie et l'autophagie réalisée par des protéines chaperonnes (*Figure 14*). L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes (CMA) dégrade des protéines portant un motif KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) comme le facteur de transcription c-fos, l'inhibiteur de facteur transcriptionnel IκB ou encore des parties du protéasome [252]. Ce mécanisme possède donc une spécificité d'action et seules les protéines solubles sont dégradées excluant entre autre les mitochondries. Ce sont les protéines chaperonnes « heat-shock cognate » (hsc70 et hsc90) qui reconnaissent la séquence KFERQ pour amener les protéines à dégrader au niveau de la partie cytosolique de la protéine lysosomale membranaire LAMP2a. Le complexe protéique peut ensuite être internalisé dans le lysosome pour être dégradé [253] (*Figure 15*).

La dégradation protéique par la macroautophagie communément appelée « autophagie » est la seule voie pouvant dégrader massivement des macromolécules et des organites, lui conférant un rôle tout aussi important mais alternatif à l'UPS [254]. Ce processus est dynamique et relève de plusieurs étapes : **1)** Etape d'initiation avec la séquestration des protéines à dégrader dans une structure appelée pré-autophagosome ou phagophore ; **2)** Etape d'élongation du phagophore en autophagosome ; **3)** Etape de maturation puis fusion de l'autophagosome avec le lysosome pour former un autolysosome ;

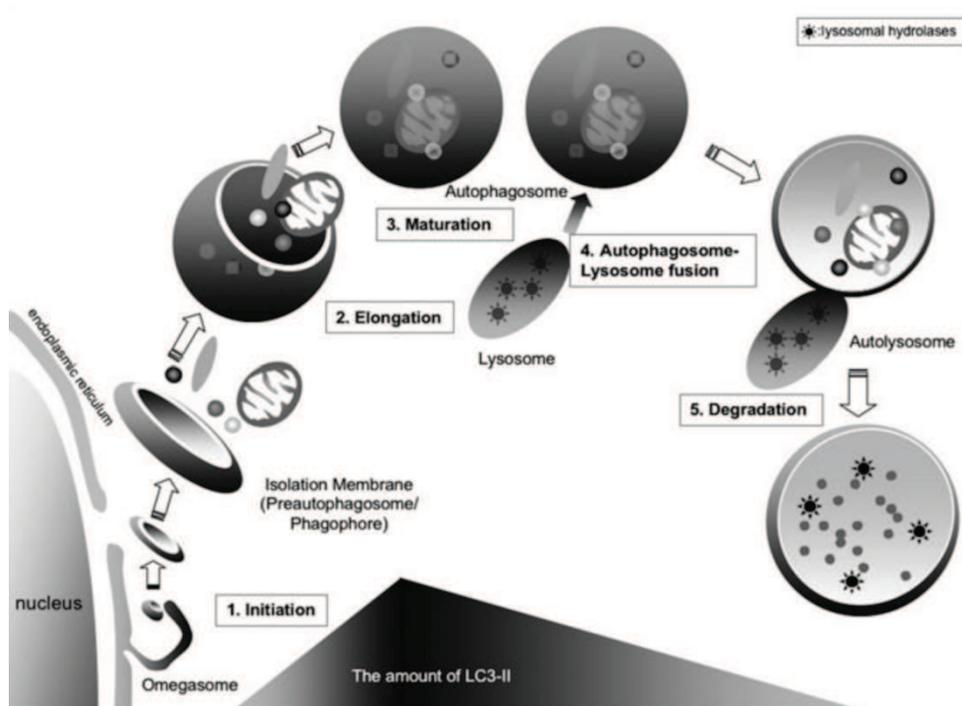


Figure 16. Modèle schématique de l'autophagie. *D'après Tanida et al., 2011*

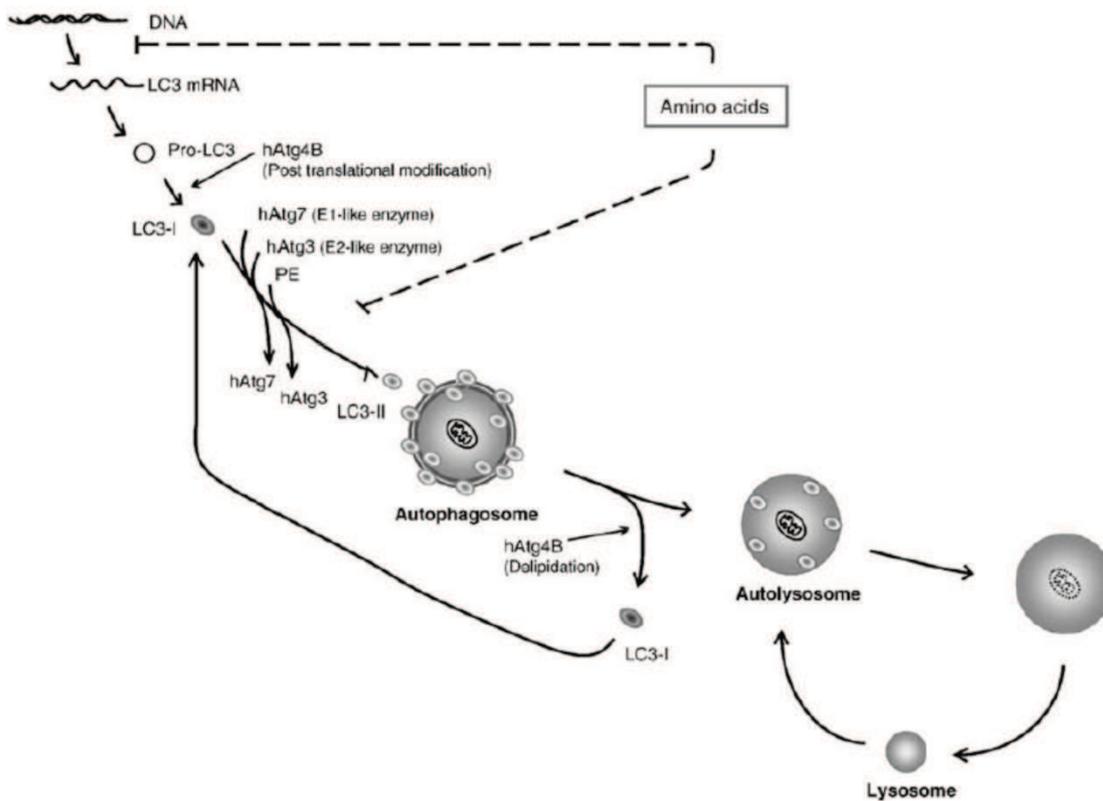


Figure 17. Recyclage ou Turnover de la protéine LC3. *D'après Kadowaki et al., 2006*

4) Etape de dégradation des composants séquestrés dans l'autolysosome [255] (*Figure 16*). La formation des vacuoles d'autophagosomes peut être très rapide dans des conditions cataboliques mais au contraire leur demi-vie est drastiquement diminuée en situation anabolique. La macroautophagie est en effet un processus très impliquée dans la dégradation protéique en réponse à une privation en nutriments [256-259]. Les acteurs majeurs dans ce processus dynamique sont des protéines Atg (Autophagy related Genes) identifiées au nombre de 30 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* dont environ la moitié est conservée chez les mammifères [260, 261]. L'activité de la protéine kinase de classe 3 (PI3K), Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), semble indispensable pour la formation du phagophore et s'intègre dans un complexe formé entre autres par les Atgs : Beclin-1 (Atg6), Ulk1 (Atg1), Atg5, Atg12 et FIP200 [262, 263]. Le complexe Atg12-Atg5 semble permettre ensuite le recrutement de la protéine LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) ou Atg8 pour la formation de l'autophagosome [264, 265]. LC3 est conjugué à la phosphatidyléthanolamine (PE) et s'incorpore dans la membrane du phagophore après lipidation. En effet, la lipidation de LC3 qui se traduit par un clivage de LC3-I (LC3 cytosolique) en LC3-II (Atg8-PE) par Atg7 sert de marqueur dans la formation de l'autophagosome [266, 267]. LC3-II permet alors l'élongation et la formation de l'autophagosome mature et n'est donc présent qu'au niveau de sa membrane. Par ailleurs, LC3-II serait indispensable pour l'étape de fusion [268, 269]. Après formation de l'autolysosome, LC3-II est délipidé et recyclé en LC3-I au sein du lysosome [256] (*Figure 17*).

2. Le système lysosomal

L'activité protéolytique du lysosome est alors très dépendante du système autophagie mais également des phénomènes d'endocytose ou phagocytose des vésicules lysosomales (hétérophagie) qui concourent à l'apport des éléments à dégrader au sein des lysosomes. Les protéases cathepsines L, B, D et H, ubiquitaires, semblent jouer un rôle majeur dans la dégradation lysosomale [251, 270]. Leur activité est en lien étroit avec le pH du lysosome ainsi la cathepsine D n'est active qu'à pH 6 alors que la cathepsine B reste active à pH 7. L'interaction entre les cathepsines et les protéines à dégrader dépend de la concentration de ces hydrolases, du pH mais également du turnover cellulaire. En effet, leur activité est augmentée dans le foie, les reins et la ratte. De plus, en ce qui concerne le muscle, leur contenu diffère selon le type de fibre. Les muscles oxydatifs seraient plus riches en cathepsines que des muscles glycolytiques [251].

3. LAS dans le muscle squelettique

Finalement, le système autophagique-lysosomal joue un rôle crucial dans l'homéostasie de la fibre musculaire et plus particulièrement dans le contrôle de la masse musculaire [271, 272]. En effet,

de nombreuses pathologies musculaires sont associées à des altérations des protéines lysosomales mais également du système autophagique [273-275].

L'expression des gènes des cathepsines B et L est augmentée dans des modèles animaux de cancer [229, 234, 276] lors d'un traitement aux glucocorticoïdes [276, 277], chez des patients atteints de la myopathie de Duchenne [278, 279] et plus particulièrement la cathepsine L dans le diabète [234, 280]. L'expression des gènes des cathepsines B et D ne sont pas systématiquement augmentées dans les modèles d'atrophie contrairement à la cathepsine L dont l'augmentation génique est systématiquement plus importante que les 2 autres et semble largement reconnue comme un marqueur de l'atrophie [251]. Par ailleurs, les variations dans l'expression des gènes des cathepsines ne reflètent pas toujours des modifications de leur activité au sein du lysosome suggérant un contrôle post-transcriptionnel ou translationnel.

Lorsque la cellule est privée en nutriments ou en l'absence de facteurs de croissance, la stimulation de l'autophagie est alors un mécanisme de défense via lequel les acides aminés sont recyclés pour maintenir la survie de la cellule et limiter l'apoptose [281, 282]. Ainsi, le vieillissement se caractérise par un déclin des processus autophagiques qui serait en partie responsable de l'accumulation de protéines vieillissantes et non fonctionnelles [283]. Dans un tel contexte, la restriction calorique permettrait d'activer l'autophagie qui est de plus en plus envisagé comme mécanisme augmentant la longévité [259, 284] notamment par sa capacité à dégrader les « vieilles » mitochondries dont la production des espèces oxygénées réactives (EORs) est exacerbée avec l'âge [285]. Par ailleurs, des souris *Atg7^{-/-}* ou *Atg5^{-/-}* présentent une altération du système autophagique qui conduit à des maladies neurodégénératives chez ces souris [286, 287] suggérant un rôle de l'autophagie dans les maladies d'Alzheimer [288] et de Parkinson [289]. Les expériences récentes de Masiero [271, 290] sur le modèle des souris *Atg7^{-/-}* montrent une atrophie exacerbée avec le vieillissement attestée par une accumulation de protéines dégradées, de radicaux libres ainsi qu'une activation de l'apoptose. L'autophagie est également très impliquée dans les cancers et particulièrement dans le développement des tumeurs lorsque le système est défaillant [291]. Ce mécanisme participerait à la stabilité des chromosomes et sa diminution serait responsable de dommages à l'ADN dans l'induction de tumeurs [292]. Enfin, une défaillance du système de l'autophagie est aussi à l'origine de nombreuses myopathies comme la maladie de Danon en lien avec une altération de la protéine LAMP2a [293]. Ces données indiquent très clairement que l'autophagie est essentielle au maintien de l'homéostasie musculaire mais cependant une autophagie excessive peut conduire à l'atrophie [294] et à des maladies musculaires comme la myopathie XMEA [295].

iii. Le système calcium-dépendant : les calpaines

Les calpaines sont des endoprotéases à cystéine calcium-dépendante, responsables à la différence de l'UPS et du LAS, d'une digestion partielle des protéines cibles. Elles sont présentes dans presque

tous les types cellulaires. Cette famille est composée de 14 membres dont les plus représentées les calpaines 1 et 2 (μ -calpaine et m-calpaine) sont ubiquitaires. A celles-ci se rajoutent des formes moins conventionnelles issues d'un épissage alternatif ou de l'absence d'une sous-unité ou encore des formes tissu-spécifique comme la calpaine 3 (p94) dans le muscle. Les calpaines sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités codées par deux gènes différents, une sous-unité catalytique de 80 kDa et une sous-unité régulatrice de 28 kDa. Elles sont synthétisées sous-forme de pro-enzyme et leur activation débute par une autolyse des deux sous-unités [296, 297]. Ensuite leur activité dépend des concentrations intracellulaires en calcium [298], de leur localisation cellulaire, de l'activité de l'inhibiteur endogène la calpastatine (Cpst) et probablement de leur état de phosphorylation. Elles régulent de multiples fonctions cellulaires telles que la migration cellulaire [299], l'apoptose [300] et le cycle cellulaire [301]. Au sein du muscle squelettique, elles sont impliquées dans la migration et la différenciation des myoblastes [302-305] notamment dans les processus de régénération musculaire [306], d'atrophie [307, 308] dans certaines pathologies telles que les dystrophies [309, 310], le diabète de type 2 [311] ou encore la maladie d'Alzheimer [312]. De nombreux substrats des calpaines ont été identifiés *in vitro* comme les protéines du cytosquelette (troponines, titine, desmine, vinculine...), des protéines membranaires (PKC, *Focal Adhesion Kinase*...) ainsi que des enzymes et des facteurs de transcription [313]. *In vivo*, la dégradation d'une protéine par les calpaines implique que celle-ci soit dénaturée [314] ainsi il n'est pas évident qu'un substrat des calpaines *in vitro* le soit *in vivo* et ainsi de nombreuses études sont encore nécessaires pour caractériser leur substrat *in vivo*. De par ces substrats décrits ci-dessus, l'implication des calpaines dans la transition phénotypique d'un muscle du rapide vers le lent [306, 315] ainsi que dans le remodelage musculaire suite à un exercice induisant des dommages musculaires chez le rat et l'Homme [316-319] ne sont pas surprenantes. Dans ces contextes, elles seraient responsables du démantèlement du cytosquelette par la digestion partielle des protéines structurales avant que celles-ci soient orientées vers l'UPS et/ou le LAS. Cependant, ce rôle ainsi que leur mode d'action lors de phénomène d'hypertrophie doivent encore être clarifiés. Un modèle d'étude de l'hypertrophie musculaire après un traitement chronique aux β 2-agonistes comme le clenbutérol [320, 321] est en lien avec une réduction de la dégradation protéique [322, 323] mais également une activité réduite de la calpaine 1 et une augmentation de la calpastatine [324, 325]. Par ailleurs, l'activité des calpaines 1 et 2 est augmentée chez des animaux traités pendant 21 jours au clenbutérol à une dose de $4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ concomitant avec l'obtention d'une hypertrophie musculaire associée à une transition phénotypique du lent vers le rapide des muscles SOL et EDL [326]. Cependant, ce rôle des calpaines dans l'hypertrophie musculaire induite par les β 2-agonistes nécessite d'autres études pour comprendre le lien entre calpaine et modèle d'hypertrophie musculaire. D'un point de vu métabolique, l'inactivation de la calpaine-3 dans le muscle contribuerait à la diminution du relargage du calcium par le reticulum sarcoplasmique ainsi qu'à la diminution de la quantité des récepteurs à la ryanodine (Ryr) [327].

Le complexe formé par la calpaine-3 et la protéine aldolase serait capable de se lier aux Ryr et induire le relargage du calcium. Les calpaines ne jouent donc pas qu'un rôle protéolytique mais pourraient être impliquées dans le maintien de l'intégrité de complexes protéiques. Par ailleurs si leurs rôles dans la régénération musculaire ainsi que dans l'organisation architecturale de la fibre musculaire ont été montré ; leur implication dans le turnover protéique n'a pas été mise en évidence.

iv. Les caspases

Les caspases (cysteine-dependent aspartate-directed proteases) sont des enzymes impliquées dans les processus apoptotiques. L'apoptose ou « mort cellulaire programmée » est un processus par lequel la cellule déclenche son autodestruction en réponse à un signal tel que l'augmentation anormale des espèces oxygénées réactives ou azotées, les ligands des récepteurs de mort cellulaire (TNF- α , IL-6...), un déséquilibre calcique ou encore une accumulation des protéines de la famille des Bcl-2 [328]. La destruction de la cellule apoptotique génère des débris cellulaires qui seront éliminés par les macrophages [329]. Activée dans le cytosol, les caspases sont principalement responsables du clivage de nombreuses protéines du cytosquelette (actine, β -caténine...), de l'enveloppe nucléaire, de protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN [330]. L'apoptose semble jouer un rôle important dans l'atrophie musculaire induite par de nombreuses pathologies (insuffisance cardiaque, lésion de la moelle épinière, sarcopénie), la dénervation, l'immobilisation et également dans certaines dystrophies.[328]. Onze caspases ont été décrites chez l'homme et parmi elles, les caspases -8,-9,-12 seraient plus spécifiquement impliquées dans l'étape d'initiation de l'apoptose alors que les caspases -3,-6,-7 dans l'étape d'exécution. Cependant, l'apoptose peut être initiée sans l'activation des caspases et à l'inverse l'activation des caspases pourrait être nécessaire au remodelage musculaire sans conduire à la mort cellulaire dans certaines conditions [331]. Ainsi, l'activité des caspases n'est pas toujours augmentée dans un modèle d'atrophie par suspension du train arrière chez le rongeur bien que l'apoptose soit augmentée [328, 332]. A l'inverse, dans un modèle d'atrophie par dénervation, l'activité de la caspase-3 [333] ainsi que celle de la caspase-8 [334] peuvent être augmentées sans induction de l'apoptose suggérant un rôle différent des caspases selon le stimulus atrophique. De la même manière, le processus de vieillissement est en lien avec une augmentation de la fragmentation de l'ADN (apoptose) qui n'est pas systématiquement associée à une augmentation de l'activité des caspases 3 et 9 [259, 335]. Ainsi, des données suggèrent que certaines caspases activées dans l'apoptose peuvent également être impliquées dans d'autres processus cellulaires comme la dégradation protéique en agissant comme des kinases, phosphatases, lipases...[331]. En effet, de façon intéressante, la caspase-3 pourrait être impliquée dans la dégradation protéique au cours de l'atrophie

en dégradant préférentiellement l'actomyosine et l'actine dans un modèle de cellules L6 ainsi que dans des muscles de rats diabétiques ou insuffisants rénaux [230]. Ces données suggèrent son rôle potentiel dans la protéolyse induite par un exercice excentrique.

v. *Les metalloprotéinases matricielles*

Les métalloprotéinases ou métalloprotéases matricielles (MMPs) sont des régulateurs importants dans la formation, le remodelage et la dégradation de la matrice extracellulaire à la fois dans des processus physiologiques que pathologiques au sein du muscle squelettique. Les MMPs sont activées dans la croissance musculaire, l'angiogenèse ainsi qu'à la suite d'un exercice physique mais également dans les maladies neuromusculaires, certaines dystrophies et plus généralement dans des situations d'atrophie [336, 337]. La famille des MMPs est composée de 22 membres d'enzymes calcium et zinc-dépendantes sécrétées par les cellules de schwann, les cellules satellites ainsi que les fibroblastes [336]. Leur activité est modulée par une famille d'enzyme, *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases* (TIMPs), inhibitrices spécifiques des MMPs. Le rôle et la régulation des MMPs dans le muscle squelettique sont très peu décrits dans la littérature, cependant MMP-2 (gélatinase A) et MMP-9 (gélatinase B) capables de dégrader le collagène IV, semblent jouer un rôle prépondérant dans le remodelage de la matrice extracellulaire après une blessure. Ainsi, l'élastine, la fibronectine et de façon intéressante la laminine, la troponine I, l' α -actine et les chaînes légères de myosine I ont été identifiées comme substrats de MMP-2 au sein du myocarde [338], ouvrant des perspectives intéressantes concernant l'implication des MMPs dans la dégradation protéique après un exercice traumatisant.

Le turnover protéique est un processus physiologique crucial dans le maintien de la masse musculaire, et l'intégrité des mécanismes cellulaires de par la dégradation de protéines vieillissantes ou non fonctionnelles. Si la régulation de la synthèse protéique dans des situations d'hypertrophie et/ou d'atrophie est largement caractérisée, les mécanismes de dégradation protéiques manquent encore de compréhension. Toutefois, les systèmes ubiquitine-protéasome et lysosomal-autophagique apparaissent comme les acteurs majeurs de la protéolyse musculaire dans la plupart des situations cataboliques avérées (cachexie, sarcopénie, traitement aux glucocorticoïdes, infections...). Cependant, des systèmes aux substrats très spécifiques comme les caspases, les calpaines et les MMPs, sont majoritairement impliqués dans situations très particulières comme les dystrophies, les phénomènes de régénérations et lésions musculaires. Compte tenu que chaque système possède ses protéines cibles à dégrader, les études suggèrent que toute situation catabolique implique au moins l'activation de deux systèmes mais leurs mécanismes d'activation simultanés ou séquentiels restent à élucider.

II- INFLUENCE DE L'EXERCICE DE RESISTANCE ET/OU DE LA NUTRITION SUR LA BALANCE PROTEIQUE

a. Effet de l'exercice de résistance sur la dégradation protéique

i. Système Ubiquitine Protéasome et exercice de résistance

1. Rôle de l'UPS dans la protéolyse induite par l'exercice en résistance

Les données concernant l'implication de ce système à la suite d'un exercice sont davantage fournies et semblent indiquer une activation systématique de l'UPS à la suite d'un exercice qu'il soit de type endurance [92, 339, 340], de résistance en mode concentrique [92, 239, 341, 342] ou excentrique [237, 238]. En effet, Willoughby *et al.* (2003) [238] ont montré des augmentations protéiques et des transcrits de l'ubiquitine (Ub), d'une ligase E2 ainsi que de la sous-unité 20S du protéasome à 6, 24 et 48 heures après un exercice excentrique d'extension du genou. Cette activation de l'UPS était associée à une diminution du contenu en protéines myofibrillaires 48 heures après l'exercice ainsi qu'une augmentation de l'activité de la caspase-3, protéine impliquée dans les phénomènes apoptotiques ainsi que probablement dans l'initiation de la dégradation des protéines myofibrillaires [230]. Par ailleurs, un exercice réalisé en excentrique est à l'origine de dommages musculaires importants s'accompagnant d'une réaction inflammatoire plus importante que lors de contractions en mode concentrique [318] qui pourrait expliquer l'activation de l'UPS via la voie de signalisation de NF- κ B. Que ce soit l'étude de Stupka *et al.* (2001) [237] ou Willoughby *et al.* (2003) [238] l'absence de mesure des activités β de la sous-unité 20S, mesure physiologique et directe de l'activation de l'UPS est une limite pour affirmer l'implication du système ubiquitine-protéasome à la suite d'un exercice excentrique. En effet, les mesures concernant l'UPS sont généralement portées sur l'activation transcriptionnelle des E3 ligases MAFbx et MuRF-1 dont l'augmentation de l'activité génique ne signifie pas automatiquement une augmentation de la dégradation protéique par le protéasome d'autant plus qu'elles peuvent être régulées de manière indépendante. En effet, il est presque systématiquement rapporté une augmentation de l'activation génique de MuRF-1 associé à une diminution ou aucun changement de MAFbx dans les heures qui suivent un exercice concentrique [92, 94, 341, 343]. S'il semble que la transcription de MuRF-1 soit augmentée rapidement à la suite d'un exercice, le retour à des conditions basales se fait en moins de 48 heures contrairement à MAFbx dont l'activation n'est soit pas modifiée [92, 341-343] soit diminuée entre 3 et 72 heures post-exercice [239, 344]. Des résultats similaires ont également été obtenus par Kostek *et al.* (2007) [345] puisque les ARNm de MAFbx seraient diminués de 3 à 24 heures à la suite d'un exercice excentrique et non après des contractions concentriques. Seuls Deldicque *et al.* (2008) [344] et Louis *et al.* (2007) [92] ont pu montrer une augmentation transitoire de MAFbx immédiatement après l'exercice. Ces résultats sont en accord avec les données de Phillips *et al.* (1997) [27] qui rapportent une augmentation de 31% de la dégradation protéique 3 heures après

un exercice de résistance qui n'est plus que de 18%, 24 heures post-exercice et retrouve des valeurs basales au bout de 48 heures. L'augmentation transitoire de la protéolyse est donc en partie concomitante avec principalement l'augmentation de l'activité génique de MuRF-1, ce qui suggère l'implication de l'UPS dans la protéolyse d'exercice et plus spécifiquement de MuRF-1. Cependant, des mesures de l'expression protéique de ces E3 ligases ainsi que de l'activité du protéasome 20S manquent pour confirmer cette hypothèse.

La réponse de l'UPS à la suite d'un entraînement en résistance a encore moins été étudiée mais Leger *et al.* (2006) [346] rapportent une augmentation de l'activation génique des atrogènes (MAFbx et MuRF-1) 48 heures après un programme d'entraînement en résistance de 8 semaines mais un retour à des conditions basales 8 semaines après l'arrêt du protocole. Les auteurs suggèrent que l'implication de ces E3 ligases est en lien avec l'hypertrophie musculaire retrouvée après ces 8 semaines d'entraînement en résistance. En effet, un muscle hypertrophié est davantage constitué de protéines de structures et du cytosquelette, l'augmentation de MuRF-1 et MAFbx pourrait contribuer à augmenter le turnover protéique afin de maintenir le taux de protéolyse basale. Cette hypothèse reste spéculative étant donné que les auteurs n'ont pas mesuré ni la protéolyse ni le turnover protéique à l'issue de l'entraînement ni même lors de la phase d'atrophie liée à l'arrêt de la sollicitation musculaire. Cette hypothèse est aussi critiquable compte tenu que des athlètes entraînés depuis des années en résistance présentent une diminution de l'expression génique de MuRF-1 3 heures après un exercice aigu [347] et aucun changement de MAFbx [348]. L'entraînement pourrait induire à long terme une diminution de la dégradation protéique participant à l'augmentation de la balance protéique en lien avec le gain d'hypertrophie musculaire plus important chez des athlètes très entraînés versus sédentaires après le même protocole d'entraînement [118].

Si le système ubiquitine-protéasome semble activé à la suite d'un exercice en résistance (*Annexe 2*), son rôle dans la protéolyse induite d'exercice reste à expliquer ainsi que les actions probablement différentes et spécifiques de MuRF-1 et MAFbx. Etant donné que MuRF-1 dégrade principalement les protéines contractiles et sarcomériques, les données présentées ci-dessus suggèrent son implication forte dans la protéolyse protéasome-dépendante à la suite d'un exercice aigu et plus fortement lorsque celui-ci est excentrique. L'activation de MuRF-1 post-exercice pourrait également expliquer le remodelage phénotypique obtenu après des semaines d'entraînement en résistance. En revanche, MyoD ou eIF3f pouvant être des cibles de MAFbx, l'absence de modification ou une diminution de MAFbx après un exercice aigu pourrait participer à l'hypertrophie musculaire induite par l'entraînement grâce à la diminution de la polyubiquitination de marqueurs de prolifération et différenciation myogénique ainsi que la polyubiquitination de facteurs d'initiation de la synthèse protéique.

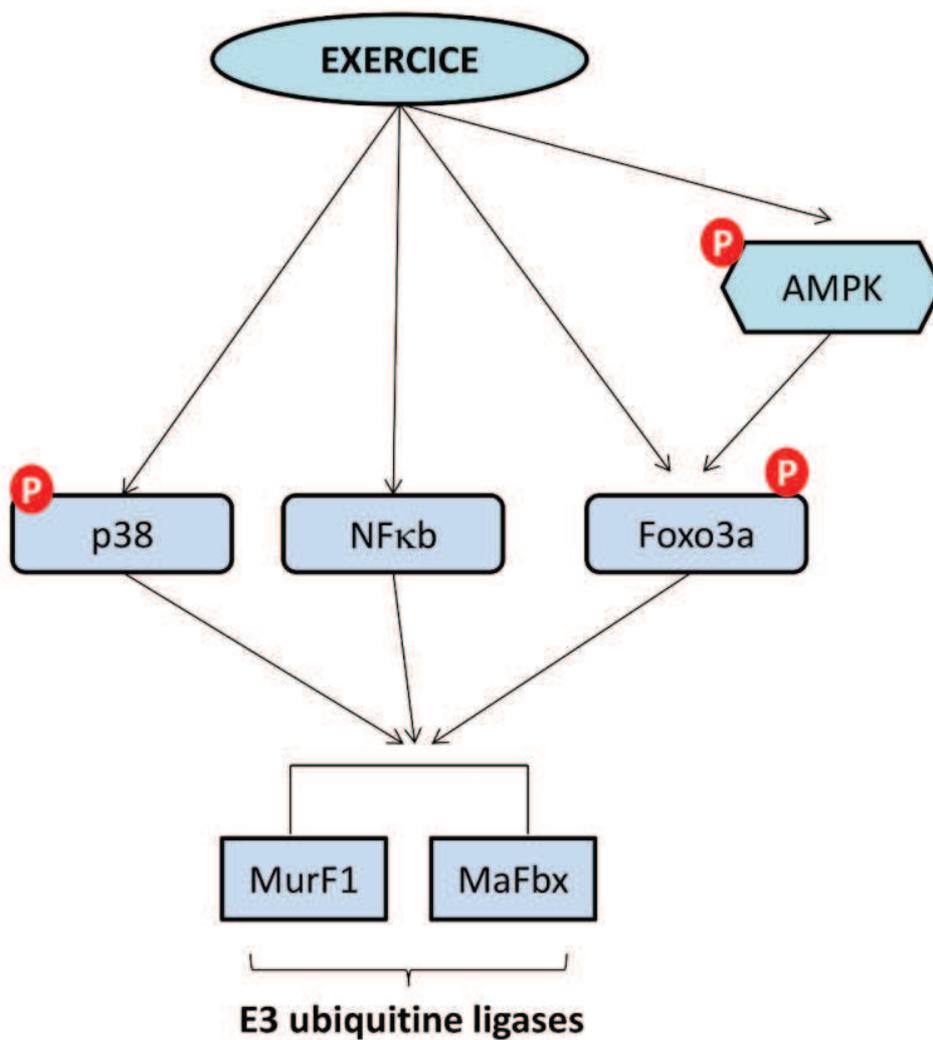


Figure 18. Voies de signalisation potentiellement impliquées dans la régulation de l'UPS par l'exercice

2. Voies signalétiques impliquées dans la régulation de l'UPS par l'exercice

La voie de signalisation de Akt serait en partie au centre de la régulation de la balance protéique. Ainsi, l'activation d'Akt peut être responsable de la diminution de la transcription de MuRF-1 et MAFbx via l'inhibition des facteurs de transcription Foxo [235, 248]. Si les études sur l'animal et des myotubes C2C12 montrent le rôle essentiel de la signalisation Akt-Foxo sur la régulation de MAFbx et MuRF-1, son rôle chez l'homme à la suite d'un exercice de résistance semble très modeste. En effet, au regard des études rapportant une régulation différente de MAFbx et MuRF-1 à la suite d'un exercice [92, 239, 343] associé à l'augmentation transitoire des 2 ligases; ces données sont en contradiction avec l'activation d'Akt retrouvée après un exercice [343] et suggèrent d'autres voies de signalisation dans la régulation de MAFbx et MuRF-1 à la suite d'un exercice. La voie de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) peut également être envisagée comme inducteur du système UPS cours d'un exercice. En effet, cette protéine peut favoriser *in vitro* la dégradation des protéines myofibrillaires suite à l'activation des E3 ligases via la phosphorylation de Foxo3a sur les résidus sérines 413/588 [247, 349, 350]. L'activation de l'AMPK étant très sensible au statut énergétique de la cellule notamment au rapport AMP/ATP ainsi qu'à l'augmentation des concentrations en calcium, il se trouve particulièrement augmenté pour des exercices entre 60-75% VO_{2max} ou des exercices à faible intensité menés jusqu'à épuisement [339, 351]. Si cette augmentation de l'AMPK au cours d'un exercice semble être en lien avec l'inhibition de la synthèse protéique, ceci ne peut être affirmé dans les heures qui suivent l'exercice. En effet, Dreyer *et al.* (2006) [352] ont pu montrer une augmentation de l'activation de l'AMPK α 2 au cours d'un exercice de résistance (10 x 10 répétitions à 65-70% de 1RM) chez l'homme associée à une diminution de la synthèse protéique. En revanche, l'activité de l'AMPK α 2 restait élevée jusqu'à 2 heures post-exercice alors que la synthèse protéique était relancée. Ainsi, il est donc envisageable que l'augmentation de l'AMPK à la suite d'un exercice soit en lien avec l'augmentation de la protéolyse et soit en partie responsable de l'activation de l'UPS et des E3 ligases via la phosphorylation de Foxo3a sur les sérines 413/588. Par ailleurs, la régulation transcriptionnelle de MAFbx et MuRF-1 serait médiée par la cytokine TNF- α via la p38 MAPK [232] ainsi que par la voie de signalisation NF- κ B [245] dans le muscle. Or, que ce soit la p38 ou NF- κ B, ces deux voies de signalisation ont été retrouvées activées après un exercice de résistance [75, 353] ouvrant, avec la voie de l'AMPK-Foxo3a, des perspectives intéressantes dans la régulation des E3 ligases de manière Akt indépendante (*Figure 18*).

ii. Activation du système Autophagique-Lysosomal avec l'exercice

1. Rôle de l'autophagie dans la protéolyse induite d'exercice

Le système autophagique-lysosomal et plus spécifiquement l'autophagie est sensible au statut énergétique de la cellule et activé lors d'une privation en nutriments particulièrement en acides aminés essentiels. Ainsi, il existe davantage de données sur l'activation de ce système avec l'exercice et l'entraînement en endurance (*Annexe 2*). Grumati *et al.* (2011) [354] montrent de façon intéressante que l'autophagie est induite à la suite d'un exercice d'une heure de course chez des souris sauvages mais altérée chez des souris dont les muscles sont déficients en collagène VI (Col6a1^{-/-}). Ces souris Col6a1^{-/-} présentent alors une accumulation de mitochondries non fonctionnelles responsables de la dégénérescence des fibres par apoptose. Les auteurs mettent en relation ce résultat avec la défaillance du système autophagique rencontrée chez ces souris Col6a1^{-/-} à la suite de l'exercice. En lien avec ces résultats, l'étude de He *et al.* (2012) [355] montrent que l'augmentation du métabolisme du glucose par l'exercice n'est pas retrouvée chez des souris présentant une mutation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Ces souris présentent alors une déficience du système autophagique puisque cette mutation empêche la dissociation de Bcl-2 avec Beclin-1 pour l'induction de l'autophagie par l'exercice perturbant l'homéostasie glucidique à l'exercice. Dans un autre contexte, une épreuve d'ultra-endurance de 24 heures chez l'homme, conduit à l'activation de marqueurs de l'autophagie (Atg12, LC3-II) en lien avec une diminution drastique de la prise alimentaire [339]. Seuls Kim *et al.* (2012) [340] ont observé une diminution du ratio LC3-II/LC3-I, des protéines Beclin-1, Atg7 et LAMP2a, attestant d'une diminution de l'activation de l'autophagie dans les heures qui suivent 50min de course chez des souris. A l'origine de cette discordance de résultats avec les études précédentes, une intensité d'exercice de 12m/min probablement trop faible comparée à celle de 40m/min maintenue pendant une heure de Grumati *et al.* (2011) [354] ou l'exercice à charge croissante jusqu'à épuisement de l'étude de He *et al.* (2012) [355]. Le protocole de Kim *et al.* (2012) [340] n'a sûrement pas été assez intense pour produire un déficit énergétique suffisant afin d'induire l'autophagie. Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que l'induction de l'autophagie par l'exercice d'endurance est essentielle au maintien de l'homéostasie du muscle mais d'autres études sont requises pour préciser le rôle bénéfique de ce système dans les adaptations musculaires à l'exercice ainsi que les conditions de sa régulation. Dans cette perspective, l'entraînement en endurance permettrait de réduire l'augmentation de l'expression de certaines protéines du LAS (Beclin-1, Atg12, Atg7, LC3 et cathepsine L) après un traitement à la doxorubicine (anticancéreux) chez le rat [356]. Ces résultats démontrent qu'une régulation fine du LAS par l'entraînement d'endurance est possible dans le maintien de l'intégrité du muscle lors d'un traitement pharmacologique au cours d'une pathologie. Peu d'études se sont intéressées aux marqueurs de l'autophagie à la suite d'un exercice aigu de résistance (*Annexe 2*). MacKenzie *et al.* (2009) [357] ont pu montrer une augmentation de l'activité de

la protéine Vps34 3 et 6 heures après des stimulations électriques de type résistance chez le rat suggérant une activation du système autophagie. En revanche après un exercice aigu chez l'homme, aucune modification du ratio LC3-II/LC3-I n'a été observé par Glynn *et al.* (2010) [358] 1 heure post-exercice contrairement à Fry *et al.* (2012) [343] qui rapportent une diminution de l'expression génique de l'Atg GABARAP à 3 et 6 heures post-exercice ainsi qu'une diminution du ratio protéique LC3-II/LC3-I, au bout de 3, 6 et 24 heures après l'exercice. En revanche, aucune régulation des protéines Atg7 et Beclin-1 n'a été observé dans cette étude. Ces données ne permettent pas de conclure sur l'implication de l'autophagie à la suite d'un exercice de résistance. En effet, une diminution du ratio LC3II/LC3I peut être attribuée soit à une diminution de la traduction de LC3II en protéine soit à une augmentation de la vitesse de son recyclage dans le lysosome en lien avec une augmentation du flux autophagique. Ainsi, il apparaît important de mesurer des marqueurs intervenant à différentes étapes de ce système et plus particulièrement l'activité de la protéine Vps34 comme marqueur de l'initiation ainsi qu'une mesure du flux autophagique ou turnover de LC3, ce que n'ont pas mesuré Fry *et al.* (2012) [343], Glynn *et al.* (2010) [358]

2. Voies potentielles de régulation de l'autophagie par l'exercice

La protéine mTOR est au centre de la régulation du système autophagique dans de nombreuses conditions. Ainsi dans des conditions normales de croissance c'est-à-dire en présence d'un milieu riche en nutriments, la protéine mTOR est phosphorylée pour agir comme régulateur négatif de l'autophagie [359]. A l'inverse, lorsque l'autophagie est exacerbée au cours du jeûne ou une privation en nutriment de la cellule, mTOR est alors inactivée. La cascade de régulation négative de l'autophagie par mTOR inclut en amont les protéines PDK1 et Akt via PTEN (*phosphatase and tensin-like protein*) qui jouent alors un rôle parfois antagoniste à Vps34. En effet, en lien avec la quantité d'acides aminés présents au sein de la cellule, Vps34 semble avoir un effet positif à la fois sur l'autophagie [360, 361] et également sur mTOR [362, 363] suggérant l'hypothèse de partenaires différents dans la formation d'un complexe Vps34-Vps15 conduisant à l'induction ou l'inhibition de l'autophagie [364, 365]. Vps34 peut en effet induire l'autophagie en s'associant avec la protéine Beclin-1 [360] mais serait indispensable pour la phosphorylation de S6K1 via l'insuline de manière Akt et TSC1/2 indépendante [363]. Un rapprochement intéressant peut être fait entre l'implication de la protéine Vps34 dans le turnover protéique en lien avec le statut nutritionnel de la cellule et l'augmentation de son activité à la suite de contractions électriques chez le rat. En effet, l'activité de Vps34 est augmentée de 3 à 6 heures après un exercice de résistance [357] et davantage lors de contractions excentriques [366]. Même si l'augmentation de l'activité de Vps34 est corrélée à l'augmentation de l'activité de S6K1, 3 heures après l'exercice, une augmentation massive de la phosphorylation d'Akt est mesurée 30 minutes après ce même exercice. Comme pour la stimulation de Vps34 via l'insuline et les acides aminés, l'exercice

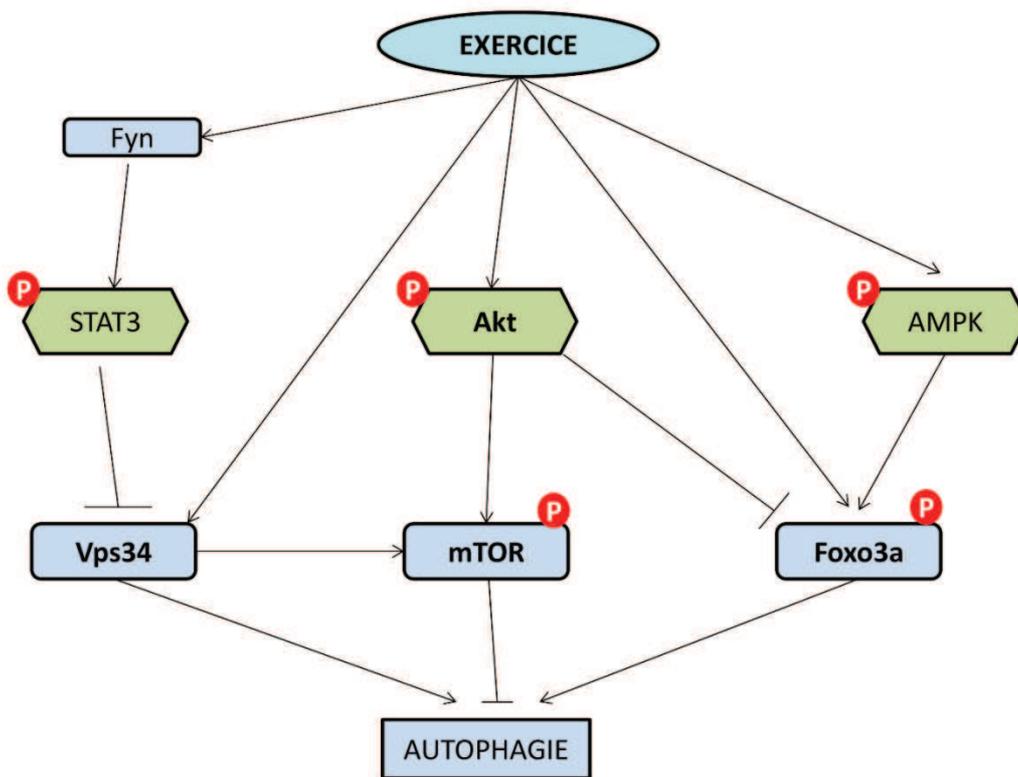


Figure 19. Voies de signalisation potentielles régulant l'autophagie par l'exercice

peut stimuler mTOR via Vps34 de manière Akt indépendante (*Figure 19*). Ces auteurs suggèrent que la synthèse protéique induite par un exercice en résistance et plus particulièrement en excentrique concourt à la diminution du pool intracellulaire en acides aminés et donc à l'activation de Vps34 pour stimuler l'autophagie. L'autophagie serait alors un mécanisme pour augmenter la concentration intracellulaire en acide aminé pour participer au maintien de l'activation de mTOR [366].

La voie de l'AMPK peut également être envisagée comme inducteur d'autophagie via l'inhibition de mTOR au cours d'un exercice mais également l'activation de Foxo3a (*Figure 19*). En effet, cette protéine est un régulateur négatif de la synthèse protéique via l'inhibition de mTOR mais peut également participer *in vitro* à la dégradation des protéines myofibrillaires via la phosphorylation de Foxo3a sur les résidus sérines 413/588 [349, 350]. Si cette phosphorylation de Foxo3a par l'AMPK est impliquée dans la dégradation des protéines myofibrillaires via l'UPS [247], récemment, il a été montré comme interagissant avec ULK1(Atg1) via Foxo3a pour induire l'autophagie [367, 368]. En lien avec le résultat de Dreyer *et al.* (2006) [352] montrant une activité de l'AMPK α 2 élevée après un exercice de résistance chez l'homme; l'hypothèse d'un rôle de l'AMPK dans la protéolyse d'exercice via l'activation de l'autophagie est à envisager.

En relation avec la première partie de cette thèse, la voie de signalisation Fyn/STAT3 pourrait contribuer à la régulation de Vps34 de façon mTOR indépendante [369]. Fyn est un proto-oncogène membre de la famille des non-récepteurs tyrosine kinases (Src) dont les isoformes majeures sont FynB et FynT. Yamada *et al.* (2012) [369] ont pu montrer que les souris Fyn^{-/-} ne présentent pas d'augmentation de la phosphorylation de STAT3 ni de diminution du contenu de la protéine Vps34 à la suite d'un gavage consécutif à une privation de nourriture contrairement à des souris sauvages. En situation de jeûne, la diminution de l'activité de Fyn est directement corrélée avec la diminution de la phosphorylation de STAT3 et l'augmentation du contenu en protéine Vps34. Sachant que la phosphorylation de la protéine STAT3 est augmentée entre 2 et 6 heures après un exercice de résistance [170] la voie Fyn/STAT3 ouvre une perspective intéressante dans la régulation de l'autophagie par l'exercice (*Figure 19*).

3. Activation et régulation du système lysosomal en situation d'exercice

L'étude des cathepsines à la suite d'un exercice présente très peu de données (*Annexe 2*). Aucune cathepsine ne semble activée immédiatement ou 24 heures après un exercice d'endurance chez le rat [356] ou chez l'homme [339]. L'absence d'activation des cathepsines peut résider dans la cinétique de mesure, par ailleurs de par son implication dans toutes les situations d'atrophie [251], la cathepsine L apparaît comme un marqueur à étudier préférentiellement dans les heures qui suivent un exercice de résistance.

iii. Activation du système des calpaines avec l'exercice

Des études s'intéressant au système calcium-dépendant des calpaines ont pu montrer une activation des calpaines 1 et 2 après un exercice excentrique [318, 319] ou un exercice d'endurance mené jusqu'à épuisement [316, 370] (*Annexe 2*). Ces modifications d'activité des calpaines sont corrélées à des mesures directes (histomorphologie) des lésions des myofilaments [318, 319] ou indirectes à travers l'augmentation de la créatine kinase ou la dégradation de protéines myofibrillaires (tropomyosine, actine) et/ou du cytosquelette (Tenascine C, desmine, vimentine). En effet, Belcastro (1993) [316] ont pu montrer une corrélation entre l'augmentation de l'activité de la calpaine 1 et la dégradation de la desmine qui est *in vitro*, avec la titine, une cible des calpaines [280]. Murphy *et al.* (2007) [371], Murphy&Lamb (2009) [372] ont pu retrouver une activité augmentée de la p94, 24 heures après un exercice excentrique chez l'homme mais celle-ci ne serait pas activée immédiatement ni 3 heures après cet exercice. Cependant, l'implication des calpaines à la suite d'un exercice de résistance concentrique semble moins évidente. En effet, Louis *et al.* (2007) [92] n'ont pas observé de modifications transcriptionnelles des calpaines 1 et 2 jusqu'à 24 heures après un exercice d'extension de genou, quel que soit le type de fibres [341]. Après un exercice de sprint de 30s sur ergocycle, Murphy *et al.* (2006) [373] n'ont pas obtenu de modifications des activités des calpaines 1 et 3 immédiatement après le sprint. Ces données sont en adéquation avec l'augmentation des concentrations intracellulaires en calcium après un exercice excentrique ou en endurance qui restent élevés jusqu'à 24-48 heures après l'exercice et serait donc suffisant pour activer les calpaines [374]. En effet, les études de Sultan *et al.* (2000) [306], Sultan *et al.* (2001) [315] utilisant un modèle de stimulation électrique à basse fréquence chez le rat ou le lapin montrent une activation du système des calpaines sans dommages notoires des fibres musculaires confirmant le rôle joué par des concentrations intracellulaires élevées en calcium pendant une période longue. Au regard de ces études, l'implication du système des calpaines dans la dégradation protéique induite par un exercice en résistance semble avoir une place peu importante en lien avec la libération calcique mais être davantage activé si l'exercice génère des dommages musculaires majeurs. Dans ce cas, l'activation des calpaines pourraient participer à la digestion partielle des protéines du cytosquelette afin de les faire dégrader par l'UPS et/ou le LAS.

iv. Activation du système des caspases avec l'exercice

L'activité des caspases étant communément associée aux phénomènes apoptotiques, très peu de données existent sur leur activation à la suite d'un exercice de résistance et encore moins leur implication dans la protéolyse induite par ce type d'exercice (*Annexe 2*). Si l'on considère un exercice d'endurance, Kocturk *et al.* (2008) [375] ont rapporté que l'activité des caspases 9 et 3 augmentait immédiatement après une épreuve de course menée jusqu'à épuisement alors que la caspase 8 n'était retrouvée augmentée que 3 heures post-exercice. Par ailleurs 48 à 72 heures après un entraînement en endurance de plusieurs semaines chez le rongeur, il n'a pas été rapporté d'augmentation des

phénomènes apoptotiques ni d'activation des caspases quel que soit le type de muscle. En revanche, ce type d'entraînement chez des rats âgés pourrait permettre de diminuer à la fois l'apoptose et l'activation des caspases associées au phénomène du vieillissement [376, 377] ou un traitement aux glucocorticoides [356]. Ces données suggèrent qu'après un exercice d'endurance source de production importante de EORs et donc potentiellement de phénomènes apoptotiques, l'activation précoce des caspases pourrait contribuer à ce phénomène. En revanche l'augmentation du système antioxydant avec l'entraînement contribue à limiter leur activation expliquant la diminution de l'apoptose chez le sujet âgé entraîné en endurance.

Les quelques données existantes sur l'exercice en résistance chez l'homme rapportent une activité génique de la caspase-3 non modifiée 1, 4 ou 24 heures post-exercice quel que soit le type de fibre. [341, 358]. Le point limitant de ces deux études est l'absence de mesure de l'activité des caspases, mesure nécessaire pour attester ou non de leur activation. Par ailleurs, comme l'entraînement en endurance, un entraînement en résistance pourrait contribuer à diminuer la présence des caspases 3 et 9 dans le sérum. Sharafi&Rahimi (2012) [378] ont pu montrer que l'augmentation de ces dernières immédiatement et 3 heures après un exercice de résistance épuisant chez des sujets sédentaires, n'est pas retrouvé chez des sujets entraînés. Ces modifications des caspases dans le sérum sont en lien avec les changements sériques de la p53, marqueur mitochondrial activateur de ces caspases. Ainsi, si l'exercice en résistance peut induire de l'apoptose en lien avec une activation des caspases 3 et 9, l'entraînement en résistance induit une diminution de la production de p53 probablement par l'augmentation des défenses antioxydantes. Ces résultats doivent être considérés en regard du protocole employé c'est-à-dire un exercice conduit jusqu'à épuisement ; aucune autre étude ne s'est intéressée à l'apoptose et à l'activation des caspases après un exercice de résistance classique ce qui ne permet pas de conclure sur le rôle et l'implication des caspases après ce type d'exercice. Enfin, si l'activité de la caspase-3 est augmentée 24 heures après un exercice excentrique chez des sujets sédentaires, elle est diminuée lorsque ces mêmes sujets réitèrent cet exercice à 3 semaines d'intervalles [238]. L'augmentation de l'activité de la caspase-3 après le 1^{er} exercice est corrélée à la diminution du contenu en ADN ainsi qu'en protéines myofibrillaires du muscle d'autant que ces derniers marqueurs ne sont plus modifiés après le 2^e exercice. Ces résultats semblent montrer l'implication de la caspase-3 dans la dégradation protéique post-exercice ainsi que dans l'apoptose en lien avec la diminution du contenu en ADN. La diminution de l'activité de la caspase-3 à la suite du 2^e exercice est en lien avec la plasticité du muscle qui a su renforcer ses fibres pour répondre de façon plus efficiente à la future demande impliquant que la dégradation des protéines myofibrillaires ne soit plus nécessaire. Tout comme l'entraînement d'endurance ou de résistance en mode concentrique, l'entraînement en excentrique est responsable d'une diminution de l'activité de la caspase-3 attestant d'un effet protecteur de l'entraînement en général contre les phénomènes apoptotiques.

v. *Activation des MMPs avec l'exercice ?*

L'expression de MMP-2 est augmentée après une stimulation électrique chronique chez le rat [379] ainsi que l'expression de MMP-9 en lien avec l'augmentation du flux sanguin [380]. Même si les résultats concernant l'activation des MMPs avec l'exercice et l'entraînement sont assez hétérogènes, il semble que les expressions géniques et protéiques de ces deux MMPs soient augmentées à la suite d'un exercice de course de longue durée chez le rat [381-383] ou l'homme [384-386] dans certaines conditions. Ainsi, Yeghiazaryan *et al.* (2012) [383] ont obtenu une augmentation génique de MMP-9 mais pas de MMP-2, 2 heures après un exercice aigu d'endurance. Des résultats similaires ont également été obtenus chez l'homme [384, 386] avec l'augmentation des ARNm et de l'activité de MMP-9, 2 heures après un exercice d'endurance.

Après 10 jours d'entraînement en endurance chez l'homme, plus aucune activité de MMP-9 n'est observée contrairement à son activité transcriptionnelle qui reste élevée alors que l'activité de MMP-2 est augmentée [384, 385]. Comme chez l'homme, Yeghiazaryan *et al.* (2012) [383] ont obtenu une augmentation génique de MMP-9 mais pas de MMP-2 au bout de 5 et 14 jours d'entraînement en endurance chez le rat. En revanche, les activités de ces dernières sont augmentées après 5 jours d'entraînement. A l'opposé, Carmeli *et al.* (2005) [382] n'ont pas observé de changement de l'expression génique de MMP-9 contrairement à MMP-2 qui est augmentée après 14 jours d'entraînement en endurance chez le rat.

L'ensemble de ces résultats suggère une régulation différente de ces MMPs dans les adaptations musculaires à l'exercice aigu ou à l'entraînement en endurance. Le type de muscle ainsi que les modalités d'exercice semblent être d'importants modulateurs de la cinétique d'activation des MMPs. En effet, Koskinen *et al.* (2001) [387] rapportent une augmentation protéique et de l'activité de MMP-2 sans modification de celles de MMP-9 principalement dans les muscles lents, 2, 4 et 7 jours après un exercice excentrique. (*Annexe 2*). Par ailleurs, il apparaît que MMP-2 soit principalement localisée au niveau du myocyte alors que MMP-9 est davantage retrouvé au niveau des cellules satellites et endothéliales [383, 384], données pouvant en partie expliquer des cinétiques de réponses différentes.

Si l'UPS semble activé à la suite d'un exercice en résistance, son rôle dans la protéolyse induite d'exercice reste à préciser à travers des mesures directes d'activités du protéasome ainsi que la caractérisation des actions probablement différentes et spécifiques de MuRF-1 et MAFbx. Quant au système lysosomal-autophagique, l'exercice en endurance semble l'activer notamment en lien avec la déplétion énergétique. Même si un exercice de résistance n'induit pas un tel stress énergétique, des données moléculaires (Vps34, AMPK-Foxo3a) suggèrent son activation et son implication dans la protéolyse d'exercice. La caspase-3, enzyme pro-apoptotique, aurait un rôle dans la dégradation des protéines myofibrillaires et est donc potentiellement impliquée à la suite d'exercices traumatisants. Il n'est pas non plus à exclure un rôle des calpaines plus particulièrement dans les exercices excentriques en raison de ses substrats spécifiques : les protéines sarcomériques ainsi que de la fuite du calcium résultats des dommages musculaires. Dans cette perspective, les MMPs impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire, pourraient intervenir dans la dégradation des protéines myofibrillaires. Chacun de ces systèmes peut donc contribuer à la protéolyse induite par un exercice en résistance et spécifiquement lorsque celui-ci est exécuté en mode excentrique. De plus, certains systèmes (UPS, LAS) sont davantage en lien avec le statut énergétique de la cellule alors que d'autres (caspases, calpaines, MMPs) semblent davantage impliqués dans le remodelage musculaire (hypertrophie, phénotype) induit par l'entraînement et/ou un traitement pharmacologique. Ainsi, dans des perspectives de maintien ou de gain de masse musculaire, il peut être intéressant d'augmenter la balance protéique post-exercice en limitant la protéolyse notamment celle activée lors d'un statut nutritionnel inadéquat. Les acides aminés essentiels apparaissent alors comme une stratégie nutritionnelle efficace principalement pour la stimulation de la synthèse protéique et plus récemment dans l'inhibition de la protéolyse via la leucine.

b. Rôle des acides aminés essentiels sur la balance protéique après un exercice

i. Acides aminés essentiels et balance protéique

Les phases d'effort et les repas déterminent des alternances de périodes cataboliques et anaboliques. En situation de repos à jeun, le bilan protéique est négatif et majoré dans certaines situations d'atrophies musculaires telles que l'hypoxie, le vieillissement, l'alitement, certaines pathologies comme le diabète, la BPCO, le cancer... En revanche, un exercice physique de type résistance accompli à jeun produit dans les heures qui suivent un bilan protéique musculaire moins défavorable sans toutefois arriver à le positiver en l'absence d'apport nutritif [27]. Ainsi, la prise d'acides aminés s'avère essentielle pour optimiser la période anabolique post-exercice [388-390]. Plus généralement une supplémentation en acides aminés serait intéressante lors de situations cataboliques pour optimiser la balance protéique en stimulant la synthèse protéique notamment [391-393]. De manière plus précise, il est admis que seuls les acides aminés essentiels (AAE) et parmi ceux-ci plus spécifiquement les acides aminés branchés (AAB) et la

L-leucine en particulier ont un effet sur la synthèse protéique [394-396]. En effet, des prises importantes entre 10 à 20g d'acides aminés essentiels au décours d'un exercice physique, chez le sujet jeune ou âgé contribuent à améliorer de façon similaire la protéosynthèse [30, 392, 397, 398]. L'action positive des AAE sur la balance protéique musculaire se ferait davantage sur la synthèse protéique plutôt que sur l'inhibition de la protéolyse. Cependant, dans des situations cataboliques, la leucine posséderait davantage une action anti-protéolytique [399-401]. Ainsi, une supplémentation en leucine contribuerait à inhiber l'activation de l'UPS chez le rat âgé [110] ainsi que l'augmentation de la protéolyse chez des rats cancéreux [402]. Un rôle de la leucine sur l'inhibition de la protéolyse induite d'exercice peut donc être envisagé comme stratégie d'optimisation de la balance protéique en faveur de l'anabolisme. Si toutes les études s'intéressant à la prise d'AAE ou de compléments protéiques (*whey proteins*, caséine) sur la balance protéique d'exercice rapportent une augmentation de la synthèse protéique, aucune ne s'est intéressée ou n'a rapporté un effet de cette prise d'acides aminés sur la protéolyse [30, 389, 403, 404]. L'absence d'un effet anti-protéolytique de la leucine après un exercice peut s'expliquer par les quantités entre 1 et 8 grammes de leucine relativement faible au regard des quantités de $1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ administrées chez le rongeur. Ainsi, l'exercice de résistance associé à une supplémentation en AAB semble donc être un moyen efficace de contrôle de la masse musculaire chez les sujets âgés et/ou atteints de pathologies entraînant une fonte musculaire importante. Par ailleurs, des compositions en AAB enrichis en leucine s'avèrent être une perspective d'étude à envisager dans l'inhibition de la protéolyse induite d'exercice pour un meilleur contrôle de la masse musculaire.

ii. Voie signalétiques impliquées dans la stimulation de la balance protéique par les acides aminés branchés

L'activation de la synthèse protéique par les AAB et/ou l'exercice, impliquent les voies mTOR/p70S6K et mTOR/4EBP1 [70, 352, 396, 405, 406]. De manière plus précise, et contrairement à l'exercice, l'activation de mTOR par les AAB ne serait pas dépendante de la voie Akt [391] et donc des facteurs TSC1/TSC2, dont la phosphorylation par Akt permet de lever l'inhibition sur mTOR. En effet, la synthèse protéique par les AAB impliquerait une voie parallèle à la voie Akt/TSC activée par l'insuline suite à la prise de glucose et/ou l'exercice. L'activation de la voie mTOR/p70S6K/4EBP1 par les AAB et particulièrement la leucine, serait médiée par d'autres protéines kinases dont Vps34 [362, 363] et/ou MAP4K3 (*mitogen-activated protein 4 kinases 3*) [407] dont les rôles ne sont pas clairement définis. La protéine Vps34 semble alors être au carrefour de la régulation de la synthèse protéique et/ou de l'autophagie [365] à la fois à la suite d'un exercice [357, 366] et d'une supplémentation en leucine [362, 363]. Récemment, la phospholipase D1 (PLD1) a été mise en évidence comme cible potentielle de Vps34 dans la stimulation de mTOR par les acides

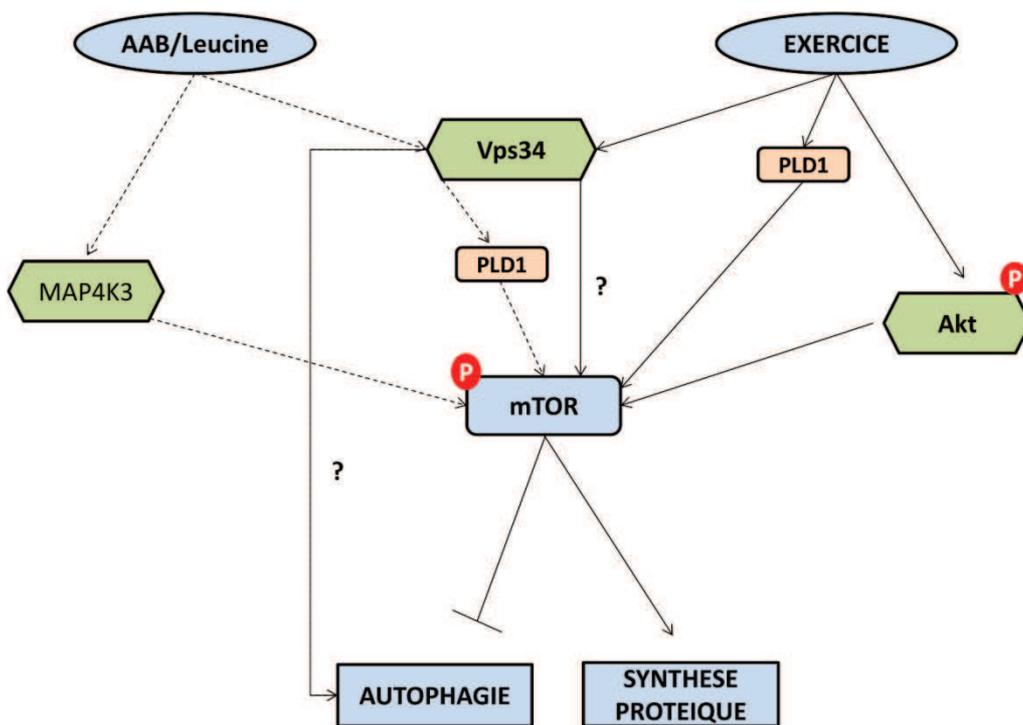


Figure 20. Perspectives de régulation de l'autophagie et de la synthèse protéique par la leucine et l'exercice

aminés[408]. Par ailleurs, la PLD1 est également impliquée dans l'activation de la synthèse protéique via mTOR à la suite de contraction en excentrique [409]. Ces données récentes mettent en évidence de nouvelles pistes d'étude du contrôle de la synthèse protéique et/ou de l'autophagie via Vps34/PLD1 par les AAB et/ou l'exercice de résistance (*Figure 20*).

L'exercice en résistance ainsi que les acides aminés branchés et plus particulièrement la leucine sont des stimuli indépendants capables d'activer la synthèse protéique. Par ailleurs, l'effet anti-protéolytique de la leucine a pu être démontré dans des cas de catabolismes exacerbés tels que les cachexies ou la sarcopénie. Si l'on considère que l'exercice en résistance concourt à augmenter à la fois la synthèse protéique mais également la protéolyse ; une stratégie nutritionnelle riche en leucine associée à l'exercice en résistance pourrait s'avérer intéressante dans le contrôle de la masse musculaire. Par ailleurs, la protéine Vps34, senseur des concentrations intracellulaires en leucine pour l'activation de mTOR serait également activée par l'exercice probablement pour la stimulation de l'autophagie suggérant un rôle double de cette protéine (*Figure 20*). Ainsi, une supplémentation en acides aminés branchés enrichis en leucine pourrait être un moyen efficace pour augmenter la synthèse protéique induite d'exercice mais également inhiber en partie la protéolyse dans un objectif de prise de masse musculaire.

OBJECTIFS

Dans ce contexte, une petite partie du travail de cette deuxième partie de thèse a consisté en une collaboration au sein de l'équipe, aux travaux de thèse d'Aymeric Douillard pour étudier l'implication du système des calpaines dans l'hypertrophie musculaire induite par un traitement prolongé au clenbutérol (**Etude n°2**). Ainsi, deux modèles ont été utilisés pour comprendre le rôle des calpaines dans la médiation des effets du clenbutérol sur le remodelage musculaire à travers :

- L'inhibition pharmacologique des calpaines 1 et 2 parallèlement à un traitement au clenbutérol sur des cellules satellites de souris.

- La surexpression de la calpastatine par électrotransfert dans le *Tibialis Anterior* de souris traitées 21 jours au clenbutérol

Ensuite, les travaux majeurs de cette deuxième partie ont été consacrés à l'étude de l'impact d'une stratégie nutritionnelle en acides aminés branchés et plus particulièrement en leucine sur la protéolyse induite par un exercice de résistance et plus spécifiquement réalisé en mode excentrique (**Etude n°3**). L'objectif étant de montrer dans quelle mesure l'exercice couplé à la prise de leucine pourrait être envisagé à la fois comme outil thérapeutique simple de mise en œuvre pour lutter contre la perte de masse musculaire mais également envisagé dans une stratégie de récupération ou de prise de masse musculaire chez le sportif. Ainsi, l'adaptation d'un modèle d'exercice excentrique réalisé *ex vivo* sur muscle isolé de rat a été utilisé pour :

- Déterminer la part des différents systèmes protéolytiques impliqués dans la protéolyse induite d'exercice

- Caractériser les différents marqueurs moléculaires et voie de signalisation des systèmes protéolytiques impliqués à la suite de cet exercice

- Etudier le rôle anti-protéolytique de la leucine sur les systèmes de dégradation activés par l'exercice en particulier l'autophagie

MATERIELS ET METHODES

I- PLANS EXPERIMENTAUX

Toutes les expérimentations ont été approuvées par le Comité d'éthique d'expérimentation Animal du Languedoc Roussillon (n° de saisine : CEEA-LR-1069) et en accord avec les recommandations du Guide pour le Soins et l'Utilisation des Animaux de Laboratoire de l'Institut National Français pour la Santé. Toutes les dissections ont été réalisées sous anesthésie par une injection de Pentobarbital et toutes les précautions ont été prises pour minimiser la souffrance des animaux.

a. Etude n°1 : Implication de la voie IL-6/STAT3 dans l'hypertrophie musculaire induite par un entraînement en résistance

Une échelle (hauteur 1m, espacement des barreaux de 2cm, inclinaison 85°) a été construite au sein du laboratoire selon le modèle décrit par Lee *et al.* (2004) et utilisée pour les protocoles d'exercice et d'entraînement en résistance. Dans un 1^{er} temps, les rats étaient placés en bas de cette échelle et devaient monter volontairement jusqu'en haut. Après une semaine de familiarisation, les protocoles d'exercice et d'entraînement ont pu commencer. Des charges étaient attachées à la base de leur queue et les poids soulevés étaient placés dans de petits sacs en tissus et fixés à la queue des rats par un adhésif en velcro.

i. Protocole d'entraînement en résistance

Après une semaine d'adaptation, 36 rats mâles (Wistar Han) ont été répartis par randomisation en 6 groupes : CTL2, CTL4, CTL10 (CTL= contrôle non entraînés, n=6 par groupe) et E2, E4, E10 incluant respectivement des rats entraînés pendant 2, 4 et 10 semaines (Entraînement, n=6 par groupe). La charge initiale soulevée a été déterminée en fonction du poids corporel du rat et débutait à 50%. Les rats étaient placés en bas de l'appareil d'escalade et étaient autorisés à se reposer sur une plateforme pendant 2 minutes à l'issue de la montée. Le protocole d'entraînement consistait en 10 répétitions ou montées, 5 fois par semaine pendant 2 (E2), 4 (E4) et 10 (E10) semaines. Le poids des rats était relevé tous les matins des jours d'entraînement de façon à déterminer quotidiennement la charge à soulever et l'exercice était ensuite réalisé l'après-midi. La charge était augmentée de 10% tous les 2 jours uniquement si l'animal était capable d'accomplir les 10 répétitions au cours de la séance précédente. Un test pour déterminer la répétition maximale a été effectué pour le groupe 10 semaines à la fin du protocole. Celle-ci correspondait à la charge maximale pouvant être soulevée en une répétition. A l'issue du protocole d'entraînement et 72 heures après le dernier exercice, les rats ont été sacrifiés par injection létale de pentobarbital 50mg.kg⁻¹ (Penthotal®). Les muscles des pattes arrières, *Extensor Digitorum Longus* (EDL) et *Soleus* (SOL) ainsi que des muscles des pattes avant *Flexor Digitorum Profundus* (FDP) ont été prélevés afin d'observer les effets du protocole sur des typologies musculaires différentes de muscles

potentiellement les plus impliqués dans ce type d'exercice. Les muscles prélevés ont ensuite été plongés dans de l'isopentane refroidi par l'azote liquide et conservés jusqu'à utilisation à -80°C .

ii. Protocole d'exercice aigu en résistance

Après la semaine d'adaptation, 12 rats (Wistar Han) ont été répartis par randomisation en trois groupes : Repos ($n=4$) dont les animaux ont été sacrifiés avant l'exercice, E2H ($n=4$) et E6H ($n=4$) pour lesquels les animaux ont été respectivement sacrifiés 2 et 6 heures après l'exercice aigu. Les animaux de chaque groupe ont reçu une dose de $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de bromodeoxyuridine (BrdU, *B5002*, *Sigma Aldrich*) en intrapéritonéale, 24 heures avant le sacrifice afin d'identifier les cellules en mitotiquement actives. L'après-midi, les rats des groupes E2H et E6H ont effectué le protocole d'exercice suivant : 4 montées à 25%, 50%, 75% du poids corporel et 6 montées à 100% soient 18 montées au total. Les animaux opéraient un repos de 2min entre chaque répétition. A l'issue du protocole, les rats ont été sacrifiés par injection létale de pentobarbital $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Pentotal®) et le muscle FDP uniquement a été prélevé et plongé dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide pour une conservation à -80°C .

b. Etude n°2 : Implication des calpaines dans la médiation des effets hypertrophiques du clenbutérol chez la souris

Les souris utilisées pour ces expérimentations étaient des souris F2 issues du croisement de deux hybrides F1 issus eux-mêmes d'un croisement de deux souches pures, des femelles C57BL/6 et des mâles CBA. Ces souris âgées de 7 semaines environ pesaient en moyenne 26 grammes en début de protocole. Le remodelage musculaire induit par le clenbutérol (Cb) n'est pas significatif avant 10 jours au cours d'un traitement chronique. Ainsi, les souris ont reçu une injection sous-cutanée quotidienne de $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de clenbutérol pendant 21 jours ainsi qu'une électroporation dans les tibialis antérieurs (TA) à J0 et J11 du plasmide pcDNA3-calpastatine ou du vecteur vide pcDNA3. Ces différents traitements permettent de constituer 4 groupes ($n=8$ par groupe) :

- CTL : TA gauche électroporé avec pcDNA3 + injection saline
- Cpst : TA droit électroporé avec pcDNA3-calpastatine+ injection saline
- Cb : TA gauche électroporé avec pcDNA3 + injection clenbutérol
- Cb+ Cpst : TA droit électroporé avec pcDNA3-calpastatine+ injection clenbutérol

Les souris étaient sacrifiées 24 heures après la dernière injection de clenbutérol par dislocation cervicale et les TA prélevés, plongés et congelés dans de l'isopentane refroidi par l'azote liquide pour une conservation à -80°C

c. Etude n°3 : Implication des différents systèmes protéolytiques dans la protéolyse induite par un exercice en résistance et/ou le jeûne

i. Expériences ex vivo, sur muscle isolé

1. Protocole de contractilité

Un appareil de contractilité sur muscle isolé (model 805, *Aurora Scientific*) a été utilisé afin de générer des contractions musculaires grâce à l'induction d'un courant électrique. Un muscle de petit animal fraîchement disséqué est placé dans un bain d'incubation gazé (95% O₂, 5% CO₂), entre deux électrodes et attaché au niveau de ses tendons à un transducteur de force/longueur contrôlé par un ordinateur. Ce système permet de générer une stimulation électrique ou d'induire des modifications de force et de longueur du muscle tout en récupérant grâce à un système d'acquisition (*DMC v. 4.1.6, Aurora scientific*) des mesures fonctionnelles du muscle en contraction à une fréquence préalablement déterminée.



Appareil de contractilité ex vivo
(modèle 805A, *Aurora Scientific*)

Dans notre étude le muscle EDL a été utilisé pour sa facilité de fixation par ses 2 tendons sur le transducteur de force. Le muscle était placé à sa longueur de repos (L_0) définie comme la longueur du muscle permettant de générer une force isométrique maximale. Des contractions musculaires maximales ont ensuite été générées sur muscle étiré à une longueur de 5% de L_0 , afin de reproduire un protocole de contractions excentriques. Ces contractions ont été induites à une fréquence de 100Hz avec un train de stimulation de 0,5ms à 150Hz pendant 10s soit 19 contractions. A l'issue, le muscle retrouvait sa L_0 et était maintenu au repos pendant 1min avant de réitérer le protocole et cela 15 fois. Ce protocole de contraction permettait de mimer un exercice excentrique de type résistance puisque chaque contraction était maximale avec un temps de contraction de 15 x 9,5secondes soit 2min 22s pour 296 contractions au total.

2. Approche expérimentale

Les muscles EDL étaient prélevés sur des rats Wistar mâles de 250-300g anesthésiés au pentobarbital (Penthotal®). Certains ont été mis à jeun le soir précédent l'expérience c'est à dire

pendant 12 heures (groupe *A Jeun = AJ*) tandis que d'autres ont été nourris « ad libitum » (groupe *Non A Jeun = NAJ*). Des précautions ont été prises lors de la dissection afin de ne pas tirer sur le muscle et de garder un des deux tendons intacts pour permettre sa fixation sur le transducteur de force/longueur. Le muscle était alors incubé pendant 15min afin qu'il s'équilibre, dans un milieu à 30°C de Krebs-Ringer gazé (95% O₂, 5% CO₂) composé de (mM): 120 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,8 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄; 2,5 CaCl₂, 5 Glucose, 5 HEPES à pH 7,4 (**Krebs 1**). Après ce temps d'équilibration, la longueur de repos (L₀) a été déterminée et le protocole de contractilité en excentrique appliqué (groupe *Exercice = EX*). A l'issue du protocole, le muscle était détaché, fixé tendon à tendon à L₀ par des minuties sur un morceau de silicone puis incubé dans 3ml de milieu de Krebs-Ringer gazé à 30°C pendant 1 heure en présence de 0,1% BSA (Bovine Serum Albumine, 98% free fatty acid, A7030, Sigma) (**Krebs 2**) et 0,5mM de cycloheximide (C7698, Sigma). Des muscles n'ont pas été soumis au protocole de contractilité afin de servir de muscles contrôles (groupe *Contrôle= CTL*) et ainsi ont directement été incubés pendant 1 heure après les 15min d'équilibration. Le milieu d'incubation était ensuite récupéré pour déterminer la protéolyse fonction de la concentration en tyrosine dans le milieu, mesurée par spectrofluorimétrie. Le muscle était ensuite séché, pesé puis congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C pour son utilisation a posteriori. Dans l'objectif de déterminer la part des différents systèmes protéolytiques dans la dégradation protéique à la suite du protocole de contractilité, des inhibiteurs de certains systèmes majeurs de dégradation ont été ajoutés après la contractilité dans le milieu d'incubation du muscle pendant 1 heure.

Ainsi nous avons utilisé :

- Pepstatine A (10µM, P5318, Sigma) + E64d (10µM, E8640, Sigma) pour inhiber le LAS
- 3-méthyladénine (3-MA, 10mM, M9281, Sigma) pour inhiber le système autophagique uniquement
- MG132 (40µM, 3175-V, Wako Chemicals) ou lactacystine (20µM, clasto-Lactacystin β-lactone, L7035, Sigma) pour inhiber l'UPS

Dans un 1^{er} temps, nous avons donc constitué les groupes suivants :

- Contrôle A Jeun (CTL AJ) : EDL de rat mis à jeun pendant 12 heures, sans contractilité (n=19)
- Exercice A Jeun (EX AJ) : EDL de rat mis à jeun pendant 12 heures, avec contractilité (n=10)

- Exercice A Jeun + pepstatineA+E64d (EX AJ + pepstatineA+E64d) : EDL de rat mis à jeun pendant 12 heures, avec contractilité puis inhibition du LAS (n=10)
- Exercice A Jeun + 3-MA (EX AJ + 3-MA) : EDL de rat mis à jeun pendant 12 heures, avec contractilité puis inhibition du système autophagique (n=10)
- Exercice A Jeun + MG132 (EX AJ + MG132) : EDL de rat mis à jeun pendant 12 heures, avec contractilité puis inhibition de l'UPS (n=6)

Au regard des résultats obtenus, nous avons ensuite ajouté les groupes suivants afin de déterminer la part des différents systèmes protéolytiques dans la protéolyse induite par les 12 heures de jeûne :

- Contrôle A Jeun + pepstatineA+E64d (CTL AJ + pepstatineA+E64d) : EDL de rat mis à jeun pendant 12 heures, sans contractilité puis inhibition du LAS (n=4)
- Contrôle A Jeun + 3-MA (CTL AJ + 3-MA) : EDL de rat mis à jeun pendant 12 heures, sans contractilité puis inhibition du système autophagique (n=8)
- Contrôle A Jeun + MG132 (CTL AJ + MG132) : EDL de rat mis à jeun pendant 12 heures, sans contractilité puis inhibition de l'UPS (n=5)

Les résultats issus des groupes ci-dessus, ont présentés des difficultés d'analyse. En effet, le MG132 a contribué à augmenter la protéolyse du groupe *CTL AJ + MG132* suggérant un problème de spécificité. L'inhibiteur présenté comme davantage spécifique dans la littérature, la lactacystine, a donc été utilisé. De plus, aucun des autres inhibiteurs n'a permis d'inhiber la protéolyse obtenu en condition sans inhibiteur (*CTL AJ*) ainsi une absence d'effet de la mise à jeun a été soulevée, nous amenant à mesurer la protéolyse chez des rats nourris « *ad libitum* ».

- Contrôle Non A Jeun (CTL NAJ) : EDL de rat nourris « *ad libitum* », sans contractilité (n=10)
- Exercice Non A Jeun (EX NAJ) : EDL de rat nourris « *ad libitum* », avec contractilité (n=3)
- Contrôle A Jeun + lactacystine (CTL AJ + lactacystine) : EDL de rat mis à jeun pendant 12 heures, sans contractilité puis inhibition de l'UPS (n=4)
- Exercice A Jeun + lactacystine (EX AJ + lactacystine) : EDL de rat mis à jeun pendant 12 heures, avec contractilité puis inhibition de l'UPS (n=7)

ii. *Expériences In vivo : modèle d'exercice en résistance chez le rat*

L'objectif étant la mesure de la balance protéique à la suite d'un exercice en résistance, des expériences préliminaires ont été menées afin de déterminer le timing de mesure post-exercice le plus approprié pour obtenir une balance protéique positive la plus grande possible

Les rats étaient mis à jeun le matin pendant 4 heures puis en utilisant le modèle de l'échelle d'escalade, le protocole suivant était appliqué :

Les animaux ont ensuite été sacrifiés 1, 2 ou 3 heures après la fin de l'exercice. Les muscles EDL, SOL et FDP ont été prélevés, pré-incubés 30 minutes dans une solution de *Krebs1* puis incubés pendant 1 heure dans 1,5ml de *Krebs2* gazé à 30°C en présence de L-[¹⁴C(U)]-Phénylalanine, (*NEC284E, Perkinelmer*) pour mesurer la synthèse protéique et dans certains cas en présence de 3-MA (10mM). Le milieu était ensuite récupéré pour mesurer la balance protéique et les muscles congelés dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

iii. *Expériences In vitro : Culture cellulaire L6*

Des études préliminaires ont été réalisées sur des myotubes L6 de rats à 7 jours de différenciation (J+7). Les cellules étaient mises en culture et maintenues dans un milieu de DMEM (*D5796, Sigma*) enrichis avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, *500105Y, Pan Biotech*) dans une étuve sous atmosphère 95% O₂/5%CO₂. Le SVF était ensuite remplacé par 2% sérum de cheval (*500131, Pan Biotech*) afin de stimuler la différenciation. A J+7 de différenciation, le milieu de DMEM était remplacé par un milieu déprimé en nutriments appelé *PBS atrophie*. Selon les conditions, les cellules étaient placées quelques heures dans ce milieu afin d'induire des mécanismes mimétiques des situations d'atrophie ou de jeûne [410, 411]. A l'issue, le milieu était remplacé par un milieu identique de *PBS atrophie 1X* mais contenant différents traitements présentés ci-dessous. A la fin du traitement, le milieu était récupéré pour le dosage de la protéolyse et les cellules récupérées pour le dosage protéique, la quantification de protéines et de gènes d'intérêt.

PBS Atrophie (10X)

53,6 mM KCl

16,6 mM MgSO₄

1M NaCl

262 mM NaHCO₃

9 mM NaH₂PO₄, 2H₂O

Extemporément

2,38 mM CaCl₂ (238mM ; 100x)

Filtrer sur 0,22µm

Expérience n°1 (1 culture) : Effet dose-réponse de la L-leucine

4 heures *PBS atrophie*

Boîtes de 60mm, 2 boîtes par condition

Traitement sur 2 heures en présence de cycloheximide (0,5mM)

- PBS atrophie + leucine (5mM)
- PBS atrophie + leucine (10mM)
- PBS atrophie + leucine (20mM)
- PBS atrophie + MG132 (10 μ M)
- PBS atrophie + 3-MA (5mM)
- PBS atrophie + pepstatine (10 μ g.ml⁻¹) + E64d (10 μ g.ml⁻¹) + 3-MA
- PBS atrophie + pepstatine + E64d + MG132
- PBS atrophie + pepstatine + E64d + MG132+3-MA

Expérience n°2 (1 culture) : Effet de L-leucine et différents inhibiteurs

4 heures *PBS atrophie*

Boîtes de 100mm, 2 boîtes par condition

Traitement sur 3 heures en présence de cycloheximide (0,5mM)

- PBS atrophie + leucine (5mM)
- PBS atrophie + MG132 (10 μ M)
- PBS atrophie + pepstatineA (10mg. μ l⁻¹) + E64d (10 μ g.ml⁻¹)
- PBS atrophie + 3-MA (5mM)
- PBS atrophie + pepstatineA (10 μ g.ml⁻¹) + E64d (10 μ g.ml⁻¹) + 3-MA
- PBS atrophie + 1-butanol (0,5%)
- PBS atrophie + 1-butanol + leucine

II- MISE EN EVIDENCE DE LA TYPOLOGIE ET DE L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRE : ETUDE N°1 ET 2

a. Contenu en protéine et ADN : étude n°1

i. Extraction protéique et de l'ADN

La méthode d'Adams&McCue (1998) [48] permettant l'extraction et la quantification des protéines totales et myofibrillaires a été modifiée pour récupérer du contenu en ADN à partir de la même solution d'homogénéisation.

Environ 15 à 30mg étaient récupérés sur le cryostat puis broyés à l'aide d'un piston en téflon dans dix fois le volume du muscle d'une solution tampon composée de 100mM KCL et 5mM EDTA (pH 7) à

4°C. 25µl étaient prélevés et homogénéisés volume à volume dans du PBS (25mM Na₂HPO₄, 1M NaCl, pH 7,4) à 4°C, puis congelés à -20°C pour le dosage du contenu en ADN. L'homogénat restant était ensuite dilué volume à volume dans le tampon KCL/EDTA précédent. Un aliquot de 20µl était congelé à -20°C pour le dosage des protéines totales. L'extraction des protéines myofibrillaires était réalisée à partir de l'homogénat précédent par centrifugation à 1000g pendant 10mn à 4°C. Le surnageant de chaque échantillon était éliminé après la centrifugation et le culot est repris successivement deux fois dans trois solutions de lavage : **solution 1** : 250mM sucrose, 100mM KCl, 20mM imidazole et 5mM EDTA (pH 6,8) ; **solution 2** : 0,5% Triton X-100 and 175mM KCl (pH 6,8) ; **solution 3** : 150mM KCl et 20mM imidazole (pH 7). Le culot final était suspendu dans 50µl d'une solution de NaCl (500mM) et l'échantillon congelé à -20°C.

ii. Dosage des protéines totales et myofibrillaires

Les concentrations en protéines totales et myofibrillaires étaient déterminées en utilisant la méthode BCA (*BCATM*, #23225, Pierce®, France) sur plaque ELISA. L'absorbance du complexe, proportionnelle à la concentration protéique, était mesurée par spectrophotométrie (Elx 800, Biotek) à une longueur d'onde de 570 nm et lue contre une droite étalon exprimée en mg/ml.

iii. Dosage du contenu en ADN

La concentration des échantillons en ADN était déterminée après dilution au 1/4^e dans une solution de TEN (TRIS 10mM, EDTA 0,1mM, NaCl 0,5mM) et quantifiée par fluorescence avec Hoescht 33258 (bizbenzimidazole), un composé fluorescent (λ excitation: 365nm, λ émission: 450nm) très sensible et spécifique de l'ADN qui permet de détecter des concentrations situées entre 1 à 50µg/ml. La fluorescence du complexe mesurée au luminomètre (Synergy2, Biotek) à une absorbance de 260nm est proportionnelle à la concentration en ADN. La fluorescence de l'échantillon est lue contre une droite étalon établie à partir de l'ADN de sperme de saumon (*D-1626, Sigma*).

b. Technique d'immunohistochimie

Cette technique consiste à appliquer un anticorps primaire spécifique de la protéine à révéler puis un anticorps secondaire couplé à un système enzymatique ou fluorescent pour la révélation au microscope.

i. Coupes musculaires

Des coupes de muscles ont été réalisées dans un cryostat (Microm HM 560, Microm Microtech, France) à -20°C. Le muscle était placé sur un support d'OCT et des coupes transversales sériées (10 µm) ont été réalisées sur lame polysilicium et conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

ii. Immunohistochimie des chaînes lourdes de myosines (MHC) : études 1 et 2

Les coupes musculaires étaient fixées dans l'acétone pendant 10 minutes puis rincées 3 fois avec du tampon phosphate pH 7,4 (PBS 1X). Après fixation, les lamelles étaient saturées dans une solution contenant du PBS 1X avec 2% de BSA pendant 30 minutes. Les coupes étaient ensuite incubées 2 heures à température ambiante, dans une solution de PBS/BSA 2% et contenant les anticorps primaires monoclonaux (*DSHB, Université d'Iowa*) spécifique aux MHC-I (*A4-971*), MHC IIa (*2F7*), MHC IIx (*6H1*) et MHC-IIb (*10F5*). Après 3 rinçages au PBS 1X, un anticorps secondaire couplé à une peroxydase rabbit anti-mouse IgG (*A-9044, Sigma*) était déposé sur les coupes pendant 1 heure à 37°C en chambre humide. Les coupes étaient révélées grâce au kit *NovaREDTM* (*Vector® Lab, USA*) et enfin montées sur lame avec du Mowiol. Les coupes musculaires étaient ensuite photographiées à l'aide d'un microscope (*ZEISS Axiophot*) couplé à une caméra numérique CCD, reliée à un ordinateur. Le comptage des différents types de fibres ainsi que le calcul de leur surface de section ont été réalisés à l'aide du logiciel *ImagJ®* à un grossissement x10 sur 1500 fibres par groupe (250 fibres par muscles, n=6).

iii. Immunofluorescence pSTAT3 et Pax7 : étude n°1

Les coupes musculaires ont été utilisées pour co-marquer les protéines pSTAT3 et Pax7 afin de distinguer la localisation cellulaire de la protéine STAT3 activée (pSTAT3) soit au sein des myocytes soit au sein des cellules satellites en quiescence ou active (cellules Pax7⁺). Avant de débiter l'immunofluorescence, les sections musculaires ont été réhydratées dans du PBS 1X. Pour le marquage pSTAT3 et Pax7, les coupes ont été saturées dans 1% BSA pendant 1 heure à température ambiante. Les anticorps primaires ont été incubés dans du PBS avec 0,1% Triton X-100 et 1% BSA toute la nuit à 4°C. La solution de PBS 1X a été utilisée pour toutes les étapes de lavages à l'exception de l'anticorps Pax7 pour lequel une solution de TBS (Tris Buffered Saline) a été utilisée. Les coupes ont été incubées une première fois avec l'anticorps anti-pSTAT3 puis une 2^e fois avec l'anti-Pax7. Après incubation avec pSTAT3 (1/50), les coupes ont été rincées et un anticorps secondaire *goat anti-rabbit* couplé à un fluorochrome (1/1000, Alexa Fluor® 488, #A-11034, Invitrogen Life Technologies) a été appliquée pendant 30 minutes à 37°C puis les coupes ont été fixées dans une solution à 1% de paraformaldéhyde (PAF) pendant 10 minutes avant d'être incubées avec le 2^e anticorps primaire anti-Pax7 (non dilué) toute la nuit à 4°C. Après rinçage, l'anticorps *goat anti-mouse* (1/1000; Alexa Fluor® 568, #A-11031, Invitrogen Life technologies) a été appliqué pendant 30 minutes à 37°C sur les coupes. Après un rinçage rapide, l'intercalant nucléique fluorescent Hoescht a été appliqué puis les coupes ont été une dernière fois fixées au PAF avant d'être montées sur lame.

iv. Co-marquage immunofluorescent BrdU et laminine : étude n°1

Un double marquage avec les anticorps anti- BrdU et anti-laminine a été réalisé pour observer les SCs mitotiquement actives. Les coupes préalablement réhydratées dans du PBS, ont été fixées 5min dans 4% de PAF (pH 7.2) puis rincées au PBS et placées dans une solution de HCl (2M) à 56°C pendant 30 minutes afin de dénaturer les doubles brins de l'ADN. Après une étape de neutralisation dans une solution de sodium borate (0,1M ; pH 8,5) pendant 10 minutes, les coupes rincées ont été saturées dans du sérum normal de chèvre (normal goat serum, 1/30, G9023, Sigma) pendant 1 heure à 25°C. L'anticorps anti-BrdU (B-2531, Sigma) a été appliqué en 1^{er} pendant 2 heures à 25°C après dilution (1/50) dans une solution de PBS avec 0,2% BSA et 0,05% Tween-20. Après rinçage au PBS, l'anticorps secondaire, *goat anti-mouse* (1/250, Alexa Fluor® 568, #A-11031, Invitrogen) a été déposé pendant 1 heure 30 à 25°C. Après fixation au PAF (4%), les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-laminine (1/50, L9393, Sigma) diluée dans 1% BSA pendant 30 minutes à 37°C. Après rinçage, l'anticorps secondaire *goat anti-rabbit* (1/1000, Alexa Fluor® 488) a été appliqué sur les coupes pendant 30 minutes à 37°C suivant d'une dernière fixation au PAF (4%).

Toutes les sections musculaires étaient montées sur lame polysilane avec le milieu de montage Dako (#S3023, Dako) et les images obtenues à l'aide d'un microscope (ZEISS Axiophot) couplé à une caméra numérique CCD, reliée à un ordinateur et analysées avec le logiciel ImageJ®.

Les cellules marquées avec le BrdU étaient considérées comme des cellules satellites lorsqu'elles étaient situées entre la lame basale visualisée par le marquage de la laminine. Elles étaient exprimées en pourcentage du nombre de fibres (500 fibres comptées par muscle, n=4).

III- TECHNIQUE D'ELECTROPORATION DES PLASMIDES : SUREXPRESSON DE LA CALPASTATINE (ETUDE N°2)

a. Développement et extraction du plasmide

Un plasmide désigne une molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique capable de réplication autonome [412] Le plasmide de la calpastatine, nous a été gracieusement offert par l'équipe USC2009 Protéolyse, Croissance et Développement Musculaire (UPCDM Université Bordeaux I) du Pr. P. Cottin. Le plasmide était constitué d'un fragment de 2,5kb inséré entre Hind III et Bam II de CD136 (pRSV-CSN) dans le site de multiclonaage (MCS) de pcDNA3-Neo. La réplication des plasmides contrôles (pcDNA3) et calpastatine (pcDNA3-calpastatine) a été effectuée dans des lignées bactériennes d'E.Coli placées pendant une nuit dans un milieu de croissance (LB-medium, Tryptone ; extrait de levure ; NaCl ; Q-Bio gene) et d'ampicilline à 37°C sous agitation. L'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée à l'aide du kit d'extraction JETstar (*Genomed, Löhne, Allemagne*). La procédure consistait à lyser les bactéries par un détergent en milieu alcalin

(SDS/NaOH) afin de libérer l'ADN génomique et plasmidique. Le lysat obtenu était placé dans les colonnes de purification qui permettaient de séparer l'ADN plasmidique de l'ARN, des protéines ainsi que des autres impuretés. Puis, le plasmide était précipité dans de l'isopropanol (C_3H_8O) et centrifugé pour être ensuite lavé dans l'éthanol afin de dissoudre les sels et restituer les propriétés physico-chimiques à l'ADN. Enfin, le plasmide était repris en suspension dans du tampon ou dans du sérum physiologique en fonction de l'utilisation future. Le dosage de l'ADN a été réalisé ensuite à l'aide d'un spectrophotomètre avec une lecture à longueur d'onde de 260 nm (biophotometer, eppendorf, Le Pecq, France). La concentration finale en plasmide était ajustée à 1mg/mL.

b. Electroporation des plasmides

Les souris étaient anesthésiées par inhalation d'isoflurane (0.75% à 1% O_2) avant de recevoir 50µl d'une injection de hyaluronidase bovine (0.4U/µl) dans les muscles TA. Cette enzyme hydrolyse l'acide hyaluronique responsable de la viscosité des tissus et accroît donc la perméabilité tissulaire. Une heure après, les souris étaient injectées avec une solution de kétamine (100mg.kg⁻¹) et xylazine (10mg.kg⁻¹) en intrapéritonéale et 15µg de plasmide pcDNA3-calpastatine étaient injectés dans les TA droits tandis que 15µg de plasmide vide pcDNA3 étaient injectés dans les TA gauches. Les muscles étaient ensuite soumis à un protocole de stimulation électrique : 65V, 6 séries de 6 pulses de 60ms espacés de 100ms, 5s entre les séries (Caliper électrode 384L ; générateur BTX ECM 830). Dans une étude préliminaire, l'efficacité de l'électroporation au cours du temps a été vérifiée sous microscope par un marquage fluorescent. Le même vecteur (pcDNA3) était couplé à la GFP (*green fluorescence protein*).

IV- MESURE DE LA BALANCE PROTEIQUE : ETUDE N°3

a. Dosage de la L-tyrosine par spectrofluorimétrie : mesure de la protéolyse

Les milieux d'incubation des muscles des expériences *ex vivo*, *In vivo* et *in vitro* ont été récupérés afin de mesurer la quantité de l'acide aminé tyrosine dans le milieu. La tyrosine est un acide aminé avec la phénylalanine et le tryptophane, composé d'une base aromatique. Son dosage peut donc être effectué par fluorescence. Cependant, dans le cas où une méthode non radioactive est choisi comme dans les expériences *ex vivo* et *in vitro*, il est obligatoire de stopper la synthèse protéique par du cycloheximide afin de bloquer la ré-incorporation de la tyrosine en protéine. Dans le cas de l'utilisation de la technique radioactive (décrite ci-dessous) utilisée dans les expériences *In vivo*, un simple calcul permet de déterminer la tyrosine ré-incorporée.

Les échantillons étaient conservés à -20°C depuis le jour de l'incubation. 1ml de milieu en dupliquât était réparti dans des tubes en polypropylène et 250µl d'acide perchlorique 1.5M (PCA) étaient

ajoutés. Une gamme étalon était établie à partir de solutions stocks de tyrosine. Le volume de chacun des points de gamme était également de 1ml auquel 250µl de PCA (1,5M) étaient ajoutés. La réaction s'effectuait dans un 1^{er} temps dans un mélange volume à volume de Nitrosonaphtol (solution à 1g/L dans Ethanol 95%) et Nitrite de Sodium (solution à 0,5g/L dans HNO₃ 14%) préparé extemporanément. 1,5ml de ce mélange étaient distribués dans les échantillons et points de gamme. Les tubes étaient ensuite protégés de l'obscurité et incubés 30 minutes dans un bain marie à 55°C. Le mélange nitrosonaphtol/nitrite de sodium ajouté à l'échantillon permettait après incubation à 55°C de transformer la tyrosine en un composé fluorescent. Après refroidissement à température ambiante, 5ml de dichloroéthane (C₂H₄Cl₂) étaient ajoutés dans les tubes qui étaient ensuite fortement agités pendant 2 minutes et centrifugés 2000g à 4°C pendant 5-10minutes. On obtenait 2 phases dont la phase supérieure aqueuse qui contenait le dérivé tyrosine et qui était dosé par fluorimétrie. L'ajout de dichloroéthane permettait d'extraire le nitrosonaphtol en excès et de retrouver le composé fluorescent dans la phase aqueuse après centrifugation. 1,5ml de la phase aqueuse étaient prélevés, déposés dans des cuves 4 faces optiques pour une lecture rapide (λ excitation = 460nm, λ émission = 570 nm) au spectrofluorimètre. La concentration en tyrosine dans le milieu était calculée à partir de la droite d'étalonnage et exprimée en nmole/ml de milieu. Elle correspondait à la quantité de tyrosine libérée par le muscle dans le milieu pendant le temps d'incubation. Cette quantité de tyrosine était normalisée par le poids du muscle (g) dans les expériences *ex* et *In vivo* et par la quantité de protéines (mg) dans les expériences *in vitro*.

b. Incorporation de L-[C¹⁴]-phénylalanine : Mesure de la synthèse protéique

Dans les expériences *in vivo*, les muscles EDL ont été pré-incubés 30 minutes dans un milieu de *Krebs1* à 30°C et gazés. Ces muscles étaient ensuite transférés pendant 1 heure dans un milieu frais de *Krebs2* dans lequel était ajouté 0,5 mM de phénylalanine froide (non radioactive) et de L-[C¹⁴]-phénylalanine (2,8 µCi/ml). Le milieu d'incubation était ensuite récupéré pour la mesure de la dégradation protéique par dosage de la tyrosine. Le muscle était utilisé pour la mesure de la synthèse protéique par comptage radioactif de la quantité de phénylalanine radiomarquée ré-incorporée au sein du muscle. Le muscle pouvait aussi être congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C pour une utilisation ultérieure.

Après avoir été pesé, le muscle était broyé à l'aide d'un polytron dans un tube en polypropylène avec 2ml d'eau distillée puis homogénéisé avec 2ml d'Acide Trichloracétique 20% (TCA 20%). Les tubes étaient ensuite placés dans de la glace pour laisser les protéines précipiter puis vortexés plusieurs fois jusqu'à ce que le précipité soit complètement dissout. L'homogénat était centrifugé à 4°C pendant 5min à 10 000g et le surnageant éliminé. Le culot constitué de la fraction protéique était lavé 3 fois avec 3ml de TCA 10% par centrifugations successives afin d'éliminer la radioactivité libre. Le culot restant était solubilisé dans 2ml de NaOH 1M pendant 1 heure à 37°C. 1,5ml de l'homogénat sodique

étaient ensuite placés dans un flacon à scintillation en présence de 300µl d'acide chlorhydrique (HCl) 5M et 10ml de liquide à scintillation (6013321, *Ultima Gold*, *PerkinElmer*). Un flacon à scintillation *Blanc* contenant 1,5ml de NaOH 1M et 300µl de HCl 5M permettant de déterminer le bruit de fond lié au comptage était rajouté. Enfin, 2 flacons à scintillation *Témoins* étaient nécessaires pour déterminer la radioactivité spécifique de l'expérience à partir de 150µl de *Krebs2* radioactif, 1,5ml de NaOH 1M et 300µl de HCl 5M. L'ajout de HCl permet de neutraliser la soude afin que celle-ci ne soit pas comptée par chimioluminescence. Les flacons à scintillation étaient ensuite placés dans un compteur et la radioactivité était mesurée 5 minutes par flacon et exprimée en désintégrations par minute (dpm). Le calcul de la radioactivité spécifique de la phénylalanine (AS Phe) à partir des flacons témoins s'effectuait comme suit :

$$\text{AS Phe (dpm/nmole)} = (\text{moyenne radioactivité } \textit{Témoins}) / [^{14}\text{C-Phe}]_{\textit{Témoins}}$$

La radioactivité comptée (dpm) pour chaque échantillon était rapportée à la quantité de muscle (g) présente dans le flacon de comptage. La synthèse protéique s'exprimait en nmole de phénylalanine/g de muscle et se calculait comme suit :

$$\text{Synthèse protéique (nmole/g)} = [\text{radioactivité échantillon} / (\text{AS Phe})] / \text{poids muscle}$$

$$\text{Synthèse protéique (nmole/g)} = [^{14}\text{C-Phe}]_{\text{échantillon}} / \text{poids muscle}$$

La dégradation protéique correspondante au relargage de tyrosine par le muscle dans le milieu d'incubation et mesurée par fluorimétrie doit être ajoutée à la quantité de tyrosine recyclée au sein du muscle. Cette tyrosine recyclée participe à la synthèse protéique et ne se retrouve donc plus dans le milieu d'incubation. Pour calculer la quantité de tyrosine incorporée, il est considéré que pour une molécule de phénylalanine incorporée, 0,77 molécules de tyrosine sont incorporées dans le muscle. Ainsi la quantité de tyrosine recyclée dans un muscle correspond à $0,77 \times [^{14}\text{C-Phe}]_{\text{échantillon}}$. La protéolyse pour un muscle donné correspond donc à :

$$\text{Protéolyse (nmole/g)} = ([\text{L-tyrosine}]_{\text{milieu incubation}} + [\text{tyrosine recyclée}]_{\text{muscle}}) / \text{poids muscle}$$

$$\text{Protéolyse (nmole/g)} = ([\text{L-tyrosine}]_{\text{milieu incubation}} + [0,77 \times [^{14}\text{C-Phe}]_{\text{échantillon}}]_{\text{muscle}}) / \text{poids muscle}$$

V- ACTIVITES ENZYMATIQUES : CALPAINES, CHYMOTRYPSINE-LIKE DU PROTEASOME, CATHEPSINE L (ETUDES 2 ET 3)

a. **Activité chymotrypsine-like et cathépsine L : Etude 3**

Les protocoles décrits ci-dessous ont été gentiment diffusés par Cécile Jamart de l'unité EXR6 de la Faculté des Sciences de la Motricité de Louvain-la-neuve (Belgique) adaptés de la version originale issue du laboratoire de Sue Bodine à Davis (USA)

i. *Extraction des protéines cytosoliques*

Un échantillon de muscle des expériences *ex vivo* était broyé dans 30 volumes de tampon pH7.5 (50mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10% glycérol) auquel était ajouté extemporanément un cocktail d'inhibiteur de protéases (*P8340, Sigma*) qui ne contenait pas d'inhibiteur de thréonine protéase, activité essentielle de la sous-unité chymotrypsine-like ($\beta 5$). Ceci afin d'éviter d'obtenir des résidus d'activité chymotrypsine-like modifiant l'activité basale spécifique. L'homogénat protéique obtenu était centrifugé 1500g pendant 15 minutes à 4°C puis le surnageant était récupéré pour être centrifugé à 10 000g pendant 15 minutes à 4°C. Les protéines étaient ensuite dosées par la méthode BCA.

ii. *Mesure de l'activité chymotrypsine-like (sous-unité $\beta 5$) du protéasome par fluorescence*

Dans une microplaque noire de 96 puits et pour chaque échantillon, 1 puits servait à la mesure de la fluorescence non spécifique en présence de l'inhibiteur spécifique du protéasome, la lactacystine (20 μ M) et du substrat spécifique à la sous-unité $\beta 5$ (LLVY-AMC, 100 μ M); tandis que 2 puits réalisés en dupliquât permettaient la mesure de l'activité spécifique en présence uniquement du substrat. Un puits sans présence de l'échantillon mais uniquement du substrat servait de mesure du bruit de fond (« blanc »).

Pour la mesure de l'activité spécifique (AS), 4 μ l de DMSO, 10 μ l d'une solution tampon « UPS » 10X (250mM HEPES, 5mM EDTA, 0.3% SDS, pH 7.5) et 25 μ g de protéines cytosoliques étaient déposés pour un volume final de 100 μ l. L'activité non spécifique (ANS) était mesurée en dupliquât en déposant par puits : 4 μ l de lactacystine 0.5mM, 10 μ l d'une solution tampon « UPS » 10X (pH 7.5) et 25 μ g de protéines cytosoliques pour un volume final de 100 μ l. La plaque était ensuite placée dans un luminomètre, agitée pendant 10s puis recouverte d'aluminium pour une incubation à 25°C pendant 20 minutes. A l'issue, 10 μ l du substrat LLVY-AMC (N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin, *S6510, Sigma*) à 1mM étaient ajoutés rapidement dans chacun des puits et la plaque était lue à 25°C pendant 2 heures.

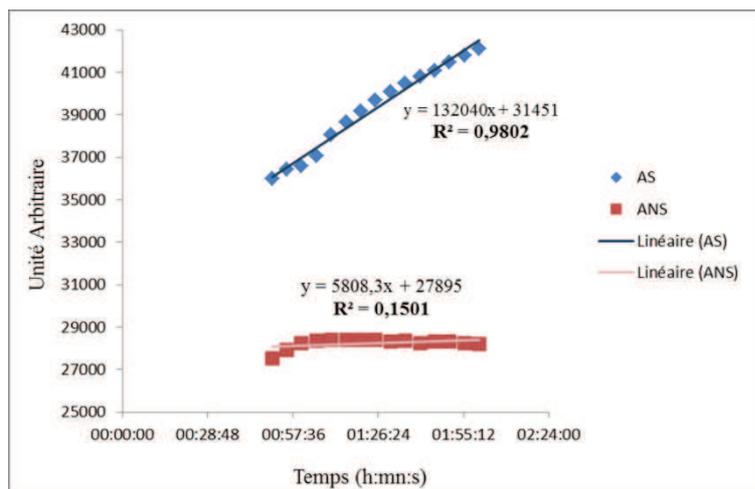
iii. Mesure de l'activité de la cathepsine L lysosomale par fluorescence

Dans une microplaque noire de 96 puits et pour chaque échantillon, 1 puits servait à la mesure de la fluorescence non spécifique en présence de l'inhibiteur spécifique de la cathepsine L (10 μ M, Calbiochem, 219421) et du substrat spécifique Z-Phe-Arg-MCA (100 μ M, Z-Phe-Arg 7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride, C9521, Sigma); tandis que 2 puits réalisés en dupliquât permettaient la mesure de l'activité spécifique en présence uniquement du substrat.

Pour la mesure de l'activité spécifique (AS), 4 μ l de DMSO, 50 μ l d'une solution tampon « cathepsine L » 2X (20mM Acétate de sodium, 2mM EDTA, 2mM DTT extemporanément, pH 5.5) et 20 μ g de protéines cytosoliques étaient déposés pour un volume final de 100 μ l. L'activité non spécifique (ANS) était mesurée en dupliquât en déposant par puits : 4 μ l de l'inhibiteur à 250 μ M, 50 μ l de la solution tampon « cathepsine L » 2X (pH 5.5) et 20 μ g de protéines cytosoliques pour un volume final de 100 μ l. La plaque était ensuite placée dans un luminomètre, agitée pendant 10s puis recouverte d'aluminium pour une incubation à 25°C pendant 20 minutes. A l'issue, 10 μ l du substrat Z-Phe-Arg-MCA à 1mM étaient ajoutés rapidement dans chacun des puits et la plaque était lue à 25°C pendant 2 heures.

La quantification des activités cathepsine L et chymotrypsine-like s'effectuait en retirant pour chaque point mesuré le bruit de fond c'est-à-dire le « blanc ». Puis, la courbe des activités spécifiques (AS, après avoir moyenné les valeurs des dupliquas) et non spécifiques (ANS, Unité Arbitraire, UA) en fonction du temps étaient tracées. L'activité de la cathepsine L ou chymotrypsine-like correspondait à la différence de pente entre les activités spécifiques et non spécifiques.

Exemple de calcul



$$R^2 = 0,98 \text{ sur } 15 \text{ mesures}$$

$$\text{Pente AS} = 132040 \text{ UA}$$

$$\text{Pente ANS} = 5808 \text{ UA}$$

$$\text{Activité Echantillon} = 132040 - 5808$$

$$\text{Activité Echantillon} = 126232 \text{ UA}$$

b. Activité calpaine : Etude n°2

L'activité des calpaines était déterminée sur un homogénat total de muscle c'est-à-dire en présence de l'inhibiteur endogène, la calpastatine. Le principe de la méthode a été décrit par Edelstein *et al.* (1995) [413]. Brièvement, le SLY-AMC (N-succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin, *S1153, Sigma*) servait de substrat aux calpaines. 150µg d'extrait musculaire étaient incubés dans la solution d'extraction (Tris HCl 20mM, CaCl₂ 5mM, DTT 1mM, 10µg/ml Pefabloc, 10µg/ml pepstatine A ; pH=7,4 ; 10min ; 37°C), puis 5µl de substrat (SLY-AMC, 50mM dans DMSO) étaient ajoutés à la solution ainsi que de la solution tampon pour ajuster le volume à 1ml. La fluorescence de l'AMC libérée était mesurée 15 minutes à 37°C dans un fluorimètre (Perkin Elmer ; excitation 380nm ; émission 460nm). Les essais contrôle étaient réalisés dans une solution tampon sans CaCl₂ mais remplacé par de l'EDTA et EGTA afin de le chélater. Le clivage calcium dépendant du SLY-AMC représente ainsi l'activité calpaine. L'activité était exprimée en unité arbitraire par minutes d'incubation en fonction de la quantité de protéines (mg).

VI- QUANTIFICATION PROTEIQUE PAR WESTERN BLOT : ETUDES 1 A 3

a. Extraction protéique

Tous les westerns blots ont été réalisés sur le muscle FDP (Etude n°1) et le muscle EDL (Etude n°3) de rat ainsi que sur des TA de souris (Etude n°2). Environ 20mg de muscle étaient broyés dans 10 volumes d'une solution tampon en présence d'un cocktail inhibiteur de protéase au 100x (*P8340, Sigma*). Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 4°C, le surnageant récupéré puis dosé par la méthode BCA. Les tampons et conditions d'extraction sont décrits ci-dessous :

Etudes 1 et 2	Etude 3	
TAMPON « BASE »	TAMPON « LC3 »	TAMPON « RIPA »
20mM TRIS pH 6.8	20mM TRIS-HCl	Ripa-Buffer (R0278, Sigma)
100mM NaCl	150mM NaCl	50mM NaF
1mM EGTA	1mM EDTA	2mM Na ₃ VO ₄
0.5% Triton X-100	2% Triton X-100	
100mM NaF	20mM NaF	
5mM Na ₃ VO ₄	1mM Na ₃ VO ₄	
<u>Centrifugation</u>	<u>Centrifugation</u>	<u>Centrifugation</u>
Etude 1 : 1000g 10min	Incubation 30min à 4°C puis	1000g 10min
Etude 2 : 12000g 20°min	12000g 20min	

Dans l'étude n°3, le tampon « LC3 » a été utilisé pour la quantification des protéines LC3B, Atg4B et Atg7 et le tampon « RIPA » pour l'ensemble des autres protéines d'intérêt.

b. Electrophorèse

Les extraits protéiques étaient dénaturés en mélangeant l'échantillon avec une quantité équivalente (v/v) de tampon de charge de type Laemmli (2X) et 0,03% p/v de bleu de Bromophenol servant de marqueur pour la migration. La linéarisation des protéines était achevée par une incubation de 4 minutes à 95°C. Les échantillons étaient déposés sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE). Le pourcentage du gel de séparation d'acrylamide variait selon les protéines d'intérêt tandis que le gel de concentration est à 4% d'acrylamide (acrylamide/bis-acrylamide 37,5:1). 40-50µg de protéines étaient déposés dans les puits du gel de concentration. La migration au sein du gel de séparation était réalisée à une tension constante de 140 V (Mini Protean II, Bio-Rad, France) dans le tampon d'électrophorèse TGS 1X

Gel de concentration	Gel de séparation	Laemmli 2X	TGS 1X
5%Acrylamide/Bis-acrylamide 0,125M TRIS (pH 6,8) 0,1% SDS	Acrylamide/Bis-acrylamide (% variable selon la protéine d'intérêt) 0,375M TRIS (pH 8,8) 0,1% SDS	0,1M TRIS pH 6,8 4% SDS 25% Glycérol 0,03% bleu de bromophénol	25mM TRIS pH 8,1-8,4 192mM Glycine 0,1% SDS
<i>Extemporément</i> 0,1% Ammonium persulfate 0,1% TEMED	<i>Extemporément</i> 0,1% Ammonium persulfate 0,1% TEMED	<i>Extemporément</i> 0,2M DTT	

c. Transfert

Les protéines étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose (Trans-blot, 0,2µm, Biorad, USA). Le transfert était réalisé à une tension constante de 300mA pendant 1 heure 30 à 4°C, dans un tampon composé de TG 1X (25mM TRIS, 192mM Glycine) à 20% d'éthanol. Au terme du transfert, la membrane était incubée pendant 5 minutes sous agitation dans une solution de rouge ponceau (*Sigma-78376*) afin de visualiser les protéines transférées sur la membrane et valider la qualité du transfert pour poursuivre le Western blot. Les membranes sont ensuite rincées à l'eau osmosée (H₂O_{mmQ}).

	Protéine d'intérêt	kDa	Référence	Source	Saturation	Incubation	Dilution
Etude 1	phospho-STAT1 (Tyr701)	84,91	Cell Signaling #9171	Polyclonal Lapin	BSA	BSA	1/500e
	STAT1	84,91	Cell Signaling #9172	Polyclonal Lapin	Lait	BSA	1/1000e
	phospho-STAT3 (Tyr705)	79,86	Cell Signaling #9131	Polyclonal Lapin	BSA	BSA	1/1000e
	STAT3	79,86	Cell Signaling #9132	Polyclonal Lapin	Lait	BSA	1/1000e
	Phospho-p44/42 (Tyr202/204)	42,44	Cell Signaling #9106	Monoclonal Souris	Lait	BSA	1/500e
	p44/42	42,44	Cell Signaling #9102	Polyclonal Lapin	Lait	BSA	1/500e
Etude 2	calpastatine	120	Cell Signaling #4146	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
	phospho-AMPK α (Thr172)	60	Cell Signaling #2535	Monoclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
	AMPK α	62	Cell Signaling #2603	Monoclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
	phospho-Akt (Ser473)	60	Cell Signaling #4060	Monoclonal Lapin	lait	BSA	1/2000e
	Akt	60	Cell Signaling #9272	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
	phospho-rpS6 (Ser235/236)	32	Cell Signaling #4856	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
	rpS6	32	Cell Signaling #2317	Monoclonal souris	lait	Lait	1/1000e
	phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	15,20	Cell Signaling #2855	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
	4E-BP1	15,20	Cell Signaling #9452	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
	phospho-CaMK2 (Thr286/287)	50,60	Millipore #06-881	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/500e
	CaMK2	50,60	Millipore #07-1496	Polyclonal Lapin	lait	lait	1/500e
	Etude 3	p62/SQSTM1	60	Cell Signaling #5114	Polyclonal Lapin	Lait	BSA
Atg4B		44	Sigma A2981	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
Atg7		75	Sigma A2856	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
LC3B		18	Sigma L7543	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/500e
Lamp2a		110	Abcam 37024	Polyclonal Lapin	lait	lait	1/500e
phospho-Akt (Ser473)		60	Cell Signaling #4051	Monoclonal souris	lait	BSA	1/1000e
Akt		60	Cell Signaling #9272	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
phospho-rpS6 (SER235/236)		32	Cell Signaling #4856	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
rpS6		32	Cell Signaling #2317	Monoclonal Souris	lait	Lait	1/1000e
4E-BP1		15,20	Cell Signaling #9452	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
phospho-p38 (Thr180/182)		43	Cell Signaling #9211	Polyclonal Lapin	lait	BSA	1/1000e
p38 α		38	SantaCruz SC-535	Polyclonal Lapin	lait	lait	1/200e
Ubiquitine			SantaCruz SC-8017	Monoclonal Souris	lait	lait	1/3000e
μ -calpaine		80	Affinity Bioreagent OPA1-08803	Polyclonal Lapin	lait	lait	1/1000e
Etudes 1,2,3		α -tubuline	55	Sigma T6199	Monoclonal Souris	Lait	Lait
	Anticorps secondaire		Référence	Source	Solution d'Incubation		Dilution
Etudes 1, 2,3	anti-lapin		GE Healthcare NA934V	Singe	lait		1/5000e
Etudes 1,2	anti-souris		Sigma #A9044	Lapin	lait		1/4000e
Etude 3	anti-souris		GE Healthcare NA931V	Mouton	lait		1/5000e

Tableau 1 : Références des anticoprs primaires et secondaires utilisés en Western Blot

d. Saturation

Afin de bloquer les sites non spécifiques (sans protéines), les membranes étaient incubées dans une solution de saturation contenant 5% de lait écrémé ou de BSA dans du TTBS (Tween Tris Buffer Saline ; 50 mM Tris Base, 150mM NaCl, pH 7,5, avec 0,1% Tween 20), pendant 1 heure à température ambiante (TA), sous agitation lente. Pour établir le profil d'ubiquitination, les membranes étaient saturées pendant 30 minutes.

e. Anticorps primaires et secondaires

L'anticorps primaire était ensuite préparé à la dilution appropriée (*Tableau 1*) dans la solution de saturation puis incubé avec la membrane la nuit à 4°C. Pour le profil d'ubiquitination, les membranes étaient incubées avec l'anticorps primaire pendant 3 heures à TA. A l'issue, les membranes étaient rincées 3 fois 5 minutes dans du TTBS puis incubées avec l'anticorps secondaire approprié (anti-lapin ou anti-souris) et dilué dans du TTBS avec 5% lait pendant 1 heure à TA sous agitation lente. Les membranes étaient ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans du TTBS avant la révélation.

f. Révélation et quantification

Les protéines étaient ensuite révélées par chimioluminescence (*Enhanced Chemiluminescence, ECL, #32106, Pierce®, France*). Cette réaction de chimioluminescence avec l'anticorps secondaire va impressionner un film photo (*Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare, Royaume-Uni*). Ce dernier est ensuite numérisé puis les bandes de l'image obtenue sont quantifiées par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ®. L'analyse prend en compte l'intensité de la bande (unité de densité optique DO) et sa surface et s'exprime en unité arbitraire.

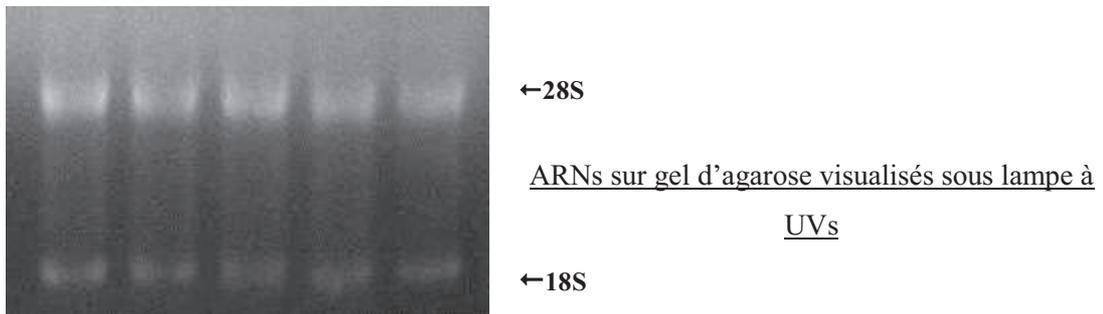
VII- ETUDES N°1 ET N°3 : EXPRESSION GENIQUE PAR RT-QPCR

L'acronyme RT-PCR signifie *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). Elle est une méthode très sensible pour détecter (et éventuellement quantifier), les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule. L'une des difficultés de cette méthode concerne la préparation des ARNs qui peuvent être très facilement dégradés et contaminés par de l'ADN génomique

a. Extraction des ARNs

Les ARNs étaient extraits à partir de 30mg de muscle à l'aide d'un kit d'extraction sur colonne (*RNeasy Fibrous mini kit, 74704, Qiagen Germantown, MD*). Les ARNs étaient ensuite dosés avec un

spectrophotomètre (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) à une longueur d'onde de 260nm ($DO_{260nm}=50ng/\mu l$). La pureté des ARNs était vérifiée à partir du ratio de densité optique mesuré aux longueurs d'onde 260nm et 280nm qui doit être supérieur à 1.95 ($DO_{260}/DO_{280} > 1.95$) afin de contrôler l'absence d'ADN dans nos échantillons. Une électrophorèse sur gel d'agarose 1% était réalisée dans une solution de migration TBE 1X (89mM TRIS, 89mM acide borique, 2mM EDTA, pH 8.2 contenant du bromure d'éthidium (BET)) à partir de 1 μ g d'ARNs déposés par puits afin de contrôler l'intégrité de ces derniers. Pour cela, l'intensité de la bande 28S des ARNs ribosomiaux doit être le double de l'intensité de la bande 18S et aucun « smear » ne doit être visible entre les 2 bandes (figure ci-contre).



b. Transcription Inverse (RT)

2 μ g d'ARN totaux de chaque échantillon étaient transformés en ADNc dans un volume final de 20 μ l à l'aide d'un kit (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystem Life Technologies Carlsbad, CA*). La réaction de transcription inverse (RT) s'effectuait selon les instructions du fournisseur dans un thermocycleur (MiniCycler™, MJ Research, St Bruno, Canada) puis les échantillons de RT étaient dilués 10 fois (Etude 1) ou 60 fois (Etude 3) dans une eau ultra-pure contenant de l'ADN de sperme de saumon dénaturé. Le principe étant que l'ADN de saumon adhère aux parois des microtubes et réduise ainsi la fixation des ADNc d'intérêt dont presque la totalité pourra être prélevé lors du pipetage. Les échantillons de RT peuvent aussi être aliquotés et congelés à -20°C pour une utilisation ultérieure. Les cycles décongélation-congélation sont à éviter pour ne pas dégrader l'ADN très fragile.

c. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

i. Principe général

Cette technique permet d'obtenir à partir d'un échantillon peu abondant, une quantité importante d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Elle repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») la réaction en chaîne par polymérase (PCR) à l'aide de la fluorescence émise dans nos conditions par un fluorophore : le SYBR Green qui s'intercale entre les

bases de l'ADN. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité d'ADN amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est à l'origine concentré en ADN cibles, moins de cycles seront nécessaires pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Cq et apparaît en début de phase exponentielle. Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est donc pas affectée par les éléments limitant identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Cq est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique

ii. Conditions expérimentales

La PCR en temps réel était réalisée dans un volume final de 20µL sur une plaque transparente de 48 puits contenant dans chacun des puits:

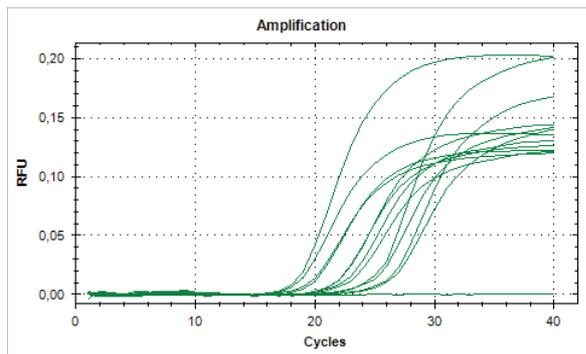
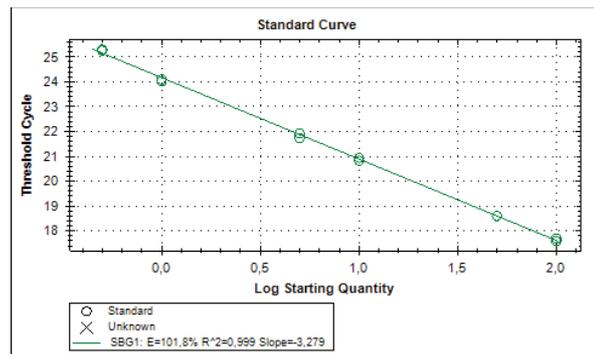
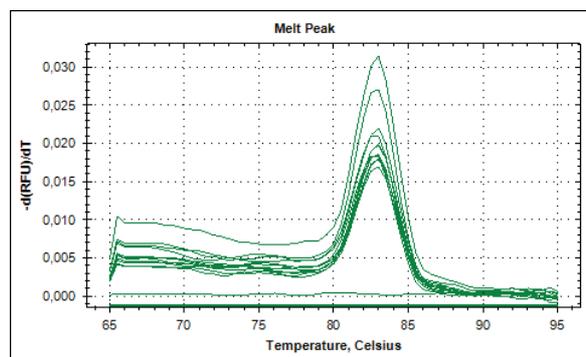
- 5µL de l'échantillon de RT
- 250nM d'amorces sens (Forward) du gène d'intérêt
- 250nM d'amorces anti-sens (Reverse) du gène d'intérêt
- 2X de SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-rad, Hercules, CA)
- H₂O ultra-pure

Les séquences des amorces sont détaillées dans le *tableau 2*.

Après 10 minutes à 95°C, la plaque était soumise à 40 cycles de température réalisés avec le thermocycleur MiniOpticon™ (Bio-rad) :

- Etape de dénaturation : 10s à 95°C
- Etape d'hybridation : 30s à environ 60°C (cette température dépend des amorces et est indiquée dans le *tableau 2*)
- Etape d'élongation : elle n'est pas nécessaire étant donné que les amorces sont de petites tailles (<300bp)

A l'issue des 40 cycles, une courbe de fusion est réalisée afin de contrôler l'absence de structures secondaires et la spécificité des amorces. Le principe est que la diminution de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température entraîne un pic de fusion d'un produit PCR. Celui-ci va se distinguer facilement des pics de fusion de produits non spécifiques qui vont fondre à des températures plus faibles en présentant des pics généralement plus larges.

Exemple pour le gène RPS9Courbe d'amplificationCourbe standard-Détermination de l'efficacité du gène à la T° d'hybridationCourbe de fusion

Les valeurs obtenues par régression pour chaque échantillon (Cq) ont été analysées par la méthode comparative des ΔCq décrites par Pfaffl (2001) [414]. Les niveaux de transcription étaient ensuite normalisés par la moyenne arithmétique des Cq de deux gènes de références pour chaque échantillon soit : le gène de la cyclophilineA et le gène ribosomal Rpl32 (Etude n°1) ainsi que les gènes ribosomaux Rpl32 et RPS9 (Etude n°3).

VIII- ANALYSES STATISTIQUES

Pour les études 1 et 3, les données étaient exprimées en moyenne \pm SEM et la normalité des distributions vérifiées à partir de la droite de Henry. Pour l'ensemble des résultats des études 1 et 3, l'analyse de variance (ANOVA) à un facteur pour échantillons indépendants a été utilisée ainsi que le test post-hoc de Fischer afin de préciser les différences entre les groupes lorsque l'ANOVA était significative à $p < 0,05$.

Pour l'étude 2, les données sont exprimées en moyenne \pm SD et la normalité des distributions vérifiées avant d'effectuer une analyse de variance (ANOVA) pour échantillon indépendant à deux facteurs : traitement (clenbutérol vs saline) et électroporation (pcDNA3-calpastatine versus pcDNA3-vide). Le test post-hoc de Tuckey a été appliqué lorsque l'ANOVA était significative au seuil de $p < 0,05$.

RESULTATS

a

		2 semaines d'entraînement (E2)											
		Rat 1		Rat 2		Rat 3		Rat 4		Rat 5		Rat 6	
Charge (%poids corporel)	Jour	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions
50	J1	236	5	230	8	224	7	229	7	235	4	221	8
50	J2	247	8	232	8	228	8	232	8	238	8	227	8
50	J3	252	8	243	8	237	8	239	8	241	8	230	8
50	J4	260	10	249	10	236	10	243	10	242	10	236	10
50	J5	264	10	256	10	243	10	249	10	253	10	244	10
80	J6	278	7	265	10	246	10	266	10	262	10	255	10
100	J7	287	5	278	8	254	8	269	8	261	8	260	8
100	J8	296	6	279	12	258	12	277	12	268	12	260	12
120	J9	296	12	279	12	262	12	279	12	272	12	266	12
120	J10	300	7	283	10	262	10	277	10	272	10	266	9

b

		4 semaines d'entraînement (E4)											
		Rat 1		Rat 2		Rat 3		Rat 4		Rat 5		Rat 6	
Charge (%poids corporel)	Jour	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions
50	J1	221	10	217	10	210	10	210	10	217	10	213	10
50	J2	223	10	224	10	215	10	215	10	225	10	217	10
50	J3	225	10	227	10	218	10	218	10	226	10	219	10
50	J4	229	10	232	10	222	10	224	10	234	10	224	10
50	J5	232	10	236	10	224	10	224	10	238	10	230	10
80	J6	247	10	250	10	240	10	242	10	250	10	241	10
100	J7	248	10	248	10	241	10	245	10	251	10	240	10
100	J8	253	10	252	10	246	10	246	10	258	10	246	10
120	J9	253	10	256	10	250	10	250	10	262	10	247	10
120	J10	253	18	255	11	252	8	253	13	262	10	249	14
120	J11	270	10	268	10	261	10	265	10	276	10	262	10
120	J12	269	10	274	10	262	10	266	10	275	10	264	10
120	J13	270	10	276	10	263	10	268	10	270	10	264	10
130	J14	274	10	276	10	266	10	272	10	262	10	266	10
130	J15	273	10	279	10	267	10	274	10	271	10	272	10
130	J16	280	10	286	10	278	10	285	10	293	10	279	10
140	J17	282	10	294	10	278	10	287	10	291	10	277	10
140	J18	285	10	289	10	278	10	285	10	294	10	282	10
150	J19	287	10	292	10	278	10	290	10	294	10	283	10
150	J20	287	18	291	30	280	30	294	35	291	31	284	18

c

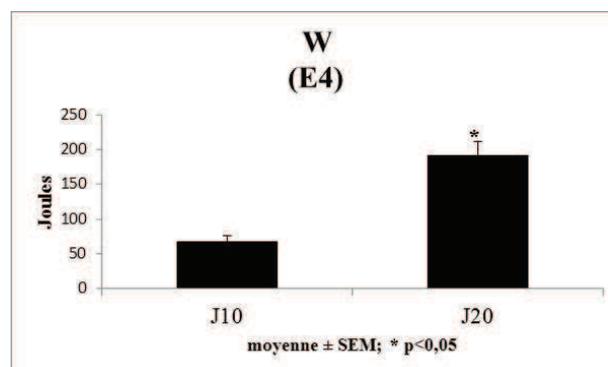


Figure 21: Evolution des charges d'entraînement au cours d'un programme de 2 (a) et 4 (b) semaines de résistance, (c) travail développé au bout de 2 semaines (J10) et 4 semaines (J20) du groupe E4.

ETUDE 1 : IMPLICATION DE LA VOIE IL-6/STAT3 DANS L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRE INDUITE PAR UN ENTRAÎNEMENT EN RESISTANCE

I- CARACTERISTIQUES DE L'ENTRAÎNEMENT EN RESISTANCE

a. Evolution des charges d'entraînement

La fréquence d'augmentation de la charge portée par le rat a été ajustée en fonction de la tolérance à l'exercice de l'animal. L'incrémentation de la charge a été globalement identique entre les groupes E2, E4 et E10 attestant de la reproductibilité de l'entraînement (*Figures 21 et 22*). Le groupe E2 a été le 1^{er} groupe à effectuer l'entraînement, des ajustements et des mises au point du protocole sont donc à l'origine des variations obtenues dans le nombre de répétitions. Les groupes E4 et E10 présentent très peu de variations inter et intra-individuelles au niveau de la charge et du nombre de répétitions effectuées. Seul l'animal n°2 du groupe E10 n'a pas terminé le protocole en raison de refus pour réaliser l'exercice.

b. Mesures de performance

Afin de vérifier que le protocole d'entraînement induisait bien une amélioration des performances chez les rats entraînés, un test de maximum de répétition à un pourcentage de masse corporelle du rat a été effectué à J10 et J20 du groupe E4 (*Figure 21*). A partir des résultats, le travail développé par le rat peut être calculé selon la formule suivante :

$$W = \text{nombre de répétitions} \times \text{charge kg (masse du rat + masse portée)} \times g \times h \text{ (hauteur de l'échelle)}$$

Au bout de deux semaines d'entraînement (J10), le rat développait un travail moyen de **67,6 J** et de **190,9 J** au terme des 4 semaines (J20) (*Figure 21*). Ces résultats attestent de l'efficacité de l'entraînement en termes d'amélioration des capacités physiques du rat.

Au terme des 10 semaines d'entraînement (E10 ; J50), un test de répétition maximale a été effectué afin de comparer l'efficacité du protocole d'entraînement chez des rats entraînés versus sédentaires. La répétition maximale moyenne des animaux entraînés correspondait à des masses moyennes soulevées de 1,2 kg soit 350% de la masse corporelle du rat. Les animaux sédentaires étaient capables de porter des masses moyennes de 400g soit 100% de leur masse corporelle (*Figure 22*). Ces résultats montrent une amélioration de la force maximale après 10 semaines d'entraînement en résistance.

		10 semaines d'entraînement (E10)											
		Rat 1		Rat 2		Rat 3		Rat 4		Rat 5		Rat 6	
Charge (%poids corporel)	Jour	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions	Poids Corporel	Nombre de répétitions
50	J1	218	6	225	7	219	5	225	10	215	10	215	10
50	J2	217	10	226	10	219	10	227	10	218	10	221	10
50	J3	225	10	237	10	222	10	236	10	221	10	226	10
50	J4	226	10	247	10	225	10	241	10	224	10	230	10
50	J5	232	10	255	10	228	10	248	10	232	10	234	10
80	J6	244	10	276	10	240	10	264	10	245	10	248	10
100	J7	251	10	280	10	242	10	266	10	253	10	253	10
100	J8	251	10	284	10	242	10	272	10	251	10	253	10
120	J9	256	10	293	10	249	10	276	10	262	10	262	10
120	J10	255	10	292	10	248	10	276	10	257	10	261	10
120	J11	264	10	304	10	251	10	287	10	270	10	267	10
120	J12	270	10	315	10	261	10	295	10	281	10	273	10
120	J13	278	10	325	10	260	10	295	10	280	10	274	10
130	J14	280	10	326	10	258	10	294	10	285	10	283	10
130	J15	282	10	333	10	249	10	285	10	291	10	290	10
130	J16	294	10	345	10	272	10	310	10	303	10	302	10
140	J17	289	10	342	10	278	10	313	10	305	10	305	10
140	J18	293	10	345	10	278	10	318	10	306	10	304	10
150	J19	298	10	347	10	281	10	321	10	313	10	309	10
150	J20	300	9	357	5	283	9	328	10	313	10	309	10
150	J21	307	10	364	10	285	10	342	10	327	9	322	10
150	J22	307	10	364	10	288	9	342	10	327	10	322	10
150	J23	307	10	368	10	288	10	342	10	327	10	322	10
160	J24	307	10	365	10	285	10	343	10	328	10	321	10
160	J25	311	10	370	10	287	10	345	10	328	10	321	10
160	J26	323	10	383	10	298	10	355	10	341	10	330	10
160	J27	320	10	384	10	302	10	360	10	345	10	332	10
170	J28	323	9	388	8	299	10	355	10	345	10	334	10
170	J29	324	10	380	10	302	10	365	10	347	10	336	10
180	J30	324	10	387	10	304	10	366	10	348	10	336	10
180	J31	328	10	391	10	306	10	366	10	354	10	345	10
190	J32	330	10	391	10	309	10	368	10	354	10	344	10
190	J33	326	10	391	8	309	10	368	10	351	10	338	10
190	J34	326	10	396	4	312	10	370	10	351	10	338	10
190	J35	328	10	392	5	311	10	370	10	351	10	338	10
190	J36	337	10	407	3	318	10	379	10	355	10	340	10
190	J37	333	10	404	0	315	10	379	10	347	10	332	10
190	J38	340	10	409		321	10	384	10	358	10	344	10
200	J39	343	10	416		319	10	384	10	356	10	344	10
200	J40	336	10	409		313	10	386	10	360	10	345	10
200	J41	343	10			321	10	392	10	364	10	350	10
200	J42	343	10			318	10	389	10	362	10	350	10
200	J43	345	10			320	10	391	10	363	10	351	10
200	J44	340	10			320	10	392	10	365	10	351	10
200	J45	340	10			316	10	392	10	362	10	345	10
210	J46	346	10			324	10	401	10	372	8	355	10
210	J47	344	10			319	10	401	10	372	9	355	9
210	J48	344	10			319	10	400	10	372	10	351	10
210	J49	342	10			317	10	397	10	370	10	352	10
MAX	J50	344	340%			321	360%	402	380%	369	340%	353	320%

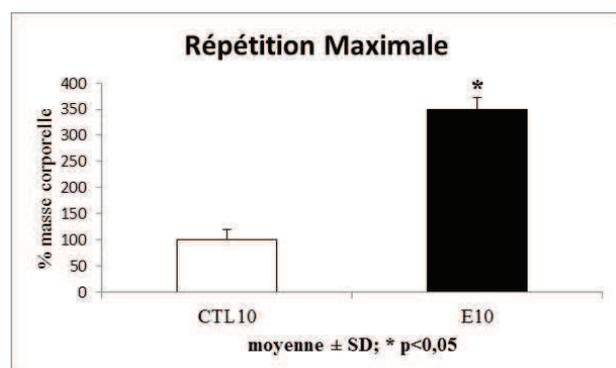


Figure 22: Evolution des charges d'entraînement au cours d'un programme de résistance de 10 semaines (a) et performance lors d'un test de répétition maximale (b)

II- MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES INDUITES PAR L'ENTRAINEMENT

a. Evolution de la masse corporelle

A partir de 6 semaines d'entraînement (30 jours d'exercice), la masse corporelle des rats entraînés est augmentée très faiblement contrairement aux rats sédentaires (*Figure 23*). Ainsi, au terme des 10 semaines d'entraînement, la masse corporelle des rats entraînés était inférieure aux rats sédentaires (non significatif). Il aurait été intéressant de mesurer la quantité de graisse abdominale et/ou épидидimale afin d'expliquer cette différence de masse. En effet, la différence de masse corporelle dans le groupe entraîné versus sédentaire peut s'expliquer par l'effet lipolytique de l'entraînement et/ou la diminution de l'activité spontanée chez des rats sédentaires liée à l'augmentation de l'âge (16 semaines à la fin du protocole).

b. Modification phénotypique du muscle *Soleus*

i. Contenu protéique et ADN

Les effets de l'entraînement sur le contenu protéique du muscle oxydatif soléaire apparaissaient au bout de 10 semaines d'entraînement (E10) (*Figure 24a*). On observait une augmentation du contenu en protéines totales mais qui était associé à une diminution du contenu en protéines myofibrillaires. L'augmentation du contenu protéique peut être expliquée par davantage de protéines sarcoplasmiques.

ii. Analyse histochimique

Les immunohistochimies réalisées avec des anticorps dirigés spécifiquement contre les différents type de MHC confirment le phénotype lent du muscle SOL composé à 85% de fibres de type I et 15% de fibres de type IIa chez des animaux sédentaires (*Figure 25*). L'entraînement en résistance de 2, 4 ou 10 semaines conduisait à une augmentation de +10% de la quantité de fibres de type I. Aucune fibre de type IIx ou IIb n'ont été retrouvées chez des animaux sédentaires ou entraînés.

Quelle que soit la durée de l'entraînement et le type de fibre, aucune hypertrophie n'a été observée suggérant soit une très faible participation du muscle soleus dans notre exercice soit un protocole d'entraînement inadapté pour induire une hypertrophie musculaire.

c. Modification phénotypique du muscle *Extensor Digitorum Longus*

Le contenu en protéines myofibrillaires était augmenté uniquement après 2 semaines d'entraînement (E2) alors que la quantité de protéines totales se trouvait diminuée uniquement après 4 semaines d'entraînement (E4). Aucune modification du contenu protéique ou en ADN n'était observée dans le groupe E10 (*Figure 24b*). Ces modifications transitoires du contenu protéique n'étaient, dans

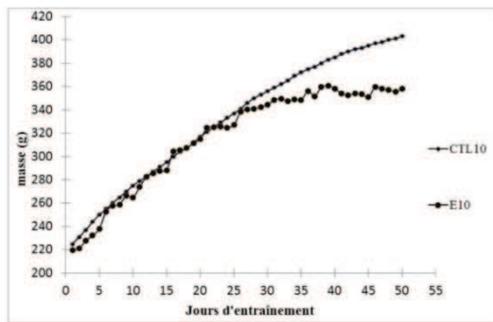


Figure 23 : Evolution de la masse corporelle chez des rats sédentaires (CTL10) versus entraînés (E10) pendant 10 semaines.

a

	SOL					
	CTL2	E2	CTL4	E4	CTL10	E10
Protéines totales PT (mg/g)	210,15±34,11	202,79±37,33	166,46±17,06	178,4±25,74	116,82±9,33	160,96± 11,37*
Protéines Myofibrillaires PM (mg/g)	46,22±2,1	42,08±6,87	44,61±3,48	43,41±5,14	42,24 ±4,76	32,93 ±5,63*
PM/PT	0,22±0,03	0,21±0,04	0,27±0,03	0,25±0,04	0,36± 0,007	0,20 ±0,03*
ADN/PT (x1000)	2,50±0,73	3,03±0,62	2,01±0,56	2,33±0,32	5,65±0,86	6,27±1,63

moyenne ± ecartype ; * différent CTL10 (p<0,05)

b

	EDL					
	CTL2	E2	CTL4	E4	CTL10	E10
Protéines totales PT (mg/g)	148,08±10,94	135,84±25,47	185,85±23,74	150,01±28,07†	148,20±20,84	134,81± 14,79
Protéines Myofibrillaires PM (mg/g)	23,86±5,09	37,93±6,00*	42,84±5,6	39,91±7,09	35,80 ±6,54	35,16 ±4,57
PM/PT	0,16±0,03	0,29±0,09*	0,24±0,03	0,27±0,07	0,24± 0,003	0,26 ±0,04
ADN/PT (x1000)	2,55±0,55	3,27±0,85	1,47±0,17	2,12±0,44†	6,24±2,34	7,37±3,11

moyenne ± ecartype ; * différent CTL2 , † différent CTL4 (p<0,05)

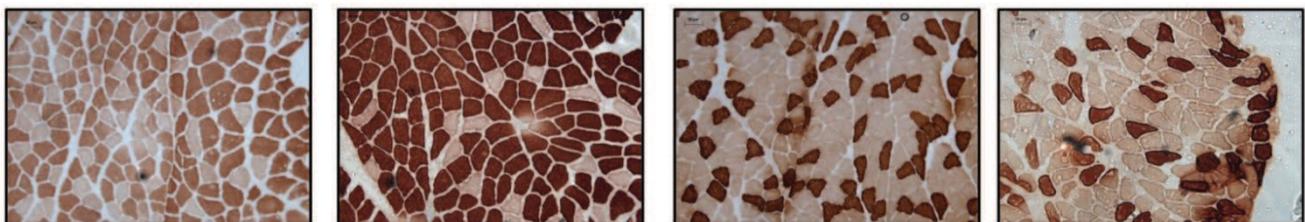
c

	FDP					
	CTL2	E2	CTL4	E4	CTL10	E10
Protéines totales PT (mg/g)	186,05±18,34	139,46±16,06*	168,94±14,41	166,07±9,02	160,56 ±12,61	157,88± 15,35
Protéines Myofibrillaires PM (mg/g)	43,92±9,3	41,25±5,5	44,01±5,01	44,33±5,9	45,22 ±2,41	38,03 ±7,01†
PM/PT	0,24±0,05	0,31±0,06	0,26±0,05	0,27±0,05	0,28± 0,008	0,24 ±0,03†
ADN/PT (x1000)	1,76±0,39	1,78±0,41	2,21±0,6	2,15±0,38	4,75±0,46	4,73±0,62

moyenne ± ecartype ; * différent CTL2 ; † différent CTL10 (p<0,05)

Figure 24 : Contenu en protéines totales (PT), myofibrillaires (PM) et en ADN après un entraînement de 2, 4 et 10 semaines dans les muscles (a) SOL, (b) EDL et (c) FDP

SOLEUS



		CTL2	E2	CTL4	E4	CTL10	E10
Type de fibres (%)	Type I	82,48 ±3,52	93,31* ±2,82	83,61 ±1,75	93,45* ±1,82	88,94 ±3,48	97,23* ±0,95
	Type IIa	17,52 ±3,52	6,69* ±2,82	16,39 ±1,75	6,55* ±1,82	11,06 ±3,48	2,77* ±0,95
Surface de section des fibres (µm ²)	Type I	2426,30 ±256,61	1976,15 ±879,40	3175,07 ±159,45	2607,23 ±161,72	3943,58 ±266,50	3259,84 ±297,46
	Type IIa	1966,59 ±171,22	1881,18 ±267,87	2447,40 ±88,23	2223,50 ±37,17	2882,23 ±218,54	2960,27 ±438,52

Figure 25 : Typologie et Surface de section des fibres du muscle Soleus après 2, 4 et 10 semaines d'entraînement. moyennes± SEM ; *différent entre CTL et E (p<0,05)

aucun des groupes, associées à une modification de la typologie du muscle ou à une hypertrophie musculaire (*Figure 26*). En accord avec la littérature, le muscle EDL possède un phénotype glycolytique avec environ 25-30% de fibres lentes ou rapides oxydatives (I et IIa) et 70-75% de fibres rapides (IIx et IIb). De la même manière que pour le muscle SOL, il semblerait que l'EDL ne soit pas impliqué dans notre modèle d'exercice.

d. Modification phénotypique du muscle *Flexor Digitorum Profundus*

i. Contenu protéique et ADN

Les changements du contenu protéique du muscle FDP semblaient anecdotiques (*Figure 24c*). En effet, une diminution du contenu en protéines totales était obtenue au bout de 2 semaines mais n'était pas modifiée après 4 (E4) ou 10 (E10) semaines d'entraînement. Par ailleurs, les protéines myofibrillaires étaient diminuées uniquement dans le groupe E10.

ii. Analyse histochimique

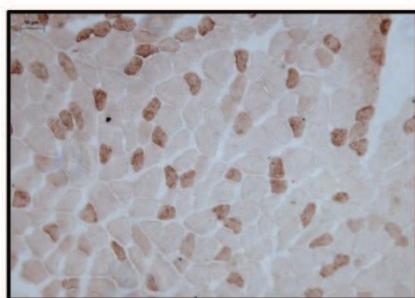
1. Phénotype musculaire

Ce muscle peu décrit dans la littérature est constitué entre 15-25% de fibres de type I, 25-40% de fibres de type IIa et 40-60% de fibres de type IIx. Le phénotype du muscle FDP peut être caractérisé de mixte (*Figure 27*).

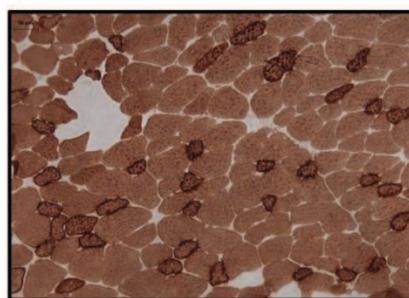
Dès 2 semaines d'entraînement, on observait une diminution de 50% des fibres de type I ainsi qu'une hypertrophie des fibres de type IIx (+ 85%). Ces changements se retrouvaient après 4 semaines d'entraînement, la diminution des fibres de type I accompagnait celle des fibres de type IIx (-25%) alors qu'on notait une augmentation de 110% des fibres de type IIa. L'hypertrophie des fibres de type IIx (+48%) était associée à celle des fibres de type IIa (+25%) au terme des 4 semaines d'entraînements. Ces adaptations phénotypiques étaient amplifiées après 10 semaines d'entraînement puisque tous les types de fibres étaient hypertrophiés avec des augmentations de surface de section de 77%, 91% et 100%, respectivement pour les fibres de type I, IIa et IIx.

Contrairement aux muscles SOL et EDL, le muscle FDP est majoritairement impliqué dans notre type d'exercice. En effet, lorsque l'on observe un rat effectuant une montée de l'échelle, la participation des muscles fléchisseurs des pattes avant semble prépondérante, les muscles des pattes arrière ayant une action davantage de soutien que de poussée. De plus selon la nature du mouvement, il semblerait que le régime de contraction du muscle FDP s'apparente à régime concentrique lors des montées bien que quelques secondes par séances aient été passées en régime isométrique lorsque l'animal faisait du « sur place ».

Extensor Digitorum Longus



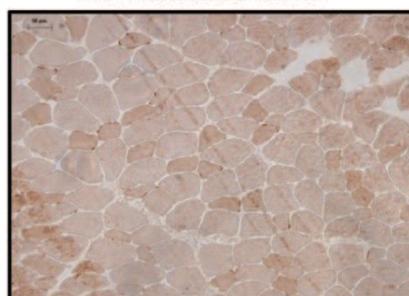
CTL2- Fibres de type IIa



E2- Fibres de type IIa



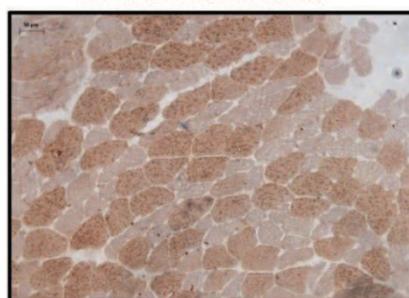
CTL2- Fibres de type IIx



E2- Fibres de type IIx



CTL2- Fibres de type IIb



E2- Fibres de type IIb

		CTL2	E2	CTL4	E4	CTL10	E10
Type de fibres (%)	Type I	6,7±0,9	6,7±0,6	4,2±1,0	7,5±1,6	2,1±1,1	4,8±1,3
	Type IIa	19,6±3,7	25,6±1,3	20,5±1,4	25,6±4,0	29,0±4,6	23,3±1,0
	Type IIx	39,7±3,5	34,6±1,8	32,2±2,7	34,2±3,1	32,5±3,7	33,6±2,9
	Type IIb	34,0±4,9	33,0±3,5	43,1±2,8	32,7±3,1	36,3±3,0	38,2±4,0
Surface de section des fibres (µm²)	Type I	861,6 ±192,7	797,3 ±127,1	1030,1 ±47,3	1063,8 ±95,8	1336,6 ±88,0	1592,1 ±274,6
	Type IIa	1193,0 ±267,3	984,2 ±82,4	1203,5 ±98,7	1066,4 ±35,9	1299,8 ±35,5	1488,2 ±110,8
	Type IIx	1357,8 ±124,2	1591,4 ±162,9	1449,1 ±79,3	1503,6 ±98,7	1536,1 ±49,9	1350,2 ±70,9
	Type IIb	2716,7 ±310,0	2707,1 ±433,6	3517,2 ±349,9	3161,8 ±459,6	4537,2 ±391,9	3607,1* ±403,6

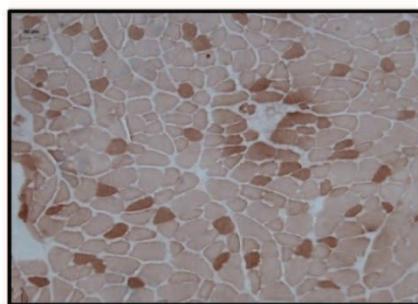
Figure 26. Typologie et Surface de section des fibres du muscle EDL après 2, 4 et 10 semaines d'entraînement. Moyenne ± SEM ; *différent entre CTL et E (p<0,05)

2. Domaine myonucléaire

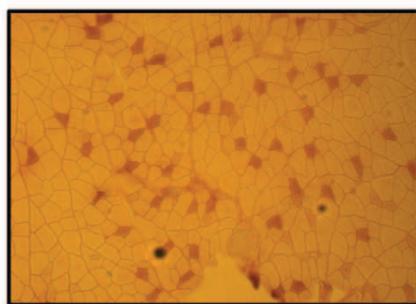
L'augmentation de la surface de section des fibres était associée à une augmentation du nombre de noyaux au sein de la fibre dans le groupe E10 par rapport au groupe CTL10. Ainsi, le domaine myonucléaire défini comme le ratio de la surface de section de la fibre (μm^2) par le nombre de noyaux n'était pas modifié au bout de 10 semaines d'entraînement (*Figure 27*). Ces données suggèrent l'incorporation de nouveaux noyaux via les cellules satellites.

En résumé, ce modèle d'entraînement en résistance a induit des changements phénotypiques des muscles fléchisseurs et particulièrement d'un fléchisseur des pattes avant : le muscle FDP. Des changements de la typologie et de la taille des fibres du FDP étaient visibles dès 4 semaines d'entraînement et majorés au terme des 10 semaines. Ces adaptations étaient similaires à celles retrouvées chez l'homme c'est-à-dire l'obtention d'un phénotype « intermédiaire » par augmentation des fibres de type IIa et également une hypertrophie musculaire de l'ensemble des types de fibres. Enfin, le muscle FDP étant plus « répondeur » que le muscle SOL, l'implication de la voie IL-6/STAT3 dans l'hypertrophie musculaire induite par cet entraînement a été étudiée uniquement sur le FDP.

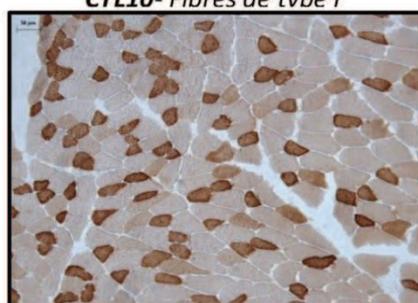
Flexor Digitorum Profundus



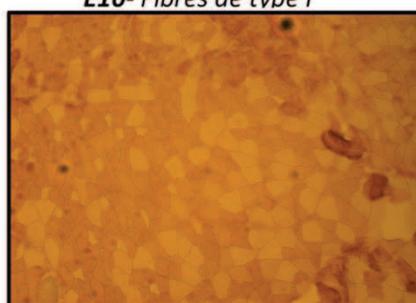
CTL10- Fibres de type I



E10- Fibres de type I



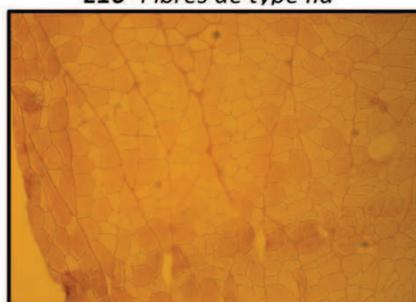
CTL10- Fibres de type IIa



E10- Fibres de type IIa



CTL10- Fibres de type IIx



E10- Fibres de type IIx

		CTL2	E2	CTL4	E4	CTL10	E10
Type de fibres (%)	Type I	24,29 ±4,76	12,27* ±3,47	13,95 ±1,99	6,90* ±2,01	13,76 ±2,09	3,94* ±1,63
	Type IIa	38,62 ±5,97	36,53 ±3,17	22,37 ±2,24	47,10* ±4,97	26,27 ±2,26	55,41* ±2,57
	Type IIx	37,09 ±5,42	50,27 ±3,06	61,95 ±2,67	45,91* ±3,10	59,85 ±3,09	40,65* ±3,54
Surface de section des fibres (µm²)	Type I	708,37 ±64,48	959,13 ±117,29	825,76 ±139,60	829,2 ±46,15	726,31 ±34,30	1287,33* ±58,92
	Type IIa	945,53 ±6,88	1151,29 ±100,88	1049,30 ±54,98	1325,57* ±98,56	1099,58 ±39,13	2109,10* ±169,06
	Type IIx	1209,32 ±142,44	2271,84* ±104,94	1762,77 ±84,01	2622,36* ±236,28	2069,14 ±224,31	4138,55* ±238,62
Domaine Myonucléaire	Non Mesuré	Non Mesuré	Non Mesuré	Non Mesuré	16,1±1,2	15,6±1,2	

Figure 27. Typologie et Surface de section des fibres du muscle FDP après 2, 4 et 10 semaines d'entraînement. Moyennes ± SEM ; *différent entre CTL et E (p<0,05)

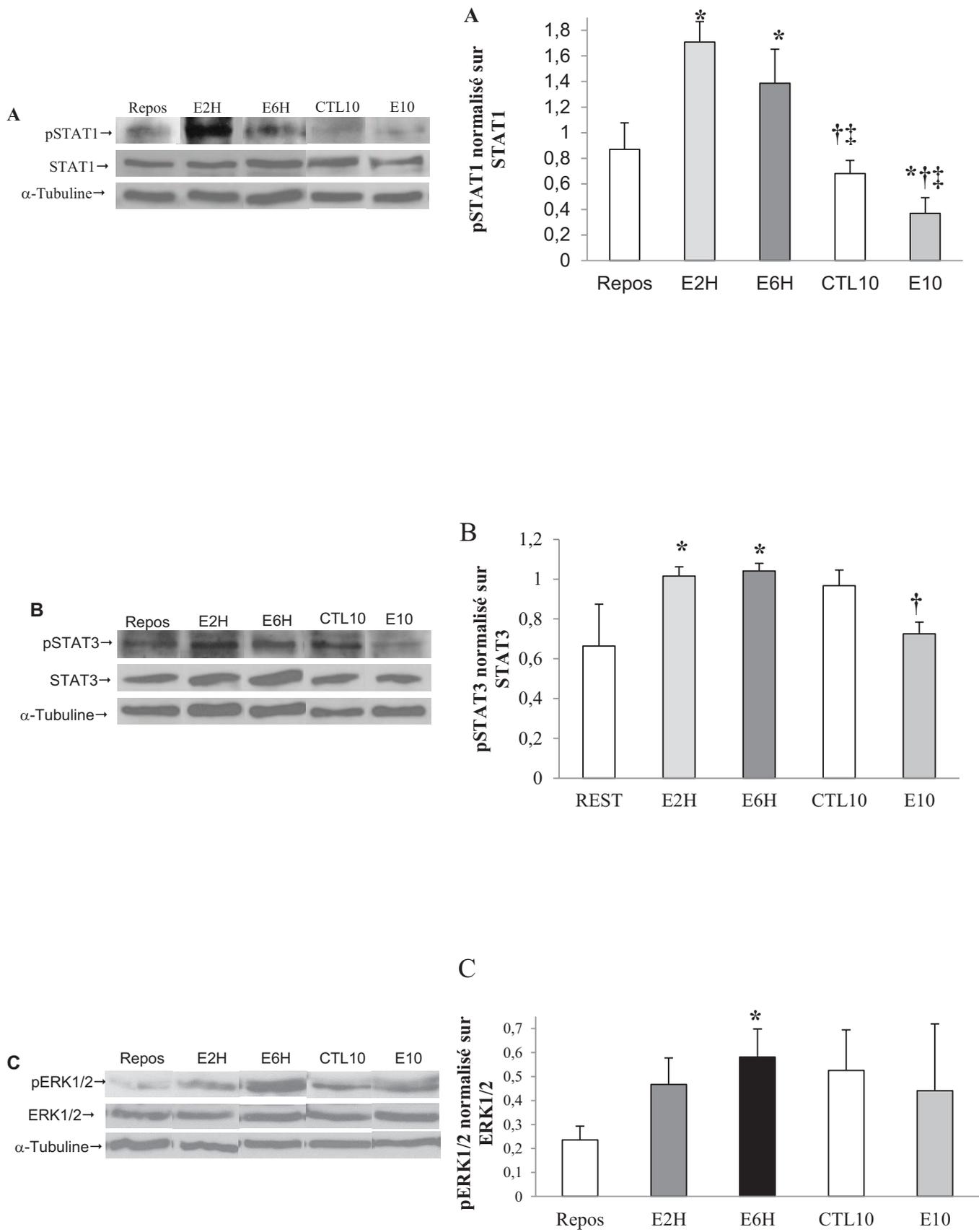


Figure 28. Etat de phosphorylation des protéines (A) STAT1, (B) STAT3 et (C) ERK1/2 après un exercice aigu (E2H, E6H) et 10 semaines d'entraînement (E10). Moyennes \pm SEM (n=4-6).
 * différent Repos, ‡ E2H, †CTL10 (p<0,05)

III- MARQUEURS DE L'ACTIVATION DE LA VOIE IL-6/STAT3 APRES UN EXERCICE AIGU ET 10 SEMAINES D'ENTRAINEMENT DANS LE MUSCLE FDP

a. Etat d'activation des protéines STAT1, STAT3 et ERK1/2

L'activation des protéines STAT1, STAT3 et ERK1/2 a été mesurée par leur état de phosphorylation. La *figure 28* montre que 2 heures (E2H) et 6 heures (E6H) après un exercice aigu en résistance, les phosphorylations de STAT1 (pSTAT1) et de STAT3 (pSTAT3) étaient augmentées, attestant de l'activation de la voie STAT1/STAT3 après une session d'exercice en résistance. Au contraire, l'activation de la voie STAT1/STAT3 était réduite après 10 semaines d'entraînement.

La protéine ERK1/2 est impliquée dans la prolifération et la différenciation des myoblastes et peut être activée à la suite d'un exercice ainsi que par l'IL-6 via STAT3 (*Figure 11*) [415]. La phosphorylation de ERK1/2 (pERK1/2) donc son activation était augmentée 6 heures après une seule session d'exercice (E6H). En revanche, après 10 semaines d'entraînements, son état d'activation n'était pas modifié (*Figure 28*).

La protéine STAT3 étant impliquée après notre exercice de résistance, nous nous sommes intéressés à la régulation de ses gènes cibles dans la voie IL-6/STAT3.

b. Impact de l'exercice et de l'entraînement en résistance sur les gènes cibles de STAT3

Nous nous avons étudié les gènes cibles de STAT3 pouvant jouer un rôle dans l'hypertrophie musculaire induite par notre entraînement en résistance via l'IL-6 (et/ou le LIF). En effet, comme vu précédemment, le LIF est capable de se fixer sur les récepteurs à l'IL-6 / gp130 et d'activer la voie JAK/STAT (*Figure 9*). La question était de savoir s'il existait une réponse de LIF avec l'exercice en résistance pouvant avoir un effet synergique à l'IL-6. Ainsi, les ARNm de l'IL-6, LIF et SOCS3 ont été quantifiés afin de déterminer l'implication de la voie IL-6/STAT3. Les gènes cibles de STAT3 marqueurs de la prolifération cellulaires CyclinD1 et c-Myc ont également été mesurés.

L'expression génique de l'IL-6 était augmentée de 2,2 et 3,2 fois respectivement à 2 (E2H) et 6 (E6H) heures après un exercice aigu et également 1.57 fois après 10 semaines d'entraînement (*Figure 29*). Ces changements étaient corrélés à l'augmentation de l'expression génique de SOCS3, 2 et 6 heures après un exercice aigu ($R^2=0,55$, $p<0,05$). Aucun changement de l'expression du gène de LIF n'a été observé à 2 et 6 heures après un exercice aigu alors que celle-ci était diminué de 0,6 fois après 10 semaines d'entraînement ($p<0,05$).

Les ARNm de CyclinD1 et c-Myc, deux marqueurs de prolifération cellulaire, étaient significativement augmentés dans le groupe E2H mais seule l'expression génique de CyclinD1

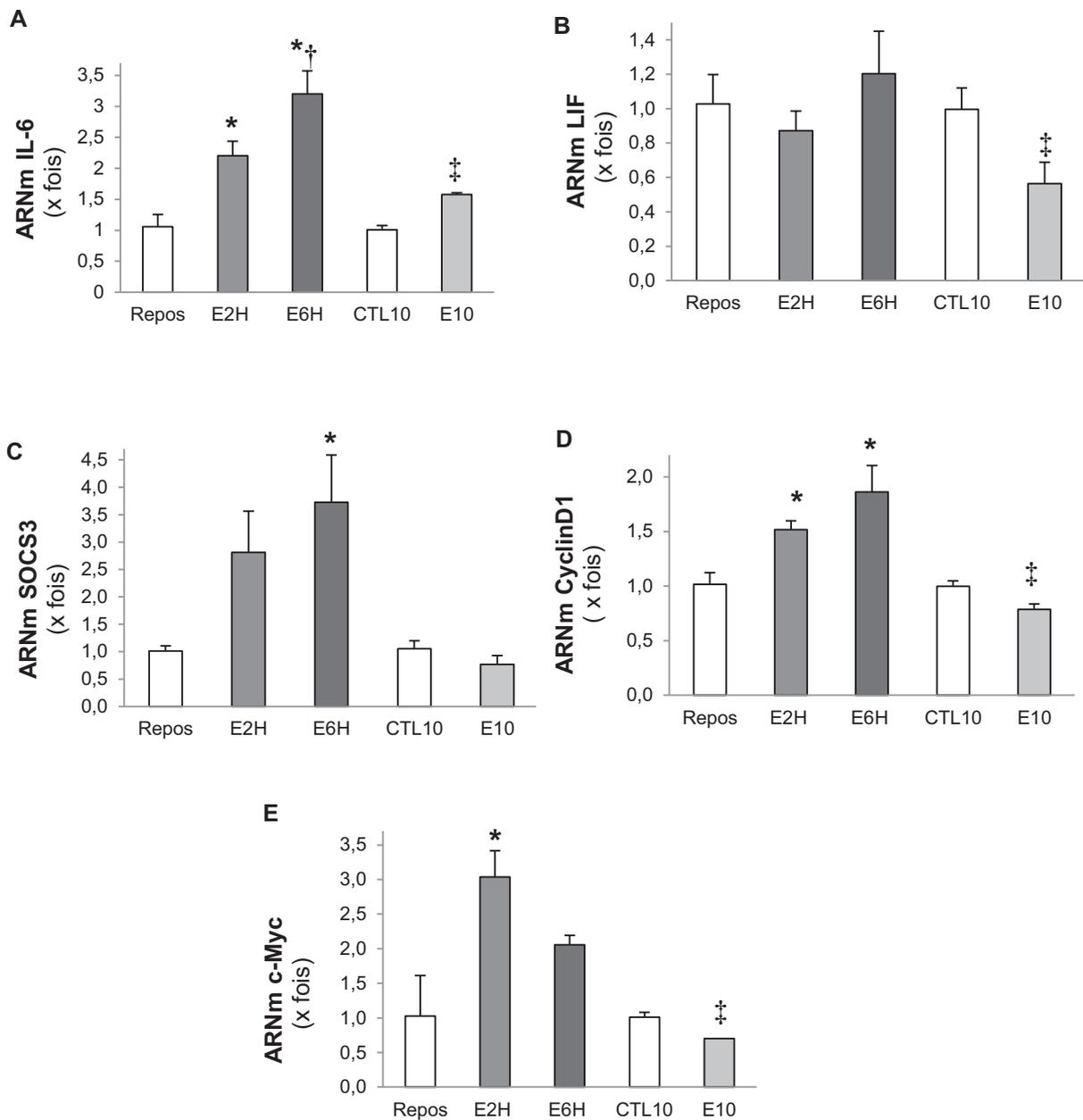


Figure 29. Expression des gènes cibles de STAT3 : (A) IL6, (B) LIF, (C) SOCS3, (D) CyclinD1, (E) c-Myc après un exercice aigu et 10 semaines d'entraînement en résistance. Moyennes \pm SEM (n=4-6), * différent Repos, † E2H, ‡CTL10 (p<0,05)

augmentait également dans le groupe E6H (*Figure 29*). L'expression génique de la CyclinD1 était également corrélée à celle de l'IL-6 après un exercice aigu ($R^2=0,64$; $p<0,05$). En revanche, les niveaux d'expression des gènes CyclinD1 et c-Myc diminuaient après 10 semaines d'entraînement.

En résumé, les expressions géniques augmentées de l'IL-6 et SOCS3 étaient significativement corrélées entre elles et peuvent être associées à l'augmentation de la phosphorylation de STAT1 et STAT3 dans les heures qui suivent un exercice de résistance. Ces résultats associés à l'absence de variation du gène LIF suggèrent l'activation de la voie IL-6/STAT1/STAT3 au décours d'un exercice de résistance ; cette dernière pourrait être impliquée dans l'hypertrophie musculaire observée après 10 semaines d'entraînement puisque l'expression génique de marqueurs de prolifération cellulaires (CyclinD1, c-Myc) était également augmentée. En revanche, l'implication de la voie IL-6/STAT3 semble jouer un rôle différent dans l'exercice aigu et dans l'entraînement. Par ailleurs, ces résultats ne permettent pas de déterminer le rôle des myocytes différenciés et celui des cellules satellites dans l'activation de la voie IL-6/STAT3 ainsi que sa participation dans l'hypertrophie musculaire induite par l'entraînement.

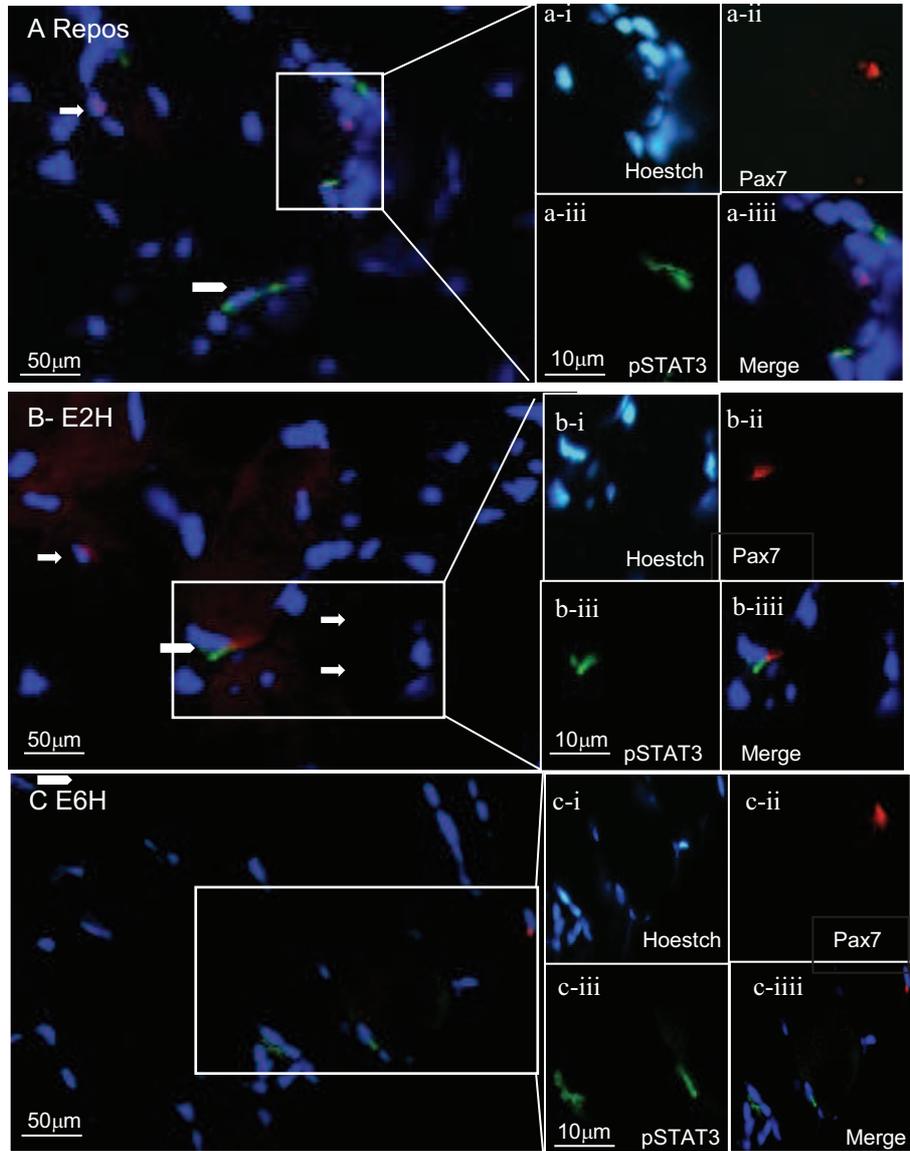


Figure 30. Localisation nucléaire de pSTAT3 au Repos (**A**), E2H (**B**), E6H (**C**). Les images sont la superposition du marquage des noyaux (**i**), des cellules satellites (Pax7) (**ii**) et de pSTAT3 (**iii**)

IV- IMPLICATION DES CELLULES SATELLITES EN REPONSE A L'ACTIVATION DE LA VOIE IL-6/STAT3 DANS L'EXERCICE AIGUE ET L'ENTRAINEMENT EN RESISTANCE

a. Localisation nucléaire de pSTAT3

L'activation de STAT3 par phosphorylation sur la tyrosine 705 induit sa translocation dans le noyau. Par un marquage immunofluorescent de la protéine pSTAT3 et du marqueur myogénique Pax7 sur coupes musculaires, il est possible de déterminer si l'activation de la voie IL-6/STAT3 se trouve davantage dans les noyaux des myocytes différenciés ou dans ceux des cellules satellites. Le marquage montrait une co-localisation des cellules exprimant Pax7 (Pax7+) avec pSTAT3 seulement 2 heures après un exercice aigu (E2H) (*Figure 30*). Aucune co-localisation de cellules Pax7+ n'a été observée avec pSTAT3 chez des rats sédentaires (Repos, CTL10) ni même 6 heures après un exercice (E6H) ou 10 semaine d'entraînement (E10) (*Figure 30 et 31*). Ces résultats montrent une activation transitoire de la protéine STAT3 dans les cellules satellites (Pax7+) après un exercice aigu de résistance, permettant d'émettre l'hypothèse de leur implication dans l'hypertrophie induite par l'entraînement. Pour cela, un marquage au BrdU a été réalisé afin de rendre compte de l'état prolifératif des cellules satellites. L'étude de l'expression génique des facteurs myogéniques a été également effectuée pour préciser le niveau d'implication de ces cellules en termes de prolifération et/ou de différenciation.

b. Etat de prolifération des cellules satellites après un exercice aigu

Pour déterminer l'implication des cellules satellites après un exercice en résistance, un double marquage fluorescent BrdU et anti-laminine a été réalisé afin de distinguer les cellules en prolifération (BrdU+) situées sous la lame basale c'est-à-dire les SCs, des autres types cellulaires tels que les fibroblastes, macrophages...

Exprimée en pourcentage sur 2000 fibres comptées par muscle, le nombre de SCs positives au BrdU augmentait de 0,03% au Repos à 6% et 3% respectivement 2 heures (E2H) et 6 heures (E6H) après une session d'exercice ($p < 0,05$). (*Figure 32*). Ce résultat atteste de l'activation et la prolifération des SCs dans les heures qui suivent un exercice aigu en résistance.

c. Expression génique des facteurs de régulation myogéniques

L'expression de Pax7, marqueur des cellules satellites quiescentes et activées, ainsi que les expressions des gènes de MyoD et Myf5, marqueurs des cellules satellites en prolifération, étaient significativement diminuées 2 heures après un exercice aigu (E2H, $p < 0,01$). Seuls les ARNm de MyoD et Myf5 restaient diminués 6 heures après l'exercice aigu (E6H). Par ailleurs, l'expression de la myogénine, marqueur des cellules satellites en différenciation, était augmentée de 2,2 fois ($p < 0,05$), 6 heures après l'exercice aigu (*Figure 33*).

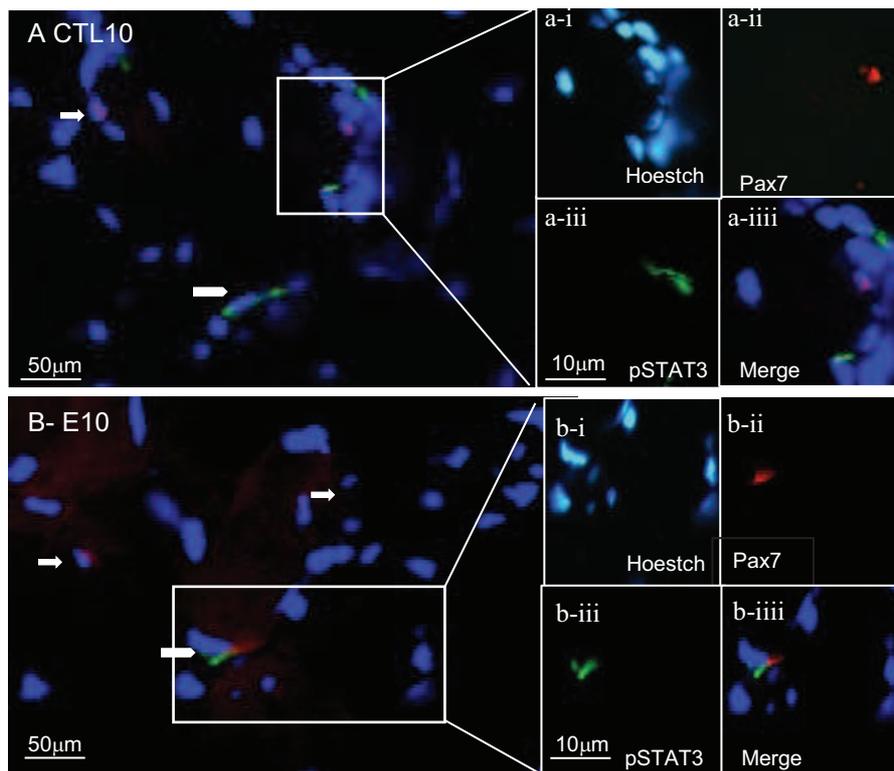


Figure 31. Localisation nucléaire de pSTAT3 au Repos (CTL10, **A**), et après 10 semaines d'entraînement E10 (**B**). Les images sont la superposition du marquage des noyaux (**i**), des cellules satellites (Pax7) (**ii**) et de pSTAT3 (**iii**)

Après 10 semaines d'entraînement (E10), l'expression des gènes Pax7 et MyoD n'était pas modifiée contrairement au gène Myf5 et myogénine dont les expressions diminuaient significativement ($p < 0,05$). Le ratio des ARNm de Pax7/MyoD était augmenté de 4 fois, 6 heures après l'exercice aigu (E6H, $p < 0,01$) mais n'était pas modifié dans les autres conditions.

En définitive, ces résultats suggèrent que l'activation de STAT3 dans les cellules satellites 2 heures après un exercice induit une prolifération de celles-ci dans les heures qui suivent l'exercice attesté par le marquage au BrdU. En revanche, l'expression génique des marqueurs myogéniques de prolifération (MyoD et Myf5) restent diminués 6 heures après l'exercice. Si l'on considère le ratio des ARNm de Pax7/MyoD comme marqueur du renouvellement du pool de cellules satellites, son augmentation 6 heures après l'exercice suggère qu'un pool de cellules satellites en prolifération retourne dans un état de quiescence. Par ailleurs, il semble qu'un pool de cellules satellites soit capable de se différencier, l'expression de myogénine étant augmentée 6 heures post-exercice. Au contraire, un entraînement de 10 semaines diminue l'expression génique des marqueurs de prolifération et différenciation cellulaire (CyclinD1, c-Myc, Myf5, myogénine) suggérant une diminution du pool de cellules satellites en prolifération et en différenciation et attestant d'un retour à des conditions basales (mesures 72 heures après le dernier exercice)

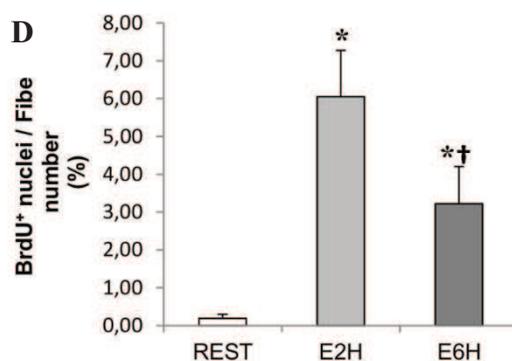
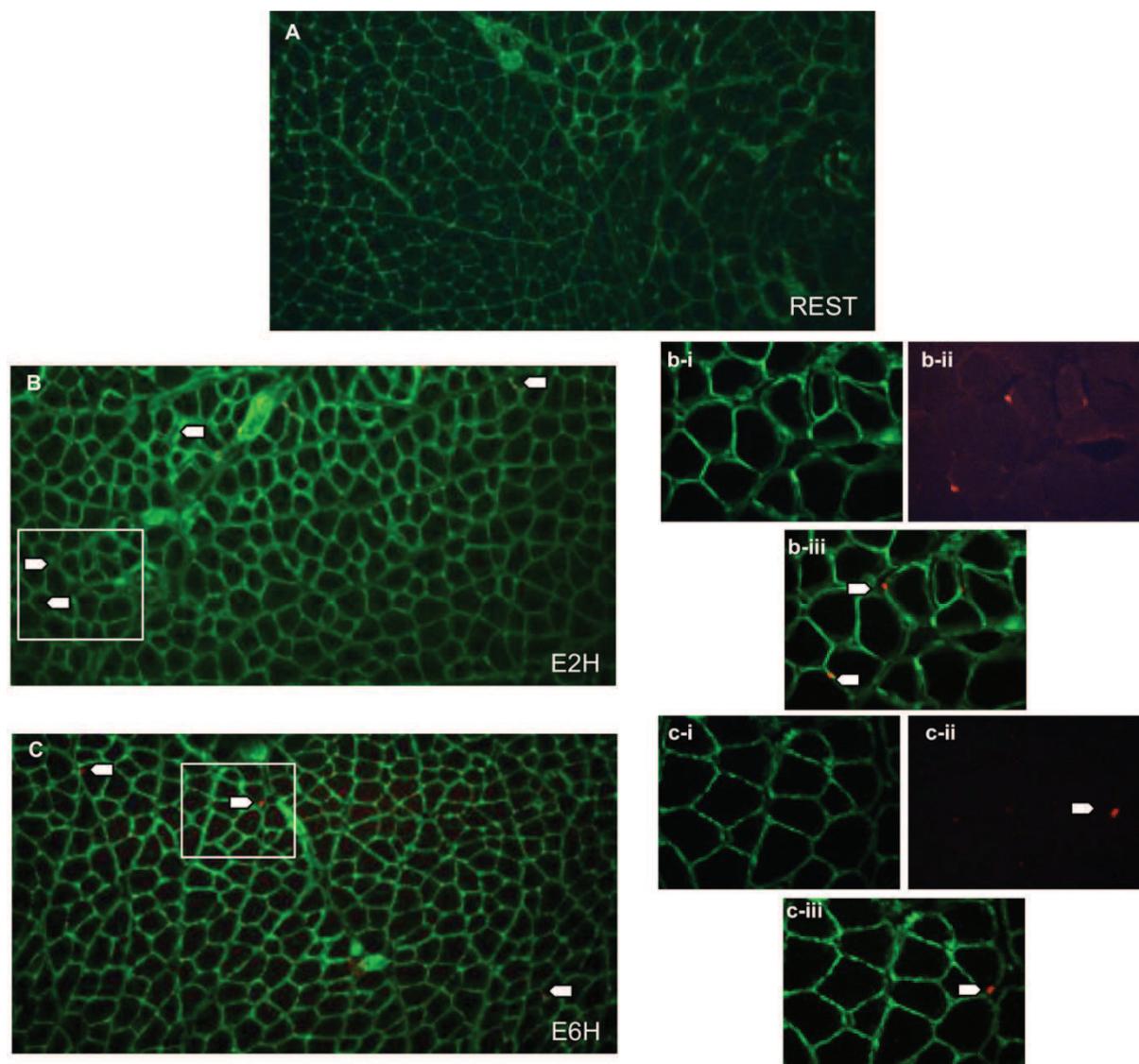


Figure 32. Prolifération des cellules satellites (SCs) après un exercice aigu de résistance. **A-C** : Superposition des images (grossissement x10) du marquage de la laminine (vert) et des cellules positives au BrdU (rouge) du muscle FDP au Repos (**A**), E2H (**B**), E6H (**C**). **b-c** : Grossissement (x40) des marquages **(i)** laminine (vert), **(ii)** BrdU (rouge), **(iii)** SCs positives au BrdU. **D**: Le graphique montre les moyennes \pm SEM des SCs positives au BrdU (%) exprimées sur 2000 fibres de 4 rats. * Different de Repos, † Different de E2H ($p < 0,05$)

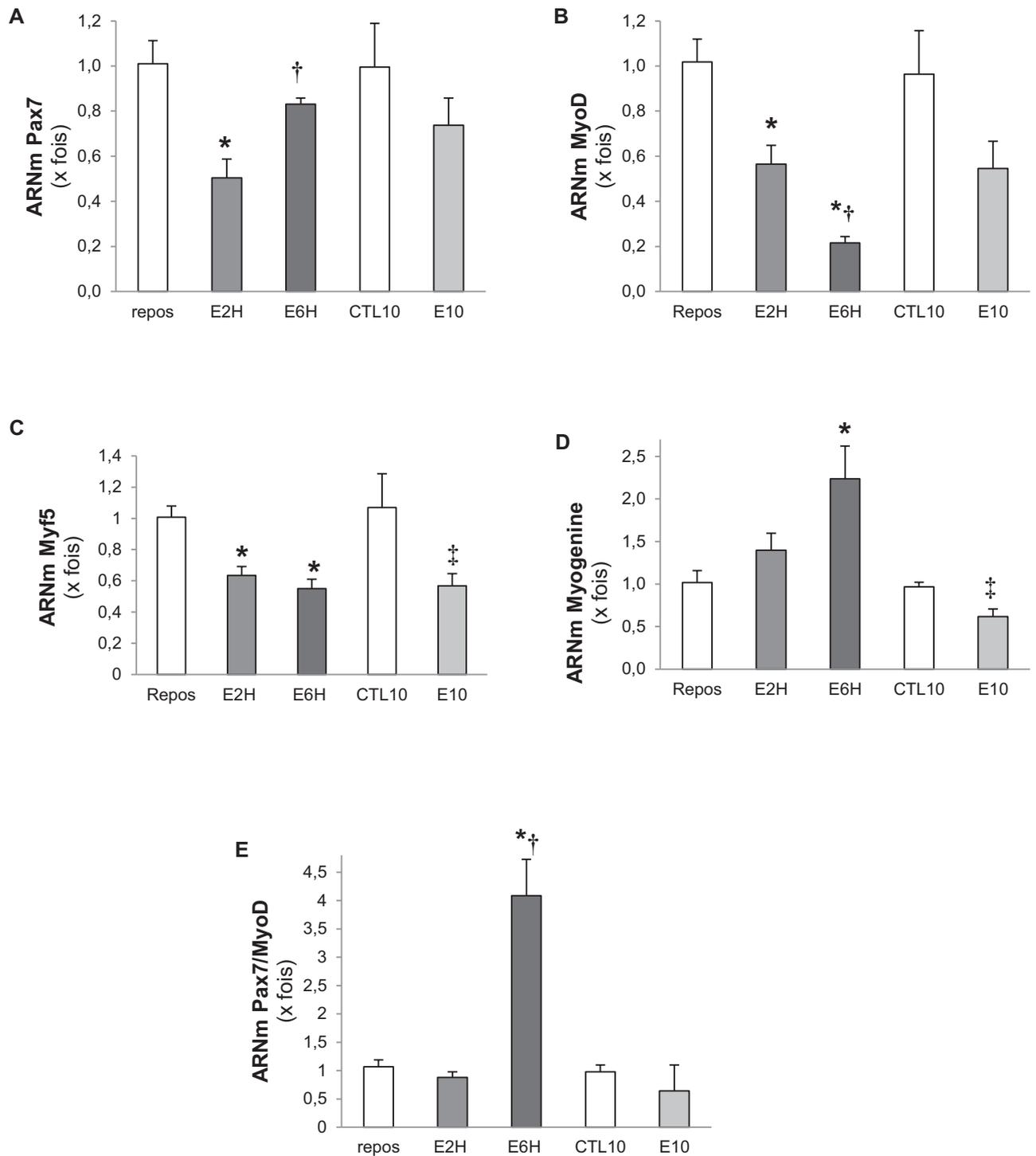


Figure 33. Expression génique des facteurs de régulation myogénique (A)Pax7, (B) MyoD, (C) Myf5, (D) Myogénine, (E) Pax7/MyoD après un exercice aigu et 10 semaines d'entraînement en résistance. Moyennes \pm SEM (n=4-6), * différent Repos, † E2H, ‡CTL10 (p<0,05)

A

n=2	PROTEOLYSE (nmole tyrosine/g muscle/h)		
	0-1h	1-2h	2-3h
CONTROL CONTROLATERAL CONCENTRIQUE	42,42	42,84	40,01
EXERCICE CONCENTRIQUE	59,55	43,31	42,07
CONTROL CONTROLATERAL EXCENTRIQUE	17,15	24,39	29,14
EXERCICE EXCENTRIQUE	45,32	48,06	45,31

B

n=2	PROTEOLYSE (%)			
	0-1h	1-2h	2-3h	moyenne
CONCENTRIQUE	40,37	1,09	5,16	15,54
EXCENTRIQUE	164,29	97,08	55,48	105,62

C

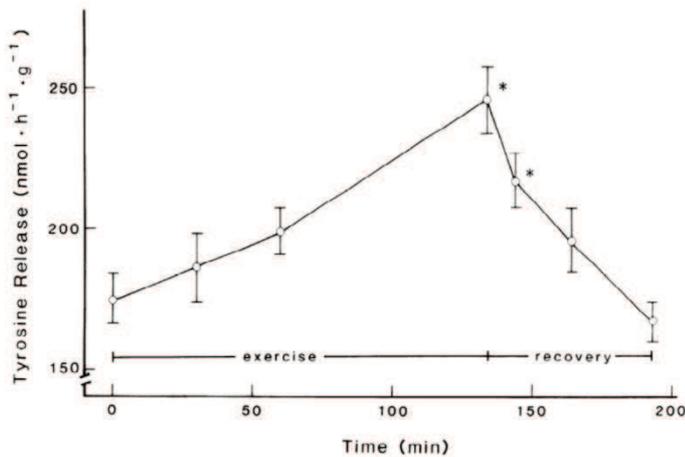


Figure 34. Expériences préliminaires de mesure de protéolyse sur EDL isolé de rats après 12 heures de jeûne. (A) Protéolyse en nmol tyrosine /g muscle/h (B) Protéolyse induite par les contractions en % de la valeur basale (C) Protéolyse du muscle SOL au cours et décours d'un exercice d'endurance chez le rat. *Etude de Kasperek & Snider (1989)*

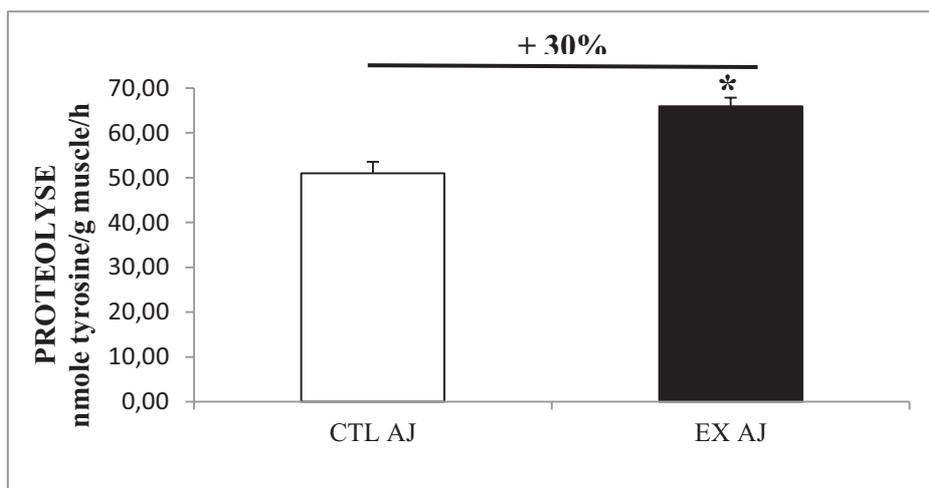


Figure 35 : Protéolyse induite par un exercice excentrique (5% L_0) sur EDL isolé de rat après 12 heures de jeûne. * différent CTL AJ ($p < 0,01$); moyennes \pm SEM; $n=11-19$

ETUDE 3 : ROLE DES DIFFERENTS SYTEMES PROTEOLYTIQUES DANS LA PROTEOLYSE INDUITE PAR UN EXERCICE EN RESISTANCE

I- EXPERIMENTATIONS PRELIMINAIRES

Les objectifs de ces études préliminaires ont été triples :

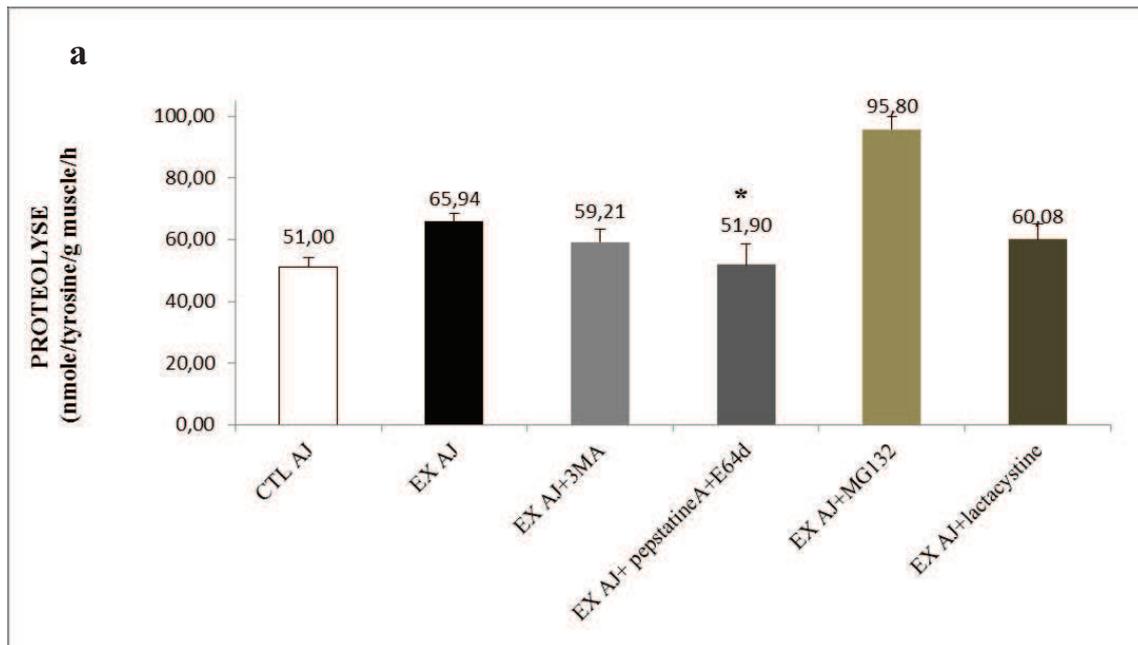
- Déterminer un protocole de contractilité induisant une protéolyse importante
- Déterminer le timing de mesure pour lequel la protéolyse est maximale
- Vérifier la reproductibilité de l'expérience

Ces expériences de contractilité *ex vivo* ont été réalisées sur le système de mesure *Aurora Scientific* (modèle 805A) permettant de maîtriser les modalités de contractions musculaires (intensité de stimulation, fréquence de stimulation et régime de contraction). Nous avons choisi d'étudier la réponse du muscle EDL sur ce type d'études car celui-ci présente l'avantage d'être un muscle long et fin, et d'avoir deux tendons à ces extrémités, permettant un accrochage aisé au transducteur de force.

Nous avons donc comparé un protocole de contractilité réalisé en mode concentrique à un mode excentrique et choisi de mesurer la protéolyse avec la méthode par fluorescence du relargage en tyrosine en présence de cycloheximide entre 0-1, 1-2 et 2-3 heures après la contractilité.

Tout d'abord, nous avons choisi un protocole excentrique à 10% de la longueur de repos (L_0) dont la tension générée s'est révélée trop importante provoquant le déchirement systématique du muscle. Nous avons donc réduit l'étirement de 10 à 5% de L_0 , longueur d'étirement ne générant pas de déchirement du muscle. Ces expériences ont été réalisées le matin vers 9h sur des rats nourris ad libitum (n=2 par conditions).

Les résultats obtenus (*Figure 34*) montrent que des contractions excentriques génèrent davantage de protéolyse que celles en concentriques quel que soit le timing de mesure, soit en moyenne une protéolyse de 105% et 15% respectivement. De plus, il semble que cette protéolyse soit maximale entre 0 et 1 heure après les contractions quel que soit le type d'exercice. Ce résultat est en accord avec l'étude de Kasperek&Snider (1989) [416] qui a montré que la protéolyse est maximale dans le muscle soléaire immédiatement après un exercice d'endurance chez le rat. Enfin, ces études préliminaires suggèrent une grande variabilité du taux de protéolyse basale si l'on compare les muscles contrôles excentriques versus concentriques. Ces données suggèrent une grande variabilité en lien avec la prise alimentaire. En effet, alors que la prise alimentaire contribue à augmenter la synthèse protéique et diminuer la protéolyse, le jeûne a l'effet inverse [417]



b

	Protéolyse induite d'exercice		UPS	Autophagie-Lysosomal	Autophagie	Lysosomal
	EX AJ	CTL AJ	EX AJ + lactacystine	EX AJ + pepstatineA+E64d	EX AJ + 3MA	EX AJ + 3MA - EX AJ + pepstatineA+E64d
Protéolyse (nmole/tyrosine/g muscle)	65,94	51,00	60,08	51,90	59,21	
Différence avec EX AJ	14,94		5,86	14,04	6,73	7,31
% inhibition	0		39,25	93,97	45,04	48,93
% TOTAL	100%		133,22		93,97	

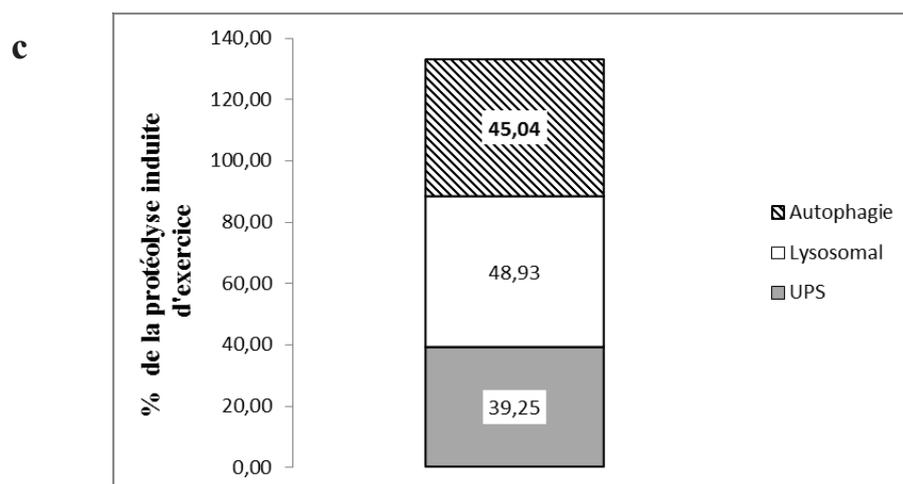


Figure 36. Mesure de la protéolyse 1 heure après un exercice excentrique sur EDL isolé de rat après 12 heures de jeûne (EX AJ) en présence d'inhibiteurs des différents systèmes protéolytiques : autophagique (3-MA), LAS (pepstatineA+E64d), UPS (MG132 ou lactacystine) (a). Implication (%) de ces 3 systèmes dans la protéolyse d'exercice (b,c) Moyennes \pm SEM (n=6-10). * Différent de EX AJ (p<0,05)

Suite à ces résultats, nous avons dans un 1^{er} temps basé nos études sur :

- 1) Un protocole d'exercice *ex vivo* réalisé en mode excentrique à 5% L₀
- 2) Une mesure de dégradation protéique entre 0-1 heure après les contractions
- 3) Une mise à jeun des rats pendant 12 heures afin de s'affranchir de l'effet de la dernière prise alimentaire et réduire la variabilité interindividuelle.

II- DETERMINATION DE L'IMPLICATION DES DIFFERENTS SYSTEMES PROTEOLYTIQUES DANS LA DEGRADATION PROTEIQUE INDUITE PAR DES CONTRACTIONS EXCENTRIQUES EN RESISTANCE SUR MUSCLE ISOLE DE RAT

a. Mesure de protéolyse induite d'exercice en condition à Jeun

i. Mesure de protéolyse totale 1 heure après l'exercice

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer le pourcentage de protéolyse induite par notre protocole de contractions excentriques réalisé sur muscle EDL de rats à jeun (EX AJ) versus des muscles EDL contrôle sans contraction (CTL AJ). Le niveau de protéolyse induit par l'exercice en résistance avec les modalités décrites dans la partie « Matériels et Méthodes » atteignait + 30% par rapport à la condition contrôle (*Figure 35*)

ii. Mesure de protéolyse spécifique des différents systèmes de dégradation

La question étant de déterminer la part des différents systèmes protéolytiques dans cette protéolyse induite d'exercice, nous avons utilisé après l'exercice, dans le milieu d'incubation du muscle, différents inhibiteurs connus pour inhiber chacun ou plusieurs des systèmes de dégradation :

- Autophagie : 3-méthyladénine (3-MA), inhibiteur de la PI3K Vps34
- (Autophagique-)Lysosomale : pepstatine A + E64d
- Ubiquitine-proteasome : MG132 ou lactacystine

L'utilisation de la 3-MA permettait de distinguer au sein de la protéolyse induite par le système LAS celle autophagique-dépendante de celle purement lysosomale. Les résultats de la mesure de protéolyse induite par l'exercice en résistance sont présentés dans la *figure 36* où le système ubiquitine-proteasome a été inhibé avec du MG132 ou la lactacystine.

Les résultats présentés sur la *figure 36* suggèrent un problème de spécificité du MG132 pourtant couramment utilisé. Il se révèle inducteur de protéolyse dans nos conditions. Ainsi, la lactacystine, inhibiteur plus onéreux mais plus spécifique, a été utilisé et permis d'obtenir des résultats plus cohérents.

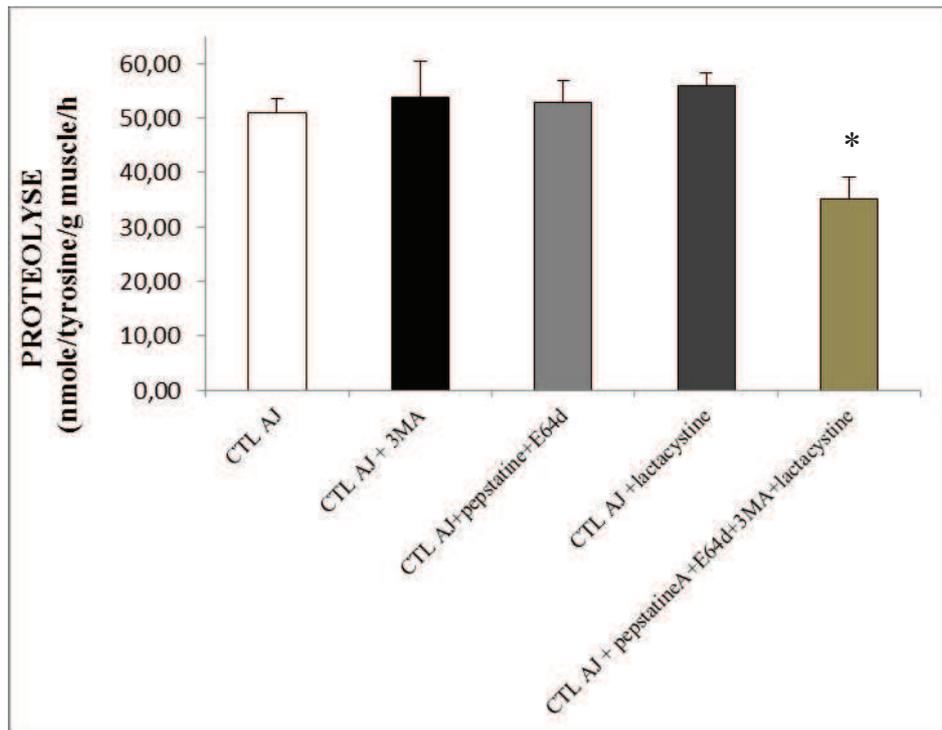


Figure 37. Mesure de la protéolyse sur EDL isolé de rat après 12 heures de jeûne (CTL AJ) en présence d'inhibiteurs des différents systèmes protéolytiques : autophagique (3MA), LAS (pepstatineA+E64d), UPS (lactacystine). Moyennes \pm SEM. * Différent CTL AJ ($p < 0.05$)

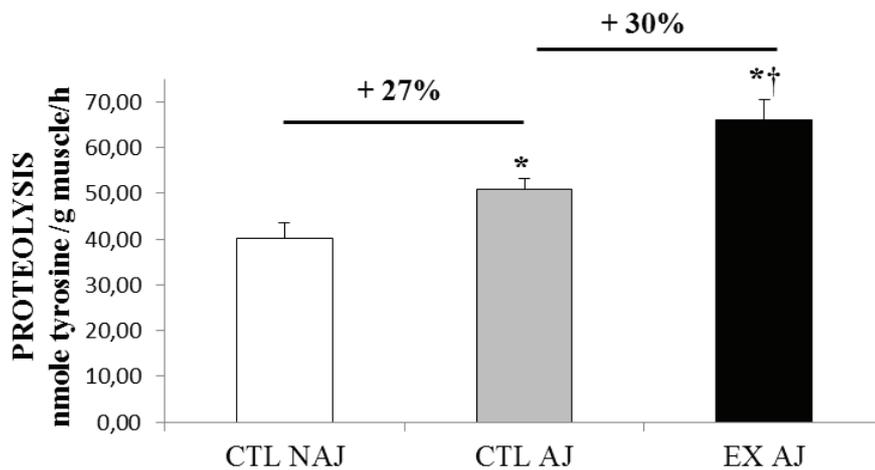


Figure 38. Mesure de la protéolyse sur EDL isolé de rats, nourris *ad libitum* (CTL NAJ), après 12 heures de jeûne au repos (CTL AJ) ou après un exercice excentrique (EX AJ). Moyennes \pm SEM. * Différent CTL NAJ. † CTL AJ ($p < 0.05$)

Lorsque l'on calcule le pourcentage d'inhibition afin de déterminer la part de ces 3 systèmes dans la protéolyse d'exercice, on remarque que le pourcentage d'inhibition est égal à **133%**. (*Figure 36*)

Ceci peut s'expliquer d'une part par un manque de spécificité des inhibiteurs mais d'autre part l'hypothèse d'une compensation de l'inhibition d'un système engendrant l'activation d'un ou de plusieurs autres n'est pas à exclure. Dans ce contexte, il apparaît très difficile de déterminer précisément par une mesure physiologique la part exprimée en pourcentage des systèmes majeurs de dégradation. Néanmoins, il apparaît que le système autophagique-lysosomal soit majoritairement impliqué dans la protéolyse à la suite d'un exercice réalisé à jeun (*Figure 36b, c*). Dans nos conditions, le jeûne est déjà responsable d'une activation des systèmes protéolytiques ainsi il n'est pas possible de déterminer lequel ou lesquels de ces systèmes contribuent à augmenter la protéolyse de 30% à la suite de l'exercice. De ce fait, il serait nécessaire de déterminer la part des différents systèmes protéolytiques dans notre condition contrôle à jeun sans exercice (CTL AJ). Les résultats sont présentés dans la *figure 37*

De façon surprenante, aucun des inhibiteurs ne contribuaient à inhiber la protéolyse en situation à jeun. L'hypothèse d'absence d'induction de dégradation protéique à la suite de 12 heures de jeûne chez le rat apparaît peu probable d'autant que l'incubation d'un muscle de rat mis à jeun en présence de la totalité des inhibiteurs contribue à diminuer de 70% la protéolyse (*Figure 37*). Afin d'être certains de l'effet protéolytique de la mise à jeun, la protéolyse a finalement été mesurée sur des muscles EDL de rats nourris *ad libitum* (CTL NAJ). Les résultats sont présentés dans la *figure 38*

Dans nos conditions, 12 heures de jeûne ont contribué à augmenter la protéolyse de **27%**. L'hypothèse envisagée concernant l'absence d'effet des inhibiteurs sur la protéolyse induite par le jeûne en lien avec l'effet du MG132 observé précédemment (augmentation de la protéolyse induite d'exercice) serait la suivante : dans un système intégré, le blocage d'un système de dégradation entraîne l'activation plus ou moins rapide d'un autre système pour compenser l'inhibition du premier afin de maintenir des conditions homéostatiques indispensables au déroulement de certains processus physiologiques au sein de la cellule musculaire.

En conclusion, les inhibiteurs des systèmes protéolytiques ne peuvent pas être utilisés dans notre modèle pour déterminer physiologiquement la part de chacun des systèmes dans la dégradation induite d'exercice. En revanche, il reste intéressant pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires qui pourront rendre compte de l'implication de tel ou tel système et/ou de leur distribution différente au regard de la protéolyse basale en condition de jeûne.

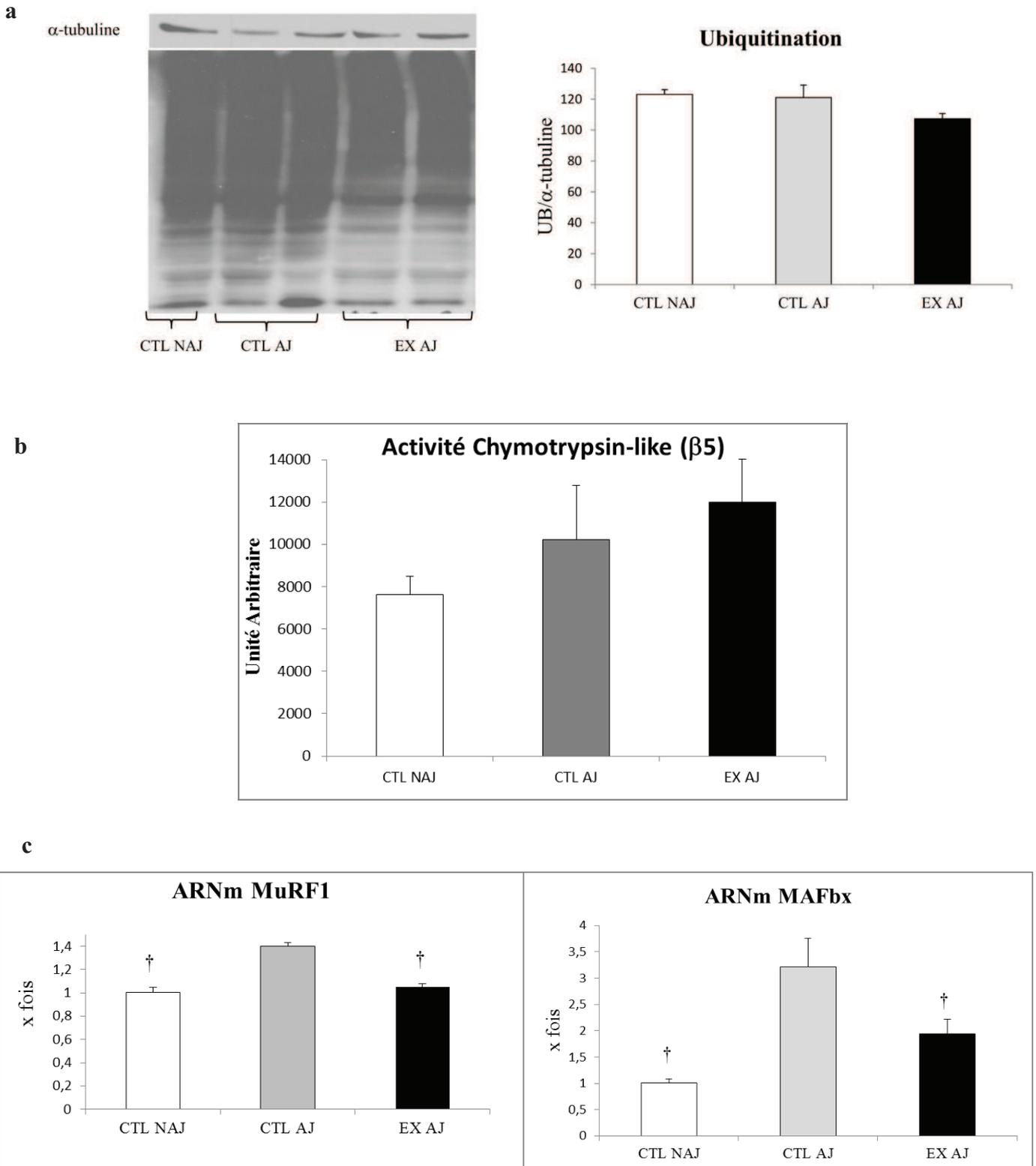


Figure 39. Marqueurs moléculaires de l'UPS : (a) Profil d'ubiquitination, (b) activité β 5 chymotrypsine-like du protéasome 20S, (c) expressions des gènes des E3 ligases MAFbx et MuRF1 de muscles EDL de rats nourris *ad libitum* (CTL NAJ) ou après 12 heures de jeûne en condition de Repos (CTL AJ) ou d'exercice (EX AJ). Moyennes \pm SEM (n=8). † Différent CTL AJ (p<0,05)

b. Marqueurs moléculaires des différents systèmes protéolytiques

i. Ubiquitine-Protéasome

1. Profil d'ubiquitination

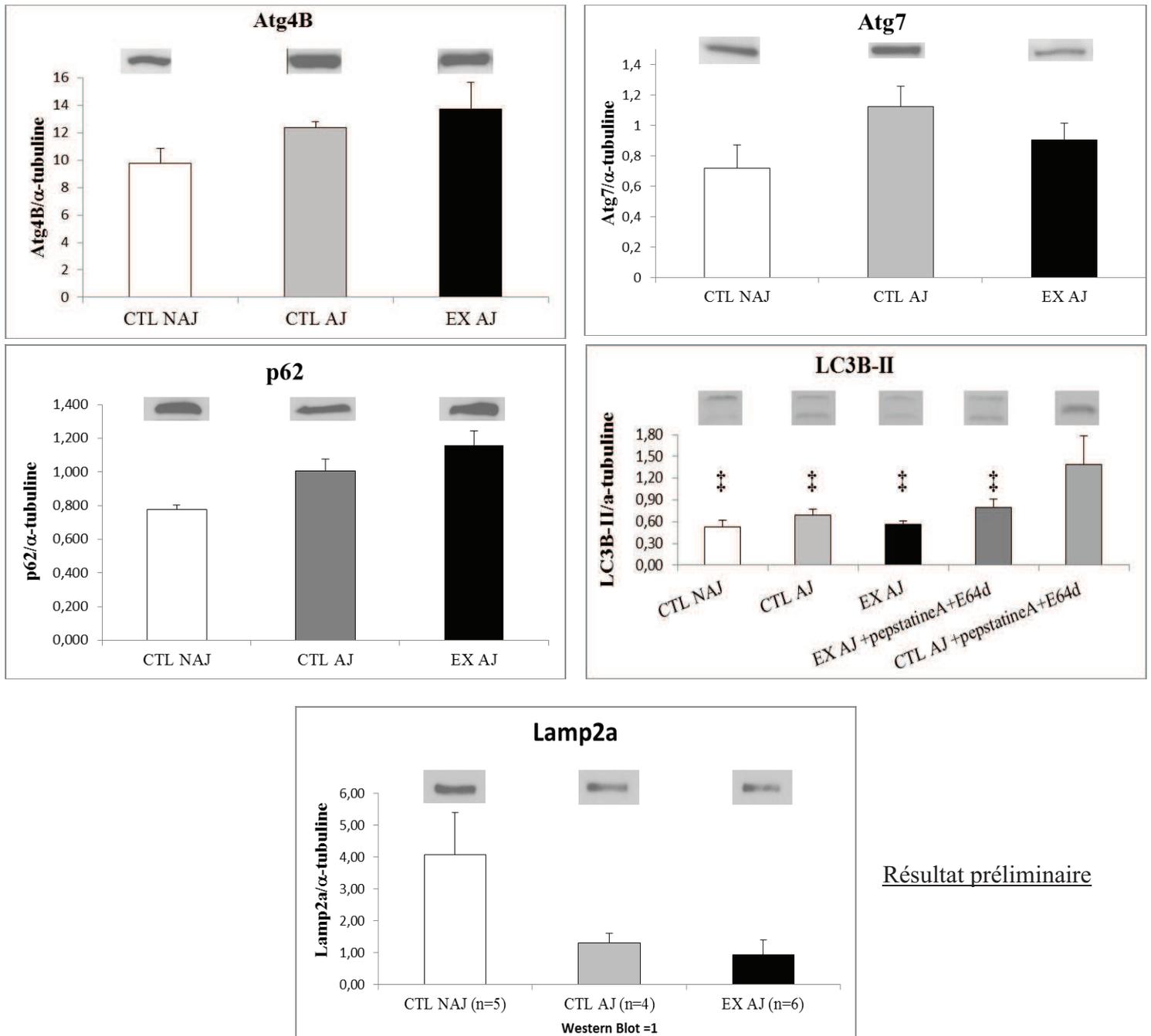
Le profil de poly-ubiquitination est le reflet de la quantité de protéines poly-ubiquitinées autrement dit de la quantité de protéines marquées par l'ubiquitine afin d'être ciblées pour la dégradation par le protéasome 20S. Aucune différence significative n'a été obtenue entre les trois groupes (*Figure 39a*), cependant une tendance à la diminution peut être observée en condition d'exercice. La diminution de la quantité de protéines poly-ubiquitinées est le reflet soit d'une diminution de l'activation du système UP soit au contraire une augmentation de l'activité catalytique de la sous-unité 20S du protéasome contribuant, à un instant t, à l'augmentation de la dégradation protéasome dépendante.

2. Activité enzymatique chymotrypsine-like ($\beta 5$)

L'activité chymotrypsine like ($\beta 5$) du protéasome a été mesurée en spectrofluorimétrie. Le protéasome 20S possède trois activités enzymatiques principales : l'activité caspase-like, trypsine-like et chymotrypsine-like. Suite à l'inactivité, certains travaux ont montré une augmentation de leur activité [418, 419] alors que d'autres ne notaient pas de modifications significatives [419, 420] selon le type de muscle. Cependant, l'ensemble de ces études rapportent une modulation identique et simultanée des activités chymotrypsine et trypsine-like. Ainsi, nous avons choisi de mesurer l'activité enzymatique du protéasome 20S à partir de l'activité chymotrypsine-like. Comme pour le profil d'ubiquitination, aucune différence significative ne peut être observée entre les groupes (*Figure 39b*). Cependant, une tendance à l'augmentation peut être observée dans le groupe EX AJ en comparaison au groupe CTL AJ et CTL NAJ. Au regard de la littérature, la mesure, de l'activité trypsine-like semble nécessaire pour conclure sur une augmentation ou une absence de modification de l'activité du protéasome en situation d'exercice.

3. Expression génique des E3 ligases

La quantification de l'expression génique des E3 ligases par RT-qPCR (*Figure 39c*) montrait une régulation transcriptionnelle de MAFbx ainsi que de MuRF1 par le jeûne (CTL AJ) qui par ailleurs s'atténuait lorsque l'on ajoute le stimulus de l'exercice (EX AJ). Dans la continuité des résultats du profil d'ubiquitination et de la mesure enzymatique du protéasome, l'exercice ne majorait pas l'expression génique des E3 ligases par rapport à la condition contrôle à jeun; au contraire celles-ci se trouvaient diminuées.



Résultat préliminaire

Figure 40. Quantification protéique par Western blot des marqueurs de l'autophagie (a) Atg4B, Atg7, p62 et LC3-II des EDL de rats nourris *ad libitum* (CTL NAJ) ou après 12 heures de jeûne en condition de Repos (CTL AJ) ou après un exercice (EX AJ). Moyennes \pm SEM (n=6-10). ‡ Différent CTL AJ+pepstatineA+E64d $p < 0,05$ (b) ainsi que le marqueur Lamp2a de la CMA.

ii. Autophagie

1. Quantification protéique des Atgs

Aucune différence significative des expressions protéiques des Atgs, Atg4b, Atg7 et p62 n'existait entre les groupes (*Figure 40a*). La quantité en protéine LC3-II, marqueur de la formation des autophagosomes, n'était ni modifiée par le jeûne (CTL NAJ vs CTL AJ) ni par l'exercice (CTL AJ vs EX AJ). En revanche, lorsque son recyclage au sein du lysosome était bloqué grâce aux inhibiteurs lysosomales pepstatineA et E64d, une augmentation significative de son expression était obtenue en situation de jeûne (CTL AJ + pepstatineA+E64d vs CTL AJ) et une tendance ($p=0,1$) pouvait être notée en situation d'exercice (EX AJ + pepstatineA+ E64d vs EX AJ). Ces résultats attestent d'une augmentation du turnover ou recyclage de LC3-II en situation de jeûne traduisant une augmentation des flux autophagiques. Ces données montrent qu'en situation de jeûne, l'ajout du stimulus de l'exercice en résistance concoure à la diminution du turnover de LC3-II (*Figure 40a*).

Des études préliminaires ont été également conduites sur les marqueurs de l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA) à travers l'expression protéique de Lamp2 et plus spécifiquement sa partie cytosolique Lamp2a au niveau du lysosome. Les résultats obtenus à la suite d'un seul Western blot (*Figure 40b*) montrent une diminution importante de Lamp2a au cours du jeûne (CTL NAJ vs CTL AJ) qui ne semble pas s'accroître lorsque l'on ajoute l'exercice (CTL AJ vs EX AJ). Ces données suggèrent une diminution de l'activation de la CMA au cours du jeûne.

2. Expression génique des Atgs

L'augmentation de la transcription de LC3B dans les groupes CTL AJ et EX AJ versus CTL NAJ (*Figure 41*) corroborait l'augmentation du turnover de LC3B-II observée par Western blot (*Figure 40a*). Par ailleurs, la diminution de l'expression du gène de Atg4B et l'absence de modifications du gène Atg7 attestaient que l'augmentation des flux autophagiques n'étaient pas liés à la régulation de ces Atgs (*Figure 41*). Enfin, comme l'expression protéique (*Figure 40b*), la transcription de Lamp2a se trouvait drastiquement diminuée par le jeûne (CTL AJ) mais cette diminution n'était pas majorée par l'exercice (EX AJ).

iii. Système lysosomal

La cathepsine L est considérée comme marqueur de l'activation du système lysosomal étant donné que de nombreuses études ont retrouvé ses expressions protéiques et/ou géniques augmentées dans diverses situations d'atrophies [251]. L'activité de la cathepsine L (*Figure 42a*) était très significativement augmentée par le jeûne (CTL AJ vs CTL NAJ ; $p<0,01$) mais celle-ci revenait à un niveau basale en condition d'exercice (pas de différence CTL NAJ et EX AJ). La même régulation a pu être observée au niveau transcriptionnel (*Figure 42b*). Ces données suggèrent l'implication du

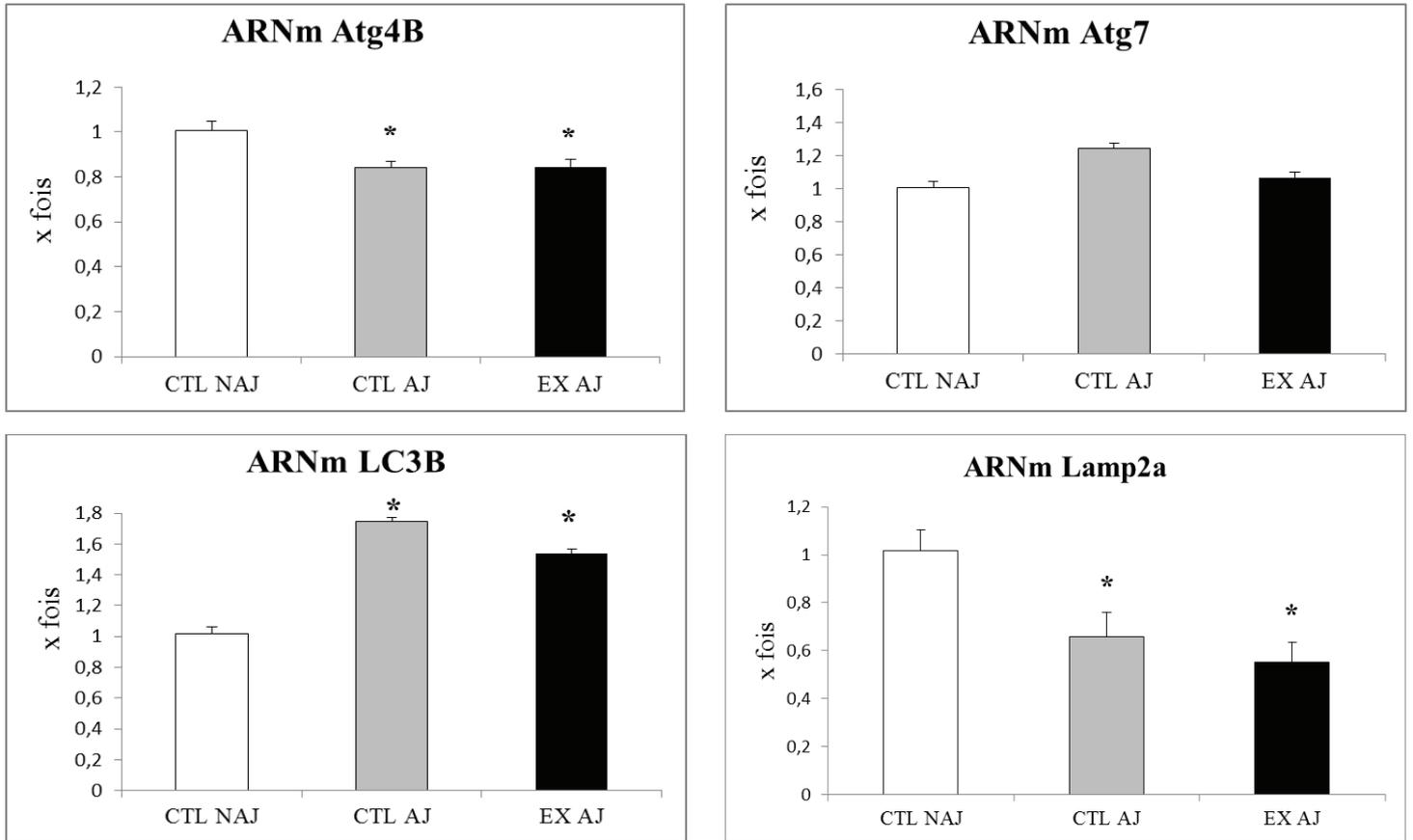


Figure 41. Expression des gènes de marqueurs de l'autophagie Atg4B, Atg7 et LC3B ainsi que le marqueur de la CMA, Lamp2a, mesurés par qPCR à partir du muscle EDL de rats, nourris *ad libitum* (CTL NAJ), après 12 heures de jeûne au repos (CTL AJ) ou après un exercice excentrique (EX AJ). Moyennes \pm SEM (n=8). * Différent CTL NAJ. (p<0,05)

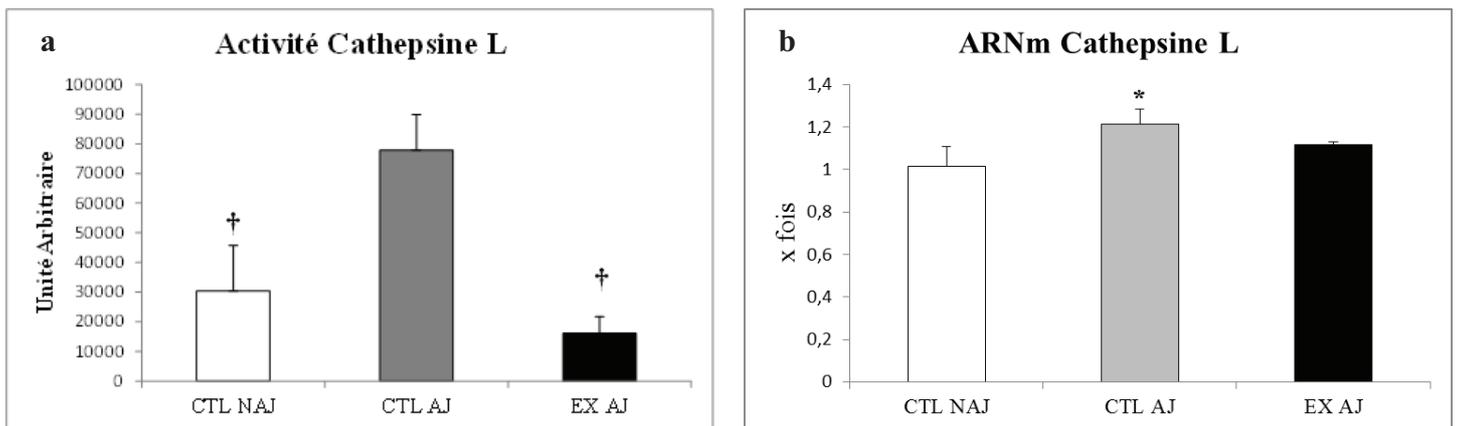


Figure 42. Mesure de l'activité (a) et de l'expression génique (b) de la cathepsine L à partir du muscle EDL de rats, nourris *ad libitum* (CTL NAJ), après 12 heures de jeûne au repos (CTL AJ) ou après un exercice excentrique (EX AJ). Moyennes \pm SEM (n=8). * Différent CTL NAJ. † Différent CTL AJ (p<0,05)

système lysosomal dans la dégradation protéique induite par le jeûne à travers l'activation de la cathepsine L, cependant cette dernière n'est pas induite par l'exercice en résistance. Afin de conclure sur l'implication du système lysosomal par l'exercice, d'autres cathepsines pourraient être étudiées notamment les cathepsines B et D.

L'ensemble des marqueurs moléculaires des trois systèmes protéolytiques majeurs ne permettent pas d'expliquer l'origine de la protéolyse induite par un protocole d'exercice de résistance en mode excentrique. En effet, la mesure physiologique de dégradation protéique atteste d'une induction de 30% de la protéolyse lorsque l'exercice est réalisé à jeun. Si les 27% d'induction de protéolyse par le jeûne (CTL NAJ vs CTL AJ) peuvent être expliqués par une activation des systèmes :

- Ubiquitine protéasome (↑ ARNm MAFbx et MuRF1)
- Autophagie (↑ turnover et ARNm de LC3B-II)
- Lysosomal (↑ activité et ARNm de la cathepsine L)

Ces derniers se trouvaient systématiquement diminués ou non modifiés lorsque l'exercice était ajouté suggérant d'une part que les marqueurs choisis ne sont pas pertinents, d'autre part que d'autres systèmes protéolytiques sont probablement activés tels que les calpaines, les métalloprotéases matricielles ou encore les caspases. Les perspectives d'études doivent donc maintenant se porter sur la mesure de l'activité trypsine-like du protéasome, l'activité des cathepsines B et D, l'activité de la caspase-3 ainsi que des MMPs.

iv. Autres systèmes

Des mesures préliminaires n'ont pas suggéré de différences sur le clivage de la μ -calpaine par Western blot (*Figure 43a*). Cependant, des premiers résultats sur la transcription des MMPs révèlent une augmentation de l'expression génique de MMP-2 en condition de jeûne qui n'est pas diminuée par l'exercice (*Figure 43b*). La mesure de l'activité de MMP-2 par zymographie devient alors une perspective intéressante.

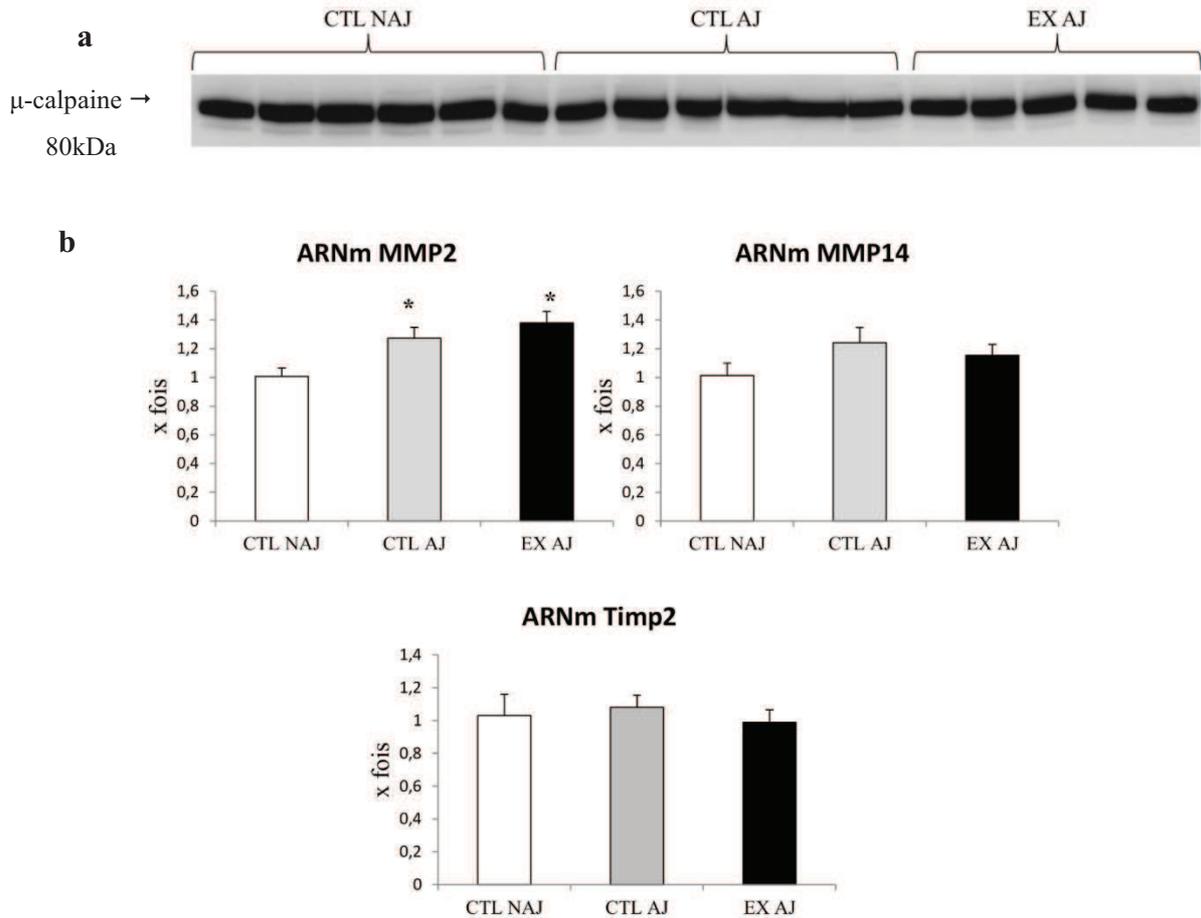


Figure 43. Quantification de (a) la protéine μ-calpain par Western blot (n=1) ainsi que de (b) l'expression génique de MMP-2, MMP-14, Timp2 par qPCR. Moyennes ± SEM (n=6-8). * Différent CTL NAJ (p<0,05)

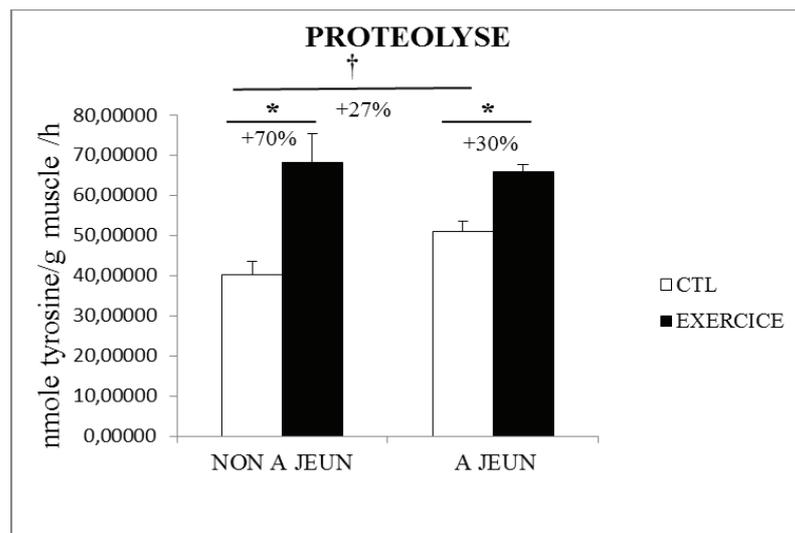


Figure 44. Protéolyse sur EDL isolés de rats au Repos (CTL) ou une heure après un exercice (Exercice) en condition *nourris ad libitum* (NON A JEUN) ou après 12 heures de jeûne (A JEUN). Moyennes ±SEM (n=10). * Différent CTL ; † Différent CTL NAJ vs CTL AJ (p<0,01)

c. Mesure de protéolyse induite d'exercice en condition non à jeun

Le choix de mesure de la protéolyse induite d'exercice en condition de jeûne était justifié par nos premières expériences (*Figure 34*) qui suggéraient une variabilité importante de la protéolyse basale en situation « *nourrie ad libitum* » (CTL NAJ) et d'autant plus lorsqu'un exercice était ajouté (EX NAJ). Cependant, la protéolyse induite par le jeûne pourrait être un stimulus si important qu'elle empêche d'observer des différences significatives avec la condition exercice à jeun (EX AJ) rendant difficile la distinction entre la protéolyse induite par le jeûne de celle induite par l'exercice. De ce fait, nous avons augmenté le nombre d'échantillons dans la mesure de la protéolyse basale de rat nourris *ad libitum* (CTL NAJ, n=10) et effectué des mesures à la suite d'un exercice non à jeun (EX NAJ, n=3). Ces expériences ont permis d'obtenir une augmentation de 70% de la protéolyse lorsque l'exercice était réalisé dans des conditions physiologiques non à jeun (*Figure 44*). De façon intéressante, la protéolyse induite d'exercice en situation de jeûne (EX AJ) n'est pas plus importante qu'en situation non à jeun (EX NAJ) suggérant un mécanisme de protection du muscle afin de le maintenir dans des conditions homéostatiques en limitant les phénomènes protéolytiques (*Figure 44*).

L'étude des marqueurs moléculaires des différents systèmes protéolytiques impliqués dans la protéolyse induite d'exercice en condition non à jeun n'a pas été effectuée, ne faisant pas l'objet de notre question initiale. Au regard des derniers résultats présentés, il semble dorénavant possible d'étudier et de répondre à la question de la part des différents systèmes de protéolyse dans la dégradation protéique induite d'exercice en situation physiologique *non à jeun*.

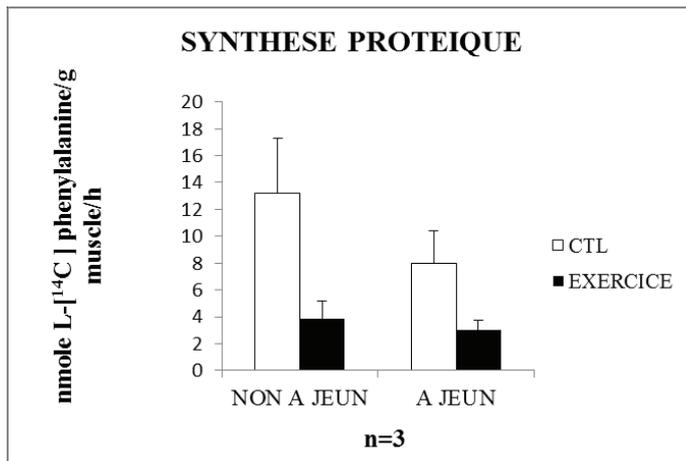


Figure 45. Mesure de la synthèse protéique par incorporation en L-[¹⁴C]-phénylalanine dans des EDL isolés de rats au Repos (CTL) ou une heure après un exercice (Exercice) en condition *nourris ad libitum* (NON A JEUN) ou après 12 heures de jeûne (A JEUN). Moyennes \pm SEM (n=3)

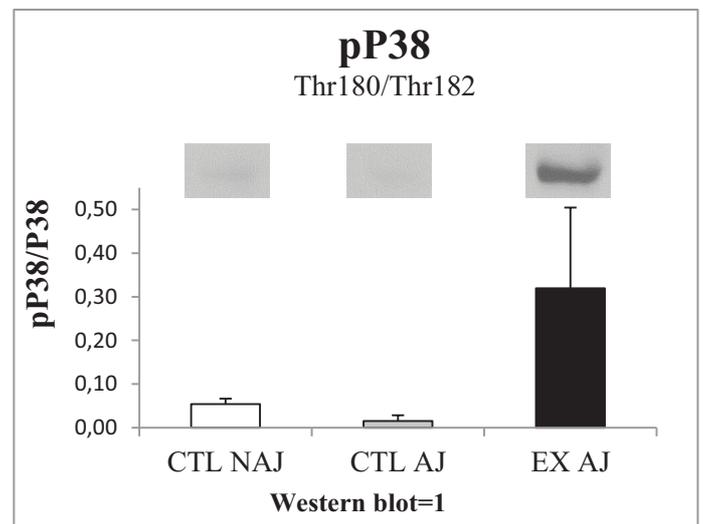
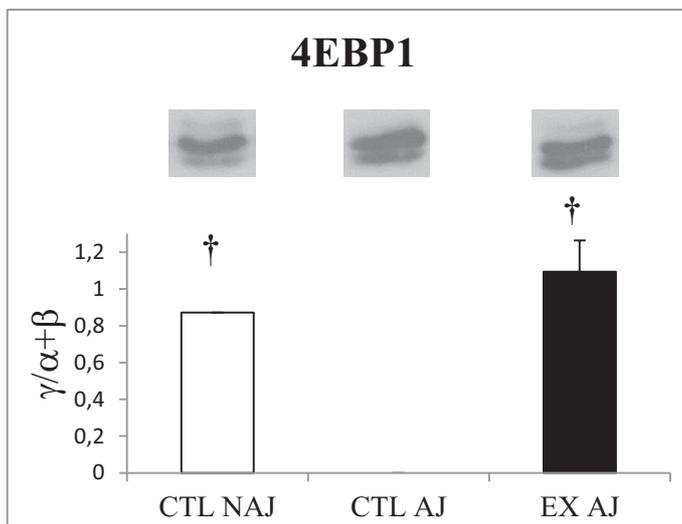
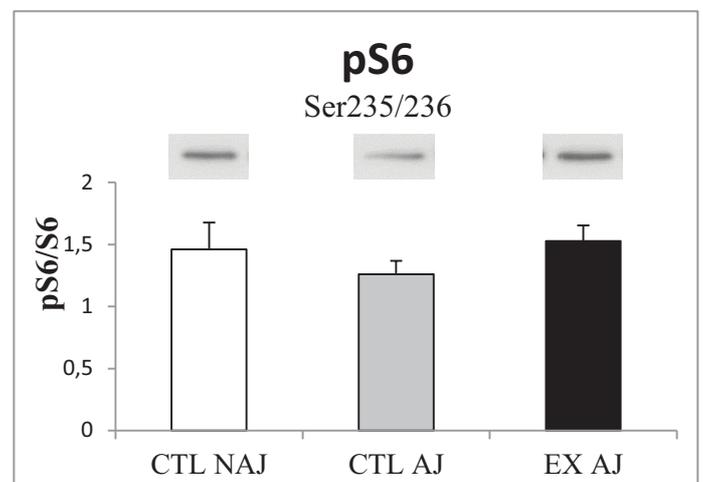
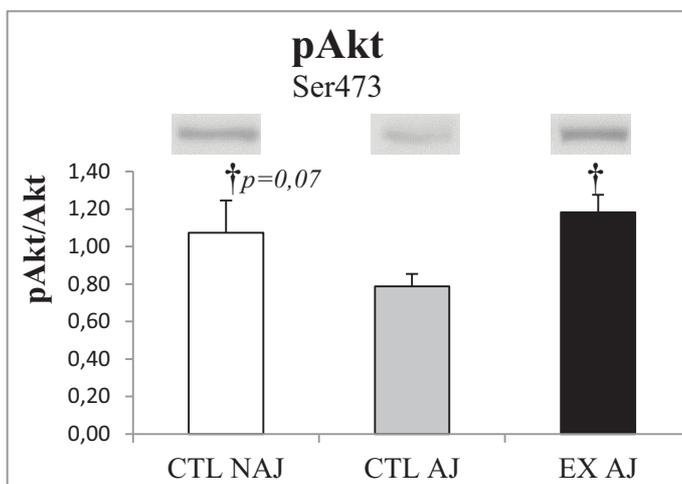


Figure 46. Quantification protéique par Western blot de l'activation des marqueurs de la synthèse protéique, Akt, S6, 4EBP1, p38 sur EDL de rats nourris *ad libitum* (CTL NAJ) ou après 12 heures de jeûne en condition de Repos (CTL AJ) ou après un exercice (EX AJ). Moyennes \pm SEM (n=6-10). † Différent CTL AJ (p<0,05).

III- ETUDE DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE A LA SUITE DE CONTRACTIONS EXCENTRIQUES EN RESISTANCE SUR EDL ISOLE DE RAT

a. Mesure physiologique de la synthèse protéique 1 heure après l'exercice

Une première mesure de synthèse protéique par incorporation de phenylalanine radiomarquée au C¹⁴ montre de façon non significative (n=3) que le taux de synthèse protéique est diminué dans l'heure qui suit l'exercice quel que soit le statut alimentaire (*Figure 45*). Cette mesure permet également de vérifier que non seulement les 12 heures de jeûne induisent une protéolyse (+27%) mais non seulement contribuent à diminuer la synthèse protéique (-40%).

b. Marqueurs moléculaires de la synthèse protéique

Si la mesure physiologique de la synthèse protéique était diminuée dans l'heure qui suit l'exercice (0-1 heure), les marqueurs moléculaires de la voie canonique Akt/mTOR étaient globalement augmentés. Ainsi, les phosphorylations des protéines Akt et 4EBP1 étaient significativement diminuées par le jeûne (CTL AJ) mais augmentées en situation d'exercice (EX AJ) confirmant une donnée clairement acceptée d'une stimulation de la synthèse protéique par l'exercice et plus précisément ici de la cascade Akt/mTOR/4EBP1 (*Figure 46*). La phosphorylation de S6 sur les sérines 235/236 ne présente aucune différence entre les groupes. Ainsi, l'étude de sa phosphorylation sur les sérines 240/244 et/ou l'étude de la protéine en amont, p70S6k, seraient alors à envisager pour vérifier la participation de la voie Akt/mTOR/p70S6K/S6 dans la synthèse protéique induite d'exercice [24, 45]. L'activation de la voie de la p38 MAPK après l'exercice est également un élément dans l'activation de la synthèse protéique mais également dans la régulation de l'UPS (*Figure 46*).

IV- ETUDE PRELIMINAIRE DE LA BALANCE PROTÉIQUE A LA SUITE D'UN EXERCICE *IN VIVO* EN RESISTANCE CHEZ LE RAT

Dans la perspective d'étudier l'effet d'une supplémentation en leucine sur la dégradation protéique induite par un exercice en résistance, nous avons réinvesti le modèle d'exercice *In vivo* détaillé dans la première étude. Cet exercice permettant au bout de 4 semaines d'entraînement d'obtenir une hypertrophie du muscle FDP, il peut être intéressant d'accélérer ce processus de prise de masse musculaire en limitant la protéolyse induite d'exercice. Tout d'abord, il faut déterminer les temps post-exercice pour lesquels la synthèse et la dégradation protéique sont maximales chez le rat. Dans les expériences préliminaires suivantes, les rats étaient mis à jeun le matin pendant 4 heures avant le début de l'exercice. Différents timing ont été testés pour mesurer les niveaux de synthèse et de dégradation protéique. De la même manière nous avons testé l'inhibiteur 3-MA de la protéine Vps34 du système autophagique dans certaines conditions (*Figure 47*).

a	Protéolyse nmole tyrosine/g muscle/h					
	EDL		SOL		FDP	
	CTL	Exercice	CTL	Exercice	CTL	Exercice
Timing post-exercice						
1H-2H	95	114	153	168,6 ±8,2		92,5 ±10,5
2H-3H	80	72	140	229 ±20,7		185,3 ±21,4
3H-4H			119 ±12	132 ±15	94,5±11	93 ±11

	Synthèse Protéique nmole [C ¹⁴]-Phe/g muscle/h					
	EDL		SOL		FDP	
	CTL	Exercice	CTL	Exercice	CTL	Exercice
Timing post-exercice						
1H-2H	8,9	7,3	21,5	11,6 ±1,3		12,4 ±1,1
2H-3H	10,7	10,8	25,8	13,7 ±1,4		8,8 ±0,4
3H-4H			21,4 ±0,6	20,5 ±0,2	20,57±0,2	32,1 ±2,8

b

SOL	PROTEOLYSE (nmole tyrosine/g muscle/h)				SYNTHESE PROTEIQUE (nmole [C14]phe/g muscle/h)			
	1H-2H		2H-3H		1H-2H		2H-3H	
	SANS 3MA	AVEC 3MA	SANS 3MA	AVEC 3MA	SANS 3MA	AVEC 3MA	SANS 3MA	AVEC 3MA
CTL	153	172	140	119	21,48	7,23	25,81	15,32
EXERCICE	184	171	171	199	13,38	8,54	12,9	7,46

EDL	PROTEOLYSE (nmole tyrosine/g muscle/h)				SYNTHESE PROTEIQUE (nmole [C14]phe/g muscle/h)			
	1H-2H		2H-3H		1H-2H		2H-3H	
	SANS 3MA	AVEC 3MA	SANS 3MA	AVEC 3MA	SANS 3MA	AVEC 3MA	SANS 3MA	AVEC 3MA
CTL	95	63	80	68	8,93	6,08	10,72	7,1
EXERCICE	114	105	72	58	7,3	4,7	10,83	5,84

Figure 47. Mesures préliminaires *ex vivo* de la balance protéique mesurée sur une heure par incorporation de L-[¹⁴C]-phénylalanine sur muscles SOL, EDL et FDP isolés de rats (a) au repos (CTL), 1, 2 ou 3 heures après un exercice de résistance réalisé *in vivo* (Exercice) et/ou (b) en présence de 3-méthyladénine (3MA). Moyennes ±SEM (n=1-2)

Une augmentation de la protéolyse a pu être observée dans les muscles SOL et FDP, 2 heures après l'exercice alors que la protéolyse du muscle EDL ne semblait pas affectée par l'exercice (*Figure 47a*). Cette différence peut être expliquée par une action majeure des muscles fléchisseurs au cours de ce type d'exercice. Par ailleurs, aucune modification importante de la synthèse protéique de l'EDL n'a été observée corroborant l'hypothèse évoquée précédemment. La synthèse protéique du muscle SOL était diminuée jusqu'à 3 heures post-exercice mais retrouvait des valeurs basales entre 3-4 heures suggérant qu'une augmentation de celle-ci pourrait être retrouvée entre 4-5 heures post-exercice. En l'absence de mesure de la synthèse protéique au repos du muscle FDP, il est difficile d'argumenter sur une diminution de la synthèse protéique entre 1-3 heures post-exercice. Cependant, on peut observer une augmentation de celle-ci entre 3-4 heures après l'exercice. L'ensemble de ces résultats (*Figure 47a*) restent à confirmer mais ils suggèrent une augmentation de la protéolyse entre 2-3 heures après ce protocole en résistance quel que soit le muscle (SOL ou FDP) alors que la synthèse protéique dans un premier temps diminuée semble être activée plus tardivement entre 3-4 heures post-exercice pour le muscle FDP et probablement 4-5 heures pour le muscle SOL.

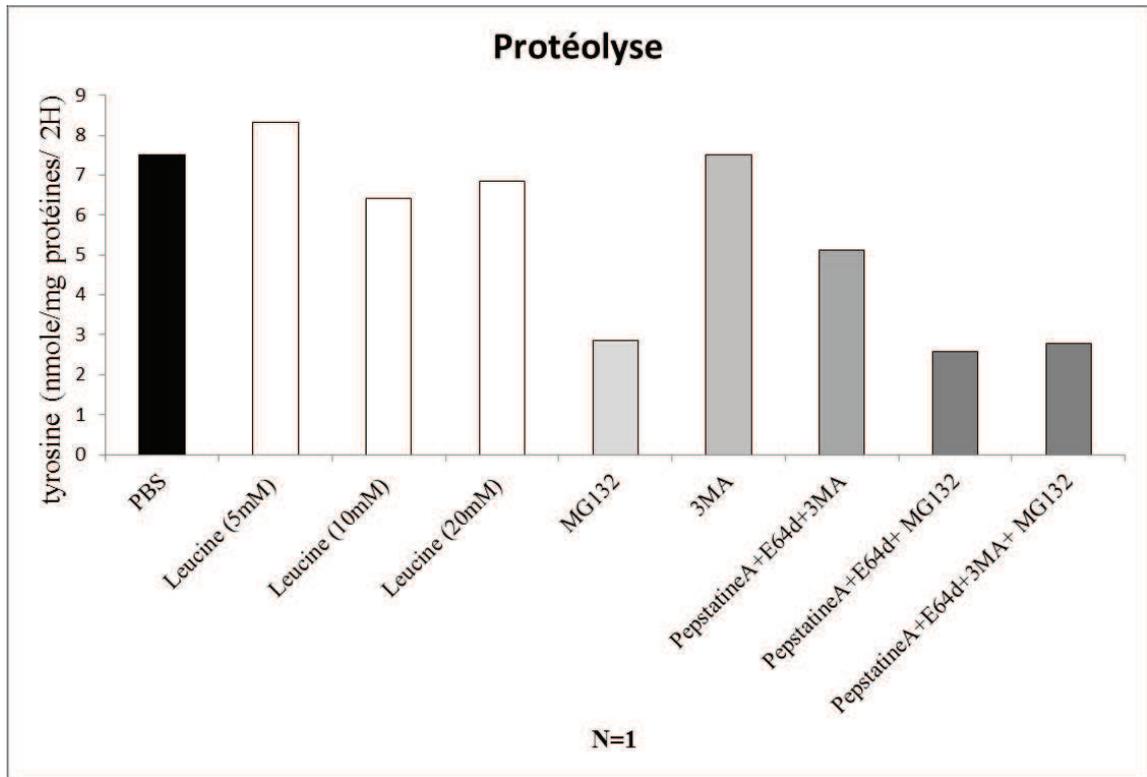
Mise à part la mesure de protéolyse du muscle SOL, la 3-méthyladénine (3-MA), inhibitrice de la protéine clé Vps34 dans les processus d'autophagie, contribuait à diminuer à la fois la protéolyse de l'EDL et la synthèse protéique du SOL et de l'EDL en condition de repos (4 heures de jeûne) et également à la suite d'un exercice (*Figure 47b*). Concernant les mesures de protéolyse de l'EDL, celles-ci suggèrent l'implication de l'autophagie dans la protéolyse basale de repos probablement en lien avec les 4 heures de privation alimentaire dans le muscle EDL (-34% et -15% respectivement entre 1-2 et 2-3 heures), l'inhibition n'étant pas plus importante en condition d'exercice (-8% et -14% respectivement entre 1-2 et 2-3 heures). De façon curieuse, la 3-MA contribue également à diminuer la synthèse protéique des deux muscles quelle que soit la condition (CTL ou Exercice) et cette inhibition est plus marquée en condition d'exercice au timing 2-3 heures. Ces données apportent des perspectives intéressantes sur le rôle peut être « pivot » de Vps34 dans la régulation de la balance protéique.

V- ETUDE PRELIMINAIRE IN VITRO DE LA DEGRADATION PROTEIQUE EN CONDITION D'ATROPHIE SUR DES MYOTUBES DE RAT (L6)

Dans l'objectif de dégager des pistes de recherche concernant les voies de signalisation impliquées dans la dégradation protéique induite dans des conditions d'atrophie et plus spécifiquement dans la compréhension des mécanismes de l'autophagie en lien avec un effet anti-protéolytique de la leucine, des expériences sur la lignée L6 de rat ont été menées.

Dans un premier temps, il s'agissait de déterminer les conditions d'atrophie et de vérifier l'action anti-protéolytique de la leucine à partir d'une étude dose-réponse. La privation de nutriments par retrait du milieu de culture classique (type DMEM) sur culture cellulaire est capable de simuler les effets du jeûne chez l'animal, à savoir l'induction d'une protéolyse via l'activation des systèmes

a



b

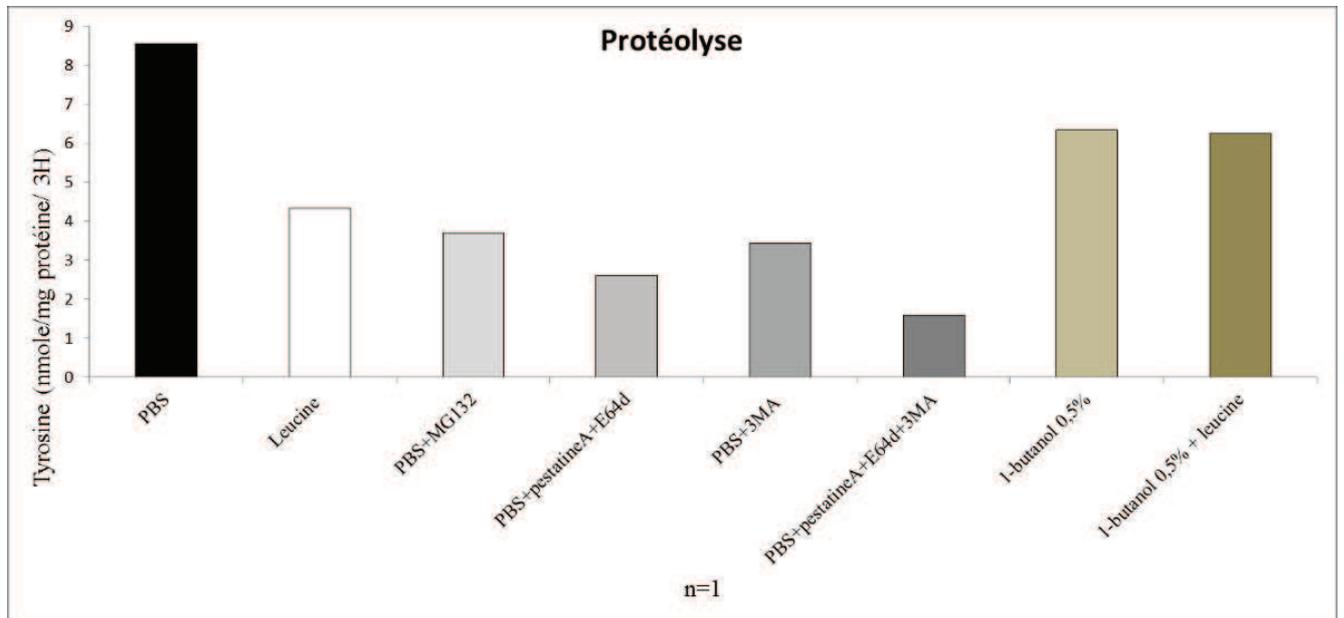


Figure 48. Mesure de la protéolyse sur culture (n=1) de L6 de rats après 4 heures de *PBS atrophie* suivies de différents traitements sur (a) 2 heures ou (b) 3 heures.

protéolytiques vus précédemment [258, 263, 421]. Ainsi, dans une première étude et après 9 heures dans un milieu privé de nutriments (« PBS *atrophie* »), les cellules n'adhéraient plus à la boîte de pétrie ce qui rendait plus difficile la mesure de la protéolyse par le dosage de la tyrosine en spectrofluorimétrie, les cellules étant en suspension dans le milieu qui devait être recueilli. Un protocole similaire d'atrophie ramené sur 4 heures a donc été testé et s'est révélé concluant au niveau de l'adhérence des cellules quelle que soit le diamètre des boîtes de pétrie testé c'est-à-dire 35, 60 et 100 mm. Le diamètre 60 mm s'avère être un compromis intéressant pour recueillir des valeurs de protéolyse plus élevées que sur des boîtes de 100mm et présente l'avantage de récupérer davantage de protéines que des boîtes de 35 mm dans des perspectives de quantifications protéiques et/ou ARNm.

Une étude préliminaire sur boîte de 60 mm (*Figure 48a*) a montré également qu'un traitement de 2 heures à 10mM de leucine en présence de cycloheximide (0,5mM) après 4 heures de privation en nutriments, était suffisant pour observer une action sur la diminution de la protéolyse (-15%). Cette première expérience a montré également que 5mM de leucine n'avait aucun effet sur la protéolyse et par ailleurs 20mM ne contribue pas à diminuer davantage la protéolyse par rapport à 10mM. Ces résultats confirmaient l'observation de Busquets *et al.* (2000) [422] sur muscle isolé de rat qui présentaient une diminution significative de 25% de la protéolyse après une incubation de 2 heures dans un milieu à 10mM de leucine plutôt que 5mM.

Dans le même objectif que l'étude *ex vivo* sur muscle isolé, différents inhibiteurs ont été utilisés pour déterminer l'implication de certains systèmes protéolytiques en condition d'atrophie (*Figure 48*) pour envisager ensuite une action de la leucine sur tel ou tel système. Une deuxième expérience a été réalisée en utilisant la leucine à 10mM, différents inhibiteurs de la protéolyse ainsi que l'agent chimique *1-butanol* comme molécule inhibitrice de la voie de signalisation de la phospholipase D1 (PLD1), voie probablement impliquée dans l'activation de mTOR par les acides aminés branchés. Une deuxième série de cultures a donc été réalisée sur des boîtes de 100mm avec des traitements plus longs de 3 heures (*Figure 48b*). Si l'on retrouvait toujours l'effet anti-protéolytique de la leucine (10mM), celui-ci semblait plus marqué au bout de 3 heures plutôt que 2 heures (-50% vs -15% respectivement). Par ailleurs, l'implication de l'UPS et du LAS semblait modifiée. Après 2 heures de traitement (*Figure 48a*), il semble que l'UPS soit majoritairement responsable de la protéolyse (- 62% avec MG132) plutôt que le système lysosomal (-32% avec pepstatineA et E64d). Cependant, une diminution de 65% de la protéolyse en présence des inhibiteurs MG132, pepstatineA et E64d laisse penser à un effet peu spécifique du MG132. Après 3 heures de traitement (*Figure 48b*), le LAS semble plus impliqué que l'UPS (-80% versus -56%) même si l'hypothèse du manque de spécificité du MG132 peut de nouveau être émise. De plus, le système autophagique apparaît jouer un rôle au bout de 3 heures de traitement puisqu'une diminution de protéolyse, non obtenue au bout de 2 heures, peut être observée (- 59%). Ces conditions de culture avec un traitement de 3 heures ouvrent une piste sur l'implication de la voie de la PLD1 dans l'effet inhibiteur de la leucine sur la protéolyse étant donné que l'action de cette dernière est inhibée en présence de *1-butanol* (*Figure 48b*)

DISCUSSION

ETUDE 1 : IMPLICATION DE LA VOIE IL-6/STAT3 DANS L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRE INDUITE PAR UN ENTRAÎNEMENT EN RESISTANCE

Des données récentes de la littérature ont pointé du doigt l'implication de l'interleukine-6 (IL-6), jusque-là considérée comme un senseur métabolique musculaire à l'exercice, dans les mécanismes d'hypertrophie [423]. En effet, Serrano *et al.* (2008) [165] ont montré une absence d'hypertrophie du muscle plantaris soumis à une surcharge compensatoire sur des souris IL-6^{-/-} comparé aux souris sauvages. L'IL-6 favoriserait la prolifération et l'accrétion des cellules satellites par la voie signalétique IL-6/JAKs/STAT3 [209, 210]. Par ailleurs, en réponse à des contractions excentriques chez l'homme, la voie IL-6/STAT3 serait activée au sein des SCs [140, 211]. Cependant, cette activation précoce de l'IL-6 au sein des SCs pourrait être juste le marqueur de leur participation au phénomène de régénération musculaire, l'exercice étant associé à une augmentation de la créatine kinase ainsi que de l'infiltration de macrophages et neutrophiles 48h post-exercice [140, 211]. Si Trenerry *et al.* (2007,2010) ont pu montrer une activation de la protéine STAT3 à la suite d'un exercice de résistance non traumatisant [170, 171], aucune étude n'avait encore exploré le lien entre la voie IL-6/STAT3 et l'hypertrophie musculaire retrouvée après des semaines d'entraînement en résistance. Ainsi, l'implication de l'IL-6 musculaire après plusieurs semaines d'entraînement n'a pas été étudiée et plus précisément, les mécanismes de son action au sein des cellules satellites via l'étude de la régulation des facteurs myogéniques (MRFs) n'ont pas été investigués. Dans cette perspective, nous avons modifié un modèle d'exercice physiologique chez le rat [20] afin d'étudier les événements cellulaires et moléculaires en lien avec la voie IL-6/STAT3 à la suite d'un exercice en résistance pouvant conduire à une hypertrophie musculaire après 2, 4 ou 10 semaines d'entraînement. L'hypothèse étant que l'hypertrophie musculaire induite au bout de quelques semaines d'entraînement serait en partie en lien avec l'activation, après chaque exercice aigu, des cellules satellites via la voie IL-6/STAT3.

Jusqu'à présent, il n'existait pas de modèle d'exercice en résistance chez le rat conduisant à une hypertrophie musculaire si ce n'est des protocoles de stimulation électriques *in situ*. En effet, l'appareil de squat de Tamaki *et al.* (1992) [19] n'a pas permis d'obtenir une hypertrophie musculaire des pattes arrières après 12 semaines d'entraînements contenant 3 fois par semaines, 3 séries de 10 répétitions à 75% de la répétition maximale. Il apparaît que ce volume d'exercice n'est pas suffisant pour provoquer une augmentation de masse musculaire chez le rat. En utilisant le même modèle, Barauna *et al.* (2005) [21], Barauna *et al.* (2007) [22] ont pu obtenir une hypertrophie cardiaque à la suite d'un protocole de 4 x 12 répétitions à 75%, 5 fois par semaine pendant 4 semaines mais ces auteurs n'ont pas mesuré l'hypertrophie musculaire squelettique. Par ailleurs, ce modèle de squat n'est pas naturel pour l'animal et nécessite donc l'application d'un courant électrique au niveau des pattes postérieures du rat. Après avoir essayé de reproduire ce type d'exercice au sein du laboratoire, l'idée a

été abandonnée puisque les animaux refusaient d'effectuer des squats correctement exécutés (amplitude du centre de gravité de $\pm 3\text{cm}$) malgré les stimulations électriques. Ainsi, le modèle physiologique d'exercice d'escalade de Lee *et al.* (2004) [20], beaucoup plus physiologique, a été adapté et nous a permis d'obtenir des changements phénotypiques comparables à ceux retrouvés chez l'homme à la suite d'entraînement en résistance. Ainsi, une hypertrophie musculaire a pu être obtenue sur le muscle *Flexor Digitorum Profundus* (FDP), fléchisseur des pattes avant, dès 4 semaines d'entraînement et de façon majorée au bout de 10 semaines. En relation avec des précédentes études chez l'homme, une hypertrophie de tous les types de fibres a été obtenue dans ce muscle mais celle-ci est majorée dans les fibres de type IIa (+92%) et IIx (+100%) par rapport aux fibres de type I (+70%) au bout de 10 semaines. La transition phénotypique vers un profil « intermédiaire » comme chez l'homme c'est-à-dire une diminution des fibres de type I et IIx associée à une augmentation des fibres IIa, s'est mise en place avant l'hypertrophie musculaire c'est-à-dire au bout de 4 semaines d'entraînement. Ainsi, ce modèle d'exercice implique davantage les muscles fléchisseurs qu'extenseurs étant donné qu'aucune modification phénotypique n'a été retrouvée sur le muscle EDL. Par ailleurs, le soléaire (SOL) présente une modification de son phénotype sans hypertrophie attestant d'un remodelage majeur des muscles fléchisseurs des pattes avant plutôt qu'arrière. Enfin, l'étude du contenu enzymatique de chaque type de fibres du FDP et du SOL pourrait s'avérer intéressant pour préciser un changement coordonné ou non de profil métabolique. Ces résultats permettraient de préciser si notre entraînement s'apparente davantage à développer l'endurance de force plutôt qu'à celui de la force maximale.

Il est reconnu que chez l'homme, l'hypertrophie musculaire est liée à une stimulation de la synthèse protéique dans les 24 à 48 heures après une séance d'exercice en résistance [27, 424]. Même si la synthèse protéique n'a pas été mesurée dans notre modèle, le phénomène hypertrophique observé pourrait s'expliquer par une augmentation de la synthèse protéique qui ne serait pas liée à une augmentation de la synthèse des protéines myofibrillaires étant donné que le contenu en protéine myofibrillaire était diminué au bout de 10 semaines dans les muscles FDP et SOL. Ainsi, il n'est pas à exclure que l'hypertrophie observée puisse en partie impliquer une augmentation de la synthèse des protéines sarcoplasmiques d'autant que le contenu en protéine totale exprimé par rapport à des grammes de muscle n'est pas modifié. N'ayant pas de données sur le poids des muscles entre avant et après entraînement, et surtout de données sur les acteurs moléculaires comme ceux de la voie IGF-1/Akt/mTOR/p70S6K, on ne peut conclure à une augmentation de la synthèse protéique en lien avec une augmentation du contenu en protéine sarcoplasmique. Par ailleurs, et contrairement à certains auteurs [425], l'hypertrophie observée au bout de 4 et 10 semaines d'entraînement dans le muscle FDP, ne s'explique pas par un phénomène d'hyperplasie puisque d'une part aucune nouvelle fibre n'a été repérée par immunohistochimie et d'autre part aucune modification du ratio ADN/Protéines totales n'a été observée.

En accord avec des études précédentes [60, 66], une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 (pERK1/2) a été mesurée 6H après notre exercice aigu pouvant être interprété comme une voie de signalisation supplémentaire à celle de mTOR dans la stimulation de la synthèse protéique. En effet, après un exercice aigu de résistance chez l'homme, pERK1/2 est capable d'activer la kinase S6 ribosomale p90 (p90RSK) de façon mTOR indépendante [397, 426]. Il n'est donc pas à exclure que la stimulation de cette voie après chaque exercice aigu pourrait expliquer une partie de l'hypertrophie musculaire obtenue après 10 semaines d'entraînement. Par ailleurs, comme il n'est pas possible de distinguer si l'activation de cette voie se fait au sein des myocytes plutôt que des cellules satellites, on ne peut pas exclure la possibilité qu'une partie de la phosphorylation de ERK1/2 mesurée provienne des SCs et participe ainsi à leur prolifération. De plus, suggéré par l'étude de Fukada *et al.* (1996) [415] sur une lignée de cellules pro-B, pERK1/2 retrouvé 6 heures après notre exercice pourrait être induite par la voie de signalisation de l'IL-6/STAT3 et induire la prolifération des SCs [210].

Parallèlement, à l'augmentation de la synthèse protéique, le recrutement des cellules satellites à la suite d'un exercice peut concourir à l'apport de nouveau matériel génétique augmentant la capacité traductionnelle du muscle et participant ainsi à l'hypertrophie musculaire. En effet, de nombreux travaux ont pu montrer une augmentation du nombre de noyaux par fibre pour des hypertrophies musculaires supérieures à 25%. Ainsi, le domaine myonucléaire (quantité théorique de cytoplasme géré par un seul noyau au sein d'une fibre musculaire) reste constant bien qu'une augmentation de la surface de section de la fibre soit mesurée, attestant de l'ajout de nouveaux noyaux en provenance des SCs. Cependant, un modèle de souris ne possédant pas de SCs présentait une importante hypertrophie a pu après ablation des muscles synergiques [427]. Cette hypertrophie était associée à une augmentation du domaine myonucléaire suggérant que les SCs ne sont pas nécessaires au phénomène hypertrophique dans ce modèle. A contrario, suite à notre entraînement de 10 semaines, nous avons obtenu jusqu'à 100% d'hypertrophie suggérant qu'en plus d'une augmentation de la synthèse protéique, une population de SCs pourrait participer à cette hypertrophie. Dans cette hypothèse, l'IL-6 produite localement par le muscle à la suite d'un exercice de résistance en agissant de manière autocrine ou paracrine pourrait favoriser la prolifération de ces dernières via le facteur de transcription STAT3 [171, 211]. En effet, la phosphorylation de STAT3 (pSTAT3) est augmentée à 2 (E2H) et 6 (E6H) heures après notre exercice de résistance et est associée à une augmentation de l'expression du gène de l'IL-6 ainsi que des gènes cibles de STAT3 : SOCS3, CyclinD1 et c-Myc. Le facteur de transcription SOCS3 exerce une boucle de régulation négative sur la voie JAK/STAT3. Cette donnée associée aux réponses des gènes cibles de STAT3 (c-Myc, CyclinD1) confirment l'implication de la voie IL-6/STAT3 de façon précoce après notre exercice aigu en résistance. Si après 10 semaines d'entraînement, l'expression génique de l'IL-6 est toujours augmentée (1,4 fois), son augmentation n'est plus associée à celle des gènes cibles de STAT3 (ARNm de SOCS3) mais est par contre associée à une diminution de l'expression des gènes de CyclinD1 et c-Myc. Dans ces conditions, le facteur de transcription STAT3 est également hypophosphorylé. Ces résultats attestent d'une diminution de

l'activation de la voie IL-6/STAT3 soit en lien avec le stimulus de l'entraînement ou bien en lien avec le timing de mesure de 72 heures après la dernière séance d'exercice qui reflète alors un retour à des valeurs de repos. Par ailleurs, il semble que l'on puisse exclure la participation de phénomènes inflammatoires dans l'augmentation du gène de l'IL-6 à la suite de l'exercice aigu et de l'entraînement. D'une part, à travers des marquages hématoxyline/eosine (données non présentées), aucun amas de cellules de l'inflammation n'a été repéré au bout de 10 semaines d'entraînement. D'autre part, en regard de la littérature, la réponse inflammatoire à la suite d'un exercice est différente de celle retrouvée dans certains phénomènes infectieux pour lesquels les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β sont les premières à être sécrétées[428]. En effet, après un exercice chez l'homme, le TNF- α et l'IL-1 β n'augmentent pas et l'IL-6 est le plus souvent la 1^{ère} cytokine présente dans la circulation sanguine [201, 429]. Par ailleurs, des données récentes suggèrent un effet anti-inflammatoire de l'IL-6 en inhibant les sécrétions de TNF- α et IL-1 [430] et en stimulant les productions de cytokines anti-inflammatoires : IL-1ra et IL-10.[431]. D'autres cytokines de la famille de IL-6, plus particulièrement le *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), pourrait également contribuer à l'activation de STAT3 [432]. Cependant, l'expression génique du LIF n'était pas augmentée ni 2 heures ni 6 heures après notre exercice et se trouvait diminuée après l'entraînement, confirmant une activation de STAT3 par l'IL-6 après l'exercice aigu.

Dans l'objectif d'explorer le lien entre la voie IL-6/STAT3 et l'intervention des cellules satellites dans la réponse hypertrophique à la suite de notre entraînement en résistance, nous avons étudié l'activation de cette voie au sein des cellules satellites ainsi que la réponse des facteurs myogéniques (MRFs) à la fois à la suite de l'exercice aigu mais également de l'entraînement.

La phosphorylation de STAT3 obtenue 2 et 6 heures après l'exercice aigu, a pu être observée de manière transitoire au sein des SCs (double marquage immunohistochimique Pax7/pSTAT3) c'est-à-dire uniquement 2 heures après notre exercice aigu et n'a pas été observée CyclinD1 après l'entraînement. La voie IL-6/STAT3 était donc activée au sein des cellules satellites après un exercice aigu en résistance non traumatisant et contribuerait à leur activation. En effet, la population de SCs mitotiquement actives (BrdU+) était augmentée 2 et 6 heures après l'exercice aigu. L'observation de leur prolifération était également renforcée par une expression génique de marqueurs du cycle cellulaire CyclinD1 et c-Myc augmentées. Il faut se rappeler que ces deux marqueurs répondent à la stimulation de l'IL-6/STAT3 et jouent un rôle critique dans la croissance des cellules notamment dans la transition de la phase G1 à S [433]. Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que l'activation de la voie IL-6/STAT3 à la suite d'un exercice en résistance se déroule en partie et de façon transitoire dans les cellules satellites et contribue à leur activation. Le comportement des SCs a été décrit dans de nombreux travaux à travers l'étude des facteurs myogéniques (MRFs) à la suite de lésions musculaires chez le rat [434] et d'entraînement en résistance chez l'homme[136]. Ces études rapportent une augmentation des MRFs entre 12 heures et 2 jours après l'exercice. Cependant, le comportement des SCs dans des temps plus précoces après l'exercice est très peu décrit. Dans notre étude, nous avons pu

mettre en évidence une diminution précoce de l'expression génique des marqueurs prolifératifs MyoD et Myf5 mais également une augmentation de celui de la myogénine, marqueur de la différenciation des SCs. Si dans un 1^{er} temps la diminution des marqueurs prolifératifs peut paraître surprenante au regard de l'augmentation de la prolifération des SCs après notre exercice, elle n'est le reflet que d'une régulation transcriptionnelle dont la conséquence au niveau traductionnelle peut être retardée. Si l'on suit cette réflexion l'augmentation transcriptionnelle de la myogénine est également contradictoire avec l'augmentation de la prolifération des SCs. Cependant, il est de plus en plus clair qu'il existe différents pools de SCs dont l'engagement dans le programme myogénique peut être différent [114, 129]. Ainsi, Schultz *et al.* (2006) [129] montrent qu'un seul marqueur myogénique ne peut rendre compte de la population totale des SCs et que par ailleurs le facteur Pax7 communément utilisé ne rend compte qu'entre 75 à 90% du pool de SCs selon le type de muscle. En effet, ces études ont pu montrer que les SCs en prolifération expriment à la fois les facteurs myogéniques Pax7, MyoD et/ou Myf5 [114, 121, 129]. Certaines d'entre elles perdent alors l'expression de Pax7, mais conservent MyoD et/ou Myf5 et peuvent ainsi s'engager dans le programme de différenciation pour ensuite exprimer myogénine. Au contraire, certaines SCs en prolifération peuvent conserver l'expression de Pax7 et perdre celles de MyoD et Myf5 et ainsi retourner en état de quiescence et participer à l'augmentation du pool de SCs initial [122]. Cette hypothèse est à mettre en relation avec l'augmentation du pool de cellules repérée à plusieurs reprises chez l'homme à la suite d'un entraînement en résistance [15, 118, 435] Ainsi, la régulation positive de l'expression génique de la myogénine 6 heures après l'exercice suggère que certaines SCs vont rapidement fusionner avec les myocytes mature afin de donner leur matériel génétique et augmenter ainsi la machinerie de synthèse protéique. Parallèlement, l'augmentation de la phosphorylation de STAT1 (pSTAT1) 2 et 6 heures après l'exercice renforce les résultats sur l'augmentation de la prolifération des cellules satellites. En effet, la voie STAT1/STAT3 induit *in vitro* la prolifération des myoblastes et empêche leur différenciation par inhibition de la transcription de MyoD contrairement à la voie STAT2/STAT3 nécessaire à la différenciation [209, 210] Ainsi, l'activation précoce de la voie STAT1/STAT3 après notre exercice en résistance participerait à la diminution de la transcription de MyoD à 2 et 6 heures et donc à l'augmentation du pool de SCs de réserve comme l'atteste l'augmentation de l'expression du ratio Pax7/MyoD. Ainsi, après un exercice de résistance, une phase de prolifération de SCs indifférenciées est rapidement activée afin de constituer un pool de cellules satellites de réserves susceptibles plus tard de s'engager dans un programme de différenciation myogénique. Pour confirmer cette hypothèse d'une activation plus tardive de la différenciation, la mesure de l'activation de STAT2 à 2 et 6 heures ainsi que plus tardivement à 12 ou 24 heures serait une information indispensable pour confirmer l'activation successive des voies STAT1/STAT3 puis STAT2/STAT3.

De la même manière qu'après un exercice aigu, 10 semaines d'entraînement concourent à diminuer l'expression génique de Myf5 et MyoD ($p=0,1$) à la différence que l'expression de myogénine est aussi diminuée. Cette diminution des expressions des facteurs myogéniques ainsi que celles de la

CyclinD1 et c-Myc est à mettre en relation avec les diminutions des phosphorylations de STAT1 et STAT3. Ces résultats attestent d'une part que la voie IL-6/STAT3 et plus spécifiquement IL-6/STAT1/STAT3 n'est plus activée après 10 semaines d'entraînement et est associée à une diminution de la prolifération et de la différenciation des SCs. Ces mesures ayant été réalisées 72 heures après le dernier exercice, l'hypothèse d'un retour à des conditions de repos n'est pas à exclure. Pour cela, la comparaison avec des données obtenues 72 heures après un exercice aigu auraient pu être judicieuses tout comme celle après 4 semaines d'entraînement pour être certain d'un effet spécifique d'un entraînement de 10 semaines. Cependant, la diminution de l'activation de la voie IL-6/STAT3 après des semaines d'entraînement peut être interprétée comme un mécanisme de protection contre une hypertrophie excessive puisque celle-ci a été augmentée jusqu'à 100% selon le type de fibre. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse d'une réponse protectrice à travers l'étude de la voie de signalisation du facteur Fgf2 et/ou du gène sprouty1 (Spry1), marqueur de la quiescence des SCs [436]. Cette idée émane d'une étude récente de Chakkalakal *et al.* (2012) [437] sur des souris transgéniques jeunes et âgées montrant dans des conditions homéostasiques qu'une diminution de la capacité à maintenir les SCs en quiescence avec l'âge présente un désavantage dans un contexte de régénération. Le déclin de du maintien en quiescence des SCs est en lien avec la diminution de l'expression du gène Spry1 dont la fonction inhibitrice sur le facteur Fgf2 n'est plus maintenue. L'augmentation de Fgf2 entraîne alors la prolifération et la différenciation excessive des SCs et par la suite la diminution du pool. Dans le contexte d'un entraînement en résistance, une augmentation de l'expression génique de sprouty1 ou encore une diminution de la production de Fgf2 serait responsable d'une diminution ou d'un ralentissement de la prolifération des SCs afin de maintenir un pool de réserve nécessaire dans un contexte de régénération musculaire. Enfin, on peut s'interroger sur les voies conduisant à l'activation de l'IL-6 musculaire à la suite de notre exercice. Un article récent [163, 164] suggère l'implication du facteur de transcription SRF (*Serum Response Factor*) dans la stimulation de la production d'IL-6 musculaire dans un modèle de surcharge fonctionnelle. Chez des souris dont le gène SRF a été inactivé au niveau musculaire, la surexpression de l'IL-6 permet de restaurer la prolifération des SCs induite par la surcharge mais n'entraîne pas la fusion de ces dernières résultant en une inhibition de l'hypertrophie induite par la surcharge. Ainsi, la production de SRF jouerait à la fois un rôle dans l'activation de l'IL-6 musculaire pour l'induction d'une hypertrophie musculaire dans un modèle de surcharge fonctionnelle mais pourrait également activer rapidement d'autre gène comme ceux de l'IL-4 et la cyclooxygénase 2 (COX2), ou encore c-fos [438] impliqués dans la fusion des SCs dans la réponse hypertrophique à la suite d'un stress mécanique. Curieusement, l'activité de SRF serait dépendante de la présence d'une E3 ligase, MuRF2, qui interagirait avec le domaine de transactivation de SRF. Or lors d'un stress mécanique, comme lors d'un exercice en résistance, il y aurait activation du domaine tyrosine kinase de la titine, une fois autophosphorylée permettrait l'interaction avec Nbr1 et MuRF2 [439]. Ainsi le stress mécanique au niveau sarcomérique

permettrait la dissociation de Murf2 et SRF pour que ce dernier puisse migrer au sein du noyau et activer ses gènes cibles tels que l'IL-6 et COX2 [439]. Le complexe protéique associé au domaine kinase de la titine apparaît alors comme un puissant modulateur de la transcription de gènes dont l'IL-6 via le SRF, impliqués dans l'hypertrophie musculaire à la suite stress mécanique.

Pour conclure, le modèle d'escalade ainsi que le protocole associé chez le rat se révèle être un modèle physiologique pertinent pour l'étude des phénomènes d'hypertrophie et des voies de signalisation associées. Ainsi, l'hypertrophie musculaire obtenue dans le muscle FDP après 10 semaines d'un entraînement en résistance chez le rat serait en partie expliquée par l'activation chronique de la voie IL-6/STAT3 après chaque exercice aigu [141]. Chaque exercice induit l'activation de l'IL-6 en partie au sein des SCs à travers l'activation du facteur de transcription STAT3 et ces gènes associés impliqués dans le cycle cellulaire (CyclinD1 et c-Myc). La diminution rapide des marqueurs myogéniques révèle qu'un pool de SCs s'engage dans un processus de prolifération via l'activation de la voie STAT1/STAT3 concourant à augmenter le pool de SCs de réserve. Au cours de l'entraînement, ces mécanismes participent à la synthèse protéique par l'apport de nouveau matériel génique au sein des fibres musculaires conduisant à une augmentation de la surface de section de la fibre. Cependant, la voie IL-6/STAT3 n'est plus activée après 10 semaines d'entraînement, ce que l'on peut interpréter comme un mécanisme de protection contre une hypertrophie excessive.

**ARTICLE 1: EARLY ACTIVATION OF RAT SKELETAL MUSCLE IL-6/STAT1/STAT3
DEPENDENT GENE EXPRESSION IN RESISTANCE EXERCISE LINKED TO
HYPERTROPHY**

**ETUDE 2: ROLE DES CALPAINES DANS LE REMODELAGE MUSCULAIRE INDUIT
PAR UN TRAITEMENT CHRONIQUE AU CLENBUTEROL CHEZ LA SOURIS**

Le stimulus β -adrénergique induit de manière pharmacologique comme lors d'un traitement au clenbutérol (Cb), entraîne une conversion phénotypique du muscle squelettique d'un profil lent vers un profil rapide ainsi qu'une hypertrophie musculaire. Différentes voies de signalisation sont impliquées dans ce remodelage musculaire induit par le clenbutérol en particulier celles modulant la balance protéique à travers les processus de synthèse et dégradation protéique. Ce travail s'est inscrit dans le cadre d'études financées par l'Agence Mondiale Anti-Dopage regroupées dans un projet intitulé : " β 2-agonist effects on human performance, skeletal, cardiac, bone tissues and signalling pathways". Les objectifs concernant le muscle squelettique définis dans l'appel d'offre étaient de répondre aux deux questions suivantes : 1) quel est l'impact d'une stimulation chronique β -adrénergique sur la cinétique de l'activité des calpaines ubiquitaires (calpaines 1 et 2)? 2) l'effet potentiellement ergogénique au niveau musculaire implique-t-il une modification de l'activité de ces calpaines ? Ou encore, ces dernières sont-elles impliquées dans le remodelage musculaire induit par un traitement chronique au clenbutérol à doses dopantes ? J'ai pu participer aux travaux concernant la deuxième question à savoir si la conversion phénotypique vers un profil plus rapide ainsi que l'hypertrophie musculaire induite par un traitement au clenbutérol à long terme à des doses supraphysiologiques ($>100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) [440, 441] impliquent le système calcium-dépendant des calpaines. Cette question a été abordée à travers la surexpression de l'inhibiteur endogène des calpaines, la calpastatine (Cpst) dans le muscle Tibialis Anterior (TA) de souris traitées ou non au clenbutérol. En effet, Otani *et al.* (2004) [442] ont montré avec un modèle de souris transgéniques que la surexpression musculaire de la calpastatine augmentait la masse musculaire totale et la teneur totale en protéines musculaires. Par ailleurs, une série d'études a décrit des altérations dans l'homéostasie calcique du muscle squelettique et des modifications de l'activité calpaine suite à un traitement β -adrénergique [323-326]. Ainsi, dans cette étude n° 2, la calpastatine a été surexprimée par électrotransfert du gène dans le muscle TA de souris mâles en parallèle d'un traitement chronique sous cutané au Cb pendant 21 jours à $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Les résultats principaux ont confirmé que ce traitement contribue à augmenter la masse corporelle des souris ainsi que le poids du muscle TA. Par ailleurs, les effets du clenbutérol dans la transition phénotypique d'un profil du lent vers le rapide ainsi qu'une hypertrophie musculaire des fibres de type IIa, IIx et IIb du TA ont bien été retrouvées à l'issue des 21 jours de traitement (Cb vs CTL, *article 2-figures 3 et 4*). En revanche, ces effets du clenbutérol sur le remodelage musculaire (Cb) étaient largement inhibés par la surexpression de la calpastatine (Cb+Cpst). Cette dernière inhibait l'augmentation de l'activité des calpaines induite par le traitement au clenbutérol (Cb+Cpst vs Cb, *article 2-figure 2*). Ces résultats suggèrent fortement que l'inhibition de l'activité des calpaines joue un rôle important dans le remodelage musculaire induit par le clenbutérol. L'autre résultat important concernait la diminution de l'expression de la calpastatine endogène à la suite du

traitement au clenbutérol (Cb vs CTL, *article 2- figure 1*) qui était associée à une augmentation de l'activité des calpaines (*article 2- figure 2*). Les calpaines étant initiatrices de la dégradation des protéines myofibrillaires, la stimulation de leur activité par le clenbutérol peut concourir à l'augmentation de la dégradation de certains types de protéines myofibrillaires et participer à la conversion phénotypique observée. Suite à cette hypothèse, l'hypertrophie musculaire obtenue par le traitement ne peut s'expliquer que par une augmentation de la synthèse protéique. En effet, les voies de signalisation Akt/mTOR/S6 et Akt/mTOR/4EBP1 conduisant à l'augmentation de la synthèse protéique sont stimulées à la suite du traitement au clenbutérol mais ne sont pas affectées par la surexpression de la calpastatine (*article 2-figure 8*). De ce fait, les niveaux de stimulation de ces voies sont identiques entre le groupe Cb et le groupe Cb+Cpst suggérant que la surexpression de la calpastatine et par conséquent l'inhibition des calpaines associée ne joue aucun rôle sur la synthèse protéique. Ainsi, après une surexpression de la calpastatine, la diminution du stimulus hypertrophique induit par le traitement ne s'explique pas par une action du système calpaine/calpastatine sur la synthèse protéique mais impliquerait davantage les phénomènes de protéolyse et/ou l'accrétion des cellules satellites[302, 305, 313].

Nos expériences préliminaires *in vitro* (non présentées dans le manuscrit) sur culture primaire de souris (C57BL/6) suggèrent que l'hypertrophie musculaire induite par le clenbutérol et inhibée par la surexpression de la calpastatine, implique les cellules satellites. En effet, les myotubes traités au clenbutérol ($5.10^{-6}M$) pendant 3 jours présentaient un diamètre et un index de fusion augmentés par rapport aux cellules contrôles confirmant l'effet hypertrophique déjà démontré du clenbutérol *in vitro*. Lorsque qu'un inhibiteur de la calpaine 1 (ALLN, *calbiochem*) était ajouté, la taille ainsi que l'index de fusion des myotubes étaient significativement diminués mais de manière moins marquée qu'avec l'ajout de l'inhibiteur seul. Ces données suggèrent que l'augmentation *In vivo* de l'activité calpaine 1 par le clenbutérol [326] participe au phénomène hypertrophique en favorisant l'accrétion des cellules satellites qui pourrait en partie être inhibée lors d'une surexpression de la calpastatine. Si ces premières données *in vitro* restent à confirmer, elles orientent vers une implication du système calpaine/calpastatine dans la stimulation des cellules satellites pour leur participation au phénomène hypertrophique induit par le clenbutérol. Cette hypothèse est soutenue par les résultats de l'étude de Raynaud *et al.* (2004) [301] qui ont montré que l'inhibition de la calpaine 2 bloquait la transition G0/G1 dans les cellules satellites de muscles de souris ayant subits une lésion musculaire.

En conclusion, ces études montrent que l'activité des calpaines est nécessaire à la transition phénotypique et l'hypertrophie musculaire induites par le clenbutérol. Cependant, leur implication dans ce remodelage musculaire n'intervient pas sur les voies canoniques de synthèse protéique stimulées par le clenbutérol mais plutôt sur un ciblage spécifique de la dégradation de protéines d'adhésion (taline, FAK intégrines...) ainsi que de la stimulation des cellules satellites.

**ARTICLE 2: CALPASTATIN OVEREXPRESSION IN THE SKELETAL MUSCLE OF MICE
PREVENTS CLENBUTEROL INDUCED MUSCLE HYPERTROPHY AND PHENOTYPIC
SHIFT**

ETUDE 3: ROLE DES DIFFERENTS SYTEMES PROTEOLYTIQUES DANS LA PROTEOLYSE INDUITE PAR UN EXERCICE EN RESISTANCE

I- CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Les objectifs de ce troisième axe de travail étaient dans un premier temps de caractériser l'implication des systèmes protéolytiques dans la balance protéique post-exercice et d'étudier ensuite l'impact d'une supplémentation en acides aminés branchés enrichie en leucine sur cette balance. En effet, l'exercice en force ou résistance, particulièrement en conditions excentriques stimule la synthèse protéique jusqu'à 48 heures après l'exercice mais induit également une protéolyse post-exercice importante [27]. La balance protéique nette après ce type d'exercice est donc négative en condition post-absorptive mais reste supérieure en comparaison à un état post-absorptive sans exercice physique. Ainsi, l'exercice physique constitue à lui seul un stimulus efficace pour augmenter la balance protéique, cette dernière étant en grande partie dépendante de l'état nutritionnel de l'organisme avant l'exercice. En effet, elle peut être rendue positive en condition postprandiale ou suite à une prise alimentaire immédiatement après l'exercice [30, 388, 390, 404, 443]. Si les mécanismes régulant la synthèse protéique après un exercice ont fait l'objet de nombreuses études, la régulation des différents systèmes de dégradation des protéines est nettement moins décrite. Parmi les acides aminés branchés (AAB), la L-leucine, déjà largement décrite pour stimuler la synthèse protéique musculaire après l'exercice [443, 444], a été plus récemment reconnue pour avoir des propriétés anti-protéolytiques particulièrement dans des situations cataboliques [400, 401]. Ainsi, dans un premier temps, il s'agit de quantifier les différents systèmes protéolytiques induits par l'exercice excentrique en s'intéressant particulièrement au système de l'autophagie. En effet, des éléments récents de la littérature suggèrent un rôle fondamental de ce système à l'exercice, jusqu'à présent longtemps sous-estimé [339, 340, 354]. Dans un second temps, il s'agira de vérifier l'effet anti-protéolytique de la leucine en condition post-exercice et d'identifier les acteurs cellulaires et moléculaires participant à ce mécanisme.

II- PROTEOLYSE ET EXERCICE EXCENTRIQUE

L'objectif principal étant de « disséquer » les différentes voies de dégradation protéique responsable de l'augmentation de la protéolyse post-exercice, il était intéressant tout d'abord d'obtenir une mesure physiologique de la part des différents systèmes dans cette protéolyse post-exercice. Cette approche a été envisagée en utilisant différents inhibiteurs déjà décrits dans la littérature comme bloquant tel ou tel système de dégradation. Ensuite, l'objectif était de relier ces mesures physiologiques à des marqueurs moléculaires des différents systèmes impliqués.

a. Mesures physiologiques de protéolyse

Les expériences préliminaires nous ont conduit à mener nos expériences sur des rats ayant été mise à jeun pendant 12 heures afin de réduire la variabilité interindividuelle. Après ajustement du protocole de contraction en excentrique sur EDL isolé, nous avons pu engendrer une protéolyse de 30% en condition d'exercice à jeun (*Figure 35*). Cependant, certains résultats nous ont conduit à mesurer des niveaux de protéolyse sur des animaux nourris *ad libitum*. Sans surprise, le jeûne auquel ont été soumis les animaux a engendré 27% de protéolyse en comparaison au niveau retrouvé chez des animaux nourris (*Figure 38*). Par ailleurs, un exercice réalisé en condition non à jeun (EX NAJ) contribue à augmenter de 70% la protéolyse basale soit de manière plus importante qu'en condition de jeûne (EX AJ) bien que les niveaux de protéolyse post-exercice en condition non à jeun (EX NAJ) soient identiques à ceux en condition à jeun (EX AJ) (*Figure 44*). Ainsi, quel que soit le niveau de protéolyse basale musculaire (plus ou moins élevé), celui-ci ne peut pas être augmenté au-delà d'une limite ou seuil, dans nos conditions d'exercice, pouvant être interprété comme un mécanisme de protection afin de maintenir des conditions homéostasiques adéquates au bon fonctionnement des autres processus physiologiques du muscle. Avant d'obtenir ces résultats comparant les conditions à jeun et non à jeun, nous avons largement avancé sur la caractérisation des systèmes de dégradation responsables de l'augmentation de 30% de la protéolyse post-exercice en condition de jeun (CTL AJ vs EX AJ). Cependant, les mesures physiologiques de la part des trois systèmes majeurs de dégradation (autophagie, lysosomal et ubiquitine-protéasome) obtenues à partir de l'ajout de différents inhibiteurs dans le milieu d'incubation des muscles n'ont pas été très concluants puisque l'utilisation séparée de chaque inhibiteur contribue à inhiber de $\pm 133\%$ la protéolyse induite d'exercice (*Figure 36*). Une première explication serait un manque de spécificité des inhibiteurs mais l'hypothèse d'une compensation par les autres systèmes protéolytiques en réponse à l'inhibition d'un des systèmes n'est pas à exclure. Cette dernière hypothèse est appuyée par le fait qu'aucun des inhibiteurs pris séparément ne contribue à inhiber la protéolyse induite uniquement par le jeûne (*Figure 37*) alors que cette dernière est totalement inhibée lorsque tous les inhibiteurs sont utilisés ensemble. En effet, l'inhibiteur MG132, couramment rapporté dans de nombreuses publications pour inhiber l'UPS a majoré la protéolyse dans nos expériences (conditions à jeun). Selon Holecek *et al.* (2006) [445], si le MG132 administré en intra péritonéale ($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) chez des rats après 24 heures de jeûne contribue à diminuer l'activité chymotrypsine-like dans le muscle, il est aussi responsable d'une augmentation à la fois de la synthèse mais aussi de la dégradation protéique globale. Ainsi, le MG132 largement décrit pour diminuer les marqueurs moléculaires de la protéolyse protéasome-dépendante [110, 446], contribue également à augmenter le turnover protéique suggérant qu'il n'est finalement pas l'inhibiteur adéquat pour les mesures physiologiques de protéolyse. Par ailleurs, il a été rapporté que le MG132 pouvait également bloquer les systèmes des calpaines et certaines cathepsines [445, 447]. Finalement, l'inhibiteur lactacystine semble le plus approprié pour l'étude de l'UPS de par sa spécificité sur

l'inhibition des différentes sous-unités du protéasome 20S [448, 449] ainsi que son absence d'inhibition des calpaines et des protéases du système lysosomal. Son effet se retrouve également sur les mesures physiologiques en inhibant la protéolyse sans pour autant majorer le turnover protéique comme le MG132 [450]. Par ces remarques et dans nos conditions, même si le chiffre de 40% concernant l'inhibition de la protéolyse post-exercice par la lactacystine doit être considéré avec précaution (*Figure 36*), il met en évidence que l'UPS n'est pas majoritairement impliqué dans la protéolyse après par un exercice en condition à jeun. De la même manière, si l'inhibition de 93% du LAS obtenue avec la pepstatine A et E64d est à nuancer, elle montre tout de même la place importante jouer par ce système dans la protéolyse d'exercice. Au sein du LAS, nous avons voulu décortiquer la part du système de l'autophagie par l'inhibition de la protéine initiateur du processus de séquestration, la PI3K de classe 3: Vps34. Il existe différents inhibiteurs des PI3K comme la 3-méthyladénine (3-MA), la wortmannine ainsi que le LY294002 [451]. Parmi eux, la 3-MA apparaît comme le plus puissant pour inhiber l'étape de séquestration [452] mais dans certaines conditions pourrait inhiber d'autres kinases impliquées dans de nombreux processus cellulaires. En effet, une étude de Wu *et al.* (2010) [453] a démontré *in vitro* sur cellules MEFs et L929 qu'un traitement de plusieurs heures (6-9 heures) avec la 3-MA (5mM) dans un milieu riche en nutriments, contribuait curieusement à augmenter les flux autophagiques en inhibant de façon prolongé des PI3K de classe 1 mais sans aucun effet sur celles de classe 3. Cependant, ce même traitement sur des temps courts (1-3 heures) et dans des conditions de privation en nutriments, contribuait à diminuer l'autophagie par un effet inhibiteur transitoire sur Vps34 et n'affectait en aucun cas les activités des cathepsines B et L du lysosome. A présent, cette étude suggère d'envisager l'utilisation de la wortmannine pour son action inhibitrice indépendante du statut énergétique de la cellule et persistante sur les PI3K de classe 3. Cependant, son action spécifique sur le système autophagique reste à démontrer, ainsi la 3-MA peut être retenue comme inhibiteur spécifique du système autophagique dans nos conditions de jeûne et un traitement sur 1 heure. Il semble donc que les systèmes autophagique et lysosomal soient impliqués à part égale dans la protéolyse en condition d'exercice à jeun (*Figure 36*). Enfin, nos mesures physiologiques de protéolyse système-dépendante après l'exercice permettent seulement de mettre en évidence l'activation majeure du LAS plutôt que l'UPS. En revanche, ils ne permettent pas de distinguer entre les systèmes activés, celui ou ceux qui ont été davantage augmentés par les contractions musculaires plutôt que par le jeûne. Etant donné que nous n'avons pas pu déterminer la part de ces systèmes protéolytiques en condition de jeûne sans exercice, il est impossible de préciser si les 30% de protéolyse induits par l'exercice sont le résultat de l'activation préférentielle d'un des trois systèmes mesurés ou encore si ces 30% d'augmentation sont en lien avec une augmentation similaire des 3 systèmes. Pour tenter de répondre à la question : quel(s) système(s) protéolytique(s) est (sont) responsables de la protéolyse induite d'exercice en condition de jeûne ?, et avec les indications des mesures d'activités protéolytiques, il devenait alors nécessaire d'étudier les acteurs moléculaires spécifiques de chacun des systèmes.

b. Marqueurs moléculaires des systèmes protéolytiques

De façon décevante, l'étude des différents marqueurs moléculaires des 3 systèmes étudiés n'a pas permis de mettre en relation les mesures de protéolyse avec les marqueurs classiques de chacun des systèmes protéolytiques. Plusieurs causes peuvent être soulevées :

- Le choix des marqueurs moléculaires
- L'implication d'autres systèmes de dégradation considérés comme mineurs : calpaines, caspases, MMPs
- Des problèmes méthodologiques

i. Participation du système ubiquitine-protéasome dans la protéolyse induite d'exercice

Concernant l'UPS, les mesures d'ubiquitination ainsi que l'activité chymotrypsine-like bien que non significativement différentes entre les groupes suggèrent une activation majorée en condition d'exercice qui reste à prouver, en augmentant dans un premier temps le nombre de mesures. En effet, l'absence de significativité des profils d'ubiquitination mesurés en Western blot peut s'expliquer méthodologiquement par une saturation du signal ne permettant pas d'affirmer la diminution de la quantité de protéines poly-ubiquitinées en condition d'exercice (*Figure 39a*). Cependant, cette tendance peut être interprétée soit comme une diminution de l'activation de l'UPS soit au contraire comme une augmentation de l'activité catalytique des sous-unités du protéasome 20S contribuant, à un instant t, à l'augmentation de la dégradation protéasome-dépendante et donc à la diminution des protéines poly-ubiquitinées. Cette dernière hypothèse s'appuie sur une augmentation (bien que non significative) de l'activité chymotrypsine-like en condition d'exercice (*Figure 39b*) mais doit être validée par la mesure de l'activité trypsine-like. Par ailleurs, l'expression génique des E3 ligases MAFbx et MuRF1 était diminuée en situation d'exercice (*Figure 39c*) On ne peut pas exclure que cette diminution une heure après l'exercice se traduise par une inhibition plus tardive de l'UPS. Cependant, si la diminution de l'expression du gène de MAFbx à la suite d'un exercice en résistance a été largement rapportée, nos résultats sur MuRF1 semblent contradictoires avec les données de la littérature (*Annexe 2*). Une des explications est à rechercher dans la mise à jeun des animaux puisqu'après 12 heures de jeûne, les expressions géniques de ces deux E3 ligases restent toujours augmentées ce qui, au regard de la littérature, est en lien avec une traduction augmentée. Ainsi, au moment de l'exercice, le contenu de ces protéines est déjà très élevé par rapport à une situation non à jeun. Ainsi, le retour à des expressions géniques identiques à celles de la condition non à jeun suite au stimulus de l'exercice (*Figure 39c*) peut contribuer à stopper la traduction protéique de ces E3 ligases dont le contenu est déjà suffisamment important pour le fonctionnement de l'UPS. Par ailleurs,

d'autres ligases pourraient être plus pertinentes à mesurer comme Trim32 (E3) et plus récemment UBE2B (E2 1) dont l'actine ainsi que les MHCs de type IIA pourraient être les cibles (données non publiées). Enfin, il faut aussi ajouter que les mesures d'activités des sous-unités du protéasome ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) sont des marqueurs davantage pertinents pour rendre compte de l'activation d'un système et à mon sens doivent prédominer pour l'interprétation des résultats.

ii. Implication du système de l'autophagie dans la balance protéique induite d'exercice

Nos résultats rapportent une activation, largement décrite dans la littérature, de l'autophagie suite à la privation alimentaire de 12 heures si l'on considère le marqueur protéique de la formation des autophagosomes LC3B. En effet, l'augmentation du recyclage de LC3-II en LC3-I traduit de manière indirecte l'augmentation des flux autophagiques par le jeûne qui se trouvent cependant diminué 1 heure après l'ajout de l'exercice dans ces conditions. Or, le système autophagique est activé dans les premières minutes qui suivent un exercice en endurance notamment suite au détachement de la protéine Bcl-2 du complexe Beclin1-Vps34 [355]. Une mesure plus précoce du turnover de LC3B pourrait donc être judicieuse pour l'observation d'une augmentation des flux autophagiques dans nos conditions d'exercice. L'hypothèse formulée est que tout d'abord l'exercice en résistance effectué dans des conditions de déficit énergétique peut concourir à augmenter les flux autophagiques afin d'apporter les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique induite plus tardivement par l'exercice. En effet, si la mesure physiologique de la synthèse protéique (*Figure 45*) n'est pas augmentée jusqu'à 1 heure après l'exercice, la synthèse protéique est malgré tout relancée si l'on s'attarde sur les marqueurs moléculaires des voies de synthèse protéique Akt et 4EBP1 (*Figure 46*). Ainsi, une heure après un exercice de résistance réalisé à jeun, les acides aminés donnés par le système autophagique participe à l'activation de la synthèse protéique [70, 396] mais peuvent également stimuler les voies de signalisation Akt indépendantes telles que mTOR/4EBP1 et la voie de la PLD1 pour l'inhibition du système autophagique (*Figure 20*) [391, 408]. Ainsi, une mesure des marqueurs de l'autophagie sur des temps courts post-exercice (0-30min) pourrait faire apparaître une activation de ce système par l'exercice expliquant en partie l'augmentation du taux de protéolyse mesurée sur l'intervalle 0-1 heure.

Enfin, l'autophagie impliquant les protéines chaperonnes (CMA) ne semble pas activée 1 heure après notre exercice et se trouve même diminué après 12 heures de jeun étant donné que ni l'expression du gène Lamp2a ni son expression protéique ne sont stimulées dans nos conditions. Kiffin *et al.* (2004) [454] ont pu montrer une expression génique multiplié par 2 après 48 heures de jeûne chez le rat suggérant une stimulation de la CMA en lien avec des déficits énergétiques plus importants que dans nos conditions.

iii. *Système lysosomal et exercice*

Si le jeûne a augmenté l'activité et l'expression génique de la cathepsine L, l'exercice ajouté a contribué à les diminuer. La baisse de cette activité pourrait dans une certaine mesure être liée à la diminution du contenu protéique en cathepsine L. Nous avons alors cherché à déterminer un index d'activation défini comme le rapport entre la quantité d'une protéine et la mesure de son activité. Cependant nos tentatives de mesures en Western blot n'ont pas été très concluantes du fait du manque de spécificité de l'anticorps utilisé. Pour conclure sur le système lysosomal, des perspectives sont à envisager sur la mesure des activités des cathepsines B et D, une heure après l'exercice mais une mesure immédiatement après l'exercice n'est pas à exclure. En effet, à la suite d'un exercice excentrique chez l'homme, Feasson *et al.* (2002) [318] ont pu mesurer une activité cathepsine B+L augmentée immédiatement après 30 minutes de course à 80% de la VO_{2max} .

iv. *Conclusions et perspectives*

L'ensemble des résultats sur les marqueurs moléculaires mesurés une heure après notre exercice en condition à jeun ne permettent pas d'expliquer très clairement l'origine de la protéolyse (+30%) induite par notre protocole d'exercice excentrique en résistance. Des informations supplémentaires doivent être apportées par les mesures de l'activité trypsine-like du protéasome ainsi que celles des cathepsines B et D du système lysosomal afin de conclure sur l'activation de ces systèmes une heure post-exercice. Par ailleurs, l'hypothèse d'une activation séquentielle de ces trois systèmes mesurés n'est pas à exclure. Pour cela, l'étude des marqueurs moléculaires sur des temps plus courts et/ou immédiatement post-exercice est à envisager. La protéolyse mesurée sur l'intervalle 0-1 heure serait peut être le résultat de l'activation dans un premier temps du système autophagique-lysosomal puis du système ubiquitine-protéasome. Enfin, des perspectives sont envisagées vers d'autres systèmes protéolytiques tout d'abord jugés mineurs comme le système des caspases ainsi que des MMPs. Nos premières mesures en qPCR montrent une réponse du gène de MMP-2 à la suite du jeûne dont l'expression reste identique après l'exercice. Au regard de la littérature, MMP-2 serait impliquée dans la réponse à l'entraînement d'endurance chez le rongeur et chez l'homme puisqu'à la fois ses expressions géniques, protéiques ainsi que son activité ont été retrouvées augmentées [384, 386, 387] après 1 à 5 semaines d'entraînement. Chez l'homme, son activité n'est pas modifiée dans les heures qui suivent l'exercice aigu contrairement à MMP-9 qui a priori répond plutôt à l'exercice aigu [384-386]. Chez le rat, d'une part l'activation de MMP-2 n'a pas été mesurée à la suite d'un exercice aigu, d'autre part les muscles rapides ne semblent pas exprimer MMP-9 [382, 383, 455] confirmant que nous n'ayons pas réussi à mesurer l'expression du gène de MMP-9 dans nos échantillons. Ces données de la littérature suggèrent qu'une mesure de l'activité de MMP-2 peut être pertinente pour expliquer, dans une certaine mesure, l'augmentation de la protéolyse post-exercice. Enfin, certaines données de la littérature mettent en évidence une activité de la caspase-3 [333] augmentée sans induction de

l'apoptose et qui serait alors impliquée dans la dégradation protéique au cours de l'atrophie en dégradant préférentiellement le complexe actomyosine ainsi que l'actine [230]. Dans le contexte d'un exercice excentrique, la mesure de l'activité de la caspase-3 est une piste supplémentaire à envisager.

Pour conclure, il apparaît très compliqué d'expliquer la protéolyse induite par l'exercice lorsque celui-ci est effectué dans des conditions de jeûne. Les systèmes protéolytiques étant déjà activés par la privation alimentaire, l'exercice n'a pu augmenter que de façon relativement peu importante une protéolyse déjà élevée. Il est alors difficile d'obtenir des modifications de marqueurs moléculaires qui soient significativement augmentés. En effet, en condition non à jeun pour laquelle la protéolyse basale présente certes une grande variabilité interindividuelle, l'exercice permet d'induire une activation de 70% de l'ensemble des systèmes protéolytiques. De ce fait, il apparaît maintenant plus évident de répondre à la question de la part des différents systèmes protéolytiques dans la protéolyse induite par un exercice en situation post absorptive.

III- RÔLE DE LA PROTEINE VPS34 DANS LA BALANCE PROTEIQUE POST-EXERCICE

La première fonction dans laquelle a été décrite la protéine Vps34 est celle de l'initiation du processus de séquestration dans l'autophagie [456]. Cependant, elle serait également le senseur de la concentration intracellulaire en leucine pour l'activation de la protéine mTOR dans la synthèse protéique [362, 363]. Ce double rôle de Vps34 serait en lien avec la formation de complexe protéique spécifique [365]. En effet, Vps34 forme un complexe avec Vps15 qui, associé à la protéine Beclin-1, est impliqué dans l'initiation de l'autophagie. En revanche, l'interaction de la protéine pro-apoptotique Bcl-2 avec Beclin-1 empêche la formation du complexe Beclin-1-Vps34 et donc l'induction de l'autophagie [457]. Ainsi, l'inhibition de l'interaction Bcl2-Beclin-1 serait essentielle dans l'induction de l'autophagie par le jeûne [457] ainsi qu'au décours d'un exercice d'endurance [355] pour la formation du complexe Vps15-Vps34-Beclin-1 [365]. Par ailleurs, la protéine UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene*) serait un autre partenaire de Vps34, en régulant positivement l'association de Beclin-1 avec Vps34 [458]. Si les mécanismes impliquant Vps34 dans l'initiation de l'autophagie sont en partie connus, son rôle suggéré dans la stimulation de mTOR par les acides aminés reste à préciser. En effet, la surexpression de Vps34 conduit à l'activation de S6K1 de manière non insulino-dépendante [363] et n'est pas non plus inhibée par un traitement à la rapamycine suggérant une action indépendante de mTOR. Ces données sont quelque peu paradoxales étant donné l'action inhibitrice connue de mTOR sur l'autophagie [459, 460]. Ainsi, ce double rôle de Vps34 serait en lien avec la formation de complexe protéique spécifique lui conférant alors soit une action positive sur l'autophagie soit une action positive sur la synthèse protéique via mTOR. Dans la mesure où la synthèse protéique nécessite une concentration intracellulaire en acide aminé suffisante, l'activation du complexe Vps34-Beclin-1 et donc de l'autophagie participerait à augmenter les concentrations intracellulaires en acides aminés. Ces derniers pourraient alors activer un autre complexe protéique,

qui reste à déterminer, impliquant Vps34 et mTOR dans la stimulation de la synthèse protéique.[365, 366]

Nos premières expériences *in vivo* suggèrent également l'implication de Vps34 à la suite d'un exercice aigu en résistance avec ce rôle de Vps34 à la fois dans la synthèse et la dégradation protéique. En effet, il apparaît que l'utilisation de la 3-MA et ainsi l'inhibition de l'activité de Vps34 soit responsable de la diminution à la fois de la synthèse et de la dégradation protéique principalement dans le muscle EDL plutôt que SOL en condition basale (post absorptive) et post-exercice (*Figure 47b*). Ces résultats sont à confirmer sur le muscle FDP, le plus impliqué dans ce type d'exercice. Ensuite, il faudrait envisager une mesure de l'activité de la protéine Vps34 d'une part pour vérifier son activation à la suite de notre exercice en résistance, d'autre part pour vérifier la spécificité de l'inhibiteur 3-MA. Par la suite, les acteurs moléculaires de la voie canonique de la synthèse protéique pourront être mesurés pour déterminer l'action de la 3-MA sur cette voie en condition d'exercice. Dans cette perspective, l'étude de l'implication de la PLD1 dans la stimulation de mTOR via Vps34 pourrait être envisagée en utilisant l'inhibiteur *1-butanol* dans le milieu d'incubation des muscles. Enfin, nos immunoprécipitations Bcl-2-Beclin-1 n'ayant pas été concluantes, celles de Beclin-1-Vps34 sont à envisager dans l'approche de la participation de Vps34 dans la protéolyse induite par un exercice en résistance.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Contrôler la masse musculaire peut se résumer *in fine* à un contrôle de la balance protéique qui s'inscrit dans une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires régulant les voies de la synthèse et de la dégradation protéique. Au regard de la littérature, les travaux présentés mettent en évidence l'absence d'une stricte dichotomie entre d'un côté la synthèse et de l'autre la protéolyse musculaire. Il apparaît que certains acteurs puissent selon la cascade de signalisation et l'interaction avec des partenaires spécifiques jouer un double rôle tout aussi important pour la régulation à la fois de la synthèse et la dégradation protéique. Ce double rôle est très lié au type de stimulus mais également à une cinétique d'activation. Ainsi, l'activation de STAT3 et sa participation dans la prolifération des cellules satellites dans les heures qui suivent un exercice aigu de résistance que nous avons pu mettre en évidence est en lien avec l'activation de la protéine STAT1. Cependant, une cinétique de mesure plus éloignée du stimulus de l'exercice aurait probablement mis en évidence la participation de STAT2 avec STAT3 dans l'induction de la différenciation des cellules satellites activées. Récemment, cet acteur pourrait également interagir avec le proto-oncogène Fyn et réguler l'activité de la protéine Vps34 en lien avec l'activation de l'autophagie [369]. Cette donnée se révèle intéressante dans notre contexte de l'exercice en résistance, puissant stimulus de la protéolyse mais capable également d'activer les voies de la synthèse protéique.

Un consensus semble s'établir concernant le double rôle de Vps34 d'une part dans l'induction de l'autophagie et d'autre part dans la stimulation de la synthèse protéique et l'inhibition de l'autophagie via mTOR. Ce double rôle serait en lien avec des partenaires d'interaction protéiques différents dont l'interaction Beclin-1-Vps34 nécessaire pour l'induction de l'autophagie dans certains contextes [365]. D'autres complexes protéiques sont à découvrir ainsi que les stimuli conduisant *in fine* à la stimulation de tel ou tel complexe formé par Vps34. Parmi ces stimuli, la concentration intracellulaire en acides aminés branchés et plus particulièrement en leucine semble être une « clé de voute » dans l'activation de ces complexes pour induire soit le système de l'autophagie soit relancer la synthèse protéique. L'activation rapide de l'autophagie à la suite d'un exercice en endurance a été montrée mais n'a pas été étudiée dans le contexte d'un exercice de résistance. En effet, un tel exercice est responsable d'une production plus importante d'insuline afin de répondre à la demande rapide en glucose par le muscle (exercice hyperglycémiant). L'effet permissif de l'insuline sur l'entrée du glucose peut également se retrouver sur les acides aminés en favorisant leur entrée dans le muscle concourant *in fine* à élever leurs concentrations intracellulaires. L'effet de l'exercice sur l'entrée d'acides aminés au sein du muscle via l'insuline ne peut se faire qu'en condition post-absorptive ou à la suite d'une prise alimentaire immédiatement après l'effort. Ainsi, si la protéine Vps34 peut être impliquée dans l'autophagie au cours de l'effort en lien avec le statut nutritionnel du sujet et également en lien avec l'activation de certaines voies telle que l'AMPK [461] ; il n'est pas évident que son activation retrouvée dans les heures qui suivent l'exercice en résistance [357, 366] soit liée au système autophagique. En effet, l'entrée massive des acides aminés évoqués précédemment pourrait activer Vps34 pour la stimulation de mTOR via la PLD1 [408, 409]. En effet, que ce soit Vps34 ou bien la

PLD1, ces deux acteurs sont activés à la suite d'un exercice en résistance mais également à la suite d'une supplémentation en leucine ouvrant des perspectives intéressantes dans la régulation de la balance protéique post-exercice. Par ailleurs, tout comme Vps34, la protéine GCN2 (*general control non-derepressible-2*) de la famille des kinases eIF2 α , est un senseur de la concentration en acides aminés de la cellule et plus spécifiquement des ARN de transport (ARNt) non acétylés. En effet, les ARNt non acétylés présentent davantage d'affinité pour la protéine GCN2 et son ainsi capables de s'y fixer pour l'activer [462]. Cet état de non-acétylation traduit un ARNt « vide » c'est-à-dire ne transportant aucun acide aminé. Ainsi l'augmentation de la concentration en ARNt vides est en lien avec une diminution de la concentration en acide aminés intracellulaires. En situation de privation en nutriment, l'activation de GCN2 concourt à l'activation de la synthèse protéique par des mécanismes non encore élucidés. Dans ce contexte, l'enzyme *Leucyl-tRNA synthetase* pourrait être un senseur de la leucine dans l'activation de mTOR via les protéines *Rag GTPases* [463, 464]. Par ailleurs, l'inhibition du protéasome participe également à l'activation de GCN2 probablement en relation avec la diminution de la dégradation des protéines cytosoliques [465, 466]. Ainsi, en lien avec l'exercice, les voies de signalisation impliquant les protéines GCN2 et Vps34 sont des pistes très intéressantes concernant la compréhension de la régulation de la balance protéique post-exercice ainsi que pour nos perspectives d'une supplémentation « anti-protéolytique » en leucine après l'exercice.

ANNEXES

Articles dans des revues internationales à comité de lecture

Article 1

Douillard A, Galbes O, Begue G, Rossano B, Levin J, Vernus B, Bonniou A, Candau R, Py G
Calpastatin overexpression in the skeletal muscle of mice prevents clenbuterol-induced muscle hypertrophy and phenotypic shift. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2012 Apr;39(4):364-72

Article 2

Begue G, Douillard A, Galbes O, Rossano B, Vernus B, Candau R, Py G (2013)

Early Activation of Rat Skeletal Muscle IL-6/STAT1/STAT3 Dependent Gene Expression in Resistance Exercise Linked to Hypertrophy. PLoS ONE 8(2): e57141

Communications orales et affichées dans les congrès nationaux et internationaux

Role of interleukin 6 (IL-6) in strength training muscle adaptations

G Begue, O Galbès, A Douillard, B Rossano, R Candau, G Py

1. *First international congress of translational research in human nutrition*, Clermont-Ferrand, 19-20 Mars 2010 (Poster)
2. *Congrès jeunes chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire*, Strasbourg, Décembre 2010 (Poster)

Modèle d'entraînement de force chez le rat

G Begue, O Galbès, A Douillard, B Rossano, R Candau et G Py

Journée de l'école doctorale SMH (463), Mai 2010 (Poster)

Rôle de l'interleukine-6 (IL-6) dans les adaptations musculaires après un entraînement de force

G Begue, O Galbès, A Douillard, B Rossano, R Candau et G Py

Journée de l'école doctorale SMH (463), Mai 2011 (Poster)

Eccentric contractions induced proteolysis through autophagy lysosomal system

G.Begue, B. Vernus, M. Combette, R.Candau, G.Py

1. *Journée de l'école doctorale SMH (463), Mai 2012* (Oral)
2. *15th International Biochemistry of Exercise Congress (IBEC)*, Stockholm 17-21 Juin 2012 (Poster)

ANNEXE 1 : Remodelage musculaire induit par différents protocoles d'exercice chez l'Homme et le Rat

Modalités d'exercice	Typologie	Contenu enzymatique	Hypertrophie	Auteurs
HOMME				
4fois/semaine ; 12 semaines 3-5 séries de 5-10 répétitions Récupération (R) 1-3min Exercices de membres supérieurs et inférieurs	<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> → type I ↑ type IIa (+73%) ↓ type IIb (-90%)		<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> ↑ type I (+12%) ↑ type IIa (+24%) → type IIb	Kraemer <i>et al.</i> , 1995
2fois/semaine ; 19 semaines 3-5 séries de 6-12 répétitions Press, extension du genou	<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> → type I ↑ type IIa (+30%) ↓ type IIb (-94%)		<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> + 7-20% (moyenne de tous les types de fibres)	Adams <i>et al.</i> , 1998
4-6 fois/semaines 4-7 séries 12 répétitions Athlètes entraînés vs Sédentaires	<i>Trapèze</i> ↓MHC I (-12%) ↑MHC IIa (+62%) ↓MHC IIx (-53%)		<i>Trapèze</i> ↑type I (+36%) ↑type IIa (+72%) ↑type IIx(+87%) → domaine myonucléaire ↑ cellules satellites	Kadi <i>et al.</i> , 1999
2-3fois/semaine ; 8semaines 3 séries de 9-11 répétitions R 2min ; Press, squat, extension du genou	<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> →I ↑ type IIa (+12%) ↓ type IIb (-50%)		<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> ↑ type I (+13%) ↑type IIa (+16%) ↑ type IIb(+27%)	Campos <i>et al.</i> , 2002
3fois/semaine ; 12 semaines 6 répétitions, nombre de séries ? Squat, press	<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> Aucune modification		<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> ↑ type I (+18%) ↑ type II (+24%) ↑ taille moyenne des fibres (+21%)	McCarthy <i>et al.</i> , 2002

Modalités d'exercice	Typologie	Contenu enzymatique	Hypertrophie	Auteurs
HOMME				
3fois/semaine ; 6 semaines 5 séries de 3 répétitions Bench press	<i>Triceps Brachial</i> ↓MHC I (-20%) ↑ MHC IIa (+35%) ↓IIx (-42%)			Liu <i>et al.</i> , 2003
3fois/semaine ; 12 semaines 2-6 séries de 4-12 répétitions (70%RM) R 3min Press, extension genou et jambes		<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> ↓ activité SDH	<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> ↑type I (+26%) ↑type II (+28%)	Chilibeck <i>et al.</i> , 1999
6 séries de 15 répétitions pendant 6 jours extension du genou		<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> ↑ activité LDH 24h post-exercice		Costa <i>et al.</i> , 2007
3fois/semaine ; 4semaines 6 séries de 25 répétitions (30% RM) R 1min Extension du genou	<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> → type I ↑type IIa (+15%) ↓type IIb (-12%)	<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> ↑ ARNm LDH-A (+70%) → ARNm LDH-B	<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> ↑ surface de section du muscle (+2%) Pas d'hypertrophie selon le type de fibres	Friedman <i>et al.</i> , 2004
3 fois /semaine ; 16 semaines ; 3 séries de 8-12 répétitions (80% RM) R 90s Extension du genou, press, squats	<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> ↑ type IIa ↓ type IIb		<i>Quadriceps (vaste latéral)</i> ↑ taille moyenne des fibres (>25%) ↑ cellules satellites ↑ nombre noyaux/fibres	Petrella <i>et al.</i> , 2008

Modalités d'exercice	Typologie	Contenu enzymatique	Hypertrophie	Auteurs
RAT				
4fois/semaine ; 4semaines 4 séries de 10 contractions concentriques (90% P _o ; 100Hz)	<i>Gastrocnemius</i> →I →IIa ↑IIx (+25%) ↓IIb (-50%)			Caiozzo <i>et al.</i> , 1997
3fois/semaine ; 8semaines 8 montées d'une échelle d'escalade de 1m. R 2min entre chaque montée. 50-100% RM + chocs électriques	<i>Flexor hallucis longus</i> ↑ MHC II _{a/x} ↓MHC IIb	→ Citrate Synthase	<i>Flexor hallucis longus</i> ↑ CSA (+21%) ↑ poids du muscle (+23%)	Lee <i>et al.</i> , 2004
4fois/semaine ; 12 semaines 5 séries de 12 contractions isométriques (60Hz) R 10min.	<i>Gastrocnemius</i> →MHC I →MHC IIa ↑MHC IIx ↓MHC IIb		<i>Gastrocnemius</i> ↑ poids du muscle (+13%)	Haddad <i>et al.</i> , 1998
4fois/semaine ; 24 semaines 4 séries de 12-15 montées d'une échelle d'escalade de 40cm R 2min	<i>EDL, SOL, Plantaris</i> Pas de modifications	<i>EDL, SOL</i> → Citrate Synthase	<i>EDL, Plantaris</i> →IIa, ↑ IIx/b (+12-14%) <i>SOL</i> ↑ IIa (+16%), ↑ I (+12%)	Duncan <i>et al.</i> , 1998
3fois/semaine ; 12 semaines 3 séries de 10 répétitions (75%RM) R 2min + chocs électriques		<i>Gastrocnemius, Quadriceps</i> →Citrate synthase → Hexokinase	Aucune hypertrophie retrouvée	Krisan <i>et al.</i> , 2004

ANNEXE 2 : Synthèse des systèmes protéolytiques activés avec l'exercice

Auteurs	Protocole	UPS	LAS	Caspase	Calpaines	MMPs
ENDURANCE						
HOMME						
Louis <i>et al.</i> , 2007	30min à 75% VO ₂ _{max}	<u>ARNm</u> ↑ MuRF-1 et MAFbx 1, 2, 4h post-exercice			<u>ARNm</u> ↑ calpaines 1&2 (peu importante)	
						<u>2h post-exercice</u> ↑ MMP-9 (activité+ARNm) → MMP-2, MMP-14 et TIMP-1 <u>Après 10jours d'entraînement</u> ↑ MMP-2 (activité+ARNm), ↑ MMP-9, MMP-14, TIMP-1 (ARNm), → MMP-9 (activité) <u>Après 5 semaines d'entraînement</u> ↑ MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1 (ARNm), → MMP-9 et ↑ MMP-2 (activité)
Rullman <i>et al.</i> , 2007, 2009	Extension genou 45 min à 60 révolution/min 4fois/semaine pendant 5 semaines					
Jamart <i>et al.</i> , 2012	24heures de course biopsie 10min après exercice	<u>Proteine</u> ↑ MurF1, → MAFbx → activité β1, β5 proteasome ↑ activité β2 proteasome	<u>Proteine</u> → Atg3, Atg7, Beclin-1 ↑ Atg12, LC3-II → activité cathepsineL			

Auteurs	Protocole	UPS	LAS	Caspase	Calpaines	MMPs
ENDURANCE						
RONGEUR						
Belcastro <i>et al.</i> , 1993	Course à 25m/min jusqu'à épuisement				↑ activité calpaine 1 et 2 immédiatement après exercice → activité calpaine 1 et 2, 24h post-exercice	
Kim <i>et al.</i> , 2011	50min à 12m/min, pente 5°	Proteine ↓ MuRF-1 à 0, 3h post-exercice ↑ MuRF-1 à 6, 12h post-exercice	Proteine ↓ Beclin-1, Atg7, Atg12-5, LC3-II, Lamp2a à 0, 3, 6, 12h post-exercice			
Grumati <i>et al.</i> , 2011	1h à charge croissante 10-40m/min			Proteine ↑ ratio LC3-II/LC3-I		
He <i>et al.</i> , 2012	Course à charge croissante jusqu'à épuisement			Proteine ↑ ratio LC3-II/LC3-I		
Yeghiazaryan <i>et al.</i> , 2012	45min de course à 20m/min Exercice aigu + 5,14, 30 jours d'entraînement					↑ activité nucléaire MMP-2 ↑ activité et expression MMP-9 cytoplasmique Adaptations uniquement dans soléaire mais pas EDL

Auteurs	Protocole	UPS	LAS	Caspase	Calpaines	MMPs
RESISTANCE						
HOMME						
Yan <i>et al.</i> , 2006	Extension du genou 3x10 répétitions 65% RM	<u>ARNm</u> ↑ MuRF-1, → MAFbx, 4h post- exercice → MuRF-1, → MAFbx, 24h post- exercice		<u>ARNm</u> ↑ caspase-3, 4, 24h post-exercice ↑ Bcl-2, 24h post-exercice	<u>ARNm</u> → calpaines 1 et 2, 4, 24h post- exercice	
Louis <i>et al.</i> , 2007	Extension du genou 3x10 répétitions 70% RM	<u>ARNm</u> ↑ MuRF-1 1, 2, 4h post- exercice ↓MAFbx 12h post-exercice			<u>ARNm</u> → calpaines 1&2	
Mascher <i>et al.</i> , 2007	Press 4 x 10 répétitions 80% RM R5min	<u>ARNm</u> ↑ MuRF-1 2h post-exercice ↓MAFbx 48h post-exercice				
Churchley <i>et al.</i> , 2007	Extension genou 8 x 5 répétitions 80% RM R3min	<u>ARNm</u> ↓ MuRF-1, ↓ MAFbx, 3h post- exercice				
Deldicque <i>et al.</i> , 2007	Extension du genou 10x 10 répétitions 80% RM R3min	<u>ARNm</u> ↑ MAFbx immédiatement ↓ MAFbx 24h post-exercice → MAFbx 72h post-exercice			<u>ARNm</u> ↑ calpaine 1, 72h post-exercice	
Glyn <i>et al.</i> , 2012	Extension du genou 10 x 10 répétitions 70% RM R3mn	<u>ARNm+ Protéine</u> ↑ MuRF-1, → MAFbx, 1h post- exercice	<u>Protéine</u> → LC3-II, 1h post- exercice			

Auteurs	Protocole	UPS	LAS	Caspase	Calpaines	MMPs
RESISTANCE						
HOMME						
Fry <i>et al.</i> , 2012	Extension du genou 8 x 10 répétitions 70% RM R3min	<u>ARNm</u> ↑ MuRF-1, 3h et 6h post-exercice → MurF-1, 24h post-exercice → MAFbx post- exercice	<u>ARNm</u> → LC3, ↓ GABARAP, 3h et 6h post-exercice			
			<u>Protéine</u> ↓ LC3-II/LC3-I, 3, 6, 24h post-exercice → Beclin-1			
RONGEURS						
Carmeli <i>et al.</i> , 2006	50min à 70% VO _{2max} 5 fois/semaine pendant 2 semaines					<u>ARNm et protéine</u> → MMP-9, ↑ MMP-2 dans muscle rapide
EXCENTRIQUE						
HOMME						
Feasson <i>et al.</i> , 2001	30 min à 80% VO _{2max} , -12% pente	<u>Activité</u> → protéasome immédiatement et 24h post- exercice	<u>Activité</u> → cathepsine B+L immédiatement et 24h post-exercice		<u>Activité</u> → calpaines 1&2, ↓ calpaine 3, immédiatement post-exercice	
		↑ protéasome 14jours post- exercice	↑ cathepsine B+L 14jours post-exercice		↓ calpaine 1&3, ↑ calpaine 2, 24h post-exercice	
Willoughby <i>et al.</i> , 2003	Extension genou 7x 10 répétitions à 150% RM R3min	<u>ARNm+Protéine</u> ↑ ubiquitine, E2, 20S proteasome 6 et 24h post- exercice		<u>Protéine+ activité</u> ↑ caspase 3, 6, 24h post-exercice		

Auteurs	Protocole	UPS	LAS	Caspase	Calpaines	MMPs
EXCENTRIQUE						
HOMME						
Kostek et al., 2007	12 min de sauts en contre-bas charge 25% poids corporel	ARNm ↓ MAFbx, 3, 6 et 24h post-exercice				
Murphy <i>et al</i> , 2007	Extension genou 10 x 30 répétitions à 30°/s R1min				Autolyse et Activité → calpaine 1, 0, 3, 24h et 7jours post-exercice ↑ calpaine 3, 24h post-exercice	
Raastad <i>et al</i> , 2010	Extension genou 30 x 10 répétitions à 30°/s R30s				↑ activité calpaine totale de 30min à 198h post-exercice	
RONGEUR						
Koskinen <i>et al</i> , 2001	130min à 17m/min, -13,5° pente					Activité ↑ MMP-2, 2,4 et 7jours dans gastrocnemius (rouge) mais pas dans le soléaire ↑ TIMP-1, ↓ TIMP- 2, 6h post- exercice dans gastrocnemius ↑ TIMP-2, 4 et 7jours dans gastrocnemius → TIMP-2 dans soléaire

REFERENCES

1. Campos, G.E., T.J. Luecke, H.K. Wendeln, K. Toma, et al., *Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones*. Eur J Appl Physiol, 2002. **88**(1-2): p. 50-60.
2. Adams, G.R., B.M. Hather, K.M. Baldwin, and G.A. Dudley, *Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training*. J Appl Physiol, 1993. **74**(2): p. 911-5.
3. Caiozzo, V.J., M.J. Baker, and K.M. Baldwin, *Modulation of myosin isoform expression by mechanical loading: role of stimulation frequency*. J Appl Physiol, 1997. **82**(1): p. 211-8.
4. Haddad, F., A.X. Qin, M. Zeng, S.A. McCue, et al., *Effects of isometric training on skeletal myosin heavy chain expression*. J Appl Physiol, 1998. **84**(6): p. 2036-41.
5. Liu, Y., A. Schlumberger, K. Wirth, D. Schmidtbleicher, et al., *Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strength vs. combination training*. J Appl Physiol, 2003. **94**(6): p. 2282-8.
6. Staron, R.S., D.L. Karapondo, W.J. Kraemer, A.C. Fry, et al., *Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women*. J Appl Physiol, 1994. **76**(3): p. 1247-55.
7. Duncan, N.D., D.A. Williams, and G.S. Lynch, *Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1998. **77**(4): p. 372-8.
8. Chilibeck, P.D., D.G. Syrotuik, and G.J. Bell, *The effect of strength training on estimates of mitochondrial density and distribution throughout muscle fibres*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1999. **80**(6): p. 604-9.
9. Krisan, A.D., D.E. Collins, A.M. Crain, C.C. Kwong, et al., *Resistance training enhances components of the insulin signaling cascade in normal and high-fat-fed rodent skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2004. **96**(5): p. 1691-700.
10. Yaspelkis, B.B., 3rd, M.K. Singh, B. Trevino, A.D. Krisan, et al., *Resistance training increases glucose uptake and transport in rat skeletal muscle*. Acta Physiol Scand, 2002. **175**(4): p. 315-23.
11. Derave, W., B.O. Eijnde, P. Verbessem, M. Ramaekers, et al., *Combined creatine and protein supplementation in conjunction with resistance training promotes muscle GLUT-4 content and glucose tolerance in humans*. J Appl Physiol, 2003. **94**(5): p. 1910-6.
12. Costa, A., H. Dalloul, H. Hegyesi, P. Apor, et al., *Impact of repeated bouts of eccentric exercise on myogenic gene expression*. Eur J Appl Physiol, 2007. **101**(4): p. 427-36.
13. Friedmann, B., R. Kinscherf, S. Vorwald, H. Muller, et al., *Muscular adaptations to computer-guided strength training with eccentric overload*. Acta Physiol Scand, 2004. **182**(1): p. 77-88.
14. Juel, C., M.K. Holten, and F. Dela, *Effects of strength training on muscle lactate release and MCT1 and MCT4 content in healthy and type 2 diabetic humans*. J Physiol, 2004. **556**(Pt 1): p. 297-304.
15. Petrella, J.K., J.S. Kim, D.L. Mayhew, J.M. Cross, et al., *Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis*. J Appl Physiol, 2008. **104**(6): p. 1736-42.
16. McCarthy, J.P., M.A. Pozniak, and J.C. Agre, *Neuromuscular adaptations to concurrent strength and endurance training*. Med Sci Sports Exerc, 2002. **34**(3): p. 511-9.
17. Kraemer, W.J., J.F. Patton, S.E. Gordon, E.A. Harman, et al., *Compatibility of high-intensity strength and endurance training on hormonal and skeletal muscle adaptations*. J Appl Physiol, 1995. **78**(3): p. 976-89.
18. Kadi, F., A. Eriksson, S. Holmner, G.S. Butler-Browne, et al., *Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes*. Histochem Cell Biol, 1999. **111**(3): p. 189-95.

19. Tamaki, T., S. Uchiyama, and S. Nakano, *A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats*. Med Sci Sports Exerc, 1992. **24**(8): p. 881-6.
20. Lee, S., E.R. Barton, H.L. Sweeney, and R.P. Farrar, *Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats*. J Appl Physiol, 2004. **96**(3): p. 1097-104.
21. Barauna, V.G., M.L. Batista, Jr., L.F. Costa Rosa, D.E. Casarini, et al., *Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005. **32**(4): p. 249-54.
22. Barauna, V.G., K.T. Rosa, M.C. Irigoyen, and E.M. de Oliveira, *Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model*. Clin Med Res, 2007. **5**(2): p. 114-20.
23. Rosenblatt, J.D., D. Yong, and D.J. Parry, *Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle*. Muscle Nerve, 1994. **17**(6): p. 608-13.
24. Haddad, F. and G.R. Adams, *Selected contribution: acute cellular and molecular responses to resistance exercise*. J Appl Physiol, 2002. **93**(1): p. 394-403.
25. Degens, H. and S.E. Alway, *Control of muscle size during disuse, disease, and aging*. Int J Sports Med, 2006. **27**(2): p. 94-9.
26. Hoppeler, H., *Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle*. Int J Sports Med, 1986. **7**(4): p. 187-204.
27. Phillips, S.M., K.D. Tipton, A. Aarsland, S.E. Wolf, et al., *Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 1): p. E99-107.
28. Kubica, N., D.R. Bolster, P.A. Farrell, S.R. Kimball, et al., *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**(9): p. 7570-80.
29. Tipton, K.D., E. Borsheim, S.E. Wolf, A.P. Sanford, et al., *Acute response of net muscle protein balance reflects 24-h balance after exercise and amino acid ingestion*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(1): p. E76-89.
30. Borsheim, E., K.D. Tipton, S.E. Wolf, and R.R. Wolfe, *Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(4): p. E648-57.
31. Ferrando, A.A., H.W. Lane, C.A. Stuart, J. Davis-Street, et al., *Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 1): p. E627-33.
32. Thomason, D.B. and F.W. Booth, *Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting*. J Appl Physiol, 1990. **68**(1): p. 1-12.
33. Schiaffino, S., S.P. Bormioli, and M. Aloisi, *Cell proliferation in rat skeletal muscle during early stages of compensatory hypertrophy*. Virchows Arch B Cell Pathol, 1972. **11**(3): p. 268-73.
34. Bolster, D.R., L.S. Jefferson, and S.R. Kimball, *Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling*. Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 351-6.
35. Glass, D.J., *Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(2): p. 87-90.
36. Nascimento, E.B. and D.M. Ouwens, *PRAS40: target or modulator of mTORC1 signalling and insulin action?* Arch Physiol Biochem, 2009. **115**(4): p. 163-75.
37. Peterson, R.T., B.N. Desai, J.S. Hardwick, and S.L. Schreiber, *Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4438-42.

38. Harris, T.E., A. Chi, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, et al., *mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin*. EMBO J, 2006. **25**(8): p. 1659-68.
39. Cross, D.A., D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
40. Welsh, G.I. and C.G. Proud, *Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B*. Biochem J, 1993. **294** (Pt 3): p. 625-9.
41. Hardt, S.E. and J. Sadoshima, *Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development*. Circ Res, 2002. **90**(10): p. 1055-63.
42. Bodine, S.C., *mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise*. Med Sci Sports Exerc, 2006. **38**(11): p. 1950-7.
43. Bolster, D.R., N. Kubica, S.J. Crozier, D.L. Williamson, et al., *Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle*. J Physiol, 2003. **553**(Pt 1): p. 213-20.
44. Baar, K. and K. Esser, *Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise*. Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 1): p. C120-7.
45. Cuthbertson, D.J., J. Babraj, K. Smith, E. Wilkes, et al., *Anabolic signaling and protein synthesis in human skeletal muscle after dynamic shortening or lengthening exercise*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(4): p. E731-8.
46. Czerwinski, S.M., J.M. Martin, and P.J. Bechtel, *Modulation of IGF mRNA abundance during stretch-induced skeletal muscle hypertrophy and regression*. J Appl Physiol, 1994. **76**(5): p. 2026-30.
47. Hameed, M., R.W. Orrell, M. Cobbold, G. Goldspink, et al., *Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise*. J Physiol, 2003. **547**(Pt 1): p. 247-54.
48. Adams, G.R. and S.A. McCue, *Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats*. J Appl Physiol, 1998. **84**(5): p. 1716-22.
49. Musaro, A., K. McCullagh, A. Paul, L. Houghton, et al., *Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle*. Nat Genet, 2001. **27**(2): p. 195-200.
50. Allen, D.L., J.K. Linderman, R.R. Roy, R.E. Grindeland, et al., *Growth hormone/IGF-I and/or resistive exercise maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscles*. J Appl Physiol, 1997. **83**(6): p. 1857-61.
51. Yakar, S., J.L. Liu, B. Stannard, A. Butler, et al., *Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7324-9.
52. Yamaguchi, A., Y. Ikeda, T. Hirai, T. Fujikawa, et al., *Local changes of IGF-I mRNA, GH receptor mRNA, and fiber size in rat plantaris muscle following compensatory overload*. Jpn J Physiol, 2003. **53**(1): p. 53-60.
53. Matheny, R.W., E. Merritt, S.V. Zannikos, R.P. Farrar, et al., *Serum IGF-I-deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(2): p. 164-70.
54. Adams, G.R., D.C. Cheng, F. Haddad, and K.M. Baldwin, *Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration*. J Appl Physiol, 2004. **96**(5): p. 1613-8.
55. Heinemeier, K.M., J.L. Olesen, P. Schjerling, F. Haddad, et al., *Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types*. J Appl Physiol, 2007. **102**(2): p. 573-81.

56. Bamman, M.M., J.R. Shipp, J. Jiang, B.A. Gower, et al., *Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(3): p. E383-90.
57. Rommel, C., S.C. Bodine, B.A. Clarke, R. Rossman, 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**(11): p. 1009-13.
58. Robinson, I.C., B. Gabrielsson, G. Klaus, N. Mauras, et al., *Glucocorticoids and growth problems*. Acta Paediatr Suppl, 1995. **411**: p. 81-6.
59. Goodyear, L.J., P.Y. Chang, D.J. Sherwood, S.D. Dufresne, et al., *Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle*. Am J Physiol, 1996. **271**(2 Pt 1): p. E403-8.
60. Sherwood, D.J., S.D. Dufresne, J.F. Markuns, B. Cheatham, et al., *Differential regulation of MAP kinase, p70(S6K), and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 1): p. E870-8.
61. Nader, G.A. and K.A. Esser, *Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise*. J Appl Physiol, 2001. **90**(5): p. 1936-42.
62. Parkington, J.D., N.K. LeBrasseur, A.P. Siebert, and R.A. Fielding, *Contraction-mediated mTOR, p70S6k, and ERK1/2 phosphorylation in aged skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2004. **97**(1): p. 243-8.
63. Carlson, C.J., S. Koterski, R.J. Sciotti, G.B. Pocard, et al., *Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 634-41.
64. Boppart, M.D., S. Asp, J.F. Wojtaszewski, R.A. Fielding, et al., *Marathon running transiently increases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 activities in human skeletal muscle*. J Physiol, 2000. **526 Pt 3**: p. 663-9.
65. Yu, M., E. Blomstrand, A.V. Chibalin, H. Wallberg-Henriksson, et al., *Exercise-associated differences in an array of proteins involved in signal transduction and glucose transport*. J Appl Physiol, 2001. **90**(1): p. 29-34.
66. Aronson, D., M.A. Violan, S.D. Dufresne, D. Zangen, et al., *Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1251-7.
67. Taylor, L.W., C.D. Wilborn, R.B. Kreider, and D.S. Willoughby, *Effects of resistance exercise intensity on extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase activation in men*. J Strength Cond Res, 2012. **26**(3): p. 599-607.
68. Creer, A., P. Gallagher, D. Slivka, B. Jemiolo, et al., *Influence of muscle glycogen availability on ERK1/2 and Akt signaling after resistance exercise in human skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2005. **99**(3): p. 950-6.
69. Galpin, A.J., A.C. Fry, L.Z. Chiu, D.B. Thomason, et al., *High-power resistance exercise induces MAPK phosphorylation in weightlifting trained men*. Appl Physiol Nutr Metab, 2012. **37**(1): p. 80-7.
70. Karlsson, H.K., P.A. Nilsson, J. Nilsson, A.V. Chibalin, et al., *Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(1): p. E1-7.
71. Boppart, M.D., D. Aronson, L. Gibson, R. Roubenoff, et al., *Eccentric exercise markedly increases c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in human skeletal muscle*. J Appl Physiol, 1999. **87**(5): p. 1668-73.

72. Tannerstedt, J., W. Apro, and E. Blomstrand, *Maximal lengthening contractions induce different signaling responses in the type I and type II fibers of human skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2009. **106**(4): p. 1412-8.
73. Widegren, U., X.J. Jiang, A. Krook, A.V. Chibalin, et al., *Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle*. FASEB J, 1998. **12**(13): p. 1379-89.
74. Widegren, U., C. Wretman, A. Lionikas, G. Hedin, et al., *Influence of exercise intensity on ERK/MAP kinase signalling in human skeletal muscle*. Pflugers Arch, 2000. **441**(2-3): p. 317-22.
75. Hulmi, J.J., S. Walker, J.P. Ahtiainen, K. Nyman, et al., *Molecular signaling in muscle is affected by the specificity of resistance exercise protocol*. Scand J Med Sci Sports, 2012. **22**(2): p. 240-8.
76. Haddad, F. and G.R. Adams, *Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles*. J Appl Physiol, 2004. **96**(1): p. 203-10.
77. Fluckey, J.D., M. Knox, L. Smith, E.E. Dupont-Versteegden, et al., *Insulin-facilitated increase of muscle protein synthesis after resistance exercise involves a MAP kinase pathway*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(6): p. E1205-11.
78. Ma, L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, et al., *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis*. Cell, 2005. **121**(2): p. 179-93.
79. Grobet, L., D. Pirottin, F. Farnir, D. Poncelet, et al., *Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene*. Genesis, 2003. **35**(4): p. 227-38.
80. Whittemore, L.A., K. Song, X. Li, J. Aghajanian, et al., *Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(4): p. 965-71.
81. Lee, S.J., L.A. Reed, M.V. Davies, S. Girgenrath, et al., *Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18117-22.
82. Wolfman, N.M., A.C. McPherron, W.N. Pappano, M.V. Davies, et al., *Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15842-6.
83. Rodriguez, J., B. Vernus, M. Toubiana, E. Jublanc, et al., *Myostatin inactivation increases myotube size through regulation of translational initiation machinery*. J Cell Biochem, 2011. **112**(12): p. 3531-42.
84. Taylor, W.E., S. Bhasin, J. Artaza, F. Byhower, et al., *Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(2): p. E221-8.
85. Trendelenburg, A.U., A. Meyer, D. Rohner, J. Boyle, et al., *Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(6): p. C1258-70.
86. Suryawan, A., J.W. Frank, H.V. Nguyen, and T.A. Davis, *Expression of the TGF-beta family of ligands is developmentally regulated in skeletal muscle of neonatal rats*. Pediatr Res, 2006. **59**(2): p. 175-9.
87. Welle, S., K. Bhatt, and C.A. Pinkert, *Myofibrillar protein synthesis in myostatin-deficient mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(3): p. E409-15.
88. Welle, S., K. Burgess, and S. Mehta, *Stimulation of skeletal muscle myofibrillar protein synthesis, p70 S6 kinase phosphorylation, and ribosomal protein S6 phosphorylation by inhibition of myostatin in mature mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(3): p. E567-72.
89. Sartori, R., G. Milan, M. Patron, C. Mammucari, et al., *Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(6): p. C1248-57.

90. Lipina, C., H. Kendall, A.C. McPherron, P.M. Taylor, et al., *Mechanisms involved in the enhancement of mammalian target of rapamycin signalling and hypertrophy in skeletal muscle of myostatin-deficient mice*. FEBS Lett, 2010. **584**(11): p. 2403-8.
91. Amirouche, A., A.C. Durieux, S. Banzet, N. Koulmann, et al., *Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle*. Endocrinology, 2009. **150**(1): p. 286-94.
92. Louis, E., U. Raue, Y. Yang, B. Jemiolo, et al., *Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2007. **103**(5): p. 1744-51.
93. Raue, U., D. Slivka, B. Jemiolo, C. Hollon, et al., *Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women*. J Appl Physiol, 2006. **101**(1): p. 53-9.
94. Mascher, H., H. Andersson, P.A. Nilsson, B. Ekblom, et al., *Changes in signalling pathways regulating protein synthesis in human muscle in the recovery period after endurance exercise*. Acta Physiol (Oxf), 2007. **191**(1): p. 67-75.
95. Hulmi, J.J., J. Tannerstedt, H. Selanne, H. Kainulainen, et al., *Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men*. J Appl Physiol, 2009. **106**(5): p. 1720-9.
96. Inui, M., G. Martello, and S. Piccolo, *MicroRNA control of signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 252-63.
97. Chen, J.F., E.M. Mandel, J.M. Thomson, Q. Wu, et al., *The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation*. Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 228-33.
98. McCarthy, J.J. and K.A. Esser, *MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy*. J Appl Physiol, 2007. **102**(1): p. 306-13.
99. Nielsen, S., C. Scheele, C. Yfanti, T. Akerstrom, et al., *Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 20): p. 4029-37.
100. Safdar, A., A. Abadi, M. Akhtar, B.P. Hettinga, et al., *miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5610.
101. Davidsen, P.K., I.J. Gallagher, J.W. Hartman, M.A. Tarnopolsky, et al., *High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression*. J Appl Physiol, 2011. **110**(2): p. 309-17.
102. McCarthy, J.J., K.A. Esser, C.A. Peterson, and E.E. Dupont-Versteegden, *Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy*. Physiol Genomics, 2009. **39**(3): p. 219-26.
103. van Rooij, E., D. Quiat, B.A. Johnson, L.B. Sutherland, et al., *A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance*. Dev Cell, 2009. **17**(5): p. 662-73.
104. Drummond, M.J., J.J. McCarthy, C.S. Fry, K.A. Esser, et al., *Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(6): p. E1333-40.
105. Combaret, L., D. Dardevet, D. Bechet, D. Taillandier, et al., *Skeletal muscle proteolysis in aging*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2009. **12**(1): p. 37-41.
106. Teunissen, S.C., W. Wesker, C. Kruitwagen, H.C. de Haes, et al., *Symptom prevalence in patients with incurable cancer: a systematic review*. J Pain Symptom Manage, 2007. **34**(1): p. 94-104.
107. Tisdale, M.J., *Mechanisms of cancer cachexia*. Physiol Rev, 2009. **89**(2): p. 381-410.
108. Tisdale, M.J., *Cancer cachexia*. Curr Opin Gastroenterol, 2010. **26**(2): p. 146-51.

109. Meijer, A.J. and P. Codogno, *Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(5-6): p. 411-25.
110. Combaret, L., D. Dardevet, I. Rieu, M.N. Pouch, et al., *A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle*. J Physiol, 2005. **569**(Pt 2): p. 489-99.
111. Attaix, D., L. Combaret, D. Bechet, and D. Taillandier, *Role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy in cachexia*. Curr Opin Support Palliat Care, 2008. **2**(4): p. 262-6.
112. Stockdale, F.E. and H. Holtzer, *DNA synthesis and myogenesis*. Exp Cell Res, 1961. **24**: p. 508-20.
113. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **9**: p. 493-5.
114. Schultz, E., *Satellite cell behavior during skeletal muscle growth and regeneration*. Med Sci Sports Exerc, 1989. **21**(5 Suppl): p. S181-6.
115. Parker, P.J., M.J. Evans, and I.H. Annan, *Catastrophic familial rhabdomyolysis: compartment syndrome with muscle fiber regeneration*. J Pediatr Orthop B, 1999. **8**(1): p. 64-6.
116. Charge, S.B. and M.A. Rudnicki, *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 209-38.
117. Charifi, N., F. Kadi, L. Feasson, and C. Denis, *Effects of endurance training on satellite cell frequency in skeletal muscle of old men*. Muscle Nerve, 2003. **28**(1): p. 87-92.
118. Kadi, F., P. Schjerling, L.L. Andersen, N. Charifi, et al., *The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles*. J Physiol, 2004. **558**(Pt 3): p. 1005-12.
119. Zammit, P.S., J.P. Golding, Y. Nagata, V. Hudon, et al., *Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?* J Cell Biol, 2004. **166**(3): p. 347-57.
120. Collins, C.A. and T.A. Partridge, *Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell*. Cell Cycle, 2005. **4**(10): p. 1338-41.
121. Olguin, H.C. and B.B. Olwin, *Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal*. Dev Biol, 2004. **275**(2): p. 375-88.
122. Yoshida, N., S. Yoshida, K. Koishi, K. Masuda, et al., *Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 6): p. 769-79.
123. Megeney, L.A., B. Kablar, K. Garrett, J.E. Anderson, et al., *MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle*. Genes Dev, 1996. **10**(10): p. 1173-83.
124. Ustanina, S., J. Carvajal, P. Rigby, and T. Braun, *The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification*. Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 2006-16.
125. Hasty, P., A. Bradley, J.H. Morris, D.G. Edmondson, et al., *Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene*. Nature, 1993. **364**(6437): p. 501-6.
126. Zhang, W., R.R. Behringer, and E.N. Olson, *Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies*. Genes Dev, 1995. **9**(11): p. 1388-99.
127. Gayraud-Morel, B., F. Chretien, P. Flamant, D. Gomes, et al., *A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis*. Dev Biol, 2007. **312**(1): p. 13-28.
128. Kuang, S., M.A. Gillespie, and M.A. Rudnicki, *Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(1): p. 22-31.

129. Schultz, E., C. Chamberlain, K.M. McCormick, and P.E. Mozdziak, *Satellite cells express distinct patterns of myogenic proteins in immature skeletal muscle*. Dev Dyn, 2006. **235**(12): p. 3230-9.
130. Voytik, S.L., M. Przyborski, S.F. Badylak, and S.F. Konieczny, *Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles*. Dev Dyn, 1993. **198**(3): p. 214-24.
131. Sakuma, K., K. Watanabe, M. Sano, I. Uramoto, et al., *The adaptive response of MyoD family proteins in overloaded, regenerating and denervated rat muscles*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1428**(2-3): p. 284-92.
132. Kadi, F. and L.E. Thornell, *Concomitant increases in myonuclear and satellite cell content in female trapezius muscle following strength training*. Histochem Cell Biol, 2000. **113**(2): p. 99-103.
133. Roth, S.M., G.F. Martel, F.M. Ivey, J.T. Lemmer, et al., *Skeletal muscle satellite cell characteristics in young and older men and women after heavy resistance strength training*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001. **56**(6): p. B240-7.
134. Haddad, F. and G.R. Adams, *Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy*. J Appl Physiol, 2006. **100**(4): p. 1188-203.
135. Drummond, M.J., R.K. Conlee, G.W. Mack, S. Sudweeks, et al., *Myogenic regulatory factor response to resistance exercise volume in skeletal muscle*. Eur J Appl Physiol, 2010. **108**(4): p. 771-8.
136. Bickel, C.S., J. Slade, E. Mahoney, F. Haddad, et al., *Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise*. J Appl Physiol, 2005. **98**(2): p. 482-8.
137. Willoughby, D.S. and J.M. Rosene, *Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression*. Med Sci Sports Exerc, 2003. **35**(6): p. 923-9.
138. Psilander, N., R. Damsgaard, and H. Pilegaard, *Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2003. **95**(3): p. 1038-44.
139. Bamman, M.M., R.C. Ragan, J.S. Kim, J.M. Cross, et al., *Myogenic protein expression before and after resistance loading in 26- and 64-yr-old men and women*. J Appl Physiol, 2004. **97**(4): p. 1329-37.
140. McKay, B.R., M. De Lisio, A.P. Johnston, C.E. O'Reilly, et al., *Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e6027.
141. Fluck, M., *Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli*. J Exp Biol, 2006. **209**(Pt 12): p. 2239-48.
142. Brack, A.S., M.J. Conboy, S. Roy, M. Lee, et al., *Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis*. Science, 2007. **317**(5839): p. 807-10.
143. Conboy, I.M. and T.A. Rando, *The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis*. Dev Cell, 2002. **3**(3): p. 397-409.
144. Kopan, R., J.S. Nye, and H. Weintraub, *The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD*. Development, 1994. **120**(9): p. 2385-96.
145. Kuroda, K., S. Tani, K. Tamura, S. Minoguchi, et al., *Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7238-44.
146. Tsivitse, S., *Notch and Wnt signaling, physiological stimuli and postnatal myogenesis*. Int J Biol Sci, 2010. **6**(3): p. 268-81.

147. Armstrong, D.D. and K.A. Esser, *Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(4): p. C853-9.
148. Aschenbach, W.G., R.C. Ho, K. Sakamoto, N. Fujii, et al., *Regulation of dishevelled and beta-catenin in rat skeletal muscle: an alternative exercise-induced GSK-3beta signaling pathway*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(1): p. E152-8.
149. Leal, M.L., L. Lamas, M.S. Aoki, C. Ugrinowitsch, et al., *Effect of different resistance-training regimens on the WNT-signaling pathway*. Eur J Appl Physiol, 2011. **111**(10): p. 2535-45.
150. Barton-Davis, E.R., D.I. Shoturma, and H.L. Sweeney, *Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle*. Acta Physiol Scand, 1999. **167**(4): p. 301-5.
151. Machida, S. and F.W. Booth, *Insulin-like growth factor 1 and muscle growth: implication for satellite cell proliferation*. Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 337-40.
152. Coolican, S.A., D.S. Samuel, D.Z. Ewton, F.J. McWade, et al., *The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6653-62.
153. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. FASEB J, 1995. **9**(9): p. 726-35.
154. Karin, M. and E. Gallagher, *From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance*. IUBMB Life, 2005. **57**(4-5): p. 283-95.
155. Bennett, A.M. and N.K. Tonks, *Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1288-91.
156. Gredinger, E., A.N. Gerber, Y. Tamir, S.J. Tapscott, et al., *Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10436-44.
157. Naya, F.J. and E. Olson, *MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(6): p. 683-8.
158. Gilson, H., O. Schakman, S. Kalista, P. Lause, et al., *Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1): p. E157-64.
159. McCroskery, S., M. Thomas, L. Maxwell, M. Sharma, et al., *Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal*. J Cell Biol, 2003. **162**(6): p. 1135-47.
160. Wang, Q. and A.C. McPherron, *Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 9): p. 2151-65.
161. Amthor, H., A. Otto, A. Vulin, A. Rochat, et al., *Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(18): p. 7479-84.
162. Lee, S.J., T.V. Huynh, Y.S. Lee, S.M. Sebald, et al., *Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(35): p. E2353-60.
163. Guerci, A., C. Lahoute, S. Hebrard, L. Collard, et al., *[Srf: a key factor controlling skeletal muscle hypertrophy by enhancing the recruitment of muscle stem cells]*. Med Sci (Paris), 2012. **28**(5): p. 468-70.
164. Guerci, A., C. Lahoute, S. Hebrard, L. Collard, et al., *Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy*. Cell Metab, 2012. **15**(1): p. 25-37.
165. Serrano, A.L., B. Baeza-Raja, E. Perdiguero, M. Jardi, et al., *Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 33-44.

166. Horsley, V., K.M. Jansen, S.T. Mills, and G.K. Pavlath, *IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth*. Cell, 2003. **113**(4): p. 483-94.
167. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6*. Physiol Rev, 2008. **88**(4): p. 1379-406.
168. Keller, C., A. Steensberg, H. Pilegaard, T. Osada, et al., *Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content*. FASEB J, 2001. **15**(14): p. 2748-50.
169. Penkowa, M., C. Keller, P. Keller, S. Jauffred, et al., *Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise*. FASEB J, 2003. **17**(14): p. 2166-8.
170. Trenerry, M.K., K.A. Carey, A.C. Ward, and D. Cameron-Smith, *STAT3 signaling is activated in human skeletal muscle following acute resistance exercise*. J Appl Physiol, 2007. **102**(4): p. 1483-9.
171. Trenerry, M.K., P.A. Della Gatta, A.E. Larsen, A.P. Garnham, et al., *Impact of resistance exercise training on interleukin-6 and JAK/STAT in young men*. Muscle Nerve, 2011. **43**(3): p. 385-92.
172. Abbott, K.L., B.B. Friday, D. Thaloor, T.J. Murphy, et al., *Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(10): p. 2905-16.
173. Dellling, U., J. Tureckova, H.W. Lim, L.J. De Windt, et al., *A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(17): p. 6600-11.
174. Friday, B.B., V. Horsley, and G.K. Pavlath, *Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation*. J Cell Biol, 2000. **149**(3): p. 657-66.
175. Friday, B.B., P.O. Mitchell, K.M. Kegley, and G.K. Pavlath, *Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD*. Differentiation, 2003. **71**(3): p. 217-27.
176. Musaro, A., K.J. McCullagh, F.J. Naya, E.N. Olson, et al., *IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1*. Nature, 1999. **400**(6744): p. 581-5.
177. Semsarian, C., M.J. Wu, Y.K. Ju, T. Marciniec, et al., *Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway*. Nature, 1999. **400**(6744): p. 576-81.
178. Dunn, S.E., J.L. Burns, and R.N. Michel, *Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21908-12.
179. Sakuma, K., M. Akiho, H. Nakashima, R. Nakao, et al., *Cyclosporin A modulates cellular localization of MEF2C protein and blocks fiber hypertrophy in the overloaded soleus muscle of mice*. Acta Neuropathol, 2008. **115**(6): p. 663-74.
180. Mitchell, P.O., S.T. Mills, and G.K. Pavlath, *Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscles*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(5): p. C984-92.
181. Oishi, Y., T. Ogata, K.I. Yamamoto, M. Terada, et al., *Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading*. Acta Physiol (Oxf), 2008. **192**(3): p. 381-95.
182. Bodine, S.C., T.N. Stitt, M. Gonzalez, W.O. Kline, 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**(11): p. 1014-9.
183. Serrano, A.L., M. Murgia, G. Pallafacchina, E. Calabria, et al., *Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13108-13.

184. Parsons, S.A., B.J. Wilkins, O.F. Bueno, and J.D. Molkentin, *Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(12): p. 4331-43.
185. Talmadge, R.J., J.S. Otis, M.R. Rittler, N.D. Garcia, et al., *Calcineurin activation influences muscle phenotype in a muscle-specific fashion*. BMC Cell Biol, 2004. **5**: p. 28.
186. Banzet, S., N. Koulmann, H. Sanchez, B. Serrurier, et al., *Contraction-induced interleukin-6 transcription in rat slow-type muscle is partly dependent on calcineurin activation*. J Cell Physiol, 2007. **210**(3): p. 596-601.
187. Kubis, H.P., N. Hanke, R.J. Scheibe, J.D. Meissner, et al., *Ca²⁺ transients activate calcineurin/NFATc1 and initiate fast-to-slow transformation in a primary skeletal muscle culture*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(1): p. C56-63.
188. Norrbom, J., C.J. Sundberg, H. Ameln, W.E. Kraus, et al., *PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2004. **96**(1): p. 189-94.
189. Lamas, L., M.S. Aoki, C. Ugrinowitsch, G.E. Campos, et al., *Expression of genes related to muscle plasticity after strength and power training regimens*. Scand J Med Sci Sports, 2010. **20**(2): p. 216-25.
190. Febbraio, M.A. and R.L. Starkie, *The cellular origin of plasma cytokine expression after acute exercise*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **282**(4): p. R1253-7; author reply R1254-7.
191. Ostrowski, K., T. Rohde, S. Asp, P. Schjerling, et al., *Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans*. J Physiol, 1999. **515 (Pt 1)**: p. 287-91.
192. Bruunsgaard, H., E. Bjerregaard, M. Schroll, and B.K. Pedersen, *Muscle strength after resistance training is inversely correlated with baseline levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the oldest old*. J Am Geriatr Soc, 2004. **52**(2): p. 237-41.
193. Bruunsgaard, H., H. Galbo, J. Halkjaer-Kristensen, T.L. Johansen, et al., *Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage*. J Physiol, 1997. **499 (Pt 3)**: p. 833-41.
194. Li, T.L. and M. Gleeson, *The effects of carbohydrate supplementation during the second of two prolonged cycling bouts on immunoendocrine responses*. Eur J Appl Physiol, 2005. **95**(5-6): p. 391-9.
195. Nehlsen-Cannarella, S.L., O.R. Fagoaga, D.C. Nieman, D.A. Henson, et al., *Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running*. J Appl Physiol, 1997. **82**(5): p. 1662-7.
196. Febbraio, M.A., N. Hiscock, M. Sacchetti, C.P. Fischer, et al., *Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction*. Diabetes, 2004. **53**(7): p. 1643-8.
197. Petersen, E.W., A.L. Carey, M. Sacchetti, G.R. Steinberg, et al., *Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(1): p. E155-62.
198. van Hall, G., A. Steensberg, M. Sacchetti, C. Fischer, et al., *Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(7): p. 3005-10.
199. Moldoveanu, A.I., R.J. Shephard, and P.N. Shek, *Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells*. J Appl Physiol, 2000. **89**(4): p. 1499-504.
200. Ullum, H., P.M. Haahr, M. Diamant, J. Palmo, et al., *Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC*. J Appl Physiol, 1994. **77**(1): p. 93-7.
201. Steensberg, A., C. Keller, R.L. Starkie, T. Osada, et al., *IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(6): p. E1272-8.

202. Jonsdottir, I.H., P. Schjerling, K. Ostrowski, S. Asp, et al., *Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles*. J Physiol, 2000. **528 Pt 1**: p. 157-63.
203. Steensberg, A., G. van Hall, T. Osada, M. Sacchetti, et al., *Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**: p. 237-42.
204. Yin, F., Y.Y. Wang, J.H. Du, C. Li, et al., *Noncanonical cAMP pathway and p38 MAPK mediate beta2-adrenergic receptor-induced IL-6 production in neonatal mouse cardiac fibroblasts*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **40(3)**: p. 384-93.
205. Hiscock, N., M.H. Chan, T. Bisucci, I.A. Darby, et al., *Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity*. FASEB J, 2004. **18(9)**: p. 992-4.
206. Chan, M.H., A.L. Carey, M.J. Watt, and M.A. Febbraio, *Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **287(2)**: p. R322-7.
207. Banzet, S., N. Koulmann, N. Simler, O. Birot, et al., *Fibre-type specificity of interleukin-6 gene transcription during muscle contraction in rat: association with calcineurin activity*. J Physiol, 2005. **566(Pt 3)**: p. 839-47.
208. Dendorfer, U., P. Oettgen, and T.A. Libermann, *Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide*. Mol Cell Biol, 1994. **14(7)**: p. 4443-54.
209. Sun, L., K. Ma, H. Wang, F. Xiao, et al., *JAK1-STAT1-STAT3, a key pathway promoting proliferation and preventing premature differentiation of myoblasts*. J Cell Biol, 2007. **179(1)**: p. 129-38.
210. Wang, K., C. Wang, F. Xiao, H. Wang, et al., *JAK2/STAT2/STAT3 are required for myogenic differentiation*. J Biol Chem, 2008. **283(49)**: p. 34029-36.
211. Toth, K.G., B.R. McKay, M. De Lisio, J.P. Little, et al., *IL-6 induced STAT3 signalling is associated with the proliferation of human muscle satellite cells following acute muscle damage*. PLoS One, 2011. **6(3)**: p. e17392.
212. Heinrich, P.C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334 (Pt 2)**: p. 297-314.
213. Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi, *Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors*. Oncogene, 2000. **19(21)**: p. 2548-56.
214. Levy, D.E. and C.K. Lee, *What does Stat3 do?* J Clin Invest, 2002. **109(9)**: p. 1143-8.
215. Rawlings, J.S., K.M. Rosler, and D.A. Harrison, *The JAK/STAT signaling pathway*. J Cell Sci, 2004. **117(Pt 8)**: p. 1281-3.
216. Ivanova, A.V., S.V. Ivanov, X. Zhang, V.N. Ivanov, et al., *STRA13 interacts with STAT3 and modulates transcription of STAT3-dependent targets*. J Mol Biol, 2004. **340(4)**: p. 641-53.
217. Kiuchi, N., K. Nakajima, M. Ichiba, T. Fukada, et al., *STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene*. J Exp Med, 1999. **189(1)**: p. 63-73.
218. Matsui, T., T. Kinoshita, T. Hirano, T. Yokota, et al., *STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development*. J Biol Chem, 2002. **277(39)**: p. 36167-73.

219. Dominov, J.A., C.A. Houlihan-Kawamoto, C.J. Swap, and J.B. Miller, *Pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family in skeletal muscle: a distinct role for Bcl-2 in later stages of myogenesis*. Dev Dyn, 2001. **220**(1): p. 18-26.
220. Jenab, S. and P.L. Morris, *Differential activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 and STAT-1 transcription factors and c-fos messenger ribonucleic acid by interleukin-6 and interferon-gamma in Sertoli cells*. Endocrinology, 1996. **137**(11): p. 4738-43.
221. Puntchart, A., E. Wey, K. Jostarndt, M. Vogt, et al., *Expression of fos and jun genes in human skeletal muscle after exercise*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 1): p. C129-37.
222. Cohen, T., D. Nahari, L.W. Cerem, G. Neufeld, et al., *Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 736-41.
223. Caldow, M.K., G.R. Steinberg, and D. Cameron-Smith, *Impact of SOCS3 overexpression on human skeletal muscle development in vitro*. Cytokine, 2011. **55**(1): p. 104-9.
224. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 378-87.
225. Yang, Y., Y. Xu, W. Li, G. Wang, et al., *STAT3 induces muscle stem cell differentiation by interaction with myoD*. Cytokine, 2009. **46**(1): p. 137-41.
226. Lecker, S.H., V. Solomon, W.E. Mitch, and A.L. Goldberg, *Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states*. J Nutr, 1999. **129**(1S Suppl): p. 227S-237S.
227. Reid, M.B., *Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(6): p. R1423-31.
228. Murton, A.J., D. Constantin, and P.L. Greenhaff, *The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(12): p. 730-43.
229. Jagoe, R.T. and A.L. Goldberg, *What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy?* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2001. **4**(3): p. 183-90.
230. Du, J., X. Wang, C. Miereles, J.L. Bailey, et al., *Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions*. J Clin Invest, 2004. **113**(1): p. 115-23.
231. Tawa, N.E., Jr., R. Odessey, and A.L. Goldberg, *Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles*. J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 197-203.
232. Li, Y.P., Y. Chen, J. John, J. Moylan, et al., *TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle*. FASEB J, 2005. **19**(3): p. 362-70.
233. Tiao, G., S. Hobler, J.J. Wang, T.A. Meyer, et al., *Sepsis is associated with increased mRNAs of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle*. J Clin Invest, 1997. **99**(2): p. 163-8.
234. Lecker, S.H., R.T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, et al., *Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression*. FASEB J, 2004. **18**(1): p. 39-51.
235. Bodine, S.C., E. Latres, S. Baumhueter, V.K. Lai, et al., *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1704-8.
236. Clarke, B.A., D. Drujan, M.S. Willis, L.O. Murphy, et al., *The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 376-85.
237. Stupka, N., M.A. Tarnopolsky, N.J. Yardley, and S.M. Phillips, *Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage*. J Appl Physiol, 2001. **91**(4): p. 1669-78.

238. Willoughby, D.S., M. Taylor, and L. Taylor, *Glucocorticoid receptor and ubiquitin expression after repeated eccentric exercise*. *Med Sci Sports Exerc*, 2003. **35**(12): p. 2023-31.
239. Mascher, H., J. Tannerstedt, T. Brink-Elfegoun, B. Ekblom, et al., *Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **294**(1): p. E43-51.
240. Lagirand-Cantaloube, J., N. Offner, A. Csibi, M.P. Leibovitch, et al., *The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy*. *EMBO J*, 2008. **27**(8): p. 1266-76.
241. Tintignac, L.A., J. Lagirand, S. Batonnet, V. Sirri, et al., *Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(4): p. 2847-56.
242. Jogo, M., S. Shiraishi, and T.A. Tamura, *Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(17): p. 2715-9.
243. Polge, C., A.E. Heng, M. Jarzaguat, S. Ventadour, et al., *Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1*. *FASEB J*, 2011. **25**(11): p. 3790-802.
244. Koyama, S., S. Hata, C.C. Witt, Y. Ono, et al., *Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis*. *J Mol Biol*, 2008. **376**(5): p. 1224-36.
245. Cai, D., J.D. Frantz, N.E. Tawa, Jr., P.A. Melendez, et al., *IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice*. *Cell*, 2004. **119**(2): p. 285-98.
246. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(10): p. 725-34.
247. Nakashima, K. and Y. Yakabe, *AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007. **71**(7): p. 1650-6.
248. Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, et al., *Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy*. *Cell*, 2004. **117**(3): p. 399-412.
249. Brunet, A., A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
250. Nader, G.A., *Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(10): p. 1985-96.
251. Bechet, D., A. Tassa, D. Taillandier, L. Combaret, et al., *Lysosomal proteolysis in skeletal muscle*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(10): p. 2098-114.
252. Kaushik, S., U. Bandyopadhyay, S. Sridhar, R. Kiffin, et al., *Chaperone-mediated autophagy at a glance*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 4): p. 495-9.
253. Ravikumar, B., M. Futter, L. Jahreiss, V.I. Korolchuk, et al., *Mammalian macroautophagy at a glance*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 11): p. 1707-11.
254. Klionsky, D.J. and S.D. Emr, *Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation*. *Science*, 2000. **290**(5497): p. 1717-21.
255. Tanida, I., *Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(11): p. 2201-14.
256. Kadowaki, M., M.R. Karim, A. Carpi, and G. Miotto, *Nutrient control of macroautophagy in mammalian cells*. *Mol Aspects Med*, 2006. **27**(5-6): p. 426-43.

257. Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, et al., *In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1101-11.
258. Mordier, S., C. Deval, D. Bechet, A. Tassa, et al., *Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29900-6.
259. Wohlgemuth, S.E., A.Y. Seo, E. Marzetti, H.A. Lees, et al., *Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise*. Exp Gerontol, 2010. **45**(2): p. 138-48.
260. Klionsky, D.J., J.M. Cregg, W.A. Dunn, Jr., S.D. Emr, et al., *A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes*. Dev Cell, 2003. **5**(4): p. 539-45.
261. Xie, Z. and D.J. Klionsky, *Autophagosome formation: core machinery and adaptations*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1102-9.
262. Ganley, I.G., H. Lam du, J. Wang, X. Ding, et al., *ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy*. J Biol Chem, 2009. **284**(18): p. 12297-305.
263. Tassa, A., M.P. Roux, D. Attaix, and D.M. Bechet, *Class III phosphoinositide 3-kinase--Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes*. Biochem J, 2003. **376**(Pt 3): p. 577-86.
264. Hanada, T., N.N. Noda, Y. Satomi, Y. Ichimura, et al., *The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37298-302.
265. Mizushima, N., H. Sugita, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 33889-92.
266. Klionsky, D.J., H. Abeliovich, P. Agostinis, D.K. Agrawal, et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes*. Autophagy, 2008. **4**(2): p. 151-75.
267. Tanida, I. and S. Waguri, *Measurement of autophagy in cells and tissues*. Methods Mol Biol, 2010. **648**: p. 193-214.
268. Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. EMBO J, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
269. Nakatogawa, H., Y. Ichimura, and Y. Ohsumi, *Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion*. Cell, 2007. **130**(1): p. 165-78.
270. Taillandier, D., E. Auroousseau, D. Meynial-Denis, D. Bechet, et al., *Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle*. Biochem J, 1996. **316** (Pt 1): p. 65-72.
271. Masiero, E., L. Agatea, C. Mammucari, B. Blaauw, et al., *Autophagy is required to maintain muscle mass*. Cell Metab, 2009. **10**(6): p. 507-15.
272. Sandri, M., *New findings of lysosomal proteolysis in skeletal muscle*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(3): p. 223-9.
273. Malicdan, M.C., S. Noguchi, I. Nonaka, P. Saftig, et al., *Lysosomal myopathies: an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle*. Neuromuscul Disord, 2008. **18**(7): p. 521-9.
274. Raben, N., V. Hill, L. Shea, S. Takikita, et al., *Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(24): p. 3897-908.

275. Ramachandran, N., I. Munteanu, P. Wang, P. Aubourg, et al., *VMA21 deficiency causes an autophagic myopathy by compromising V-ATPase activity and lysosomal acidification*. *Cell*, 2009. **137**(2): p. 235-46.
276. Deval, C., S. Mordier, C. Obléd, D. Bechet, et al., *Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting*. *Biochem J*, 2001. **360**(Pt 1): p. 143-50.
277. Komamura, K., H. Shirotani-Ikejima, R. Tatsumi, Y. Tsujita-Kuroda, et al., *Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2003. **17**(4): p. 303-10.
278. Katunuma, N., N. Yasogawa, K. Kito, Y. Sanada, et al., *Abnormal expression of a serine protease in human dystrophic muscle*. *J Biochem*, 1978. **83**(2): p. 625-8.
279. Kominami, E., I. Kunio, and N. Katunuma, *Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy*. *Am J Pathol*, 1987. **127**(3): p. 461-6.
280. Huang, J. and N.E. Forsberg, *Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(21): p. 12100-5.
281. Ravikummar, B., Z. Berger, C. Vacher, C.J. O'Kane, et al., *Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(7): p. 1209-16.
282. Sandri, M., *Autophagy in skeletal muscle*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(7): p. 1411-6.
283. Cuervo, A.M., *Autophagy and aging: keeping that old broom working*. *Trends Genet*, 2008. **24**(12): p. 604-12.
284. Pallauf, K. and G. Rimbach, *Autophagy, polyphenols and healthy ageing*. *Ageing Res Rev*, 2012. **12**(1): p. 237-252.
285. Lemasters, J.J., *Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging*. *Rejuvenation Res*, 2005. **8**(1): p. 3-5.
286. Hara, T., K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, et al., *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. *Nature*, 2006. **441**(7095): p. 885-9.
287. Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, et al., *Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice*. *Nature*, 2006. **441**(7095): p. 880-4.
288. Nixon, R.A. and D.S. Yang, *Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect*. *Neurobiol Dis*, 2011. **43**(1): p. 38-45.
289. Cheung, Z.H. and N.Y. Ip, *Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases - recent advances and future perspectives*. *J Neurochem*, 2011. **118**(3): p. 317-25.
290. Masiero, E. and M. Sandri, *Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles*. *Autophagy*, 2010. **6**(2): p. 307-9.
291. Yue, Z., S. Jin, C. Yang, A.J. Levine, et al., *Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(25): p. 15077-82.
292. Mathew, R., S. Kongara, B. Beaudoin, C.M. Karp, et al., *Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability*. *Genes Dev*, 2007. **21**(11): p. 1367-81.
293. Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E.L. Eskelinen, et al., *Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice*. *Nature*, 2000. **406**(6798): p. 902-6.
294. Kaneda, D., K. Sugie, A. Yamamoto, H. Matsumoto, et al., *A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multiorgan involvement*. *Neurology*, 2003. **61**(1): p. 128-31.

295. Villard, L., V. des Portes, N. Levy, J.P. Louboutin, et al., *Linkage of X-linked myopathy with excessive autophagy (XMEA) to Xq28*. Eur J Hum Genet, 2000. **8**(2): p. 125-9.
296. Goll, D.E., V.F. Thompson, H. Li, W. Wei, et al., *The calpain system*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 731-801.
297. Sorimachi, H. and K. Suzuki, *The structure of calpain*. J Biochem, 2001. **129**(5): p. 653-64.
298. Moldoveanu, T., C.M. Hosfield, Z. Jia, J.S. Elce, et al., *Ca²⁺-induced structural changes in rat m-calpain revealed by partial proteolysis*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1545**(1-2): p. 245-54.
299. Glading, A., D.A. Lauffenburger, and A. Wells, *Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(1): p. 46-54.
300. Yamashima, T., *Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates*. Cell Calcium, 2004. **36**(3-4): p. 285-93.
301. Raynaud, F., G. Carnac, A. Marcilhac, and Y. Benyamin, *m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation*. Exp Cell Res, 2004. **298**(1): p. 48-57.
302. Barnoy, S., T. Glasner, and N.S. Kosower, *The role of calpastatin (the specific calpain inhibitor) in myoblast differentiation and fusion*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **220**(3): p. 933-8.
303. Cottin, P., S. Poussard, E. Dargelos, D. Balcerzak, et al., *Calpains and myogenesis*. Methods Mol Biol, 2000. **144**: p. 173-80.
304. Dedieu, S., G. Mazerès, N. Dourdin, P. Cottin, et al., *Transactivation of capn2 by myogenic regulatory factors during myogenesis*. J Mol Biol, 2003. **326**(2): p. 453-65.
305. Dedieu, S., S. Poussard, G. Mazerès, F. Grise, et al., *Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization*. Exp Cell Res, 2004. **292**(1): p. 187-200.
306. Sultan, K.R., B.T. Dittrich, and D. Pette, *Calpain activity in fast, slow, transforming, and regenerating skeletal muscles of rat*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(3): p. C639-47.
307. Dargelos, E., C. Brule, L. Combaret, A. Hadj-Sassi, et al., *Involvement of the calcium-dependent proteolytic system in skeletal muscle aging*. Exp Gerontol, 2007. **42**(11): p. 1088-98.
308. Vermaelen, M., P. Sirvent, F. Raynaud, C. Astier, et al., *Differential localization of autolyzed calpains 1 and 2 in slow and fast skeletal muscles in the early phase of atrophy*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(5): p. C1723-31.
309. Richard, I., O. Broux, V. Allamand, F. Fougèrouse, et al., *Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. Cell, 1995. **81**(1): p. 27-40.
310. Tidball, J.G. and M.J. Spencer, *Calpains and muscular dystrophies*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(1): p. 1-5.
311. Horikawa, Y., *[Type 2 diabetes and genetic variations of calpain 10 gene]*. Nihon Rinsho, 2005. **63 Suppl 2**: p. 155-9.
312. Saito, K., J.S. Elce, J.E. Hamos, and R.A. Nixon, *Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2628-32.
313. Dargelos, E., S. Poussard, C. Brule, L. Daury, et al., *Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia*. Biochimie, 2008. **90**(2): p. 359-68.
314. Goll, D.E., W.R. Dayton, I. Singh, and R.M. Robson, *Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain*. J Biol Chem, 1991. **266**(13): p. 8501-10.

315. Sultan, K.R., B.T. Dittrich, E. Leisner, N. Paul, et al., *Fiber type-specific expression of major proteolytic systems in fast- to slow-transforming rabbit muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(2): p. C239-47.
316. Belcastro, A.N., *Skeletal muscle calcium-activated neutral protease (calpain) with exercise*. J Appl Physiol, 1993. **74**(3): p. 1381-6.
317. Belcastro, A.N., L.D. Shewchuk, and D.A. Raj, *Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis*. Mol Cell Biochem, 1998. **179**(1-2): p. 135-45.
318. Feasson, L., D. Stockholm, D. Freyssenet, I. Richard, et al., *Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle*. J Physiol, 2002. **543**(Pt 1): p. 297-306.
319. Raastad, T., S.G. Owe, G. Paulsen, D. Enns, et al., *Changes in calpain activity, muscle structure, and function after eccentric exercise*. Med Sci Sports Exerc, 2010. **42**(1): p. 86-95.
320. Bricout, V.A., B.D. Serrurier, and A.X. Bigard, *Clenbuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles*. Acta Physiol Scand, 2004. **180**(3): p. 271-80.
321. Lynch, G.S. and J.G. Ryall, *Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease*. Physiol Rev, 2008. **88**(2): p. 729-67.
322. Kim, Y.S. and R.D. Sainz, *Beta-adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles*. Life Sci, 1992. **50**(6): p. 397-407.
323. Arthur, G.D. and A.N. Belcastro, *A calcium stimulated cysteine protease involved in isoproterenol induced cardiac hypertrophy*. Mol Cell Biochem, 1997. **176**(1-2): p. 241-8.
324. Bardsley, R.G., S.M. Allcock, J.M. Dawson, N.W. Dumelow, et al., *Effect of beta-agonists on expression of calpain and calpastatin activity in skeletal muscle*. Biochimie, 1992. **74**(3): p. 267-73.
325. Parr, T., R.G. Bardsley, R.S. Gilmour, and P.J. Buttery, *Changes in calpain and calpastatin mRNA induced by beta-adrenergic stimulation of bovine skeletal muscle*. Eur J Biochem, 1992. **208**(2): p. 333-9.
326. Douillard, A., O. Galbes, B. Rossano, B. Vernus, et al., *Time course in calpain activity and autolysis in slow and fast skeletal muscle during clenbuterol treatment*. Can J Physiol Pharmacol, 2011. **89**(2): p. 117-25.
327. Kramerova, I., E. Kudryashova, B. Wu, C. Ottenheijm, et al., *Novel role of calpain-3 in the triad-associated protein complex regulating calcium release in skeletal muscle*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(21): p. 3271-80.
328. Dupont-Versteegden, E.E., *Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(46): p. 7463-6.
329. Pollack, M., S. Phaneuf, A. Dirks, and C. Leeuwenburgh, *The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **959**: p. 93-107.
330. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
331. Nhan, T.Q., W.C. Liles, and S.M. Schwartz, *Physiological functions of caspases beyond cell death*. Am J Pathol, 2006. **169**(3): p. 729-37.
332. Ferreira, R., M.J. Neuparth, R. Vitorino, H.J. Appell, et al., *Evidences of apoptosis during the early phases of soleus muscle atrophy in hindlimb suspended mice*. Physiol Res, 2008. **57**(4): p. 601-11.

333. Siu, P.M., E.E. Pistilli, and S.E. Alway, *Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(4): p. R1015-26.
334. Alway, S.E., H. Degens, G. Krishnamurthy, and A. Chaudhrai, *Denervation stimulates apoptosis but not Id2 expression in hindlimb muscles of aged rats*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2003. **58**(8): p. 687-97.
335. Chung, L. and Y.C. Ng, *Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock proteins in rat skeletal muscle*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(1): p. 103-9.
336. Carmeli, E., M. Moas, A.Z. Reznick, and R. Coleman, *Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review*. Muscle Nerve, 2004. **29**(2): p. 191-7.
337. Liu, X., *Emerging ideas: matrix metalloproteinase-2 in muscle atrophy*. Clin Orthop Relat Res, 2011. **469**(6): p. 1797-9.
338. Wang, W., C.J. Schulze, W.L. Suarez-Pinzon, J.R. Dyck, et al., *Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury*. Circulation, 2002. **106**(12): p. 1543-9.
339. Jamart, C., N. Benoit, J.M. Raymackers, H.J. Kim, et al., *Autophagy-related and autophagy-regulatory genes are induced in human muscle after ultraendurance exercise*. Eur J Appl Physiol, 2012. **112**(8): p. 3173-7.
340. Kim, Y.A., Y.S. Kim, and W. Song, *Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle*. J Physiol Biochem, 2012. **68**(2): p. 229-35.
341. Yang, Y., B. Jemiolo, and S. Trappe, *Proteolytic mRNA expression in response to acute resistance exercise in human single skeletal muscle fibers*. J Appl Physiol, 2006. **101**(5): p. 1442-50.
342. Raue, U., D. Slivka, B. Jemiolo, C. Hollon, et al., *Proteolytic gene expression differs at rest and after resistance exercise between young and old women*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2007. **62**(12): p. 1407-12.
343. Fry, C.S., M.J. Drummond, E.L. Glynn, J.M. Dickinson, et al., *Skeletal Muscle Autophagy and Protein Breakdown Following Resistance Exercise are Similar in Younger and Older Adults*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012.
344. Deldicque, L., P. Atherton, R. Patel, D. Theisen, et al., *Effects of resistance exercise with and without creatine supplementation on gene expression and cell signaling in human skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2008. **104**(2): p. 371-8.
345. Kostek, M.C., Y.W. Chen, D.J. Cuthbertson, R. Shi, et al., *Gene expression responses over 24 h to lengthening and shortening contractions in human muscle: major changes in CSRP3, MUSTN1, SIX1, and FBXO32*. Physiol Genomics, 2007. **31**(1): p. 42-52.
346. Leger, B., R. Cartoni, M. Praz, S. Lamon, et al., *Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy*. J Physiol, 2006. **576**(Pt 3): p. 923-33.
347. Churchley, E.G., V.G. Coffey, D.J. Pedersen, A. Shield, et al., *Influence of preexercise muscle glycogen content on transcriptional activity of metabolic and myogenic genes in well-trained humans*. J Appl Physiol, 2007. **102**(4): p. 1604-11.
348. Coffey, V.G., A. Shield, B.J. Canny, K.A. Carey, et al., *Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(5): p. E849-55.
349. Nakashima, K., Y. Yakabe, M. Yamazaki, and H. Abe, *Effects of fasting and refeeding on expression of atrogen-1 and Akt/FOXO signaling pathway in skeletal muscle of chicks*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(11): p. 2775-8.

350. Greer, E.L., P.R. Oskoui, M.R. Banko, J.M. Maniar, et al., *The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor*. J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30107-19.
351. Richter, E.A. and N.B. Ruderman, *AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease*. Biochem J, 2009. **418**(2): p. 261-75.
352. Dreyer, H.C., S. Fujita, J.G. Cadenas, D.L. Chinkes, et al., *Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle*. J Physiol, 2006. **576**(Pt 2): p. 613-24.
353. Vella, L., M.K. Caldw, A.E. Larsen, D. Tassoni, et al., *Resistance exercise increases NF-kappaB activity in human skeletal muscle*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **302**(6): p. R667-73.
354. Grumati, P., L. Coletto, A. Schiavinato, S. Castagnaro, et al., *Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles*. Autophagy, 2011. **7**(12): p. 1415-23.
355. He, C., M.C. Bassik, V. Moresi, K. Sun, et al., *Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 511-5.
356. Smuder, A.J., A.N. Kavazis, K. Min, and S.K. Powers, *Exercise protects against doxorubicin-induced markers of autophagy signaling in skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2011. **111**(4): p. 1190-8.
357. MacKenzie, M.G., D.L. Hamilton, J.T. Murray, P.M. Taylor, et al., *mVps34 is activated following high-resistance contractions*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 1): p. 253-60.
358. Glynn, E.L., C.S. Fry, M.J. Drummond, H.C. Dreyer, et al., *Muscle protein breakdown has a minor role in the protein anabolic response to essential amino acid and carbohydrate intake following resistance exercise*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **299**(2): p. R533-40.
359. Chang, Y.Y., G. Juhasz, P. Goraksha-Hicks, A.M. Arsham, et al., *Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 1): p. 232-6.
360. Kihara, A., T. Noda, N. Ishihara, and Y. Ohsumi, *Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 2001. **152**(3): p. 519-30.
361. Juhasz, G., J.H. Hill, Y. Yan, M. Sass, et al., *The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in Drosophila*. J Cell Biol, 2008. **181**(4): p. 655-66.
362. Nobukuni, T., M. Joaquin, M. Roccio, S.G. Dann, et al., *Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(40): p. 14238-43.
363. Byfield, M.P., J.T. Murray, and J.M. Backer, *hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase*. J Biol Chem, 2005. **280**(38): p. 33076-82.
364. Nobukuni, T., S.C. Kozma, and G. Thomas, *hVps34, an ancient player, enters a growing game: mTOR Complex1/S6K1 signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(2): p. 135-41.
365. Backer, J.M., *The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34*. Biochem J, 2008. **410**(1): p. 1-17.
366. Mackenzie, M.G., D.L. Hamilton, J.T. Murray, and K. Baar, *mVps34 is activated by an acute bout of resistance exercise*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): p. 1314-6.
367. Sanchez, A.M., A. Csibi, A. Raibon, K. Cornille, et al., *AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1*. J Cell Biochem, 2012. **113**(2): p. 695-710.

368. Mammucari, C., G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, et al., *FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo*. *Cell Metab*, 2007. **6**(6): p. 458-71.
369. Yamada, E., C.C. Bastie, H. Koga, Y. Wang, et al., *Mouse skeletal muscle fiber-type-specific macroautophagy and muscle wasting are regulated by a Fyn/STAT3/Vps34 signaling pathway*. *Cell Rep*, 2012. **1**(5): p. 557-69.
370. Cunha, T.F., J.B. Moreira, N.A. Paixao, J.C. Campos, et al., *Aerobic exercise training upregulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice*. *J Appl Physiol*, 2012. **112**(11): p. 1839-46.
371. Murphy, R.M., C.A. Goodman, M.J. McKenna, J. Bennie, et al., *Calpain-3 is autolyzed and hence activated in human skeletal muscle 24 h following a single bout of eccentric exercise*. *J Appl Physiol*, 2007. **103**(3): p. 926-31.
372. Murphy, R.M. and G.D. Lamb, *Calpain-3 is activated following eccentric exercise*. *J Appl Physiol*, 2009. **106**(6): p. 2068; author reply 2069.
373. Murphy, R.M., R.J. Snow, and G.D. Lamb, *mu-Calpain and calpain-3 are not autolyzed with exhaustive exercise in humans*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **290**(1): p. C116-22.
374. Lynch, G.S., C.J. Fary, and D.A. Williams, *Quantitative measurement of resting skeletal muscle [Ca²⁺]_i following acute and long-term downhill running exercise in mice*. *Cell Calcium*, 1997. **22**(5): p. 373-83.
375. Kocturk, S., B.M. Kayatekin, H. Resmi, O. Acikgoz, et al., *The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats*. *Eur J Appl Physiol*, 2008. **102**(5): p. 515-24.
376. Song, W., H.B. Kwak, and J.M. Lawler, *Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(3-4): p. 517-28.
377. Marzetti, E., L. Groban, S.E. Wohlgemuth, H.A. Lees, 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**(2): p. R558-67.
378. Sharafi, H. and R. Rahimi, *The effect of resistance exercise on p53, caspase-9, and caspase-3 in trained and untrained men*. *J Strength Cond Res*, 2012. **26**(4): p. 1142-8.
379. Haas, T.L., M. Milkiewicz, S.J. Davis, A.L. Zhou, et al., *Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **279**(4): p. H1540-7.
380. Van Gieson, E.J. and T.C. Skalak, *Chronic vasodilation induces matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression during microvascular remodeling in rat skeletal muscle*. *Microcirculation*, 2001. **8**(1): p. 25-31.
381. Koskinen, S.O., W. Wang, A.M. Ahtikoski, M. Kjaer, et al., *Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. **280**(5): p. R1292-300.
382. Carmeli, E., M. Moas, S. Lennon, and S.K. Powers, *High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres*. *Exp Physiol*, 2005. **90**(4): p. 613-9.
383. Yeghiazaryan, M., K. Zybura-Broda, A. Cabaj, J. Wlodarczyk, et al., *Fine-structural distribution of MMP-2 and MMP-9 activities in the rat skeletal muscle upon training: a study by high-resolution in situ zymography*. *Histochem Cell Biol*, 2012. **138**(1): p. 75-87.
384. Rullman, E., J. Norrbom, A. Stromberg, D. Wagsater, et al., *Endurance exercise activates matrix metalloproteinases in human skeletal muscle*. *J Appl Physiol*, 2009. **106**(3): p. 804-12.

385. Rullman, E., K. Olsson, D. Wagsater, and T. Gustafsson, *Circulating MMP-9 during exercise in humans*. Eur J Appl Physiol, 2012.
386. Rullman, E., H. Rundqvist, D. Wagsater, H. Fischer, et al., *A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2007. **102**(6): p. 2346-51.
387. Koskinen, S.O., M. Hoyhtya, T. Turpeenniemi-Hujanen, V. Martikkala, et al., *Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running*. Scand J Med Sci Sports, 2001. **11**(1): p. 9-15.
388. Biolo, G., K.D. Tipton, S. Klein, and R.R. Wolfe, *An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 1): p. E122-9.
389. Miller, S.L., K.D. Tipton, D.L. Chinkes, S.E. Wolf, et al., *Independent and combined effects of amino acids and glucose after resistance exercise*. Med Sci Sports Exerc, 2003. **35**(3): p. 449-55.
390. Tipton, K.D., A.A. Ferrando, S.M. Phillips, D. Doyle, Jr., et al., *Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. E628-34.
391. Liu, Z., L.A. Jahn, L. Wei, W. Long, et al., *Amino acids stimulate translation initiation and protein synthesis through an Akt-independent pathway in human skeletal muscle*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(12): p. 5553-8.
392. Paddon-Jones, D., M. Sheffield-Moore, X.J. Zhang, E. Volpi, et al., *Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(3): p. E321-8.
393. Smith, H.J., N.A. Greenberg, and M.J. Tisdale, *Effect of eicosapentaenoic acid, protein and amino acids on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice*. Br J Cancer, 2004. **91**(2): p. 408-12.
394. Rieu, I., M. Balage, C. Sornet, C. Giraudet, et al., *Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia*. J Physiol, 2006. **575**(Pt 1): p. 305-15.
395. Katsanos, C.S., H. Kobayashi, M. Sheffield-Moore, A. Aarsland, et al., *A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(2): p. E381-7.
396. Crozier, S.J., S.R. Kimball, S.W. Emmert, J.C. Anthony, et al., *Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle*. J Nutr, 2005. **135**(3): p. 376-82.
397. Drummond, M.J., H.C. Dreyer, B. Pennings, C.S. Fry, et al., *Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging*. J Appl Physiol, 2008. **104**(5): p. 1452-61.
398. Pennings, B., R. Koopman, M. Beelen, J.M. Senden, et al., *Exercising before protein intake allows for greater use of dietary protein-derived amino acids for de novo muscle protein synthesis in both young and elderly men*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(2): p. 322-31.
399. Nair, K.S., R.G. Schwartz, and S. Welle, *Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans*. Am J Physiol, 1992. **263**(5 Pt 1): p. E928-34.
400. Zanchi, N.E., H. Nicastro, and A.H. Lancha, Jr., *Potential antiproteolytic effects of L-leucine: observations of in vitro and in vivo studies*. Nutr Metab (Lond), 2008. **5**: p. 20.
401. Nicastro, H., G.G. Artioli, S. Costa Ados, M.Y. Solis, et al., *An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions*. Amino Acids, 2011. **40**(2): p. 287-300.

402. Eley, H.L., S.T. Russell, and M.J. Tisdale, *Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia*. *Biochem J*, 2007. **407**(1): p. 113-20.
403. Levenhagen, D.K., J.D. Gresham, M.G. Carlson, D.J. Maron, et al., *Postexercise nutrient intake timing in humans is critical to recovery of leg glucose and protein homeostasis*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. **280**(6): p. E982-93.
404. Rasmussen, B.B., K.D. Tipton, S.L. Miller, S.E. Wolf, et al., *An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise*. *J Appl Physiol*, 2000. **88**(2): p. 386-92.
405. Koopman, R., B. Pennings, A.H. Zorenc, and L.J. van Loon, *Protein ingestion further augments S6K1 phosphorylation in skeletal muscle following resistance type exercise in males*. *J Nutr*, 2007. **137**(8): p. 1880-6.
406. Fujita, S., H.C. Dreyer, M.J. Drummond, E.L. Glynn, et al., *Nutrient signalling in the regulation of human muscle protein synthesis*. *J Physiol*, 2007. **582**(Pt 2): p. 813-23.
407. Findlay, G.M., L. Yan, J. Procter, V. Mieulet, et al., *A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling*. *Biochem J*, 2007. **403**(1): p. 13-20.
408. Wiczer, B.M. and G. Thomas, *Phospholipase D and mTORC1: nutrients are what bring them together*. *Sci Signal*, 2012. **5**(217): p. pe13.
409. O'Neil, T.K., L.R. Duffy, J.W. Frey, and T.A. Hornberger, *The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 14): p. 3691-701.
410. Csibi, A., M.P. Leibovitch, K. Cornille, L.A. Tintignac, et al., *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**(7): p. 4413-21.
411. Ching, J.K., P. Rajguru, N. Marupudi, S. Banerjee, et al., *A role for AMPK in increased insulin action after serum starvation*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010. **299**(5): p. C1171-9.
412. Lederberg, J., *Cell genetics and hereditary symbiosis*. *Physiol Rev*, 1952. **32**(4): p. 403-30.
413. Edelstein, C.L., E.D. Wieder, M.M. Yaqoob, P.E. Gengaro, et al., *The role of cysteine proteases in hypoxia-induced rat renal proximal tubular injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(17): p. 7662-6.
414. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
415. Fukada, T., M. Hibi, Y. Yamanaka, M. Takahashi-Tezuka, et al., *Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis*. *Immunity*, 1996. **5**(5): p. 449-60.
416. Kasperek, G.J. and R.D. Snider, *Total and myofibrillar protein degradation in isolated soleus muscles after exercise*. *Am J Physiol*, 1989. **257**(1 Pt 1): p. E1-5.
417. Attaix, D., L. Mosoni, D. Dardevet, L. Combaret, et al., *Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(10): p. 1962-73.
418. Vazeille, E., L. Slimani, A. Claustre, H. Magne, et al., *Curcumin treatment prevents increased proteasome and apoptosome activities in rat skeletal muscle during reloading and improves subsequent recovery*. *J Nutr Biochem*, 2012. **23**(3): p. 245-51.
419. Yimlamai, T., S.L. Dodd, S.E. Borst, and S. Park, *Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway*. *J Appl Physiol*, 2005. **99**(1): p. 71-80.

420. Dupont-Versteegden, E.E., J.D. Fluckey, M. Knox, D. Gaddy, et al., *Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats*. J Appl Physiol, 2006. **101**(1): p. 202-12.
421. Sadiq, F., D.G. Hazlerigg, and M.A. Lomax, *Amino acids and insulin act additively to regulate components of the ubiquitin-proteasome pathway in C2C12 myotubes*. BMC Mol Biol, 2007. **8**: p. 23.
422. Busquets, S., B. Alvarez, M. Llovera, N. Agell, et al., *Branched-chain amino acids inhibit proteolysis in rat skeletal muscle: mechanisms involved*. J Cell Physiol, 2000. **184**(3): p. 380-4.
423. Pedersen, B.K., A. Steensberg, and P. Schjerling, *Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects*. J Physiol, 2001. **536**(Pt 2): p. 329-37.
424. Rennie, M.J., H. Wackerhage, E.E. Spangenburg, and F.W. Booth, *Control of the size of the human muscle mass*. Annu Rev Physiol, 2004. **66**: p. 799-828.
425. Tamaki, T., A. Akatsuka, M. Tokunaga, K. Ishige, et al., *Morphological and biochemical evidence of muscle hyperplasia following weight-lifting exercise in rats*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 1): p. C246-56.
426. Williamson, D., P. Gallagher, M. Harber, C. Hollon, et al., *Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle*. J Physiol, 2003. **547**(Pt 3): p. 977-87.
427. McCarthy, J.J., J. Mula, M. Miyazaki, R. Erfani, et al., *Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle*. Development, 2011. **138**(17): p. 3657-66.
428. Akira, S., T. Taga, and T. Kishimoto, *Interleukin-6 in biology and medicine*. Adv Immunol, 1993. **54**: p. 1-78.
429. Steensberg, A., M.K. Dalsgaard, N.H. Secher, and B.K. Pedersen, *Cerebrospinal fluid IL-6, HSP72, and TNF-alpha in exercising humans*. Brain Behav Immun, 2006. **20**(6): p. 585-9.
430. Schindler, R., J. Mancilla, S. Endres, R. Ghorbani, et al., *Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF*. Blood, 1990. **75**(1): p. 40-7.
431. Steensberg, A., C.P. Fischer, C. Keller, K. Moller, et al., *IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(2): p. E433-7.
432. Spangenburg, E.E. and F.W. Booth, *Multiple signaling pathways mediate LIF-induced skeletal muscle satellite cell proliferation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C204-11.
433. Fukada, T., T. Ohtani, Y. Yoshida, T. Shirogane, et al., *STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition*. EMBO J, 1998. **17**(22): p. 6670-7.
434. Yan, Z., S. Choi, X. Liu, M. Zhang, et al., *Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8826-36.
435. Olsen, S., P. Aagaard, F. Kadi, G. Tufekovic, et al., *Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training*. J Physiol, 2006. **573**(Pt 2): p. 525-34.
436. Shea, K.L., W. Xiang, V.S. LaPorta, J.D. Licht, et al., *Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(2): p. 117-29.
437. Chakkalakal, J.V., K.M. Jones, M.A. Basson, and A.S. Brack, *The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence*. Nature, 2012. **490**(7420): p. 355-60.

438. Fuller, S.J., J. Gillespie-Brown, and P.H. Sugden, *Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18146-52.
439. Lange, S., F. Xiang, A. Yakovenko, A. Vihola, et al., *The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1599-603.
440. Burniston, J.G., W.A. Clark, L.B. Tan, and D.F. Goldspink, *Dose-dependent separation of the hypertrophic and myotoxic effects of the beta(2)-adrenergic receptor agonist clenbuterol in rat striated muscles*. Muscle Nerve, 2006. **33**(5): p. 655-63.
441. Burniston, J.G., L. McLean, R.J. Beynon, and D.F. Goldspink, *Anabolic effects of a non-myotoxic dose of the beta2-adrenergic receptor agonist clenbuterol on rat plantaris muscle*. Muscle Nerve, 2007. **35**(2): p. 217-23.
442. Otani, K., D.H. Han, E.L. Ford, P.M. Garcia-Roves, et al., *Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 20915-20.
443. Dreyer, H.C., M.J. Drummond, B. Pennings, S. Fujita, et al., *Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(2): p. E392-400.
444. Anthony, J.C., T.G. Anthony, and D.K. Layman, *Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise*. J Nutr, 1999. **129**(6): p. 1102-6.
445. Holecek, M., T. Muthny, M. Kovarik, and L. Sispera, *Proteasome inhibitor MG-132 enhances whole-body protein turnover in rat*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(1): p. 38-42.
446. Jamart, C., J.M. Raymackers, G. Li An, L. Deldicque, et al., *Prevention of muscle disuse atrophy by MG132 proteasome inhibitor*. Muscle Nerve, 2011. **43**(5): p. 708-16.
447. Kisselev, A.F. and A.L. Goldberg, *Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates*. Chem Biol, 2001. **8**(8): p. 739-58.
448. Dick, L.R., A.A. Cruikshank, L. Grenier, F.D. Melandri, et al., *Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7273-6.
449. Fenteany, G., R.F. Standaert, W.S. Lane, S. Choi, et al., *Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin*. Science, 1995. **268**(5211): p. 726-31.
450. Fang, C.H., J.J. Wang, S. Hobler, B.G. Li, et al., *Proteasome blockers inhibit protein breakdown in skeletal muscle after burn injury in rats*. Clin Sci (Lond), 1998. **95**(2): p. 225-33.
451. Blommaart, E.F., U. Krause, J.P. Schellens, H. Vreeling-Sindelarova, et al., *The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes*. Eur J Biochem, 1997. **243**(1-2): p. 240-6.
452. Seglen, P.O. and P.B. Gordon, *3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 1889-92.
453. Wu, Y.T., H.L. Tan, G. Shui, C. Bauvy, et al., *Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase*. J Biol Chem, 2010. **285**(14): p. 10850-61.
454. Kiffin, R., C. Christian, E. Knecht, and A.M. Cuervo, *Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(11): p. 4829-40.
455. Carmeli, E. and T.G. Haimovitch, *The expression of MMP-2 following immobilization and high-intensity running in plantaris muscle fiber in rats*. ScientificWorldJournal, 2006. **6**: p. 542-50.

456. Lindmo, K. and H. Stenmark, *Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 4): p. 605-14.
457. Pattingre, S., A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, et al., *Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy*. Cell, 2005. **122**(6): p. 927-39.
458. Liang, C., P. Feng, B. Ku, I. Dotan, et al., *Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(7): p. 688-99.
459. Jung, C.H., S.H. Ro, J. Cao, N.M. Otto, et al., *mTOR regulation of autophagy*. FEBS Lett, 2010. **584**(7): p. 1287-95.
460. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 67-93.
461. Kim, J., Y.C. Kim, C. Fang, R.C. Russell, et al., *Differential Regulation of Distinct Vps34 Complexes by AMPK in Nutrient Stress and Autophagy*. Cell, 2013. **152**(1-2): p. 290-303.
462. Wek, S.A., S. Zhu, and R.C. Wek, *The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4497-506.
463. Sancak, Y., T.R. Peterson, Y.D. Shaul, R.A. Lindquist, et al., *The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1*. Science, 2008. **320**(5882): p. 1496-501.
464. Han, J.M., S.J. Jeong, M.C. Park, G. Kim, et al., *Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway*. Cell, 2012. **149**(2): p. 410-24.
465. Jiang, H.Y. and R.C. Wek, *Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 14189-202.
466. Ding, Q., E. Dimayuga, W.R. Markesbery, and J.N. Keller, *Proteasome inhibition induces reversible impairments in protein synthesis*. FASEB J, 2006. **20**(8): p. 1055-63.

BALANCE PROTEIQUE ET PHENOTYPE MUSCULAIRE

Le maintien de la masse musculaire est étroitement lié à la balance entre la synthèse et la dégradation des protéines. L'exercice physique est un puissant régulateur de la balance protéique et plus particulièrement l'exercice en résistance. S'intéresser à la balance protéique après un exercice s'inscrit dans une compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant aux phénomènes d'hypertrophie et/ou d'atrophie musculaire. Nos travaux mettent en évidence que l'hypertrophie obtenue dans le muscle FDP après 10 semaines d'un entraînement en résistance chez le rat, est en lien avec l'activation chronique de la voie IL-6/STAT3 après chaque exercice aigu, en partie au sein du pool de cellules satellites activées. En phase proliférative, les cellules dont la voie de signalisation STAT1/STAT3 est activée, répriment l'expression des facteurs myogéniques comme MyoD et retournent ainsi à l'état quiescent, concourant à augmenter le pool de réserve. Ces mécanismes participent à la synthèse protéique par l'apport de nouveau matériel génétique au sein des fibres musculaires conduisant à une augmentation de leur surface de section ainsi qu'à leur conversion phénotypique avec l'entraînement. L'exercice en résistance favorisant la protéolyse, nos travaux ont cherché à caractériser les systèmes protéolytiques (autophagique-lysosomal, ubiquitine-protéasome) impliqués dans la balance protéique post-exercice. Les marqueurs moléculaires étudiés (activités enzymatiques du protéasome et de la cathepsine L, expression protéique et génique de LC3B, des E3 ligases...) ne permettent pas d'expliquer clairement les +30% de protéolyse obtenus une heure après des contractions excentriques sur muscle EDL isolé de rat en condition à jeun. Des perspectives d'étude des systèmes des calpains, des caspases et/ou des métalloprotéases matricielles sont alors à envisager.

Mots clés : exercice, hypertrophie, IL-6, cellules satellites, autophagique-lysosomal, ubiquitine-protéasome

PROTEIN BALANCE AND MUSCULAR PHENOTYPE

The maintain of muscle mass is closely controlled by protein synthesis and degradation balance. Physical activity and mainly resistance exercise is a powerful stimulus to positive muscle protein balance. To understand how protein balance is regulated after exercise, cellular and molecular mechanisms leading to muscular hypertrophy and/or atrophy have to be elucidated. Our works point out that FDP muscular hypertrophy after 10 weeks of resistance training in rat is partly due to the chronically activation of IL-6/STAT3 signaling pathway, occurring in the activated satellite cell pool, after each single exercise bout. Once activated and engaged in the myogenic program, cells in which STAT1/STAT3 signaling pathway is activated, could downregulate MyoD and return to a quiescent state, leading to increase satellite cell reserve's pool. These events participate to enhance protein synthesis by the incorporation of new genetic material into muscle fiber leading to increase their cross sectional area and phenotypic shift after training. As resistance exercise increases proteolysis, our works attempt to characterize the proteolysis systems (lysosomal-autophagic, ubiquitin-proteasome) involved in protein balance after exercise. The molecular markers measured (chymotrypsin-like and cathepsin L activities, protein and gene expressions of LC3B, E3 ligases...) could not explain the +30% of proteolysis obtained one hour after resistance eccentric contractions on EDL muscle of starved rats. Further studies based on calpains, caspases and metalloproteinase activities and/or expressions should bring us valuable information.

Keywords : exercise, hypertrophy, IL-6, satellite cells, lysosomal-autophagic, ubiquitin-proteasome

UMR0866 DMEM Dynamique Musculaire et
Métabolisme

INRA - CAMPUS SUPAGRO

2 place Viala Bât. 22

34060 MONTPELLIER CEDEX 2