



# THESE DE DOCTORAT

Présentée par

# **Delphine DUTEIL**

En vue de l'obtention du grade de

Docteur en Sciences de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du vivant Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

# Rôle du récepteur des glucocorticoïdes (GR) et du facteur intermédiaire de transcription (TIF2) dans le muscle squelettique chez la souris adulte.

Soutenue publiquement le 24/09/2010 devant le jury :

Directeur de thèse : Co-directeur de thèse :

- Examinateur interne :
- Rapporteur externe :
- Rapporteur externe :

Examinateur externe :

Dr. Daniel Metzger Pr. Pierre Chambon Dr. Jocelyn Laporte Pr. Vincent Laudet Pr. Roland Schule Dr. Rüdiger Rudol

#### <u>REMERCIEMENTS</u>

Je souhaite avant tout remercier les membres de mon jury, le Professeur Vincent Laudet, le Docteur Jocelyn Laporte, le Docteur Joffrey Zoll, le Docteur Dr. Rüdiger Rudolf et le Professeur Roland Schule, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie l'Association Française contre les Myopathies, la Fondation pour la recherche médicale et l'Association pour la Recherche à l'IGBMC d'avoir financé mes travaux.

Je remercie le Docteur Daniel Metzger et le Professeur Pierre Chambon pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans leur laboratoire, pour leurs conseils et leur soutien.

Je tiens à remercier la fine équipe Metzger, présente, passée ou future (enfin future un peu moins parce que c'est eux qui devraient me remercier, principalement Fatillou, Hakan Badge et Miss Dumdum, n'est ce pas jeunes gens) qui m'a supportée pendant plus de 4 ans (et c'est pas peu dire). Pour le passé, je fais de gros bisous à Michal [dont le « HE ! Salut les filles (avé l'accent) vous venez boire un coup ce soir » nous a toujours bien amusées] [hein Chamby, c'était plutôt he ! pouet pouet les filles ; )], à Susan, une des seules américaines à apprécier les produits locaux comme le bon fromage qui pue et le pinard (merci pour les soirées passées entre autres à regarder des films débiles du style Dodge Ball, du grand nanar), Koumar (dont j'ai jamais compris un traître mot), Zhangounet (tutulututu), Ying qui a failli nous accoucher au labo (reste à ta maison !) et Ales. Parmi les gens encore présents, je remercie plus particulièrement « Laetitia grand » et « Laetitia petit », Pierre, el Rocco (Rocho pour les intimes, merci pour les « qPCR de protéines », ta reverse traduction s'est avérée précieuse) et le Pietre (« Si Prof Si »). Merci aussi à Manu avec qui j'ai pu (un peu au moins) reparler espagnol, Krishna, Milan, Atish, Melle Hua et JM (B, pas E) qui a quand même bien peiné avec ces vilains ChIP et les Dicer. Désolée pour ceux que j'oublie, c'est pas de la méchanceté, c'est juste que je suis un peu creuse.

Merci à toutes les personnes de l'IGBMC ou de l'ICS qui m'ont permis de réaliser cette thèse, plus particulièrement Agouna, Martine, Cindy et Natacha pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur aide précieuse dès que j'avais besoin de quelque chose. Désolée si je vous ai fait faire des choses ignobles à ces pauvres petites bêêêtes ! Duff Je remercie aussi Jojo qui m'a quand même fait gros de manips avec Jamal et la « petite » Samia (toujours plus grande que moi...). Désolée Joe pour le paintball, mais la prochaine fois on va te mettre la pattée à ce que tu veux (la pétanque, le tarot, du catch féminin, sisi tu mettras ta jupette et pis ça fera l'affaire).

Bon y pi y en a une je sais pas si je la remercie mais bon, je pense que je vais le faire quand même sinon elle va ENCORE me frapper, il s'agit du Professeur ChambRon, la seule qui a le droit de m'appeler DUTEIL, les autres, ça me vexe. Que dire de toi, surtout depuis que t'as soutenu, tu te la pètes grave comme disent les jeunes, parce que de mon temps, on parlait mieux que ça (on portait un oignon à la ceinture, c'était la mode en ce temps là...). Enfin voila (comme dit), merki d'avoir si souvent mis mes bestioles à jeun toto le matin, et pour toutes les fois où on « bossait » dur (pendant les IPGTT par exemple). Note que je vais éviter de remercier la folle-dingue. Laquelle me diras-tu ? et ben toutes voilà, y en marre des folles-dingues ! Bon je rallonge un peu la sauce parce que tu vas râler si j'en écris aussi long à ton propos que pour les mulots. Bon ben Chamby, je m'excuse d'avoir oublié autant de fois le café sur la table de la cuisine. En tout cas, si on a pas fait autre chose, on se sera bien marrées. Pour les autres commentaires, CF ton book de thèse. Je garde le dossier « blanquette » à ta disposition (gnahaha).

Merci aux mulots, mais pas aux PPARβ à Céline que c'est quand même de la belle saloperie, ni aux PPARβ/TIF2 qui l'auront gnaquée trois fois pendant la même IPIST. Merci à Biscotte (qui est devenue toute moche mais faut pas la tuer !), Wallace et Gromit (adieu Wallace, tu auras eu une belle vie, que du bonus), aux hydrocéphales qui plaisent tant à Laetitia, à Crouteuse, Queue courte, Queue tordue et aux pâtés. Désolée de vous avoir martyrisées, mais vous servez la science et c'est votre joie.

Je remercie aussi le père Castor (alias le Peck) pour toutes ses belles histoires, M. Tshirt, Blenche Nége et le nain unique.

Le père Manesse pour m'avoir regardé les ischions. Jo qui prouve qu'il y a toujours plus malheureux que soit.

Je remercie mes parents pour tout ce qu'ils ont toujours fait pour moi, alors que c'était pas forcément un cadeau. Merci de m'avoir soutenue jusqu'à la fin de mes études et d'avoir essayé de relire cette vilaine thèse. Maman, merci aussi de nous avoir fourni en médocs (on en a toujours besoin) et Papounet, ne va pas dans la forêt !

Merci à mon chéri (oui je sais ça fait cucu la praline) déjà d'être venu habiter ici que c'était pas évident et d'avoir eu ton poste. Merci aussi de m'avoir supportée avec mes plaintes récurrentes.

Et maintenant, quelques citations : « la trompe humaine, tu la tiens dans ta main »,

« tuptulup tptulup tptulup tptulup tptulup tptulup tptulup, it's not unusual to be loved by anyone... »

« t'as qu'à mettre blabli blabla »

« HE ! QU'EST CE QUE PISSE ? »

« HO BORDEL DUTEIL, TU VAS RECOPIER JUSQU'A MES REMERCIEMENTS ? »

« c'est pas parce qu'on connaît qu'on sait »

« on s'fume un joint ? » « NON ! »

« et même que une fois, y a un panda en Australie qui m'a baissé mon short ».

#### <u> Résumé :</u>

Le muscle squelettique est un tissu dynamique ayant la capacité de réguler sa taille et son activité en réponse à différents stimuli extérieurs. Mon travail de thèse a principalement porté sur l'étude d'un récepteur nucléaire, le récepteur des glucocorticoïdes (GR) et de l'un de ces co-régulateur, le facteur intermédiaire de transcription TIF2, dans ce tissu. Ainsi afin de mieux comprendre le rôle de GR et de TIF2 dans les myofibres, nous avons généré des souris dans lesquelles ils sont sélectivement invalidés dans le muscle squelettique de souris adultes (souris GR<sup>(i)skm-/-</sup> et TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>).

La première partie de ma thèse a démontré que l'augmentation du découplage mitochondrial dans les myofibres protège les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> de la diminution des capacités oxydatives induite par la sédentarité, retarde le développement du diabète de type 2 et atténue la prise de poids induite par un régime hypercalorique. De plus, nos résultats démontrent que SRC-1 et TIF2 peuvent moduler l'expression de la protéine découplante UCP3 de manière antagoniste, et que l'augmentation des niveaux de SRC-1 dans les myofibres des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> est impliquée de manière critique dans la mise en place des changements métaboliques de ces souris.

La seconde partie de ma thèse a montré que les souris GR<sup>(i)skm-/-</sup> ont une masse et une force musculaire plus importantes que des souris contrôles, du fait d'une hyperactivation des voies anaboliques. Par ailleurs, ces animaux ne subissent pas l'atrophie musculaire induite par un traitement à la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, ou par une mise à jeun prolongée, montrant que la fonte musculaire est strictement contrôlée par GR dans les myofibres.

Cette étude nous a permis d'éclaircir les mécanismes moléculaires et cellulaires régulant l'homéostasie musculaire et ouvriront de nouvelles voies dans le traitement des myopathies.

#### Abstract:

Skeletal muscle is a dynamic tissue that has the capacity to regulate its size in response to a variety of external cues. My thesis work focused on the role of a nuclear receptor, the glucocorticoid receptor (GR) and of one of it co-regulator, the transcriptional intermediary factor TIF2, in this tissue. To improve our knowledge concerning the role of GR and TIF2 in myofibers, we generated mice in which GR or TIF2 are selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adult stage (GR<sup>(i)skm-/-</sup> and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice).

The first part of this work demonstrated that increased mitochondrial uncoupling in skeletal muscle myocytes protected these mice from decreased muscle oxidative capacities induced by sedentariness, delayed the development of type 2 diabetes and attenuated high caloric diet-induced obesity. Moreover, our results demonstrate that SRC-1 and TIF2 can modulate the expression of the uncoupling protein UCP3 in an antagonistic manner, and that enhanced SRC-1 levels in TIF2-deficient myofibers are critically involved in the metabolic changes of TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

The second part of this work demonstrated that GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice skeletal muscle mass and strength were increased, due to anabolic pathway enhancement. Moreover, such mice are protected against dexamethasone-induced muscle catabolism and partially resistant to fasting-induced muscle atrophy, thus demonstrating that myofiber GR plays a major role in coordinating degradation of muscle proteins.

This work highlighted molecular mechanisms regulating muscle homeostasis and should provide new insights in treatment of muscular disorders.

# Liste des abréviations :

11β-HSD: 11-beta-hydroxysteroid
dehydrogenase
4E-BP1 : eIF4E binding protein 1
A/URE : adenine/uridine-rich element
ACC : acetyl-coa carboxylase
Ac-DEVD-CHO
Ach : Acétylcholine
ACO : aconitase
ACTH : hormone adrénocorticotrope
AD1 / 2 : activation domain 1 / 2
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
AF-1 / 2 : Activation function 1 / 2
AG : Acide Gras
AIB1 : amplified in breast cancer 1 protein
AKT / PKB : protein kinase B
AMP : Adénosine monophosphate
AMPK : AMP activated protein kinase
ANT : adenine nucleotide translocator
AOX1 : aldehyde oxidase 1
AP1 / 2 : activator protein 1 / 2
AR : Récepteur des androgènes
ARNi : acide ribonucléique interférent
ARNm : Acide ribonucléique messager
ARNt : acide ribonucléique de transfert
ATF4 : activating transcription factor 4
ATG : autophagy-related
ATP : Adénosine triphosphate
AVP : arginine vasopressine
BAT : tissu adipeux brun (brown adipose
tissue)
BCL3 : B-cell leukemia/lymphoma 3
BMCPT: brain mitochondriai carrier
BNIP3 : BCL2/adenovirus E1B interacting
protein 3
C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein
CamK : Calmoduline kinase
CaN : Calcineurine
CARM : coactivator-associated arginine
methyltransferase

CBG : corticosteroid binding globulin ou
CBP/p200 : CPER binding protoin
CoA · Coenzyme A
CDX : Cytochionie c oxidase
Cr : Créatine
Cre : enzyme Cre recombinase
CREB : cAMP responsive element binding
protein 1
CreER'': enzyme Cre recombinase
fusionnee au LBD du ER mute (12)
CRF : corticolibérine
DBD : DNA binding domain
DRIP: Vitamin D3 receptor-interacting
protein complex
LI, EZ, ES. UDIQUIUII-activating enzyme,
eIE2B / 4E : eukarvotic initiation factor 2B /
4F
ER : Récepteur des œstrogènes
ETC : electron transport chain
FA : fatty acid (acide gras)
FABP : Plasma membrane fatty acid
binding protein
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FAT : Fatty acid translocase
FATP : Fatty acid transport protein
F-box : forckhead-box
FOXO1 / 3 : forkhead box O1 / 3
G3P : Glyceraldehyde 3-phosphate
GABARAP : gamma-aminobutyric acid
receptor associated protein
GATE16 / GABARAPL2 : GABA(A)
receptor-associated protein-like 2
GC : Glucocorticoïde
GCN5 : general control of amino-acid
synthesis
GDP : Guanosine diphosphate
GFP : green fluorescent protein

transporter 4 GR : Récepteur des glucocorticoïdes GRdim : récepteur des glucocorticoïdes possédant une mutation dans son domaine de dimérisation GRE : glucocorticoid responsive element (nGRE : negative GRE) GRIP1 : glucocorticoid receptor-interacting protein 1 GSK3β : glycogen synthase kinase 3 beta GTP : Guanosine triphosphate H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène HAT : Histone acétyltransférase HDAC : Histone désacétylase HLH : helix loop helix (hélice tour hélice) HMM : Heavy meromyosin HMT : Histone méthyltransférase HNS : portion hypothalamo- neurohypophysaire HPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalien HSP : Heat shock protein IGF-I : Insulin-like growth factor-I IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-I IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-I IGF-I insulin-like growth factor-I IGF-I : intrapéritoneal insulin sensitive test IPIST : intrapéritoneal glucose tolerance test IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 Ight chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	GLUT4 : insulin-responsive glucose
GR : Récepteur des glucocorticoïdes   GRdim : récepteur des glucocorticoïdes   possédant une mutation dans son domaine   de dimérisation   GRE : glucocorticoïd responsive element   (nGRE : negative GRE)   GRIP1 : glucocorticoïd receptor-interacting   protein 1   GSK3β : glycogen synthase kinase 3 beta   GTP : Guanosine triphosphate   H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène   HAT : Histone acétyltransférase   HDAC : Histone désacétylase   HLH : helix loop helix (hélice tour hélice)   HMM : Heavy meromyosin   HMT : Histone méthyltransférase   HNS : portion hypothalamo-   neurohypophysaire   HPA : axe hypothalamo-hypophyso-   corticosurrénalien   HSP : Heat shock protein   IGF-I : Insulin-like growth factor-I   IGF-Iea, b, c : Insulin-like growth factor-I   IGF-I = insulin-like growth factor-I   IGFT : intrapéritoneal insulin sensitive test   INOS : inducible nitric oxyde synthase   IPGTT : intrapéritoneal insulin sensitive test   IxB : nuclear factor of kappa light chain   gene enhancer in B-cells inhibitor, beta   JNK : JUN N-terminal kinase   JRE	transporter 4
GRdim : récepteur des glucocorticoïdes possédant une mutation dans son domaine de dimérisation   GRE : glucocorticoid responsive element (nGRE : negative GRE)   GRIP1 : glucocorticoid receptor-interacting protein 1   GSK3β : glycogen synthase kinase 3 beta   GTP : Guanosine triphosphate   H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène   HAT : Histone acétyltransférase   HDAC : Histone désacétylase   HLH : helix loop helix (hélice tour hélice)   HMM : Heavy meromyosin   HMT : Histone méthyltransférase   HNS : portion hypothalamo- neurohypophysaire   HPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalien   HSP : Heat shock protein   IGF-I : Insulin-like growth factor-I   IGF-Iea, b, c : Insulin-like growth factor-I   IGF-I : Insulin-like growth factor-I   IGFT : intrapéritoneal insulin sensitive test   INOS : inducible nitric oxyde synthase   IPGTT : intrapéritoneal insulin sensitive test   IxB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta   JNK : JUN N-terminal kinase   JRE : JNK responsive element   KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1   KO : Knock out   LAMP : lysosomal-associated protein 1   light chain 3 <t< td=""><td>GR : Récepteur des glucocorticoïdes</td></t<>	GR : Récepteur des glucocorticoïdes
possédant une mutation dans son domaine de dimérisation   GRE : glucocorticoid responsive element (nGRE : negative GRE)   GRIP1 : glucocorticoid receptor-interacting protein 1   GSK3β : glycogen synthase kinase 3 beta   GTP : Guanosine triphosphate   H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène   HAT : Histone acétyltransférase   HDAC : Histone désacétylase   HLH : helix loop helix (hélice tour hélice)   HMM : Heavy meromyosin   HMT : Histone méthyltransférase   HNS : portion hypothalamo- neurohypophysaire   HPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalien   HSP : Heat shock protein   IGF-I : Insulin-like growth factor-I   IGF-I is noulin-like growth factor-I   IGF-I : Insulin-like growth factor-I   IGFT : intrapéritoneal insulin sensitive test   INOS : inducible nitric oxyde synthase   IPGTT : intrapéritoneal insulin sensitive test   INK : JUN N-terminal kinase   JRE : JNK responsive element   KMCP1 : kidney mitochondrial carrier   protein 1   KO : Knock ou	GRdim : récepteur des glucocorticoïdes
GRE : glucocorticoid responsive element (nGRE : negative GRE)   GRIP1 : glucocorticoid receptor-interacting protein 1   GSK3β : glycogen synthase kinase 3 beta   GTP : Guanosine triphosphate   H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène   HAT : Histone acétyltransférase   HDAC : Histone désacétylase   HLH : helix loop helix (hélice tour hélice)   HMM : Heavy meromyosin   HMT : Histone méthyltransférase   HNS : portion hypothalamo- neurohypophysaire   HPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalien   HSP : Heat shock protein   IGF-I : Insulin-like growth factor-I   IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-I   IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-I   IGFT : intrapéritoneal insulin sensitive test   INOS : inducible nitric oxyde synthase   IPGTT : intrapéritoneal insulin sensitive test   IxB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta   JNK : JUN N-terminal kinase   JRE : JNK responsive element   KMCP1 : kidney mitochondrial carrier   protein 1   KOC Knock out   LAMP : lysosomal-associated membrane   protein   LBD : Ligand binding domain   LC3 : microtubule-associated pr	possédant une mutation dans son domaine de dimérisation
(nGRE : negative GRE)GRIP1 : glucocorticoid receptor-interacting protein 1GSK3 $\beta$ : glycogen synthase kinase 3 betaGTP : Guanosine triphosphateH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogèneHAT : Histone acétyltransféraseHDAC : Histone désacétylaseHLH : helix loop helix (hélice tour hélice)HMM : Heavy meromyosinHMT : Histone méthyltransféraseHNS : portion hypothalamo- neurohypophysaireHPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-I: Insulin-like growth factor-I IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-I IGF is nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1KO : Knock outLAMP : Iysosomal-associated membrane proteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3LIMP : lyportein lipase	GRE : glucocorticoid responsive element
GRIP1 : glucocorticoid receptor-interacting protein 1GSK3 $\beta$ : glycogen synthase kinase 3 betaGTP : Guanosine triphosphate $H_2O_2$ : peroxyde d'hydrogèneHAT : Histone acétyltransféraseHDAC : Histone désacétylaseHLH : helix loop helix (hélice tour hélice)HMM : Heavy meromyosinHMT : Histone méthyltransféraseHNS : portionhypothalamo-neurohypophysaireHPA : axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-I : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance testIPIST : intrapéritoneal insulin sensitive testIKB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membrane proteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1light chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	(nGRE : negative GRE)
protein 1GSK3β : glycogen synthase kinase 3 betaGTP : Guanosine triphosphate $H_2O_2$ : peroxyde d'hydrogèneHAT : Histone acétyltransféraseHDAC : Histone désacétylaseHLH : helix loop helix (hélice tour hélice)HMM : Heavy meromyosinHMT : Histone méthyltransféraseHNS : portion hypothalamoneurohypophysaireHPA : axe hypothalamo-hypophysocorticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal glucose tolerancetestJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrierprotein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membraneproteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1light chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	GRIP1 : glucocorticoid receptor-interacting
GSK3β : glycogen synthase kinase 3 betaGTP : Guanosine triphosphateH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogèneHAT : Histone acétyltransféraseHDAC : Histone désacétylaseHLH : helix loop helix (hélice tour hélice)HMM : Heavy meromyosinHMT : Histone méthyltransféraseHNS : portion hypothalamo- neurohypophysaireHPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-IE a, b, c : Insulin-like growth factor-I IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance testIPIST : intrapéritoneal insulin sensitive testJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1KO : Knock outLAMP : Iysosomal-associated membrane proteinLBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1LMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	protein 1
GTP : Guanosine triphosphateH2O2 : peroxyde d'hydrogèneHAT : Histone acétyltransféraseHDAC : Histone désacétylaseHLH : helix loop helix (hélice tour hélice)HMM : Heavy meromyosinHMT : Histone méthyltransféraseHNS : portion hypothalamo- neurohypophysaireHPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-I: Insulin-like growth factor-I IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal insulin sensitive testIRF : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1KO : Knock outLAMP : Iysosomal-associated membrane proteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1LIMP : Iysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	GSK3 $\beta$ : glycogen synthase kinase 3 beta
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogèneHAT : Histone acétyltransféraseHDAC : Histone désacétylaseHLH : helix loop helix (hélice tour hélice)HMM : Heavy meromyosinHMT : Histone méthyltransféraseHNS : portion hypothalamo- neurohypophysaireHPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance testINS : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membrane proteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1IIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	GTP : Guanosine triphosphate
HAT : Histone acétyltransféraseHDAC : Histone désacétylaseHLH : helix loop helix (hélice tour hélice)HMM : Heavy meromyosinHMT : Histone méthyltransféraseHNS : portion hypothalamo- neurohypophysaireHPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-I : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal insulin sensitive testIkB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1KO : Knock outLAMP : Iysosomal-associated membrane proteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1Ight chain 3LIMP : Iysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène
HDAC : Histone désacétylaseHLH : helix loop helix (hélice tour hélice)HMM : Heavy meromyosinHMT : Histone méthyltransféraseHNS : portion hypothalamo- neurohypophysaireHPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-I : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IIGF : Inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance testIPIST : intrapéritoneal insulin sensitive testIkB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membrane proteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1LMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	HAT : Histone acétyltransférase
HLH : helix loop helix (hélice tour hélice)HMM : Heavy meromyosinHMM : Histone méthyltransféraseHNS : portion hypothalamo- neurohypophysaireHPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-II : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance testIPIST : intrapéritoneal insulin sensitive testIkB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membrane proteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	HDAC : Histone désacétylase
HMM : Heavy meromyosinHMT : Histone méthyltransféraseHNS : portionhypothalamo-neurohypophysaireHPA : axeHPA : axehypothalamo-hypophyso-corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-I : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal glucose tolerancetestIPIST : intrapéritoneal insulin sensitive testIkB : nuclear factor of kappa light chaingene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrierprotein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membraneproteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1light chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	HLH : helix loop helix (hélice tour hélice)
HMT : Histone méthyltransféraseHNS :portionhypothalamo-neurohypophysaireHPA :axehypothalamo-hypophyso-corticosurrénalienHSP : Areat shock proteinIGF-I :Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c :Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT :intrapéritoneal glucose tolerancetestIPIST : intrapéritoneal insulin sensitive testIkB : nuclear factor of kappa light chaingene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrierKO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membraneLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1LIMP : lysosome membrane proteinLIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	HMM : Heavy meromyosin
HNS : portion hypothalamo- neurohypophysaire HPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalien HSP : Heat shock protein IGF-I : Insulin-like growth factor-I IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor- IEa, b, c IL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10 iNOS : inducible nitric oxyde synthase IPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance test IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test IkB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta JNK : JUN N-terminal kinase JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	HMT : Histone méthyltransférase
neurohypophysaire HPA : axe hypothalamo-hypophyso- corticosurrénalien HSP : Heat shock protein IGF-I : Insulin-like growth factor-I IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor- IEa, b, c IL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10 iNOS : inducible nitric oxyde synthase IPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance test IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test IkB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta JNK : JUN N-terminal kinase JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : Iysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : Iysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	HNS: portion hypothalamo-
HPA :axehypothalamo-hypophyso- corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-I : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c :Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT :intrapéritoneal glucose tolerancetestIPIST : intrapéritoneal insulin sensitive testIkB :nuclear factor of kappa light chaingene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE :JNK responsive elementKMCP1 :kidney mitochondrial carrierprotein 1KO : Knock outLAMP :lysosomal-associated membraneprotein1Ight chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM :Light meromyosinLPL :lipoprotein lipase	neurohypophysaire
corticosurrénalienHSP : Heat shock proteinIGF-I : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal glucose tolerancetestIPIST : intrapéritoneal insulin sensitive testIkB : nuclear factor of kappa light chaingene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrierprotein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membraneproteinLIBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1Ight chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	HPA : axe hypothalamo-hypophyso-
HSP : Heat shock proteinIGF-I : Insulin-like growth factor-IIGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor-IEa, b, cIL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal glucose tolerancetestIPIST : intrapéritoneal insulin sensitive testIkB : nuclear factor of kappa light chaingene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrierprotein 1KO : Knock outLAMP : Iysosomal-associated membraneproteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1Iight chain 3LIMP : Iysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	corticosurrénalien
IGF-I : Insulin-like growth factor-I IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor- IEa, b, c IL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10 iNOS : inducible nitric oxyde synthase IPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance test IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test IkB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta JNK : JUN N-terminal kinase JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	HSP : Heat shock protein
IGF-IEa, b, c : Insulin-like growth factor- IEa, b, c IL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10 iNOS : inducible nitric oxyde synthase IPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance test IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test IkB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta JNK : JUN N-terminal kinase JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	IGF-I : Insulin-like growth factor-I
IEa, b, c IL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10 iNOS : inducible nitric oxyde synthase IPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance test IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test IkB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta JNK : JUN N-terminal kinase JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	IGF-IEa, b, c: Insulin-like growth factor-
IL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 / 10 iNOS : inducible nitric oxyde synthase IPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance test IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test IkB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta JNK : JUN N-terminal kinase JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	IEa, b, c
10   iNOS : inducible nitric oxyde synthase   IPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance   test   IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test   IkB : nuclear factor of kappa light chain   gene enhancer in B-cells inhibitor, beta   JNK : JUN N-terminal kinase   JRE : JNK responsive element   KMCP1 : kidney mitochondrial carrier   protein 1   KO : Knock out   LAMP : lysosomal-associated membrane   protein   LBD : Ligand binding domain   LC3 : microtubule-associated protein 1   light chain 3   LIMP : lysosome membrane protein   LMM : Light meromyosin   LPL : lipoprotein lipase	IL1 / 4 / 6 / 8 / 10 : interleukine 1 / 4 / 6 / 8 /
iNOS : inducible nitric oxyde synthaseIPGTT : intrapéritoneal glucose tolerancetestIPIST : intrapéritoneal insulin sensitive testI\kappa B: nuclear factor of kappa light chaingene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrierprotein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membraneproteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1light chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	10
IPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance test IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test I $\kappa$ B : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta JNK : JUN N-terminal kinase JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	iNOS : inducible nitric oxyde synthase
test IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test $I \ltimes B$ : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta JNK : JUN N-terminal kinase JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	IPGTT : intrapéritoneal glucose tolerance
IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test $I\kappa B$ : nuclear factor of kappa light chaingene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrierprotein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membraneproteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1light chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	test
IkB : nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta   JNK : JUN N-terminal kinase   JRE : JNK responsive element   KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1   KO : Knock out   LAMP : lysosomal-associated membrane protein   LBD : Ligand binding domain   LC3 : microtubule-associated protein 1   light chain 3   LIMP : lysosome membrane protein   LMM : Light meromyosin   LPL : lipoprotein lipase	IPIST : intrapéritoneal insulin sensitive test
gene enhancer in B-cells inhibitor, betaJNK : JUN N-terminal kinaseJRE : JNK responsive elementKMCP1 : kidney mitochondrial carrierprotein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membraneproteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1light chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	IkB: nuclear factor of kappa light chain
JNK : JUN N-terminal kinase JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	gene enhancer in B-cells inhibitor, beta
JRE : JNK responsive element KMCP1 : kidney mitochondrial carrier protein 1 KO : Knock out LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	JNK : JUN N-terminal kinase
KMCP1 :kidneymitochondrialcarrierprotein 1KO :Knock outLAMP :lysosomal-associatedmembraneproteinLBD :Ligand binding domainLC3 :microtubule-associatedproteinLIMP :lysosome membraneproteinLIMP :lysosome membraneproteinLPL :lipoproteinlipase	JRE : JNK responsive element
protein 1KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membrane proteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1light chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	KMCP1 : kidney mitochondrial carrier
KO : Knock outLAMP : lysosomal-associated membraneproteinLBD : Ligand binding domainLC3 : microtubule-associated protein 1light chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	protein 1
LAMP : lysosomal-associated membrane protein LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	KO : Knock out
protein   LBD : Ligand binding domain   LC3 : microtubule-associated protein 1   light chain 3   LIMP : lysosome membrane protein   LMM : Light meromyosin   LPL : lipoprotein lipase	LAMP : lysosomal-associated membrane
LBD : Ligand binding domain LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3 LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	protein
LC3 : microtubule-associated protein 1light chain 3LIMP : lysosome membrane proteinLMM : Light meromyosinLPL : lipoprotein lipase	LBD : Ligand binding domain
LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	LC3: microtubule-associated protein 1
LIMP : lysosome membrane protein LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	light chain 3
LMM : Light meromyosin LPL : lipoprotein lipase	LIMP : lysosome membrane protein
LPL : lipoprotein lipase	LMM : Light meromyosin
	LPL : lipoprotein lipase

MAFbx / Atrogin1 : muscle atrophy F-box protein
MAPK : mitogen activated protein kinase
MEF2 : Myocyte enhancer factor 2
MGF : Mechano growth factor
MHC : Myosin heavy chain
miCK : créatine kinase mitochondriale
MLC : Myosin light chain
MR : Récepteur des minéralocorticoïdes
mtADN : ADN mitochondrial
mTOR : mammalian target of rapamycin
MuRF1 : muscle ring finger protein 1
Myf5 : myogenic factor 5
MyoD : myogenic differentiation 1
NAD : Nicotinamide adénine dinucleotide
NCoA : nuclear receptor coactivator
N-CoR : nuclear receptor co-repressor
NFAT : Nuclear factor of activated T cells
NFkB : nuclear factor of kappa light chain
gene enhancer in B-cells
NLS : Nuclear localisation signal
NRF : Nuclear respiratory factor
O <sub>2</sub> : oxygène
O <sub>2</sub> -• : anion superoxyde
OH• : superoxyde d'hydroxyle
OOA : oxaloacétate
OXT : ocytocine
p/CAF : p300/CBP-associated factor
p/CIP : CBP-interacting protein
p70-S6K1: 70 kDa ribosomal protein S6
kinase 1 Partia S1 ( S2 : tâta glabulaira ( guaya da
la méromyosine lourde
Pax $3/7$ : paired box $3/7$
PCr · Phosphocréatine
PDH : Pyruvate déshydrogénase
PDK1 / 4: pyruvate dehydrogenase
kinase, isoenzyme 1 / 4
PGC1-a: Peroxisome proliferator-activated
receptor-γ coactivator 1α
Pi : Pyrophosphate
PI3K : PI3 kinase
rior: pnosphatidyIInositoi-3,4,5- triphosphate
PKA : protein kinase A

POL II : polymérase 2
POMC : proopiomélanocortine
PPARα, β, γ: récepteur activé par les
proliférateurs de peroxysomes $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$
PR : Récepteur de la progestérone
PRMT : protein arginine methyltransferase
PTEN : phosphatase and tensin homolog
PVN: noyau hypothalamique
paraventriculaire
RAC3 : receptor-associated coactivator 3
RACh : Récepteur à l'Ach
RAR : retinoic acid receptor
RD : regular diet
RDHP : Récepteur à la dihvdropyridine
REDD1 / Ddit4 : DNA-damage-inducible
transcript 4
Rel : v-rel reticuloendotheliosis viral
oncogene homolog
RN : Récepteur nucléaire
$ROR\alpha$ : retinoid-related orphan receptor-
alpha
ROS : Reactive Oxygen Species
RQ : quotient respiratoire
RS : Réticulum sarcoplasmique
RU486 : Mifepristone ; Roussel Uclaf,
composé n°486
RXR : Récepteur X des rétinoïdes
RyR : Récepteur à la ryanodine
SCD1 : stearoyl-Coenzyme A desaturase
1
SDH : succinate déshydrogénase
SERCA : Sarco (endo) plasmique
réticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
SHIP2: SH2 domain-containing inositol
phosphatase 2
SMPT (NCoP2): allonating modiator of
retinoid acid and thyroid hormone receptor

SON : noyau supra-optique
SRC : steroid receptor coactivator
SRF : serum response factor
STAT : signal transducer and activator of
transcription
SUMO : Small Ubiquitine-like mOdifier
T3 / T4 : hormones thyroïdiennes
triiodothyronine et tétraiodothyronine
TAT : tyrosine aminotransferase
Tfam : Mitochondrial transcription factor A
TG : Triglycéride
TGF $\beta$ : transforming growth factor, beta
TIF2 : transcriptional intermediary factor 2
TnC : Troponine C
TnI : Troponine I
TnT : Troponine T
TOM : translocase of outer membrane
TORC1 / 2 : mTOR complex 1 (raptor) / 2
(rictor)
TR : Récepteur des hormones
thyroïdiennes
TRAM : toll-like receptor adaptor molecule
TRAP : thyroid hormone receptor
associated protein
TSC1 / 2 : tuberous sclerosis 1 / 2
UCP : Uncoupling protein
ULK1 : unc-51-like kinase 1
UPS : ubiquitin proteasome system
VDAC : voltage-dependent anion channel
Vmax : Vitesse maximale
VO <sub>2</sub> / VCO <sub>2</sub> : volume d'oxygène inspiré /
de dioxyde de carbone produit
WAT : tissu adipeux blanc (white adipose
Xamb : activité ambulatoire
ZAP : 70 kDa zeta-associated protein

# TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	
INTRODUCTION	1
I. LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE : STRUCTURE ET FONCTIONS	3
I.1 Formation du muscle squelettique	3
	_
1.2 Structure du muscle squelettique.	5
I.2.1 Organisation anatomique du muscle squelettique	5
1.2.2 Organisation cellulaire du muscle squelettique.	6
I.2.2.1 Les Myotibrilles : appareil contractile.	6
I.2.2.1.1 Les filaments fins.	6
I.2.2.1.2 Les filaments épais.	7
I.2.2.1.3 Le sarcomère	8
I.2.2.2 Proteines de structure : cytosquelette non contractile.	8
I.2.2.3 Réticulum sarcoplasmique et tubules T.	9
I.2.3 Contrôle du processus contractile.	10
I.2.3.1 Unité motrice et jonction neuromusculaire.	10
I.2.3.2 Naissance et propagation du potentiel d'action.	10
I.2.3.3 Couplage excitation-contraction	11
I.2.3.3.1 Structure de la triade.	12
I.2.3.3.2 Libération du calcium et contraction du muscle	13
I.3 Propriétés mécaniques du muscle : production de force	14
I.3.1 Contraction musculaire : définitions.	14
I.3.2 Les relations caractéristiques de la mécanique musculaire.	15
I.3.2.1 Relation force-longueur.	15
I.3.2.2 Relation force-vitesse	15
I.3.3 Cinétique des ponts d'union.	16
I.3.4 Cycles des ponts d'union.	17
I.4 Régulation de la masse musculaire.	18
I.4.1 L'hypertrophie musculaire.	
I.4.1.1 La voie IGF-I-AKT et le contrôle de la croissance musculaire.	18
I.4.1.1.1 IGF-I	
I.4.1.1.2 AKT	19
I.4.1.2 mTOR-S6K1 et le contrôle de la synthèse protéique	20
I.4.1.2.1 mTOR.	20
I.4.1.2.2 Complexes impliquant mTOR et voies avales.	21

I.4.1.3 Les senseurs $\beta$ -adrénergiques et mécaniques	21
I.4.2 L'atrophie musculaire.	23
I.4.2.1 Conditions de développement d'une atrophie musculaire	23
I.4.2.2 Voies de signalisation diminuant la synthèse protéique.	23
I.4.2.2.1 La voie AKT/mTOR	23
I.4.2.2.2 La voie GSK3β	24
I.4.2.3 Voies de signalisation stimulant la dégradation des protéines	26
I.4.2.3.1 Les systèmes effecteurs de l'atrophie musculaire	26
I.4.2.3.2 La voie FOXO.	
I.4.2.4 Autres voies et molécules impliquées dans l'atrophie musculaire	
I.4.2.4.1 La myostatine.	
I.4.2.4.2 TNF- $\alpha$ et autres cytokines	34
I.4.2.4.3 Le stress oxydatif	34
I.4.2.4.4 La voie de signalisation NF-κB	35
I.5 Proprietes metaboliques du muscle.	
I.5.1 Propriétés des fibres musculaires.	
I.5.2 Production d'énergie par le muscle squelettique	
I.5.2.1 Metabolisme anaerobie.	
I.5.2.1.1 Hydrolyse de la phosphocreatine.	
I.5.2.1.2 Utilisation du glycogene intramusculaire.	
I.5.2.2 Metabolisme aerobie	
1.5.2.2.1 Metabolisme des hydrates de carbones.	
1.5.2.2.2 Utilisation des acides gras	41
I.5.2.2.3 La navette Malate/Aspartate.	43
I.5.2.2.4 La navette du Giycerol-3-Phosphate (G3-P).	43
1.5.3 La mitochondrie : site de production d'energie au niveau du muscle	
1.5.3.1.2. L'espace inter-membranaire.	
1.5.5. 1.5. La membrane interne.	
I.5.3.2 Distribution dans la cenule musculaire.	
1.5.5.5.2. La production de radicaux libres ouvrésés	47 47
1.5.5.5.5. La production de la dificada inpres oxygenes.	47
1.5.5.4 Les substrats energetiques de la mitochondriele	

I.5.3.5.2 Calmoduline kinase/MEF2/HDAC	50
I.5.3.5.3 Calcium et ATP	51
I.5.3.5.4 Voie des MAPK	51
I.5.3.5.5 Conséquences de l'induction de la voie AMPK.	52
I.5.3.5.6 PCG-1α/NRF1/TFAM	53
I.6 La thermogenèse musculaire.	57
I.6.1 Le découplage mitochondrial.	57
I.6.1.1 Production de chaleur.	57
I.6.1.2 Les protéines de découplage.	57
I.6.1.2.1 UCP1 et thermogenèse.	57
I.6.1.2.2 UCP2 et dépense énergétique.	59
I.6.1.2.3 UCP3, une isoforme spécifique du muscle	60
II LES RECEPTEURS NUCLEAIRES ET LES COFACTEURS TRNASCRIPTIONNELS	65
II.1 Structure et organisation fonctionnelle des récepteurs nucléaires.	65
II.2 Régulation de la transcription des gènes cibles par les RNs	68
II.2.1 Mécanismes d'action	68
II.2.2 Les co-facteurs.	68
II.2.2.1 Les co-répresseurs.	69
II.2.2.2 Les co-activateurs.	70
II.2.2.2.1 La famille des p160	70
II.2.2.2.2 CBP/p300.	70
II.2.2.3 Les co-intégrateurs.	71
II.2.3 Les modifications post-traductionnelles des RNs	71
II.2.4 Le récepteur des androgènes.	72
II.2.5 Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes $\beta$	75
III RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOÏDES ET ATROPHIE MUSCULAIRE	78
III.1 Biosynthèse et mode d'action des glucocorticoïdes.	78
III.1.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (HPA).	78
III.1.2 Les glucocorticoïdes	81
III.1.2.1 Les récepteurs intracellulaires aux glucocorticoïdes	81
III.1.2.2 Régulation de la disponibilité en glucocorticoïdes.	81
III.1.2.3 Mécanismes d'action des glucocorticoïdes	82
III.1.2.3.1 Les effets génomiques	82
III.1.2.3.2 Les effets non génomiques	84
III.1.2.4 Les actions anti-inflammatoires des glucocorticoïdes	85
III.1.2.5 Le syndrome de Cushing.	86

III.2 Régulation des mécanismes d'atrophie par les glucocorticoïdes.	88
III.2.1 Rôle des glucocorticoïdes dans l'atrophie musculaire	88
III.2.2 Caractérisation de l'atrophie induite par les glucocorticoïdes.	88
III.2.3 Mécanismes de l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes	89
III.2.3.1 Action anti-anabolique des glucocorticoïdes	89
III.2.3.2 Action catabolique des glucocorticoïdes.	89
III.2.4 Voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire induite p	ar les
glucocorticoïdes	90
III.2.4.1 FOXO	90
III.2.4.2 GSK3β	91
III.2.4.3 IGF-I	92
III.2.4.4 mTOR	92
III.2.4.5 Myostatine	93
III.2.5 Conséquences de l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes	94
III.3 Modeles murins d'invalidation de GR.	96
	98
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE	98
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE	
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE	
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs	98
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transci	98 ription.
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transce	98 ription.
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE. IV.1 Identification de la famille des SRCs. IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs. IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transci	98 ription. 100
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE. IV.1 Identification de la famille des SRCs. IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs. IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transce IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs.	98 fiption. 100 102
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE. IV.1 Identification de la famille des SRCs. IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs. IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transce IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs. IV.4.1 SRC-1	98 fiption. 100 102
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs. IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transce IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs. IV.4.1 SRC-1 IV.4.2 TIF2.	98 ription. 100 102 102 103
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transci IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs IV.4.1 SRC-1 IV.4.2 TIF2 IV.4.3 SRC-3	98 fiption. 100 102 102 103 104
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs. IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs. IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transcu IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs. IV.4.1 SRC-1 IV.4.2 TIF2. IV.4.3 SRC-3 V SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS.	98 fiption. 100 102 102 103 104 104
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transci IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs IV.4.1 SRC-1 IV.4.2 TIF2 IV.4.3 SRC-3 V SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS VI LES OBJECTIFS DE LA THESE.	98 fiption. 100 102 102 103 104 109 111
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transco IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs IV.4.1 SRC-1 IV.4.1 SRC-1 IV.4.2 TIF2 IV.4.3 SRC-3 V SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS VI LES OBJECTIFS DE LA THESE.	98 fiption. 100 102 102 103 104 109 111
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transcr IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs IV.4.1 SRC-1 IV.4.2 TIF2 IV.4.3 SRC-3 V SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS VI LES OBJECTIFS DE LA THESE. RESULTATS	98 fiption. 100 102 102 103 104 109 111
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transce IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs IV.4.1 SRC-1 IV.4.2 TIF2 IV.4.2 TIF2 IV.4.3 SRC-3 V SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS VI LES OBJECTIFS DE LA THESE	98 fiption. 100 102 102 103 104 109 111 1 stasie
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transco IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs IV.4.1 SRC-1 IV.4.2 TIF2 IV.4.3 SRC-3 V SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS VI LES OBJECTIFS DE LA THESE. RESULTATS I. Les co-régulateurs transcriptionnels TIF2 et SRC-1 régulent l'homéo énergétique en modulant la respiration mitochondriale dans les myofibres du n	98 fiption. 100 102 102 103 104 109 111 111 stasie
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transce IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs IV.4.1 SRC-1 IV.4.2 TIF2 IV.4.3 SRC-3 V SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS VI LES OBJECTIFS DE LA THESE. RESULTATS I. Les co-régulateurs transcriptionnels TIF2 et SRC-1 régulent l'homéo énergétique en modulant la respiration mitochondriale dans les myofibres du n	98 fiption. 100 102 102 103 104 109 111 111 stasie nuscle
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs. IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs. IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transco IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs. IV.4.1 SRC-1. IV.4.2 TIF2. IV.4.2 TIF2. IV.4.3 SRC-3. V SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS. VI LES OBJECTIFS DE LA THESE. RESULTATS. I. Les co-régulateurs transcriptionnels TIF2 et SRC-1 régulent l'homéo énergétique en modulant la respiration mitochondriale dans les myofibres du n squelettique.	98 fiption. 100 102 102 103 104 104 109 111 stasie nuscle 2
IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE IV.1 Identification de la famille des SRCs IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transci IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs IV.4.1 SRC-1 IV.4.2 TIF2 IV.4.2 TIF2 IV.4.3 SRC-3 V SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS VI LES OBJECTIFS DE LA THESE. RESULTATS I. Les co-régulateurs transcriptionnels TIF2 et SRC-1 régulent l'homéo énergétique en modulant la respiration mitochondriale dans les myofibres du n squelettique II. Le récepteur des glucocorticoïdes contrôle l'homéostasie de la masse musculair	98 fiption. 100 102 102 103 103 104 109 111 1 stasie nuscle nuscle 2 re chez

DISCUSSION	1

a. Les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> ont une longévité augmentée.

III. SRC-3 n'est pas le régulateur métabolique majeur dans le muscle chez la souris......12

IV. GR contribue à l'homéostasie musculaire chez la souris adulte......16

# **TABLE DES FIGURES**

# **INTRODUCTION**

	Figure 1 : Représentation schématique de la somitogénèse.	.3
	Figure 2 : Représentation schématique de la formation des muscles du membre	.4
	Figure 3 : Anatomie du muscle squelettique strié	.5
	Figure 4 : Disposition des filaments fins et épais dans un sarcomère.	.6
auto	Figure 5 : Modèle de l'arrangement moléculaire de la troponine et de la tropomyosir our de l'actine.	าe .7
	Figure 6 : Représentation schématique de la molécule de myosine	.8
	Figure 7 : A. Fibres musculaires et myofilaments. D'après la bibliothèque AFM.	.9
	B. Ultrastructure du muscle squelettique vue en microscopie électronique	.9
la tr	Figure 9 : Agencement des récepteurs à la ryanodine et à la dihydropyridine au niveau c iade1	le 12
	Figure 10 : Force isométrique en fonction de la longueur du sarcomère1	14
	Figure 11 : Modèle de la tête pivotante1	6
	Figure 12 : Etapes du cycle des ponts1	17
	Figure 13 : Schéma illustrant les principales voies contrôlant l'hypertrophie musculaire. 2	22
	Figure 14 : Schéma illustrant les principales voies contrôlant l'atrophie musculaire2	25
dan	Figure 15 : Représentation schématique des trois systèmes protéolytiques impliqué s l'atrophie musculaire2	és 26
	Figure 16 : Résumé du rôle des calpaïnes dans l'atrophie musculaire2	28
	Figure 17 : Représentation schématique de la formation de l'auto-lysosome	31
	Figure 18 : Schéma général de la glycolyse	39
	Figure 19 : Schéma général du cycle de Krebs4	<b>10</b>
	Figure 20 : Transport des acides gras dans la matrice mitochondriale4	11
	Figure 21 : Schéma général de la β-oxydation4	<b>1</b> 2
	Figure 22 : Schéma représentatif d'une mitochondrie4	14
	Figure 23 : Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons4	<b>1</b> 6
calc	Figure 24 : Activation des gènes impliqués dans la formation des fibres lentes par la vo ineurine/NFAT4	ie 19
Calr	Figure 25 : Activation des gènes impliqués dans la formation des fibres lentes par la vo noduline Kinase/MEF2	ie 50
	Figure 26 : Régulation de l'oxydation des lipides dans le muscle squelettique par l'AMP	K. 53
	Figure 27 : Biogenèse mitochondriale. D'après (Hood, 2001).	54
lesq	Figure 28 : Régulation de l'expression de PGC-1 $\alpha$ dans le muscle et mécanismes pa juelles PGC-1 $\alpha$ régule l'expression des gènes mitochondriaux	ar 55
	Figure 29 : Le découplage	58
	Figure 30 : Modèles des fonctions physiologiques catalysées par UCP2 et UCP3	52
	Figure 31 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires	6

# **DISCUSSION**

Figure 1 : Etude de la longévité des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> par rapport aux souris contrôles......7

F	igure	2:	Les	souris	TIF2 <sup>(i)skm-/-</sup>	sont	résistantes	au	stress	induit	par
l'ische	émie/rep	perfu	sion								.11
F	igure 3	: Les	souris	SRC-3 <sup>(i)sk</sup>	<sup></sup> n'ont pas	de déf	auts de therm	ogenè	se		14
F	igure 4	: Les	capaci	tés oxyda	atives des so	ouris SR	C-3 <sup>(i)skm-/-</sup> ne s	ont pa	as modifi	ées	.15
F	igure 5	: Les	souris	GR <sup>(i)skm-/d</sup>	<sup>lim</sup> ne sont p	as sens	sibles à l'atrop	ohie m	nusculaire	e induite	par
un tra	itement	à la c	dexamé	éthasone.							.20

# TABLE DES TABLEAUX

ique et contractile des différentes fibres 37	Tableau 1 : Caractéristiques biochimique     musculaires chez la souris.
s chez l'homme67	Tableau 2: Classification des récepteurs
s observations réalisées sur les souris le des p160 : SRC-1, TIF2, SRC-3 et le 108	Tableau 3 en 3 parties récapitulant les nulles pour les différents co-régulateurs d double mutant SBC-1/SBC-3

# INTRODUCTION

#### INTRODUCTION

## I. LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE : STRUCTURE ET FONCTIONS.

Le muscle squelettique est un tissu essentiel au sein de l'organisme. Il permet le déplacement, le maintien de la posture, et constitue un des principaux organes métaboliques. Ce chapitre se propose de résumer les connaissances actuelles sur le muscle squelettique, tant du point de vue de sa structure que de ses fonctions que sont la production de force et de mouvement par un mécanisme spécifique, la contraction musculaire et l'homéostasie métabolique.

#### I.1 Formation du muscle squelettique.

Chez les vertébrés supérieurs, les muscles squelettiques dérivent principalement des somites qui sont des structures sphériques issues de la segmentation du mésoderme paraxial suivant un axe antéropostérieur de part et d'autre du tube neural. Le somite se divise pour donner le sclérotome (la partie ventrale) qui est à l'origine des cellules du cartilage, des os, des vertèbres et des côtes, et le dermomyotome (la partie dorsale) qui va donner le derme et le muscle squelettique.

La région dorso-médiane du dermomyotome se différencie pour former la musculature paraxiale (ou epaxiale) à l'origine des muscles intercostaux et paraspinaux associés à la colonne vertébrale. La région ventro-latérale va former la musculature hypaxiale qui va donner les muscles des membres et de la ceinture [(Buckingham et al., 2003), Figure 1].



**Figure 1 : Représentation schématique de la somitogenèse.** D'après (Buckingham et al., 2003).

Les progéniteurs des cellules musculaires (pré-myoblastes) subissent une délamination de l'épithélium du dermomyotome hypaxial et migrent au niveau du futur membre. Les somites en migration sont caractérisés par l'expression de Pax3 et Pax7. 5 à 10% de ces cellules vont donner des cellules satellites (Le Grand and Rudnicki, 2007). La migration est également dépendante d'un autre facteur de transcription Lbx1 (Schafer and Braun, 1999). Au cours de leur migration, les pré-myoblastes prolifèrent, et ce n'est qu'une fois arrivés au niveau du membre que les pré-myoblastes vont quitter de manière irréversible le cycle cellulaire et vont exprimer les gènes de détermination myogénique *MyoD* et *Myf5* pour se transformer en myoblastes (Tajbakhsh and Buckingham, 1994). Les myoblastes vont fusionner et se différencier en cellules allongées plurinucléées les myotubes. Le programme de différentiation dépend de la présence de la myogénine, ainsi que d'autres facteurs de différentiation, tels que Mef2 (Figure 2).

Les cellules satellites sont présentes entre la membrane plasmique et la lame basale des fibres musculaires. Elles interviennent dans la croissance pré- et post-natale du muscle ainsi que dans sa régénération. Elles sont activées en réponse à divers stimuli tels que l'exercice, la stimulation électrique et les blessures (Seale et al., 2000).



**Figure 2 : Représentation schématique de la formation des muscles du membre.** NC : notochorde, TN : tube neural, ES : ectoderme de surface D'après (Buckingham et al., 2003).

## I.2 Structure du muscle squelettique.

#### I.2.1 Organisation anatomique du muscle squelettique.

Le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires. Chaque muscle est inséré sur l'os par l'intermédiaire des tendons constitués essentiellement de tissu fibreux, élastique et solide. Le muscle squelettique est entouré de plusieurs couches de tissus conjonctifs :

- l'endomysium entoure chaque fibre musculaire
- le périmysium assemble les différentes fibres musculaires en faisceau
- l'épimysium recouvre l'ensemble du muscle

Après avoir traversé l'épimysium, les vaisseaux sanguins qui assurent la vascularisation du muscle donnent naissance à un fin réseau de capillaires qui gagne le périmysium puis l'endomysium pour vasculariser chaque fibre musculaire. Les prolongements des nerfs gagnent également le périmysium. Ils se finissent en arborisation dont les ramifications se terminent dans la jonction neuromusculaire pour innerver les différentes fibres musculaires (Figure 3).



**Figure 3 : Anatomie du muscle squelettique strié.** D'après la bibliothèque AFM.

#### 1.2.2 Organisation cellulaire du muscle squelettique.

Chaque faisceau musculaire est formé d'un ensemble de fibres musculaires. La fibre musculaire est une longue cellule cylindrique dont le diamètre varie de 10 à 100  $\mu$ m et la longueur de plusieurs centaines de  $\mu$ m à plusieurs dizaines de mm. C'est un syncytium résultant de la fusion de plusieurs cellules qui contient de nombreux noyaux situés en périphérie, juste au-dessous de la membrane plasmique ou sarcolemme, le centre de la fibre étant occupé par les myofibrilles.

#### I.2.2.1 Les Myofibrilles : appareil contractile.

Les myofibrilles sont les éléments contractiles de la fibre musculaire. Une fibre musculaire possède plusieurs centaines de myofibrilles. En microscopie photonique, à fort grossissement, elles apparaissent parallèles, orientées selon l'axe longitudinal de la fibre qu'elles parcourent sur toute sa longueur. Elles mesurent 1 à 3  $\mu$ m de diamètre et occupent environ 80 % du volume de la cellule. Les myofibrilles sont constituées de faisceaux de myofilaments fins et épais qui sont les protéines contractiles du muscle strié (Figure 4).



Figure 4 : Disposition des filaments fins et épais dans un sarcomère.

Les filaments fins sont principalement constitués d'actine et d'un ensemble de protéines régulatrices : la tropomyosine et la troponine. L'actine est une protéine globulaire (actine G) qui se polymérise en double filet hélicoïdal (actine F). La polymérisation de l'actine nécessite l'hydrolyse de l'ATP en ADP. La tropomyosine s'étend sous forme d'un dimère le long de

I.2.2.1.1 Les filaments fins.

l'actine et bloque les sites de liaison à la myosine en absence de liaison du calcium à la troponine (Gordon et al., 2000).

Cette dernière est composée de trois sous-unités (Figure 5) :

- la troponine C (TnC) : qui lie le calcium permettant ainsi le déplacement de la tropomyosine et l'interaction actine-myosine

- la troponine I (TnI) : qui se fixe à l'actine et inhibe l'interaction actine-myosine (elle maintient le complexe dans une configuration qui masque le site de fixation de la myosine sur l'actine)

- la troponine T (TnT) : qui se lie à la tropomyosine et stabilise le complexe troponinetropomyosine-actine.



Figure 5 : Modèle de l'arrangement moléculaire de la troponine et de la tropomyosine autour de l'actine. TnC : Troponine C Tni : Troponine I TnT : troponine T D'après (Gordon et al., 2000).

I.2.2.1.2 Les filaments épais.

La molécule de myosine est le composant majeur des filaments épais ; elle est constituée de plusieurs chaînes (Figure 6) :

- deux chaînes lourdes, d'un poids moléculaire de 200 kDa (MHC : Myosin Heavy Chain) formées de méromyosine légère (LMM) et de méromyosine lourde (HMM). Cette dernière étant subdivisée en deux fragments : la tête globulaire (ou partie S1) qui porte l'activité ATPasique et qui se lie à l'actine, et la queue (ou partie S2) qui est une région flexible et qui permet de lier des molécules de myosine ensemble pour former les filaments épais (Craig and Woodhead, 2006).

- quatre chaînes légères d'un poids moléculaire de 20 kDa (MLC : Myosin Light Chain). Deux de ces chaînes sont phosphorylables (chaînes régulatrices), les deux autres sont non-phosphorylations (chaînes essentielles). Une chaîne régulatrice et une chaîne essentielle sont associées à chaque tête de myosine.

Les molécules de myosine sont disposées de façon à ce que les têtes de myosine pointent dans des directions opposées. Par conséquent la région au centre de chaque filament est dépourvue de têtes de myosine. Dans la fibre musculaire, les filaments épais de myosine et fins d'actine sont disposés de telle manière qu'ils puissent glisser entre eux.



**Figure 6 : Représentation schématique de la molécule de myosine.** Les chaînes lourdes sont représentées en vert et rouge, les légères en jaune et bleu. HMM : méromyosine lourde ; LMM : méromyosine légère. D'après (Craig and Woodhead, 2006).

I.2.2.1.3 Le sarcomère.

La disposition des filaments fins et épais entre eux donne son apparence striée au muscle squelettique. La ligne Z est l'extrémité où se rejoignent les filaments fins d'actine, et la structure allant d'une ligne Z à une autre est appelée sarcomère.

La Figure 4 donne la nomenclature des différentes bandes d'un sarcomère. Les bandes A et I sont appelées ainsi en raison de leur propriété biréfringente en microscopie électronique, la bande I étant isotrope et la bande A anisotrope. La zone de la bande A où il n'y a pas de superposition des filaments épais aux fins est appelée zone H. Au centre de la zone H, se trouve la région des filaments épais dénuée de projection de tête de myosine, et forme la ligne M (Craig and Woodhead, 2006).

#### 1.2.2.2 Protéines de structure : cytosquelette non contractile.

Le cytosquelette non contractile peut être divisé en trois groupes : le cytosquelette endosarcomérique et le cytosquelette exosarcomérique qui permettent de maintenir l'architecture des myofibrilles et de relier les myofibrilles adjacentes entre elles, et le cytosquelette sous-sarcolemmal qui connecte l'appareil contractile au sarcolemme et de façon indirecte à la matrice extracellulaire (Berthier and Blaineau, 1997). Le cytosquelette non contractile assure la liaison d'une part entre les myofibrilles, permettant ainsi la coordination de la contraction dans l'ensemble de l'appareil contractile, et d'autre part entre myofibrilles et matrice extracellulaire, renforçant la résistance de la structure cellulaire à la contraction.

### I.2.2.3 Réticulum sarcoplasmique et tubules T.

Chaque myofibrille est enveloppée par un sac membraneux appelé réticulum sarcoplasmique (RS), dont l'intérieur est séparé du cytoplasme de la fibre. Ce système membraneux a pour fonction la régulation intracellulaire du calcium et participe au contrôle de la contraction musculaire (Figure 7A).



**Figure 7 : A. Fibres musculaires et myofilaments.** D'après la bibliothèque AFM. **B. Ultrastructure du muscle squelettique vue en microscopie électronique.** Sont représentées les bandes Z, I, A, M et H, ainsi que les T tubules (Tt).

La membrane plasmique de la fibre, également appelée sarcolemme, s'invagine formant les tubules T qui courent transversalement le long de la fibre, formant un réseau complexe de branches qui entrent en contact et entourent généralement chaque myofibrille.

Dans la zone de rencontre entre le tubule T et le réticulum sarcoplasmique, les deux membranes sont proches l'une de l'autre. En microscopie électronique, les tubules T sont vus en section transversale avec une portion de réticulum sarcoplasmique de chaque côté, formant la triade (Figure 7B).

#### I.2.3 Contrôle du processus contractile.

La machinerie contractile est activée et coupée rapidement pour permettre des mouvements coordonnés complexes.

#### I.2.3.1 Unité motrice et jonction neuromusculaire.

A maturité, chaque fibre musculaire est innervée par un seul axone. On distingue trois types de motoneurones : les motoneurones  $\alpha$ , qui innervent les fibres musculaires responsables de la contraction, les motoneurones  $\beta$ , qui innervent les deux types de fibres, et les motoneurones  $\gamma$ , qui innervent les fuseaux neuromusculaires, ajustant ainsi leur sensibilité à l'étirement. Le motoneurone  $\alpha$ , via des branches axonales, innerve plusieurs fibres musculaires. Toutes les fibres innervées par un même motoneurone forment une unité motrice (Figure 7). La connexion synaptique entre la terminaison axonale du motoneurone et de la fibre musculaire se fait au niveau de la jonction neuromusculaire (Figure 7).

#### 1.2.3.2 Naissance et propagation du potentiel d'action.

Les potentiels d'action qui arrivent au niveau de la terminaison axonale entraînent l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. L'afflux de calcium provoque la fusion des vésicules synaptiques qui contiennent l'acétylcholine (ACh), puis la libération de leur contenu dans la fente synaptique. La membrane post-synaptique de la fibre musculaire possède à sa surface des récepteurs à l'ACh (RACh). La liaison de l'ACh à son récepteur entraîne la dépolarisation de la membrane de la fibre musculaire. La propagation de cette dépolarisation dépendra de la quantité d'ACh libérée dans la fente synaptique. Si la quantité d'ACh libérée atteint un certain seuil pour produire une dépolarisation importante, il y aura

naissance d'un potentiel d'action. La dépolarisation de la membrane est due à une entrée massive d'ions Na<sup>+</sup> à l'intérieur de la cellule (Stephenson, 2006).

La cholinestérase, présente dans la fente synaptique, est l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'ACh en choline. La choline libre sera alors recaptée au niveau de la terminaison axonale, où elle sera de nouveau convertie en ACh (Figure 8).



**Figure 8 : Naissance d'un potentiel d'action.** Les vésicules synaptiques fusionnent pour libérer leur contenu en acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique, le neurotransmetteur se fixe alors sur ses récepteurs présents au niveau de la membrane de la fibre musculaire. Cette liaison entraîne l'ouverture de canaux Na<sup>+</sup> et leur entrée à l'intérieur de la cellule provoquant la dépolarisation de la membrane musculaire. RACh : récepteurs à l'ACh, AChE : acétylcholine estérase. D'après la bibliothèque AFM.

Les potentiels d'action qui naissent à la jonction neuromusculaire se propagent le long de la fibre et à l'intérieur de celle-ci le long des tubules T. Lorsque le potentiel d'action traverse l'intérieur de la fibre, la membrane du tubule T se dépolarise tandis que la membrane de surface se repolarise.

# I.2.3.3 Couplage excitation-contraction.

Quand l'onde de dépolarisation traverse les tubules T, l'interaction produite avec le réticulum sarcoplasmique entraîne la libération de calcium initiant la contraction musculaire. Ce processus est connu sous le nom d'excitation-contraction.

I.2.3.3.1 Structure de la triade.

A la jonction entre les tubules T et le réticulum sarcoplasmique (RS), les deux membranes se trouvent face à face, et forment une structure appelée triade.

Les tubules T sont enrichis en canaux Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendant de type L, également appelés récepteurs à la dihydropyridine (RDHP), car ils peuvent fixer des inhibiteurs de canaux calciques : les dihydropyridines (Miller, 1992).

La membrane du RS possède des récepteurs nommés récepteurs à la ryanodine (RyR), en raison de leur sensibilité à la ryanodine, un alcaloïde d'origine végétal. Les récepteurs à la ryanodine font face aux RDHPs. Comme il y deux fois moins de RDHPs que de RyRs, un récepteur à la ryanodine sur deux se trouve en face d'un récepteur à la dihydropyridine [(Flucher et al., 1993), Figure 9].

Trois autres protéines présentes dans le réticulum sarcoplasmique vont jouer un rôle important dans le phénomène d'excitation-contraction : la calsequestrine, la triadine et la junctine. La calsequestrine est une protéine présente dans le lumen du RS où elle fixe le calcium (Rossi and Dirksen, 2006). La triadine et la junctine sont deux glycoprotéines de structure similaire, avec une petite séquence N-terminale dans le cytosol et une grande séquence C-terminale dans le lumen du RS. Le récepteur à la ryanodine, la triadine, la junctine et la calsequestrine forment un complexe quaternaire dans lequel la calsequestrine permet de localiser de fortes concentrations de calcium près de RyR (côté lumen) via un pont de protéines constitué de la triadine et de la junctine (Sorrentino, 2004).



Figure 9 : Agencement des récepteurs à la ryanodine et à la dihydropyridine au niveau de la triade.

I.2.3.3.2 Libération du calcium et contraction du muscle.

La sous-unité a1 des RDHPs est la sous-unité responsable de la détection du changement de potentiel de membrane. Elle répond à la dépolarisation par un changement de conformation permettant ainsi l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (Miller, 1992). Le calcium est alors libéré du RS et vient se fixer à la troponine C, provoquant ainsi un changement de conformation qui déplace la tropomyosine de sorte que les sites de liaison à l'actine par la myosine sont découverts. Les ponts de liaison actine-myosine se forment, et la force est développée.

Une fois la contraction terminée, le calcium se dissocie de la troponine et est repompé dans le réticulum sarcoplasmique par un processus qui nécessite de l'ATP. C'est une protéine présente au niveau du RS appelée Sarco (Endo) plasmique réticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) qui permet le recaptage du calcium. Cette protéine appartient à la famille des ATPases de type P, car elle fait partie des protéines de transport qui subissent une autophosphorylation, dans laquelle le  $\gamma$ -phosphate de l'ATP est transféré sur un résidu aspartyl dans la partie cytoplasmique de la protéine. Il existe trois isoformes avec des expressions tissulaires différentes : SERCA 1 est exprimé dans les muscles squelettiques rapides, SERCA 2 dans le cœur et les muscles squelettiques lents, et SERCA 3 dans les cellules lymphoïdes et les cellules endothéliales (Rossi and Dirksen, 2006). Pour une molécule d'ATP hydrolysée par cycle, deux ions Ca<sup>2+</sup> sont pompés dans le RS en échange de deux ou trois ions H<sup>+</sup> (Yu et al., 1993).

## 1.3 Propriétés mécaniques du muscle : production de force.

#### I.3.1 Contraction musculaire : définitions.

La force de contraction musculaire dépend des conditions mécaniques dans lesquelles le muscle est placé. Plusieurs types de contractions sont distingués :

- la contraction isotonique, au cours de laquelle le muscle se raccourcit ou s'allonge pour développer une force constante. Il y a deux types de contractions isotoniques, la concentrique au cours de laquelle le muscle se raccourcit, et l'excentrique au cours de laquelle le muscle se rallonge tout en exerçant une force.

- la contraction isométrique au cours de laquelle le muscle développe une force à longueur constante (Figure 10). Ce type de contraction est très important, car c'est l'état des muscles qui stabilisent les articulations pendant que d'autres sont en mouvements.

- la contraction auxotonique, qui s'effectue à charge et à longueur variables.

La plupart des activités humaines font intervenir ces différents types de contraction.



# Figure 10 : Force isométrique en fonction de la longueur du sarcomère.

A : Force produite par le muscle. B : Longueur des sarcomères.

D'après (Jones, 2005).

## 1.3.2 Les relations caractéristiques de la mécanique musculaire.

Le muscle peut être assimilé à un système mécanique comportant des composantes contractiles et élastiques. La force développée par un muscle au cours de son activité varie avec sa longueur. La force musculaire est optimale lorsque le muscle est à sa longueur d'équilibre, et elle diminue s'il est raccourci ou étiré. Cette caractéristique fonctionnelle est due à l'organisation structurale des myofilaments des fibres musculaires. Les relations caractéristiques du muscle entre les grandeurs mécaniques et la force générée sont décrites par les relations force-longueur et force-vitesse.

#### I.3.2.1 Relation force-longueur.

La force est développée par l'interaction des filaments d'actine et de myosine quand ils se superposent : c'est la théorie des filaments glissants. Les mesures réalisées par Gordon et collaborateurs chez la grenouille ont permis de comprendre la relation entre la force et la longueur du muscle. Ces résultats sont schématisés sur la Figure 10. La force est faible aux courtes longueurs du muscle, passe par un maximum et diminue quand le muscle est étiré davantage (Gordon et al., 1966).

En extrapolant cette courbe à des longueurs supérieures, il est possible de prédire une valeur pour laquelle aucune force n'est développée, et qui correspond à la position où les filaments d'actine et de myosine ne se superposent plus (situation I sur la Figure 10). Les mesures réalisées par Gordon et collaborateurs montrent que, du côté droit de la courbe, la diminution linéaire de la force est proportionnelle au degré de superposition des filaments fins et épais. En revanche, du côté gauche, la force développée décroît rapidement, car les filaments fins se superposent les uns aux autres au centre du sarcomère, tandis que les filaments épais viennent en contact avec les lignes Z (situation IV sur la Figure 10) (Gordon et al., 1966). Le mécanisme des filaments glissants explique pourquoi la force développée est proportionnelle à l'étendue de la superposition des filaments. En effet, plus la superposition est grande, plus le nombre de têtes de myosine qui peuvent interagir avec l'actine est important.

#### I.3.2.2 Relation force-vitesse.

La force dépend de la longueur des sarcomères, mais également de la vitesse avec laquelle le muscle se raccourcit. Quand la vitesse de raccourcissement d'un muscle augmente, la force développée par le muscle diminue rapidement, pour atteindre finalement une vitesse pour laquelle aucune force n'est développée : c'est la vitesse maximale de raccourcissement (Vmax). La force pour un raccourcissement de vitesse nulle correspond à la force isométrique.

La puissance est le produit de la force et de la vitesse. Comme la force est proportionnelle à la surface de section transversale d'un muscle, et la vitesse à la longueur, il s'ensuit que la puissance est proportionnelle au produit des deux : le volume. Il en résulte qu'un muscle court et trapu va produire une force élevée, mais va avoir une vitesse maximale de raccourcissement faible, alors qu'un muscle fin produit moins de force, mais se raccourcit rapidement. Si ces muscles ont le même volume, ils auront par conséquent la même puissance maximale. Cette dernière est obtenue à environ un tiers de la Vmax, si bien que même si deux muscles ont une puissance maximale identique, la vitesse pour laquelle elle est obtenue sera différente.

#### 1.3.3 Cinétique des ponts d'union.

Le modèle d'action des ponts d'union d'actine-myosine repose sur les théories avancées par Huxley en 1957 (Huxley, 1957) et développées par Huxley et Simmons en 1971 (Huxley and Simmons, 1971). Il est fondé sur l'idée d'une tête de myosine flexible, si bien que l'extension de la queue de la molécule de myosine est déterminée à la fois par le déplacement du site de liaison de l'actine depuis la position d'équilibre (x) et par la rotation de la tête (z) (Figure 11).



#### Figure 11 : Modèle de la tête pivotante.

La tête du pont peut se lier à l'actine dans différentes configurations stables à des angles différents (différentes valeurs de z). La force dépend également de la longueur x. Les flèches indiquent les directions des mouvements relatifs des filaments fins et épais. D'après (Huxley and Simmons, 1971).
Les ponts d'union de la tête de myosine peuvent se lier à l'actine, et c'est la rotation de la tête qui étend la portion S2 de la myosine et qui produit la force. Cependant, les transitions entre les états limites sont si rapides, que le modèle peut être réduit à un modèle à deux états dans lequel les ponts sont soit attachés, soit détachés (Huxley, 1957).

#### I.3.4 Cycles des ponts d'union.

Il est généralement admis que l'interaction entre l'actine, la myosine et l'ATP se fait par étapes et que les stades intermédiaires peuvent être mis en correspondance avec les différentes étapes mécaniques du cycle des ponts d'union de la myosine. Les études détaillées de cinétique ont démontré un grand nombre d'intermédiaires possibles (Gordon et al., 2000). Les principales étapes de ce cycle sont illustrées dans la Figure 12. La liaison de la myosine et de l'actine est un processus réversible (1), qui donne de la rigidité au muscle, mais qui ne donne pas de la force par lui-même. Le relargage de phosphate à partir du complexe acto-myosine (2) initie probablement les changements qui conduisent à la production de force (rotation de la tête S1 de la molécule de myosine). Vers la fin de la phase de rotation, l'ADP est relarguée (3) et le complexe acto-myosine peut alors fixer l'ATP (4). Puis l'actine et la myosine se dissocient avec l'ATP liée à la myosine (5). Enfin, la tête de myosine hydrolyse l'ATP en ADP+Pi (6), permettant alors une nouvelle association avec une molécule d'actine (Gordon et al., 2000).



Figure 12 : Etapes du cycle des ponts. A : Actine, M : Myosine, AM : Actomyosine. D'après (Gordon et al., 2000).

## 1.4 Régulation de la masse musculaire.

#### I.4.1 L'hypertrophie musculaire.

L'augmentation de la masse musculaire, comme celle d'autres tissus, dépend du renouvellement des protéines (Sartorelli and Fulco, 2004). Le turnover cellulaire joue un rôle majeur au cours du développement embryonnaire du muscle squelettique. Les cellules satellites sont incorporées dans les fibres en formation durant la croissance musculaire postnatale (Moss and Leblond, 1971) de façon concomitante avec une augmentation de la synthèse protéique. L'activation des cellules satellites est importante pour le maintien d'une taille constante pour chaque compartiment nucléaire (quantité de cytoplasme, nombre de noyaux à l'intérieur du cytoplasme). Contrairement à ce qui se passe dans le muscle jeune, la contribution du turnover cellulaire à l'homéostasie des fibres adultes est mineure, et son rôle dans l'hypertrophie a été débattu récemment (McCarthy and Esser, 2007; Rehfeldt, 2007). Dans le muscle adulte, les conditions physiologiques promouvant la croissance musculaire y contribuent principalement en augmentant la synthèse protéique et en diminuant leur dégradation. Cependant, les cellules satellites sont activées dans le cas d'une hypertrophie compensatoire (Moss and Leblond, 1971; Schiaffino et al., 1976), et l'ajout de nouveaux noyaux à la fibre en croissance semble être requis pour l'hypertrophie extrême. Ce chapitre vise à détailler les différentes voies de signalisation contrôlant l'hypertrophie du muscle squelettique.

#### I.4.1.1 La voie IGF-I-AKT et le contrôle de la croissance musculaire.

I.4.1.1.1 IGF-I.

Les IGF (insulin-like growth factor), plus précisément IGF-I et IGF-II, sont des hormones peptidiques ayant une structure chimique semblable à celle de l'insuline. IGF-I est l'effecteur de la croissance musculaire le mieux caractérisé. En plus d'IGF-I circulant, principalement synthétisé par le foie sous le contrôle de l'hormone de croissance (GH ou growth hormone), la production locale par le muscle squelettique de différents produits d'épissage d'IGF-I a récemment renouvelé l'intérêt pour cette protéine. Trois isoformes spécifiques d'IGF-I, IGF-IEa, IGF-IEb et IGF-IEc ont été décrites dans le muscle, et chacune semble, entre autre, contribuer à la régénération musculaire (Chakravarthy et al., 2000; Rotwein et al., 1986; Yang et al., 1996). IGF-IEb pourrait être impliqué dans l'hypertrophie ou la régénération

musculaires ; cependant, le rôle physiologique de IGF-IEb dans le muscle squelettique chez l'homme demeure inconnu. IGF-IEc ou mechano growth factor (MGF) est un variant d'épissage d'IGF-IEa qui à la fois des fonctions autocrines et paracrines (Goldspink, 1999), stimulant la prolifération des cellules satellites et l'hypertrophie musculaire consécutive à un étirement ou des dommages musculaires (Hill and Goldspink, 2003; Yang et al., 1996). Chez les rongeurs, il n'existe que deux isoformes, IGF-Ia et IGF-Ib qui correspond au MGF (Dai et al., 2010).

De manière intéressante, l'expression d'IGF-I est augmentée à la suite d'une surcharge fonctionnelle du plantaris par élimination des muscles gastrocnémien et soléaire [qui sont des muscles synergistes ; (McCall et al., 2003)]. De plus, la surexpression d'IGF-I, spécifiquement dans le muscle squelettique de souris, résulte en une hypertrophie musculaire (Musaro et al., 2001), et la croissance du muscle s'effectue de façon concomitante à une augmentation de la force. Par ailleurs, une induction d'IGF-I dans des muscles adultes par électroporation est suffisante pour promouvoir une hypertrophie musculaire (Alzghoul et al., 2004). Bien que ces résultats suggèrent un rôle autocrine/paracrine pour l'IGF-I local dans la plasticité musculaire dépendante de l'activité, une preuve directe suggérant un tel rôle à travers des approches de perte de fonction (knock-out ou knock-down) n'a pas encore été relatée.

I.4.1.1.2 AKT.

IGF-I et l'insuline peuvent induire l'activation de AKT par la génération de phosphatidylinositol-3,4,5-triphospsates (PI3P) produit par la PI3-kinase (PI3K), à laquelle s'opposent les activités de la phosphatase PTEN (« phosphatase and tensin homolog ») et de SHIP2 (« SH2-containing 5'-inositol phosphatase 2 »). Les PI3P recrutent AKT à la membrane plasmique en se liant à son domaine NH2-terminal. A la membrane, AKT est phosphorylé par au moins deux kinases distinctes, PDK1 et le complexe mTOR-Rictor. Le rôle d'AKT dans la croissance musculaire a tout d'abord été suggéré par la découverte chez le rat qu'un double mutant d'une forme active de Ras (RasV12C40), induisant sélectivement la voie AKT par la PI3K [(Murgia et al., 2000), Figure 13].

Cette observation a été confirmée par l'étude de la surexpression constitutive d'une forme active d'AKT dans le muscle squelettique à l'âge adulte (Bodine et al., 2001b; Pallafacchina et al., 2002), ainsi que par la génération de souris transgéniques conditionnelles dans lesquelles AKT est exprimé dans le muscle squelettique à l'âge adulte (Lai et al., 2004) (Izumiya et al., 2008).

Des études menées à la fois chez le rat et chez l'homme ont montré que l'activité d'AKT était augmentée en réponse à l'activité contractile du muscle extensor digitorum longus (EDL). Cependant, il reste à établir comment le stress mécanique est converti en activation d'AKT, sachant que celle-ci est également augmentée en réponse à une stimulation hormonale et par les facteurs de croissance (Nader and Esser, 2001; Sakamoto et al., 2004; Sakamoto et al., 2003; Sakamoto et al., 2002).

#### I.4.1.2 mTOR-S6K1 et le contrôle de la synthèse protéique.

Deux branches majeures en aval d'AKT, intervenant dans l'hypertrophie musculaire, sont la voie mTOR (de l'anglais « mammalian target of rapamycin »), qui est activée par AKT, et la voie GSK3 $\beta$  (de l'anglais « glycogen synthase kinase 3 $\beta$  »), qui est inhibée par AKT. Ces deux voies contrôlent la synthèse protéique. Une troisième cible en aval d'AKT est la voie FOXO, qui contrôle la dégradation protéique, et dont il sera question dans les paragraphes traitant de l'atrophie musculaire.

#### I.4.1.2.1 mTOR.

La kinase mTOR est un régulateur clé de la croissance cellulaire, intégrant des signaux à partir de facteurs de croissance, de nutriments et de l'état énergétique, afin de contrôler la synthèse protéique et d'autres fonctions cellulaires (Hay and Sonenberg, 2004; Teleman et al., 2008). mTOR est sélectivement inhibé par la rapamycine, une drogue utilisée en tant qu'immunosuppresseur dans les cas de transplantation d'organes. Le rôle de mTOR dans la croissance du muscle a été démontré par des études in vivo montrant que la rapamycine bloquait l'hypertrophie liée à la surcharge, ainsi que la croissance du muscle en régénération (Bodine et al., 2001b; Pallafacchina et al., 2002). En effet, chez les souris surexprimant AKT, la rapamycine abolit complètement les effets d'AKT sur la croissance musculaire (Izumiya et al., 2008). L'activation de mTOR par AKT est indirecte et implique la phosphorylation et l'inhibition par AKT de TSC2 (de l'anglais « tuberous sclerosis 2 ») qui est une protéine activant les GTPases (GAP) fonctionnant en association avec TSC1 pour inactiver la petite protéine G Rheb qui, en retour, active mTOR en complexe avec la protéine adaptatrice raptor [complexe TORC1, voir Figure 13, (Wan et al., 2006)].

I.4.1.2.2 Complexes impliquant mTOR et voies avales.

mTOR fait partie de deux complexes multiprotéiques :

(i) mTORC1, qui contient Raptor et qui est sensible à la rapamycine, est requis pour la signalisation S6K et 4EBP1, alors que

(ii) mTORC2, qui contient Rictor, est requis pour la signalisation AKT-FOXO (Figure 13).

L'effet de mTOR sur la machinerie traductionnelle et la synthèse protéique est relayé par la phosphorylation des protéines ribosomales S6 kinases (S6K1 et 2) et de 4EBP1, un répresseur de la protéine de liaison de la cap eIF4E, de façon dépendante de TORC1. S6K1 semble être un important effecteur de la voie AKT du fait que les fibres musculaires des souris ne possédant pas S6K1 sont plus petites, et que leur réponse hypertrophique à IGF-I et à une forme activée d'AKT est bloquée (Ohanna et al., 2005). Par ailleurs, le complexe TORC1 régule négativement la voie IGF-I via S6K1 (Aguilar et al., 2007; Um et al., 2004). Ainsi, mTORC1 et mTORC2 pourraient avoir des effets opposés sur l'activité AKT : TORC1 régule négativement la voie IGF-I alors que TORC2 induit l'activité AKT (Figure 13).

I.4.1.3 Les senseurs β-adrénergiques et mécaniques.

Au cours de l'exercice, une élévation aigue de catécholamines entraîne des changements dans le phénotype musculaire. Les  $\beta$ -agonistes tels que le clenbutérol, agissant par l'intermédiaire des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques, sont connus pour provoquer une hypertrophie musculaire et une conversion des fibres lentes en fibres rapides (voir § I.5). De façon intéressante, certains effets des catécholamines peuvent être relayés par la production locale d'IGF-I par le muscle squelettique (Awede et al., 2002; Sneddon et al., 2001). En effet, l'action des  $\beta$ -agonistes sur la croissance est, au moins partiellement, relayé par la voie AKT/mTOR, la rapamycine abolissant presque complètement les effets hypertrophiques de clenbutérol (Kline et al., 2007). L'activation des récepteurs  $\beta$  est également connue pour augmenter les niveaux d'AMPc intracellulaire et activer la protéine kinase A (PKA), qui pourrait également activer la voie AKT et le facteur de transcription CREB. Cependant, cette voie n'a pas encore été explorée dans les muscles en contraction.



# Figure 13 : Schéma illustrant les principales voies contrôlant l'hypertrophie musculaire.

L'induction est symbolisée par une flèche verte et l'inhibition par une rouge.

I.4.2 L'atrophie musculaire.

#### 1.4.2.1 Conditions de développement d'une atrophie musculaire.

L'atrophie est un changement dans les propriétés du muscle squelettique pouvant être lié une immobilisation du muscle [comme l'immobilisation, la dénervation ou la décharge (unloading)], l'âge, la privation alimentaire et de nombreuses maladies. Parmi celles-ci, la cachexie est un affaiblissement profond de l'organisme (perte de poids, atrophie musculaire, etc.), lié à une dénutrition très importante. Elle peut provenir d'une anorexie, d'un cancer (cachexie cancéreuse, produite par des substances secrétées par la tumeur, les cachexines), de maladies chroniques (insuffisances cardiaque, hépatique ou rénale), voire de certaines maladies infectieuses (par exemple la tuberculose et le SIDA), ou certaines maladies auto-immunes.

L'atrophie musculaire est caractérisée par une diminution du niveau de protéines, du diamètre des fibres, de la production de force et de la résistance à la fatigue. Les différentes conditions conduisant à l'atrophie impliquent différents types de cibles moléculaires et de voies de signalisation. Après le stimulus initial, au cours duquel la masse musculaire diminue et le muscle squelettique ne se contracte plus correctement, les molécules impliquées dans l'atrophie initient le processus dégradation des protéines. Ce chapitre se propose de résumer des connaissances actuelles.

#### 1.4.2.2 Voies de signalisation diminuant la synthèse protéique.

I.4.2.2.1 La voie AKT/mTOR.

Les facteurs contrôlant la synthèse protéique ont été analysés précédemment. On peut cependant noter qu'une diminution de la phosphorylation d'Akt, mTOR (Reynolds et al., 2002) ou S6K1 (Bodine et al., 2001b; Hornberger et al., 2001) entraîne une diminution de la synthèse protéique, et accentue de ce fait les effets de l'atrophie musculaire.

La signalisation IGF-I/insuline, tout en favorisant la croissance musculaire, est capable d'inhiber la dégradation des protéines (Sacheck et al., 2004). Ainsi, les souris surexprimant IGF-I sont résistantes à l'atrophie musculaire (Schulze et al., 2005; Song et al., 2005), et une injection locale d'IGF-I suffit à bloquer l'atrophie causée par une immobilisation du muscle (Stitt et al., 2004). Dans ces modèles de fonte musculaire, IGF-I supprime complètement l'induction de deux ubiquitine ligases, l'atrogin-1/MAFbx et MuRF1, impliquées dans la

dégradation protéique via le protéasome (voir § 1.4.2.3.2). Des expériences de transfection d'Akt dans des souris adultes corroborent le rôle de cette voie dans la régulation de l'atrophie musculaire. De plus, l'électroporation d'Akt dans des myofibres adultes bloque entièrement l'atrophie musculaire induite par la dénervation (Bodine et al., 2001b). Enfin, l'augmentation des niveaux d'atrogin-1 et de MuRF1 est généralement bloquée par Akt, via une régulation négative de la famille de facteurs de transcription FoxO (voir § 1.4.2.3.2) (Lee et al., 2004; Stitt et al., 2004).

Il est bien établi que l'atrophie des muscles conduit à une diminution précoce du niveau de la synthèse protéique (Grater et al., 2005; Morissette et al., 2006; Song et al., 2005). La traduction de l'ARNm en protéine a lieu au cours de trois phases appelées initiation, élongation et terminaison, les deux premières étapes étant les plus fortement régulées (Sandri et al., 2006). Dans le cas d'une immobilisation du muscle, la plupart des données concernent la régulation de l'initiation. Des régulateurs connus en amont de l'initiation de la traduction ont été examinés ci-dessus. En aval de ces derniers, 4E-BP1, dont il a été question dans les paragraphes précédents, semble être un régulateur clé de la synthèse protéique du fait qu'il inhibe l'action d'eIF-4E. En effet, la quantité de 4E-BP1 lié à eIF-4E est augmentée après 14 jours de déchargement du muscle gastrocnémien chez le rat (Bodine et al., 2001b), suggérant son implication dans la diminution du taux de traduction observé au cours de l'atrophie. Par ailleurs, la mise à jeun prolongée chez le rongeur est un autre modèle d'atrophie musculaire dans lequel l'expression des messagers de 4E-BP1 est augmentée de [(Li et al., 2007), Figure 14].

I.4.2.2.2 La voie GSK3 $\beta$ .

La Glycogène synthase kinase  $3\beta$  (GSK $3\beta$ ) est un substrat d'Akt, capable de moduler l'hypertrophie musculaire. Comme pour FoxO, l'activité de GSK $3\beta$  est inhibée lorsque celui-ci est phosphorylé par Akt [(Cross et al., 1995), Figure 14]. L'expression d'un dominant négatif (forme inactive de la kinase GSK $3\beta$ ) induit une hypertrophie des myotubes squelettiques (Rommel et al., 2001), de même que l'inhibition pharmacologique de GSK $3\beta$  (Vyas et al., 2002).

GSK3β bloque l'initiation de la traduction des protéines en inhibant le facteur eIF2B (Hardt and Sadoshima, 2002; Jefferson et al., 1999). En outre, non seulement l'inhibition de GSK3β est suffisante pour provoquer la différenciation myogénique (van der Velden et al., 2006) et l'hypertrophie des cellules musculaires (Vyas et al., 2002), mais elle contribue aussi à l'effet hypertrophique d'IGF-I sur les cellules musculaires squelettiques (Vyas et al., 2002).

#### INTRODUCTION

Par conséquent, l'inhibition de GSK3 $\beta$  pourrait induire l'hypertrophie, en stimulant la synthèse des protéines de façon indépendante de la voie mTOR. Des arguments supplémentaires ont été fournis par une étude utilisant l'inhibiteur de GSK3 $\beta$ , Wnt (Kawano and Kypta, 2003; Veeman et al., 2003). L'application de Wnt à des myotubes squelettiques *in vitro* conduit à un phénotype ressemblant à une hypertrophie (Rochat et al., 2004). Il convient de noter, cependant, que les myotubes traités avec Wnt montrent un meilleur rapport noyau / myotube, suggérant la possibilité que le phénotype observé provienne d'une meilleure différenciation (Rochat et al., 2004). Il reste donc à démontrer si l'inhibition du blocage d'eIF2B par GSK3 $\beta$  est suffisante pour induire une hypertrophie.

Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs de GSK3 $\beta$  inhibe la dégradation protéique en bloquant l'induction de l'atrogin-1 et de MuRF-1, suggérant que les effets de GSK3 $\beta$  sont médiés, au moins en partie par le protéasome [(Evenson et al., 2005), Figure 14].

Ainsi, différents facteurs interviennent afin de moduler la taille des fibres musculaires squelettiques. En aval de ces différentes voies de signalisation se trouvent les systèmes effecteurs de l'atrophie musculaire.



**Figure 14 : Schéma illustrant les principales voies contrôlant l'atrophie musculaire.** L'induction est symbolisée par une flèche verte et l'inhibition par une rouge.

#### 1.4.2.3 Voies de signalisation stimulant la dégradation des protéines.

I.4.2.3.1 Les systèmes effecteurs de l'atrophie musculaire.

Au moins la moitié des protéines musculaires totales est constituée de protéines myofibrillaires, et cette fraction est perdue à un rythme plus rapide que les autres protéines au cours de l'atrophie musculaire (Alzghoul et al., 2004; Nakashima and Yakabe, 2007). Trois principaux systèmes protéolytiques sont impliqués dans la perte de protéines du muscle squelettique : le système des calpaïnes cytosoliques dépendant du calcium, les protéases lysosomales (i.e. les cathepsines), et le système ubiquitine-protéasome (UPS) dépendant de l'ATP. La contribution de ces trois systèmes protéolytiques dans l'atrophie musculaire, discutée dans ce chapitre, est résumée dans la Figure 15.



Figure 15 : Représentation schématique des trois systèmes protéolytiques impliqués dans l'atrophie musculaire. Le système dépendant du calcium des calpaïnes (A) clive les myofibrilles afin qu'elles soient ubiquitinées puis dégradées par le système ubiquitine (Ub) protéasome (B). L'ubiquitination est effectuée par trois classes d'enzymes : les E1 activent l'ubiquitine, les E2 prennent en charge l'ubiquitine afin qu'une fois liées aux E3, l'ubiquitine soit transférée aux myofibrilles à dégrader. Cette opération est répétée plusieurs fois de sorte que les myofibrilles polyubiquitinées soient prises en charge par le 26S protéasome. Le lysosome se forme à partir de vésicules issues du Golgi contenant des protéases (cathepsines, triangles bleus). Ces vésicules peuvent fusionner avec des vésicules d'endocytose issues de la membrane plasmique afin de dégrader les protéines membranaires. D'après (Jackman and Kandarian, 2004).

a. Rôle des calpaïnes dans l'atrophie.

Les calpaïnes sont des protéases non lysosomales dépendantes du calcium. Elles constituent une famille d'au moins 14 membres et sont soit des enzymes ubiquitaires, comme les calpaïnes  $\mu$  et m, soit tissus spécifiques, comme la calpaïne 3, spécifique du muscle. La calpaïne 3 peut avoir un rôle différent (voire opposé) de celui des calpaïnes  $\mu$  et m (Kramerova et al., 2004; Richard et al., 2000; Tidball and Spencer, 2000).

La régulation de l'activité des calpaïnes est complexe. Elles sont généralement à l'état inactif dans des conditions basales. Elles sont principalement régulées par le calcium (Figure 16), mais aussi par phosphorylation (Goll et al., 2003) ou par le phosphatidylinositol (Saido et al., 1992; Shao et al., 2006; Zalewska et al., 2004).

Un important inhibiteur de l'activité des calpaïnes est la calpastatine (Goll et al., 2003), dont la fixation peut être régulée par le calcium. En outre, les calpaïnes sont auto-catalysées, c'est-à-dire qu'une calpaïne activée est capable de se dégrader elle-même. Les calpaïnes activées peuvent aussi dégrader la calpastatine (Goll et al., 2003), ajoutant ainsi un niveau supplémentaire de complexité à la régulation de ce système.

Les caspases, protéines impliquées dans l'apoptose ayant une activité protéolytique, jouent également un rôle dans l'atrophie musculaire (Belizario et al., 2001; Du et al., 2004), et plus particulièrement dans l'étape initiale de la protéolyse myofibrillaire par le clivage de l'actomyosine. Ainsi, les caspases agissent de façon semblable aux calpaïnes en rendant les protéines myofibrillaires disponibles pour l'ubiquitination et potentiellement dégradables par l'UPS (Du et al., 2004). Ces fragments protéolytiques sont également produits lorsque les cellules musculaires L6 sont traitées avec la caspase-3. De plus, il a été montré que les rats diabétiques ou atteints de cancer ont une activité caspase augmentée dans le muscle (Belizario et al., 2001; Du et al., 2004), et la protéolyse est réduite après traitement des muscles de rats diabétiques par un inhibiteur de la caspase-3 (Du et al., 2004).

L'essentiel de la protéolyse myofibrillaire implique l'UPS (Solomon et al., 1998; Taillandier et al., 1996). Cependant, celui-ci ne peut pas dégrader les myofibrilles intactes (Solomon et al., 1998), et les calpaïnes sont incapables de dégrader l'actine et la myosine, même si elles ont une activité sur quelques sites spécifiques [voir pour revue (Thompson and Palmer, 1998)], alors qu'elles ont pour substrats les protéines impliquées dans l'assemblage et l'échafaudage des protéines myofibrillaires telles que la titine (Sorimachi et al., 2000) ou la vinculine [Figure 16, (Taillandier et al., 1996; Tischler et al., 1990; Voisin et al., 1996) et voir pour revue (Huang and Forsberg, 1998)]. Les calpaïnes permettent ainsi à l'UPS d'accéder à l'actine et à la myosine en dégradant les protéines myofibrillaires.

De plus, les calpaïnes contribuent à l'inhibition de l'activité d'AKT (Smith and Dodd, 2007), ainsi qu'à la dégradation de facteurs de transcription tel que CEBP- $\beta$  via une interaction protéine-protéine (Wei et al., 2006), ce qui les rend indispensables à l'atrophie musculaire (Smith et al., 2008).



#### Figure 16 : Résumé du rôle des calpaïnes dans l'atrophie musculaire.

L'augmentation des niveaux intracellulaires de calcium va activer les calpaïnes, bien que d'autres mécanismes puissent contribuer à cette activation. Cela va entraîner le clivage des protéines myofibrillaires du cytosquelette, ce qui résulte en une déstructuration du sarcomère et la libération de myofilaments qui sont ubiquitinés et dégradés par le protéasome 26S. Les calpaïnes régulent également la dégradation de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la fonte musculaire ainsi que l'activité d'AKT. D'après Smith (2008).

- b. Rôle de la protéolyse lysosomale.
  - a. Organisation et structure du lysosome.

L'hydrolyse lysosomale dépend de différents facteurs : la synthèse des hydrolases, mais aussi les fonctions caractéristiques des protéines lysosomales membranaires, comme la résistance à la dégradation par les hydrolases lysosomales, la génération d'un pH luménal acide (Forgac, 1999) et le transport sélectif des produits de dégradation dans le cytoplasme (Figure 17). Les principaux composants protéiques de la membrane lysosomale sont les protéines membranaires associées au lysosome (LAMP) et intégrées au lysosome [LIMP, (Fukuda, 1991)], qui forment une couche quasi continue sur la surface intérieure de la membrane lysosomale et servent ainsi de barrière résistante à la dégradation (Eskelinen et al., 2003; Tanaka et al., 2000). Le pH acide favorise l'activité de digestion des hydrolases lysosomales (Lloyd, 1996).

La cathepsine D est la principale endopeptidase aspartique identifiée dans les lysosomes. Les cathepsines B, L, H et D fonctionnent comme des peptidases lysosomales ubiquitaires (Turk et al., 2001), les autres, présentant une distribution plus limitée et des fonctions tissu-spécifiques (Driessen et al., 1999; Gelb et al., 1996). C'est le cas de la cathepsine S qui contrôle le trafic et la maturation des molécules du CMH (complexe majeur histocompatibilité) de classe II dans les cellules dendritiques. Les endopeptidases initient probablement la protéolyse lysosomale.

L'invalidation de la cathepsine D (Saftig et al., 1995) ou des carences combinées en cathepsines B et L (Felbor et al., 2002) sont létales peu après la naissance. En outre, l'expression des cathepsines est nettement augmentée dans les différentes formes d'atrophie (Ikemoto et al., 2001; Stevenson et al., 2003; Taillandier et al., 1996). Toutefois, lorsque les muscles atrophiés sont traités avec des agents bloquant l'acidification lysosomale (Tischler et al., 1990) ou inhibant directement les cathepsines (Furuno and Goldberg, 1986; Ikemoto et al., 2001; Taillandier et al., 1996), les taux de dégradation des protéines myofibrillaires ne sont pas significativement affectés, et les niveaux totaux de dégradation des protéines ne sont que légèrement réduits. C'est également le cas pour la cachexie (Deval et al., 2001; Lowell et al., 1986; Voisin et al., 1996). Ces observations sont en accord avec le fait que les cathepsines ne dégradent pas les protéines cytosoliques comme les myofibrilles, mais les protéines membranaires [voir pour revue (Mayer, 2000)]. Par conséquent, on ne s'attend pas à ce que leur inhibition *in vivo* ait beaucoup d'effet sur la dégradation des protéines totales ou myofibrillaires au cours de l'atrophie musculaire, bien

qu'*in vitro*, les cathepsines sont toutes capables de dégrader les protéines myofibrillaires purifiées (Dufour et al., 1987; Katunuma and Kominami, 1983). D'autre part, les protéines associées à la membrane qui sont susceptibles d'être dégradées par la voie lysosomale pourraient être des éléments clés contribuant au phénotype d'atrophie musculaire.

b. L'acheminement de substrats aux lysosomes.

Schématiquement, la dégradation lysosomale des constituants cytoplasmiques (autophagie) inclut la séquestration initiale des substrats protéiques dans le système vacuolaire et leur hydrolyse par les hydrolases lysosomales. Différentes voies peuvent être utilisées pour fournir des substrats protéiques intracellulaires aux lysosomes : la microautophagie, la crinophagie, l'autophagie relayée par les protéines chaperonnes ou la macroautophagie (Blommaart et al., 1997). Ici, nous ne traiterons que de la macroautophagie car, dans les cellules de mammifères (Ogier-Denis and Codogno, 2003), y compris les cellules musculaires différenciées (Mordier et al., 2000; Tassa et al., 2003), la macroautophagie lysosomale représente la principale voie protéolytique stimulée en réponse à limitation des éléments nutritifs.

Au cours de ce processus, les constituants cytoplasmiques, y compris les organites, sont séquestrés par une structure pré-autophagosomale (PAS) afin de générer une vésicule appelée autophagosome (Mortimore et al., 1989). Celui-ci fusionne ensuite avec un lysosome pour devenir un autolysosome, où les constituants séquestrés sont dégradés (Mortimore et al., 1996).

Les principales protéines formant l'autophagosome sont les Atg [Autophagy-specific genes (Ohsumi, 2001)]. Leurs ARNm sont largement exprimés dans les tissus humains et murins, et sont abondants dans le muscle squelettique (Mizushima et al., 1998; Yan et al., 1998). Des modifications post-traductionnelles des protéines Atg sont importantes pour la séquestration macroautophagique (Mizushima et al., 2002). Ces modifications post-traductionnelles de modification :

i. la conjugaison des protéines Atg12 et Atg5 (Mizushima et al., 1998), et

ii. la conjugaison de la chaîne légère de la protéine associée aux microtubules 3 (LC3 ;
 Atg8 chez les mammifères) à la membrane phospholipidique (Kabeya et al., 2000).

Les cellules de mammifères expriment deux autres homologues de LC3/Atg8, le Golgiassociated ATPase enhancer de 16 kDa (GATE-16) et l'acide-aminobutyrique receptorassociated protein (GABARAP), qui pourraient avoir des fonctions redondantes (Tanida et al., 2004). La séquestration macroautophagique implique également deux autres composants multiprotéiques. Le premier complexe contient une protéine kinase Atg1 (Kamada et al., 2000), dont l'homologue potentiel chez les mammifères est également appelé Ulk1 (Yan et al., 1998). Le second complexe contient des PI3K de classe III (PI3K<sub>III</sub>), et Beclin1 (Atg6 chez les mammifères) (Kihara et al., 2001a; Kihara et al., 2001b). Le modèle actuel pour la séquestration macroautophagique implique les étapes suivantes [Figure 17 ; (Mizushima et al., 2002; Mizushima et al., 2001; Suzuki et al., 2001)].



Figure 17 : Représentation schématique de la formation de l'autolysosome.

Les complexes PI3K<sub>III</sub> et Atg12-Atg5 sont probablement requis pour la génération de la structure pré-autophagosomale, et LC3, conjuguée aux lipides, est associée à l'élongation des membranes d'isolation. Le complexe Atg1 permet de finaliser l'autophagosome, avant qu'il ne fusionne avec le lysosome.

Des études sur des myotubes en culture ont révélé que l'autophagie était la principale voie impliquée dans la régulation de la protéolyse dépendant des acides aminés dans les myotubes (Mordier et al., 2000). L'analyse des voies de transduction, par lesquelles la limitation en acides aminés relaye la macroautophagie, fournit une preuve supplémentaire que la stimulation de l'activité PI3K du complexe PI3K<sub>III</sub>-Beclin1/Atg6 joue un rôle majeur (Tassa et al., 2003). Pour identifier les tissus dans lesquels la macroautophagie se produit *in vivo*, Mizushima et coll. ont généré des souris transgéniques exprimant LC3 fusionnée à la protéine fluorescente verte [GFP-LC3, (Mizushima et al., 2004)]. Dans cette étude, les muscles squelettiques montrent une très nette induction de la macroautophagie en réponse à la privation de nourriture, principalement dans les fibres rapides.

Un autre domaine de recherche sur la protéolyse au cours de l'atrophie musculaire est l'étude des mécanismes d'interaction entre le lysosome et l'UPS. Comme pour les calpaïnes, il semble que le lysosome et l'UPS travaillent ensemble pour dégrader les protéines. Le type de modification ubiquitine constitue le signal qui détermine laquelle de ces voies est utilisée : une protéine polyubiquitinée sera reconnue et dégradée par le protéasome et une protéine mono- ou di-ubiquitinée par le lysosome. c. Rôle de l'UPS.

Comme il a été précédemment évoqué, il semble que l'essentiel de la dégradation des protéines myofibrillaires au cours de l'atrophie musculaire se produise par la voie de l'ubiquitine-protéasome dépendante l'ATP [UPS, voir pour revue (Jagoe et al., 2001 ; Lecker et al., 1999)]. Le processus d'ubiquitination du substrat implique l'interaction coopérative d'au moins trois classes de protéines appelées enzymes E1 (activant l'ubiquitine), E2 (conjuguant l'ubiquitine) et E3 [liant l'ubiquitine, Figure 15, voir pour revue (Glickman and Ciechanover, 2002)]. De nombreuses sous-unités du protéasome sont surexprimées en cas d'atrophie musculaire (Stevenson et al., 2003; Taillandier et al., 1996).

De toutes les protéines impliquées dans l'ubiquitination de substrats, les ubiquitine ligases sont celles qui semblent avoir le plus de spécificité à la fois pour le tissu et pour le substrat (Hershko and Ciechanover, 1998). Deux groupes ont simultanément identifié une ubiquitine ligase (E3), spécifique du muscle, atrogin-1/MAFbx, possédant une F-box (forkhead box) et étant nettement surexprimée suite à une atrophie musculaire (Bodine et al., 2001a) et à une cachexie (Gomes et al., 2001). Lorsque les souris knock-out pour MAFbx sont soumises à de la dénervation musculaire, l'atrophie du gastrocnémien est atténuée de plus 50 % (Bodine et al., 2001a). Une autre E3 augmentée dans l'atrophie musculaire et contenant un « ring-finger »a également été caractérisée (Bodine et al., 2001a) : MuRF1 (muscle RING finger 1). Les souris knock-out pour MuRF1 montrent une atténuation de plus de 30 % de l'atrophie musculaire après 14 jours de dénervation du gastrocnémien (Bodine et al., 2001a).

Une autre ubiquitine, l'ubiquitine C, appartenant à la classe des enzymes conjuguant l'ubiquitine est également surexprimée dans le cas d'une atrophie, montrant ainsi l'importance des différents composants de l'UPS.

I.4.2.3.2 La voie FOXO.

Dans le muscle squelettique, la famille des FoxO (forkhead box, sub-group O) est constituée de trois isoformes : FoxO1, FoxO3, et FoxO4. Akt les phosphoryle, provoquant ainsi leur export du noyau vers le cytoplasme. La réduction de l'activité d'Akt observée dans différents modèles d'atrophie musculaire entraîne une diminution des niveaux de FoxO phosphorylé dans le cytoplasme et une augmentation de la protéine nucléaire. La translocation et l'activité des membres de la famille FoxO est requise pour l'augmentation des niveaux d'atrophie musculaire entraîne une foxO est requise pour l'augmentation des niveaux d'atrophie musculaire entraîne la famille FoxO est requise pour l'augmentation des niveaux d'atrophie musculaire entraîne la famille FoxO est requise pour l'augmentation des niveaux d'atrophie musculaire entraîne set suffisant pour induire l'expression de

l'atrogin-1 et l'atrophie musculaire lorsqu'il est transfecté dans des muscles squelettiques in vivo (Sandri et al., 2004). De même, chez les souris surexprimant FoxO1, la masse musculaire est nettement réduite et les fibres sont atrophiées, soutenant l'idée que FoxO est suffisant pour induire la fonte musculaire [(Kamei et al., 2004; Southgate et al., 2007), Figure 14]. D'autre part, la suppression de l'expression de FoxO par ARNi est capable de bloquer l'augmentation des niveaux d'expression d'atrogin-1/MAFbx au cours de l'atrophie musculaire (Liu et al., 2007; Sandri et al., 2004). AKT n'est pas le seul facteur se situant à l'interface entre hypertrophie et atrophie musculaire. En effet, l'activation de FoxO augmente les niveaux de 4EBP1 et diminue ceux de Raptor et mTOR (Southgate et al., 2007). Ainsi, lorsque l'activité d'AKT est diminuée et que celle de FoxO est induite, la synthèse des protéines est abolie. Ceci n'est pas trivial, puisque l'activité de FoxO est régulée par différentes modifications post-traductionnelles, comprenant la phosphorylation, l'acétylation et la mono- et poly-ubiguitination [(Huang and Tindall, 2007); Figure 14]. La plupart de ces mécanismes de régulation sont indépendants d'AKT, et pourraient jouer un rôle dans l'atrophie musculaire. De manière intéressante, il a été montré que FOXO3 avait également un contrôle sur le processus autophagique en régulant l'expression de gène liés à l'autophagie tels que LC3 et BNIP3 (Mammucari et al., 2007).

## 1.4.2.4 Autres voies et molécules impliquées dans l'atrophie musculaire.

I.4.2.4.1 La myostatine.

Une protéine appartenant à la famille des TGF- $\beta$ , la myostatine, est un puissant inhibiteur de la croissance musculaire (McMahon et al., 2003; Sharma et al., 2001). En effet, l'invalidation de la myostatine aboutit à une hypertrophie chez la souris (Clop et al., 2006; Lee and McPherron, 2001; McPherron and Lee, 1997; Schuelke et al., 2004; Welle et al., 2007). L'augmentation de la masse musculaire est une conséquence de l'hyperplasie (augmentation du nombre de cellules) et de l'hypertrophie (augmentation de la taille des cellules). L'hyperplasie suggère une activation des cellules souches musculaires, et la voie de signalisation de la myostatine influence l'expression de Pax 7, MyoD et de la myogénine, en inhibant l'activation des cellules satellites et la différenciation (lezzi et al., 2004; McFarlane et al., 2008; McFarlane et al., 2006). Cependant, l'augmentation de la masse musculaire chez les souris KO myostatine n'est pas corrélée à une augmentation de la force musculaire (Amthor et al., 2007).

L'inhibition de la myostatine est bénéfique pour le maintien de la masse musculaire chez des modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne dans lesquels la contribution des cellules satellites aux cycles de régénération est importante (Minetti et al., 2006; Wagner et al., 2002).

Une administration systémique ainsi qu'une expression ectopique de la myostatine induisent une atrophie musculaire chez la souris (Lange et al., 2005; Zimmers et al., 2002) et dans les cellules en cultures (Taylor et al., 2001). De plus, l'expression de la myostatine est augmentée dans différents types d'atrophies (Carlson et al., 1999; Lalani et al., 2000; Ma et al., 2003; Wojcik et al., 2008)]. Elle est, par ailleurs, capable d'induire une cachexie via la voie FOXO1 (Costelli et al., 2008; Gonzalez-Cadavid et al., 1998; McFarlane et al., 2006) et de diminuer la voie Akt/mTOR, conférant ainsi à la myostatine un nouveau rôle dans le contrôle de la régulation de l'atrophie (Amirouche et al., 2009; Trendelenburg et al., 2009).

I.4.2.4.2 TNF- $\alpha$  et autres cytokines.

Il existe une importante littérature concernant le rôle des cytokines dans l'atrophie musculaire ; cependant les résultats obtenus restent controversés. Certains montrant que TNF- $\alpha$  ainsi que d'autres cytokines comme IL-1 et IL-6 seraient induits au cours de la cachexie (Li et al., 1998; Moldawer and Copeland, 1997) et que celle-ce peut être induite par l'administration de TNF- $\alpha$  (Combaret et al., 2002).

A l'inverse, d'autres études supportent l'idée qu'il n'y a aucune évidence que le TNF- $\alpha$  ou d'autres cytokines soient impliquées dans l'atrophie, du fait que les niveaux d'expression de TNF- $\alpha$  sont similaire dans un muscle déchargé et un muscle contrôle (Hunter et al., 2002).

I.4.2.4.3 Le stress oxydatif.

Les radicaux libres oxygénés (dont la terminologie anglaise est ROS : reactive oxygen species) sont induits au cours d'une atrophie musculaire, et les niveaux de leurs enzymes de dégradation diminués (Lawler et al., 2003; Muller et al., 2007). De plus, différentes études suggèrent que des composants de l'UPS sont activés de façon transcriptionnelle par les ROS (Gomes-Marcondes and Tisdale, 2002; Li et al., 2003b) dans des cellules musculaires différenciées. Les ROS sont également capables d'activer les voies NF-κB et FOXO, via l'atrogine-1 (Furukawa-Hibi et al., 2002; Li et al., 1998; Sandri et al., 2004) et pourraient contribuer à la fonte musculaire liée aux cytokines (Li et al., 1998).

I.4.2.4.4 La voie de signalisation NF- $\kappa$ B.

NF- $\kappa$ B représente une famille de cinq facteurs de transcription [p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p52 et p50] exprimés dans le muscle squelettique (Hunter et al., 2002) et participant à un grand nombre de voies de signalisation (Baldwin et al., 1990). Suite à l'ubiquitination et dégradation de la protéine inhibitrice I $\kappa$ B, qui lie les hétérodimères NF- $\kappa$ B et les maintient dans le cytosol, les hétérodimères sont activés et transloqués dans le noyau.

Le complexe de facteurs de transcription NF- $\kappa$ B a été impliqué dans l'atrophie musculaire à la fois dans le cas d'une immobilisation musculaire et de la cachexie (Cai et al., 2004; Farid et al., 2005), mais les membres spécifiques impliqués dans les deux types d'atrophies sont distincts.

Concernant l'immobilisation musculaire, des expériences de surexpression et de KO ont montré que les facteurs p50 et Bcl-3 (un membre nucléaire de la famille I $\kappa$ B) étaient les principaux facteurs impliqués (Hunter and Kandarian, 2004; Hunter et al., 2002). Les gènes cibles de NF- $\kappa$ B restent cependant à déterminer (Bar-Shai et al., 2005).

## 1.5 Propriétés métaboliques du muscle.

La contraction musculaire nécessite une grande quantité d'énergie. Cela fait du muscle squelettique l'un des principaux organes métaboliques, tant du point de vue de la consommation de glucides que de lipides. Ce paragraphe se propose de détailler les propriétés métaboliques du muscle squelettique.

#### I.5.1 Propriétés des fibres musculaires.

La musculature du corps est composée de différents types de muscles squelettiques, certains ayant une apparence rouge tel que le soléaire, d'autre une apparence blanche tel que le quadriceps. Chaque muscle squelettique est caractérisé par des types de fibres musculaires qui diffèrent par leurs propriétés biochimiques, leur physiologie et leurs paramètres métaboliques.

Plusieurs classifications basées sur la révélation des propriétés contractiles ou métaboliques ont été établies. L'activité ATPasique des fibres a tout d'abord été utilisée pour les classer selon leur vitesse de contraction. La combinaison de plusieurs pH d'incubation des fibres selon la méthode de Brooke et Kaiser (Brooke and Kaiser, 1970), a permis de distinguer trois types de fibres : les fibres de type I (contraction lente), IIA et IIB (contraction rapide). D'autres auteurs, tels que Peter et coll., ont combiné la révélation du type contractile par l'activité ATPasique, avec le type métabolique par l'analyse de l'activité du métabolisme oxydatif telle que la succinate déshydrogénase [SDH ; (Peter et al., 1972)]. Ainsi, les fibres de type I sont des fibres lentes à métabolisme oxydatif, les fibres IIA sont intermédiaires à tendance rapide avec un métabolisme oxydo-glycolytique, et les IIB sont rapides avec un métabolisme glycolytique. Enfin, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les chaînes lourdes de myosine (MHC) a permis de déterminer un quatrième type de fibres de type intermédiaire les fibres IID ou IIX. La classification des fibres et leurs propriétés sont résumées dans le Tableau 1.

En plus de ces quatre types de fibres dites pures, l'utilisation d'anticorps anti-MHCs a permis de mettre en évidence des fibres hybrides qui peuvent exprimer simultanément deux à quatre isoformes des MHCs (Termin et al., 1989). Ces fibres hybrides résultent de la transition de l'expression des MHCs qui, chez les mammifères, se fait selon la séquence suivante : I→IIa→IId→IIb. Ces transitions ont lieu avec l'âge, mais aussi sous l'influence de facteurs particuliers tels que l'exercice (Pette, 1984; Peuker et al., 1999).

Type de fibres / MHC	I	IIA	IIX	IIB
Contraction	Lente	Rapide		
Activité ATPasique	Faible	Forte		
Métabolisme	Oxydatif	Oxydo-glycolytique		Glycolytique
Résistance à la fatigue	+++	++	+	+
Nombre de mitochondries	+++	++	+	+

 Tableau 1 : Caractéristiques biochimique, métabolique et contractile des différentes fibres musculaires chez la souris.

#### I.5.2 Production d'énergie par le muscle squelettique.

L'ATP est l'unité énergétique de base du muscle squelettique. Cependant, la concentration en ATP intramusculaire est faible (environ 5-6 mmol/kg de muscle), et il est donc nécessaire qu'il soit synthétisé rapidement au cours de l'exercice. L'ATP est fourni par la dégradation de substrats, soit de manière anaérobie (créatine phosphate, utilisation du glycogène dans la glycolyse anaérobie), soit de manière aérobie (métabolisme oxydatif des hydrates de carbone et des lipides). L'utilisation du métabolisme aérobie versus anaérobie est fonction du type d'exercice, le premier étant privilégié lors d'exercices d'endurance.

#### I.5.2.1 Métabolisme anaérobie.

Pendant des exercices de forte intensité et de courte durée, l'hydrolyse de la créatine phosphate et la dégradation du glycogène en lactate sont les voies de signalisation majeures conduisant à la production d'énergie.

I.5.2.1.1 Hydrolyse de la phosphocréatine.

La créatine peut provenir de l'alimentation ou être synthétisée à partir d'acides aminés dans le foie. La créatine circulante est captée par le muscle, où elle est phosphorylée par la créatine kinase en présence d'ATP selon la réaction :  $Cr + ATP \longrightarrow PCr + ADP + H^+$ .

Comme la concentration en phosphocréatine est élevée dans le muscle, l'interconversion de la PCr en ATP est très rapide. Au repos, environ 80% de la créatine contenue dans les fibres musculaires est présente sous forme de PCr, à une concentration environ cinq fois plus élevée que l'ATP. La quantité d'énergie qui peut être obtenue à partir

#### INTRODUCTION

de la PCr est de courte durée car elle est limitée par la concentration intramusculaire en PCr. En effet, les fibres rapides contiennent 15 à 20 % de PCr en plus que les fibres lentes (Soderlund and Hultman, 1991).

I.5.2.1.2 Utilisation du glycogène intramusculaire.

Chez l'homme, le muscle squelettique est le site majeur de stockage du glucose sous la forme de glycogène. Les fibres musculaires possèdent des capacités de stockage différentes, les fibres de type II glycolytiques présentant des niveaux de glycogène plus élevés que les fibres de type I oxydatives.

Au repos, le stockage du glucose en glycogène est stimulé par la signalisation insulinique qui contrôle la captation du glucose sanguin par le muscle. Ce processus est réalisé par un transporteur, GLUT4, qui est transloqué au niveau de la membrane plasmique (Tremblay et al., 2003). Une fois dans le muscle, le glucose est soit phosphorylé en glucose 6-phosphate par l'hexokinase, soit converti en glucose 1-phosphate qui sera ensuite métabolisé pour la synthèse du glycogène (Greenberg et al., 2006).

Au cours de l'exercice, la captation du glucose sanguin par le muscle est également favorisée par l'AMPK (AMP activated protein kinase). Cette dernière est une sérine/thréonine kinase qui est activée par la déplétion en composés énergétiques phosphorylés. Elle stimule la translocation de GLUT4 à la membrane et permet de capter des quantités plus importantes de glucose (Jorgensen et al., 2006).

Le glucose et le glycogène subissent ensuite une série de réactions conduisant à la formation de pyruvate. Les réactions de la glycolyse et glycogénolyse sont détaillées sur la Figure 18.

La glycolyse remplit deux fonctions, la première en condition anaérobie où elle peut générer une quantité importante d'énergie mais limitée, notamment par l'accumulation de lactate et l'acidification de la fibre musculaire. La seconde fonction, en condition aérobie, permet de générer du pyruvate qui sera utilisé comme substrat par le métabolisme oxydatif au niveau de la mitochondrie.



Figure 18 : Schéma général de la glycolyse.

### I.5.2.2 Métabolisme aérobie.

I.5.2.2.1 Métabolisme des hydrates de carbones.

Le pyruvate issu de la glycolyse entre dans la mitochondrie où il est soit décarboxylé en oxaloacétate, qui est un intermédiaire du cycle de Krebs, soit transformé en acétyl-CoA par

la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA est également le point d'entrée des acides gras et des acides aminés dans le cycle de Krebs (Figure 19).

L'oxydation du pyruvate varie en fonction du type de fibre. Ainsi, les fibres oxydatives possèdent une capacité plus élevée à l'oxyder que les fibres glycolytiques (Jackman and Willis, 1996; Ponsot et al., 2005).



Figure 19 : Schéma général du cycle de Krebs.

I.5.2.2.2 Utilisation des acides gras.

Que ce soit au repos ou pendant l'exercice, le muscle squelettique est le site principal de l'oxydation des acides gras (AG). Les AG sont la source d'énergie utilisée de manière prédominante au repos ou encore après une mise à jeun. Lors d'exercices de faible intensité, l'oxydation des AG est augmentée, tandis qu'elle est réduite lors d'exercices de forte intensité. Les acides gras libres sont stockés dans le tissu adipeux sous la forme de triglycérides. En cas de besoins énergétiques accrus, les triglycérides sont hydrolysés par la triglycéride lipase (lipolyse) et transportés par voie sanguine jusqu'au muscle squelettique par l'albumine. La lipolyse se fait sous le contrôle d'hormones : elle est stimulée par l'épinéphrine et inhibée par l'insuline. Le passage au travers du sarcolemme est réalisé via des transporteurs : la pmFABP (Plasma membrane Fatty Acid Binding Protein), la FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase), et la FATP (Fatty Acid Transport Protein).



Figure 20 : Transport des acides gras dans la matrice mitochondriale. D'après (Jeukendrup, 2002).

Dans le sarcoplasme, les acides gras sont activés par l'acyl-CoA synthétase (ou thiokinase) pour former un complexe acyl-CoA. Ce complexe peut être utilisé pour la synthèse des triglycérides intramusculaires ou lié à la carnitine sous l'influence d'une enzyme, la carnitine palmitoyl-transférase I (CPT1), localisée au niveau de la membrane mitochondriale externe. La liaison de la carnitine aux AG activés pour former l'acyl-carnitine

est la première étape du transport des AG dans la mitochondrie. L'acyl-carnitine est transportée dans la matrice mitochondriale par une translocase (carnitine/acyl-carnitine translocase) localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Puis, dans la matrice mitochondriale, elle est de nouveau convertie en acyl-CoA par la carnitine palmitoyl transférase II (CPTII) (Jeukendrup, 2002). L'acyl-CoA commence le cycle de la  $\beta$ -oxydation et la carnitine libérée retourne dans le cytoplasme et devient de nouveau disponible pour le transport d'autres AG (Figure 20).

La  $\beta$ -oxydation (Figure 21) est une suite de quatre réactions entraînant la transformation de l'acyl-CoA en acétyl-CoA. La première étape est la déshydrogénation de l'acyl-CoA en présence de FAD. Cette réaction est catalysée par une oxydoréductase (l'acyl-CoA déshydrogénase). Puis, l'action de la crotonase conduit au  $\beta$ -hydroxyacylCoA qui sera alors déshydrogéné en présence de NAD. Enfin, la coupure de la chaîne carbonée conduit à la libération d'acétyl-CoA qui peut alors entrer dans le cycle de Krebs.

L'oxydation des substrats par le cycle de Krebs et la  $\beta$ -oxydation entraîne la réduction du NAD<sup>+</sup> en NADH et du FAD<sup>2+</sup> en FADH<sub>2</sub> qui fournissent les électrons à la chaîne respiratoire.



Figure 21 : Schéma général de la β-oxydation.

I.5.2.2.3 La navette Malate/Aspartate.

Cette navette permet de régénérer dans le cytosol du NAD<sup>+</sup> utilisé au cours de la glycolyse, en réduisant l'oxaloacétate (OOA) en malate. Le malate est transporté dans la matrice mitochondriale par translocation au niveau de la dicarboxylate translocase. Sous l'action de la malate déshydrogénase, le malate est transformé en OOA et du NAD<sup>+</sup> est réduit en NADH. L'OOA ne pouvant être transféré directement à travers les membranes mitochondriales, deux réactions de transamination permettent son transfert dans le cytosol. Cette navette est décrite comme la navette dominante dans les fibres cardiaques et squelettiques de type I (Jackman and Willis, 1996).

I.5.2.2.4 La navette du Glycérol-3-Phosphate (G3-P).

Cette navette permet la régénération cytoplasmique de NAD<sup>+</sup> contre la formation, au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, de FADH<sub>2</sub> qui cèdera ses électrons au complexe II de la chaîne respiratoire. Le G3-P diffuse jusqu'à la membrane interne où la glycérol phosphate déshydrogénase le transforme en dihydroxyacétone phosphate, en réduisant le FAD<sup>+</sup> en FADH<sub>2</sub>. La navette G3-P est essentiellement active dans les fibres squelettiques de type II (Jackman and Willis, 1996) où, shuntant le cycle de Krebs, elle asservit la fonction mitochondriale à la glycolyse, permettant la régénération rapide de NAD<sup>+</sup>.

#### 1.5.3 La mitochondrie : site de production d'énergie au niveau du muscle.

La mitochondrie est à l'origine une bactérie indépendante, riche en composants biochimiques dont l'objectif majeur est la production d'énergie. Le mtADN encode seulement 13 protéines mitochondriales et plus particulièrement pour les complexes de la chaîne respiratoire (Taylor and Turnbull, 2005; Zeviani and Di Donato, 2004). Les protéines restantes (environ 850) sont encodées dans le noyau et transportées dans la mitochondrie.

En plus d'assurer l'approvisionnement cellulaire en énergie, les mitochondries ont d'autres rôles vitaux pour le bon fonctionnement de la cellule. Elles participent à l'homéostasie calcique, à la régulation du pH intracellulaire, à la synthèse d'hormones stéroïdes (l'aldostérone synthase, la 11 $\beta$ -hydroxylase et l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol étant des enzymes mitochondriales) et des hèmes, ainsi qu'à la régulation de la thermogenèse. De plus, elles constituent un des principaux sites de production des radicaux libres.

## I.5.3.1 Structure.

La mitochondrie est un organite hautement spécialisé dans la transformation d'énergie, elle est de forme longitudinale et contient deux membranes (Figure 22).



Figure 22 : Schéma représentatif d'une mitochondrie.

I.5.3.1.1. La membrane externe.

C'est une membrane dans laquelle un nombre important de protéines sont enchâssées. Ces protéines permettent les échanges entre le cytosol et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie en formant des pores qui autorisent, d'une part la translocation de protéines (TOM), et d'autre part permettent les échanges de métabolites de petit poids moléculaire via des porines. La porine, également appelée voltage dependant anion channel (VDAC), est la principale voie par laquelle transitent les métabolites régulant la respiration mitochondriale. Les trois isoformes dénombrés chez les mammifères (VDAC1, VDAC2, VDAC3) présentent des différences de perméabilité et joueraient un rôle différent dans la régulation de la fonction mitochondriale (Anflous et al., 1998; Xu et al., 1999). I.5.3.1.2. L'espace inter-membranaire.

L'espace inter-membranaire se situe entre les deux membranes, et contient des protéines qui jouent un rôle majeur dans l'énergétique mitochondriale et la mort cellulaire (Duchen, 2004). La créatine kinase mitochondriale (mi-CK) occupe un rôle prépondérant dans le transfert d'énergie. Fixée sur la membrane interne, elle a un accès privilégié à l'ADP, généré dans la matrice mitochondriale et transporté dans l'espace inter-membranaire par l'adénine nucléotide translocase (ANT). L'ANT est constituée de deux sous-unités de 32 kDa et d'un site unique de liaison à l'ATP ou l'ADP. Selon sa conformation, elle fait face, alternativement, à la matrice ou à l'espace inter-membranaire. L'ATP mitochondriale est échangée par l'ADP cytosolique dans un rapport 1:1. La mi-CK, couplée à la membrane externe, pourrait être impliquée dans la régulation de l'importation de créatine dans l'espace inter-membranaire et dans l'exportation de la PCr dans le cytosol (Wallimann et al., 1992).

I.5.3.1.3. La membrane interne.

La membrane interne présente une perméabilité réduite et sélective. Elle forme la barrière la plus distincte entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Cette perméabilité sélective permet de maintenir un gradient de concentration pour les protéines, les ions et les métabolites. Des transporteurs permettent les échanges entre les compartiments et participent au bon fonctionnement de la mitochondrie. Les complexes de la chaîne respiratoire sont représentés par 5 complexes protéiques, dont l'ATP synthase, ancrés dans la membrane interne. Ils assurent le maintien du gradient de proton et la formation d'ATP.

#### 1.5.3.2 Distribution dans la cellule musculaire.

L'utilisation de sondes fluorescentes a permis de décrire la mitochondrie comme un réticulum ou un réseau dynamique et continu qui entre continuellement en fusion ou en fission (Duchen, 2004). Ces analyses ont permis de regrouper les mitochondries en deux groupes : les mitochondries inter-fibrillaires et subsarcolemmales. Ces deux types d'organelles présentent des propriétés biochimiques et des niveaux d'activité enzymatique différents, et semblent répondre différemment au stress métabolique (Lesnefsky and Hoppel, 2003). Les mitochondries sont ancrées dans la cellule grâce à des protéines du cytosquelette et peuvent se déplacer grâce à des protéines dites motrices telles que les myosines, la dynéine ou la kinésine.

1.5.3.3 Fonctionnement de la mitochondrie.

I.5.3.3.1. La chaîne de transport des électrons.

Les éléments clés de la mitochondrie sont d'une part, les réactions enzymatiques d'oxydation des substrats énergétiques et, d'autre part, la chaîne de transport des électrons ou chaîne respiratoire (Figure 23). L'oxydation des substrats par le cycle de Krebs ou la β-oxydation entraîne la réduction du NAD<sup>+</sup> en NADH et du FAD<sup>2+</sup> en FADH<sub>2</sub>. Ces intermédiaires sont appelés équivalents réducteurs, et fournissent des électrons à la chaîne respiratoire. Cette dernière est composée de cinq complexes : le complexe I ou NADH déshydrogénase, le complexe II ou succinate déshydrogénase, le complexe III ou ubiquinol cytochrome c réductase, le complexe IV ou cytochrome c oxydase et le complexe V ou ATP synthase.

Tous sont composés de plusieurs sous-unités protéiques. Seul le complexe II est entièrement encodé dans le noyau tandis que les autres complexes résultent de l'association de protéines encodées par les ADN nucléaires et mitochondriaux (Taylor and Turnbull, 2005; Zeviani and Di Donato, 2004).



#### Figure 23 : Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons.

Les électrons sont apportés dans la chaîne respiratoire par le NADH et le FADH<sub>2</sub>, puis passent par le coenzyme Q, le complexe III et le cytochrome C, pour être utilisés au niveau du complexe IV pour réduire l'oxygène et former de l'eau. Le passage des électrons au travers de la chaîne respiratoire permet le passage des protons (H<sup>+</sup>) dans l'espace intermembranaire. Le gradient protonique ainsi créé permet la synthèse d'ATP au niveau du complexe V.

I.5.3.3.2. La phosphorylation oxydative.

Les électrons sont transportés par le NADH et le FADH<sub>2</sub>, respectivement aux complexes I et II qui transfèrent l'électron à l'ubisemiquinone, cette dernière l'acheminant au complexe III. L'arrivée de l'électron au complexe IV constitue la fin de la chaîne d'oxydo-réduction et entraîne la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Les réactions associées au passage de l'électron au niveau des complexes I, III et IV entraînent le passage d'un proton vers l'espace inter-membranaire à travers chaque complexe. Ce passage établit un gradient électrochimique de protons qui crée une force proton motrice utilisée par le complexe V pour phosphoryler des molécules d'ADP et ATP, assurant le couplage de la chaîne des oxydo-réductions avec la production d'ATP [Figure 23, (Stock et al., 1999)].

La cytochrome c oxydase (COX), accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire (Weibel et al., 1991), est une enzyme cruciale pour la respiration mitochondriale. Elle fait partie du complexe IV de la chaîne respiratoire, et permet de catalyser la réaction suivante :  $2O_2 + 4H^+ + 4 e^- \rightarrow 2H_20$ . Cette réaction représente une étape participant à la limitation de la vitesse de la phosphorylation oxydative (Richardson et al., 1999; Severinghaus, 1994).

I.5.3.3.3. La production de radicaux libres oxygénés.

La mitochondrie est également un site majeur de production des ROS à travers les complexes de la chaîne respiratoire (Boveris et al., 1972).

La production de ROS correspond à la réduction de la molécule d'O<sub>2</sub> en anion superoxyde ( $O_2^{-}$ ). Des molécules telles que l'hydrogène peroxyde ( $H_2O_2$ ) ou d'hydroxyle (OH•) sont des ROS. Leur production, de manière enzymatique ou non, est possible au niveau de plusieurs sites de la mitochondrie (au niveau des complexes I et III, de la matrice et de la membrane externe). D'un point de vue fonctionnel, le complexe I apparaît comme la source principale de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Barja, 1999; Turrens, 2003). La production de ROS par le complexe III a été démontrée, mais elle nécessite des conditions physiologiques spécifiques (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006; Turrens et al., 1985). La majeure partie de l'O<sub>2</sub> est complètement réduite au niveau du complexe IV, mais une faible partie (environ 5 %) va être impliquée dans la fabrication de ROS (Turrens, 2003).

Le stress oxydant est un processus physiologique ou physiopathologique résultant d'un déséquilibre entre la production de ROS et la capacité anti-oxydante de l'organisme. L'augmentation de ce stress joue un rôle important dans la signalisation cellulaire (Droge,

2002) et peut entraîner des réactions en chaîne délétères pour la mitochondrie et/ou la cellule, ayant pour cible des protéines, des lipides ou encore l'ADN mitochondrial (Turrens, 2003).

La quantité de ROS produite augmente avec l'activité contractile, principalement par des réactions extra-mitochondriales, car la production de ROS d'origine mitochondriale diminue avec l'activation de la respiration (Pattwell and Jackson, 2004; Pattwell et al., 2004). Les ROS sont responsables de l'altération de l'activité transcriptionnelle de certains facteurs de transcriptions tels que NF-κB, AP-1, IL-6, Egr-1 (Pattwell and Jackson, 2004) et ont un impact négatif sur la biogenèse mitochondriale.

#### 1.5.3.4 Les substrats énergétiques de la mitochondrie.

L'énergie nécessaire à la contraction musculaire est produite par trois voies métaboliques indépendantes. Seul le métabolisme aérobie nécessite de l'O<sub>2</sub> et se déroule dans la mitochondrie. Pour cela, les substrats entrent dans la mitochondrie selon les différentes voies évoquées précédemment en sollicitant différentes navettes avant d'être dégradés pour fournir des électrons à la chaîne respiratoire.

#### 1.5.3.5 Facteurs contrôlant la biogenèse mitochondriale.

Le muscle squelettique présente des capacités remarquables d'adaptation à un nombre important de conditions physiologiques et physiopathologiques. En particulier, l'un des phénotypes les plus marquants est l'adaptation du muscle en réponse à un exercice prolongé. Lors de la transition des fibres musculaires d'un type glycolytique à un type oxydatif, on observe une augmentation du nombre de mitochondries. Ce paragraphe se propose d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la biogenèse mitochondriale dans ces conditions.

#### I.5.3.5.1 Calcineurine/NFAT.

La calcineurine est une phosphatase hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique A et d'une sous-unité régulatrice B capable de lier le calcium. Le calcium, libéré au cours de la contraction musculaire, se fixe au niveau de la sous-unité régulatrice de la calcineurine. Cette liaison entraîne l'activation de la protéine qui va déphosphoryler le facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). Ce dernier migre alors du

cytoplasme au noyau, où il active la transcription des gènes impliqués dans le phénotype musculaire lent [MHCI, myoglobine, troponine lente...; Figure 24; (Liu et al., 2005b)].

L'importance de cette voie de signalisation dans la plasticité musculaire a été mise en évidence par plusieurs études réalisées *in vivo*. Il a notamment été démontré que l'administration de cyclosporine A (un inhibiteur spécifique de la calcineurine) à des rats pendant six semaines, entraînait une augmentation du nombre de fibres rapides dans les muscles de ces animaux (Chin et al., 1998). De plus, des souris transgéniques qui surexpriment la calcineurine sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase musculaire présentent une conversion de fibres rapides en lentes, ainsi qu'une augmentation de l'expression des protéines oxydatives telle que la myoglobine (Naya et al., 2000). En outre, chez des souris KO pour l'isoforme  $\alpha$  ou l'isoforme  $\beta$  de la sous unité catalytique de la calcineurine, il a été observé une réduction des fibres lentes (Parsons et al., 2003). Enfin, des souris transgéniques où la sous-unité régulatrice de la calcineurine est invalidée spécifiquement dans le muscle squelettique, présentent une importante diminution de l'expression de MHCI et MHCIIa, ainsi qu'une diminution du nombre de fibres lentes (Parsons et al., 2004).



## Figure 24 : Activation des gènes impliqués dans la formation des fibres lentes par la voie calcineurine/NFAT.

Le calcium libéré au cours de la contraction musculaire entraîne l'activation de la calcineurine (CaN\*). Cette dernière déphosphoryle le facteur de transcription NFAT qui peut alors migrer dans le noyau et activer la transcription des gènes impliqués dans le phénotype musculaire lent. D'après (Liu et al., 2005b).

I.5.3.5.2 Calmoduline kinase/MEF2/HDAC.

MEF2 (Myocyte Enhancer factor-2) est un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes spécifiques du phénotype musculaire lent. Les sites de liaison à MEF2 sur les gènes cibles sont à proximité des sites de liaison à NFAT (Chin et al., 1998). L'activité transcriptionnelle de MEF2 est inhibée par les membres de la famille des HDAC (histones désacétylases de classe II ; HDAC4, 5, 7 et 9) qui forment un complexe avec MEF2 dans le noyau. La répression de MEF2 est dépendante du statut de phosphorylation des HDACs II, lui-même régulé par la calmoduline Kinase (CaMK). Suite à l'élévation de calcium durant la contraction musculaire, la CaMK est activée, et phosphoryle les HDACs II dans le noyau. Cette phosphorylation entraîne la liaison d'une protéine chaperonne (14-3-3) aux HDACs II et leur exportation dans le cytoplasme [Figure 25, (Liu et al., 2005b)].



## Figure 25 : Activation des gènes impliqués dans la formation des fibres lentes par la voie Calmoduline Kinase/MEF2.

Le calcium libéré au cours de la contraction musculaire entraîne l'activation de la calmoduline kinase (CaMK) qui phosphoryle les HDACs II, permettant ainsi la dérépression de MEF2 et l'activation de la transcription des gènes impliqués dans le phénotype musculaire lent. D'après (Liu et al., 2005b).

Des études ont mis en évidence l'implication de CaMK dans le remodelage du muscle. Liu et coll. ont montré que l'addition d'un inhibiteur de la calmoduline kinase (KN-62) sur des fibres isolées empêchait la migration de HDAC 4 du noyau vers le cytoplasme (Liu et al., 2005a). De plus, des souris transgéniques qui présentent une surexpression de CamKIV spécifiquement dans le muscle squelettique présentent une augmentation de fibres de type I (Wu et al., 2002). Cependant la réalité physiologique de cette étude peut-être remise en question car des travaux plus récents ont montré que CamKIV n'est pas exprimée dans le muscle squelettique de souris (Akimoto et al., 2004). D'autres études devront être réalisées pour explorer les fonctions des autres membres de la famille des CaMK et particulièrement pour CamKII. En effet, CamKII est connu pour être sensible aux oscillations de calcium (De Koninck and Schulman, 1998) et pour être activé durant l'hypertrophie et l'adaptation aux exercices d'endurance (Chin, 2004).

I.5.3.5.3 Calcium et ATP.

La contraction musculaire induit des changements rapides au niveau des flux calciques, et de la consommation d'ATP et d'O<sub>2</sub>. Le calcium est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines mitochondriales (Ojuka et al., 2003). Cependant, d'autres gènes codant pour des protéines mitochondriales ne voient pas leur expression modifiée suite à l'élévation de calcium (Freyssenet et al., 2004). Ces résultats suggèrent donc que d'autres voies de signalisation interviennent dans ce processus. L'une d'elles consiste en l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase K), un senseur métabolique activé par le stress cellulaire, qui réduit le ratio ATP/ADP et élève le niveau d'AMP suite à l'activité de la myokinase. L'activité de l'AMPK est augmentée dans le muscle avec l'exercice (Fujii et al., 2000) et entraîne l'augmentation de l'activité de la citrate synthase et du contenu mitochondrial en UCP3 (Putman et al., 2003). La multiplicité des voies impliquées dans la plasticité musculaire est illustrée par le fait que l'activation d'un certains nombres de gènes n'est pas modifiée chez des souris dépourvues d'AMPK (Jorgensen et al., 2005).

I.5.3.5.4 Voie des MAPK.

Des exercices de forte intensité (Goodyear et al., 1996), où l'électro-stimulation (Aronson et al., 1997) activent de la voie Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase) dans le muscle squelettique. De plus, des études *in vivo* montrent que la transfection d'une forme constitutivement active de Ras dans le soléaire de rat après dénervation induit une augmentation de l'expression de MHCI (Murgia et al., 2000).

I.5.3.5.5 Conséquences de l'induction de la voie AMPK.

L'altération de l'homéostasie cellulaire liée à la contraction musculaire entraîne l'activation de kinases et de phosphatases qui vont, par des modifications post-traductionnelles, modifier l'activité des facteurs de transcription. Plusieurs kinases sont impliquées dans ces régulations.

Les acides gras sont oxydés dans le muscle squelettique quand de longues chaînes d'acyl-gras-CoA cytosoliques sont transportées dans la mitochondrie où elles vont subir la βoxydation et entrer dans le cycle de l'acide citrique afin de produire de l'ATP (McGarry and Brown, 1997). Ce processus est régulé de façon allostérique par le malonyl-CoA, un composé cytosolique dérivé du glucose qui inhibe l'activité de CPT1, une enzyme limitante de la prise en charge des acides gras par la mitochondrie (Ruderman et al., 1999). L'enzyme régulatrice ACC (acétyl-CoA carboxylase) catalyse la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, qui inhibe l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et augmente leur disponibilité pour la synthèse de triglycérides, diacylglycérole et céramides, un mécanisme qui favorise le métabolisme du glucose (Ruderman and Saha, 2006). L'AMPK active l'oxydation des acides gras dans le muscle en inactivant ACC en la phosphorylant, réduisant ainsi la synthèse de malonyl-CoA (Winder et al., 1997), et peut-être en activant la malonyl-CoA décarboxylase, l'enzyme catalysant la décarboxylation du malonyl-CoA en acétyl-CoA (Park et al., 2002; Saha et al., 2000). Cette hypothèse est confortée par le fait que les souris déficientes pour ACC2 montrent une oxydation accrue des acides gras et un stockage des graisses réduit (Abu-Elheiga et al., 2001). Ainsi, l'activité de l'AMPK (Figure 26) rectifie les défauts dans la balance énergétique en inhibant ACC pour lever, de ce fait, l'inhibition de CPT1 et permettre l'entrée de l'acyl-CoA dans la mitochondrie, puis sa  $\beta$ -oxydation (Long et al., 2006; Ruderman et al., 1999). Cependant, le malonyl-CoA ne joue pas un rôle dans la régulation de toutes les oxydations de lipides. Les autres facteurs que l'on suppose influencer l'oxydation des acides gras sont la concentration en acides gras (Helge and Kiens, 1997), la disponibilité en carnitine (Kiens, 2006) et en CoA dans la matrice mitochondriale (Rubink and Winder, 2005; Ruderman et al., 2003).


Figure 26 : Régulation de l'oxydation des lipides dans le muscle squelettique par l'AMPK.

Les stress métaboliques extérieurs (exercice, mise à jeun, hypoxie, etc.) causent une augmentation du rapport AMP/ATP. L'AMPK est activée par la liaison de l'AMP et une phosphorylation par des kinases en amont. L'AMPK phosphorylée phosphoryle et bloque l'activité de l'ACC, réduisant de ce fait la synthèse de malonyl-CoA. Cela lève l'inhibition de l'activité de CPT-1 et augmente l'import mitochondrial ainsi que la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le muscle. La production d'ATP par la mitochondrie satisfait les besoins de la cellule en énergie. D'après (Hood, 2006).

I.5.3.5.6 PCG-1α/NRF1/TFAM.

L'activation de la biogenèse mitochondriale (Figure 27) induit l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription, parmi lesquels c-fos, c-jun, Egr-1, Sp1, NRF-1 et Tfam (Pilegaard et al., 2000). Le passage vers un métabolisme plus oxydatif résulte également en une augmentation de l'ARNm et de la protéine du co-activateur PGC-1 $\alpha$  (Akimoto et al., 2005; Baar et al., 2002).

## INTRODUCTION



Figure 27 : Biogenèse mitochondriale. D'après (Hood, 2001).

## • PGC-1α, un inducteur du métabolisme oxydatif :

La découverte du facteur PGC-1a (peroxysome proliferator-activated receptor-y coactivator- 1a) fut un événement majeur dans la compréhension des mécanismes de la biogenèse mitochondriale. L'augmentation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  dans le muscle squelettique est induite par l'exercice aussi bien chez les rongeurs que l'homme (Baar et al., 2002; Russell et al., 2003). La compréhension de la fonction de PGC-1 $\alpha$  dans la biogenèse mitochondriale a été améliorée par l'utilisation de modèles animaux de gain ou de perte de fonction de ce facteur. Lin et coll. ont réalisé la surexpression de PGC-1a sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase, spécifiquement dans les fibres rapides du muscle squelettique (Lin et al., 2002). Cette surexpression résulte en une conversion de fibres rapides IIb en fibres de type IIa ainsi qu'en fibres lentes de type I (20 et 10 % respectivement) dans le plantaris. A l'inverse, des souris déficientes pour PGC-1 $\alpha$ présentent une diminution du nombre de mitochondries et une diminution des capacités respiratoires dans les muscles lents (Leone et al., 2005). Récemment, Handschin et coll. ont montré que des souris chez lesquelles PGC-1 $\alpha$  est inactivé spécifiquement dans le muscle squelettique présentaient une conversion de fibres lentes en fibres rapides, étaient moins résistantes à l'exercice avec des dommages au niveau des fibres musculaires suite à l'exercice (Handschin et al., 2007).

L'activation de la signalisation calcique suite à la contraction musculaire joue un rôle essentiel dans le contrôle de la transcription de PGC-1 $\alpha$ . Cette activation est réalisée par la calcineurine et la calmoduline kinase qui contrôlent les facteurs de transcription CREB et MEF2 (Wu et al., 2002). PGC-1 $\alpha$  s'autorégule par une boucle de rétrocontrôle positif en venant co-activer MEF2 sur son propre promoteur (Handschin et al., 2003). De plus, Zong et coll. ont montré que l'AMPK est requise pour l'induction de PGC-1 $\alpha$  au cours de l'exercice (Zong et al., 2002). Cependant, la cible transcriptionnelle de l'AMPK sur le promoteur de PGC-1 $\alpha$  n'est pas définie. PGC-1 $\alpha$  contrôle la transcription des gènes qui codent pour le phénotype fibre lente en co-activant MEF2 et stimule la biogenèse mitochondriale en co-activant NRF-1 et NRF-2 [Figure 28, (Lin et al., 2005a)].





La contraction musculaire active l'expression de PGC-1 $\alpha$ , qui s'autorégule par une boucle de rétrocontrôle positif en venant co-activer MEF2 sur son promoteur. PGC-1 $\alpha$  induit alors l'expression des gènes impliqués dans le phénotype lent ainsi que dans le métabolisme oxydatif via les NRF (Lin et al., 2005a).

Il a récemment été proposé que PGC-1α pouvait d'une part être activé par le resveratrol, un activateur de SIRT1 qui est une désacétylase (Lagouge et al., 2006), et d'autre part être inhibé par GCN5, une acétylase dont l'expression est contrôlée par SRC3 (Coste et al., 2008).

• Le facteur de transcription Tfam :

La biogenèse mitochondriale requiert l'expression des génomes nucléaires et mitochondriaux pour assurer le développement de l'organelle. La réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial sont régulées indépendamment du génome nucléaire, mais dépendent de l'expression et de l'importation de plusieurs facteurs nucléaires. L'une des protéines les plus importantes impliquée dans ce processus est Tfam (mitochondrial transcription factor A). L'activation de la transcription de Tfam est contrôlée par NRF1, Tfam est ensuite transportée dans la mitochondrie via Tom20 (Grey et al., 2000), où il est responsable de la réplication et de la transcription de l'ADN mitochondrial (Larsson et al., 1998).

## 1.6 La thermogenèse musculaire.

#### I.6.1 Le découplage mitochondrial.

#### I.6.1.1 Production de chaleur.

Dans certaines conditions, les protons peuvent entrer de nouveau dans la matrice mitochondriale sans contribuer à la production d'ATP. Ce procédé est connu sous le nom de fuite protonique ou découplage mitochondrial, et est dû à une diffusion facilité des protons dans la matrice. Ce processus résulte en une modification de l'énergie potentielle du gradient de protons et qui est libérée sous forme de chaleur (Voet et al., 2006).

#### I.6.1.2 Les protéines de découplage.

Les protéines découplantes (UCPs) sont enchâssées dans la membrane interne et permettent le passage de protons de l'espace inter-membranaire à la matrice. Ce phénomène de fuite induit un couplage incomplet entre les phosphorylations et les oxydations, appelé respiration mitochondriale découplée. Une partie de l'énergie est ainsi perdue sous forme de chaleur. La fuite des protons permettrait de diminuer la production des radicaux libres par une augmentation de l'oxydation de l'ubiquinone, et donc minimiserait le stress oxydant ainsi que les dégâts au niveau de l'ADN (Brand, 2000). Les UCPs joueraient donc un rôle de protection contre le stress oxydant (Echtay et al., 2002).

I.6.1.2.1 UCP1 et thermogenèse.

Le tissu adipeux brun (BAT) est un organe spécialisé dans la production de chaleur sans contraction musculaire, la thermogenèse non frissonnante, en particulier lors d'une exposition au froid. Ce tissu est spécifique des mammifères homéothermes, et est localisé entre autres dans les régions périaortiques, périrénales et interscapulaires. Il est essentiel chez les animaux de petites tailles comme les petits rongeurs, chez les animaux hibernants et chez tous les mammifères nouveaux-nés, y compris chez l'homme (Smith and Horwitz, 1969). Les adipocytes bruns présentent de nombreuses gouttelettes lipidiques et un grand nombre de mitochondries ayant une membrane interne extrêmement développée.

Dans les mitochondries du BAT, la respiration est fortement découplée de la synthèse d'ATP, ce qui a conduit à la recherche d'une protéine responsable de la perte de protons.

Ainsi, il a été démontré qu'une protéine de la membrane mitochondriale, appelée UCP1, était responsable de l'activité de thermogenèse (Nicholls et al., 1978), spécifiquement au niveau du BAT (Bouillaud et al., 1985; Heaton et al., 1978; Ricquier and Kader, 1976), et permettait le retour des protons à travers la membrane interne sans passer par la F0/F1-ATP synthase.

Cette voie alternative de retour des protons dans la matrice n'est donc pas couplée à la synthèse d'ATP (Figure 29), ce qui provoque une diminution du gradient électrochimique.

Par conséquent, l'activité de la chaîne respiratoire augmente afin de maintenir le potentiel membranaire et la synthèse d'ATP, ce qui nécessite un apport de substrats assuré par les lipides des gouttelettes lipidiques des adipocytes bruns. Cette augmentation des réactions métaboliques contribue à la production de chaleur.



**Figure 29 : Le découplage.** (A) L'oxydation des coenzymes libère des électrons qui réduisent l'oxygène en eau par le complexe IV, ce qui s'accompagne d'un gradient électrochimique de protons par les complexes I, III et IV. Cette force protomotrice est utilisée pour la synthèse d'ATP par la F0/F1-ATP synthase. (B) UCP1 découple la respiration de la synthèse d'ATP en constituant une voie alternative de retour des protons dans la matrice. Afin de réduire la diminution du potentiel de membrane causée par UCP1, la cellule augmente les réactions métaboliques pour alimenter la chaîne en coenzymes réduits, ce qui s'accompagne d'une production de chaleur.

L'évidence d'un rôle prépondérant pour UCP1 dans la thermogenèse adaptative est venue avec la création des souris UCP1<sup>-/-</sup> qui sont incapables de maintenir leur température corporelle lorsqu'elles sont exposées au froid (Enerback et al., 1997).

Cependant, chez l'homme, le site de la thermogenèse adaptative ne peut se limiter au BAT. En effet, l'adulte ne dispose que de quelques cellules de BAT, ce qui fait que sa contribution est estimée au maximum à 25 % (Astrup et al., 1985; Lean et al., 1986). Ainsi, chez l'homme, le muscle squelettique est l'organe principal de la thermogenèse. Du fait qu'UCP1 n'est pas présent dans ce tissu, des recherches ont été faites sur d'autres protéines découplantes pouvant contribuer à la thermogenèse musculaire.

I.6.1.2.2 UCP2 et dépense énergétique.

L'existence d'homologues d'UCP1 a permis d'expliquer la fuite de protons dans les autres tissus. Ainsi, plusieurs gènes ont été identifiés, parmi lesquels UCP2 et UCP3 (Fleury et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997). UCP4 (Mao et al., 1999) et BMCP1 (Sanchis et al., 1998) sont des homologues présents dans le cerveau et KMCP1 (Haguenauer et al., 2005) est exprimé dans le rein. UCP2 possède une homologie protéique de 59 % avec UCP1 et est son expression est ubiquitaire (Pecqueur et al., 2001). La forte homologie entre UCP1 et UCP2 suggère qu'ils peuvent avoir une activité biochimique similaire. Cependant, les recherches ont abouti à des implications physiologiques éloignées du rôle d'UCP1 et de la thermogenèse.

UCP2 jouerait un rôle sur la sécrétion d'insuline (Zhang et al., 2001) en réponse au glucose (Chan et al., 1999). Cependant, les souris qui surexpriment UCP2 spécifiquement dans les cellules  $\beta$  pancréatiques ont une glycémie et une insulinémie normales (Produit-Zengaffinen et al., 2007).

Il a été montré chez la levure qu'UCP2 possède une activité découplante (Fleury et al., 1997), ce qui a été confirmé en comparant les mitochondries isolées de tissus de souris Ucp2-/- et sauvages (Echtay et al., 2002). Le découplage pourrait être activé en réponse aux ROS (Echtay et al., 2002; Zhang et al., 2006a). Il permet d'expliquer l'augmentation de la thermogenèse (Conti et al., 2006; Coppola et al., 2007), mais aussi la modification de la sécrétion d'insuline. Le découplage interviendrait également dans la production de ROS (Arsenijevic et al., 2000; Kizaki et al., 2002; Vogler et al., 2006),

Cependant, ces résultats sont fortement controversés. En effet, certaines expériences n'ont pas pu être reproduites comme celle concernant le découplage sur mitochondries isolées à partir de rate de souris Ucp2-KO et sauvages (Couplan et al., 2002). Un autre

## INTRODUCTION

argument allant à l'encontre du découplage est le biais introduit lors des expériences de surexpression d'UCP2 dans les levures et les bactéries (Fleury et al., 1997; Jaburek et al., 1999; Rial et al., 1999). En effet, dans ces conditions, UCP2 est exprimé à des niveaux supraphysiologiques et induit de ce fait une forte porosité de la membrane mitochondriale. Ainsi, la fonction découplante d'UCP2 est encore très débattue et n'est probablement pas sa fonction principale.

UCP2 pourrait également être impliqué dans l'échange de métabolites entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale. Au final, hormis un consensus sur le contrôle de la production de ROS, les activités biochimiques et physiologiques d'UCP2 restent controversées.

Les effets d'UCP2 sur la thermogenèse musculaire sont encore peu connus. On peut cependant noter qu'un traitement par des hormones thyroïdiennes (T3) augmente les niveaux d'UCP2 dans le muscle (Barbe et al., 2001) et que ceux-ci sont diminués dans le muscle chez des sujets obèses (Nordfors et al., 1998), montrant que la régulation d'UCP2 dans le muscle squelettique est d'un intérêt tout particulier dans le traitement du syndrome métabolique.

I.6.1.2.3 UCP3, une isoforme spécifique du muscle.

Une troisième protéine découplante, UCP3, présentant 72 % de similarité avec UCP2 et 57 % avec UCP1, a été découverte (Boss et al., 1997). UCP3 est spécifiquement exprimé dans le muscle squelettique et le BAT (Ricquier and Bouillaud, 2000; Vidal-Puig et al., 1997). Comme UCP1 et UCP2, UCP3 diminue le gradient protonique à travers la membrane interne chez la levure (Boss et al., 1998b; Gong et al., 1997), et son expression spécifique du muscle en a fait un meilleur candidat qu'UCP2 pour expliquer la thermogenèse adaptative chez l'homme.

Comme pour UCP1 dans le BAT, l'expression d'UCP3 dans le muscle squelettique est rapidement induite après exposition au froid. Cependant, une exposition prolongée entraîne une réduction de l'expression des ARNm UCP3 (Lin et al., 1998), suggérant qu'UCP3 possède un rôle différent d'UCP1 dans la thermogenèse adaptative (Schrauwen et al., 2002).

Comme pour UCP2, l'expression d'UCP3 est induite par les hormones thyroïdiennes qui sont connues pour augmenter la thermogenèse [voir paragraphe suivant; (Barbe et al., 2001; Gong et al., 1997)]. Comme UCP1 dans le BAT, UCP3 est augmenté après la consommation de nourriture enrichie en graisse (Gong et al., 1999; Schrauwen et al., 2001) et diminué après une perte de poids. De plus, les muscles de souris surexprimant UCP3

dégagent d'avantage de chaleur que les contrôles, suggérant qu'UCP3 pourrait jouer un rôle dans la thermogenèse au niveau du muscle (Barclay et al., 2009).

Au cours d'un jeûne prolongé, un état de faible dépense énergétique, les niveaux d'expression d'UCP3 augmentent (Boss et al., 1998b; Millet et al., 1997), suggérant qu'UCP3 contribue à réguler la dépense énergétique. Cependant, les souris UCP3<sup>-/-</sup> ne sont pas obèses et n'ont pas de modification métabolique (Gong et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000), démontrant qu'une diminution d'UCP3 en dessous des niveaux de base ne modifie pas le métabolisme énergétique. Toutefois, les souris surexprimant UCP3 ont une prise alimentaire augmentée mais ne deviennent pas obèses (Clapham et al., 2000). De plus, elles ont une consommation d'oxygène augmentée et une diminution de la force proton-motrice suggérant qu'UCP3 serait en mesure de découpler la phosphorylation oxydative *in vivo*, et de dissiper l'énergie sous forme de chaleur. Cependant, un artefact de surexpression a été décrit (Harper et al., 2002), car le repliement de la protéine serait incorrect, introduisant un biais expérimental qui confèrerait à UCP3 une activité découplante.

D'autres études suggèrent qu'UCP3 pourrait également jouer un rôle dans le métabolisme du glucose (Clapham et al., 2000) et des acides gras (Barbe et al., 2001; Gong et al., 1997).

De manière intéressante, les niveaux d'UCP3 sont plus abondants dans les fibres de type 2b que dans les fibres de type 1 (Hesselink et al., 2001). De plus, les souris surexprimant UCP3 montrent un shift vers une augmentation de l'oxydation des acides gras (Bezaire et al., 2005). Cependant, aucune différence n'a été relatée à ce niveau chez les souris UCP3<sup>-/-</sup> (Bezaire et al., 2005; Seifert et al., 2008).

Par ailleurs, l'induction de l'expression de l'ARNm d'UCP3 après l'exercice (Pilegaard et al., 2000) pourrait être attribuée à l'augmentation de l'activité métabolique et de l'oxydation de graisses dans la période post-exercice. De plus, UCP3 est diminué après l'endurance (Boss et al., 1998a; Schrauwen et al., 1999), une condition dans laquelle la capacité d'oxydation de matières grasses est renforcée (Holloszy and Coyle, 1984). Ces résultats indiquent qu'UCP3 est diminué dans des conditions d'augmentation des capacités oxydatives et induit dans des conditions dans lesquelles la libération d'acides gras excède la capacité à oxyder les matières grasses, pour aboutir finalement à une augmentation des niveaux plasmatiques en acides gras libres (jeûne, exercice aiguë).



## Figure 30 : Modèles des fonctions physiologiques catalysées par UCP2 et UCP3.

Le rectangle jaune représente une cellule et le cercle rouge la membrane interne de la mitochondrie. Les acides gras sont convertis en acyl gras-CoA (FA CoA) dans la matrice, puis les équivalents réducteurs ([H]) sont enlevés par la  $\beta$ -oxydation et transmis à la chaîne de transport d'électrons (ETC) où ils sont oxydés, induisant la pompe à protons. La force proton-motrice résultante ( $\Delta$ p) permet la synthèse d'ATP ou est dissipée par les UCPs.

**Modèle 1A :** en présence des UCPs, l'oxydation des substrats est découplée de la synthèse d'ATP, induisant une augmentation de l'oxydation des substrats et de la thermogenèse.

**Modèle 1B :** par analogie avec l'activation d'UCP1 dans le BAT, le catabolisme du triacylglycérol libère les acides gras. Ceux-ci sont oxydés, induisant la production de ROS par l'ECT. Les ROS et les acides gras activent la conductance de proton par UCP2 ou UCP3, induisant la thermogenèse.

**Modèle 2 :** Quand les acides gras sont oxydés, la production de ROS active les UCPs en diminuant  $\Delta p$ . La production de ROS, sensible à  $\Delta p$ , diminue créant un rétrocontrôle négatif sur le découplage qui atténue la production de ROS quand elle devient trop élevée, protégeant ainsi les cellules contre le stress oxydant.

**Modèle 3 :** le découplage diminue  $\Delta p$  et donc la synthèse d'ATP, et augmente l'ADP dans le cytoplasme, induisant de ce fait une diminution de la libération d'insuline dans le pancréas.

**Modèle 4A :** les UCPs exportent les acides gras anioniques générés quand l'acide gras-CoA est hydrolysé par les thioestérases pour libérer le CoA, nécessaire à la  $\beta$ -oxydation (flèches rouges). Les acides gras anioniques sont aussi générés par l'entrée non catalysée d'un excès d'acides gras protonés provenant du cytosol (flèches vertes). Le cycle de l'entrée d'acides gras protonés et l'exportation d'acides gras anioniques entraînent une conductance nette de protons en tant que réaction secondaire. Modèle 4B : les ROS causent une peroxydation des phospholipides membranaires et les anions peroxydes d'acides gras résultants (HOOfa-) sont exportées par les UCPs (flèche rouge). Si les peroxydes sont protonés et retournent dans la mitochondrie (flèches vertes), le cycle catalyse la conductance nette de protons. D'après (Brand and Esteves, 2005).

I.6.2 Rôle des hormones thyroïdiennes dans la thermogenèse.

Les hormones thyroïdiennes (T3 et T4) ont des effets sur le métabolisme et la thermogenèse. En effet, l'hyperthyroïdie peut se manifester par les signes suivants : une perte de poids malgré un appétit conservé ou accru (polyphagie), une chaleur ressentie comme insupportable, une polydipsie (soif excessive), une asthénie (fatigue).

De façon surprenante, peu de chose sont connues sur les mécanismes cellulaires et moléculaires relayant l'augmentation de la dépense énergétique par les hormones thyroïdiennes. Exception faite de l'induction d'UCP1, qui a lieu exclusivement dans le tissu adipeux brun (Bianco and Silva, 1987), l'identité de groupes de gènes répondant à T3 et contrôlant la dépense énergétique est largement méconnue.

Cependant, dans le muscle squelettique, ces gènes coderaient pour des protéines capables de diminuer l'efficacité de la synthèse d'ATP et/ou augmenter le niveau du renouvellement des voies biochimiques impliquant la dégradation de l'ATP. La thyrotoxicose (excès d'hormones thyroïdiennes dans le sang) cause un découplage mitochondrial. Au niveau des muscles de personnes atteintes par ce syndrome, on remarque une augmentation de 70 % du flux du cycle de Krebs et aucune augmentation de la synthèse d'ATP (Lebon et al., 2001). Il n'est pas clair, cependant, si ce découplage induit par la T3 est relayé par une augmentation de l'expression des UCPs. Les rats thyrotoxiques possèdent des niveaux élevés d'UCP3 dans le muscle squelettique (Gong et al., 1997). Cependant, les souris ayant une perte ciblée d'UCP3 ont un niveau métabolique identique aux contrôles lorsqu'ils sont tous deux traités par la T3 (Gong et al., 2000). De plus, les niveaux d'expression d'UCP3 augmentés par la T3 dans le muscle squelettique pourraient être indirects, à savoir résultants de la lipolyse induite par l'hormone. En effet, les acides gras sont des stimulateurs potentiels d'UCP3, sachant qu'UCP3 est largement induit par la mise à jeun (Aubert et al., 1997; Brun et al., 1999).

Les hormones thyroïdiennes sont également connues pour induire des gènes du métabolisme oxydatif comme CPT1 (Hyyti and Portman, 2006) via PGC-1α qui possède aussi un élément de réponse au récepteur des hormones thyroïdiennes (TR) (Wulf et al., 2008), ou l'AMPK et l'ACC (Branvold et al., 2008), ce qui favorise la consommation des acides gras.

Dans le muscle squelettique, une des principales voies dépendantes des hormones thyroïdiennes est le cycle calcique entre le cytosol et le RS. Ce cycle consomme de grandes quantités d'ATP (de Meis et al., 2003; Reis et al., 2002). En plus de réguler l'expression des gènes codant pour les différentes MHCs (Casas et al., 2008), en favorisant par exemple

## INTRODUCTION

l'expression d'ATPases (Canepari et al., 1998), la T3 stimule l'expression des SERCAs (Nunes et al., 1985; Sayen et al., 1992; Simonides et al., 2001; Viguerie and Langin, 2003). En conséquence, le muscle thyrotoxique montre une augmentation du nombre d'unités SERCA dans le RS, ce qui induit la dépense en ATP en conditions basales. De plus, à chaque cycle contraction/relaxation, le taux de Ca<sup>2+</sup> mobilisé est supérieur et, par conséquent, il en va de même pour la dépense énergétique. Plus récemment, il a été montré que les hormones thyroïdiennes induisaient l'activité découplée Ca<sup>2+</sup>-ATPase, ie, l'activité provenant de l'hydrolyse de l'ATP et qui ne résulte pas en une accumulation de Ca<sup>2+</sup> dans le RS (Arruda et al., 2003; de Meis et al., 2003). En conséguence, davantage d'énergie est dissipée sous forme de chaleur. Ainsi, on peut noter que les hormones thyroïdiennes augmentent l'expression de SERCA1 dans le muscle squelettique (Simonides et al., 1996). En plus des cycles calciques, de nombreux autres cycles similaires impliquant des ions, des intermédiaires métaboliques et des substrats énergétiques sont influencés par les hormones thyroïdiennes. On peut citer entre autres le fructose 6-phosphate/fructose 1,6-biphosphate, la lipolyse/lipogenèse (Oppenheimer et al., 1991), la glycogénolyse/ glycogenèse ou la protéolyse/synthèse protéigue. De ce fait, ces données suggèrent que la concentration intracellulaire en T3 est un facteur déterminant du couplage entre la production et la demande en énergie.

## **II LES RECEPTEURS NUCLEAIRES ET LES COFACTEURS TRNASCRIPTIONNELS.**

#### II.1 Structure et organisation fonctionnelle des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires (RNs) forment une famille multigénique de facteurs de transcription présents chez tous les métazoaires (Chambon, 2005). 48 gènes ont été identifiés dans le génome humain (Tableau 2), 49 chez la souris, 21 dans celui de *Drosophila melanogaster* et 270 chez *Caenorhabditis elegan* (Robinson-Rechavi et al., 2005). En régulant la transcription de nombreux gènes cibles, les RNs sont impliqués dans une multitude d'événements physiologiques tels que l'embryogenèse, le métabolisme, la différenciation ou encore l'apoptose (Gronemeyer et al., 2004).

Les RNs ont la capacité de se fixer à l'ADN et la plupart d'entre eux sont capables de lier spécifiquement des petites molécules hydrophobes qui pénètrent ou sont synthétisées au sein de la cellule cible. Ces ligands (e.g. : les hormones stéroïdes, les dérivés de la vitamine A, les hormones thyroïdiennes, la vitamine D...) jouent le rôle de signaux régulateurs qui modifient l'activité transcriptionnelle des RNs. Bien que, pour plusieurs de ces récepteurs, une interaction avec un ligand soit nécessaire à leur activation, il existe des récepteurs définis comme orphelins, pour lesquels aucun ligand n'a été identifié. L'étude de la phylogénie et de la structure des RNs a suggéré que la capacité de liaison d'un ligand a été acquise par certains récepteurs au cours de l'évolution (Escriva et al., 2000; Laudet, 1997). Cette capacité à fixer des ligands fait des RNs d'importantes cibles pharmacologiques pour le traitement de pathologies majeures (cancer, diabète, obésité, syndrome de résistance hormonale, etc.).

Les RNs sont organisés selon une structure modulaire commune, agencée en 5 ou 6 domaines [désignés de A à F de la partie N-terminale à la partie C-terminale ; Figure 31 ; (Germain et al., 2006; Giguere et al., 1986)]. Ces régions ont été définies d'après leur homologie de séquence et leur fonction.



## Figure 31 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires.

Les régions C (DBD) et E (LBD), impliquées respectivement dans la liaison à l'ADN et au ligand, sont les plus conservées parmi les membres de la famille multigénique des RNs. Les régions A/B, D et F sont variables en séquence et en taille. La plupart des RNs possèdent deux domaines de transactivation : AF-1 (N-terminal et ligand-indépendant) et AF-2 (en C-terminal du domaine E et régulé par le ligand. Tous les RNs possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS) au niveau du domaine charnière D.

# **Tableau 2 : Classification des récepteurs nucléaires chez l'homme.** FXRβ est un pseudogène chez l'homme, cependant il est fonctionnel chez la souris. D'après (**Germain et al.**).

	Acronyme	Abréviation du récepteur	Sous- type	Nom complet du récepteur	Ligand
Classe I	NR1A1, A2	TR	α, β	Thyroid hormone Receptor	Hormones thyroïdes
	NR1B1, B2, B3	RAR	α, β, γ	Retinoic Acid Receptor	Acide rétinoïque
	NR1C1, C2, C3	PPAR	α, β, γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor	Acide gras, prostaglandines, thiazolidinediones
	NR1D1, D2	Rev-erb	α, β	Rev-erb	Orphelin
	NR1F1, F2, F3	ROR	α, β, γ	Retinoid related Orphan Receptor	Cholestérol, sulfate de cholestérol; acide rétinoïque; orphelin
	NR1H1, H2	LXR	α, β	Liver X Receptor	Oxystérols
	NR1H4	FXR		Farnesoid X Receptor	acide biliaire, fexaramine, lanostérol
	NR111	VDR		Vitamin D Receptor	Vitamine D, 1,25- dihydroxyvitaminD3
	NR112	PXR		Pregnane X Receptor	Xénobiotiques, 16a- cyanopregnolone
	NR1I3	CAR		Constitutive Androstane receptor	Xénobiotiques, phénobarbital
Classe II	NR2A1, A2	HNF4	α, γ	Hepatocyte Nuclear Factor-4	Orphelin
	NR2B1, B2, B3	RXR	α, β, γ	Retinoid X Receptor	Acide rétinoïque
	NR2C1	TR2		Testicular Receptor 2	Orphelin
	NR2C2	TR4		Testicular Receptor 4	Orphelin
	NR2E1	ILL		Photorecentor Specific Nuclear	Orphelin
	NR2E3	PNR		receptor	Orphelin
	NR2F1	COUP-TFI		Chicken Ovalbumine Upstream Promoter Transcription Factor 1	Orphelin
	NR2F2	COUP-TFII		Chicken Ovalbumine Upstream Promoter Transcription Factor 2	Orphelin
	NR2F6	EAR2		Eosinophil-Associated Ribonuclease 2	Orphelin
Classe III	NR3A1, A2	ER	α, β	Estrogen Receptor	Eostradiol17β, Tamoxifène
	NR3B1, B2, B3	ERR	α, β, γ	Estrogen Related Receptor	Orphelin; DES, 4-OH Tamoxifène
	NR3C1	GR		Glucocorticoïd Receptor	Cortisol, dexamethasone, RU486
	NR3C2	MR		Mineralocorticoid Receptor	Aldostérone, spirolactone
	NR3C3	PR		Progesterone Receptor	Progestérone, RU486, medroxyprogestérone acétate
	NR3C4	AR		Androgen receptor	Testostérone, DHT, flutamide
Classe IV	NR4A1	NGFI-B		Nerve growth Factor 1B	Orphelin
	NR4A2	NURR-1		Nuclear Receptor Related 1	Orphelin
	NR4A3	NOR1		Neuron Derived Orphan Receptor	Orphelin
Classe V	NR5A1,	SF1		Steroidogenic Factor 1	Orphelin
	NR5A2	LRH-1		Liver Receptor Homolog 1	Orphelin
Classe VI	NR6A1	GCNF		Germ Cell Nuclear Factor	Orphelin
Classe	NR0B1	DAX-1		DSS-AHC critical region on the X gene 1	Orphelin
0	NR0B2	SHP		Short heterodimer partner	Orphelin

## II.2 Régulation de la transcription des gènes cibles par les RNs.

## II.2.1 Mécanismes d'action.

Les récepteurs stéroïdiens sont présents dans le cytoplasme en complexe avec des protéines chaperonnes, les protéines de chocs thermiques HSP (Pratt and Toft, 1997). La fixation du ligand entraîne la dissociation des protéines chaperonnes et l'homodimérisation du RN. Enfin, il migre dans le noyau, où il va activer la transcription des gènes cibles. La plupart des autres RNs sont localisés dans le noyau et liés à l'ADN en absence de leur ligand. Ces RNs, en absence de ligand ou en réponse à des ligands antagonistes ou agonistes, vont réprimer ou activer la transcription via le recrutement de complexes multiprotéiques au niveau du promoteur de leurs gènes cibles.

Les RNs peuvent également avoir des activités non génomiques, en dehors du noyau, en activant des cascades de signalisation à partir du cytoplasme. Ces activités non génomiques sont très rapides ; elles se déroulent dans les minutes qui suivent l'activation du RN. De plus, les inhibiteurs de la transcription ou de la traduction (actinomycine D et cycloheximide respectivement) n'affectent pas ces voies de signalisation, démontrant que ces activités sont indépendantes de l'activité de facteur de transcription du RN. De telles activités sont décrites pour les récepteurs stéroïdiens, incluant le récepteur des glucocorticoïdes (RG), de la progestérone (PR), des œstrogènes (ER) et des androgènes (AR), et seront détaillées pour GR (Cancela et al., 1988) dans le § III.

Certains RNs (ex : le récepteur des glucocorticoïdes) ont également la capacité d'interagir avec d'autres facteurs de transcription tels qu'AP-1 et NFκB. L'inhibition de la voie NFκB par GR est importante car elle contribue aux effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes [voir pour revue (Pascual and Glass, 2006)].

#### II.2.2 Les co-facteurs.

Le terme de co-facteur regroupe des protéines qui interagissent avec les RNs fixés au niveau des régions promotrices des gènes cibles en affectant leur taux de transcription (Glass and Rosenfeld, 2000; McKenna et al., 1999a; McKenna et al., 1999b). Ces co-facteurs sont impliqués dans la répression et dans l'activation des gènes cibles. Il existe plusieurs familles de co-facteurs ayant différentes fonctions : les co-activateurs (CoA) qui activent la transcription, et les co-répresseurs (CoR), qui limitent l'interaction des RNs avec la machinerie transcriptionnelle.

#### II.2.2.1 Les co-répresseurs.

Plusieurs co-répresseurs ont été mis en évidence, notamment SMRT [Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid hormone receptors ; (Chen and Evans, 1995)] et N-CoR [Nuclear CoRepressor ; (Horlein et al., 1995)]. Ils ont été initialement identifiés comme interagissant, en absence de ligand, avec RAR et TR associés à RXR sur l'ADN. Ils répriment la transcription basale. N-CoR et SMRT servent aussi de co-répresseurs à de nombreux RNs orphelins, tels Rev-erbα, Rev-erbβ, COUP-TF, ainsi que ER et PR liés à des antagonistes.



## Figure 32 : Mécanisme séquentiel de l'action des RNs.

(A) En absence du ligand, le récepteur est lié à son élément de réponse sur les gènes cibles et est associé à des complexes répresseurs qui possèdent des activités HDAC. La transcription des gènes cibles est réprimée.

(B) La liaison du ligand entraîne la dissociation des complexes répresseurs et le recrutement de complexes activateurs à activité HAT, HMT ou ATPase, qui décondensent de la chromatine.

(C) Le complexe activateur se dissocie suite à son acétylation qui diminue sa capacité à interagir avec les RNs ou suite à sa dégradation par le protéasome. La transcription activée. D'après (Bastien and Rochette-Egly, 2004).

Ils exercent leur activité répressive sur des RNs via le recrutement d'un complexe à activité histone désacétylases (HDAC) qui conduit à la condensation de la chromatine, phénomène inhibant le recrutement de facteurs de transcription et du complexe ARN polymérase II (Kadonaga, 1998). L'expression des gènes cibles est alors réprimée.

Ces co-répresseurs se fixent aux RNs par le biais de motifs conservés de type LXX (I/H) XXX (I/L) (où L représente la leucine, I l'isoleucine, H l'histidine et X un acide aminé quelconque) qui ressemblent au motif LXXLL retrouvé dans les co-activateurs. Cependant, la séquence contenant le motif d'interaction des co-répresseurs forme trois tours d'hélice a et est donc plus étendue (un tour d'hélice supplémentaire) que celle des co-activateurs (Hu and Lazar, 1999; Nagy et al., 1999; Perissi et al., 1999).

II.2.2.2 Les co-activateurs.

II.2.2.2.1 La famille des p160.

La première famille de co-activateurs identifiée est la famille des p160. D'un poids moléculaire d'environ 160 kDa, cette famille est composée de trois membres : SRC-1 / NCoA-1, SRC-2 / TIF-2 / GRIP-1 /NCoA2 et SRC-3 / p/CIP / ACTR / Aib1 / TRAM1 / RAC3. Ils présentent une similarité de séquence d'environ 40 %, suggérant une certaine redondance fonctionnelle (Xu and O'Malley, 2002). Ils seront détaillés dans le paragraphe IV.

II.2.2.2.2 CBP/p300.

CBP et p300 sont des protéines homologues qui servent de co-activateurs pour un certain nombre de facteurs de transcription tels que CREB (cAMP response element binding protein), p53, NF-κB et les RNs (Xu and O'Malley, 2002).

Ces co-activateurs interagissent avec les RNs via un motif caractérisé par sa courte séquence signature LXXLL, où L représente une leucine et X un acide aminé quelconque, également appelé NR-box [Nuclear Receptor-box, (Heery et al., 1997)]. Ces motifs sont nécessaires et suffisants pour l'interaction directe avec les RNs in vivo. Certains co-activateurs se lient à l'AF-1, d'autres à l'AF-2, et d'autres encore aux deux régions AF-1 et 2 (Warnmark et al., 2003).

Parmi ces co-activateurs se trouvent des complexes qui vont modifier les histones. Certains, comme CBP/p300, P/CAF [p300/CBP Associated Factor ; (Xu and O'Malley, 2002)] et SRC-1 et SRC-3 (Chen et al., 1997; Spencer et al., 1997), possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT) et vont acétyler les histones. D'autres possèdent une activité histone méthyltransférase (HMT) et vont méthyler les histones, comme CARM-1 (Coactivator-associated Arginine Methyl Transferase). Ces complexes, en modifiant les histones, décompactent la structure des nucléosomes et rendent les gènes plus accessibles pour la transcription. D'autres complexes possédant des activités de remodelage de la chromatine dépendantes de l'ATP (SWI/SNF) induisent une ouverture de la chromatine fortement condensée et produisent un environnement transcriptionnel permissif au niveau du promoteur qui est nécessaire à l'activation de la transcription.

#### II.2.2.3 Les co-intégrateurs.

Les complexes co-activateurs permettent la décondensation de la chromatine. L'étape suivante est le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Les RNs la recrute par leur association avec les membres du complexe médiateur, TRAP/DRIP (Thyroid Hormone Receptor-Associated protein / Vitamin D receptor interacting protein). Le complexe TRAP/DRIP interagit directement avec les composants de la machinerie transcriptionnelle (Germain et al., 2006).

La séquence de recrutement des co-facteurs est schématisée sur la Figure 32.

## II.2.3 Les modifications post-traductionnelles des RNs.

L'activité transcriptionnelle des RNs peut être modulée par diverses modifications posttraductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, la sumoylation ou encore l'ubiquitination.

Plusieurs récepteurs sont phosphorylés par des kinases sur des résidus situés dans les domaines A/B, C et E. De manière générale, cela stimule l'activité transcriptionnelle des RNs en favorisant, par exemple, le recrutement de co-activateurs. Cependant, il a été montré qu'elle pouvait également exercer un effet négatif sur l'activité des RNs en induisant la dissociation du RN de l'ADN, en diminuant l'affinité de liaison du ligand ou encore en favorisant la dégradation des RNs [pour revue voir (Rochette-Egly, 2003)].

L'acétylation des résidus lysines des RNs peut affecter soit négativement, soit positivement leur activité transcriptionnelle, et a été largement décrite pour les récepteurs stéroïdiens [voir pour revue (Faus and Haendler, 2006)].

La sumoylation est une modification qui consiste en la conjugaison d'un petit polypeptide appelé SUMO (Small Ubiquitine-like MOdifier) à des résidus lysines spécifiques des protéines cibles. La sumoylation peut affecter le potentiel de transactivation, la liaison à l'ADN des RNs. Elle est aussi largement décrite pour les récepteurs stéroïdiens (Faus and Haendler, 2006).

L'ubiquitination est la conjugaison de l'ubiquitine à un substrat, un polypeptide de 76 résidus. La mono-ubiquitination est impliquée dans la régulation transcriptionnelle, alors que la poly-ubiquitination est impliquée dans les voies de dégradation des protéines. L'ubiquitination de plusieurs RNs a été reportée. ER, AR, PPARa, GR, RARy, RXRa et TR sont notamment régulés par le système ubiquitine-protéasome (Baek and Rosenfeld, 2004).

Les RNs régulent donc l'expression des gènes cibles en réponse à la liaison d'une hormone par de multiples moyens impliquant le changement de compartiment cellulaire, l'interaction avec l'ADN et des co-facteurs, les modifications post-traductionnelles, la communication avec d'autres facteurs de transcription, etc.

Parmi les différents membres de cette famille multigénique, au cours de ma thèse, je me suis intéressée plus particulièrement au récepteur des glucocorticoïdes (GR) et au corégulateur de la famille des p160, TIF2 (Transcriptional intermediary factor 2) pour leurs implication dans l'homéostasie musculaire. J'ai également contribué à l'étude dans le muscle de deux autres récepteurs nucléaires, le récepteur des androgènes, AR, et le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes  $\beta$ , PPAR $\beta$ .

#### II.2.4 Le récepteur des androgènes.

## II.2.4.1 Structure de AR.

Les androgènes appartiennent au groupe des hormones stéroïdes. Chez l'homme, la testostérone est l'androgène circulant majeur. Plus de 95 % sont synthétisés par les cellules de Leydig du testicule, qui produit environ 6 à 7 mg de testostérone par jour. Une petite fraction d'androgènes est également synthétisée par la zone réticulée de la cortico-surrénale (Nieschlag, 2004). Chez la femme, les androgènes sont synthétisés au niveau des ovaires.

Le récepteur des androgènes (AR) appartient à la famille multigénique des récepteurs nucléaires. Il fait partie de la classe des récepteurs des hormones stéroïdes, où l'on trouve également le récepteur des glucocorticoïdes (GR), des minéralocorticoïdes (MR), des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR). Le gène codant pour AR est localisé chez l'homme en position q11-12 sur le chromosome X et possède 8 exons (Galani et al., 2008). Il

code pour une protéine de 919 acides aminés avec une masse moléculaire de 110 kDa (Lubahn et al., 1988).

La voie d'activation classique de AR consiste en la liaison du ligand (testostérone ou DHT), l'homodimérisation de AR, sa migration dans le noyau, sa liaison à l'ADN et l'activation de la transcription des gènes cibles. Toutes les autres voies d'action des androgènes seront qualifiées de non génomiques. Elles peuvent être réalisées par des voies de signalisation impliquant un AR « classique » (intracellulaire) ou par des modifications de la concentration intracellulaire en ions et des changements de la fluidité membranaire.

#### II.2.4.2 Les maladies liées à AR.

Des mutations dans le RA sont à l'origine de nombreuses pathologies :

- d. Le syndrome d'insensibilité aux androgènes qui est une maladie rare liée à l'X (Quigley et al., 1995), due à des mutations de AR. Les personnes atteintes par ce syndrome présentent plusieurs degrés d'insensibilité : l'insensibilité peut être complète, les individus mâles présentent alors un appareil génital externe féminin, ou partielle, avec une gradation des phénotypes en fonction de l'importance de cette insensibilité (Quigley et al., 1995).
- e. Le cancer de la prostate qui est le cancer le plus commun chez l'homme et au cours duquel les androgènes semblent également constituer un facteur de risque. Ceci peut s'expliquer par le fait que les androgènes, via leur récepteur, peuvent stimuler la prolifération cellulaire et que les mutations de AR augmentent avec le stade évolutif du cancer.
- f. La maladie de Kennedy ou SMBA (spinal and bulbar muscular atrophy) qui est une maladie génétique liée au chromosome X, se caractérisant par une faiblesse musculaire progressive et particulièrement sévère au niveau des muscles bulbaires et des muscles des membres proximaux (Fischbeck, 1997).

## II.2.4.3 AR chez l'homme.

La réduction des niveaux de testostérone chez l'homme avec l'âge est connue sous le terme d'andropause, ou encore d'ADAM (Androgen Deficiency in the Aging Male) et de PADAM (Partial Androgen Deficiency in the Aging Male). De nombreuses études se sont attachées à étudier les effets des androgènes chez l'homme.

Les stéroïdes anabolisants, utilisés depuis longtemps comme agent dopant, sont très répandus dans les sports où la masse et à la force musculaire sont importantes. Ils sont généralement administrés sous des formes dérivées de le testostérone (ex : testostérone propionate, cypionate, énanthate). Cependant, de nombreuses controverses subsistent quant à l'effet de doses supraphysiologiques de testostérone sur la composition corporelle et la force musculaire chez des individus qui ne pratiquent pas de sport de haut niveau (Bhasin et al., 1996). Il en va de même chez les jeunes hommes atteints d'hypogonadisme (Bhasin et al., 1997), les hommes âgés avec de faibles niveaux d'androgènes, et concernant les effets de la supplémentation en androgènes chez des patients atteints du HIV.

#### II.2.4.4 AR chez le rongeur.

Les animaux, et plus particulièrement les rongeurs, ont été largement utilisés pour préciser les effets des androgènes sur le muscle squelettique. Ils présentent deux types musculaires : les muscles du périnée [le muscle bulbocaverneux (BC) et le muscle élévateur de l'anus (LA)] qui sont très sensibles à l'action des androgènes à la fois pour leur développement et pour leur maintien à l'âge adulte, et les muscles des membres qui sont moins affectés par la déprivation ou le traitement androgénique.

Plusieurs modèles de souris chez lesquelles AR est invalidé dans la lignée germinale ont été générés (Notini et al., 2005; Sato et al., 2003; Yeh et al., 2002). Ces animaux présentent une apparence externe de femelle, avec absence de prostate, de vésicules séminales, et des testicules fortement atrophiés. En outre, (MacLean et al., 2008) ont démontré que l'invalidation de AR entraînait une absence de LA et une diminution de la masse des muscles des pattes, et que la production de force était diminuée dans les muscles rapides (liée à la diminution de la masse des muscles) des souris KO, tandis que la résistance à la fatigue est augmentée dans le muscle soléaire. De plus, il a récemment été montré que les androgènes dans les myocytes contribuaient au maintien de la masse musculaire, mais pas au développement de la force ou de la résistance à la fatigue (Ophoff et al., 2009). II.2.5 Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes  $\beta$ .

II.2.5.1 Historique des PPARs.

Les peroxysomes sont des organites impliqués dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras à longues chaînes, ainsi que dans le catabolisme du cholestérol et des acides biliaires. Ils sont activés par les proliférateurs de peroxysomes tels que les fibrates, les herbicides et l'acide acétylsalicylique (Vamecq and Draye, 1989). La prolifération des peroxysomes est accompagnée par une hépatomégalie et par l'augmentation de la transcription des gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras, ainsi que par une diminution des niveaux sériques de triglycérides et de cholestérol.

Isseman et Green ont cloné chez la souris un récepteur nucléaire activé par une grande variété de proliférateurs de peroxysomes, PPARα (Issemann and Green, 1990). En 1992, deux autres récepteurs nucléaires similaires à PPARα ont été clonés : PPARβ [ou PPARδ (Kliewer et al., 1994)] et PPARγ (Dreyer et al., 1992), qui possède chez la souris deux variants d'épissage alternatif PPARγ1 et PPARγ2 (Zhu et al., 1995). Malgré leur nom de récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes, PPARβ et PPARγ n'ont jamais été associés à une prolifération des peroxysomes. PPARβ interagit avec des acides gras saturés et insaturés, notamment l'acide linolénique, arachidonique, palmitique (Amri et al., 1995; Forman et al., 1997), ainsi qu'avec des éicosanoïdes (Yu et al., 1995), et des composés synthétiques comme les ligands L-165041 (Berger et al., 1999) et GW501516 (Oliver et al., 2001).

Chaque PPAR présente une distribution tissulaire spécifique. PPARα est fortement exprimé dans le foie, le cœur, le rein, le muscle squelettique et le tissu adipeux brun. PPARγ est exprimé principalement dans le tissu adipeux brun et blanc, le gros intestin et la rate. PPARβ, quant à lui, est exprimé de manière ubiquitaire, mais c'est également l'isoforme la plus exprimée dans le muscle squelettique (Kliewer et al., 2001).

II.2.5.2 Rôle de PPARβ dans le métabolisme intermédiaire.

Afin de comprendre l'action de PPARβ dans le métabolisme, plusieurs modèles de souris chez lesquelles PPARβ a été invalidé ont été générés. L'ensemble de ces animaux PPARβ-/- présentent tous une forte létalité à l'état embryonnaire (Barak et al., 2002; Michalik et al., 2001; Peters et al., 2000), mais les souris survivantes présentent une petite taille du stage fœtal jusqu'au stage post-natal et la masse adipeuse est également réduite (Barak et et al., 2001; Peters et al., 2000), mais les souris survivantes présentent une petite taille du

al., 2002; Peters et al., 2000). Cependant, la diminution de la masse adipeuse n'est pas observée chez des souris chez lesquelles PPARβ est sélectivement invalidé dans les adipocytes, suggérant une régulation non adipocytaire, mais systémique du métabolisme lipidique (Barak et al., 2002).

II.2.5.2.1 PPARβ et le métabolisme des lipoprotéines.

L'administration de GW501516 à des singes obèses résistants à l'insuline, entraîne une augmentation de 80 % des HDL-cholestérol et une diminution des LDL-cholestérol (Oliver et al., 2001). De plus, les souris PPARβ-/- présentent des niveaux de triglycérides et d'acides gras libres élevés, mais des niveaux normaux de cholestérol total, de cholestérol libre et de phospholipides sous alimentation normale (Peters et al., 2000). Lors d'un régime alimentaire riche en graisse, les niveaux de triglycérides chez les souris PPARβ-/- restent élevés, mais ces animaux présentent de plus une augmentation de la production des VLDL par le foie et une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase (Akiyama et al., 2004). En revanche, d'autres études ne montrent aucune modification des profils lipidiques sous une alimentation normale chez les souris PPARβ-/- (Barak et al., 2002).

II.2.5.2.2 PPAR $\beta$  et le catabolisme des acides gras.

Plusieurs groupes ont montré que l'activation de PPARβ augmentait l'oxydation des acides gras à la fois dans le muscle et dans le tissu adipeux et le découplage énergétique dans le tissu adipeux.

Wang et collaborateurs ont développé un modèle de souris où PPARß est activé constitutivement (VP16- PPARß) dans les tissus adipeux brun et blanc. Ils ont observé chez ces animaux une diminution de la masse adipeuse, due à une diminution de l'accumulation des triglycérides dans les adipocytes. L'activation de PPARß spécifiquement dans le tissu adipeux induit une augmentation des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et d'UCP1, permettant ainsi une amélioration des profiles lipidiques et une réduction de l'adiposité. Ces animaux sont résistants à l'obésité induite par une alimentation riche en graisse, contrairement aux souris PPARß-/- qui développent une obésité et montrent une diminution de l'expression d'UCP1 (Wang et al., 2003a). Ces résultats montrent que PPARß stimule la thermogenèse au niveau du tissu adipeux brun en contrôlant l'expression d'UCP1.

Le muscle squelettique est le site majeur de l'oxydation des acides gras. Par conséquent, il a été proposé que la libération des acides gras par le tissu adipeux, suite à la

#### INTRODUCTION

mise à jeun ou à l'exercice, active PPARβ pour stimuler leur oxydation et la thermogenèse. Le traitement de cellules musculaires C2C12 par l'agoniste GW501516 induit l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des lipides, ainsi que des gènes codant pour les protéines découplantes : UCP1, UCP2 et UCP3 (Dressel et al., 2003). Les auteurs suggèrent que l'activation des UCPs par PPARβ conduirait à un découplage énergétique *in vivo* et par conséquent à une augmentation de la dépense énergétique.

Afin de mieux évaluer les effets de PPAR $\beta$  dans le muscle squelettique, des modèles de surexpression ou d'activation du récepteur spécifiquement dans le muscle ont été développés. La surexpression constitutive de PPAR<sup>β</sup> dans le muscle squelettique induit un changement dans la composition des fibres musculaires, avec une augmentation du nombre de fibres lentes oxydatives, conduisant à une augmentation des capacités oxydatives du muscle. L'ensemble de ces modifications est associé à une diminution de la masse adipeuse. Enfin, les auteurs démontrent que l'exercice d'endurance induit une augmentation de l'expression de la protéine PPAR<sup>β</sup> dans les muscles de souris sauvages, supportant l'idée que les modifications de la plasticité musculaire réalisées au cours de l'exercice sont en partis relayées par PPAR<sub>β</sub> (Luquet et al., 2003). L'activation de façon constitutive de PPARβ dans les muscles squelettiques induit également une conversion des fibres musculaires rapides vers lentes, et ce de manière similaire à que ce qui est observé lors du traitement de souris sauvages avec l'agoniste GW501516. L'expression des gènes impliqués dans le phénotype musculaire lent, de la biogenèse mitochondriale et de la β-oxydation est augmentée dans les souris transgéniques, les protégeant ainsi de l'obésité et améliorant le profil métabolique général. Enfin, les capacités de résistance à l'exercice sont deux fois plus développées chez les souris transgéniques en comparaison aux souris sauvages (Wang et al., 2004).

# III RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOÏDES ET ATROPHIE MUSCULAIRE.

## III.1 Biosynthèse et mode d'action des glucocorticoïdes.

#### III.1.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (HPA).

L'HPA s'articule autour de trois structures : l'hypothalamus, le lobe antérieur de l'hypophyse (adénohypophyse) et le cortex surrénalien (Figure 33).



Figure 33 : Les trois structures de l'axe hypothalamohypophyso-corticosurrénalien (Yehuda, 2002).

Le système hypothalamo-hypophysaire s'articule autour de deux portions :

*(i)* une portion hypothalamo-antéhypophysaire, associant la zone parvocellulaire du noyau hypothalamique paraventriculaire (PVN) et le lobe antérieur de l'hypophyse, et

*(ii)* une portion hypothalamo-neurohypophysaire (HNS) composée de la zone magnocellulaire du PVN, du noyau supra-optique (SON) et du lobe postérieur de l'hypophyse.

Les neurones de la zone parvocellulaire du PVN relient l'hypophyse antérieure. Lors d'un stress, ils synthétisent et libèrent la corticolibérine (CRF) et l'arginine vasopressine (AVP) dans la circulation portale (Smith and Vale, 2006). La CRF stimule les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure et l'AVP potentialise l'effet de la CRF par l'intermédiaire des récepteurs à vasopressine (Engelmann et al., 2004; Herman et al., 2003; Smith and Tisdale, 2003; Watts, 2005). Les cellules corticotropes synthétisent en réponse la proopiomélanocortine (POMC) qui est ensuite clivée en hormone adrénocorticotrope (ACTH), endorphines et lipotropines.

Les neurones du SON se projettent au niveau du lobe postérieur de l'hypophyse et synthétisent l'AVP et l'ocytocine (OXT), qui modulent la sécrétion d'ACTH (Engelmann et al., 2004).

Les glandes surrénales sont composées de deux parties :

(i) la médullosurrénale qui sécrète l'adrénaline et la noradrénaline, et

*(ii)* la corticosurrénale qui contribue à la synthèse des hormones stéroïdiennes : la zone fasciculée synthétise les hormones glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme et corticostérone chez la souris), la zone glomérulée les hormones minéralocorticoïdes (aldostérone) et la zone réticulée les hormones androgènes (déhydroépiandrostérone) et sexuelles (testostérone chez l'homme, et oestrogène et progestérone chez la femme ; Figure 34).



Figure 34 : Représentation schématique de la structure de l'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien. D'après (Watts, 2005).

La voie de synthèse est commune (Figure 35), dérivant du cholestérol, substance synthétisée dans le foie et dans les glandes endocrines à partir de l'acétyl CoA.

L'ACTH véhiculée par la circulation sanguine périphérique jusqu'aux glandes surrénales se lie aux récepteurs mélanocortines de type 2 (MC2-R) dans la corticosurrénale, stimulant la stéroïdogénèse par la voie de AMPc (Smith and Vale, 2006).



**Figure 35 : Schéma de synthèse des hormones dérivant du cholestérol.** P450c11 correspond à l'enzyme 11β-hydroxylase.

III.1.2 Les glucocorticoïdes.

#### III.1.2.1 Les récepteurs intracellulaires aux glucocorticoïdes.

Les glucocorticoïdes se lient à deux types de récepteurs nucléaires, les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR, type I) et les récepteurs aux glucocorticoïdes *per se* (GR, type II). Leur domaine C-terminal de liaison au ligand contient aussi des séquences de liaison aux Hsp, de translocation nucléaire, de dimérisation et de transactivation (Bamberger et al., 1996).

Les GR sont, entre autre, fortement exprimés dans le cerveau, les reins et les muscles squelettiques. Les MR sont quant à eux davantage exprimés dans les épithéliums. L'affinité de ces récepteurs à leur ligand est différente (Pearce, 1994). Les GR ont une plus faible affinité pour la corticostérone que pour les glucocorticoïdes de synthèse (dexaméthasone, RU486). Inversement, les MR ont une forte affinité pour la corticostérone (10 fois plus que les GR) et l'aldostérone, et une affinité beaucoup plus faible pour la dexaméthasone [pour revue (Reul and de Kloet, 1985; van Eekelen et al., 1991)]. Ces différences de localisations et d'affinités entre les deux types de récepteurs leur confèrent un rôle distinct. En phase de repos (environ 1,4 µg.mL<sup>-1</sup> de corticostérone), seuls les MR sont occupés, à 90 %. En phase d'activité ou après un stress (environ 25 µg.mL<sup>-1</sup> de corticostérone), les MR sont saturés et les GR sont occupés à 50 %. Ainsi, les MR réguleraient le tonus basal de l'activité de l'axe HPA avec une efficacité fonction de la quantité de récepteurs MR. Les GR sont les médiateurs du rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes avec une intensité fonction des quantités de glucocorticoïdes et de récepteurs GR (Reul and de Kloet, 1985).

## III.1.2.2 Régulation de la disponibilité en glucocorticoïdes.

La disponibilité des glucocorticoïdes aux tissus est régulée par la transcortine ou corticosteroidbinding globuline (CBG). Cette glycoprotéine de la famille des inhibiteurs de protéases sérines (serpine) est sécrétée par le foie. Dans la circulation sanguine, elle lie la corticostérone, la maintenant sous forme inactive et jouant un rôle de réservoir. La capacité de liaison de la CBG est modifiée par divers facteurs dont le stress [pour revue, (Breuner et al., 2006)] et l'inflammation (Breuner and Orchinik, 2002).

## INTRODUCTION

L'action des glucocorticoïdes est régulée au niveau intracellulaire par les deux isoenzymes 11β-hydroxystéroïde déshydrogénases (11β-HSD) de type 1 (11β-HSD1) et 11β-HSD de type 2 (11β-HSD2).

La 11β-HSD2 est une déshydrogénase unidirectionnelle transformant la corticostérone en 11-déhydrocorticostérone et orientant plutôt le signal corticoïde vers les récepteurs MR (Holmes and Seckl, 2006). A l'inverse, la 11β-HSD1 est une réductase, transformant la 11déhydrocorticostérone inactive en corticostérone active, jouant un rôle dans la régulation de l'axe HPA du fait de sa présence au niveau des sites clés du rétrocontrôle des glucocorticoïdes [hypothalamus, hypophyse, hippocampe et cortex cérébral ; (Holmes and Seckl, 2006)]. Les 11β-HSD semblent donc être indispensables à l'efficacité du rétrocontrôle inhibiteur des glucocorticoïdes et leurs niveaux enzymatiques sont modulés par le stress (Holmes and Seckl, 2006).

#### III.1.2.3 Mécanismes d'action des glucocorticoïdes.

Les glucocorticoïdes agissent à moyen et long terme *via* les effets génomiques et à plus court terme *via* les effets non génomiques.

III.1.2.3.1 Les effets génomiques.

• Modulation de la transcription des gènes.

Les glucocorticoïdes sont lipophiles et diffusent librement à travers la membrane cellulaire. Ils se lient à leurs récepteurs GR séquestrés dans le cytoplasme par liaison aux protéines Hsp. Après libération des Hsp, le couple GR-corticostérone est transloqué dans le noyau où il agit sur l'expression du génome en activant ou inhibant la transcription. Le mécanisme classique d'action des GR (Figure 36) passe par la formation d'un homodimère (deux molécules de GR) qui se lie aux séquences d'ADN spécifiques (« glucocorticoid response elements », GREs) et active la transcription. Il nécessite le recrutement de co-activateurs activant l'acétylation des histones, indispensable au recrutement de l'ARN polymérase II (Adcock et al., 2006). GR peut réprimer la transcription via une interaction avec la séquence d'ADN « negative GRE » (nGRE). Peu de gènes possèdent cette séquence parmi lesquels la POMC, le CRF, l'ostéocalcine et la kératine (Barnes, 2006). Un deuxième mécanisme implique l'interaction des GR avec des facteurs de transcription tels qu'« activator protein-1 » (AP-1, dimères Fos-Jun ou Jun-Jun), le facteur nucléaire κB (NF-

κB), la « cAMP response element-binding protein » (CREB), le peptide STAT (Liberman et al., 2007). Les GR liés à AP-1, NF-κB et CREB par interaction protéine-protéine préviennent la transcription des gènes activés par ces mêmes facteurs de transcription, sauf pour STAT dont la liaison GR-STAT potentialiserait l'activation des gènes activés par ce facteur de transcription, comme l'IL-4 (Smoak and Cidlowski, 2004).



Figure 36 : Mécanismes d'action des glucocorticoïdes par la voie classique génomique (Norman et al., 2004).

• Modulation post-transcriptionnelle

Les glucocorticoïdes agissent aussi sur la stabilité des ARNm, leur traduction en protéines (Lee et al., 1988; Stellato, 2004), la dégradation et la libération des protéines (Bergmann et al., 2004; Kern et al., 1988; Walker et al., 1997). L'activation de cascades de signalisation de diverses kinases favorise la stabilité et la traduction des ARNm *via* leurs séquences « JNK responsive element » (JRE) et « adenine/uridine-rich element » (A/URE). Les glucocorticoïdes diminuent la stabilité des ARNm par une inhibition de ces cascades de signalisation de kinases, passant probablement par des interactions protéine-protéine entre le complexe glucocorticoïdes-GR et la protéine de liaison aux ARNm, responsable de la cascade de signalisation stabilisant les ARNm (Lasa et al., 2001; Stellato, 2004). Les glucocorticoïdes pourraient diminuer la stabilité des ARNm de leurs propres récepteurs (Ing, 2005).

## III.1.2.3.2 Les effets non génomiques

Le délai d'action des glucocorticoïdes par voie génomique est long : 10-30 min de translocation nucléaire, 5 à 120 min de transcription et traduction (Makara and Haller, 2001). Des effets plus rapides sont toutefois observés, suggérant un mécanisme non génomique (Figure 37).



Figure 37 : Représentation schématique des différentes actions non génomiques des glucocorticoïdes.

• Action rapide relayée par les GR.

Certains effets des glucocorticoïdes relayés par les GR ne passent pas par une action transcriptionnelle (Hafezi-Moghadam et al., 2002; Makara and Haller, 2001). Par exemple, les Hsp libérées suite à la liaison des glucocorticoïdes à GR stimulent l'activité de la calcineurine [(Makara and Haller, 2001), Figure 37]. De plus, le complexe GC-GR va pouvoir effectuer un « crosstalk » transcriptionnel avec ZAP-70 pour contrôler les mécanismes d'immunité, et avec AP-1 et NF-κB pour un contrôle de la transcription (Figure 37).

• Action rapide sans implication de récepteurs.

Les glucocorticoïdes peuvent se lier aux membranes pour moduler la liaison de la calmoduline à ce niveau, mais aussi activer la fonction des canaux calciques voltagedépendants [Figure 37, (Makara and Haller, 2001)], notamment dans l'hippocampe (Lou and Chen, 1998), le pancréas (Sutter-Dub, 2002) et le muscle squelettique (Passaquin et al., 1998).

Les glucocorticoïdes peuvent également altérer les propriétés physico-chimiques de la membrane cytoplasmique (Falkenstein et al., 2000; Stellato, 2004) en se liant aux phospholipides membranaires (Carlson et al., 1983), et ainsi affecter d'une part la fluidité de la membrane et d'autre part le transport ionique et la consommation d'ATP de la membrane (Buttgereit and Scheffold, 2002; Schafer-Korting et al., 2005). Ils se fixent aussi au niveau de la membrane mitochondriale et augmentent la perméabilité aux protons pour induire un découplage (Buttgereit and Scheffold, 2002; Sionov et al., 2006; Zhang et al., 2006b). Ces effets, surtout observés *in vitro*, nécessitent des concentrations très élevées de glucocorticoïdes. Ainsi, la dexaméthasone à forte concentration déstabiliserait les membranes lysosomales, un effet impliqué dans l'action anti-anaphylactique rapide (< à 10 min) des glucocorticoïdes (Hinz and Hirschelmann, 2000).

Action rapide relayée par des récepteurs membranaires.

La majorité des effets rapides des glucocorticoïdes passerait par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, soit spécifiques aux glucocorticoïdes, soit par des récepteurs à neurotransmetteurs. Les récepteurs spécifiques se distinguent des GR par leur propriété de liaison aux glucocorticoïdes (Adcock et al., 2006), et les protéines Hsp70 et 90 interagissent avec ces récepteurs probablement de la même manière qu'avec les GR (Powell et al., 1999). Les actions rapides sont liées à des voies de signalisation intracellulaires telles que le couplage des protéines G et des kinases incluant la MAPK et la PI3K [(Adcock et al., 2006) ; Figure 36 et 37]. Ce mode d'action semble être impliqué dans le contrôle du comportement (Makara and Haller, 2001) et dans les maladies inflammatoires (Adcock et al., 2006).

#### III.1.2.4 Les actions anti-inflammatoires des glucocorticoïdes.

L'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes est à la fois génomique et non génomique. Par voie génomique, ils activent la synthèse de protéines anti-inflammatoires

dont les gènes possèdent une séquence GRE comme l'IκB-α, l'IL-1 ou l'IL-10 [(Barnes, 2006; Smoak and Cidlowski, 2004). Ils interagissent également avec des facteurs de transcription, inhibant la transcription de nombreuses cytokines telles que les interleukines et TNF-α (Barnes, 2006; Smoak and Cidlowski, 2004). Enfin, ils diminuent la stabilité et la traduction des ARNm d'un grand nombre de gènes inflammatoires possédant une séquence A/URE comme IL-1, -6, -8, TNF-α ou iNOS (Stellato, 2004). Par voie non génomique, les glucocorticoïdes induisent la libération des protéines Hsp du complexe cytosolique GR-glucocorticoïdes-Hsp, ce qui entraîne l'activation de protéines anti-inflammatoires au niveau du cytosol.

#### III.1.2.5 Le syndrome de Cushing.

Le syndrome de Cushing, ou hypercorticisme chronique, est une maladie décrite par Harvey Cushing en 1932, qui est causée par un excès de sécrétion de cortisol par les glandes surrénales et ayant des conséquences pathologiques. La manifestation la plus visible est l'apparition d'une obésité chronique de la partie supérieure du corps et un aspect bouffi du visage. Il faut distinguer le syndrome de la maladie de Cushing qui en est une souscatégorie. L'hypercorticisme primaire, ou Syndrome de Cushing se caractérise par un taux de cortisol élevé dû à une hypersécrétion des glandes surrénales. L'hypercorticisme secondaire, se caractérise par un taux de cortisol élevé dû à une hypersécrétion d'ACTH (Maladie de Cushing) causée par exemple à un adénome hypophysaire ou une tumeur à sécrétion ectopique d'ACTH (e.g. carcinoïde bronchique, tumeur pancréatique...). L'hypercorticisme tertiaire, se caractérise par un taux de cortisol élevé dû à une hypersécrétion d'ACTH qui est causé par une hypersécrétion de CRH. Cette situation est due le plus souvent à un adénome hypothalamique, mais peut être également le résultat d'une tumeur à sécrétion ectopique de CRH. Le syndrome de Cushing peut également avoir une origine médicamenteuse en raison de prises excessives de glucocorticoïdes.

Le diagnostic du syndrome de Cushing est relativement difficile à poser. En effet, les symptômes évocateurs de ce trouble ne sont pas pathognomoniques et peuvent relever de beaucoup d'autres maladies. On peut toutefois noter la silhouette typiquement « cushingoïde » : le visage est dit « lunaire », gonflé et rouge, et des formations lipidiques disgracieuses s'enkystent au niveau du cou, de la nuque. On parlera d'obésité ou lipodystrophie facio-tronculaire, qui contraste avec une fonte musculaire au niveau des jambes et des bras (Figure 38). Celle-ci est de toute première importance car elle entraîne des chutes et des fractures chez les patients. Il est donc nécessaire de comprendre les

mécanismes d'action des glucocorticoïdes au niveau musculaire, afin de proposer un traitement palliatif.



Figure 38 : Schéma récapitulatif des différents symptômes répertoriés dans le syndrome de Cushing.

## III.2 Régulation des mécanismes d'atrophie par les glucocorticoïdes.

Les glucocorticoïdes sont une des causes d'atrophie musculaire, aussi bien en tant que drogues utilisées dans le traitement de différentes pathologies qu'en tant qu'hormones secrétées en réponse à différentes conditions de stress. La faiblesse des muscles respiratoires et périphériques qui en résulte a des implications cliniques importantes, telles qu'un dysfonctionnement pulmonaire et une réponse immunitaire amoindrie. Le but de ce paragraphe est de décrire les mécanismes moléculaires et cellulaires des actions cataboliques des glucocorticoïdes dans le muscle squelettique. Une meilleure compréhension des mécanismes des myopathies cortisoniques devrait conduire au développement de nouvelles voies thérapeutiques afin de préserver la masse et les fonctions musculaires chez les patients exposés à de fortes doses de glucocorticoïdes.

#### III.2.1 Rôle des glucocorticoïdes dans l'atrophie musculaire.

De nombreuses conditions pathologiques caractérisées par une atrophie musculaire sont associées à une augmentation des niveaux de glucocorticoïdes circulants (Lecker et al., 1999), suggérant que ces hormones pourraient contribuer à l'atrophie musculaire. Dans le cas d'une septicémie, d'une cachexie, d'un jeun prolongé et d'une insulinopénie, un traitement avec un antagoniste du récepteur des glucocorticoïdes comme le RU-486 atténue l'atrophie musculaire, indiquant que les glucocorticoïdes en sont en partie responsables. Au contraire, les glucocorticoïdes ne semblent pas requis dans le cas d'une immobilisation musculaire (Tischler, 1994), mais pourraient clairement exercer des effets délétères sur la masse du muscle squelettique dans d'autres conditions d'atrophie (Fitts et al., 2007).

#### III.2.2 Caractérisation de l'atrophie induite par les glucocorticoïdes.

L'atrophie du muscle squelettique est caractérisée par une diminution de la taille des fibres musculaires. Les glucocorticoïdes sont capables de causer l'atrophie des fibres de type II (x et b) avec peu voire pas d'impact sur les fibres de type I (Dekhuijzen et al., 1995; Fournier et al., 2003). Ainsi, les muscles glycolytiques sont plus sensibles aux glucocorticoïdes que les muscles oxydatifs. Cependant, le mécanisme expliquant la spécificité fibrillaire n'est pas connu.
#### III.2.3 Mécanismes de l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes.

Dans le muscle squelettique, les glucocorticoïdes diminuent le niveau de la synthèse des protéines et augmentent leur taux de dégradation (Goldberg et al., 1980; Lofberg et al., 2002; Tomas et al., 1979) contribuant ainsi à l'atrophie. Les effets cataboliques des glucocorticoïdes varient potentiellement avec l'âge. Par exemple, les glucocorticoïdes causent une atrophie plus sévère chez les rats âgés par rapport aux jeunes. En outre, l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes résulte principalement de l'augmentation de la protéolyse chez des rats adultes, mais aussi d'une forte diminution de la synthèse protéique chez des animaux âgés (Dardevet et al., 1998).

#### III.2.3.1 Action anti-anabolique des glucocorticoïdes.

L'effet inhibiteur sur la synthèse protéique résulte de différents mécanismes. Tout d'abord, les glucocorticoïdes inhibent le transport des acides aminés dans le muscle (Kostyo and Redmond, 1966). Deuxièmement, les glucocorticoïdes inhibent l'action stimulatrice de l'insuline, d'IGF-I et des acides aminés (en particulier la leucine) sur la phosphorylation de 4E-BP1 et de S6K1 (Liu et al., 2001a; Liu et al., 2004; Shah et al., 2000a; Shah et al., 2000b). Enfin, les glucocorticoïdes causent une atrophie musculaire en inhibant la myogenèse via une inhibition de la myogénine, un facteur de transcription obligatoire pour la différenciation des cellules satellites en fibres musculaires (te Pas et al., 2000).

#### III.2.3.2 Action catabolique des glucocorticoïdes.

L'effet stimulant des glucocorticoïdes sur la protéolyse musculaire résulte de l'activation des principaux systèmes protéolytiques cellulaires (Hasselgren, 1999), à savoir le système ubiquitine-protéasome (UPS), le système lysosomal (cathepsines) et le système dépendant du calcium (calpaïnes). La dégradation des protéines causée par les glucocorticoïdes affecte principalement les protéines myofibrillaires, ce qui est illustré par l'augmentation de l'excrétion de la 3-méthyl histidine (Tiao et al., 1996; Zamir et al., 1991). Pour activer la dégradation des protéines, les glucocorticoïdes stimulent l'expression de plusieurs composants de l'UPS, soit impliqués dans la conjugaison de l'ubiquitine à la protéine en voie de dégradation [ubiquitine, 14 kDa (E2), une enzyme de conjugaison ; atrogin-1 et MuRF-1, deux ubiquitine ligases (E3) spécifiques du muscle (Bodine et al., 2001a)], soit directement responsables de la dégradation des protéines par le protéasome [plusieurs sous-unités du

#### INTRODUCTION

protéasome 20S (Mitch and Goldberg, 1996)]. Cette activation de la transcription est associée à une augmentation du taux d'ubiquitination des protéines et à l'augmentation de l'activité protéolytique du protéasome (Combaret et al., 2005). De plus, les glucocorticoïdes stimulent aussi la dégradation des protéines via les calpaïnes et le lysosome (Hasselgren, 1999). L'augmentation de l'expression musculaire de la cathepsine L chez des animaux traités aux glucocorticoïdes suggère que le lysosome joue un rôle dans l'atrophie induite par les glucocorticoïdes (Deval et al., 2001; Komamura et al., 2003; Sacheck et al., 2004). Enfin, des données *in vivo* suggèrent également que la caspase-3 pourrait être impliquée dans la dégradation des protéines myofibrillaires induite par les glucocorticoïdes. En effet, ils augmentent l'activité de la caspase-3 dans le muscle, et son inhibition par l'Ac-DEVD-CHO supprime l'accélération de la protéolyse musculaire (Du et al., 2004). Cependant, le rôle des glucocorticoïdes dans l'induction de l'activité de la caspase-3 dans ces modèles n'a pas encore été exploré.

III.2.4 Voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes.

#### III.2.4.1 FOXO.

Le catabolisme de la cellule musculaire causé par les glucocorticoïdes est sans doute en partie relayé par les facteurs de transcription FOXO. Le rôle de ces facteurs de transcription dans l'atrophie de la cellule musculaire induite par les glucocorticoïdes a été établi par différentes observations. Tout d'abord, l'exposition de myotubes aux glucocorticoïdes augmente l'expression du gène FOXO (Imae et al., 2003). De plus, la surexpression d'un dominant négatif de FOXO-3a empêche l'atrophie des cellules musculaires, de même que l'induction de l'atrogin-1 provoquées par les glucocorticoïdes *in vitro* (Sandri et al., 2004). De manière générale, ces données indiquent que l'augmentation de l'expression des FOXO induite par les glucocorticoïdes active un programme de transcription génique responsable du déclenchement de l'atrophie musculaire (atrogin-1, MuRF-1, cathepsine L, PDK4, p21, Gadd45 et 4E-BP1) (Almon et al., 2007; Jagoe et al., 2002; Komamura et al., 2003; Lecker et al., 2004). Toutes ces observations confirment le rôle des FOXO dans l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes, bien qu'il n'existe pas de preuve directe *in vivo* du rôle de FOXO dans ce modèle d'atrophie musculaire (Figure 39).



**Figure 39 : Altérations dans les voies de dégradation des protéines, induites par les glucocorticoïdes.** La stimulation de la dégradation protéique résulte de différents mécanismes. En effet, les glucocorticoïdes (GC) induisent plusieurs systèmes protéolytiques en activant le facteur de transcription FOXO. L'induction de GSK3β pourrait également être impliquée dans la dégradation protéique des glucocorticoïdes.

#### III.2.4.2 GSK3β.

GSK3β, qui est phosphorylée et inhibée par Akt, pourrait également être impliquée dans l'effet atrophique des glucocorticoïdes. En effet, l'inhibition de GSK3β, par la surexpression d'un dominant négatif ou par des inhibiteurs pharmacologiques, prévient la protéolyse et l'atrophie cellulaire provoquée par les glucocorticoïdes *in vitro* (Evenson et al., 2005; Fang et al., 2005; Rommel et al., 2001). Le mécanisme par lequel l'inactivation de GSK3β inhibe la dégradation des protéines musculaires causée par les glucocorticoïdes n'est pas connu. Cependant, l'observation que l'inhibition de la dégradation des protéines par des inhibiteurs de GSK3β est associée au blocage de l'induction de l'expression de l'atrogin-1 et de MuRF-1 suggère que cette réduction de la protéolyse musculaire est relayée, au moins en partie, par l'inhibition de l'UPS (Evenson et al., 2005; Fang et al., 2005). Bien que le rôle de GSK3β dans l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes n'a pas encore été démontré *in vivo*, l'effet anti-catabolique des inhibiteurs de GSK3β suggère que ce facteur pourrait devenir une cible importante pour inhiber la fonte musculaire (Figure 39).

#### III.2.4.3 IGF-I.

Les glucocorticoïdes peuvent causer une atrophie musculaire en modifiant la production de facteurs de croissance qui contrôlent localement le développement de la masse musculaire tels qu'IGF-I [(Gayan-Ramirez et al., 1999), Figures 39 et 40]. Par ailleurs, IGF-I a un effet dominant, surpassant les glucocorticoïdes pour inhiber le catabolisme :

(i) en activant la voie PI3K/Akt/mTOR et en bloquant la translocation nucléaire de FOXO,
IGF-I inhibe les différents systèmes protéolytiques et l'expression d'atrogènes comme
l'atrogin-1, MuRF-1 ou la cathepsine L, induits par les glucocorticoïdes (Dehoux et al., 2004;
Latres et al., 2005; Li et al., 2005).

(ii) en supprimant l'atrophie des cellules musculaires causées par les glucocorticoïdes *in vitro* (Li et al., 2004; Sacheck et al., 2004).

(iii) en prévenant l'atrophie induite par les glucocorticoïdes quand il est administré de façon systémique (Fournier et al., 2003; Kanda et al., 1999; Tomas, 1998; Tomas et al., 1992) ou quand il est surexprimé dans le muscle squelettique (Schakman et al., 2005).

Par conséquent, une supplémentation en IGF-I pourrait constituer une stratégie d'inversion des effets cataboliques d'un excès en glucocorticoïdes.

#### III.2.4.4 mTOR.

L'inhibition de la synthèse protéique par les glucocorticoïdes résulte principalement de l'inhibition de mTOR, la kinase responsable de la phosphorylation de 4E-BP1 et S6K1. La répression de la signalisation de mTOR, en réponse aux glucocorticoïdes proviendrait d'une induction de la transcription de REDD1, un répresseur de signalisation de mTOR (Wang et al., 2006a). REDD1 a la capacité d'interagir avec le complexe TSC1-TSC2 qui est lui-même un inhibiteur de la protéine Rheb. Cette protéine contribue quant à elle à la stabilisation de la forme active de mTOR (Figure 40). Ainsi, REDD1 réprime mTOR, conduisant à une diminution de la phosphorylation des 4E-BP1 et S6K1. La signalisation de mTOR peut également être inhibée directement par FOXO (Southgate et al., 2007). Considérant que les effets des glucocorticoïdes sur la synthèse protéique ont été expliqués au niveau moléculaire, peu de chose sont connues sur la façon dont ces hormones altèrent l'expression des gènes anaboliques.

Des études récentes ont identifié ATF-4 en tant que facteur de transcription anabolisant réprimé par les glucocorticoïdes (Adams, 2007). ATF-4 semble être requis pour l'activation de l'absorption cellulaire d'acides aminés essentiels, et la synthèse des acides aminés non-

92

essentiels et des aminoacyl-ARNt. Cela suggère que les glucocorticoïdes inhibent la synthèse protéique, au moins partiellement, par l'inhibition d'ATF-4, ce qui pourrait limiter la disponibilité intracellulaire en acides aminés. Il est intéressant de noter que l'insuline induit la transcription d'ATF-4, même en présence de glucocorticoïdes (Figure 40).



Figure 40 : Effets anti-anaboliques des glucocorticoïdes. Leurs effets inhibiteurs sur la synthèse protéique résultent de plusieurs mécanismes.

(i) les glucocorticoïdes (GC) limitent la synthèse protéique en inhibant le transport des acides aminés dans le myocyte.

(ii) les glucocorticoïdes inhibent l'action stimulatrice de l'insuline, d'IGF-I et des acides aminés sur l'eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) et la protéine ribosomale S6 kinase 1 (S6K1) via une répression de l'activité de mTOR par REDD1.

#### III.2.4.5 Myostatine.

Les glucocorticoïdes stimulent la production musculaire en myostatine (Artaza et al., 2002; Ma et al., 2001; Ma et al., 2003). Cette hypothèse a été récemment confirmée *in vivo* (Gilson et al., 2007) en utilisant des souris KO pour la myostatine. Contrairement aux souris de type sauvage, les souris KO myostatine ne développent pas de réduction de la masse musculaire après un traitement aux glucocorticoïdes, ce qui indique que la myostatine est

essentielle pour relayer les effets atrophiques des glucocorticoïdes sur le muscle. Le mécanisme par lequel l'ablation de la myostatine empêche l'atrophie musculaire provoquée par les glucocorticoïdes n'est pas connue. Cependant, cette invalidation bloque l'induction des atrogènes et de l'activité protéosomale causée par les glucocorticoïdes (Gilson et al., 2007). Ainsi, ces résultats montrent que l'augmentation de la myostatine contribue à l'atrophie dépendante des glucocorticoïdes dans les muscles squelettiques. Par ailleurs, en plus de la stimulation de l'IGF-I, l'inhibition de la myostatine pourrait fournir une autre stratégie visant à inverser le catabolisme dû à un excès en glucocorticoïdes.

#### III.2.5 Conséquences de l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes.

L'administration de fortes doses de glucocorticoïdes cause non seulement une diminution de la masse musculaire, mais aussi un dysfonctionnement du myocyte, caractérisé par une réduction de la force musculaire (Shin et al., 2000). Chez l'homme, une relation significative entre l'usage de stéroïdes (comme les androgènes) et la force des muscles périphériques et respiratoires a été mise en évidence dans le cadre de maladies pulmonaires chroniques (Decramer et al., 1994) et de la fibrose kystique (Barry and Gallagher, 2003). Une faiblesse des muscles périphériques a également été observée chez les patients atteints de syndrome de Cushing, qui présentent des niveaux élevés de glucocorticoïdes endogènes (Khaleeli et al., 1983; Mills et al., 1999). Par conséquent, l'étude de l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes pourrait avoir d'importantes implications cliniques.

Les glucocorticoïdes constituent également l'un des meilleurs traitements de la dystrophie musculaire de Duchenne dont on dispose à l'heure actuelle. Cette myodystrophie est causée par des mutations dans le gène de la dystrophine sur le chromosome X à la position p21 et touche environ 1 homme sur 3500. La dystrophine est une longue molécule de 427 kDa qui est localisée sur la partie cytoplasmique du sarcolemme. Une de ces extrémités se lie à un complexe glycoprotéique du sarcolemme et l'autre au cytosquelette d'actine. Elle permet ainsi le lien entre le cytosquelette contractile et la matrice extracellulaire. Les mutations dans le gène de la dystrophine entraînent une perte quasi totale de la protéine conduisant dans les muscles triés et cardiaques à des dommages dans le sarcolemme, une perte de l'homéostasie calcique et la dégénération de la fibre musculaire. Ces dommages sont également associés à une forte inflammation au niveau des muscles et des tendons. A ce jour, les glucocorticoïdes constituent le traitement le plus efficace contre la DMD, et des revues sont mises à jour régulièrement dans la librairie

94

#### INTRODUCTION

Cochrane. Des tests cliniques ont montré qu'un traitement à la prednisone pouvait stabiliser la force et les fonctions musculaires, mais prolongeaient également les capacités ambulatoires ainsi que les fonctions respiratoires. Cependant, ces traitements ont des effets secondaires importants, notamment une prise de poids et des fractures au niveau des vertèbres occasionnées lors d'un traitement à long terme (Manzur et al., 2008).

#### III.3 Modèles murins d'invalidation de GR.

Un outil puissant pour l'étude des fonctions des protéines *in vivo* est l'utilisation de souris génétiquement modifiées. Les souris homozygotes pour une invalidation ciblée du gène de GR (GR<sup>-/-</sup>) meurent dans les heures suivant leur naissance, en raison d'une insuffisance respiratoire résultant d'un défaut sévère de développement des poumons (Cole et al., 1995). De plus, l'expression des enzymes de la néoglucogenèse comme la glucose-6-phosphatase et des gènes du catabolisme des acides aminés tels que la tyrosine aminotransférase (TAT) et la sérine déshydrogénase est sensiblement réduite chez ces souris. Au niveau de l'axe HPA, les souris GR<sup>-/-</sup> ont des niveaux d'ACTH 20 fois plus élevés et des niveaux de corticostérone circulante 2 à 3 fois supérieurs aux souris contrôles. De même, l'expression de la CRH dans l'hypothalamus des souris GR<sup>-/-</sup> est environ cinq fois supérieure à celle des souris de type sauvage (Kretz et al., 1999). Ces effets sont en accord avec une perte de l'inhibition du rétrocontrôle négatif de l'axe HPA, et confirment donc le rôle de GR dans ce processus.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de GR, une lignée de souris transgéniques a été créée dans laquelle le GR sauvage a été remplacé par un récepteur contenant la mutation A458T dans la boucle D [Figure 41, (Reichardt et al., 1998)]. Du fait que ce récepteur est incapable de s'homodimériser, il ne peut ni se lier à l'ADN ni activer la transcription des sites classiques GRE, tandis que la transrépression via les facteurs AP-1 et NF-κB n'est pas affectée (Dahlman-Wright et al., 1991; Heck et al., 1994). Ainsi, les souris homozygotes pour la mutation A458T, nommées GR<sup>dim/dim</sup>, offrent l'occasion de tester *in vivo* les effets de GR dépendant ou indépendant de la liaison à l'ADN (Reichardt and Schutz, 1998). Contrairement aux souris GR<sup>-/-</sup>, les souris GR<sup>dim/dim</sup> sont viables (Reichardt et al., 1998), ce qui implique que les fonctions nécessaires au développement des poumons et à d'autres processus physiologiques sont indépendantes de la liaison de GR à l'ADN. De manière intéressante, l'expression de la TAT ou d'autres gènes impliqués dans la néoglucogenèse n'est pas modifiée chez les souris GR<sup>dim/dim</sup>, ce qui indique que la dimérisation de GR et la liaison à l'ADN *in vivo* ne sont pas nécessaires à la transactivation de ces gènes dépendante de GR.

Ainsi, l'analyse *in vivo* de souris sauvages, GR<sup>-/-</sup>, et GR<sup>dim/dim</sup> confirme les données *in vitro* en démontrant que les fonctions dépendantes et indépendantes de la liaison à l'ADN sont distinctes. En outre, il apparaît que la transrépression impliquant les mécanismes de d'interaction avec les autres facteurs de transcription demeure intacte, du moins concernant les gènes dépendants d'AP-1 (Reichardt et al., 1998). D'autres études sont désormais

96

nécessaires afin d'examiner la capacité de ces souris à supprimer diverses réactions inflammatoires en réponse aux glucocorticoïdes, ainsi que pour déterminer les autres effets indésirables.



**Figure 41 : Structure du DBD du récepteur des glucocorticoïdes.** L'agrandissement d'une partie du DBD montre la séquence d'acides aminés des deux doigts de zinc et de la boucle de dimérisation (en gras). La numérotation du récepteur humain et du rat est donnée. La mutation du A en T en position 458 rendant la dimérisation des récepteurs défectueuse est signalée.

Récemment, les souris GR<sup>dim/dim</sup> ont été analysées dans le cadre de l'atrophie musculaire (Waddell et al., 2008). Dans cette étude, les souris GR<sup>dim/dim</sup> perdent significativement moins de poids que les souris de type sauvage quand elles sont traitées à la dexaméthasone. Cependant, le degré d'atrophie musculaire relevé chez les souris contrôles est similaire à celui des souris GR<sup>dim/dim</sup>, montrant que la dimérisation de GR n'est pas nécessaire pour médier l'atrophie musculaire. MuRF1, une ubiquitine ligase possédant un GRE au niveau de son promoteur, est fortement induite chez les souris contrôles après traitement à la dexaméthasone, ce qui n'est pas le cas chez les souris GR<sup>dim/dim</sup>. La même observation fut faite pour FOXO1 et 3a, indiquant que la dimérisation est nécessaire à l'induction de ces deux facteurs, et donc que l'atrophie chez ces animaux résulte de l'activation d'autres voies de signalisation.

#### IV TIF2 ET METABOLISME ENERGETIQUE

#### IV.1 Identification de la famille des SRCs.

Trois membres homologues de la famille de gènes SRC ont été identifiés chez l'homme et les rongeurs. SRC-1 a été cloné par sa capacité à interagir avec PR, ER ou TR (Kamei et al., 1996; Onate et al., 1995; Takeshita et al., 1996). SRC-2, ou TIF2, a été identifié par le biais de ses interactions avec les domaines de liaison au ligand de GR et ER (Glass et al., 1997; Hong et al., 1996; Torchia et al., 1997; Voegel et al., 1996). SRC-3 a d'abord été identifié dans une région chromosomique amplifiée d'un cancer du sein de cellules humaines et, par la suite caractérisé comme un co-activateur des récepteurs nucléaires, homologue de SRC-1 et TIF2 (Anzick et al., 1997; Chen et al., 1997; Glass et al., 1997; Li et al., 1997; Suen et al., 1998; Takeshita et al., 1997; Torchia et al., 1997). Les trois membres de la famille SRC sont capables d'interagir avec de multiples RNs de manière ligand-dépendante [voir pour revue (Xu and O'Malley, 2002)]. En plus des RNs, les membres de la famille SRC interagissent avec certains autres facteurs de transcription tels qu'AP-1 (Lee et al., 1998), SRF (Kim et al., 1998), NF-κB (Na et al., 1998) et CREB (Torchia et al., 1997). Par conséquent, lorsqu'ils sont surexprimés dans des cellules en culture, chaque membre de la famille SRC semble servir de co-activateur général pour plusieurs RNs et certains autres facteurs de transcription. Inversement, l'activité transcriptionnelle d'un RN donné peut être relayée par n'importe quel membre de la famille SRC. Cette relation fonctionnelle définie par des expériences in vitro sur les différents RNs et SRCs pourrait fournir une explication concernant une redondance fonctionnelle entre les membres de la famille SRC in vivo.

#### IV.2 Domaines structuraux et fonctionnels de la famille des SRCs.

Les protéines codées par les gènes de la famille SRC chez l'homme et les rongeurs sont d'une taille d'environ 160 kDa, et ont une similarité de séquence de 50-55% et une identité de séquence de 43-48% entre les trois membres (Figure 42). Leur domaine le plus conservé est le domaine "N-terminal bHLH/Per/Ah receptor nuclear translocator (ARNT)/Sim". Il a été initialement identifié dans des protéines de drosophile (Per et Sim), où il est impliqué dans la liaison à l'ADN et hétérodimérisation entre protéines contenant ces motifs (Huang et al., 1993). La région centrale de la famille SRC est relativement bien conservée et contient trois motifs LXXLL (L, leucine, X, tout acide aminé) qui sont responsables de l'interaction avec les RNs liés à leurs ligands [L1-L3 dans la Figure 42 ; (Chen et al., 1997; Heery et al., 1997; Torchia et al., 1997; Voegel et al., 1998)], ce domaine est appelé NID (Nuclear receptor Interaction Domain). Des motifs LXXLL distincts montrent une affinité de liaison différente selon le RN, suggérant que les RNs ont une préférence pour un motif LXXLL par rapport à un autre dans le même co-activateur, ou pour un co-activateur plutôt qu'un autre. Toutefois, une seule mutation de n'importe lequel de ces trois motifs LXXLL supprime complètement l'interaction entre les SRCs et les RNs, ce qui suggère que plusieurs motifs LXXLL sont impliqués dans la haute affinité de liaison du SRCs aux RNs [voir pour revue (Leo and Chen, 2000)].

TEF-4	Nuclear Receptors		AD1	CARM1/PRMT1 AD2	
Myogenin MEE-2C			CBP/p300		
bHLH/PAS	S/T			HAT hSRC-3	
bHLH/PAS	S/T			hSRC-2	
bHLH/PAS	S/T	GØB	L415L6Q	HAT D hSRC-1	
hSRC1/2 : 73% (64%) hSRC1/3 : 67% (59%) hSRC2/3 : 71% (63%)		55% (48%) 55% (45%) 64% (58%)	42% (36 45% (38 52% (46	6%) 6%) 6%)	

Similarité (identité) : hSRC1/2, 54% (46%) ; hSRC1/3, 50% (43%) ; hSRC2/3, 55% (48%)

Figure 42 : Domaines structuraux et fonctionnels des membres de la famille des SRCs. La similarité et l'identité des séquences d'acides aminés des formes entières des protéines SRCs humaines et leurs régions spécifiques conservées sont indiquées autour des barres. Les domaines d'interaction avec différents facteurs ou d'activation transcriptionnelle (AD) 1 et 2 sont représentés. PAS, domaine homologue à Per/ARNT/Sim ; S/T, régions riches en sérine/thréonine ; L entouré, motifs LXXLL en hélice  $\alpha$  typique ; L encadré, motifs LXXLL atypiques (L4 = PDDLL pour hSRC-2 ou LDDLV pour hSRC-3 et L6 = IDKLV pour hSRC-1 ou IPELV pour hSRC-2 et hSRC-3) (Leo and Chen, 2000) ; Q, régions riches en glutamine ; HAT, domaines histone acétyltransférase identifiés pour SRC-1 et SRC-3 (Chen et al., 1997; Spencer et al., 1997).

Il existe deux domaines d'activation transcriptionnelle intrinsèques (AD1 et AD2) définis lors d'expériences de transfection en liant les différentes régions des protéines SRCs au domaine de liaison à l'ADN de Gal4. La région AD1 est responsable de l'interaction avec des co-régulateurs (e.g. CBP et p300), mais ne pas interagir avec les RNs [Figure 42, (Li et al., 1997; Onate et al., 1998; Voegel et al., 1996)]. Le deuxième domaine d'activation transcriptionnelle (AD2) est situé en C terminal des protéines SRCs. AD2 est responsable de l'interaction avec les histones méthyltransférases, CARM-1 et PRMT1 (Chen et al., 1999a; Koh et al., 2001). Le recrutement de ces histones méthyltransférases à un enhancer / promoteur par les co-activateurs SRCs pourrait être critique pour le remodelage local de la chromatine dirigé par les RNs, ainsi que l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle au niveau du promoteur (Figure 43).



Figure 43 : La transcription dépendante des récepteurs nucléaires est médiée par des complexes de co-activateurs multiples.

Les complexes de co-régulateurs incluant les complexes brahma-related gene/brahma, SRC, ASC-2, et TRAP/DRIP peuvent être recrutés par des RNs liés à leur ligand sur des régions spécifiques de la chromatine pour le remodelage de cette chromatine, facilitant ainsi l'assemblage des facteurs généraux de transcription (GTFs), et l'activation de la transcription de gènes cibles. H, Hormone; Ac, acétylation; Me, méthylation.

#### IV.3 Rôle des SRCs dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transcription.

Les domaines C-terminaux de SRC-1 et SRC-3 ont des activités d'histone acétyltransférase (HAT), soulevant la possibilité que les co-activateurs SRCs pourraient jouer un rôle direct dans le remodelage de la chromatine au cours du processus d'initiation de la transcription dirigé par les RNs (Chen et al., 1997; Spencer et al., 1997). Toutefois, l'activité HAT des SRCs est beaucoup plus faible que celle de CBP, p300 et p/CAF, et l'inactivation de l'activité HAT de SRC-1 par mutations ciblées ne semble pas affecter de façon significative sa fonction de co-activation dans un système transcriptionnel *in vitro* (Liu et al., 2001b; Spencer et al., 1997). Ces données suggèrent que l'activité HAT intrinsèque

des SRCs pourrait ne pas être essentielle pour l'initiation de la transcription dirigée par les RNs.

Les SRCs pourraient jouer un rôle majeur dans le remodelage de la chromatine et l'assemblage général des facteurs de transcription par des recrutements directs et indirects d'autres co-activateurs. Différentes données vont dans le sens d'un mécanisme moléculaire séquentiel concernant la fonction des SRCs. Tout d'abord, les complexes SRCs préexistants contenant CBP, p300, p/CAF, CARM-1 et PRMT1 (les composants spécifiques pourraient être dépendants du type cellulaire) sont recrutés au niveau de la chromatine par des interactions directes entre les RNs et les SRCs, déclenchées par la liaison au ligand, et entraînant des acétylations et méthylations sur des sites particuliers d'histones spécifiques (Chakravarti et al., 1996; Chen et al., 1999a; Demarest et al., 2002; Kamei et al., 1996; Koh et al., 2001; Lee et al., 2002; Li et al., 2000; Li et al., 2003a; Shang et al., 2000; Sheppard et al., 2001). Deuxièmement, le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF est recruté à la chromatine via des interactions directes ou indirectes avec CBP/p300, et le recrutement est stabilisé par les queues d'histones acétylées par CBP/p300. Le complexe SWI/SNF contient une ATPase et cause des acétylations des histones de manière dépendante de l'ATP, ce qui entraîne des changements de topologie de l'ADN (Dilworth et al., 2000; Huang et al., 2003; Rosenfeld and Glass, 2001). Troisièmement, le complexe médiateur TRAP peut être recruté à la chromatine par des interactions avec le complexe SRC/CBP/p300 ou des interactions directes avec RNs. Des études ont également montré que le recrutement du complexe TRAP par p300 est en partie dépendant de l'acétylation des histones. Le complexe TRAP communique directement avec la machinerie transcriptionnelle de base et facilite l'initiation de l'expression des gènes (Fondell et al., 1996; Huang et al., 2003; Ito and Roeder, 2001; Rachez et al., 1998; Shang et al., 2000; Sharma and Fondell, 2002). Quatrièmement, l'ensemble du processus de recrutement des co-activateurs induit par les RNs, d'assemblage de la machinerie transcriptionnelle, et d'initiation de la transcription est dynamique et pourrait se produire de façon cyclique. Le cycle est probablement régulé par la phosphorylation de la partie C terminale de la polymérase II, par l'échange de co-activateurs comme celui de p300 par CBP et par des modifications covalentes des co-régulateurs tels que la phosphorylation et l'acétylation des SRCs (Chen et al., 1999b; Rowan et al., 2000; Shang et al., 2000).

#### IV.4 Fonctions biologiques de la famille des SRCs.

Notre connaissance des fonctions biologiques de SRCs est en partie basée sur des patrons d'expression des ARNm et des protéines, mais surtout sur les phénotypes de modèles de rongeurs génétiquement modifiés (Tableau 3). Nous nous axerons principalement sur le rôle de chaque SRC dans le métabolisme énergétique.

#### IV.4.1 SRC-1

Le gène SRC-1 est situé sur le chromosome 2 (p23) chez l'homme et le chromosome 12 (A2-A3) chez la souris (Carapeti et al., 1998; Ning et al., 1999). Il est largement exprimé dans de nombreux tissus et types cellulaires dont les muscles squelettiques et le tissu adipeux blanc (Li and Chen, 1998; Misiti et al., 1998; Picard et al., 2002).

Aucune maladie humaine connue n'a été spécifiquement liée à une anomalie génétique de SRC-1 à ce jour. De plus, les souris ne possédant pas de forme fonctionnelle de la protéine SRC-1 présentent une croissance normale et sont fertiles. Toutefois, les modèles génétiques ont fourni des indices importants concernant la résistance partielle aux hormones stéroïdes due à la perte de fonction de SRC-1, et plusieurs observations indiquent que SRC-1 est l'un des co-activateurs qui, *in vivo,* relaye une partie de l'activité transcriptionnelle de récepteurs stéroïdiens (Xu et al., 1998).

SRC-1 participe également à la régulation de l'activité du récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). Dans le foie, SRC-1 ne semble pas nécessaire à l'expression des gènes régulés par PPAR $\gamma$  (Qi et al., 1999). En revanche, dans le tissu adipeux brun, l'activation de PPAR $\gamma$  déclenche le recrutement d'un complexe de co-activateurs, incluant PGC-1 $\alpha$ , SRC-1 et CBP/p300 (Puigserver et al., 1999). L'inactivation de SRC-1 réduit la dépense énergétique, et conduit à une obésité lors d'un régime hypercalorique. En effet, les souris SRC-1<sup>-/-</sup> présentent une température corporelle et des capacités respiratoires plus faibles. De plus, l'absence de SRC-1 altère l'activité thermogénique de PGC-1 $\alpha$  en diminuant ces niveaux d'expression, et diminue les dépenses énergétiques via une baisse des niveaux d'expression de gènes tels qu'UCP1 et AOX1 dans le BAT (Picard et al., 2002). Les différentes caractéristiques de ce phénotype sont détaillées dans le Tableau 3.

Ainsi, SRC-1 semble jouer un rôle important dans le contrôle de la balance énergétique dans les tissus adipeux blanc et brun. Cependant, sa fonction dans d'autres tissus tels que le muscle squelettique reste à déterminer.

102

#### <u>IV.4.2 TIF2</u>

Le gène TIF2 (SRC-2 ou GRIP1) est situé sur le chromosome 8 (q21) chez l'homme et le chromosome 1 (A3-A5) chez la souris (Kalkhoven et al., 1998; Ning et al., 1999). L'ARNm de TIF2 a été détecté dans de nombreux tissus dont le muscle squelettique (Li and Chen, 1998; Nishihara et al., 2003; Voegel et al., 1996; Xu et al., 1998).

De même que les souris SRC-1<sup>-/-</sup>, les souris TIF2<sup>-/-</sup> présentent une croissance somatique normale. Toutefois, la fécondité est considérablement réduite à la fois chez les mâles et les femelles TIF2<sup>-/-</sup> (Gehin et al., 2002), indiquant que TIF2 joue un rôle important dans le comportement et les fonctions de reproduction.

Des études récentes ont montré que TIF2 joue un rôle important dans le métabolisme lipidique et la balance énergétique (Picard et al., 2002). Dans le tissu adipeux blanc (WAT), TIF2 sert de co-activateur à PPAR<sub>Y</sub>. Chez les souris TIF2<sup>-/-</sup>, le WAT exprime des niveaux plus élevés de leptine et plus faibles pour les gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras (comme les perilipines, la protéine de liaison aux acides gras AP2, la lipoprotéine lipase et PPARy), augmentant de ce fait le niveau de la lipolyse et diminuant le potentiel de stockage des acides gras. Dans le tissu adipeux brun (BAT), SRC-1 est un meilleur co-activateur que TIF2 pour stabiliser le complexe formé par PPARγ et PGC-1α pour l'activation transcriptionnelle. L'absence de TIF2 dans le BAT facilite la formation du complexe PPARy/PGC-1a/SRC-1 pour la transactivation dépendante de PPARy. Ainsi, le BAT ne possédant pas TIF2 exprime des niveaux plus élevés d'UCP1, de PGC-1 $\alpha$ , et d'acétyle coenzyme A oxydase, provoquant une augmentation de la dépense énergétique due à l'oxydation accrue des acides gras et au découplage de la respiration mitochondriale. En conséquence, les souris TIF2<sup>-/-</sup> présentent une température corporelle plus élevée lorsqu'elles sont mises au froid, elles accumulent moins de graisses, présentent de plus faibles niveaux de glycémie à jeun et de triglycérides, et une plus grande sensibilité à l'insuline. Ces souris sont protégées contre l'obésité induite par un régime alimentaire riche en graisses ou une hyperphagie. De façon intéressante, une alimentation riche en graisses provoque une augmentation des niveaux d'expression de TIF2, à la fois dans le WAT et le BAT, ainsi que du rapport TIF2/SRC-1, qui pourrait refléter une partie des mécanismes moléculaires intervenant dans l'accumulation de graisses (Picard et al., 2002).

Par ailleurs, TIF2 est exprimé dans les myoblastes en prolifération et dans les myotubes post-mitotiques, et potentialisait la différenciation du muscle squelettique en agissant comme co-activateur critique pour la transactivation relayée par MEF-2 (Chen et al., 2000). Toutefois, aucun défaut de développement des muscles squelettiques n'a été rapporté chez

103

les souris TIF2<sup>-/-</sup> (Gehin et al., 2002), suggérant que TIF2 n'est pas essentiel à la différenciation du muscle squelettique, et que d'autres membres de la famille SRC pourraient compenser la perte de la fonction de TIF2 dans le développement du muscle squelettique *in vivo*.

Récemment, TIF2 a été identifié comme un régulateur de la libération de glucose hépatique lors d'un jeûne, une fonction que TIF2 effectue en contrôlant l'expression de la glucose-6-phosphatase hépatique (Chopra et al., 2008). TIF2 module l'expression de la G6Pase en agissant directement comme un co-activateur du récepteur nucléaire orphelin RORa. En outre, l'ablation de TIF2, à la fois dans un organisme entier et dans le foie de façon spécifique, aboutit à un phénotype équivalent à la maladie de von Gierke (maladie liée au stockage du glycogène) chez la souris, positionnant ainsi TIF2 comme un régulateur essentiel de la production de glucose chez les mammifères.

#### IV.4.3 SRC-3

Le gène SRC-3 est situé sur le chromosome 20 (q12) chez l'homme et le chromosome 2 (H2-H4) chez la souris (Anzick et al., 1997; Ning et al., 1999). Comme les autres membres de la famille, SRC-3 est également exprimé, entre autre dans les muscles squelettiques (Chen et al., 1997; Coste et al., 2008; Li and Chen, 1998; Suen et al., 1998; Takeshita et al., 1997; Xu et al., 1998). Contrairement aux souris SRC-1<sup>-/-</sup> et TIF2<sup>-/-</sup>, les souris SRC-3<sup>-/-</sup> montrent un retard de croissance et une taille corporelle inférieure à l'âge adulte, probablement dus à de plus faibles niveaux d'IGF-1 et à une résistance partielle de leurs tissus à cette protéine (Wang et al., 2000; Xu et al., 2000). Les fonctions reproductrices des mâles SRC-3<sup>-/-</sup> ne sont que légèrement réduites, mais le développement et le fonctionnement du système reproducteur féminin est fortement affecté par la mutation (Xu et al., 2000).

SRC-3 est également un régulateur notoire de la mise en place du tissu adipeux. En effet, la différenciation des fibroblastes embryonnaires de souris SRC-3<sup>-/-</sup> en adipocytes est abolie, et restaurée par la réexpression de SRC-3. Les premiers stades de la différenciation des adipocytes sont accompagnés d'une augmentation des niveaux nucléaires de SRC-3. Les souris SRC-3<sup>-/-</sup> ont un poids corporel et une masse de tissu adipeux réduits, associés à une diminution significative de l'expression PPAR<sub>Y</sub>2, un gène essentiel pour l'adipogenèse. Au niveau moléculaire, SRC-3 agit en synergie avec le facteur de transcription C/EBP pour contrôler l'expression de PPAR<sub>Y</sub>2 (Louet et al., 2006). Cette étude fut poursuivie par Coste et al. qui ont caractérisé les mécanismes par lesquels le co-activateur SRC-3 contrôle la

#### INTRODUCTION

balance énergétique (Coste et al., 2008). Les souris SRC-3<sup>-/-</sup> présentent un profil métabolique plus favorable, dû à une augmentation de l'activité mitochondriale et de la dépense énergétique, conséquentes à l'activation de PGC-1 $\alpha$ . En contrôlant l'expression de GCN5, la seule acétyltransférase de PGC-1 $\alpha$  caractérisée, SRC-3 induit l'acétylation de PGC-1 $\alpha$  et inhibe son activité. De manière intéressante, l'expression de SRC-3 est induite par un excès calorique, ce qui entraîne l'inhibition de l'activité de PGC-1 $\alpha$  et des dépenses énergétiques, à l'inverse de la restriction calorique. Le détail du phénotype est présenté dans le Tableau 3.

En parallèle de ces études menées de concerts par les équipes de Bert O'Malley et de Johan Auwerx, l'équipe de Tony Hunter s'est attachée à caractériser le double KO SRC-1, SRC-3 (Wang et al., 2006b). Ces souris présentent un arrêt du développement du BAT interscapulaire et une thermogenèse adaptative défectueuse en raison d'un défaut d'induction des gènes cibles de PPAR<sub>γ</sub>, impliqués dans l'adipogenèse et le découplage mitochondrial. En l'absence de SRC-1 et de SRC-3, les souris sont hyperphagiques, à la fois sous alimentation équilibrée et dans le cas d'un régime hypercalorique, et ce en raison d'une diminution des taux sanguins de leptine. Toutefois, les souris SRC-1<sup>-/-</sup> / SRC-3<sup>-/-</sup> sont maigres et résistantes à l'obésité induite par un régime riche en graisses. De plus, le métabolisme basal et l'activité physique sont augmentés chez ces souris, montrant ainsi que SRC-1 et SRC-3 jouent un rôle crucial dans l'équilibre énergétique en contrôlant à la fois l'apport énergétique et la dépense énergétique. La comparaison les doubles mutants à la fois aux souris contrôles mais aussi aux simples mutants n'a révélé aucune des différences citées précédemment, remettant en cause l'implication de chaque facteur dans le métabolisme

Ces études montrent donc que les membres de la famille des p160 jouent très certainement un rôle prépondérant dans le métabolisme énergétique mais leur mode d'action exact et leurs spécificités tissulaires restent à déterminer.

	SRC-1 <sup>-/-</sup>		TIF2 <sup>-/-</sup>	SRC-3 <sup>-/-</sup>		SRC-1/SRC-3 <sup>-/-</sup>	
	Wang, et al. 2006	Picard, et al. 2002	Picard, et al. 2002	Coste, et al. 2008	Wang, et al. 2006	Wang, et 2006	al.
Poids (RD)	Identique		Identique	Diminué	-50 à -70%	-50 à -70%	
Poids (HFD)	Identique (gain)	Augmenté (gain)	Diminué	Diminué	Identique (gain)	-80% (gain)	
Poids BAT (RD)	Identique		Diminué	Diminué	Identique	-50%	
Particularité	Identique		Augmentation nombre cellules WAT		Identique	Arrêt croissance BAT	de du
Histologie BAT (RD)	Identique		Adipocytes plus petits		Identique	Adipocytes petits	plus
Histologie BAT (HFD)	Identique	Infiltrations lipidiques dans le BAT			Identique	Moins gouttes lipidiques	de
Poids WAT (RD)	Identique		Identique	Diminué	Identique	-43%	
Poids WAT (HFD)		Augmenté		Diminué			
Température	Identique		Identique		Identique	Identique	
Température au froid	Identique (RD)	Diminuée (HFD)	Augmentée		Identique	~ -3°C	
Température à jeun		Diminuée (HFD)	Augmentée (+ refed)				
Température sous HFD	Identique	Identique			Identique	~ -1°C	

Tableau 3 : Partie 1.

	SRC1 <sup>-/-</sup>		TIF2 <sup>-/-</sup>	SRC3 <sup>-/-</sup>		SRC1/SRC3 <sup>-/-</sup>	
	Wang, et al. 2006	Picard, et al. 2002	Picard, et al. 2002	Coste, et al. 2008	Wang, et al. 2006	Wang, et al. 2006	
Histologie WAT (RD)			Adipocytes plus petits				
Histologie WAT (HFD)	Identique				Identique	Adipocytes plus petits	
Prise alimentaire (RD)	Identique		Identique	Identique	Identique	Augmentée	
Prise alimentaire (HFD)	Identique		Augmenté	Identique	Identique	Augmentée	
Glucose			Diminué (jeun)	Diminué (HFD)			
Insuline			Diminué (RD)	Diminuée (HFD)			
IPGTT			Amélioré (RD + HFD)	Amélioré (RD + HFD)			
IPIST			Amélioré (RD)	Amélioré (HFD)			
Leptine (RD)	Identique	Augmentée (HFD)	Augmentée		Identique	Diminuée	
Triglycérides	Identique (HFD)		Diminué (RD, jeun)	Diminué (HFD)	Identique (HFD)	Diminués (HFD)	
Cholestérol (HFD)	Identique			Diminué	Identique	Diminué	
FFA (RD)			Augmentés	Diminués			
Corps Cétonés		Diminués	Augmentés				
VO2	Identique	Diminué	Augmenté	Augmenté	Identique	Augmentée	
VCO2				Augmenté			
RQ		Augmenté		Diminué ?			
Xamb	Identique			Identique	Identique	Augmentée	
mtDNA				Augmenté			
				(muscle +			
				Bat)			

Tableau 3 : Partie 2.

	SRC1 <sup>-/-</sup>		TIF2 <sup>-/-</sup>	SRC3 <sup>-/-</sup>		SRC1/SRC3 <sup>-/-</sup>
	Wang, et al. 2006	Picard, et al. 2002	Picard, et al. 2002	Coste, et al. 2008	Wang, et al. 2006	Wang, et al. 2006
UCP1 (RD)	Identique		Augmenté		Identique	Diminué
UCP2 (RD)	Identique				Identique	Diminué
CD36 (RD)	Identique				Identique	Diminué
AOX1 (RD)	Identique		Augmenté		Identique	Diminué
LPL (RD)	Identique		Diminué		Identique	Identique
AP2 (RD)	Identique		Diminué		Identique	Identique
COX2 (RD)	Identique				Identique	Identique
PPARg (RD)			Diminué			
Leptine (RD)			Augmentée			
PGC-1α			Augmenté			
			lelentieure			
	Idontiquo	Diminuá	Identique	Augmontó	Identique	Diminuá
	Identique	Diminue		Augmente	Identique	Diminue
				Augmente		
	Idontiquo			Augmente	Identique	Diminuá
	Identique				Identique	Diminué
	Identique				Identique	Diminué
LPL (HFD)	Identique				Identique	Diminué
(HFD)	Identique				Identique	Diminue
PGC-1α (HFD)		Diminué		Augmenté		
AOX1 (HFD)	Augmenté ?	Diminué			Identique	Diminué
PGC-1b				Augmenté		
NRF-1				Augmenté		
Tfam				Augmenté		
mCPT1				Augmenté		
Cyt C				Augmenté		
CoxIV				Augmenté		
ACO				Rien		
ATPsynth				Augmenté		
ERRa				Augmenté		

Tableau 3 : Partie 3.

Tableau 3 en 3 parties récapitulant les différentes observations réalisées sur les souris nulles pour les différents co-régulateurs de la famille des p160 : SRC-1, TIF2, SRC-3 et le double mutant SRC-1/SRC-3.

#### V SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS.

L'invalidation fonctionnelle des gènes par introduction de mutations nulles dans la lignée germinale chez la souris a permis des avancées importantes concernant le rôle de ces gènes *in vivo*. Cependant, cette stratégie présente un certain nombre de limitations. En effet, l'invalidation de certains gènes, comme c'est le cas pour GR, conduit à une mort précoce des animaux, ne permettant alors pas de comprendre la fonction de ces gènes à des stades plus tardifs. De plus, des compensations peuvent se mettre en place au cours du développement, après ce type de mutations. Enfin, l'invalidation d'un gène dans l'organisme entier peut avoir pour conséquence un phénotype complexe, ne permettant pas de discriminer des effets particuliers dans un tissu donné. La découverte réalisée par Austin et collaborateurs du système de recombinaison Cre-LoxP dans le bactériophage P1 (Austin et al., 1981), a permis le développement d'une nouvelle technique de mutations somatiques ciblées.

Le système Cre-LoxP consiste en une recombinaison homologue entre deux segments d'ADN spécifiques appelés sites LoxP, réalisée par une recombinase Cre. Les sites LoxP sont composés de deux séquences palindromiques de 13bp, séparées par 8 bp. Lorsque les sites LoxP sont placés dans une conformation « tête-bêche », la recombinase Cre induit une inversion de la séquence située entre les deux sites LoxP (séquence floxée). A l'inverse, si les sites LoxP sont dans une conformation « tête-à-queue », la recombinase induit l'excision de la séquence floxée [(Austin et al., 1981) ; Figure 44].



Figure 44 : Le système Cre/LoxP.

Au début des années 1990, Orban et collaborateurs ont montré que l'expression de la recombinase Cre chez des souris possédant une séquence d'ADN floxée, induisait l'excision de ce fragment (Orban et al., 1992). Puis, l'utilisation de promoteurs tissus-spécifiques pour contrôler l'expression de la Cre a permis de réaliser des mutations de gènes sélectivement dans un tissu donné. Ainsi, l'utilisation du promoteur de l'a-actine squelettique humaine a permis de réaliser des mutations de gènes sélectivement dans les muscles squelettiques (Miniou et al., 1999; Schuler et al., 2005).

Afin de permettre un contrôle temporel de l'activité de la recombinase Cre, une protéine de fusion entre la recombinase Cre et le LBD du récepteur humain des oestrogènes α (hER a) a été générée au laboratoire. La recombinase Cre chimérique ainsi générée (Cre-ER) a une activité contrôlée par les oestrogènes (Metzger et al., 1995). Cependant, l'introduction de la recombinase Cre-ER chez des souris transgéniques, aurait pour conséquence une activation constitutive par les oestrogènes endogènes. Pour contourner cet effet, des mutations ont été introduites dans le LBD de hERα, conduisant à une nouvelle recombinase Cre chimérique (Cre-ER<sup>T2</sup>), dont l'activité est uniquement induite par un ligand synthétique, le tamoxifène [(Feil et al., 1997) ; Figure 45]. Cette technique d'invalidation spatio-temporelle des gènes est un outil puissant pour l'étude de leurs fonctions *in vivo*.



Figure 45 : Induction de l'activité Cre recombinase en présence de Tamoxifène.

#### VI LES OBJECTIFS DE LA THESE.

Les objectifs de cette thèse sont de caractériser les fonctions de GR et de TIF2 dans le muscle squelettique chez la souris.

Les études concernant les effets des traitements à la dexaméthasone ont mis en évidence un rôle catabolique des glucocorticoïdes sur le muscle squelettique (pour revue...). En revanche, elles n'apportent aucune réponse concernant leurs mécanismes d'action. Ainsi, l'utilisation thérapeutique de molécules antagonistes du récepteur des glucocorticoïdes chez l'homme pour contrecarrer la perte de masse et de force musculaire liée à l'âge ou à des pathologies, nécessite une meilleure compréhension au niveau moléculaire de leurs actions. Afin de préciser ces mécanismes, des modèles animaux d'invalidation de GR ont été développés. Cependant, l'invalidation de GR chez ces animaux étant létale, les effets relayés spécifiquement au niveau des muscles à l'âge adulte n'ont pas pu être déterminés. De plus, GR est exprimé dans de nombreux types cellulaires au sein du muscle squelettique (fibroblastes, myocytes, cellules satellites) et, bien que la principale hypothèse soit que l'essentiel de l'action des glucocorticoïdes consiste à cibler les myofibres pour activer le catabolisme musculaire, aucune étude réalisée à l'heure actuelle n'a pu déterminer le rôle exact du récepteur des glucocorticoïdes dans le muscle squelettique et les différents types cellulaires qui le composent. Ainsi, l'objectif de cette étude est de caractériser les actions de GR dans le muscle squelettique et de déterminer par quel(s) type(s) cellulaire(s) et par quelles voies de signalisation elles sont relayées. Afin de répondre à ces questions, nous avons développé, au laboratoire, de nouveaux modèles murins où GR est sélectivement invalidé dans les myofibres du muscle squelettique, spécifiquement à l'âge adulte et avons réalisé différentes études phénotypiques montrant notamment l'implication de GR dans le contrôle de la masse et de la force musculaire.

Des études ont montré que TIF2 contrôlait la balance énergétique au niveau des tissus adipeux blanc et brun. Cependant, son rôle dans le muscle squelettique reste méconnu. Le premier objectif est de caractériser plus précisément l'action de TIF2 sur le métabolisme dans les myofibres. De plus, le développement de l'obésité et du diabète de type II étant corrélé avec le nombre de fibres lentes des muscles, le second objectif est de comprendre les conséquences métaboliques de la modification de la typologie musculaire et le rôle précis joué par TIF2 dans l'étiologie du syndrome métabolique. Afin de répondre à ces interrogations, nous avons généré des souris chez lesquelles TIF2 est invalidé sélectivement dans les muscles squelettiques à l'âge adulte. Les études phénotypiques réalisées ont montré que TIF2 régule le métabolisme basal en maintenant de faibles niveaux de SRC-1

111

mais aussi le couplage entre la consommation d'oxygène et la production d'ATP dans les mitochondries du muscle squelettique.

## RESULTATS

# I.Les co-régulateurs transcriptionnels TIF2 et SRC-1 régulent l'homéostasieénergétique en modulant la respiration mitochondriale dans les myofibresdu muscle squelettique. (Cell Metabolism, sous presse)

Les deux membres de la famille des co-régulateurs transcriptionnels p160, SRC-1 et TIF2 ont d'importantes fonctions métaboliques dans les tissus adipeux blanc et brun, ainsi que dans le foie. Afin d'analyser les fonctions cellulaires-autonomes de TIF2 dans le muscle squelettique, un autre organe majeur du métabolisme, nous avons généré des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, dans lesquelles TIF2 a été sélectivement invalidé dans les myofibres des muscles squelettiques à l'âge adulte. Nous avons démontré que l'augmentation du découplage mitochondrial dans les myofibres protège les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> de la diminution des capacités oxydatives induite par la sédentarité, retarde le développement du diabète de type 2 et atténue la prise de poids induite par un régime hypercalorique. De plus, nos résultats démontrent que SRC-1 et TIF2 peuvent moduler l'expression de la protéine découplante UCP3 de manière antagoniste, et que l'augmentation des niveaux de SRC-1 dans les myofibres des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> est impliquée de manière critique dans la mise en place des changements métaboliques de ces souris.

Ainsi, la modulation de l'expression et/ou de l'activité de ces co-régulateurs représente une méthode attractive pour prévenir ou traiter les désordres métaboliques. Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles, Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/j.cmet.2010.09.016

## Cell Metabolism



### The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles

Delphine Duteil,<sup>1,2,3,4</sup> Céline Chambon,<sup>1,2,3,4</sup> Faisal Ali,<sup>1,2,3,4,9</sup> Rocco Malivindi,<sup>1,10</sup> Joffrey Zoll,<sup>6,7</sup> Shigeaki Kato,<sup>8</sup> Bernard Geny,<sup>6,7</sup> Pierre Chambon,<sup>1,2,3,4,5</sup> and Daniel Metzger<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiological Genetics, IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Illkirch, 67404, France <sup>2</sup>Inserm, U964, Illkirch, 67404, France

3CNRS, UMR7104, Illkirch, 67404, France

<sup>4</sup>Université de Strasbourg, Strasbourg, 67000, France

<sup>5</sup>Collège de France, Illkirch, 67404, France

<sup>6</sup>Department of Physiology and EA 3072, Faculty of Medicine, Université de Strasbourg, Strasbourg, 67000, France

<sup>7</sup>Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, CHRU, Strasbourg, 67091, France

<sup>8</sup>Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Tokyo, 113-0032, Japan

<sup>9</sup>Present address: Bywaters Center for Vascular Inflammation, Imperial College, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, London W12 ONN, UK

<sup>10</sup>Present address: Departments of Pharmaco-Biology, University of Calabria, 87030 Arcavacata di Rende (CS), Italy \*Correspondence: metzger@igbmc.u-strasbg.fr

DOI 10.1016/j.cmet.2010.09.016

#### SUMMARY

The two p160 transcriptional coregulator family members SRC-1 and TIF2 have important metabolic functions in white and brown adipose tissues as well as in the liver. To analyze TIF2 cell-autonomous functions in skeletal muscles, we generated TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice in which TIF2 was selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood. We found that increased mitochondrial uncoupling in skeletal muscle myocytes protected these mice from decreased muscle oxidative capacities induced by sedentariness, delayed the development of type 2 diabetes, and attenuated high-caloric-diet-induced obesity. Moreover, our results demonstrate that SRC-1 and TIF2 can modulate the expression of the uncoupling protein 3 (UCP3) in an antagonistic manner and that enhanced SRC-1 levels in TIF2-deficient myofibers are critically involved in the metabolic changes of TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Thus, modulation of the expression and/or activity of these coregulators represents an attractive way to prevent or treat metabolic disorders.

#### INTRODUCTION

To maintain the body weight of adult mammals, caloric intake has to be balanced by energy expenditure, resulting mainly from physical activity and thermogenesis. In industrialized countries, characterized by sedentary lifestyle and high-caloric diet, this balance is often deregulated, leading to the development of obesity, dyslipidemia, hyperglycemia, insulin resistance (type 2 diabetes), and hypertension.

Metabolic homeostasis is regulated by complex transcriptional signaling pathways in various tissues. The three members

of the p160 transcriptional coregulators (the steroid receptor coactivator 1 [SRC-1, also called NcoA-1], the transcriptional intermediary factor 2 [TIF2, also referred as SRC-2, GRIP1, or NCOA2], and steroid receptor co-activator 3 [SRC-3, also called p/CIP, AIB1, ACTR, RAC3, or TRAM-1]) have been shown to control energy balance. Indeed, SRC-1 null mice are prone to obesity (Picard et al., 2002), whereas TIF2 null and SRC-3 null mice are protected against diet-induced obesity (Coste et al., 2008; Picard et al., 2002). It has been proposed that TIF2 plays a predominant metabolic role in white adipose tissue by regulating the activity of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  and in brown adipose tissue by modulating the interaction between SRC-1 and PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ (PGC-1a) (Picard et al., 2002). Moreover, TIF2 has been identified as a regulator of hepatic glucose release upon fasting by controlling glucose-6-phosphatase expression in hepatocytes (Chopra et al., 2008).

Skeletal muscles, which generate locomotor force and heat, also play an important metabolic role in mammals. They are composed of myofibers exhibiting distinct contractile and metabolic properties and they display a remarkable adaptation to functional and metabolic demands (Schiaffino, 2010). Sedentariness induces a decrease of muscle oxidative capacities (Figueiredo et al., 2009), and muscle fiber type switching toward lower oxidative capacity has been shown to promote obesity and type 2 diabetes (Schuler et al., 2006). In contrast, endurance exercise induces muscle fiber type switching from fast glycolytic to slow oxidative (Handschin et al., 2007), while caloric restriction retards age-related reduction of muscle oxidative capacity (Aspnes et al., 1997; Baker et al., 2006).

All three p160 family members are expressed in skeletal muscle (Coste et al., 2008; Picard et al., 2002), and it has been shown that TIF2 potentiates differentiation of cultured C2C12 myoblasts into myotubes through the enhancement of myocyte enhancer factor (MEF)-2C-mediated transactivation (Chen et al., 2000) even though it corepresses transcription mediated by the myogenic transactivator Myo-D (Wu et al., 2005).

Cell Metabolism 12, 1-13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc. 1

Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mito-chondrial Respiration in Skeletal Muscles. Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/i.cmet.2010.09.016

**Cell Metabolism** 

Role of TIF2 and SRC-1 in Skeletal Muscles



Figure 1. Increased Energy Expenditure in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> Mice Fed a Regular Diet

(A) Body weight of control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

(B) Lean and fat content of 18- and 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice analyzed by DEXA scanning.

(C) Food intake in 11-, 14-, and 30-week-old control and TIF2<sup>0skm-/-</sup> mice. (D) VO<sub>2</sub> and VCO<sub>2</sub> determined in 18- and 30-week-old control and TIF2<sup>0skm-/-</sup> mice.

(U) VU2 and VU2 addermined in 18- and 30-week-old control and TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice.
(E and F) Evaluation of the RQ in 18- and 30-week-old control and TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice (E) and deduced heat production (F).
(G) Rectal temperature of 11-, 14-, and 30-week-old control and TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice.

(H) Oxygen consumption in saponin-skinned quadriceps fibers of 14- and 30-week-old control and TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice in the absence (V<sub>0</sub>) and presence (V<sub>MAX</sub>) of ADP and evaluation of mitochondria uncoupling by the ACR.

(I) Relative transcript levels of UCP1, UPC2, and UPC3 in brown adipose tissue (BAT) of 30-week-old control and TIF2<sup>@skm-/-</sup> mice and in gastrocnemius muscle of 11-, 14-, 18-, and 30-week-old control and TIF2<sup>@skm-/-</sup> mice. Note that UCP1 transcripts were undetectable in gastrocnemius muscle.

(J) Representative western-blot analysis of UCP3, phospho-AMPK (pAMPK), total AMPK (AMPK), phospho-ACC (pACC), total ACC (ACC), phospho-4E-BP1 (p4E-BP1), and total 4E-BP1 (4E-BP1) in quadriceps muscle of 14- and 30-week-old control and TIF2<sup>(0skm-/-</sup> mice. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is used as an internal control

(A-I) n = 10; error bars show SEM; \*p < 0.05. (J) n = 6. See also Figure S1.

To further investigate the function of TIF2 in skeletal muscles, we have generated TIF2<sup>(0ekm-/-</sup> mice in which TIF2 was selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood. Studies of these mice have revealed that increased energy expenditure was generated by SRC-1-dependent enhanced skeletal muscle mitochondrial uncoupling. As a consequence, sedentariness-induced adverse effects, such as reduced muscle oxidative capacities and type 2 diabetes, as well as high-caloricdiet-induced obesity, were attenuated in TIF2<sup>(I)skm-/-</sup> mice.

#### RESULTS

#### Energy Expenditure Is Increased in TIF2<sup>(I)skm-/-</sup> Mice through Enhanced Skeletal Muscle Mitochondrial Uncoupling

To investigate the impact of TIF2 ablation in skeletal muscle myofibers on energy homeostasis, we generated TIF2<sup>(i)skm</sup>

2 Cell Metabolism 12, 1-13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc

**CMET 803** 

mice in which TIF2 is selectively ablated in mouse skeletal muscle myofibers at adulthood (see Supplemental Results, available online). When fed a chow diet, the body weight of TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice was slightly lower than that of control mice over a 30 week period, but this difference did not reach statistical significance (Figure 1A). Dual energy X-ray absortiometry (DEXA) scan analyses did not reveal any difference in body lean and fat contents between TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> and control mice at 18 and 30 weeks of age (Figure 1B). Moreover, skeletal muscle mass and fiber size distribution, as well as epididymal adipose tissue weight and adipocyte size, were similar in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> and control mice at 14 to 30 weeks of age (Figures S1A-S1F and data not shown). However, food intake was  ${\sim}10\%$  higher for 14- to 30-week-old TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice than for age-matched control mice (Figure 1C), indicating that TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice dissipate more energy. Even though the average voluntary activities over a 24 hr time period were slightly higher in

Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles, Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/j.cmet.2010.09.016

#### Cell Metabolism

Role of TIF2 and SRC-1 in Skeletal Muscles

 ${\rm TIF2}^{(0{\rm skm}-/-}$  mice than in control mice, they did not reach statistical significance (Figure S1G).

Oxygen consumption (VO<sub>2</sub>) was determined to characterize energy expenditure. At 18 and 30 weeks of age, VO<sub>2</sub> was  $\sim$ 8% and ~18% higher in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice than in control mice, respectively (Figure 1D). At 18 weeks, CO2 production (VCO2) was also  $\sim 8\%$  higher in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice than in control mice, resulting in a similar respiratory quotient (RQ, VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub> ratio) in mutant and control mice (Figures 1D and 1E). Interestingly, VO<sub>2</sub> decreased by  $\sim$ 12.5% between 18 and 30 weeks in control mice, leading to an increased RQ (Figures 1D and 1E), thus demonstrating a shift in energy fuel consumption from fatty acid to carbohydrate usage. In contrast, RQ was similar at 18 and 30 weeks in TIF2<sup>(0skm-/-</sup> mice, indicating the protection of TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice from such an energy substrate shift. Calorimetric parameters deduced from these analyses indicated that heat production was increased by  $\sim$ 9% to  $\sim$ 12% in TIF2<sup>(i)skm</sup> mice at 18 and 30 weeks, respectively (Figure 1F). In agreement with these results, body temperature was  $\sim 1^{\circ}C$  higher in 14- to 30-week-old TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice than in age-matched control mice (Figure 1G), further supporting the role of TIF2 in energy expenditure.

Coupling between oxygen consumption and ADP phosphorylation occurs via an electrochemical proton gradient across the inner mitochondrial membrane. Part of heat production results from proton leak through this membrane, which uncouples oxygen reduction from ATP synthesis. To test the implication of TIF2 in muscle mitochondrial function, we determined oxygen consumption in saponin-skinned quadriceps fibers from 14- and 30-week-old regular-diet-fed mice in the presence of the mitochondrial substrates glutamate and malate but in the absence of ADP (V<sub>0</sub>). In TIF2<sup>(0skm-/-</sup> mice, V<sub>0</sub> was ~10% and ~12% higher than in control mice at 14 and 30 weeks, respectively (Figure 1H), thus demonstrating a higher proton leakage in skeletal muscle myocytes of TIF2<sup>(0skm-/-</sup> mice.

Maximal rate of O<sub>2</sub> consumption (V<sub>MAX</sub>), determined after exogenous ADP addition, was similar in TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> and control mice at 14 weeks. However, while it was ~7.5% lower at 30 weeks than at 14 weeks in control mice, it remained unchanged in TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice (Figure 1H). Thus, mitochondrial activity decreased with time in control, but not in TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice. Moreover, oxidative phosphorylation efficiency, known as the acceptor control ratio (ACR) defined by the ratio between V<sub>MAX</sub> and V<sub>0</sub>, was ~10% and ~13% lower in TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice than in control mice at 14 and 30 weeks, respectively (Figure 1H), showing that uncoupling of oxidative phosphorylation was higher in skeletal muscles of TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice.

Taken together, the above results demonstrate that ablation of TIF2 in myofibers of adult mice increases energy expenditure through enhanced skeletal muscle mitochondrial uncoupling. Uncoupling protein 1 (UCP1), which is selectively expressed in brown adipose tissue in rodents, catalyzes a back flux of protons not related to ATP synthesis to produce heat (Matthias et al., 1999; Monemdjou et al., 1999). UCP1 transcript levels were similar in brown adipose tissue of TIF2<sup>0jskm-/-</sup> and control mice and were undetectable in their skeletal muscles (Figure 1I). However, whereas at 11 weeks of age the transcript levels of the two UCP1 homologs UCP2 and UCP3 were similarly expressed in gastrocnemius of TIF2<sup>0jskm-/-</sup> and control mice, from 14 to

30 weeks of age they were ~2-fold higher in TIF2<sup>0skm-/-</sup> mice (Figure 1), and UCP3 protein levels were increased by ~2-fold (Figure 1J).

AMP-activated protein kinase (AMPK) is a metabolic sensor that becomes phosphorylated when the ATP/AMP ratio is low (Hardie, 2007), such as during endurance exercise (Narkar et al., 2008) and caloric restriction (Kondo et al., 2009). Phospho-AMPK, by phosphorylating and inhibiting the activity of the mitochondrial enzyme acetyl CoA carboxylase (ACC). reduces malonyl-CoA production, thus leading to derepression of mCPT1 activity and promotion of long-chain fatty acid (FA) entry into the mitochondria and fatty acid oxidation to protect cells from energy deprivation (Hoehn et al., 2010; Viollet et al., 2009) To determine whether increased mitochondrial uncoupling in skeletal muscles of TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice might induce AMPK activation, we determined the phospho-AMPK/total AMPK ratio in gastrocnemius muscles by western-blot analysis. This ratio was ~10-fold higher in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice than in control mice from 14 to 30 weeks of age (Figure 1J and data not shown), indicating that ATP levels were limiting in skeletal muscles of TIF2<sup>(i)skm</sup> mice. As ACC was hyperphosphorylated in gastrocnemius muscle of 14- and 30-week-old TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice, AMPK activation contributes to the maintenance of mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscles of TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Note that even though phospho-AMPK has been shown to inhibit protein synthesis via mTOR signaling in some conditions (Viollet et al., 2009), it is unlikely that protein synthesis is impaired in skeletal muscles of TIF2(i) mice as the phosphorylation level of the mTOR target 4E-BP1 was similar in skeletal muscles of control and mutant mice (Figure 1J) and as their skeletal muscle weight and fiber size were similar (see above).

Taken together, these results demonstrate that TIF2 contributes to optimization of energy production in myofibers through oxidative phosphorylation by increasing mitochondrial coupling.

#### TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> Mice Are Protected from Fiber Type Switching toward Lower Oxidative Capacity Induced by Sedentariness

Mice express four myosin isoforms (MyHC1, 2A, 2X, and 2B) in their skeletal muscles (Schiaffino, 2010). At 14 weeks of age, muscle fiber type composition was similar in control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Soleus was composed of about half slow-MvHC1 and half MvHC2A fibers, whereas gastrocnemius contained mainly MyHC2 fibers (Figure 2A). In soleus muscle of control mice, the percentage of MyHC1 fibers decreased by 10% between 14 and 30 weeks of age and that of MyHC2A concomitantly increased. At 18 and 30 weeks, 10% and 20% of fibers coexpressed MyHC1 and MyHC2A, respectively, and  $\sim$ 5% and  $\sim$ 10% of the fibers expressed MyHC2X, respectively (Figure 2A and data not shown). Strikingly, during this time period, no fiber type switching was observed in soleus muscle of mutant mice (Figure 2A and data not shown). Thus, MvHC1 fibers in soleus muscle of mutant mice were protected from switching to MyHC2A fibers. Moreover, whereas the number of fibers expressing MyHC1 protein decreased with aging in gastrocnemius of control mice to represent less than 1% at 18 to 30 weeks, those expressing MyHC2A increased between 14 and 18 weeks from  $\sim$ 15% to  $\sim$ 40% and decreased to 1% at 30 weeks (Figure 2A). From 18 to 30 weeks, the number of

Cell Metabolism 12, 1-13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc. 3



Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles. Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/i.cmet.2010.09.016



Cell Metabolism

Role of TIF2 and SRC-1 in Skeletal Muscles



Figure 2. TIF2<sup>(I)skm-/-</sup> Mice Are Protected from Age-Dependent Fiber-Type Switching

(A) Representative MyHC1 (I), MyHC2A (A), and MyHC2B (B) immunohistochemical detection (brown) on serial sections of soleus and quadriceps from 14-, 18-, and 30-week-old control and TIF2<sup>(I)skm-/-</sup> mice. Fibers coexpressing MyHC1 and MyHC2A are labeled I/A. Fibers that are negative for MyHC1, MyHC2A, and MyHC2B correspond to MyHC2X fibers (X); the scale bar represents 50 μm.
(B) Histochemical staining of NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase activities in tibialis muscle of 14- and 30-week-old control and TIF2<sup>(I)skm-/-</sup>

(B) Histochemical staining of NADH dehydrogenase and succinate dehydrogenase activities in tibialis muscle of 14- and 30-week-old control and TIF2<sup>00-801/P/C</sup> mice. Three different fiber types are distinguished. Oxidative and intermediate fibers are darkly and moderately stained, respectively; glycolytic fibers are unstained. The scale bar represents 200 µm.

(C) Relative transcript levels in gastrocnemius muscle of 11-, 14-, 18-, and 30-week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice of mitochondrial electron transport chain genes (complex I: Nddrifds; complex II: Sddrifds; complex II: Sddrifd; complex III: Uqcrc1; complex IV: Cox5b; complex V: Atp5i) of nuclear respiratory factor 1 (NRF-1) and of mitochondrial electron drial transcription factor A (TFAM).

(D) Oxygen consumption in saponin-skinned quadriceps fibers of 14- and 30-week-old control and TIF2<sup>@skm-/-</sup> mice in presence of palmitoyl-L-carnitine (V<sub>Palm-Carn</sub>).

(A and B) n = 6; (C and D) n = 10. Error bars in (C and D) show SEM. p < 0.05. See also Figure S2.

fibers expressing MyHC2B increased from 40% to 95%, showing a progressive fiber type switching from 1 to 2A, and from 2A to 2B, via 2X, in agreement with previous reports (Schiaffino, 2010 and references therein). In contrast, in gastrocnemius

of mutant mice, the percentage of MyHC1 and MyHC2A fibers decreased only after 18 weeks of age, to reach 1% and 6% at 30 weeks of age, respectively, and that of MyHC2B fibers increased during this time period to reach about 90% at week

4 Cell Metabolism 12, 1-13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc.

Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles, Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/j.cmet.2010.09.016

#### Cell Metabolism

Role of TIF2 and SRC-1 in Skeletal Muscles

**Cell** PRESS

30 (Figure 2A). In agreement with these results, switching of slow to fast fibers was also retarded in quadriceps muscle of mutant mice (Figure S2A).

Histochemical staining of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase (mitochondrial respiratory complex I) and succinate dehydrogenase (complex II) activities in tibialis muscle showed that the proportion of darkly stained oxidative fibers decreased in control mice from 14 to 30 weeks (Figure 2B and data not shown). In contrast, similar activities were observed in 14- to 30-week-old TIF2<sup>(0)skm-/-</sup>

mice. Moreover, transcript levels of genes encoding subunits of the mitochondrial respiratory chain (such as NADH dehydrogenase ubiquinone 1 beta subcomplex 3 [Ndufb3; complex ]]; succinate dehydrogenase complex, subunit B [Sdhb; complex II]; ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I [Uqcrc1; complex III]; cytochrome c oxidase subunit Vb [Cox5b; complex IV]; and ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e [Atp5i; complex V]), as well as those of the nuclear respiratory factor-1 (NRF-1, an oxidative gene controlling transcription factor) and of the mitochondrial transcription factor A (TFAM, a factor controlling mitochondrial transcription and replication), decreased less between 11 and 30 weeks in gastrocnemius of TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice than in that of control mice (Figure 2C).

As O2 consumed by saponin-skinned quadriceps myofibers in presence of the substrate palmitoyl-L-carnitine was reduced by 20% from 14 to 30 weeks in control but not in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 2D), fatty acid oxidative capacity was maintained in quadriceps of mutant but not of control mice. The transcript levels of genes controlling lipolysis (lipoprotein lipase, LPL), fatty acid uptake (fatty acid translocase, FAT/CD36), binding (heart fatty-acid binding protein, hFABP), activation (long-chain acyl-CoA synthetase, LCAS), β-oxidation (β-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase,  $\beta\text{-HAD},$  and long-, medium- and short-chain acyl-CoA dehydrogenase, LCAD, MCAD, and SCAD, respectively), and tricarboxylic acid (TCA) cycle (citrate synthase, CS) decreased less between 11 and 30 weeks in gastrocnemius of TIF2(i)skm-/mice than in that of control mice (Figure 3A). Remarkably, the transcript level of the muscle carnitine palmitoyltranferase 1 (mCPT1), encoding an enzyme that catalyzes the rate-controlling step of fatty acid oxidation, increased in aging TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice but not in control mice (Figure 3A). Note that the transcript levels of the glycolytic enzyme phosphofructokinase (PFK) and the activity of the glycolytic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) were similar in gastrocnemius of 11- to 30-week-old control and mutant mice (Figure 3B and Figure S2B).

The transcript levels of PGC-1*α*, a transcriptional coregulator known to control mitochondrial biogenesis and slow fiber type maintenance in skeletal muscle (Arany, 2008; Choi et al., 2008; Wenz et al., 2008), were stable in gastrocnemius of control mice between 14 and 30 weeks, but progressively increased in TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice, resulting in 2.5-fold higher levels at 30 than at 11 weeks (Figure 3A). In contrast, no significant difference in transcript levels of PGC-1*β*, a homolog of PGC-1*α*, was observed (Figure S2C). It is of note that sedentary-lifestyle-induced decreased muscle oxidative capacity was not associated with decreased mitochondrial number, as mitochondrial DNA content and aconitase protein levels were similar in quadri-

ceps of control mice at 14 to 30 weeks (Figures 3C and 3D). Moreover, whereas mitochondrial content was similar in 14- to 18-week-old control and mutant mice, it increased in skeletal muscles of TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice after 18 weeks of age (Figures 3C and 3D). Ultrastructural analyses performed at 30 weeks demonstrated that both muscle mitochondrial content and size were higher in tibialis of mutant than of control mice (Figure 3E and Figures S2D and S2E).

Even though mutant mice were partially protected from sedentariness-induced slow to fast fiber type switching, and maintained higher muscle oxidative capacities than control mice, 18-week-old TIF2<sup>(I)skm-/-</sup> mice were less effective at endurance running than age-matched control mice (Figure S2F). Note, however, that muscle strength determined by grip test was similar in 11- to 18-week-old control and TIF2<sup>(I)skm-/-</sup> mice (Figure S2G).

## TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> Mice Are Protected from Type 2 Diabetes and High-Fat-Diet-Induced Obesity

When fed a chow diet, blood cholesterol, triglyceride, and free fatty acid levels were similar in control and TIF2(i)skm-/ (Figure S3A). Serum glucose levels were also similar in control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice from 8 to 17 weeks (Figure 4A and data not shown). However, while those of control mice progressively rose from 165 mg/dl at 14 weeks to 268 mg/dl at 30 weeks, those of mutant mice only reached 228 mg/dl at 30 weeks of age (Figure 4A and data not shown). At 18 weeks, insulin levels were 25% lower in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice than in control mice (Figure 4B). Mutant mice were slightly more insulin sensitive than control mice (Figure 4C), and their glucose uptake was higher when subjected to an intraperitoneal glucose tolerance test (Figure 4D). At 30 weeks, control mice remained less glucose tolerant than TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 4D) and were much more insulin-resistant than mutant mice (Figure 4C). Note that at this age, serum levels of insulin were also lower in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice than in control mice (Figure 4B). Thus, sedentary TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice are partially protected from type 2 diabetes.

When challenged with a high-fat diet (HFD), TIF2^{(i)skm-/-} mice gained 5.5% and 17% less weight than controls from week 8 to 12 and from week 8 to 23, respectively (Figure 4E), despite similar food intake (Figure S3B). DEXA scan analyses revealed that body fat content was 42% lower in TIF2<sup>(i)skm</sup> mice than in control mice at 23 weeks of age (Figure 4F). In agreement with these results, epididymal fat mass was lower in 23-weekold TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice than in control mice (Figure S3C), and histological analyses revealed that their adipocytes were less hypertrophic (Figure 4G and Figure S3D). High-fat-diet feeding induced liver and muscle steatosis as well as a reduction of muscle mass in control mice, in agreement with previous reports (Almond and Enser, 1984; Lillioja et al., 1987), but not in mutant mice (Figures S3E-S3G). Blood glucose levels increased less in mutant than in control mice upon high-caloric-diet feeding, and at 25 weeks blood cholesterol and triglyceride levels were lower in TIF2<sup>(I)skm-/-</sup> mice than in control mice (Figures S3H and S3I), and insulin sensitivity was improved in mutant mice (Figure S3J). Moreover, transcript levels of UCP2, UCP3, and PGC-1 $\alpha$ , as well as those encoding enzymes involved in lipolysis (LPL); in fatty acid uptake (FAT/CD36), binding (hFABP), and

Cell Metabolism 12, 1-13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc. 5



Figure 3. Analysis of Transcript Levels of Genes Controlling Muscle Oxidative Capacities and Determination of Mitochondrial Content (A) Relative transcript levels in gastrocnemius muscle of 11-, 14-, 18-, and 30-week-old control and TIF2<sup>(0ekm-/-</sup> mice of LPL, FAT/CD36, hFABP, LCAS, β-HAD,

LCAD, MCAD, SCAD, mCPT1, CS, and PGC-1α. (B) Biochemical determination of LDH activity in tibialis extracts of 11-, 18-, and 30-week-old control and TIF2<sup>(0)akm-/-</sup> mice and in soleus extracts of 30-week-old

(b) blochemical determination of LDH activity in tiblalis extracts of 11-, 18-, and 30-week-old control and TIF2<sup>0/stm-/-</sup> mice and in soleus extracts of 30-week-old control and TIF2<sup>0/stm-/-</sup> mice and in soleus extracts of 30-week-old control and TIF2<sup>0/stm-/-</sup> mice by PCR amplification of the *Cox2* mitochon-

drial gene and the FAS nuclear gene. (D) Western-blot analysis of the mitochondrial protein aconitase in quadriceps muscle of 14-, 18-, and 30-week-old control and TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice. GAPDH is used as an internal control.

(E) Mitochondria number and mean mitochondria cross sectional area in tibialis muscles from 30-week-old control and TIF2<sup>(0skm-/-</sup> mice evaluated by electron microscopy.

(A–C) n = 10; (D) n = 6; and (E) n = 4. Error bars in (A–C) and (E) show SEM. \*p < 0.05.

activation (LCAS); and in  $\beta$ -oxidation ( $\beta$ -HAD and SCAD), were higher in TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice than in control mice after 15 weeks of high-fat-diet feeding (Figure S3K). Thus, increased energy expenditure through enhanced skeletal muscle mitochondrial uncoupling in TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice improved their metabolic profile when fed a high-caloric diet, attenuated obesity and diabetes, and protected them from muscle wasting.

#### Enhanced Energy Expenditure in Myofibers of TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> Mice Is SRC-1 Dependent

Previous results have shown that the relative amounts of TIF2 and SRC-1 modify the transcriptional control in white and brown adipose tissues (Picard et al., 2002). Interestingly, transcript and protein levels of SRC-1 were higher in skeletal muscle of TIF2<sup>(0skm-/-</sup> than of control mice at 11 weeks, whereas those

6 Cell Metabolism 12, 1–13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc.

Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles, Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/j.cmet.2010.09.016

#### **Cell Metabolism**

Role of TIF2 and SRC-1 in Skeletal Muscles





Figure 4. Lack of TIF2 in Skeletal Muscle Partially Protects from Obesity and Type 2 Diabetes

(A) Serum glucose levels in 11-, 14-, 18-, and 30-week-old control and TIF2() mice.

(B–D) Serum insulin levels (B), intraperitoneal insulin sensitive test (IPIST) (C), and intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) (D) in 18- and 30-week-old control and TIF2<sup>(Ijekm-/-</sup> mice.

(E) Body weight of control and  $\mathsf{TIF2}^{(i)\mathsf{skm}-\!/-}$  mice fed a high-fat diet.

(F) Body fat content in 23-week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a high-fat diet evaluated by DEXA scanning.

(G) Representative hematoxylin and eosin stained epididymal fat pad of 23-week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a high-fat diet.

(A–D) n = 10, chow diet; (E–G) n = 12, high-fat diet. Error bars in (A–F) show SEM. \*p < 0.05. See also Figure S3.

of UCP3 were increased in mutant mice only after 14 weeks of age (Figures 5A and 5B and Figure S4A). UCP2 and PGC-1 $\alpha$  transcript levels were also increased in skeletal muscles of TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice but at a later time point than the levels of SRC-1 (Figure 5A). In contrast, transcript levels of SRC-3 were similar in skeletal muscles of TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> and control mice (Figure 5A). Thus, these data suggest that the balance between TIF2 and SRC-1 levels might play a crucial role in the control of UCP2, UCP3, and/or PGC-1 $\alpha$  expression in skeletal muscle myofibers.

To further characterize gene transcriptional control by TIF2 and SRC-1, we performed transient transfection assays in differentiated C2C12 myocytes. Whereas SRC-1 overexpression stimulated *UCP3* expression up to 3.5-fold in a dose-dependent manner (Figure 5C), TIF2 overexpression repressed its expression by up to 30% (Figure 5C). Moreover, even though SRC-1 or TIF2 overexpression did not affect each other's protein levels (Figure S4B and data not shown), TIF2 overexpression decreased SRC-1-stimulated *UCP3* expression (Figure 5C and Figure S4B), indicating that these coregulators have antagonistic activities on *UCP3* transcription.

In agreement with previous reports (Dressel et al., 2003), treatment of mouse C2C12 myocytes with the PPARβ-selective agonist GW501516 induced UCP3 transcript levels by more than 8-fold (Figure 5D). Sequence alignments of the promoter region of the human *UCP3* gene, which encompasses two PPAR response elements (PPREs) (Acín et al., 1999; Tu et al., 2000), showed that the promoter of the mouse *UCP3* gene contains such elements at position -234 to -222 and -56 to -34 relative to its transcriptional start site (Figure 5E). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) from C2C12 myocytes with antibodies directed against SRC-1 or TIF2 did not reveal the presence of SRC-1 or TIF2-containing complexes on DNA segments encompassing these PPREs (Figure 5F). In the presence of GW501516, endogenous SRC-1, but not TIF2, was recruited to the PPRE-containing DNA segments of *UCP3* 

Cell Metabolism 12, 1-13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc. 7



Figure 5. Transcriptional Control by TIF2 and SRC-1

(A) Relative transcript levels of TIF2, SRC-1, SRC-3, UCP2, UCP3, and PGC-1α in gastrocnemius muscle of 8-, 10-, 11-, 14-, and 30-week-old control and TIF2<sup>0skm-/-</sup> mice.

8 Cell Metabolism 12, 1-13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc.
# RESULTATS

Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles, Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/j.cmet.2010.09.016

## Cell Metabolism

Role of TIF2 and SRC-1 in Skeletal Muscles



(Figure 5F). Moreover, overexpressed SRC-1 was recruited to these DNA segments in the absence of ligand treatment, and GW501516 further promoted SRC-1 recruitment to these DNA segments and increased UCP3 transcript levels (Figures 5D and 5G). As the fold increase of UCP3 transcript levels in response to GW501516 was similar with and without SRC-1 overexpression, SRC-1 might coactivate PPAR $\beta$  and/or other enhancer factors bound to the UCP3 promoter. In contrast, even though overexpressed TIE2 was efficiently recruited to PPRE-containing DNA segments of UCP3 in the absence of ligand treatment, GW501516 strongly decreased its recruitment to these DNA segments and relieved its repressive action on UCP3 transcription (Figures 5D and 5H). Thus, whereas overexpressed TIF2 interacts with enhancer factors bound to the UCP3 promoter under basal conditions, PPARB ligands impair this association and promote that of SRC-1.

SRC-1 overexpression in differentiated C2C12 myocytes also enhanced PGC-1 $\alpha$  expression, as well as that of PGC-1 $\alpha$  target genes (e.g., LPL and mCPT1 [Lagouge et al., 2006; Lin et al., 2002; Vega et al., 2000]), in a dose-dependent manner, (Figures S4B and S4C). Note that the levels of phosphorylated AMPK and ACC were not enhanced in these conditions (Figure S4B), indicating that short term SRC-1 overexpression is not sufficient to induce energy deprivation in C2C12 myocytes. TIF2 overexpression decreased PGC-1 $\alpha$ , LPL, and mCPT1 transcript levels in a dose-dependent manner (Figure S4D).

Taken together, these results show that SRC-1 and TIF2 are involved in the transcriptional control of *UCP3* and *PGC-1* $\alpha$  in differentiated C2C12 myocytes and that the balance between their levels is crucial for fine tuning the expression of these target genes. As SRC-1 and TIF2 recruitment to PPRE-containing DNA segments of *UCP3* were strongly modulated by PPAR $\beta$  ligand, it is likely that these coregulators control PPAR $\beta$  activity in myocytes.

To determine whether SRC-1 overexpression was involved the defects induced by TIF2 ablation in muscle myofibers, we generated TIF2/SRC-1<sup>(0)skm-/-</sup> mice in which both TIF2 and SRC-1 are selectively ablated in skeletal muscle myofibers (see Supplemental Results and Figure S5).

In contrast to TIF2<sup>(0skm-/-</sup> mice, UCP2 and UCP3 transcript levels were not increased in gastrocnemius of 20- to 30-week-old TIF2/SRC-1<sup>(0skm-/-</sup> mice (Figure 5I and data not shown), and their body temperature was similar to that of age-matched

control mice (Figure S4E). AMPK was not activated in their skeletal muscles, and the transcript levels of PGC-1a and of genes encoding enzymes controlling fatty acid metabolism and subunits of the mitochondrial respiratory chain were not enhanced (Figures 5I and 5J and Figure S4F). Moreover, mitochondrial complex 2 activity similarly decreased in tibialis of TIF2/SRC-1(i)skm-/and control mice between 14 and 20 weeks of age (Figure S4G and data not shown), and no difference in body weight and blood alucose levels were observed between TIF2/SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> mice and control littermates when fed a regular or a high-fat diet (Figures S4H-S4J and data not shown). Thus, enhanced thermogenesis and oxidative metabolism in TIF2-deficient myofibers were blunted in mice lacking both TIE2 and SRC-1 in these cells. Note that the selective lack of SRC-1 in skeletal muscle myofibers induced no major defects (see Supplemental Information).

#### DISCUSSION

Previous studies of TIF2 null mice had shown that TIF2 promotes fasting hepatic glucose release and lipid storage in white adipose tissue and negatively regulates adaptive thermogenesis in brown adipose tissue (Chopra et al., 2008; Picard et al., 2002). These effects were mainly attributed to the regulation by TIF2 of glucose-6 phosphatase expression in hepatocytes by acting as a coactivator of the orphan nuclear receptor RORa, to the modulation of PPARγ-mediated fat uptake and storage pathways in white adipocytes, and to a competition with SRC-1 for the formation of PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\gamma$  complexes in brown adipocytes.

We have shown in this study that TIF2 has also a major metabolic role in skeletal muscles. Indeed, selective ablation of TIF2 in skeletal muscle myofibers of adult mice resulted in increased energy expenditure through enhanced mitochondrial uncoupling in these cells. When fed a regular diet, food intake was raised in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mutant mice to meet the energetic requirements of their skeletal muscles and to maintain their body weight. Moreover, increased energy expenditure partially protected these mice against high-caloric-diet-induced obesity (Figure 6). Thus, TIF2 appears to coordinate energy metabolism in various tissues by promoting energy storage in white adipocytes, by limiting energy dissipation in brown adipocytes and skeletal muscles in fed conditions, and by favoring hepatic glucose release upon fasting.

(E) Sequence of a consensus PPRE and of the two human (h) and mouse (m) UCP3 PPREs (PPRE1 and PPRE2).

(J) Representative western-blot analysis of pAMPK and total AMPK (AMPK) in quadriceps muscle of 14- and 30-week-old TIF2<sup>0skm-/-</sup>, TIF2/SRC-1<sup>0skm-/-</sup>, and SRC-1<sup>0skm-/-</sup> mice and of their respective controls. GAPDH is used as an internal control. (A and I) n = 10; (B–D, F–H, and J) n = 6. Error bars in (A, C, D, F–I) show SEM. \*p < 0.05. See also Figure S4.

Cell Metabolism 12, 1-13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc. 9

**CMET 803** 

<sup>(</sup>B) Western-blot analysis of SRC-1 and UCP3 proteins in quadriceps muscle of 11-, 14-, and 30-week-old control (CT) and TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice (TIF2). GAPDH is used as an internal control.

<sup>(</sup>C) Relative UCP3 transcript levels in C2C12 myocytes transiently transfected with 100 ng or 1 µg SRC-1 and/or TIF2 expression vectors.

<sup>(</sup>D) Relative UCP3 transcript levels in C2C12 cells transiently transfected with SRC-1 and/or TIF2 expression vectors (1  $\mu$ g) and grown in the absence or presence of GW501516 (GW). \*p  $\leq$  0.05 between – and + GW;  $\S$ p  $\leq$  0.05 between untransfected and SRC-1 or TIF2 transfected cells.

<sup>(</sup>F–H) PCR detection of the DNA segments encompassing the UCP3-PPREs and of a DNA segment downstream of the UCP3 transcriptional start site (I3/E4) after chromatin immunoprecipitation from C2C12 myocytes grown in the absence (–GW) or presence (+GW) of GW501516 with antibodies directed against SRC-1 or TIF2 or with normal rabbit serum (NRS). C2C12 myocytes were transfected with empty vector (control) (G and H), SRC-1 expression vector (1 µg) (G), or TIF2 expression vector (1 µg) (H). Data are expressed as a percentage relative to the input DNA.

<sup>(</sup>i) Relative UCP2, UCP3, and PGC-1*a* transcript levels in gastrocennius muscle of 30-week-old TIF2<sup>0skm\_/\_</sup>, TIF2/SRC-1<sup>0skm\_/\_</sup>, and SRC-1<sup>0skm\_/\_</sup> mice and of their respective controls (TIF2<sup>L2/L2</sup>, TIF2/SRC-1<sup>12/L2</sup>, and SRC-1<sup>L2/L2</sup>).

Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles, Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/j.cmet.2010.09.016

**Cell Metabolism** 

Role of TIF2 and SRC-1 in Skeletal Muscles



Our data show that the levels of UCP3 were about 2-fold increased in skeletal muscle myocytes of TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice, and several studies have reported that overexpression of this protein in skeletal muscle myocytes enhances mitochondrial uncoupling and muscle heat production and reduces body weight gain upon high-fat-diet feeding (Clapham et al., 2000; Son et al., 2004; Tiraby et al., 2007). Thus, increased mitochondrial uncoupling in TIF2  $^{(\!0\!skm-\!/-}$  mice might result, at least in part, from elevated UCP3 levels. Note that UCP2 overexpression in skeletal muscles of TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice might also contribute to increased thermogenesis (Schrauwen and Hesselink, 2002). However, if, as indicated by other studies (Bezaire et al., 2005; Cadenas et al., 2002), UCP3 and UCP2 do not induce mitochondrial uncoupling, TIF2 might negatively regulate the expression of an as yet unidentified uncoupling protein in skeletal muscles. In any event, our results show that TIF2 limits proton leakage in myocytes, thereby optimizing the coupling between oxidation and phosphorylation in skeletal muscles.

As UCP3 expression is stimulated by various nuclear receptors that interact with p160 coregulators, including PPAR $\beta$ (Acín et al., 1999; Gong et al., 1997; Solanes et al., 2003), TIF2 might repress the activity of these receptors in skeletal muscle myofibers. Our ChIP experiments performed in differentiated C2C12 myocytes did not, however, reveal the presence of endogenous TIF2 on DNA segments encompassing PPREs located in the UCP3 promoter region in the absence or presence of PPAR $\beta$  ligand. Moreover, while TIF2 levels were strongly decreased within 1 week after TIF2 gene ablation, the transcript levels of UCP3, as well as of UCP2 and PGC-1a, were enhanced only more than 1 month later, thus indicating that endogenous TIF2 might not repress the expression of these genes under basal conditions. Interestingly, we found that SRC-1 levels were increased at an early time after TIF2 ablation, thus strongly suggesting that enhanced SRC-1 levels might stimulate UCP3 expression. This assumption was strengthened in differentiated C2C12 cells, where SRC-1 overexpression promoted SRC-1 binding to PPRE-containing DNA segments of UCP3 and enhanced the expression of this gene. Moreover, even though UCP3 transcript levels were unchanged in SRC-1 myofiber-deficient mice, enhanced UCP3 levels in TIF2-depleted myofibers were SRC-1 dependent. Thus, these data indicate that endogenous levels of SRC-1 and TIF2 exert little if any control on UCP3

10 Cell Metabolism 12, 1–13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc.

**CMET 803** 

#### Figure 6. Schematic Illustration of the Putative Role of TIF2 in Skeletal Muscles

transcription under basal conditions, whereas SRC-1 overexpression enhances UCP3 expression. Note that our data in differentiated C2C12 myocytes also show that overexpressed TIF2 counteracts SRC-1-induced UCP3 expression in the absence of PPAR $\beta$  ligand but does not inhibit PPAR $\beta$  ligand-induced UCP3 expression. Thus, depending on its levels and the presence of PPAR $\beta$  ligand, TIF2 either does not modulate UCP3 expression or acts as a transcriptional core-

pressor, whereas SRC-1 stimulates UCP3 expression, most likely by coactivating PPAR<sub>β</sub>.

As most metabolic defects induced by selective ablation of TIF2 in skeletal muscle fibers were SRC1 dependent, and as UCP3 overexpression in skeletal muscles of mice generated defects that are similar to those of TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice (Clapham et al., 2000; Son et al., 2004; Tiraby et al., 2007), our data strongly suggest that TIF2 controls important muscle functions by maintaining low SRC-1 levels and thereby limits UCP3 expression and mitochondrial uncoupling in skeletal muscle myofibers. Our data also show that TIF2 and SRC-1 have the opposite effects on other genes (e.g., *PGC-1* $\alpha$ ), indicating that these coregulators fine tune the levels of a number of proteins to coordinate metabolic pathways. Whether the levels of TIF2 and SRC-1 are modified in pathophysiological conditions in skeletal muscle myofibers, and how TIF2 controls SRC-1 levels, remains to be determined.

In agreement with previous studies (Figueiredo et al., 2009; Zoll et al., 2002; Schlaffino, 2010 and references therein), our data show that skeletal muscle contractile and metabolic properties are strongly affected in sedentary mice. Indeed, oxidative capacities of control mice progressively decreased from 11 to 30 weeks, and this decrease was associated with a slow to fast fiber type switching. The cause of these changes are unknown, but oxidative stress and mitochondrial damage could play a major role (Figueiredo et al., 2009; Short et al., 2005).

Interestingly, muscle oxidative and contractile properties were maintained in TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice during this time period, and, in contrast to wild-type mice, mutant mice were partially protected against type 2 diabetes (Figure 6). The fuel gauge AMPK, which is stimulated by caloric restriction as well as by endurance exercise to enhance muscle oxidative metabolism, was constitutively activated in skeletal muscles of sedentary TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice, demonstrating that their skeletal muscles were in a chronic low-energy state.

In agreement with previous work (Jäger et al., 2007) showing that activated AMPK induces the expression of PGC-1 $\alpha$ , a key factor for stimulation of mitochondrial oxidative metabolism, PGC-1 $\alpha$  transcript levels progressively increased in skeletal muscles of TIF2<sup>0/skm-/-</sup> mice. Note that increased SRC-1 levels in TIF2<sup>0/skm-/-</sup> myofibers might also contribute to enhanced PGC-1 $\alpha$  alevels. Moreover, enhanced PGC-1 $\alpha$  activity by

# RESULTATS

Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles, Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/j.cmet.2010.09.016

## Cell Metabolism

Role of TIF2 and SRC-1 in Skeletal Muscles



activated-AMPK phosphorylation (Jäger et al., 2007) and AMPKdependent SIRT1-mediated deacetylation (Cantó and Auwerx, 2009) might further stimulate oxidative phosphorylation in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> skeletal muscle myofibers. Indeed, PGC-1 $\alpha$ , by coactivating numerous transcription factors, stimulates its own expression, that of UCP2 and UCP3, as well as that of a number of factors controlling the formation and maintenance of slowoxidative fibers (Arany, 2008; Puigserver et al., 2001; Rohas et al., 2007; St-Pierre et al., 2003; Wu et al., 1999). Thus, TIF2 deficiency, by enhancing SRC-1 levels, most likely induces a feed-forward loop that promotes uncoupling and oxidative metabolism (Figure 6). Enhanced expression of the enzyme mCPT-1, which catalyzes the rate-limiting step in the pathway of mitochondrial fatty acid oxidation and is induced by increased levels of PGC-1a (Zhang et al., 2004) and/or of SRC-1 (see above), combined with derepression of its activity by phosphorylated AMPK (Hoehn et al., 2010; Viollet et al., 2009), might be a key event in stimulation of skeletal muscle oxidative metabolism in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice. It is of note that the increased mitochondrial activity was sufficient to meet the energetic requirements of skeletal muscles in TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice for more than 2 months under sedentary conditions, but not during endurance exercise, and that mitochondrial biogenesis was stimulated at a later time only.

To conclude, the current study demonstrates that TIF2 limits mitochondrial uncoupling to optimize ATP production during oxidative phosphorvlation in skeletal muscles, mainly by maintaining low SRC-1 levels in myofibers. Thus, it has highly beneficial effects in mammals living in the wilderness, where food supply is limiting and energy demands are high. In contrast, under sedentary conditions and food excess, two characteristics of industrialized societies, TIF2-induced optimized energy production in skeletal muscle myocytes promotes a slow/ oxidative to fast/glycolytic fiber type switching, leading to type 2 diabetes and the development of obesity, and thus becomes detrimental for health (Figure 6). Lowering metabolic efficiency by decreasing TIF2 activity or increasing SRC-1 activity in skeletal muscles represents an attractive strategy to counteract Western-lifestyle-induced metabolic disorders, such as obesity and diabetes, even though endurance exercise will be impaired.

#### **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

#### **Body Lean and Fat Content**

Body lean and fat content were recorded in anaesthetized mice DEXA; PIXIMUS, GE Medical Systems, Buc, France) according to the manufacturer's instructions.

#### **Food Consumption**

Mice were individually housed. Food pellets (150 g) were delivered and weighed after 1 week. Weekly food consumption was calculated by subtracting the final from the initial pellet weight.

#### **Blood Glucose Level Analysis**

Glucose levels were determined on a drop of blood collected from the tail vein of fed mice with an Accu-Chek Active blood glucometer (Roche, France).

#### **RNA Preparation and Analysis**

RNA was isolated with TRIzol Reagent (Invitrogen). Five micrograms of RNA was converted to cDNA with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies) and dT24 primers according to the supplier's protocol. Quantitative RT-PCR was performed by using the QuantiTectTM SYBR Green PCR kit (Roche) according to the supplier's protocol. HPRT was used as an internal control. Primer sequences are given in Table S1.

#### **Data Analysis**

Data are represented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences analyzed by a two-tailed Student's t tests were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$  and are indicated by an asterisk in the figures. In Figure 5, # indicates p > 0.05.

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Results, Supplemental Experimental Procedures, five figures, and one table and can be found with this article online at doi:10.1016/j.cmet.2010.09.016.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the mouse, histopathology, imaging, and biochemistry facilities from Institut Clinique de la Souris and Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Collulaire (IGBMC), as well as Hakan Bagci, Thanuja Gali Ramamoorthy, Fatima Taleb, Jamal Bouitbir, and Jean-Marc Bornert for technical assistance. This work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Collège de France, and the National Institute of Health (DK59820). D.D was supported by fellowships from the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Fondation pour la Recherche Médicale, and the Association pour la recherche à l'IGBMC (ARI). C.C. was supported by fellowships from the AFM and the ARI, and F.A. by a Boehringer Ingelheim Fund fellowship.

Received: November 28, 2009 Revised: June 17, 2010 Accepted: August 23, 2010 Published: November 2, 2010

#### REFERENCES

Acin, A., Rodriguez, M., Rique, H., Canet, E., Boutin, J.A., and Galizzi, J.P. (1999). Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human uncoupling protein 3 (UCP3) gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 258, 278–283.

Almond, R.E., and Enser, M. (1984). A histochemical and morphological study of skeletal muscle from obese hyperglycaemic ob/ob mice. Diabetologia *27*, 407–413.

Arany, Z. (2008). PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. Curr. Opin. Genet. Dev. 18, 426–434.

Aspnes, L.E., Lee, C.M., Weindruch, R., Chung, S.S., Roecker, E.B., and Aiken, J.M. (1997). Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. FASEB J. *11*, 573–581.

Baker, D.J., Betik, A.C., Krause, D.J., and Hepple, R.T. (2006). No decline in skeletal muscle oxidative capacity with aging in long-term calorically restricted rats: effects are independent of mitochondrial DNA integrity. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 61, 675–684.

Bezaire, V., Spriet, L.L., Campbell, S., Sabet, N., Gerrits, M., Bonen, A., and Harper, M.E. (2005). Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. FASEB J. 19, 977–979.

Cadenas, S., Echtay, K.S., Harper, J.A., Jekabsons, M.B., Buckingham, J.A., Grau, E., Abuin, A., Chapman, H., Clapham, J.C., and Brand, M.D. (2002). The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3. J. Biol. Chem. 277, 2773–2778.

Cantó, C., and Auwerx, J. (2009). PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. Curr. Opin. Lipidol. *20*, 98–105.

Cell Metabolism 12, 1-13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc. 11

Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles, Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/j.cmet.2010.09.016

Cell Metabolism

Role of TIF2 and SRC-1 in Skeletal Muscles

Chen, S.L., Dowhan, D.H., Hosking, B.M., and Muscat, G.E. (2000). The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. Genes Dev. *14*, 1209–1228.

Choi, C.S., Befroy, D.E., Codella, R., Kim, S., Reznick, R.M., Hwang, Y.J., Liu, Z.X., Lee, H.Y., Distefano, A., Samuel, V.T., et al. (2008). Paradoxical effects of increased expression of PGC-1alpha on muscle mitochondrial function and insulin-stimulated muscle glucose metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105. 19926-19931.

Chopra, A.R., Louet, J.F., Saha, P., An, J., Demayo, F., Xu, J., York, B., Karpen, S., Finegold, M., Moore, D., et al. (2008). Absence of the SRC-2 coactivator results in a glycogenopathy resembling Von Gierke's disease. Science 322, 1395–1399.

Clapham, J.C., Arch, J.R., Chapman, H., Haynes, A., Lister, C., Moore, G.B., Piercy, V., Carter, S.A., Lehner, I., Smith, S.A., et al. (2000). Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. Nature 406, 415–418.

Coste, A., Louet, J.F., Lagouge, M., Lerin, C., Antal, M.C., Meziane, H., Schoonjans, K., Puigserver, P., O'Malley, B.W., and Auwerx, J. (2008). The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1alpha. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 17187–17192.

Dressel, U., Allen, T.L., Pippal, J.B., Rohde, P.R., Lau, P., and Muscat, G.E. (2003). The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. Mol. Endocrinol. *17*, 2477–2493.

Figueiredo, P.A., Powers, S.K., Ferreira, R.M., Amado, F., Appell, H.J., and Duarte, J.A. (2009). Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 64, 927–939.

Gong, D.W., He, Y., Karas, M., and Reitman, M. (1997). Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. J. Biol. Chem. 272, 24129–24132.

Handschin, C., Chin, S., Li, P., Liu, F., Maratos-Flier, E., Lebrasseur, N.K., Yan, Z., and Spiegelman, B.M. (2007). Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. J. Biol. Chem. 282, 30014–30021.

Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 774-785.

Hoehn, K.L., Turner, N., Swarbrick, M.M., Wilks, D., Preston, E., Phua, Y., Joshi, H., Furler, S.M., Larance, M., Hegarty, B.D., et al. (2010). Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity. Cell Metab. *11*, 70–76.

Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 12017– 12022.

Kondo, M., Shibata, R., Miura, R., Shimano, M., Kondo, K., Li, P., Ohashi, T., Kihara, S., Maeda, N., Walsh, K., et al. (2009). Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. J. Biol. Chem. 284, 1718-1724.

Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., et al. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell 127, 1109–1122.

Lillioja, S., Young, A.A., Culter, C.L., Ivy, J.L., Abbott, W.G., Zawadzki, J.K., Yki-Järvinen, H., Christin, L., Secomb, T.W., and Bogardus, C. (1987). Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. J. Clin. Invest. 80, 415–424.

Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., et al. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature *418*, 797–801.

12 Cell Metabolism 12, 1–13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc.

**CMET 803** 

Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (1999). The bioenergetics of brown fat mitochondria from UCP1-ablated mice. Ucp1 is not involved in fatty acid-induced de-energization ("uncoupling"). J. Biol. Chem. 274, 28150–28160.

Monemdjou, S., Kozak, L.P., and Harper, M.E. (1999). Mitochondrial proton leak in brown adipose tissue mitochondria of Ucp1-deficient mice is GDP insensitive. Am. J. Physiol. 276, E1073–E1082.

Narkar, V.A., Downes, M., Yu, R.T., Embler, E., Wang, Y.X., Banayo, E., Mihaylova, M.M., Nelson, M.C., Zou, Y., Juguilon, H., et al. (2008). AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. Cell 134, 405–415.

Picard, F., Géhin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W., Chambon, P., and Auwerx, J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. Cell *111*, 931–941.

Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J.C., Zhang, C.Y., Krauss, S., Mootha, V.K., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. Mol. Cell 8, 971–982.

Rohas, L.M., St-Pierre, J., Uldry, M., Jäger, S., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2007). A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *104*, 7933–7938.

Schiaffino, S. (2010). Fibre types in skeletal muscle: a personal account. Acta Physiol (Oxf) 199, 451–463.

Schrauwen, P., and Hesselink, M. (2002). UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. J. Exp. Biol. 205, 2275–2285.

Schuler, M., Ali, F., Chambon, C., Duteil, D., Bornert, J.M., Tardivel, A., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., and Metzger, D. (2006). PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. Cell Metab. 4, 407–414.

Short, K.R., Bigelow, M.L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S., and Nair, K.S. (2005). Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 5618–5623.

Solanes, G., Pedraza, N., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (2003). Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription. Mol. Endocrinol. *17*, 1944–1958.

Son, C., Hosoda, K., Ishihara, K., Bevilacqua, L., Masuzaki, H., Fushiki, T., Harper, M.E., and Nakao, K. (2004). Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle. Diabetologia 47, 47–54.

St-Pierre, J., Lin, J., Krauss, S., Tarr, P.T., Yang, R., Newgard, C.B., and Spiegelman, B.M. (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferatoractivated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. J. Biol. Chem. *278*, 26597–26603.

Tiraby, C., Tavernier, G., Capel, F., Mairal, A., Crampes, F., Rami, J., Pujol, C., Boutin, J.A., and Langin, D. (2007). Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. Diabetologia 50, 2190–2199.

Tu, N., Chen, H., Winnikes, U., Reinert, I., Pirke, K.M., and Lentes, K.U. (2000). Functional characterization of the 5'-flanking and the promoter region of the human UCP3 (hUCP3) gene. Life Sci. 67, 2267–2279.

Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. Mol. Cell. Biol. 20, 1868–1876.

Viollet, B., Lantier, L., Devin-Leclerc, J., Hebrard, S., Amouyal, C., Mounier, R., Foretz, M., and Andreelli, F. (2009). Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. Front. Biosci. *14*, 3380–3400.

Wenz, T., Diaz, F., Spiegelman, B.M., and Moraes, C.T. (2008). Activation of the PPAR/PGC-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. Cell Metab. *8*, 249–256.

Please cite this article in press as: Duteil et al., The Transcriptional Coregulators TIF2 and SRC-1 Regulate Energy Homeostasis by Modulating Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscles, Cell Metabolism (2010), doi:10.1016/j.cmet.2010.09.016

# **Cell Metabolism**

Role of TIF2 and SRC-1 in Skeletal Muscles



Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., and Spiegelman, B.M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell 98, 115–124.

Wu, H.Y., Hamamori, Y., Xu, J., Chang, S.C., Saluna, T., Chang, M.F., O'Malley, B.W., and Kedes, L. (2005). Nuclear hormone receptor coregulator GRIP1 suppresses, whereas SRC1A and p/CIP coactivate, by domain-specific binding of MyoD. J. Biol. Chem. 280, 3129–3137. Zhang, Y., Ma, K., Song, S., Elam, M.B., Cook, G.A., and Park, E.A. (2004). Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 alpha) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I alpha). J. Biol. Chem. 279, 53963–53971.

Zoll, J., Sanchez, H., N'Guessan, B., Ribera, F., Lampert, E., Bigard, X., Serrurier, B., Fortin, D., Geny, B., Veksler, V., et al. (2002). Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. J. Physiol. 543, 191–200.

Cell Metabolism 12, 1–13, November 3, 2010 ©2010 Elsevier Inc. 13

**CMET 803** 

#### **Supplemental Text**

29/07/10

#### Revision

**Supplemental Informations** 

#### **Supplemental Results**

Generation of TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice in which TIF2 is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood.

To selectively ablate TIF2 in skeletal muscle myofibers, TIF2<sup>L2/L2</sup> mice bearing floxed TIF2 L2 alleles (in which LoxP sites flank the TIF2 exon encoding the nuclear receptor interaction domain) (Gehin et al., 2002) were bred with HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup> transgenic mice that express the Cre-ER<sup>T2</sup> recombinase selectively in post-mitotic skeletal muscle myocytes [Figure S5A; (Schuler et al., 2005)]. Seven week-old male HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/TIF2<sup>L2/L2</sup> control mice and HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/TIF2<sup>L2/L2</sup> somatic pre-mutant mice were daily intraperitoneally injected with tamoxifen for 5 days to generate control (CT) and TIF2<sup>(0)ekm-/-</sup> mutant mice, respectively. As expected, TIF2 L2 alleles were selectively converted into L- alleles in various skeletal muscles of TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mutant mice (Figure S5B), and TIF2 RNA and protein levels were strongly reduced in all skeletal muscles analysed, but not in other tissues (e.g. heart and brown adipose tissue) (Supplemental Figure 5C and 5D and data not shown). Immunohistochemical analyses showed that skeletal muscle myofibers of TIF2<sup>(0)skm-/-</sup> mice lacked TIF2 as early as 1 week after the first tamoxifen administration (Figure S5E and data not shown).

# Generation of TIF2/SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> mice in which TIF2 and SRC-1 are selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood.

TIF2/SRC1<sup>(i)skm-/-</sup> mice and TIF2/SRC1<sup>L2/L2</sup> control mice were generated by Tarnoxifen injection to seven week-old male HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/TIF2<sup>L2/L2</sup>/SRC1<sup>L3/L3</sup> somatic pre-mutant mice and HSA-Cre-ER<sup>T2(0/0)</sup>/TIF2<sup>L2/L2</sup>/SRC1<sup>L3/L3</sup> mice, respectively. As expected, TIF2 L2 alleles and SRC-1 L3 alleles were selectively converted in various skeletal muscles of TIF2/SRC1<sup>(i)skm-/-</sup> mutant mice into TIF2 L- alleles and SRC1 L- alleles, respectively (Figure S5G). Moreover, both TIF2 and SRC-1 transcript levels were strongly reduced in their skeletal muscles (Figure S5H).

# Generation of SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> mice in which SRC-1 is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood.

SRC1<sup>(i)ekm-/-</sup> mice and SRC1<sup>L3/L3</sup> control mice were generated by Tamoxifen injection to seven week-old male HSA-Cre-ER<sup>T2(ig/0)</sup>/SRC1<sup>L3/L3</sup> somatic pre-mutant mice and HSA-Cre-ER<sup>T2(ig/0)</sup>/SRC1<sup>L3/L3</sup> mice, respectively. As expected, SRC-1 L3 alleles were selectively converted into SRC1 L- alleles in various

#### Revision

skeletal muscles of SRC1<sup>(i)skm-/-</sup> mutant mice (Figure S5I), and SRC-1 transcript and protein levels were strongly reduced in their skeletal muscles (Figure S5H and J).

Note that SRC-3 levels were unaffected by ablation of SRC-1 and TIF2 in skeletal muscle myofibers (Figure S5H).

# Phenotypic analysis of SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> mice gained similar weight than control mice, when fed a chow or a high caloric diet (Figure S4H and I). Moreover, body temperature, as well as UCP2 and UCP3 transcript levels, were similar in SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> and control mice (Figure 5I and Figure S4E). In addition, no difference in blood glucose levels, fiber type composition, and PGC-1 $\alpha$ , mCPT1, Ndufb3 and SCAD gastrocnemius transcript levels were observed between SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> and control mice (Figure 5I and Figure 5I and Figure S4F, G and J).

Thus, in the presence of TIF2, lack of SRC-1 in skeletal muscles has no major consequence on energy metabolism.

#### Revision

## Supplemental procedures.

#### Mice

Mice were maintained in a temperature and humidity controlled animal facility, with a 12 hours light/dark cycle and free access to water and a standard rodent chow (2800 kcal/kg, Usine d'Alimentation Rationelle, Villemoisson-sur-Orge, France). The high fat diet (HFD) study was carried out with a chow containing 4.056 kcal/kg (fat: 1.600 kcal/kg and sucrose: 1.600 kcal/kg; research Diets, New Brunswick, New Jersey). HFD was given to mice at 5 weeks of age. Breeding and maintenance of mice were performed according to institutional guidelines. Animals were killed by cervical dislocation and tissues were immediately collected, weighted, and frozen in liquid nitrogen or processed for biochemical and histological analysis.

TIF2<sup>L2/+</sup> mice bearing one WT TIF2 allele and one TIF2 L2 allele, in which the NID exon, encoding the nuclear receptor interaction domain, is flanked by LoxP sites (floxed), and SRC3<sup>L3/+</sup> mice bearing on WT SRC-1 and one SRC-1 L3 allele, in which exon 5 encoding the basic-helix-loop-helix (bHLH) domain is flanked by LoxP sites, have been previously described (Gehin et al., 2002; Yamada et al., 2004). TIF2<sup>L2/+</sup> mice were bred with HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup> transgenic mice that express the tamoxifen-dependent Cre-ER<sup>T2</sup> recombinase under the control of the human skeletal actin (HSA) regulatory elements (Schuler et al., 2005), to generate HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/TIF2<sup>L2/L2</sup> pre-mutant mice and HSA-Cre-ER<sup>T2(0/0)</sup>/TIF2<sup>L2/L2</sup> control mice. Similarly, SRC-1<sup>L3/L3</sup> mice were bred with HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/TIF2<sup>L2/L2</sup> pre-mutant mice and HSA-Cre-ER<sup>T2(0/0)</sup>/SRC-1<sup>L3/L3</sup> control mice. HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/TIF2<sup>L2/L2</sup>/SRC-1<sup>L3/L3</sup> mice. All mice were on a C57BL6 background. Pre-mutant and control male mice were intraperitoneally injected with tamoxifen (1 mg per day, for 5 days) at 7 weeks of age (Metzger et al., 2003).

Mice were genotyped by PCR amplification of genomic DNA extracted from tail biopsies using the DirectPCR extraction kit (Viagen, cat # 102-T), with TIF2 and SRC-1 primers 1 and 2 and Cre-ER<sup>T2</sup> primers (Table 1). PCR amplification with GAPDH primers (Table 1) was used to generate an internal control DNA segment.

Cre-mediated excision of the floxed TIF2 and SRC-1 DNA segments was determined by PCR of genomic DNA isolated from mouse tissues using TIF2 and SRC-1 primers 1 and 3 (Table 1).

#### Serum analysis

#### Revision

Blood was collected from retro orbital sinus after a 6 hr fast that started at the beginning of the light cycle, and serum glucose, insulin, cholesterol, triglyceride and free fatty acid levels were analyzed as described (Picard et al., 2002).

### Glucose tolerance and insulin sensitivity tests

#### Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT)

IPGTT was performed on 6 h fasted mice. After measurement of the basal glucose level on blood collected from the tail vein (time 0), mice were intraperitoneally injected with a 20 % glucose solution in sterile saline (0.9 % NaCl) at a dose of 2 g glucose/kg body weight. Blood was collected from the tail vein after 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 min for glucose determination.

#### Insulin sensitivity test (IPIST)

Six hour fasted mice were intraperitoneally injected with porcine insulin (0.5 U/kg; Sigma). Blood was collected at 15, 30, 60, and 90 min, and glucose analyzed as describe above.

### **Energy expenditure**

Oxygen consumption and carbon dioxide production were measured with a Labmaster system (TSE, www.TSE-Systems.com) at 26 minutes intervals for 24 h.  $VO_2$  and  $VCO_2$  values were normalized to body mass. The respiratory quotient (RQ) corresponds to  $VCO_2/VO_2$ . Heat (Kcal/kg0.75h) was calculated using the formula: Heat (H) = (Calorific Value x  $VO_2$  x 0.001) / body weight x 0.75; (Caloric Value = 3.815 + 1.232 x RQ). Body temperature was measured with a rectal probe linked to a digital thermometer (Bioseb).

#### **Exercise performance test**

Exercise performance tests were performed on a motorized treadmill (LE 8700; Control Panlab Instrument). 18 week-old animals were accustomed to treadmill running for 3 days (10 min runs in the morning and in the afternoon; day 1, no incline and 15 cm/s belt speed in the morning and 20 cm/s in the afternoon; day 2, 10° incline and 20 cm/s belt speed in the morning and 25 cm/s in the afternoon; day 3, 15° incline and 25 cm/s belt speed). At day 4, following a warm up phase of 10 min (0° incline, 25 cm/s belt speed), animals were run for 50 min at a 15° incline and a belt speed of 25 cm/s, followed by 30 min at 20° incline and 28 cm/s. Thereafter, the belt speed was increased for 3 cm/s every 30 min, until the animals were exhausted (Pederson et al., 2005).

#### Revision

Grip strength.

A Grip Strength Meter (Bioseb) was used to measure forelimb and hindlimb grip strength. The test was repeated 3 consecutive times within the same session, and the mean value was recorded as the maximal grip strength for each mouse.

# Histological and histochemical analysis

Muscles were quickly frozen in dry ice-cooled isopentane.

For NADH-tetrazolium reductase staining, 10 μm cryosections were incubated in 0.2 M Tris-HCl pH 7.4, containing 1.5 mM NADH and 1.5 mM nitrobluetetrazolium for 15 min at 55°C, dehydrated, and mounted (Hamalainen and Pette, 1993).

For SDH staining, 10 µm cryosections were incubated for 1 hour in 20 mM Potassium Dihydrogen Phosphate, 76 mM Di-Sodium Hydrogen Phosphate, 5.4 % Sodium Succinate and 0.02 % Nitrobluetetrazolium, washed in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) for 5 min 3 times, postfixed in 10 % buffered formalin solution for 10 min, rinsed in 15 % ethanol for 5 min two times and mounted with aqueous mounting medium (Carson, 1997).

For immunohistochemistry, 10 µm cryosections were rehydrated, incubated in 4 % PFA for 10 min, in 10% SDS for 10 min, in 5 % Normal goat serum (NGS, VS-1000, Coger Reactifs Et Produits De La Recherche) in PBS, 0.1 % Triton-X100 for 1 h and overnight at 4°C with anti-TIF2 antibodies (3Ti3F1, IGBMC, 1/2000), anti-MyHC1 (M 8421, Sigma, 1/2000), MyHC2A and MyHC2B (cell culture supernatant from SC-71 and BF-F3 hybridomes, respectively, obtained from the German collection of microorganisms and cell cultures). Slides were then incubated with a secondary antibody [GAM-Cy3 (IgG+M), 115-165-044, INTERCHIM SA, 1/400] and mounted in aqueous medium with DAPI (SIGMA, D-9542, 1/1000). Between each step, sections were washed with PBS, 0.1 %Triton-X100.

Quadriceps and epididymal WAT were fixed in 10 % buffered formalin, dehydrated in ethanol, embedded in paraffin, and cut at 5 µm. Sections were deparaffinized, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin, washed in running tap water, decolorized in acid alcohol (1mL HCl 37 % in 100 mL of 70 % EtOH) for 2 seconds, washed in running tap water, dehydrated, cleared and mounted. Muscle and WAT cross section areas were determined with the MetaMorph<sup>®</sup> software.

For oil red O staining, 10 µm cryosections were rehydrated in PBS for 2 min and stained in oil red O solution during 3 minutes, washed in deionised water for 30 seconds, counterstained by dipping the slide in

#### Revision

Harris' hematoxylin for 1 second, washed in tap water during 2 minutes and mounted in aqueous medium with DAPI (SIGMA, D-9542, 1/1000).

For ultrastructural analyses, skeletal muscle samples were fixed by immersion in 2.5 % glutaraldehyde and 2.5 % paraformaldehyde in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) and washed in cacodylate buffer for 30 minutes and kept at 4 °C. Post-fixation was performed with 1 % osmium tetraoxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at 4 °C and dehydration through graded alcohol (50, 70, 90 and 100 %) and propylene oxide for 30 minutes each. Samples were oriented longitudinally and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were cut at 70 nm and contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined at 70 kv with a Morgagni 268D electron microscope. Images were captured digitally by a Mega View III camera (Soft Imaging System).

Mitochondria number and cross section areas were determined with the MetaMorph® software.

#### Protein preparation and analysis

Quadriceps were grounded in RIPA buffer [50 mM Tris pH 7.5, 1 % Nonident P40, 0.5 % Sodium Deoxycholate, 0.1 % SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (45  $\mu$ g/mL, 11 873 580 001, Roche)] with a potter at 4°C. Homogenates (100  $\mu$ g of protein) were electrophoresed on 10 % polyacrylamid gels. Proteins were electroblotted to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) and immunodetected using primary antibodies directed against TIF2 (3Ti3C11, IGBMC, 1/1000), GAPDH (MAB374, MILLIPORE UPSTATE CHEMICON, 1/10000), UCP3 (ab3477, abcam, 1/1000), phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172, 2531S, Cell Signaling, 1/1500) and AMPK $\alpha$  (2532S, Cell Signaling, 1/500), phospho-ACC (Ser79, 3661S, Cell Signaling, 1/1000) and ACC (3662S, Cell Signaling, 1/1000), phospho-4E-BP1 (Thr37/46, 9459S, Cell Signaling, 1/1000) and 4E-BP1 (9644S, Cell Signaling, 1/1000), MyHC1 (M 8421, Sigma, 1/2000), MyHC2A and MyHC2B (SC-71 and BF-F3 hybridomes from the German collection of microorganisms and cell cultures, cell supernatant, purum, respectively), and Aconitase [(Martelli et al., 2007), 1/10000], SRC-1 (ab84, abcam, 1/500), PGC-1 $\alpha$  (H-300, Santa-Cruz, 1/200). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Amersham Biosciences) were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce, Rockford, IL, 1/1000).

## LDH activity determination

Tibialis and soleus muscle extracts were homogenized in an ice-cold dilution (1:20, weight/volume) of homogenization buffer (150 mM Na-P-Buffer, pH 7.6 and Triton X100, 0.1%) with a Polytron homogenizer for 1 min. Homogenates were incubated at 4 °C for 20 min under constant agitation and centrifuged for 15 min

#### Revision

at 2500 rpm at 4 °C. 10  $\mu$ L of extract were diluted to 500  $\mu$ L with 250  $\mu$ L of TRA buffer (100 mM Triethanolamin-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.6) and 10  $\mu$ L of 14 mM NADH, and analysed in a spectrophotometer. The slope E<sub>prerun</sub> (nm/min) and E<sub>run</sub> (nm/min) were determined at 334 nm before and after addition of 10  $\mu$ L of 120 mM pyruvate, respectively. The activity (A) ( $\mu$ mol/min\*mL) was calculated by: A = (( $\delta$ E/min)/extinction coefficient) x (test volume / probe volume) x 1/d.  $\delta$ E/min was obtained by substracting E<sub>prerun</sub> to E<sub>run</sub>; extinction coefficient at 334 nm, 6.08 cm<sup>-1</sup> /  $\mu$ mol; d = optical path length.

#### Mitochondria respiration analysis

Mice were anesthetized by 300 µL intraperitoneal injection of a 10 % pentobarbital solution in 10 mM NaCl. Muscles were collected and placed in S solution (see below). Fibers were separated under a binocular microscope in solution S at 4°C and permeabilized for 30 min in solution S with 50 µg/mL of saponin. After being placed for 10 min in solution R (see below) to wash out adenine nucleotides and creatine phosphate, isolated fibers were transferred to a 3 mL water-jacketed oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, UK) equipped with a Clark electrode, as previously described (Jeukendrup et al., 1997). Solutions R and S contained 2.77 mM CaK<sub>2</sub>EGTA, 7.23 mM K<sub>2</sub>EGTA, 6.56 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM taurine, 0.5 mM DTT, 50 mM potassium-methane sulfonate (160 mM ionic strength) and 20 mM imidazole (pH 7.1). Solution S contained in addition 5.7 mM Na<sub>2</sub>ATP, 15 mM creatine-phosphate, while solution R also contained 5 mM glutamate, 2 mM malate, 3 mM phosphate, and 2 mg/mL fatty acid free bovine serum.

 $V_{INIT}$  was measured in absence of fibers and substrate at 22°C under continuous stirring.  $V_0$  corresponds to the rate of  $O_2$  consumption after addition of muscle fibers and glutamate-malate as substrate, to which  $V_{INIT}$  is subtracted.  $V_{MAX}$  (maximal respiration) corresponds to the rate of  $O_2$  consumption after addition of 2 mM of ADP as phosphate acceptor, to which  $V_{INIT}$  is subtracted. The acceptor control ratio, ACR, is defined as the ratio between  $V_{MAX}$  and  $V_0$ .  $V_{PALM}$  was determined as Vmax, except that glutamate was replaced by 100  $\mu$ M palmitoyl-L-carnitin as substrate.

After measurement, fibers were dried, and respiration rates were expressed as micromoles of  $O_2$  per minute per gram dry weight.

#### Quantification of mitochondrial and nuclear DNA

Quadriceps were digested with Proteinase K overnight, and DNA was extracted by a phenol-chloroform method. Mitochondrial and nuclear DNA was amplified by semi-quantitative PCR using Cox2 and Fas primers (Table 1), respectively. PCR products were run on a 2 % agarose gel, the intensity of the Cox2 and

#### Revision

Fas DNA segments quantified with a luminometer, and their ratio determined to evaluate the mitochondria number.

#### Cell culture and transfection

Murine C2C12 muscle cells (ECACC, reference number 91031101) were grown in a humid atmosphere at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> in proliferation media (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM], 20% fetal bovine serum). Differentiation was induced at 50 % confluence, by growing cells in differentiation medium (DMEM, 5% horse serum) for 2 days.

C2C12 cells were transiently transfected with SRC-1 and TIF2 expression vectors (Voegel et al., 1998; Xu et al., 1998) using FUGENE.6 (Roche) according to the manufacturer's instructions. Total DNA was adjusted to the highest TIF2 and/or SRC-1 expression vector concentration with empty expression vector. Briefly, cells were grown in 100 mm plates for 12 h in proliferation medium containing plasmid DNA and Fugene.6 (1:3 ratio), and for 48 h in differentiation medium. GW 501516 (1 μM) was added 1 and 48 h before harvesting cells for ChIP assay and RNA isolation, respectively.

#### **Chromatin Immunoprecipitation Assays**

ChIP was performed according to Morelli et al. (Morelli et al., 2004). Whereas 10 % of pre-cleared chromatin from cell lysates were stored and used as input DNA, the remaining precleared chromatin was immunoprecipitated either with specific anti-TIF2 (IGBMC, 3Ti3C11, 10 µg) or anti-SRC-1 (AbCam, ab84, 10 µg) antibodies. Normal rabbit serum IgG were used as negative control. 10 % of input and immunoprecipitated DNA were quantified by real time PCR.

#### Revision

9

### Supplemental figures.

Figure S1: Characterisation of muscles and adipose tissue from control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Related to Figure 1.

(A) Weight of tibialis, gastrocnemius (gastro), soleus and quadriceps (quadri) from 14 and 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

(B) Hematoxylin and eosin stained sections of tibialis, gastrocnemius, soleus and quadriceps muscles from 14 and 30 week-old control and TIF2<sup>(I)skm-/-</sup> mice; scale bar: 50 μm.

(C) Distribution of muscles fiber CSA and mean fiber CSA of tibialis, gastrocnemius, soleus and quadriceps muscles from 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

(D) Epididymal white adipose tissue weight of 14 and 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

(E) Hematoxylin and eosin stained sections of epididymal white adipose tissue from 30 week-old control and mutant mice; scale bar: 50 μm.

(F) Epididymal adipocyte CSA from 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

(G) Spontaneous activity of 18 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

A, B, D to G: n = 10, C: n = 4. Error bars in A, C, D, F and G : SEM.

## Figure S2: Characterisation of muscles from control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Related to Figure 2.

(A) Western blot analysis of MyHC1, MyHC2A and MyHC2B in quadriceps muscle of 14, 18 and 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice. GAPDH is used as an internal control.

(B) Relative phosphofructokinase (PFK) transcript levels in gastrocnemius muscle of 11, 14, 18 and 30 week-old control and TIF2<sup>(I)skm-/-</sup> mice.

(C) Relative PGC-1 $\beta$  transcript levels in gastrocnemius muscle of 11, 14, 18 and 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

(D) Ultrastructure of tibialis muscle from 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Arrowheads point to some mitochondria. A band; I: I band; Z, z line; scale bar: 1  $\mu$ m..

(E) Distribution of mitochondria CSA in tibialis muscles from 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

(F) Total treadmill running time and distance of 18 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

(G) Grip strength in control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice at 11, 14 and 18 weeks of age.

A: n = 6, B, C, F and G: n = 10, D and E: n = 4. Error bars in B, C, F and G : SEM.

Figure S3: Metabolic characteristics of control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular or high fat diet. Related to Figure 4. 29/07/10 Revision 10
(A) Plasma cholesterol, triglyceride and free fatty acid levels of 11, 14 and 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular diet.
(B) Food intake in 15 and 23 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a high fat diet.
(C) Epididymal white adipose tissue weight of 23 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a high fat diet.
(D) Epididymal adipocyte CSA from 23 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a high fat diet.
(E and F): Hematoxylin and eosin (H&E) and oil red O stained liver (E) and gastrocnemius (F) sections from control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a high fat diet; scale bar: 50 µm.
(G) Gastrocnemius weight of control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular (RD) or a high fat (HFD) diet.
(H) Serum glucose levels in 15 and 23 week-old high fat diet-fed control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

(I) Serum cholesterol, triglyceride and insulin levels in 23 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a high fat diet.

(J) Intraperitoneal insulin sensitive test (IPIST) in 23 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a high fat diet.

(K) Relative transcript levels in gastrocnemius muscle of 23 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a high fat diet of lipoprotein lipase (LPL), fatty acid translocase (FAT/CD36), heart fatty-acid binding protein (hFABP), long chain acyl-CoA synthetase (LCAS),  $\beta$ -hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase ( $\beta$ -HAD), short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD), PGC-1 $\alpha$ , and UCP2 and UCP3.

A to C and E to K: n = 10; D: n = 4. Error bars in A-D and G-K: SEM.

Figure S4: Effect of SRC-1 and TIF2 overexpression in differentiated C2C12 myocytes and of selective ablation of both TIF2 and SRC-1 in myofibers of adult mice. Related to Figure 5.

(A) Representative western blot analysis of SRC-1 in gastrocnemius (gastro), soleus and tibialis muscles of 11 week-old control (CT) and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice (TIF2). GAPDH is used as an internal control.

(B) Representative western blot analysis of TIF2, SRC-1, UCP3, PGC-1α, phospho-AMPK (pAMPK), total AMPK (AMPK), phospho-ACC (pACC) and total ACC (ACC) in C2C12 myocytes transfected with 1 μg SRC-1 and/or TIF2 expression vectors. GAPDH is used as an internal control.

(C) Relative transcript levels of PGC-1 $\alpha$ , mCPT1 and LPL in C2C12 myocytes transfected with 100 ng or 1 $\mu$ g of SRC-1 expression vector.

(D) Relative transcript levels of PGC-1 $\alpha$ , mCPT1 and LPL in C2C12 myocytes transfected with 100 ng or 1  $\mu$ g of TIF2 expression vector.

(E) Rectal temperature of 20 week-old TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, TIF2/SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> and SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> mice, and of their respective controls (TIF2<sup>L2/L2</sup>, TIF2/SRC-1<sup>L2/L2</sup> and SRC-1<sup>L3/L3</sup>), fed a regular diet.

#### Revision

(F) Relative muscle carnitine palmitoyltranferase 1 (mCPT1), NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 3 (Ndufb3) and short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) transcript levels in gastrocnemius muscle of 30 week-old TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, TIF2/SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> and SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> mice, and of their respective controls. (G) Histochemical staining of succinate dehydrogenase (SDH, complex II) activity in tibialis muscle of 20 week-old control and mutant (TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, TIF2/SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> and SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup>) mice. Three different fiber-types are distinguished: oxidative and intermediate fibers are darkly and moderately stained, respectively; glycolytic fibers are unstained; scale bar, 100 μm.

(H) Body weight of 10 and 20 week-old control and mutant (TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, TIF2/SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> and SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup>) mice fed a regular diet.

(I) Body weight of 10 and 20 week-old control and mutant (TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, TIF2/SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> and SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup>) mice fed a a high fat diet.

(J) Blood glucose levels of 20 week-old control and mutant (TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, TIF2/SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> and SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup>) mice fed a regular diet.

A-D: n = 6; E-J: n = 10. Error bars in C-F and H-J: SEM.

# Figure S5: Characterization of Tam-induced Cre-ER<sup>T2</sup>-mediated SRC-1 and/or TIF2 ablation in mice. Related to Supplemental Results.

(A) Schematic representation of the HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> transgene and of the wild type (WT allele, upper panel), floxed L2 (middle panel) and the Cre-mediated NID exon deleted L- (lower panel) TIF2 alleles. Primers used to characterize TIF2 L- alleles are materialized with arrows. LoxP sites are shown by arrowheads.

(B) PCR detection of the TIF2 L- alleles in various organs from 30 week-old control and TIF2<sup>(I)skm-/-</sup> mice (T: tail, W: white adipose tissue, B: brown adipose tissue, H: heart, G: gastrocnemius, Ti: tibialis, Q: quadriceps, S: soleus). GAPDH is used as an internal control (IC) for DNA loading.

(C) Relative TIF2 transcript levels in various organs from 30 week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice (G: gastrocnemius, S: soleus, Ti: tibialis, B: brown adipose tissue, H: heart).

(D) Western blot analysis of TIF2 protein in slow (soleus, S), mixed (gastrocnemius, G; tibialis, Ti) and fast (EDL, E; diaphragm, D) muscles of 8 week-old control (CT) and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> (TIF2) mice, and in quadriceps muscle of 8 and 30 week-old control (CT) and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice, and 30 week-old TIF2<sup>L-/L-</sup> mice [(Gehin et al., 2002); negative control]. GAPDH is used as an internal control.

(E and F) TIF2 immunohistochemical detection (red) in quadriceps from 8 (E) and 30 (F) week-old control and TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Nuclei are stained with DAPI (blue); scale bar: 20  $\mu$ m.

#### Revision

12

(G) PCR detection of the SRC-1 L3 and L- and TIF2 L2 and L- alleles in various organs from 20 week-old control and TIF2/SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> mice (G: Gastrocnemius, S: soleus, E: EDL, W: white adipose tissue, B: Brown adipose tissue, H: Heart and L: liver).

(H) Relative transcript levels of SRC-1, TIF2 and SRC-3 in gastrocnemius of 20 week-old control, SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> and TIF2/SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

(I) PCR detection of the SRC-1 L3 and L- alleles in various organs from 20 week-old control and SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup>

mice (H: Heart, W: white adipose tissue, L: liver, G: Gastrocnemius).

(J) Western blot analysis of SRC-1 protein in quadriceps muscle of 30 week-old control and SRC-1 (i)skm-/-

mice. GAPDH is used as an internal control.

B, C, G-I: n = 10, D-F and J: n = 6. Error bars in C and H: SEM.

#### Supplemental Table 1: list of oligonucleotides used for PCR analyses.

## **Supplemental References**

Carson, F. L. (1997). Histotechnology: A Self Instructional Text, 2nd ed. (Chicago, III).

Gehin, M., Mark, M., Dennefeld, C., Dierich, A., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (2002). The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. Mol Cell Biol *22*, 5923-5937.

Hamalainen, N., and Pette, D. (1993). The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. J Histochem Cytochem *41*, 733-743.

Jeukendrup, A. E., Mensink, M., Saris, W. H., and Wagenmakers, A. J. (1997). Exogenous glucose oxidation during exercise in endurance-trained and untrained subjects. J Appl Physiol *82*, 835-840.

Martelli, A., Wattenhofer-Donze, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. Hum Mol Genet *16*, 2651-2658.

Metzger, D., Indra, A. K., Li, M., Chapellier, B., Calleja, C., Ghyselinck, N. B., and Chambon, P. (2003). Targeted conditional somatic mutagenesis in the mouse: temporally-controlled knock out of retinoid receptors in epidermal keratinocytes. Methods Enzymol *364*, 379-408.

Morelli, C., Garofalo, C., Sisci, D., del Rincon, S., Cascio, S., Tu, X., Vecchione, A., Sauter, E. R., Miller, W. H., Jr., and Surmacz, E. (2004). Nuclear insulin receptor substrate 1 interacts with estrogen receptor alpha at ERE promoters. Oncogene 23, 7517-7526.

Pederson, B. A., Cope, C. R., Irimia, J. M., Schroeder, J. M., Thurberg, B. L., Depaoli-Roach, A. A., and Roach, P. J. (2005). Mice with elevated muscle glycogen stores do not have improved exercise performance. Biochem Biophys Res Commun *331*, 491-496.

Picard, F., Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M. F., O'Malley, B. W., Chambon, P., and Auwerx, J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. Cell *111*, 931-941.

Schuler, M., Ali, F., Metzger, E., Chambon, P., and Metzger, D. (2005). Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. Genesis *41*, 165-170.

Voegel, J. J., Heine, M. J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. Embo J *17*, 507-519.

29/0	7/	1	0	
------	----	---	---	--

## Revision

Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1998). Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. Science 279, 1922-1925.

Yamada, T., Kawano, H., Sekine, K., Matsumoto, T., Fukuda, T., Azuma, Y., Itaka, K., Chung, U. I., Chambon, P., Nakamura, K., *et al.* (2004). SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. J Bone Miner Res *19*, 1452-1461.











# Supplemental Table 1

Gene	Primer (5' – 3')	Gene	Primer (5' – 3')	
TIF2	1: TCCTGGATGCTTAATCCTTCACATG	SRC-1	1: TGGCATCTATAACCAAATGTGTATCA	
	2: GCAGAGCAACTGTACATGTCTCTTG		2: TGTGGAAGACATGCTAGTCAATGCT	
	3: CCTGGATTGTTCCAAAGGTATTAACT		GTCGTACCATCTATGCCTCCTATAT	
GAPDH	GCAGCTGCTCAGCTGCCTGC	LPL	CACAGTGGCCGAGAGCGAGAA	
(DNA IC)	GATCGCACTTCTCATACTCG		GCTGAGTCCTTTCCCTTCTGCAG	
Cre	TTCCCGCAGAACCTGAAGATGTTCG	FAT/CD36	TCTGACATTTGCAGGTCTATCT	
	GGGTGTTATAAGCAATCCCCAGAAATGC		TGTCTGGATTCTGGAGGGGTGATGC	
HPRT	GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG	hFABP	CGAGAAGAACGGGGGATAC	
	GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC		AATGTCAGAGGGGAAAACCA	
TIF2	TTTGTCTGATGGCACTCTCG	LCAS	GCTCTCCGCCCTACCATCTT	
	CTACCGAGGGTCATGTCCTG		CCGGACCTCTGCCTGCTTGC	
SRC-1	CGCAGGGAGCAAGAAAATAA	β <b>-ΗΑD</b>	TTTGGTACAGTTATTCAGGA	
	ACGTCATCATCAGTCGTGGA		CAGCCACGACAGCATCACAC	
SRC-3	CAGCTCTGGCCAAGAGAAAG	LCAD	TTGGTGGGGACTTGCTCTCA	
	AGAGAACTCGGTCCTGCAAA		CTGTTCTTTGTGCCGTAAT	
UCP1	TGGCAAAAACAGAAGGATT	MCAD	GGATGACGGAGCAGCCAATG	
	CGAGTCGCAGAAAAGAAGC		ATACTCGTCACCCTTCTTCT	
UCP2	ACCAAGGGCTCAGAGCATGCA	SCAD	TCGCTGGTCCCTTCGTAGAT	
	AGGTCACCAGCTCAGCACAGT		TGGGATGGGCTTCAAAATAG	
UCP3	ACTCCAGCGTCGCCATCAGGATTCT	mCPT1	CAGCTGGCTGGTTGTTGTCA	
	TAAACAGGTGAGACTCCAGCAACTT		TTGTCGGAAGAAGAAAATGC	
Ndufb3	AAGGGACGCCATTAGAAACG	CS	CAGCTACAGAAGGAAGTTGG	
	TACCACAAACGCAGCAAACC		AGGAATAGCGAGGGTCAGTC	
Sdhb	TGGTGGAACGGAGACAAGTA	PGC-1α	AAGTGTGGAACTCTCTGGAACTG	
	TGGCAGCGGTAGACAGAGAA		GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG	
Uqcrc1	GGGGCAAAAACATCCTTAGG	PGC-1β	CTACCAGAGCCCACCCAGTA	
	ATCCGGCTCTCCCACTCAGC		CAGGATGAGGAGCCAGAACT	
Cox5b	CGTCCATCAGCAACAAGAGA	Cox2	AATTAGCTCCTTAGTCCTCT	
	AGATAACACAGGGGGCTCAGT		CTTGGTCGGTTTGATGTTAC	
Atp5l	CCCCTGCTGAAATCCCTACA	FAS	ACCCAAGCATCATTTTCGTC	
	TAAAACCACATCCACACCTC		AGGATATGGAGAGGGCTGGT	
NRF-1	TGGAGTCCAAGATGCTAATG	UCP3	CGTCTTCTCCTCTCCCCTCT	
	AGAGCTCCATGCTACTGTTC	PPRE1	GGTTTAGCTTCCGTGACCTG	
TFAM	AATTGCAGCCATGTGGAGGGA	UCP3	CATTAAAGAGCCCCAGGTCA	
	GCTCTCAGGTGGGATGCAG	PPRE2	GCCTCACCATTCACTGTTGT	
PFK	TGACCTCTGGTGGAGATGCCC	UCP3 13-E4	AGGTTTCAGGTCAGCTGGTG	
	ATGGACACGCTCTCCCAGGTG		CCACTCCATTAGGTAGCAGCA	

# II. Le récepteur des glucocorticoïdes contrôle la masse musculaire chez la souris adulte.

Les glucocorticoïdes exercent des effets pléiotropes chez les Mammifères, et sont fréquemment employés dans le traitement des maladies inflammatoires. L'un des principaux effets secondaires des glucocorticoïdes est la fonte musculaire. Du fait que les mécanismes moléculaires par lesquels les glucocorticoïdes contrôlent l'atrophie musculaire restent peu connus, nous avons généré des souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>, dans lesquelles le récepteur des glucocorticoïdes (GR) est sélectivement invalidé dans les muscles squelettiques à l'âge adulte. Nous montrons que la voie anabolique mTOR est stimulée chez les souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>, résultant en une augmentation de masse et de force musculaires, est que cette stimulation est probablement due à une diminution des niveaux d'expression de l'inhibiteur de la phosphorylation de mTOR, REDD1. De plus, de telles souris sont protégées du catabolisme musculaire induit par un traitement à la dexaméthasone, et partiellement résistantes à l'atrophie musculaire induite par un jeun prolongé. Ainsi, nos résultats démontrent que GR dans les myofibres contrôle à la fois les voies anti-anaboliques et cataboliques.

## Glucocorticoid receptor controls mouse muscle mass at adulthood.

## Summary

Glucocorticoids exert pleiotropic effect in mammal and are widely used for the management of inflammatory diseases. One of the main glucocorticoid side effects is muscle proteolysis. As, the molecular mechanisms through which glucocorticoid controls muscle atrophy remain poorly understood, we generated mice GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, in which the glucocorticoid receptor (GR) is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood. We demonstrate that mTOR anabolic pathway is stimulated in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, resulting in increased skeletal muscle mass and strength and that this stimulation most probably due to decreased REDD1 levels, an inhibitor of mTOR phosphorylation. Moreover, such mice were protected from dexamethasone-induced muscle catabolism and partially resistant to fasting-induced muscle atrophy. Thus, our results demonstrate that myofiber GR controls both anti-anabolic and catabolic pathways.

# Introduction.

Skeletal muscle is a dynamic tissue that has the capacity to regulate its size in response to a variety of external cues, including mechanical load, neural activity, hormones/growth factors, stress and nutritional status. Under stress conditions, skeletal muscle serves as the most significant repository for protein in the body, a source that is trapped to provide a pool of amino acids for tissue repair and gluconeogenesis. Moreover, muscle atrophy occurs as the result of a number of disparate conditions including aging, immobilization, metabolic diseases, cancer and neurodegenerative diseases. Muscle weakness results from inhibition of anabolic and/or activation of catabolic pathways. The growth factor IGF-I, which activates Akt kinase by phosphorylation on Thr308 residue, stimulates muscle hypertrophy (Latres et al., 2005; Sacheck et al., 2004). When activated, Akt can phosphorylate mTOR, an evolutionary conserved nutriment sensing protein kinase that regulates growth and metabolism in eukaryotic cells. mTOR resides in two structurally and functionally distinct signaling complexes: mTOR complexe 1 (mTORC1) and mTORC2. The raptor-containing complex mTORC1 regulates a vast range of cellular activities, including transcription, translation, ribosome biogenesis and autophagy (Wullschleger et al., 2006). The ribosomal S6 Kinase (S6K1) and the translation repressor 4E-BP1 are two key cellular substrates for mTORC1 (Gingras et al., 1998; Ma and Blenis, 2009; Rommel et al., 2001). The rictor-containing complex mTORC2 is proposed to regulate actin organization. Moreover, mTORC2 is one of the kinases that phosphorylates Akt on Ser473 (Bentzinger et al., 2008; Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004). Another target of Akt, GSK3<sub>β</sub>, inhibits protein synthesis by sequestering the translation factor eIF2B (Jefferson et al., 1999).

Muscle catabolism mainly involves three pathways: (i) the cytosolic calcium-dependent calpain system (Goll et al., 2003; Smith and Dodd, 2007), (ii) the ubiquitin-proteasome system (UPS) through which proteins are ubiquitined and degraded by the ATP-dependent 26S-proteasome (Clarke et al., 2007; Lee et al., 2004), and (iii) the autophagy-lysosomal protease system (Mammucari et al., 2007; Mizushima et al., 2004; Tanida et al., 2004). Calpains clivate cytoskeleton muscle myofibers that are then degraded by UPS. Ubiquitin proteasome system (UPS) functions as the association of the 26Sproteasome and three ubiquitins (E1, E2 and E3) that ubiquitinate target proteins and lead them to the 26S proteasome. Among these ubiquitins, Ubiquitin C (E2), Atrogin1 and Murf1 (E3) are upregulated in various models of muscle atrophy (Clarke et al., 2007; Gilson et al., 2007; Gomes et al., 2001; Lecker et al., 2004). Autophagy-induced protein degradation is mediated by an autolysosome resulting from the fusion of an autophagosome, containing of Beclin1, PI3K<sub>III</sub>, GABARAPL and ATG proteins, and a lysosome, a double membrane filled with cathepsin proteases. BNIP3 is among the most induced atrogene during muscle wasting, and has been shown to control autophagy (Hamacher-Brady et al., 2007; Tracy et al., 2007). These catabolic pathways are transcriptionaly activated by the FOXO transcription factor family and by the Akt substrate GSK3ß (Mammucari et al., 2007; Mammucari et al., 2008; Stitt et al., 2004; Waddell et al., 2008; Zhao et al., 2009).

Natural glucocorticoids such as cortisol and corticosterone, as well as synthetic glucocorticoids such as dexamethasone and prednisolone are potent inducer of skeletal muscle atrophy. They exert their biological effects predominantly via the glucocorticoid receptor (GR), a member of the nuclear receptor superfamily, that acts as a ligand dependent transcription factor. In the absence of ligand, GR is located in the cytoplasm within a large complex that includes chaperones such as heat shock protein 90 (Schakman et al., 2008). Upon ligand binding, GR is translocated to the cell nucleus and binds to DNA sequences called glucocorticoid response elements to activate (GRE) or repress (nGRE) target genes (Newton, 2000). In addition, GR positively or negatively influences transcription in a GRE- and homodimer-independent manner, via interaction with promoter bound STAT5, AP-1 or NF- $\kappa$ B transcription factors (Rhen and Cidlowski, 2005; Schakman et al., 2008).

Although number of studies have characterized glucocorticoid action in cultured myotubes, signaling pathways controlled by GR during skeletal muscle atrophy remains to be investigated *in vivo*. We thus generated GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, in which GR is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood. Analyses of GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice revealed that under normal conditions mTOR pathway is activated, resulting in increased skeletal muscle mass and strength, and that this stimulation most probably due to decreased REDD1 levels, an inhibitor of mTOR phosphorylation. Moreover, such mice were protected against dexamethasone-induced muscle catabolism and partially resistant to fasting-induced muscle atrophy. Thus, myofiber GR is not only transducing glucocorticoid-induced myofibrillar protein degradation but has also anti-anabolic effects.

# Results

### Myocytic GR exerts anti-anabolic effects in mouse skeletal muscles.

To determine the impact of GR ablation in skeletal muscle myofibers, we generated GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, in which GR is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood (see Supplemental Informations). GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice gained ~15 % more weight than their control littermates over a 20 week time period (Figure 1A), due to a ~15 % increased muscle but not fat content, as determined by Dexa Scan analysis (Supplemental Figure 1A and 1B). Muscle to body weight ratio was similar in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, indicating that increased body weight resulted essentially from increased muscle mass (Supplemental Figure 1A and 1B). Whereas one week after GR ablation guadriceps, gastrocnemius, tibialis and EDL muscle mass was similar in GR<sup>(i)skm-/-</sup> and control mice (Supplemental Figure 1C), their mass was 10-15 % increased 2 months after GR ablation (Figure 1B), and was more than 10 % increased 1 year after GR ablation (Supplemental Figure 1D). In contrast, the mass of soleus muscle and epididymal fat pad was similar in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 1B and Supplemental Figure 1C and 1D). Histological analyses of fast quadriceps muscle 2 months after GR ablation revealed that muscle fibers of GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice were enlarged (Figure 1C). Quadriceps fiber CSA was ~15 % increased in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 1D and 1E), whereas fiber number was similar (Supplemental Figure 1E). In contrast, there was no difference in fiber CSA of slow soleus muscle between control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Supplemental Figure 1F to 1H). Thus, ablation of GR selectively in skeletal muscle myofibers results in increased fast and mixed muscle fiber size.

To determine whether increased muscle size was associated with increased muscle strength, GR<sup>(i)skm-/-</sup> and control mice were subjected to grip tests at various age (Figure 1F). Muscle strength increased more in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice than in control mice between 2 and 4 month of age, and remained higher in 14 months GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice than in age-matched control mice (Figure 1F).

To further characterize the strength of limb muscle lacking GR selectively in myofibres, *in vivo* tibialis contractile properties were measured one year after GR ablation (Figure 1G). As expected, muscle mass (Supplemental Figure 1I) and maximal tetanic force were significantly increased in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 1G), but not fatigue resistance (Supplemental Figure 1J).

Taken together, these results demonstrate that myocytic GR controls intrinsic mass and contractile function of mixed and fast hindlimb skeletal muscles.

It has been shown that IGF-I induces muscle hypertrophy (Alzghoul et al., 2004; Musaro et al., 2001). However, eventhough gastrocnemius fiber size was enlarged in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, IGF-I transcript levels were similar in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice at 1 week and 2 months after GR ablation (Figure 2A and Supplemental Figure 2A). mTORC1 activity was enhanced in 4 month-old GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, as assessed by monitoring phosphorylation of two mTORC1 downstream targets, 4E-BP1 and S6K1

(Figure 2B). Interestingly, the transcript levels of REDD1, a protein that negatively controls mTOR phosphorylation (Ellisen, 2005), were decreased in  $GR^{(i)skm-/-}$  mice (Figure 2A). Thus, decreased REDD1 levels might lead to increased mTOR phosphorylation in  $GR^{(i)skm-/-}$  mice. Note that the activity of GSK3 $\beta$ , another target of Akt, was decreased, as it was hyperphosphorylated 2 months after GR ablation (Figure 2B).

Muscle hypertrophy could also result from reduced muscle catabolism. Since myostatin, member of the TGFβ family, is a major inhibitor of muscle hyperplasia (Amirouche et al., 2009; Zimmers et al., 2002), we determined its transcript levels. As they were similar in GR<sup>(i)skm-/-</sup> and control mice, 1 week and 2 months after GR ablation, it is unlikely that myostatin plays a role hyperplasia induced by the lack of GR in myofibers. Muscle atrophy is controlled, at least in part, by the proteolysis pathway inducer FOXO3a, whose activity is negatively regulated by Akt (Mammucari et al., 2007; Mammucari et al., 2008; Sandri et al., 2004). However, FOXO3a phosphorylation level was similar in GR<sup>(i)skm-/-</sup> and control mice, 1 week and 2 months after GR ablation (Figure 2B). Accordingly, transcript levels of genes involved in UPS (e.g. Atrogin1, Murf1), autophagy (Cathepsin L) and calpain system were similar in GR<sup>(i)skm-/-</sup> and control mice (Figure 2A and Supplemental Figure 2A).

Taken together, these results show that GR negatively controls muscle mass mainly by inhibiting activation of the anabolic mTOR pathway, leading to muscle hyperplasia in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

### Mice lacking GR in myofibers are resistant to dexamethasone-induced muscle atrophy.

To determine whether muscle atrophy induced by glucocorticoids is myofiber GR dependent, dexamethasone (dex) was administred at 10 mg/kg for 3 days to control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 week after GR ablation, a time point when muscle mass and strength were similar in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice. As previously shown (Orzechowski et al., 2002), dex administration to control mice induced spleen atrophy, and an ~20 % weight loss of gastrocnemius, tibialis and quadriceps, but not of soleus (Figure 3A and Supplemental Figure 3A). Moreover, quadriceps CSA was ~20 % lower in dex-treated than in oil-treated control mice (Figure 3B and 3C), and muscle strength decreased by ~20 % in dextreated control mice (Figure 3D). Dex also induced atrophy of the spleen, but muscle mass and strength, and quadriceps CSA were similar in vehicle and dex-treated GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 3A to 3D).

IGF-I transcript levels similarly decreased in dex-treated control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 3E). Akt is activated through an IGF-I dependent way and/or by mTORC2 on two residues, Thr308 and Ser473, respectively (Bentzinger et al., 2008; Risson et al., 2009). In contrast with GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, IGF-I- dependent phosphorylation of Akt on Thr308 was reduced in dex-treated control mice (Figure 3F). On the contrary, phosphorylation of Akt on Ser473 was increased, which is representative of increased mTORC2 activity (Figure 3F). mTORC1 activity was next assessed by monitoring phosphorylation of 4E-BP1 (Figure 3F). Decreased phosphorylation of 4E-BP1 was consistent with down-regulation of

mTOR phosphorylation. Interestingly, REDD1 levels were two-fold increased in dex-treated control but not mutant mice (Figure 3E), thus indicating that GR might decrease mTORC1 activity through REDD1 in myofibers. Note, that activity of the AKT target GSK3β was enhanced in dex-treated control, but not GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 3F), thereby contributing to reduced protein synthesis in control mice.

To further investigate the molecular pathways controlling dex-induced muscular atrophy, transcript levels of genes involved in protein degradation were analyzed by qPCR in gastrocnemius muscle. Myostatin expression, which is stimulated during muscle atrophy (Costelli et al., 2008; Ma et al., 2003; McFarlane et al., 2006; Wojcik et al., 2008), was more than 3-fold induced by dex in control mice, but not in GR<sup>(I)skm-/-</sup> mice, thus demonstrating that dex-induced myostatin expression is myofiber GR dependent (Figure 3E).

FOXO3 and GSK3β, which stimulate muscle catabolism, were activated by dephosphorylation in dex-treated control mice. In contrast, these two factors remained inactive in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 3F). Moreover, transcript levels Ubiquitin C, Atrogin1 and Murf1 were strongly induced by dex in control mice (2.5, 15 and 16 fold, respectively), but not in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice. m- but not *µ*-calpain was upregulated after dex treatment in control mice, but not in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Supplemental Figure 3B). In addition, dex increased transcript levels of autophagy-related genes ATG12, LC3, GABARAPL, Cathepsin L and BNIP3 in control mice, but not in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Note that Beclin1 levels were not affected by dex in either control or GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, indicating that Beclin1 induction is not required for dexamethasone-induced lysosomal activation. These results show that UPS and autophagy, but not calpain system transcriptional activation is myofiber GR dependent.

Taken together, these results show that dexamethasone-induced activation of proteolysis in skeletal muscle fibers is prevented in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

## Mice lacking GR in myofibers are partially resistant to starvation-induced muscle atrophy.

To characterize the cell-autonomous functions of GR in myofibers atrophy induced by physiological conditions, control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice were subjected to starvation, which is known to enhance muscle catabolic pathways (Lecker et al., 2004).

After 72h starvation, body weight and epididymal fat mass decreased by 27 and 50 %, respectively, both control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 4A and Supplemental Figure 4A). In starved control mice, muscle size was strongly decreased (Supplemental Figure 4B), and gastrocnemius and quadriceps muscle mass was reduced by 20 %, whereas soleus muscle mass was unaffected (Figure 4B and Supplemental Figure 4A). In addition, quadriceps CSA was decreased by 20 % in starved control mice (Figure 4C and 4D, and Supplemental Figure 4B). In contrast, after starvation of GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, gastrocnemius and quadriceps muscle mass was reduced by only 7 % and quadriceps CSA was

similar (Figure 4C and 4D, and Supplemental Figure 4B), and soleus mass was unaffected (Figure 4B and Supplemental Figure 4A).

Electron microscopy (EM) of control mice gastrocnemius revealed disruptions of myofibrils in more than 2 / 3 of the sarcomeres after starvation, with loss of myofilaments, rupture of Z lines and enlarged sarcoplasm (Supplemental Figure 4C). In contrast, less than 20 % of the sarcomers from gastrocnemius muscle of GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice showed disruptions, and damages were less pronounced (Supplemental Figure 4C). Taken together, our results show that GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice are partially protected from starvation-induced muscle atrophy.

IGF-I gastrocnemius transcript levels similarly decreased in starved control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 4E). However, activity of anabolic patway, including that of Akt (phosphorylated on Thr308), mTORC1 and 4E-BP1, was reduced in starved control mice (Figure 4F), but not in starved GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice. REDD1 transcript levels, which were 60-fold increased in starved control mice, were only 20-fold increased in starved GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 4E), suggesting that during starvation, myofiber GR negatively controls the activity of anabolic pathways, most probably through REDD1. Note that mTORC2 activity, assessed by monitoring phosphorylation of Akt on Ser473 was increased (Figure 4F).

Moreover, transcript levels of the cell growth inhibitor myostatin, which increased by 3-fold in starved control mice (Figure 4E), were unaffected in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

In starved control mice, expression levels of FOXO3 were 3-fold increased, and this factor was in its unphosphorylated active form, in contrast to starved  $GR^{(i)skm-/-}$  mice (Figure 4F and Supplemental Figure 4D). GSK3 $\beta$  also activated after starvation in control mice, but not in  $GR^{(i)skm-/-}$  mice (Figure 4F).

Ubiquitin C, Atrogin1 and Murf1 expression levels were strongly increased by starvation in control mice (4-, 32- and 28-fold, respectively). In contrast, Ubiquitin C transcript levels were not induced in starved  $GR^{(i)skm-/-}$  mice, and those of Atrogin1 and Murf1 increased only by 10 and 5 fold, respectively (Figure 4E), thus showing that UPS activation is strongly impaired in  $GR^{(i)skm-/-}$  mice. Gastrocnemius transcript levels of GABARAPL, Cathepsin L and BNIP3 were much higher in starved control mice (10-, 6-, 7- and 5-fold increase in respect to fed control mice, respectively) than in starved  $GR^{(i)skm-/-}$  mice. However, m-calpain was slightly increased in starved control mice (1.5 fold) but not in  $GR^{(i)skm-/-}$  mice, and  $\mu$ -calpain levels were similar after starvation (Figure 4E).

Taken together, these results show that starvation-induced muscle degradation is partially prevented in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

## Discussion

Although glucocorticoids are known to induce skeletal muscle atrophy, the molecular mechanisms through which they control muscle physiology remain unclear. Our results show that myofiber GR not only transduces dexamethasone and fasting-induced myofiber protein catabolism, but also exerts antianabolic effects in skeletal muscle fibers. These two main points will be discussed below.

# GR negatively controls anabolic pathways in skeletal muscle myofibers.

Our results show that GR plays a major role in skeletal muscle homeostasis at adult stage. Indeed, we have demonstrated that under basal conditions muscle mass and strength of GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice were increased at early time after GR ablation, due to muscle fiber hyperplasia. This muscle hyperplasia is likely to be IGF-I independent, as no variation in IGF-I transcript levels were detected in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Moreover, eventhough IGF-I transcript levels are negatively controlled by glucocorticoids in skeletal muscle, this regulation is myofiber GR independent. Indeed, upon dexamethasone treatment or starvation, IGF-I transcript levels similarly decreased in skeletal muscles of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Thus, glucocorticoids might negatively control IGF-I production via GR in other muscle cell types such as satellite cells, or in a GR independent fashion.

As Akt was hyperphosphorylated in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, despite no difference in IGF-I transcript levels, it will be interesting to monitor the expression and/or activity of the kinase crucial for the activation of Akt, PDK1, as well as that of the tumor suppressor PTEN, which antagonizes the PI3K (phosphoinositide 3 kinase)-Akt pathway. We also show that during myofiber protein catabolism, Akt is dephosphorylated on Thr308, but hyper-phosphorylated on Ser473. Akt dephosphorylation on Thr308 is consistent with decreased IGF-I levels following dexamethasone treatment or starvation. Hyper-phosphorylated Akt on Ser473 is a consequence of an increased mTORC2 activity. As mTORC1 activity was decreased in these stress conditions in control mice, it is likely that mTOR was preferentially contained in mTORC2 complex.

Interestingly, the transcript levels of REDD1 (see for review (Ellisen, 2005)), a stress response gene activated during hypoxia (Brugarolas et al., 2004), were decreased in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice. It has been shown that decreased REDD1 levels increased the size of Drosophila and mammalian cells (Reiling and Hafen, 2004; Sofer et al., 2005). Conversely, enhanced REDD1 levels by glucocorticoid treatment are associated with cell size decrease (Wang et al., 2006a; Wang et al., 2003b). REDD1 has been shown to negatively regulate mTORC1 activity via tuberous sclerosis complex 1 (TSC1) and 2 (TSC2) (Brugarolas et al., 2004; DeYoung et al., 2008; Ellisen, 2005). Here, we observed increased activity of mTORC1 following REDD1 downregulation in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, and, reciprocally, we found that mTORC1 activity was reduced in dexamethasone or starved control mice, but not in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice. Activation of mTORC1 stimulates mRNA translation via its downstream substrates S6K1 and 4E-BP1/eIF4E (Beretta et al., 1996; Brunn et al., 1997; Gingras et al., 1998; Holz et al., 2005). Phosphorylation of 4E-BP1 by mTOR results in its dissociation from eIF4E, promoting the assembly of

the eIF4F complex and thus protein synthesis (Gingras et al., 1998). In addition, it is thought that S6K1 phosphorylates translational regulators such as eIF4B to enhance the translational efficiency of mRNAs with highly structured 5'-UTRs (Dorrello et al., 2006; Raught et al., 2004; Shahbazian et al., 2006). Thus, by limiting REDD1 levels in myofibers, the lack of GR enhances the mTORC1 pathway to promote protein synthesis in myofibers and subsequently increased muscle mass in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice (Figure 5). It will be interesting to investigate how GR controls REDD1 expression in myofibers. The REDD1 promoter contains regulatory elements that bind the transcription factors ELK1, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP), hepatic nuclear factor-4, NF-κB, p53 and HIF-1α (Lin et al., 2005). However, no glucocorticoid response element (GRE) has been discovered yet.

GR positively transduces dexamethasone and fasting-induced catabolic pathways in skeletal muscle.

We show that under physiological conditions, the lack of GR had no obvious consequences on catabolic pathways. Indeed, no variation in FOXO3 nor GSK3 $\beta$  activity was detected, and no significant difference in expression levels of genes involved in autophagy, calpain or UPS proteolysis systems were found in myofibers of GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice. It was shown that reduction in GR levels diminishes the expression of Atrogin1 and MuRF1 in C2C12 muscular cells, suggesting a role for GR in maintaining basal levels of these ubiquitin ligases (Zhao et al., 2009). They might obtain these varition since few amounts of dexamethasone have been put in the growth medium. This might have slightly increase Atrogin1 and Murf1 levels in control cells, as GR-/- cell had not the capacity to activate such pathway, as we demonstrate.

Our results also show that ablation of GR in myofibers prevented reduction of muscle mass by dexamethasone treatment, and strongly reduced starvation effects, thus showing that the presence of the receptor is crucial to transduce atrophic signals. Glucocorticoid treatment induced muscle catabolism by enhancing atrogin-1 and MuRF1 expression, both in cell culture and *in vivo* (Bodine et al., 2001a; Clarke et al., 2007; Sacheck et al., 2004; Sandri et al., 2004; Schakman et al., 2008).

A GRE has been identified in the MuRF1 promoter region (Waddell et al., 2008), showing that GR directly controls MuRF1 expression. This is consistent with our results showing that Murf1 is not induced after dexamethasone treatment or starvation in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice. However, no GRE have ever been described on other atrophy-related genes (Lecker et al., 2004), even if glucocorticoids have been reported to enhance lysosomal autophagy by increasing levels of several factors such as Cathepsin L or LC3 (Komamura et al., 2003; Laane et al., 2009). As no variation in such genes expression was detected in dexamethasone treated or starved GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, it will be interesting to determine whether GR controls these genes at the transcriptional level. Upregulation of atrogenes after dexamethasone treatment or starvation could be indirect, as the presence of GR is essential for the activation of FOXO3a and GSK3β induction, which positively regulate UPS and autophagy pathways

(Evenson et al., 2005; Mammucari et al., 2007; Sandri et al., 2004). It will be interesting to determine how GR controls FOXO3a and GSK3 $\beta$  activity in myofibers, and whether FOXO responsive elements are present in atrogenes, as it was already shown for Atrogin1, LC3 and BNIP3 (Mammucari et al., 2007; Sandri et al., 2004).

In summary, our results highlight the complexity of glucocorticoid signaling pathway in skeletal muscles. We show that GR finely tunes muscle mass in normal conditions, and that it is an essential inducer of muscle atrophy. Previous results have shown that a 15 days treatment with GR antagonist RU486 did not increase muscle mass in rats (Pickering et al., 2003). Moreover, RU486 attenuates muscle loss in some diseases (Schakman et al., 2008), but failed in reducing cachexia (Llovera et al., 1995). This might result from incomplete inhibition of GR functions as RU486 only exert a partial antagonism (Schulz et al., 2002). It will be interesting to find direct GR target genes in skeletal muscle, as well as in other tissues to design new screens to identify modulators of GR that conserve anti-inflammatory capacities, without inducing muscle fiber proteolysis, or GR full antagonists that increase muscle mass without effect on the immune system.

## **Experimental procedures**

#### Mice

Mice were maintained in a temperature and humidity controlled animal facility, with a 12 hours light/dark cycle and free access to water and a standard rodent chow (2800 kcal/kg, Usine d'Alimentation Rationelle, Villemoisson-sur-Orge, France). Body weight was determined at the indicated ages. Animals were killed by cervical dislocation and tissues were collected, weighed, and frozen in liquid nitrogen or processed for biochemical and histological analysis.

## **Dexamethasone treatment**

Mice were treated with 10mg/kg of Dexamethasone (31381, Fluka). Dexamethasone was first ressuspended in 100% EtOH to make a 25mg/mL stock solution, and then dissolved in oil to be I.P. injected each day during three days. Experiment controls were injected with oil. Body weight and strength were determined before and after treatment.

# Starvation

Mice were maintained in a temperature and humidity controlled animal facility, with a 12 hours light/dark cycle and free access to water without chow for 72h.

## Body lean and fat content

Body lean and fat content were recorded by quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR). The analysis is performed by a Minispec analyzer (www.bruker.com).

# **Muscle strength**

*Grip strength:* a Grip Strength Meter (Bioseb) was used to measure forelimb and hindlimb grip strength. The grip strength meter was positioned horizontally, and mice were held by the tail and lowered toward the apparatus. Mice were allowed to grasp the smooth metal pull bar with both their hindlimbs and forelimbs and then were pulled in the horizontal plane. The force applied to the bar at the moment the grasp was released was recorded as the peak tension (g). The test was repeated 3 consecutive times within the same session, and the mean value was recorded as the grip strength for each mouse.

Contractile measurements: in situ isometric tibialis anterior muscle contraction in response to nerve stimulation was performed as described (Lahoute et al., 2008). Mice were anaesthetized using a pentobarbital solution (ip, 60 mg/kg) and supplemental doses were given as required to maintain deep anesthesia during experiments. Feet were fixed with clamps to a platform and knees were immobilized using stainless steel pins. The distal tendons of muscles were attached to an isometric transducer (Harvard Bioscience) using a silk ligature. The sciatic nerves were proximally crushed and distally stimulated by a bipolar silver electrode using supramaximal square wave pulses of 0.1 ms duration. All data provided by the isometric transducer were recorded and analyzed on a microcomputer, using a PowerLab system (4SP, AD Instruments). All isometric measurements were made at an initial length L0 (length at which maximal tension was obtained during the twitch). Responses to tetanic stimulation (pulse frequency from 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 143 Hz) were successively recorded. Maximal tetanic force was determined. Muscle masses (m) were measured to calculate specific force. Finally, the fatigue resistance was assessed. The fatigue protocol consists of repeated contractions (75 hz for 500 ms, evoked once every second for 100s). The time to reach half of the maximal force was then calculated (FR). After contractile measurements, mice were sacrificed with an overdose of anesthetic solution.

## Histology and histochemistry

Muscles were quickly frozen in dry ice-cooled isopentane. For H&E staining, 10-µm cryosections were stained with Harris hematoxylin (VWR International S.A.S.), washed in running tap water, decolorized in acid alcohol for 2 s, stained in eosin (VWR International S.A.S.), washed in running tap water, dehydrated, cleared, and mounted. For muscle fiber CSA, all surface fibers of a muscle section were determined using MetaMorph software (Molecular Devices).
#### **Electron Microscopy**

Skeletal muscle samples were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), washed in cacodylate buffer for 30 min, and kept at 4 °C. Postfixation was performed with1%osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer for 1 h at 4 °C, and dehydration was performed with graded alcohol (50, 70, 90, and 100%) and propylene oxide for 30 min each. Samples were oriented longitudinally and embedded in Epon 812 (Sigma Chimie). Ultrathin sections were cut at 70 nm, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined at 70 kV.

#### **RNA** preparation and analysis

RNA was isolated using TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). 5 µg of RNA were converted to cDNA with SuperScript<sup>™</sup> II reverse transcriptase (Invitrogen<sup>™</sup> life technologies) and dT24 primers according to the supplier's protocol. Quantitative RT-PCR was performed by using the QuantiTectTM SYBR® Green PCR kit (Roche) according to the supplier's protocol. HPRT was used as an internal control. Primer sequences are available in Table 1.

#### Protein preparation and analysis

Proteins were isolated using a RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 1 % Nonident p40, 0.5 % Sodium Deoxycholate, 0.1 % SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF and containing a cocktail of protease inhibitors (45 µg/mL). Homogenates (100 µg of protein) were electrophoresed in 6 % to 12 % Bis-acrylamid gels. Proteins were electroblotted to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences), and proteins of interest were immunodetected using primary antibodies for antibodies directed against GR (M20, Santa Cruz, 1/500), GAPDH (abCam, 1/10000), phospho-mTOR (Ser2448, Cell Signaling, 1/1000), phospho-S6K1 (Thr389, Cell Signaling, 1/500), phospho-4E-BP1 (Thr37/46, Cell Signaling, 1/1500), phospho-FOXO3a (Ser318/321, Cell Signaling, 1/1000), phospho-Akt (Ser473, Cell Signaling, 1/1000), phospho-Akt (Thr308, Cell Signaling, 1/1000), phospho-GSK3 $\beta$  (Ser9, 5B3, Cell Signaling, 1/1500), mTOR (Cell Signaling, 1/500), p70 S6 Kinase (BD Transduction Laboratories, 1/500), 4E-BP1 (53H11, Cell Signaling, 1/1500), FOXO3a (Cell Signaling, 1/1000), Akt1 (2H10, 1/500), GSK3 $\beta$  (BD Transduction Laboratories, 1/1000). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Amersham Biosciences) were detected using enhanced an chemiluminescence detection system (Pierce, Rockford, IL, 1/10000).

#### Data analysis

Differences analyzed by a two-tailed Student's t test were considered statistically significant at p < 0.05 and are indicated by an asterisk (\*) in figures.

#### References

- Alzghoul, M.B., Gerrard, D., Watkins, B.A. and Hannon, K. (2004) Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo. *Faseb J*, **18**, 221-223.
- Amirouche, A., Durieux, A.C., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Mouret, C., Bigard, X., Peinnequin, A. and Freyssenet, D. (2009) Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology*, **150**, 286-294.
- Bentzinger, C.F., Romanino, K., Cloetta, D., Lin, S., Mascarenhas, J.B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C.F., Brink, M., Zorzato, F., Hall, M.N. and Ruegg, M.A. (2008) Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab*, 8, 411-424.
- Beretta, L., Gingras, A.C., Svitkin, Y.V., Hall, M.N. and Sonenberg, N. (1996) Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *Embo J*, **15**, 658-664.
- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z.Q., Valenzuela, D.M., DeChiara, T.M., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, **294**, 1704-1708.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W. and Kaelin, W.G., Jr. (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*, **18**, 2893-2904.
- Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulic, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C., Jr. and Abraham, R.T. (1997) Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*, **277**, 99-101.
- Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., Rakhilin, S.V., Stitt, T.N., Patterson, C., Latres, E. and Glass, D.J. (2007) The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*, **6**, 376-385.
- Costelli, P., Muscaritoli, M., Bonetto, A., Penna, F., Reffo, P., Bossola, M., Bonelli, G., Doglietto, G.B., Baccino, F.M. and Rossi Fanelli, F. (2008) Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest*, **38**, 531-538.
- DeYoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D. and Ellisen, L.W. (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*, **22**, 239-251.
- Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E. and Pagano, M. (2006) S6K1and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, **314**, 467-471.
- Ellisen, L.W. (2005) Growth control under stress: mTOR regulation through the REDD1-TSC pathway. *Cell Cycle*, **4**, 1500-1502.
- Evenson, A.R., Fareed, M.U., Menconi, M.J., Mitchell, J.C. and Hasselgren, P.O. (2005) GSK-3beta inhibitors reduce protein degradation in muscles from septic rats and in dexamethasone-treated myotubes. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 2226-2238.
- Gilson, H., Schakman, O., Combaret, L., Lause, P., Grobet, L., Attaix, D., Ketelslegers, J.M. and Thissen, J.P. (2007) Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology*, **148**, 452-460.
- Gingras, A.C., Kennedy, S.G., O'Leary, M.A., Sonenberg, N. and Hay, N. (1998) 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev*, **12**, 502-513.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. (2003) The calpain system. Physiol Rev, 83, 731-801.
- Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A. and Goldberg, A.L. (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14440-14445.
- Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Logue, S.E., Sayen, M.R., Jinno, M., Kirshenbaum, L.A., Gottlieb, R.A. and Gustafsson, A.B. (2007) Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ*, **14**, 146-157.

- Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P. and Blenis, J. (2005) mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, **123**, 569-580.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A. and Hall, M.N. (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, **6**, 1122-1128.
- Jefferson, L.S., Fabian, J.R. and Kimball, S.R. (1999) Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulinregulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 191-200.
- Komamura, K., Shirotani-Ikejima, H., Tatsumi, R., Tsujita-Kuroda, Y., Kitakaze, M., Miyatake, K., Sunagawa, K. and Miyata, T. (2003) Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoidinduced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovasc Drugs Ther*, **17**, 303-310.
- Laane, E., Tamm, K.P., Buentke, E., Ito, K., Kharaziha, P., Oscarsson, J., Corcoran, M., Bjorklund, A.C., Hultenby, K., Lundin, J., Heyman, M., Soderhall, S., Mazur, J., Porwit, A., Pandolfi, P.P., Zhivotovsky, B., Panaretakis, T. and Grander, D. (2009) Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ*, **16**, 1018-1029.
- Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D. and Daegelen, D. (2008) Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS One*, **3**, e3910.
- Latres, E., Amini, A.R., Amini, A.A., Griffiths, J., Martin, F.J., Wei, Y., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (2005) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem*, **280**, 2737-2744.
- Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S.R., Mitch, W.E. and Goldberg, A.L. (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J*, **18**, 39-51.
- Lee, S.W., Dai, G., Hu, Z., Wang, X., Du, J. and Mitch, W.E. (2004) Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. J Am Soc Nephrol, 15, 1537-1545.
- Lin, L., Stringfield, T.M., Shi, X. and Chen, Y. (2005b) Arsenite induces a cell stress-response gene, RTP801, through reactive oxygen species and transcription factors Elk-1 and CCAAT/enhancer-binding protein. *Biochem J*, **392**, 93-102.
- Llovera, M., Garcia-Martinez, C., Agell, N., Lopez-Soriano, F.J. and Argiles, J.M. (1995) Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Cancer*, **61**, 138-141.
- Ma, K., Mallidis, C., Bhasin, S., Mahabadi, V., Artaza, J., Gonzalez-Cadavid, N., Arias, J. and Salehian, B. (2003) Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. Am J Physiol Endocrinol Metab, 285, E363-371.
- Ma, X.M. and Blenis, J. (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 307-318.
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A.L., Schiaffino, S. and Sandri, M. (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*, 6, 458-471.
- Mammucari, C., Schiaffino, S. and Sandri, M. (2008) Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy*, **4**, 524-526.
- McFarlane, C., Plummer, E., Thomas, M., Hennebry, A., Ashby, M., Ling, N., Smith, H., Sharma, M. and Kambadur, R. (2006) Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*, **209**, 501-514.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*, **15**, 1101-1111.
- Musaro, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L. and Rosenthal, N. (2001) Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*, **27**, 195-200.
- Newton, R. (2000) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? Thorax, 55, 603-613.

- Orzechowski, A., Ostaszewski, P., Wilczak, J., Jank, M., Balasinska, B., Wareski, P. and Fuller, J., Jr. (2002) Rats with a glucocorticoid-induced catabolic state show symptoms of oxidative stress and spleen atrophy: the effects of age and recovery. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, **49**, 256-263.
- Pickering, W.P., Baker, F.E., Brown, J., Butler, H.L., Govindji, S., Parsons, J.M., Pawluczyk, I.Z., Walls, J. and Bevington, A. (2003) Glucocorticoid antagonist RU38486 fails to block acid-induced muscle wasting in vivo or in vitro. *Nephrol Dial Transplant*, **18**, 1475-1484.
- Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L., Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N. and Hershey, J.W. (2004) Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *Embo J*, 23, 1761-1769.
- Reiling, J.H. and Hafen, E. (2004) The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by downregulating S6K activity upstream of TSC in Drosophila. *Genes Dev*, **18**, 2879-2892.
- Rhen, T. and Cidlowski, J.A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, **353**, 1711-1723.
- Risson, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., Corneloup, C., Richard-Bulteau, H., Vignaud, A., Baas, D., Defour, A., Freyssenet, D., Tanti, J.F., Le-Marchand-Brustel, Y., Ferrier, B., Conjard-Duplany, A., Romanino, K., Bauche, S., Hantai, D., Mueller, M., Kozma, S.C., Thomas, G., Ruegg, M.A., Ferry, A., Pende, M., Bigard, X., Koulmann, N., Schaeffer, L. and Gangloff, Y.G. (2009) Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *J Cell Biol*, **187**, 859-874.
- Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol*, **3**, 1009-1013.
- Sacheck, J.M., Ohtsuka, A., McLary, S.C. and Goldberg, A.L. (2004) IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. Am J Physiol Endocrinol Metab, 287, E591-601.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H. and Goldberg, A.L. (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, **117**, 399-412.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D.M. (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, **14**, 1296-1302.
- Schakman, O., Gilson, H. and Thissen, J.P. (2008) Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol*, **197**, 1-10.
- Schulz, M., Eggert, M., Baniahmad, A., Dostert, A., Heinzel, T. and Renkawitz, R. (2002) RU486-induced glucocorticoid receptor agonism is controlled by the receptor N terminus and by corepressor binding. J Biol Chem, 277, 26238-26243.
- Shahbazian, D., Roux, P.P., Mieulet, V., Cohen, M.S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J.W., Blenis, J., Pende, M. and Sonenberg, N. (2006) The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *Embo J*, 25, 2781-2791.
- Smith, I.J. and Dodd, S.L. (2007) Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle. *Exp Physiol*, **92**, 561-573.
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C.M. and Ellisen, L.W. (2005) Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol*, **25**, 5834-5845.
- Stitt, T.N., Drujan, D., Clarke, B.A., Panaro, F., Timofeyva, Y., Kline, W.O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (2004) The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, **14**, 395-403.
- Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2503-2518.
- Tracy, K., Dibling, B.C., Spike, B.T., Knabb, J.R., Schumacker, P. and Macleod, K.F. (2007) BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol*, **27**, 6229-6242.
- Waddell, D.S., Baehr, L.M., van den Brandt, J., Johnsen, S.A., Reichardt, H.M., Furlow, J.D. and Bodine, S.C. (2008) The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophyassociated MuRF1 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **295**, E785-797.
- Wang, H., Kubica, N., Ellisen, L.W., Jefferson, L.S. and Kimball, S.R. (2006) Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J Biol Chem*, **281**, 39128-39134.

- Wang, Z., Malone, M.H., Thomenius, M.J., Zhong, F., Xu, F. and Distelhorst, C.W. (2003) Dexamethasoneinduced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. J Biol Chem, 278, 27053-27058.
- Wojcik, S., Nogalska, A., Engel, W.K. and Askanas, V. (2008) Myostatin and its precursor protein are increased in the skeletal muscle of patients with Type-II muscle fibre atrophy. *Folia Morphol (Warsz)*, **67**, 6-12.

Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. Cell, 124, 471-484.

- Zhao, W., Qin, W., Pan, J., Wu, Y., Bauman, W.A. and Cardozo, C. (2009) Dependence of dexamethasoneinduced Akt/FOXO1 signaling, upregulation of MAFbx, and protein catabolism upon the glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **378**, 668-672.
- Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M. and Lee, S.J. (2002) Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*, **296**, 1486-1488.

#### **Figures legend**

#### Figure 1: Increased muscle mass and strength in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

A: Body weight in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular diet.

B: Quadriceps (Q), gastrocnemius (G), tibialis (T), EDL and soleus (S) muscle mass in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 2 months after GR ablation.

C: Histological analysis by hematoxylin and eosin staining of quadriceps muscle of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 week and 2 months after GR ablation; scale bar: 100 µm.

D: Distribution of quadriceps muscles fibers CSA of from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 2 months after GR ablation.

E: Mean quadriceps fibers CSA in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 2 months after GR ablation.

F: Grip strength in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 week, 2 months and 1 year after GR ablation.

G: *In vivo* absolute maximal isometric tetanic force in tibialis anterior muscle from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 year after GR ablation.

A-C and F: n = 10; D and E: n = 4; G: n = 7.

#### Figure 2: Characterization of molecular pathways in gastrocnemius of GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

A: Relative transcript levels of IGF-I, REDD1, Myostatin, Atrogin1, Murf1 and Cathepsin L in gastrocnemius muscle of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 week and 2 months after GR ablation.

B: Western blot analysis of phospho-Akt, Akt, phospho-mTOR, mTOR, phospho-FOXO3a, FOXO3a, phopho-GSK3β, GSK3β, phospho-p70S6K1, p70S6K1, phospho-4E-BP1 and 4E-BP1 protein levels in quadriceps muscle from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 week and 2 months after GR ablation. GAPDH is used as an internal control.

A: n = 10; B: n = 4.

#### Figure 3: GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice are resistant to dexamethasone-induced muscle atrophy.

A: Spleen, quadriceps (Quadri), gastrocnemius (Gastro), tibialis and soleus muscle weight of oil and dexamethasone treated control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

B: Distribution of quadriceps fibers CSA from oil or dexamethasone treated control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

C: Mean quadriceps fibers CSA from oil or dexamethasone treated control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

D: Maximal grip strength of oil or dexamethasone treated control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

E: Relative transcript levels of IGF-I, REDD1, Ubiquitin C, Atrogin1, Murf1, LC3, Cathepsin L and Myostatin in gastrocnemius muscle of oil or dexamethasone treated control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

F: Western blot analysis of phospho-Akt(Ser473), phospho-Akt(Thr308), Akt, phospho-mTOR, mTOR, phospho-4E-BP1, 4E-BP1, phospho-FOXO3a, FOXO3a, phopho-GSK3β and GSK3β protein levels on quadriceps muscle from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice treated either with oil or dexamethasone. GAPDH is used as an internal control.

A, D and E: n = 10; B, C and F: n = 4.

#### Figure 4: GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice are partially resistant to fasting-induced muscle atrophy.

A: Body weight of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular diet or 72h starved.

B: Quadriceps (Quadri), gastrocnemius (Gastro) and soleus muscles weight of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular diet or 72h starved.

C: Distribution of quadriceps fibers CSA of muscle from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular diet or 72h starved.

D: Mean quadriceps fibers CSA from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular diet or 72h starved.

E: Relative transcript levels of IGF-I, REDD1, Myostatin, Ubiquitin C, Atrogin1, Murf1, LC3 and Cathepsin L in gastrocnemius muscle of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular diet or 72h starved.

F: Western blot analysis of phospho-Akt(Ser473), phospho-Akt(Thr308), Akt, phospho-mTOR, mTOR, phospho-4E-BP1, 4E-BP1, phospho-FOXO3a, FOXO3a, phopho-GSK3β and GSK3β protein levels in quadriceps muscle from GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular diet or 72h starved. GAPDH is used as an internal control.

A, D and E: n = 10; B, C and F: n = 4.

## Figure 5: Scheme illustrating the major pathways that modulating fiber size under glucocorticoid control.

A: Role of GR in normal conditions. Activation and repression mechanisms are represented by green and red arrows, respectively, transcriptional activation and repression control by dotted green and red arrows, respectively. The potential role of GR on anabolic pathway is represented in blue. Blue cross indicates that, contrary to what was shown, GR does not control IGF-I production in myocytes.

B: Role of GR in high stress conditions. Activation and repression mechanisms are represented by green and red arrows, respectively, transcriptional activation and repression control by dotted green and red arrows, respectively. The potential role of GR on anabolic and catabolic pathways is represented in blue. Blue cross indicates that, contrary to what was shown, GR does not control IGF-I production in myocytes.









Figure 5



Supplemental information.

#### Supplemental Results.

Generation of GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice in which GR is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood.

GR<sup>L2/L2</sup> mice, in which GR exons 3 and 4 encoding the DNA binding domain is flanked with 2 LoxP sites, were generated at ICS facility. Homologue recombination between the two LoxP sites induces a frame shift in GR sequence. To selectively ablate GR in skeletal muscle myofibers of adult mice, GR<sup>L2/L2</sup> mice were bred with HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup> mice that express the Cre-ER<sup>T2</sup> recombinase selectively in skeletal muscle myofibers (Supplemental Figure 5A; Schüler et al., 2005). Seven week-old HSA-Cre-ER<sup>T2(0/0)</sup>/GR<sup>L2/L2</sup> mice and HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/GR<sup>L2/L2</sup> somatic pre-mutant mice were intraperitoneally injected with tamoxifen (tam) to generate control (CT) and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mutant mice, respectively. As expected, one week after GR ablation, GR L2 alleles were selectively converted in L-alleles in various skeletal muscles of GR<sup>(i)skm-/-</sup> mutant mice (Supplemental Figure 5B), and GR mRNA and protein levels were strongly reduced in their skeletal muscles (Supplemental Figure 5C and 5D, and data not shown).

#### Supplemental Figures.

#### **Supplemental Figure 1**

A: Dexa scan analysis of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 2 months after GR ablation.

B: Dexa scan muscle to body weight ratio of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 2 months after GR ablation.

C: Quadriceps (Quad), gastrocnemius (Gastro), tibialis, EDL and soleus muscles, as well as white adipose tissue (WAT) mass in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 week after GR ablation.

D: Quadriceps (Quad), gastrocnemius (Gastro), tibialis, EDL and soleus muscles, as well as white adipose tissue (WAT) mass in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 year after GR ablation.

E: Histological analysis by hematoxylin and eosin staining of soleus muscle of control and mutant mice, 1 week and 2 months after GR ablation; scale bar: 100  $\mu$ m.

F: Distribution of muscles fibers CSA of soleus muscle from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 2 months after GR ablation.

G: Mean fibers CSA of soleus muscle from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 2 months after GR ablation.

H: Mean of total number of muscle fibers of soleus and quadriceps muscles from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 2 months after GR ablation.

I: Tibialis anterior muscle mass from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 year after GR ablation.

J: *In vivo* fatigue resistance of tibialis anterior muscle from control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 year after GR ablation.

A-E: n = 10; F-H: n = 4; I and J: n = 7.

**Supplemental Figure 2:** Relative transcript levels of mTOR, FOXO3, ubiquitin C, ATG3, ATG5, ATG12, GABARAPL, beclin1, LC3, BNIP3, m-calpain and  $\mu$ -calpain in gastrocnemius muscle of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 week and 2 months GR ablation. n = 10.

**Supplemental Figure 3:** Relative transcript levels of FOXO3, ATG3, ATG5, ATG12, GABARAPL, Beclin1, BNIP3, m-calpain and  $\mu$ -calpain in gastrocnemius muscle of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, either treated with oil or dexamethasone. n = 10.

#### **Supplemental Figure 4**

A: WAT weight of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice fed a regular diet or 72h starved.

B: Gross morphology of hindlimb muscles and histological analysis of quadriceps muscle of control and  $GR^{(i)skm-/-}$  mice fed a regular diet or 72h starved by hematoxylin and eosin staining; scale bar: 100  $\mu$ m.

C: Ultrastructure of quadriceps muscle from 9 week-old control and GR<sup>(I)skm-/-</sup> mice fed a regular diet or 72h starved. Black arrows indicate Z line disruptions; white arrows indicate loss of myofilaments; S: sarcoplasm. Z, Z line; A, A band; I, I band; H. H band; M, M line; Mt, mitochondria; Tt, T-tubules.

D: Relative transcript levels of FOXO3, GABARAPL, BNIP3,  $\mu$ -calpain and m-calpain in gastrocnemius muscle of fed or 72h starved control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

A and D: n = 10; B and C: n = 4.

## Supplemental Figure 5: Characterization of Tam-induced Cre-ER<sup>T2</sup>-mediated GR ablation in GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice.

A: Schematic representation of the HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> transgene and of the wild type GR (WT allele, upper panel), floxed GR L2 (middle panel) and the Cre-mediated encoding DBD exons deleted GR L- (lower panel) alleles. Primers used to characterize the various alleles are materialized with arrows (1 and 2 for the L2 allele, 1 and 3 for L- allele). LoxP sites are shown by arrowheads.

B: Detection of the GR L- alleles in control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice by PCR (T: tail, W: white adipose tissue, G: gastrocnemius, Ti: tibialis, Q: quadriceps, S: soleus), 1 week after GR ablation. Myogenin is used as an internal control (IC) for DNA loading.

C: Analysis of relative GR transcript levels of control and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice on gastrocnemius (Gastro), quadriceps (Quadri), tibialis and soleus muscles, 1 week after GR ablation.

D: Western blot analysis of GR protein levels in quadriceps muscle of control (CT) and GR<sup>(i)skm-/-</sup> mice, 1 week and 1 year after GR ablation. GAPDH is used as an internal control.

B and D: n = 4. C: n = 10;

#### **Supplemental Figure 1**







Supplemental Figure 4



**Supplemental Figure 5** 



#### III. Le récepteur des androgènes dans les myocytes contrôle la force mais pas la masse des muscles des membres postérieurs.

Les effets anaboliques des androgènes sur les muscles squelettiques sont principalement relayés par le récepteur des androgènes (AR), un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires. Cependant, malgré de nombreuses études réalisées chez l'homme et le rongeur, ces effets demeurent mal compris. Afin de caractériser la voie de signalisation des androgènes dans les muscles squelettiques, nous avons généré des souris dans lesquelles AR est sélectivement invalidé dans les myofibres. Nous montrons que AR dans les myocytes contrôle l'expression induite par les androgènes de l'insulin-like growth factor (IGF-IEa) dans les muscles du périnée qui sont très sensibles aux androgènes, et qu'il relaye dans ces muscles l'hypertrophie post-natale stimulée par les androgènes. A l'inverse, l'hypertrophie post-natale dépendante des androgènes des muscles des membres postérieurs est indépendante de AR dans les myocytes. Ainsi, les androgènes contrôlent la masse des muscles des membres et du périnée chez la souris mâle via des voies de signalisation dépendantes et indépendantes de AR dans les myocytes, respectivement. De manière importante, nous montrons également que l'ablation de AR dans les myocytes des membres empêche l'organisation correcte des myofibrilles des sarcomères et diminue la force musculaire, démontrant ainsi que AR dans les myocytes contrôle des voies de signalisation clés, requises pour une production de force maximale. Ces voies distinctes dans la signalisation des androgènes dans les muscles des membres et du périnée devraient permettre de designer des cribles afin d'identifier des modulateurs androgéniques sélectifs de la force musculaire.

AS PNAS

# Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles

Céline Chambon<sup>a</sup>, Delphine Duteil<sup>a</sup>, Alban Vignaud<sup>b,c</sup>, Arnaud Ferry<sup>b,c</sup>, Nadia Messaddeq<sup>a</sup>, Rocco Malivindi<sup>a,d</sup>, Shigeaki Kato<sup>e</sup>, Pierre Chambon<sup>a,1</sup>, and Daniel Metzger<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964, Université de Strasbourg, Collège de France, 67404 Illkirch, France; <sup>b</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U974, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7215, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, 75013 Paris, France; <sup>c</sup>Université Paris Descartes, 75006 Paris, France; <sup>d</sup>Department of Pharmaco-Biology, University of Calabria, 87030 Arcavacata di Rende, Italy; and <sup>e</sup>Institut of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 113-0032 Tokyo, Japan

Contributed by Pierre Chambon, July 2, 2010 (sent for review January 29, 2010)

The anabolic effects of androgens on skeletal muscles are thought to be mediated predominantly through the androgen receptor (AR), a member of the ligand-dependent nuclear receptor superfamily. However, despite numerous studies performed in men and in rodents, these effects remain poorly understood. To characterize androgen signaling in skeletal muscles, we generated mice in which the AR is selectively ablated in myofibers. We show that myocytic AR controls androgen-induced insulin-like growth factor IEa (IGF-IEa) expression in the highly androgen-sensitive perineal muscles and that it mediates and rogen-stimulated postnatal hypertrophy of these muscles. In contrast, androgen-dependent postnatal hypertrophy of limb muscle fibers is independent of myocytic AR. Thus, androgens control perineal and limb muscle mass in male mice through myocytic AR-dependent and -independent pathways, respectively. Importantly, we also show that AR deficiency in limb myocytes impairs myofibrillar organization of sarcomeres and decreases muscle strength, thus demonstrating that myocytic AR controls key pathways required for maximum force production. These distinct androgen signaling pathways in perineal and limb muscles may allow the design of screens to identify selective androgen modulators of muscle strength.

androgens | insulin-like growth factor | perineal muscles | sarcopenia | mouse

Loss of muscle mass and function is a feature of various dis-Leases (e.g., neuromuscular disorders, cancer, sepsis, and AIDS), immobilization following acute injuries, and aging that greatly impairs the quality of life for affected patients. Clinical studies indicate that testosterone replacement in young and old hypogonadal men (1–9), as well as in men with sarcopenia associated with chronic illness (10, 11), increases skeletal muscle mass and strength. However, other clinical studies indicate that androgens stimulate muscle mass but not strength (12–14). Moreover, despite the use of androgenic steroids by athletes, the effects of these agents on athletic performance and physical functions remain poorly characterized (15).

In rodents, perineal skeletal muscles [bulbocavernosus (BC) and levator ani (LA), collectively BC/LA] are highly androgen sensitive (16). Indeed, postnatal gonadal testosterone production in males increases BC/LA muscle fiber number and muscle fiber hypertrophy at puberty (17, 18). At adulthood BC/LA fiber size decreases markedly after castration and increases with androgen treatment (19-22), but fiber number remains unchanged (23). In contrast, androgen effects on limb muscle mass and function in animal models remain controversial. Indeed, studies in mice indicate that androgen withdrawal by castration reduces fast-twitch hindlimb muscle mass and maximum force production (24, 25), whereas testosterone administration to orchidectomized male mice prevents hindlimb skeletal muscle atrophy and enhances fatigue resistance of soleus muscle (26). However, it also was reported that administration of the testosterone derivative stanozolol to mice does not increase muscle mass, force, or resistance to fatigue (27).

Androgens mediate their effects predominantly through the androgen receptor (AR), a member of the ligand-dependent nuclear receptor superfamily (28). Two natural steroids, testosterone and dihydrotestosterone, bind and activate AR to regulate target gene expression. Because AR is expressed in various cell types of skeletal muscle in mammals (e.g., fibroblasts, satellite cells, and myofibers) (29–31), as well as in motoneurons (31), all these cells are potential sites of androgen action. In addition, androgens might act through poorly characterized nongenomic pathways (32) or after aromatization by activation of estrogen receptors (33).

To characterize androgen signaling in skeletal muscle and to identify cellular target(s) through which androgens exert their effects, we generated and analyzed mice in which AR is ablated selectively and efficiently in myofibers. We show that myocytic AR transduces androgen-dependent postnatal fiber hypertrophy in perineal but not in limb skeletal muscles. In addition, we demonstrate that myocytic AR is essential to generate maximum force of fast- and intermediary-twitch leg muscles by controlling myofibrillar organization of androgen-induced hypertrophic myofibers.

#### Results

Generation of Mice Lacking AR Selectively in Postmitotic Skeletal Muscle Myocytes. To investigate androgen signaling in skeletal muscle, we established mice in which the AR is ablated selectively in skeletal muscle myofibers. To this end,  $AR^{L2/y}$  mice bearing floxed AR L2 alleles (in which LoxP sites flank chromosome X exon 1 encoding the AR N-terminal domain) (34) were bred with HSA-Cre mice that express Cre recombinase in skeletal muscle myofibers (35–37) to produce HSA-Cre/AR<sup>L2/y</sup> somatic mutant male mice (hereafter called  $AR^{skm-/y}$ ) as well as  $AR^{L2/y}$  control littermates.

AR transcript levels were decreased selectively in skeletal muscles of 6-wk-old AR<sup>skm-/y</sup> mice (Fig. S14). At age 15 wk, AR transcript levels were more than 5-fold lower in the fast-twitch [e.g., extensor digitorum longus (EDL) and quadriceps], mixed (e.g., gastrocnemius, tibialis), and slow-twitch (e.g., soleus) hindlimb skeletal muscles and were 3-fold lower in the BC/LA in AR<sup>skm-/y</sup> mice than in AR<sup>L2/y</sup> mice (Fig. S1*B*). Moreover, AR protein levels were strongly decreased in skeletal muscles of AR<sup>skm-/y</sup> mice (Fig. S1*C*). The low levels remaining probably were present in skeletal muscle fibroblasts and/or satellite cells where AR was not ablated.

Author contributions: C.C., A.F., P.C., and D.M. designed research; C.C., D.D., A.V., A.F., N.M., R.M., and D.M. performed research; S.K. contributed new reagents/analytic tools; C.C., D.D., A.F., P.C., and D.M. analyzed data; and C.C., P.C., and D.M. wrote the paper. The authors declare no conflict of interest.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: chambon@igbmc.fr or metzger@igbmc.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10. 1073/pnas.1009536107/-/DCSupplemental.

Perineal Myocytic AR Mediates Androgen-Dependent Postnatal Fiber Hypertrophy of BC/LA. Because the postnatal development of the BC/LA muscles and their maintenance in adulthood are highly androgen dependent (16), we first analyzed the effect of AR ablation in myocytes of these muscles. At 6 wk of age, the mass of the BC/LA was 2-fold lower in AR<sup>skm-/y</sup> mice than in AR<sup>L2/y</sup> mice (Fig. 1*A*), indicating a growth defect. Moreover, whereas the mass of BC/LA increased by 2-fold in AR<sup>L2/y</sup> between 6 and 13 wk of age, it was almost unchanged in AR<sup>skm-/y</sup> mice during this time period (Fig. 1*A*). At age 13 wk, the size of BC/LA was strongly reduced in AR<sup>skm-/y</sup> mice (Fig. 1*B*, *Upper*), and histological analyses showed that BC muscle fibers were smaller in AR<sup>skm-/y</sup> mice than in AR<sup>L2/y</sup> mice (Fig. 1*B*, *Lower*). The distribution of crosssectional areas (CSA) of BC fibers in AR<sup>L2/y</sup> mice it was shifted to around 1,000–1,500 µm<sup>2</sup>, whereas in AR<sup>skm-/y</sup> mice (Fig. 1*C*). Collectively these results show that myocytic AR controls hypertrophy of perineal muscle fiber during postnatal development.

To demonstrate that myocytic AR also controls the maintenance of BC/LA muscle fiber size, we generated mice in which AR was selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood. To this end, AR<sup>1,2/L2</sup> female mice were bred with HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> transgenic mice that express the tamoxifen-dependent Cre-ER<sup>T2</sup> recombinase selectively in postmitotic skeletal muscle myocytes (38). I.p. injection of tamoxifen in 7-wk-old HSA-Cre-ER<sup>T2</sup>/ AR<sup>L2/y</sup> male mice induced efficient ablation of AR in their skeletal muscles (Fig. S3), thus generating AR<sup>(i)skm-/y</sup> mice. Similarly treated AR<sup>1,2/y</sup> male littermates were used as controls. One week after the first tamoxifen administration, BC/LA weight was 20% lower in AR<sup>(i)skm-/y</sup> mice than in control mice (Fig. 1*D*) and was



**Fig. 1.** Characterization of BC/LA muscles in AR<sup>skm-/y</sup> and AR<sup>(i)skm-/y</sup> mice. (A) BC/LA weight from 6- and 13-wk-old AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice (n = 7). (B) Gross morphology of BC/LA (*Upper*) and histological analysis of H&E-stained BC muscle (*Lower*) of 13-wk-old AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice. (Scale bar, 20 µm.) (C) Mean fiber CSA of BC muscle from 13-wk-old AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice. (D and E) BC/LA weight from 8-wk-old (D) and 25-wk-old (E) AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>(i)skm-/y</sup> mice (n = 7). (F) BC/LA weight from 25-wk-old AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>(i)skm-/y</sup> mice (n = 7). (G) IGF-IEa mRNA levels from 13-wk-old AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice (n = 8). In A and C–G, error bars indicate SEM; \*, P < 0.05.

reduced by 25% in 25-wk-old AR<sup>(i)skm-/y</sup> mice (Fig. 1*E*). Interestingly, BC/LA mass of AR<sup>L2/y</sup> mice 1 mo after orchidectomy was similar to that of age-matched AR<sup>skm-/y</sup> mice ( $57.6 \pm 5.1$  mg vs. 62.3  $\pm$  3.5 mg) (Fig. 1*F*), thus showing that myocytic AR transduces androgen signaling to maintain BC/LA fiber size in adulthood. Taken together, these results demonstrate that myocytic AR transduces BC/LA fiber hypertrophy during postnatal development and maintenance of muscle fiber size at adulthood.

Androgens have been shown to stimulate local production of insulin-like growth factor I (IGF-I) to increase muscle mass (39), and two IGF-I splice variants encoding the mechano growth factor (MGF) and IGF-IEa are expressed in rodent skeletal muscles (40). Because the regulation of MGF and IGF-IEa by androgens and their contribution to muscle hypertrophy were unknown, we compared their transcript levels in AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice. Transcript levels of MGF were similar in BC/LA muscles of 13-wk-old control and mutant mice (Fig. S4.4); IGF-IEa transcript levels were 2-fold lower in AR<sup>skm-/y</sup> mice than in AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice (Fig. IG), but plasma IGF-I levels were similar in AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice (Fig. S4.B). These data demonstrate that myocytic AR transduces the anabolic effects of androgens on BC/LA muscles and indicate that these effects are mediated, at least in part, by local IGF-IEa production.

Lack of AR in Skeletal Muscle Myofibers Does Not Affect Limb Muscle Mass But Impairs Strength of Fast- and Intermediary-Twitch Muscles. Weight gain was similar in AR<sup>skm-/y</sup> and AR<sup>L2/y</sup> mice over the course of more than 1 y (Fig. S5*A*), and the mass of various hindlimb skeletal muscles (EDL, quadriceps, gastrocnemius, tibialis, and soleus) was similar in AR<sup>skm-/y</sup> and AR<sup>L2/y</sup> mice at 6, 13, and 40 wk of age (Table 1 and Fig. 2*A*). Gastrocnemius and soleus muscles of AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice had a similar gross morphology, and their histological analyses did not reveal any differences (Fig. 2*B*). Gastrocnemius, tibialis, and soleus fiber distribution, as well as their mean CSA, were similar in AR<sup>skm-/y</sup> and AR<sup>L2/y</sup> mice (Fig. 2*C* and Fig. S2 *B*–*F*). Moreover, selective ablation of AR in skeletal muscle myofibers of adult mice did not affect limb muscle mass (Fig. 2*D*). Taken together, these results demonstrate that myocytic AR is dispensable for postnatal leg muscle growth and maintenance of leg muscle mass in adulthood.

Because the mass of fast-twitch skeletal muscles is reduced when androgen levels are low (26), as well as in AR-null mice (41), we determined the effect of androgen deficiency in mice lacking AR selectively in skeletal muscles. One month after orchidectomy of 5-mo-old mice, the mass of fast-twitch (EDL and quadriceps) and intermediary-twitch (gastrocnemius and tibialis) skeletal muscles was similarly decreased in  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm\slash y}$  mice (Table S1 and Fig. 2E), and in both cases mean fiber CSA of gastrocnemius muscle was 20% lower than in sham-operated mice (Fig. 2F). Thus, androgen depletion leads to atrophy of fast- and intermediary-twitch muscle, irrespective of the presence of AR in myocytes. IGF-IEa transcript levels were decreased by 2-fold in gastrocnemius of AR<sup>L2/y</sup> after orchidectomy, indicating that decreased muscle fiber size might be a consequence of reduced IGF-IEa levels (Fig. 2G). Because a similar decrease in IGF-IEa transcript levels was observed in the gastrocnemius of orchidectomized AR<sup>skm-/y</sup> mice, myocytic AR does not control IGF-IEa transcript levels in limb skeletal muscles (Fig. 2G). Note that MGF transcript levels were similar in the gastrocnemius of shamoperated and orchidectomized mice of each genotype (Fig. S6). In contrast, soleus muscle mass was not affected by orchidectomy in either AR<sup>L2/y</sup> or AR<sup>skm-/y</sup> mice (Table S1). Taken together, these results show that androgens control fast- and intermediary-twitch hindlimb muscle mass through myocytic AR-independent pathways, most probably via local IGF-IEa production.

To determine whether myocytic AR controls leg skeletal muscle strength, we subjected  $AR^{1.2/y}$  and  $AR^{skm-/y}$  mice to grip tests at various ages (Fig. 3*A*). Between 6 and 8 wk, maximal grip

Chambon et al.

NAS PNAS

	6 VVk		13 WK		40 VVK	
Muscle	AR <sup>L2/y</sup>	AR <sup>skm-/y</sup>	AR <sup>L2/y</sup>	AR <sup>skm-/y</sup>	AR <sup>L2/y</sup>	AR <sup>skm-/y</sup>
EDL	16.8 ± 1.0	16.1 ± 1.3*	15.2 ± 0.9	14.8 ± 0.6*	16.7 ± 1.5	16.1 ± 1.3*
Quadriceps	$140 \pm 3.4$	136 ± 5.9*	183.3 ± 1.2	189.9 ± 1.2*	222.6 ± 3.4	223.7 ± 7.0*
Gastrocnemius	107.6 ± 3.4	100 ± 5.9*	145.7 ± 10.0	155.8 ± 7.6*	$174 \pm 6.0$	185.0 ± 10.0*s
Tibialis	46.2 ± 4.0	41.2 ± 4.6*	62.1 ± 3.5	62.0 ± 3.1*	68.8 ± 3.3	69.3 ± 2.1*
Soleus	9.7 ± 1.5	8.1 ± 1.0*	$8.8\pm0.7$	$8.3\pm0.7^{\star}$	8.6 ± 1.4	9.0 ± 1.8*

#### Table 1. Hindlimb skeletal muscle mass (mg) of 6-, 13-, and 40-wk-old AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice

Data are expressed  $\pm$  SEM; n = 7 animals per group.

\*Not statistically different from  $AR^{L2/y}$  mice (P > 0.05).

strength increased by 15% in AR<sup>L2/y</sup> mice and increased further to reach peak level at around 6 mo of age. With increased aging, maximal grip strength decreased progressively, and at 10 mo it was similar to the prepuberty level (Fig. 3*A*). In contrast, maximal grip strength of AR<sup>skm-/y</sup> mice did not increase at puberty,

despite increased muscle mass, and remained constant over more than 14 months (Fig. 3A and Table 1). Interestingly, ablation of AR in skeletal muscle myocytes by tamoxifen treatment of HSA-Cre-ER<sup>T2</sup>/AR<sup>L2/y</sup> mice at 7 wk also resulted in decreased muscle strength (Fig. S7A). These results indicate that



**Fig. 2.** Characterization of hindlimb skeletal muscles in  $AR^{skm - 4y}$  mice and  $AR^{(i)skm - 4y}$  mice. (*A*) Gastrocnemius weight from 6- and 13-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm - 4y}$  mice (*n* = 7). (*B*) Gross morphology of gastrocnemius (G) and soleus (S) muscles (*Upper*) and histological analysis of H&E-stained gastrocnemius muscle (*Lower*) from 13-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm - 4y}$  mice. (Scale bar, 20 µm.) (C) Mean fiber CSA of gastrocnemius muscle from 13-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm - 4y}$  mice. (*D*) Gastrocnemius weight from 12- and 32-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{(i)skm - 4y}$  mice (*n* = 7). Gastrocnemius weight (*E*), mean fiber CSA (*F*), and IGF-IEa mRNA levels (G) from 25-wk-old sham-operated (sham) and orchidectomized (Orx)  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm - 4y}$  mice (*n* = 6). In *A* and *C*-*G*, error bars indicate SEM. In *A*, *F*, and *G*, \**P* < 0.05. In *G*, "*P* ≥ 0.05.

Chambon et al.

PNAS Early Edition | 3 of 6



**Fig. 3.** Characterization of muscle contractile functions in AR<sup>4km-4y</sup> mice. (A) Maximal grip strength of AR<sup>12/y</sup> and AR<sup>4km-4y</sup> mice between the ages of 6 and 65 wk (n = 8-10). (B) In situ absolute maximal isometric tetanic force of tibialis anterior muscle from 20-wk-old AR<sup>12/y</sup> and AR<sup>4km-4y</sup> mice (n = 7-8). (C) In vitro absolute maximal isometric tetanic force of EDL and of soleus muscles from 20-wk-old AR<sup>12/y</sup> and AR<sup>5km-4y</sup> mice (n = 7-8). (C) In vitro absolute maximal isometric tetanic force of EDL and of soleus muscles from 20-wk-old AR<sup>12/y</sup> and AR<sup>5km-4y</sup> mice (n = 7-8). In A-C, error bars indicate SEM; \*P < 0.05. In C, "P = 0.84. (D) Ultrastructure of EDL muscle from 15-wk-old AR<sup>12/y</sup> and AR<sup>5km-4y</sup> mice. Black arrowheads indicate Z line disruptions; white arrowheads indicate loss of myofilaments; white arrows indicate sarcoplasm. A, A band; I, I band; H. H band; M, M line; Mt, mitochondria; Tt, T-tubules; Z, Z line.

myocytic AR is critically involved in specific maximal force production of limb muscles.

To characterize further limb muscles lacking AR selectively in myocytes, in situ tibialis anterior contractile properties were analyzed in 20-wk-old mice. Maximal tetanic force and maximal tetanic force relative to muscle weight in response to nerve stimulation were 25% lower in AR<sup>skm-/y</sup> mice than in AR<sup>L2/y</sup> littermates (Fig. 3*B* and Fig. S5*B*). To determine whether this decrease was caused by neuromuscular defects or alterations of intrinsic contractile functions, muscle force was determined in vitro. Maximal tetanic force and specific tetanic force in response to muscle stimulation was 20% lower in the fast-twitch EDL of AR<sup>skm-/y</sup> mice than of AR<sup>L2/y</sup> mice but was unchanged in the slow-twitch soleus muscle (Fig. 3*C* and Fig. S5*C*). Fatigue resistance was similar in intermediary- and fast-twitch skeletal muscles of AR<sup>skm-/y</sup> mice and was slightly reduced in the slow-twitch soleus muscle of AR<sup>skm-/y</sup>, without reaching statistical significance (Fig. S5*D*). Collectively, these results demonstrate that myocytic AR controls intrinsic contractile functions of fast- and intermediary-twitch hindlimb skeletal muscles.

Lack of AR in Myocytes Induces Myofibrillar Disruption. To investigate whether the impaired specific strength of muscles in ARsi n-/y mice was a consequence of alterations in the contractile apparatus, we performed ultrastructural analyses. Electron microscopy of EDL, tibialis and gastrocnemius from 15-wk-old AR<sup>skm-/y</sup> mice revealed disruptions of myofibrils in about 10% of AR<sup>skm<sup>5</sup>/y</sup> mice revealed disruptions of myofibrils in about 10% of the sarcomeres from AR<sup>skm<sup>-/y</sup></sup> mice, with loss of myofilaments, rupture of Z lines, and enlarged sarcoplasm (Fig. 3D and Fig. S8 A and B). These myofibrillar alterations were distributed randomly in skeletal muscle sarcomeres. Despite these defects, no sign of fiber degeneration, inflammation, or atrophy was observed in skeletal muscles of AR<sup>skm-/y</sup> mice. In contrast, no myofibrillar disruption was observed in slow-twitch skeletal muscles (e.g., soleus) of mutant mice (Fig. S8C). It is noteworthy that the defects exhibited in gastrocnemius muscle of AR<sup>(i)skm</sup> mice were similar to those of AR<sup>skm-/y</sup> mice (Fig. S7B). Taken together, these data demonstrate that myocytic AR is essential for proper myofibril organization of fast- and intermediary-twitch skeletal muscles.

#### Discussion

We have shown here, in agreement with a recent report (42), that selective ablation of AR in skeletal muscle myofibers results in a reduction of perineal muscle fiber size and mass. Moreover, because either castration or selective AR ablation in myofibers at adulthood decreases perineal muscle mass similarly, myocytic AR transduces and rogen-dependent BC/LA muscle hypertrophy (Fig. 4). In contrast, mass and fiber size of limb skeletal muscles were similar in adult AR<sup>skm-/y</sup> and control mice, demonstrating that myocytic AR does not control postnatal growth of these skeletal muscles. Because castration induced a similar reduction in leg muscle mass in AR<sup>skm-/y</sup> and control mice, androgens mediate leg muscle hypertrophy in a myocytic AR-independent pathway. Thus, androgen anabolic effects in leg muscles might be transduced by other cellular targets (e.g., satellite cells) (Fig. 4). Differential responses in perineal and leg muscles might result from a higher number of AR-expressing myonuclei in perineal than in limb muscles (29) or from cell-specific transcriptional activities of AR in these muscles.

Our results also demonstrate that androgens differentially regulate IGF-I transcript variants in skeletal muscles of adult mice. Indeed, whereas IGF-IEa transcript levels were androgen dependent in both perineal and leg skeletal muscles, MGF transcript levels were androgen independent. Interestingly, IGF-IEa expression was dependent on myocytic AR in BC/LA muscles but not in leg skeletal muscles (Fig. 4). Because IGF-IEa has been shown to stimulate protein synthesis in skeletal muscle to increase muscle fiber size (40), it is likely that androgen-stimulated muscle fiber hypertrophy in adult mice is mediated, at least in part, by IGF-IEa produced by satellite cells or myofibroblasts.

Importantly, even though selective AR ablation in skeletal muscle myofibers induced by Cre recombinase expressed under the control of the human skeletal actin promoter did not affect leg muscle mass, the strength of fast- and intermediary-twitch muscles was reduced selectively because of alterations in myofibrillar organization in some of their sarcomeres (Fig. 4). Similar defects were induced by AR ablation in skeletal muscle myofibers in adulthood, thus demonstrating that myocytic AR controls pathways required for maximum force production. Whether myocytic AR regulates the expression and/or turnover of myofibrillar cytoskeletal proteins remains to be determined.

Our data are in sharp contrast with those of Ophoff et al. (42). Indeed, their study, based on analyses of mARKO mutant mice in which AR was ablated selectively in postmitotic myocytes using



Fig. 4. Schematic model of androgen signaling in perineal and limb skeletal muscles.

MCK-Cre transgenic mice, showed that the EDL muscle mass was decreased but did not reveal any defect in intrinsic muscle strength (42). The results also are unexpected from previous studies of mice in which AR is ablated in the germ line, because decreased EDL strength in these mutant mice was attributed to decreased muscle mass, and no intrinsic contractile dysfunctions could be detected (41, 42). Note, however, that MacLean et al. (41) reported a decreased mass of slow-, intermediary-, and fast-twitch muscle in AR-null mice and an increased resistance to fatigue in slow-twitch muscles, whereas Ophoff et al. (42) observed decreased mass in fast- but not slow-twitch muscles and no impairment in fatigue resistance in the soleus muscle. The reasons for these discrepancies are unknown.

In summary, our results highlight the complexity of androgen signaling pathways in skeletal muscle. Our data show that androgens induce muscle fiber hypertrophy through different pathways in perineal and leg skeletal muscles (Fig. 4). Importantly, we also demonstrate that AR ablation in skeletal muscle myocytes impairs intrinsic contractile functions in fast- and intermediary-twitch muscle. Thus, even though perineal muscles are very sensitive to androgen anabolic effects, their use is not appropriate to identify selective AR modulators that may stimulate muscle strength in peripheral skeletal muscles. Our study opens avenues to identify selective AR modulators that (*i*) stimulate muscle strength without increasing the risk of cardiovascular and liver diseases, as well as prostate cancer, associated with testosterone therapy, and (*ii*) inhibit the progression of prostate cancer without inducing skeletal muscle weakness.

#### Methods

**Mice.** Mice were maintained in a temperature- and humidity-controlled animal facility with a 12-h light/dark cycle and free access to water and a standard rodent chow (2,800 kcal/kg Usine d'Alimentation Rationelle). Body weight was determined at various ages. Animals were killed at the beginning of the light cycle by  $CO_2$  inhalation, and tissues were collected, weighed, and frozen in liquid nitrogen or processed for biochemical and histological analysis. Breeding and maintenance of mice were performed under institutional guidelines, and all experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire.

Generation of AR<sup>skm-/y</sup> and AR<sup>(I)skm-/y</sup> Mice. HSA-Cre (35) and HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> mice (38) were described previously. AR L2 alleles were generated by Cre-mediated excision of the neomycin resistance gene in ES cells bearing AR L3 alleles (34). AR<sup>skm-/y</sup> mice were generated by breeding mice carrying "floxed" AR L2 alleles with HSA-Cre transgenic mice. To generate AR<sup>(I)skm-/y</sup> mice, mice carying "floxed" AR L2 alleles were bred with HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> transgenic mice, and HSA-Cre-ER<sup>T2</sup>/AR<sup>L2y</sup> male mice, bearing the HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> transgene and

Chambon et al.

AL CCIENCES

AR L2 alleles, were tamoxifen-treated daily for 5 d at age 7 wk, as described (43). Tamoxifen-treated AR<sup>L2/y</sup> and oil (vehicle)-treated and HSA-Cre-ER<sup>T2</sup>/ AR<sup>L2/y</sup> male littermates were used as controls.

**Grip Strength.** A grip strength meter (Bioseb) was used to measure forelimb and hindlimb grip strength. The test was repeated three consecutive times within the same session, and the mean value was recorded as the maximal grip strength for each mouse.

Contractile Measurements. In situ isometric tibialis anterior muscle force in response to nerve stimulation was performed as described previously (44), and muscle masses were measured to calculate specific maximal force. Fatique resistance was assessed after repeated contractions (75 Hz for 500 ms. evoked once every second for 100 s), and the time to reach half the initial force was calculated (FR). Measurements of in vitro isometric contractile properties of soleus and EDL muscles were performed according to previously described methods (45). Specific maximal tetanic force (mN/mm<sup>5</sup>) was calculated by dividing the force by the estimated cross-sectional area of the muscle. Assuming muscles have a cylindrical shape and a density of 1.06 mg mm<sup>-3</sup>, the muscle cross-sectional area corresponds to the wet weight of the muscle divided by its fiber length (Lf). Lf to L0 ratio of 0.7 (soleus) or 0.45 (EDL) was used to calculate Lf. Lo is the fiber length at which maximal tetanic force is observed. Fatigue resistance was assessed by repeated isometric tetanic (75 Hz for 300 ms, evoked once every second for 200 s), and FR was calculated. All data provided by the muscle lever were recorded and analyzed on a microcomputer, using the PowerLab/4SP system (AD Instruments).

**Orchidectomy.** AR<sup>L2y</sup> and AR<sup>skm-y</sup> mice were sham operated or orchidectomized at age 21 wk and were killed 1 mo later.

IGF-I Plasma Levels. Plasma IGF-I levels were measured at Institut Clinique de la Souris, using mouse IGF-I Quantikine ELISA kit (R&D Systems) (46).

**Histological Analysis.** Muscles were quickly frozen in dry ice-cooled isopentane. For H&E staining, 10-μm cryosections were stained with Harris hematoxylin (VWR International S.A.S.), washed in running tap water, decolorized in acid alcohol for 2 s, stained in eosin (VWR International S.A.S.), washed in running tap water, dehydrated, cleared, and mounted. For muscle fiber CSA, all surface fibers of a muscle section were determined using MetaMorph software (Molecular Devices).

**Electron Microscopy** Skeletal muscle samples were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), washed in cacodylate buffer for 30 min, and kept at 4 °C. Postfixation was performed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at 4 °C, and dehydration was performed with graded alcohol (50, 70, 90, and 100%) and propylene oxide for 30 min each. Samples were oriented longitudinally and embedded in Epon 812 (Sigma Chimie). Ultrathin sections were cut at 70 nm, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined at 70 kV

PNAS Early Edition | 5 of 6

with a Morgagni 268D electron microscope. Images were captured digitally by a Mega View III camera (Soft Imaging System).

RNA Preparation and Analysis. RNA was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen). We converted 5 µg RNA to cDNA with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) and hexamers primers according to the supplier's protocol. Quantitative RT-PCR was performed by using the QuantiTectTM SYBR Green PCR kit (Qiagen) according to the supplier's protocol. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) was used as an internal control. Primers were as follows:

HPRT 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3', 5'- GATTCAACTTGCGCTC-ATCTTAGGC-3'; AR 5'-CTGCCTCCGAAGTGTGGTAT-3', 5'-GCCAGAAGCTTCAT-CTCCAC-3'; MGF 5'-AGCTGCAAAGGAAGGAAGGAAGGAAG-3', 5'-GGTGATGTG-GCATTTCCTGCT-3'; IGF-IEa 5'-TGACATGCCCAAGACTCA- 3', 5' -TGTGGCATTT-TCTGCTCCGTGG -3'

Protein Preparation and Analysis. Proteins were isolated using RIPA buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 1% Nonident p40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, and containing a mixture of protease inhibitors (45 µg/mL)]. Homogenates (50 µg of protein) were electrophoresed in

- 1. Bhasin S, et al. (1997) Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. J Clin Endocrinol Metab 82:407-413.
- 2. Katznelson L, et al. (1996) Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 81:4358-4365.
- 3. Brodsky IG, Balagopal P, Nair KS (1996) Effects of testosterone replacement on muscle mass and muscle protein synthesis in hypogonadal men-a clinical research center study. J Clin Endocrinol Metab 81:3469-3475.
- 4. Wang C, et al. (1996) Sublingual testosterone replacement improves muscle mass and strength, decreases bone resorption, and increases bone formation markers in hypogonadal men-a clinical research center study. J Clin Endocrinol Metab 81:3654-3662.
- 5. Wang C, et al., Testosterone Gel Study Group (2000) Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength, and body composition parameters in hypogonadal men. J Clin Endocrinol Metab 85:2839-2853.
- 6. Morley JE, et al. (1993) Effects of testosterone replacement therapy in old hypogonadal males: A preliminary study. J Am Geriatr Soc 41:149-152.
- 7. Sih R, et al. (1997) Testosterone replacement in older hypogonadal men: A 12-month randomized controlled trial. J Clin Endocrinol Metab 82:1661-1667.
- 8. Urban RJ, et al. (1995) Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. Am J Physiol 269:E820-E826.
- 9. Tenover JL (2000) Experience with testosterone replacement in the elderly. Mayo Clinic Proc 75 Suppl:S77-81.
- 10. Bhasin S, et al. (2000) Testosterone replacement and resistance exercise in HIVinfected men with weight loss and low testosterone levels. JAMA 283:763-770. 11. Reid IR, Wattie DJ, Evans MC, Stapleton JP (1996) Testosterone therapy in
- glucocorticoid-treated men. Arch Intern Med 156:1173-1177.
- 12. Tenover JS (1992) Effects of testosterone supplementation in the aging male. J Clin Endocrinol Metab 75:1092-1098.
- 13. Snyder PJ, et al. (1999) Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age. J Clin Endocrinol Metab 84:2647-2653.
- 14. Snyder PJ, et al. (2000) Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. J Clin Endocrinol Metab 85:2670-2677.
- 15. Wilson JD (1988) Androgen abuse by athletes. Endocr Rev 9:181-199
- 16. Sengelaub DR, Forger NG (2008) The spinal nucleus of the bulbocavernosus: Firsts in androgen-dependent neural sex differences. Horm Behav 53:596-612.
- 17. Tobin C, Joubert Y (1991) Testosterone-induced development of the rat levator ani muscle. Dev Biol 146:131-138. 18. Joubert Y, Tobin C (1995) Testosterone treatment results in guiescent satellite cells
- being activated and recruited into cell cycle in rat levator ani muscle. Dev Biol 169: 286-294.
- 19. Wainman P, Shipounoff GC (1941) The effects of castration and testosterone propionate on the striated perineal musculature in the rat. Endocrinology 29:975-978.
- 20. Dorfman KD, Kincl FA (1963) Relative potency of various steroids in an anabolic androgenic assay using castrated rat. *Endocrinology* 72:259–266. 21. Vyskocil F, Gutmann E (1977) Anabolic effect of testosterone on the levator ani
- muscle of the rat. Pflugers Arch 371:3-8.
- 22. Balice-Gordon RJ, Breedlove SM, Bernstein S, Lichtman JW (1990) Neuromuscular junctions shrink and expand as muscle fiber size is manipulated: In vivo observations in the androgen-sensitive bulbocavernosus muscle of mice. J Neurosci 10:2660-2671.
- 23. Venable JH (1966) Morphology of the cells of normal, testosterone-deprived and testosterone-stimulated levator ani muscles. Am J Anat 119:271-301.

8% acrylamide gels. Proteins were electroblotted to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences), and proteins of interest were immunodetected using primary antibodies directed against AR (N-20, 1/200; Santa Cruz) (42) and GAPDH (1/50,000; Millipore/Upstate/Chemicon). Secondary antibodies (1/10,000) conjugated to HRP (Jackson ImmunoResearch) were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (Thermo Scientific).

Data Analysis. Data are presented as mean ± SEM. Differences analyzed by a two-tailed Student's t test were considered statistically significant at P < 0.05 and are indicated in the figures by an asterisk.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank J. Melki (Hebrew University Hospital, Jerusalem, Israel) for providing HSA-Cre mice and the staff of the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire and the Institut Clinique de la Souris animal facilities for their kind help. This work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Collège de France, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and the Association Française contre les Myopathies. C.C. and D.D. were supported by fellowships from the Association Française contre les Myopathies.

- 24. Jiang B, Klueber KM (1989) Structural and functional analysis of murine skeletal muscle after castration. Muscle Nerve 12:67-77.
- 25. Rowe RW (1968) Effect of castration on muscle growth in the mouse. J Exp Zool 169: 59-64
- 26. Axell AM, et al. (2006) Continuous testosterone administration prevents skeletal muscle atrophy and enhances resistance to fatigue in orchidectomized male mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 291:E506-E516.
- 27. Tingus SJ, Carlsen RC (1993) Effect of continuous infusion of an anabolic steroid on nurine skeletal muscle. Med Sci Sports Exerc 25:485-494
- MacLean HE, Warne GL, Zajac JD (1997) Localization of functional domains in the androgen receptor. J Steroid Biochem Mol Biol 62:233–242.
- 29. Johansen JA, Breedlove SM, Jordan CL (2007) Androgen receptor expression in the levator ani muscle of male mice. J Neuroendocrinol 19:823-826.
- 30. Sinha-Hikim I, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Zheng W, Bhasin S (2004) Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: Up-regulation by androgen treatment. J Clin Endocrinol Metab 89:5245-5255.
- 31. Monks DA, O'Bryant EL, Jordan CL (2004) Androgen receptor immunoreactivity in
- skeletal muscle: Enrichment at the neuromuscular junction. J Comp Neurol 473:59–72. 32. Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ (2008) Non-genomic actions of androgens. Front Neuroendocrinol 29:169-181.
- 33. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ (2008) Androgen actions and the ovary. Biol Reprod 78:380-389.
- 34. Shiina H, et al. (2006) Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 103:224-229.
- 35. Miniou P, et al. (1999) Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. Nucleic Acids Res 27:e27 (i-iv).
- 36. Monks DA, et al. (2007) Overexpression of wild-type androgen receptor in muscle recapitulates polyglutamine disease. Proc Natl Acad Sci USA 104:18259-18264
- 37. Nicole S, et al. (2003) Intact satellite cells lead to remarkable protection against Smn gene defect in differentiated skeletal muscle. J Cell Biol 161:571-582.
- 38. Schuler M, Ali F, Metzger E, Chambon P, Metzger D (2005) Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. *Genesis* 41:165–170. 39. Chen Y, Zajac JD, MacLean HE (2005) Androgen regulation of satellite cell function.
- J Endocrinol 186:21-31 40. Goldspink G, Harridge SD (2004) Growth factors and muscle ageing. Exp Gerontol 39:
- 1433-1438.
- 41. MacLean HE, et al. (2008) Impaired skeletal muscle development and function in male, but not female, genomic androgen receptor knockout mice. FASEB J 22: 2676-2689
- 42. Ophoff J, et al. (2009) Androgen signaling in myocytes contributes to the maintenance of muscle mass and fiber type regulation but not to muscle strength or fatigue. Endocrinology 150:3558-3566.
- 43. Schuler M, et al. (2006) PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. Cell Metab 4:407-414.
- 44. Lahoute C, et al. (2008) Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. PLoS One 3:e3910.
- 45. Agbulut O, et al. (2009) Slow myosin heavy chain expression in the absence of muscle activity. Am J Physiol Cell Physiol 296:C205-C214.
- 46. Entingh-Pearsall A, Kahn CR (2004) Differential roles of the insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors in response to insulin and IGF-I. J Biol Chem 279: 38016-38024.

AS PNAS

### **Supporting Information**

#### Chambon et al. 10.1073/pnas.1009536107



**Fig. S1.** Selective ablation of androgen receptor (AR) in skeletal muscles of  $AR^{skm-4y}$  mice. (A) AR transcript levels in various tissues of 6-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-4y}$  mice (n = 10). BC/LA, bulbocavernosus/levator ani; BAT, brown adipose tissue; BR, brain; G, gastrocnemius; LI, liver; TE, testis; WAT, white adipose tissue. (B) AR transcript levels in various skeletal muscles of 15-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-4y}$  mice (n = 10). BC/LA, bulbocavernosus/levator ani; EDL, extensor digitorum longus; G, gastrocnemius; Q, quadriceps; S, soleus; T, tibialis. In A and B, error bars indicate SEM; \*P < 0.05. (C) Representative Western blot analysis of AR protein in quadriceps muscles of 15-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-4y}$  mice. GAPDH is used as an internal control.



Fig. 52. Fiber cross sectional area (CSA) of various skeletal muscles from 13-wk-old AR<sup>L2y</sup> and AR<sup>km-/y</sup> mice. Distribution of muscle fiber CSA of bulbocavernosus muscle (BC) (A), gastrocnemius muscle (B), tibialis muscle (C), and soleus muscle (E). Mean fiber CSA of tibialis muscle (D) and soleus muscle (F). In F, error bars indicate SEM.

NAS PNAS



Fig. S3. Selective ablation of androgen receptor in skeletal muscles of  $AR^{(i)skm-ly}$  mice. AR transcript levels in various skeletal muscles of 8-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{(i)skm-ly}$  mice (n = 10). BC/LA, bulbocavernosus/levator ani; G, gastrocnemius; S, soleus; T, tibialis. Error bars indicate SEM; \*P < 0.05.



**Fig. 54.** Mechano growth factor (MGF) transcript levels in BC/LA muscles from  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-Ay}$  mice, and insulin-like growth factor I (IGF-I) plasma levels. (A) MGF transcript levels in BC/LA muscles from 13-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-Ay}$  mice (n = 8). (B) Plasma IGF-I levels from 15-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-Ay}$  mice (n = 9). Error bars indicate SEM.



**Fig. S5.** Body weight and contractile properties of skeletal muscle of  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-4y}$  mice. (*A*) Body weight of 5- to 65-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-4y}$  mice (*n* = 10). (*B*) In situ maximal isometric tetanic force relative to muscle weight of tibialis anterior muscles from 20-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-4y}$  mice (*n* = 7–8). (*C*) In vitro specific maximal isometric tetanic force of EDL and of soleus muscles from 20-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-4y}$  mice (*n* = 7–8). (*C*) In vitro specific maximal isometric tetanic force of EDL and of soleus muscles from 20-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-4y}$  mice (*n* = 7–8). (*C*) In vitro specific maximal isometric tetanic force of EDL and of soleus muscles from 20-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-4y}$  mice (*n* = 7–8). In *B* and *C*, error bars indicate SEM; \**P* < 0.05. (*D*) In situ fatigue resistance of tibialis and in vitro fatigue resistance of EDL and soleus muscles of 20-wk-old  $AR^{L2/y}$  and  $AR^{skm-4y}$  mice (*n* = 7–8). Error bars indicate SEM. \**P* = 0.082.



Fig. S6. MGF transcript levels in gastrocnemius muscle from AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice. MGF transcript levels in gastrocnemius muscles from 25-wk-old AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice (*n* = 6). Error bars indicate SEM.

NAS PNAS



**Fig. S7.** Muscle strength defects in AR<sup>(l)skm-4y</sup>. (A) Maximal grip strength of 6- to 12-wk-old AR<sup>L2y</sup> and AR<sup>(l)skm-4y</sup> mice (n = 8). Tam, tamoxifen administration at age 7 wk. Error bars indicate SEM. \*P < 0.05. (B) Ultrastructure of gastrocnemius muscle from 15-wk-old AR<sup>L2y</sup> and AR<sup>(l)skm-4y</sup> mice. Black arrowheads indicate Z line; white arrowheads indicate loss of myofilaments; white arrows indicate sarcoplasm. A, A band; H, H band, I, I band; M, M line; Z, Z line.



Fig. S8. Ultrastructure of (A) tibialis, (B), gastrocnemius, and (C) soleus muscles from 15-wk-old AR<sup>L2/y</sup> and AR<sup>skm-/y</sup> mice. Black arrowheads indicate Z line disruptions; white arrowheads indicate loss of myofilaments; white arrows indicate sarcoplasm. A, A band; H, H band; I, I band; M, M line; Mt, mitochondria; Tt, T-tubules; Z, Z line.

Table S1.	Limb skeletal muscle mass (in mg) in AR <sup>L2/y</sup> a	and AR <sup>skm-/y</sup> mice 1 mo after orchidectomy
(Orx) or sh	ham operation (sham)	

Muscle	$AR^{L2/y}$ sham (n = 6)	$AR^{L2/y}$ Orx ( $n = 5$ )	$AR^{skm-/y}$ sham (n = 5)	$AR^{skm-/y} Orx (n = 6)$
EDL	20.0 ± 2.4	16.0 ± 1.1*	18.0 ± 1.6	15.9 ± 0.9 <sup>#</sup>
Quadriceps	208.0 ± 8.1	182.9 ± 8.6*	215.5 ± 8.9	179.5 ± 7.6 <sup>#</sup>
Gastrocnemius	180.0 ± 5.6	149.0 ± 7.7*	184.8 ± 9.0	151.6 ± 8.4 <sup>#</sup>
Tibialis	72.0 ± 3.7	59.8 ± 2.2*	68.0 ± 1.5	54.1 ± 2.0 <sup>#</sup>
Soleus	9.5 ± 1.0	11.1 ± 1.5	10.6 ± 1.4	9.6 ± 2.0

Data are expressed  $\pm$  SEM. \*P < 0.05: AR<sup>L2/y</sup> sham vs. AR<sup>L2/y</sup> Orx; # P < 0.05: AR<sup>skm-/y</sup> sham vs. AR<sup>skm-/y</sup> Orx (Student's t test).

IV. L'expression de PGC1a est contrôlée par PPARb dans les muscles squelettiques, dont l'ablation résulte en une conversion de fibres, une obésité et diabète de type 2.

Les souris dans lesquelles peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$  (PPAR $\beta$ ) est sélectivement invalidé dans les myocytes du muscle squelettique ont été générées afin d'élucider le rôle joué par la signalisation de PPAR $\beta$  dans les myocytes. Ces souris mutantes développent une conversion de fibres tendant vers des capacités oxydatives plus faibles qui précèdent le développement d'une obésité et d'un diabète de type 2, démontrant ainsi que PPAR $\beta$  est essentiel dans les myocytes pour maintenir les fibres oxydatives, et que la conversion de fibres est plutôt la cause et non la conséquence des désordres métaboliques. Nous montrons également que PPAR $\beta$  stimule, dans les myocytes, l'expression de PGC1 $\alpha$ , un co-activateur de nombreux facteurs de transcription connu pour jouer un rôle important dans la formation des fibres musculaires lentes. De plus, du fait que le promoteur de PGC1 $\alpha$ contient un élément de réponse à PPAR $\beta$ , l'effet de PPAR $\beta$  sur la formation et/ou la maintenance des fibres lentes peut être attribué, au moins en partie, à une stimulation de l'expression de PGC1 $\alpha$  au niveau transcriptionel.
## PGC1 $\alpha$ expression is controlled in skeletal muscles by PPAR $\beta$ , whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes

Michael Schuler,<sup>1,2,3,4,5,6</sup> Faisal Ali,<sup>1,2,3,4,5</sup> Céline Chambon,<sup>1,2,3,4,5</sup> Delphine Duteil,<sup>1,2,3,4,5</sup> Jean-Marc Bornert,<sup>1,2,3,4,5</sup> Aubry Tardivel,<sup>7</sup> Béatrice Desvergne,<sup>7</sup> Walter Wahli,<sup>7</sup> Pierre Chambon,<sup>1,2,3,4,5,6,\*</sup> and Daniel Metzger<sup>1,2,3,4,5,6,\*</sup>

<sup>1</sup> IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Department of Physiological Genetics

<sup>3</sup>CNRS, UMR7104

<sup>4</sup>Collège de France

Illkirch, F-67400 France

- <sup>5</sup>Université Louis Pasteur, Strasbourg, F-67000 France
- <sup>6</sup>Institut Clinique de la Souris, 67404, Illkirch, Strasbourg, France

<sup>7</sup> Center for Integrative Genomics, National Center of Competence in Research "Frontiers in Genetics," University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

\*Correspondence: metzger@igbmc.u-strasbg.fr (D.M.), chambon@igbmc.u-strasbg.fr (P.C.)

#### Summary

Mice in which peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$  (PPAR $\beta$ ) is selectively ablated in skeletal muscle myocytes were generated to elucidate the role played by PPARß signaling in these myocytes. These somatic mutant mice exhibited a muscle fiber-type switching toward lower oxidative capacity that preceded the development of obesity and diabetes, thus demonstrating that PPAR<sub>β</sub> is instrumental in myocytes to the maintenance of oxidative fibers and that fiber-type switching is likely to be the cause and not the consequence of these metabolic disorders. We also show that PPAR $\beta$  stimulates in myocytes the expression of PGC1a, a coactivator of various transcription factors, known to play an important role in slow muscle fiber formation. Moreover, as the PGC1α promoter contains a PPAR response element, the effect of PPARβ on the formation and/or maintenance of slow muscle fibers can be ascribed, at least in part, to a stimulation of PGC1 a expression at the transcriptional level.

### Introduction

Skeletal muscles account for up to 55% of total body mass in nonobese mammals and generate motile forces and heat. They are a major site for carbohydrate and fatty acid metabolism and are composed of three myofiber types exhibiting distinct contractile and metabolic properties: (1) slow-twitch, oxidative, fatigue-resistant, oxidative (SO) fibers, (2) fast-twitch, oxidativeglycolytic (FOG) fibers, and (3) fast-twitch, glycolytic, fatigueable (FG) fibers. These fiber types are established during development, and in adults, they display a remarkable adaptation to functional and metabolic demands, responding by a fiber-type switching to altered workload and frequency of motor nerve stimulation (Berchtold et al. [2000]; Fluck and Hoppeler [2003], and references therein). Moreover, caloric restriction retards age-related slow-to-fast fiber-type conversion in rats (Aspnes et al., 1997), and studies of humans and rodents have indicated a correlation between (1) obesity and/or diabetes and (2) reduced muscle oxidative capacity and/or fiber type composition. However, it is not known whether replacement of oxidative fibers by glycolytic fibers is a cause or a consequence of obesity or diabetes (Patti et al. [2003], Petersen et al. [2003], Tanner et al. [2002], Wisloff et al. [2005], and references therein).

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear receptor superfamily that form heterodimers with retinoid X receptors (RXRs) and bind preferentially to direct repeats of the consensus hexameric nucleotide sequence 5'-AGGTCA-3' separated by 1 base (DR1), called peroxisome proliferator-activated receptor response elements (PPREs), to control target gene expression. Three PPAR isotypes ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ), with distinct tissue distribution, have been identified. PPARa (NR1C1) is preferentially expressed in tissues with high fatty acid (FA) oxidation, such as heart, kidney, brown adipose tissue (BAT), and liver, where it regulates FA transport, esterification and oxidation via transcriptional activation of genes encoding enzymes involved in each step of FA breakdown. PPARy (NR1C3) is predominant in adipose tissue and plays an essential role in adipocyte differentiation and survival (Desvergne and Wahli, 1999; Evans et al., 2004; Metzger et al., 2005). In contrast, PPAR $\beta$  ( $\delta$ ; NR1C2), which is expressed ubiquitously, is the most abundant PPAR isotype in skeletal muscle (Escher et al., 2001). Increases of PPARB activity through ligand activation, PPARB overexpression, or expression of a constitutively active PPARB in transgenic mice, have recently suggested that this receptor could be physiologically involved in fatty acid metabolism and muscle fiber-type switching (Evans et al., 2004). To investigate whether PPAR $\beta$  is actually a key player in these processes, we have generated PPAR $\beta^{skm-/-}$  mice, in which PPAR $\beta$  is selectively ablated in skeletal muscle myocytes. We show that these mice exhibit a functional switch of the skeletal muscle fiber type toward lower oxidative capacity that precedes the appearance of age-dependent obesity and type 2 diabetes.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Inserm, U596

### SHORT ARTICLE



Figure 1. Characterization of PPARβ-deficient skeletal muscles

A) Relative weight of fast (G, gastrocnemius), slow (S, soleus) and mixed (T, tibialis) muscles from 28 week-old CT and MT mice (n = 6-8).

B) Histochemical NADH-tetrazolium reductase staining of tibialis muscles of 28 week-old CT (a) and PPARß<sup>skm-/-</sup> (b) mice, and 20 week-old CT (c) and PPARß<sup>(i)skm-/-</sup> (d) mice. Three different fiber types are distinguished: oxidative (SO) and intermediate (FOG) fibers are darkly and moderately stained, respectively; glycolytic fibers (FG) are unstained. Scale bar, 100 µm.

C) Percentage of unstained fibers in tibialis muscles of 12 and 28 week-old CT and MT mice (n = 4-6).

**D**) Biochemical determination of CS, β-HAD, and LDH activities in tibialis extracts of 12 week-old CT and PPARβ<sup>skm-/-</sup> (MT) mice (n = 4).

E) Relative MHCI and MHCIIb transcript levels in gastrocnemius muscle of 16 week-old CT and MT mice.

F) Relative troponin I slow and fast transcript levels in gastrocnemius muscle of 16 week-old CT and MT mice

G) Relative transcript levels in gastrocnemius muscle of 10–12 week-old CT and MT mice of genes involved in FA metabolism and energy uncoupling (UCP 3). LPL, lipoprotein lipase; FAT/CD36, fatty acid translocase; hFABP, heart fatty-acid binding protein; LCAS, long chain acyl-CoA synthetase; LCAD, MCAD, and SCAD, long-, medium-, and short-chain acyl-CoA dehydrogenase; β-HAD, β-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase; CS, citrate synthase.

H) Relative transcript levels of genes involved in glucose metabolism. PFK, phosphofructokinase 1; GLUT4, glucose transporter 4.

I) Relative transcript levels of genes of the mitochondrial electron transport chain and of transcription factors controlling their expression, as indicated (n = 7-11).

We also demonstrate that the expression of PGC1 $\alpha$ , a transcriptional coregulator that coordinates the formation/maintenance of slow fibers in skeletal myocytes, is directly controlled by PPAR $\beta$ .

#### Results

To selectively ablate PPAR $\beta$  in skeletal muscle, PPAR $\beta^{L2/L2}$  mice bearing floxed PPAR $\beta$  L2 alleles (in which LoxP sites flank the PPAR $\beta$  exon encoding the N-terminal zinc finger of the DNA binding domain) were bred with HSA-Cre<sup>tg/0</sup> mice that express

the Cre recombinase under the control of the human  $\alpha$ -skeletal actin promoter (Miniou et al., 1999) to produce control mice (CT) as well as HSA-Cre<sup>tg/0</sup>/PPAR $\beta^{L2/L2}$  somatic mutants (MT) in which PPAR $\beta$  is selectively ablated in skeletal muscles (PPAR $\beta^{skm-/-}$  mice; Supplemental Data).

Muscle-to-body weight ratios and the morphology of gastrocnemius (G), soleus (S), and tibialis (T) muscles were similar in 12 and 28 week-old CT and MT (Figure 1A and data not shown). However, histochemical staining with NADH-tetrazolium reductase, a marker of the mitochondrial respiratory chain complex I activity, revealed a 40% increase of unstained FG in tibialis muscles of 12 week-old MT mice (MT, 35%; CT, 25%), and a corresponding lower number of stained fibers (FOG and SO; Figure 1B, panels a and b), indicating that muscle fibers in MT were less oxidative than in CT. In 28 week-old MT, the percentage of NADH-tetrazolium reductase unstained fibers was further increased to reach 45%, whereas it was unchanged in CT (Figure 1C), showing an age-dependent decrease of oxidative capacity in PPARβ-deficient skeletal muscles. Interestingly, selective ablation of PPAR $\beta$  in skeletal muscles of adult mice [PPAR $\beta^{(i)skm^{-/-}}$  mice], induced by Tamoxifen administration to PPAR $\beta^{L2/L2}$  mice bearing the HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> transgene (Schuler et al., 2005), also resulted in a lower oxidative capacity of skeletal muscle (Figure 1B, compare panels c and d).

To further characterize muscle oxidative capability, enzyme activities of the aerobic oxidative pathways (fatty acid oxidation and tricarboxylic acid cycle [TCA]) and of the glycolytic pathways were analyzed in tibialis muscle extracts of 12 week-old mice. The activity of β-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase (β-HAD, aerobic-oxidative pathway, FA oxidation) and citrate synthase (CS, aerobic-oxidative pathway, TCA) were 50% lower in MT than CT, whereas the activity of the glycolytic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) was unchanged (Figure 1D; data not shown). To determine the fiber-type composition, the expression of myosin heavy chain (MHC) isoforms was analyzed in gastrocnemius of 16 week-old mice by quantitative RT-PCR. The transcript levels of the slow MHCI was ~50% lower in MT than in CT, whereas those of fast MHCIIb were ~25% higher in MT (Figure 1E). Moreover, Troponin I slow RNA levels were reduced by  $\sim$ 35% in MT, whereas those of troponin I fast were increased by  $\sim 20\%$  in MT (Figure 1F).

Quantitative RT-PCR analysis of 10–12 week-old mouse gastrocnemius muscle revealed that transcript levels of genes controlling (1) lipolysis (LPL); (2) FA uptake (FAT/CD36), binding (hFABP), activation (LCAS), and  $\beta$ -oxidation (LCAD, MCAD, SCAD,  $\beta$ -HAD); and (3) the TCA cycle (CS) were 20%–40% lower in MT. Moreover, the transcript level of uncoupling protein (UCP) 3, a putative target of PPAR $\beta$ -specific ligands in skeletal muscle cells (Muoio et al., 2002), was 50% lower in MT (Figure 1G), whereas those of two genes of the glycolytic pathway (PFK and GLUT4) were similar in CT and MT (Figure 1H).

As the histochemically determined mitochondrial respiratory chain complex I activity was lower in MT than in CT (Figures 1B and 1C), we also analyzed the transcript levels of nuclear genes encoding components of the respiratory chain. The transcripts of Ndfua2, Ndfub3, Ndfub5, Ndfus2, and Ndfus3 (complex I); Sdhb (complex II); Uqcrc1 (complex III); Cox5b and Cox6a2 (complex IV); as well as Atp5I and Atp5o (complex V) were 20%-40% lower in MT. Moreover, the transcript level of the mitochondrial transcription factor A (mtTFA), which regulates transcription of mitochondrial genes encoding respiratory chain proteins, was 20% lower in the MT gastrocnemius muscles, and the RNA level of the mitochondrial Cox 2 gene was reduced by about 20% in MT (Figure 1I). Interestingly, the transcript level of PGC1a, which binds and coactivates the transcriptional function of nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) on the mtTFA promoter (Wu et al., 1999), was 2-fold lower in MT than in CT (Figure 1I), whereas those of NRF-1 were unchanged. Gastrocnemius mitochondrial DNA content was however similar in CT and MT at 8 and 26 weeks (data not shown). Note that transcript levels of UCP1, 2, and 3 and  $\text{PPAR}\alpha$  in BAT; those of leptin, FAS, SREBP-1, and PPAR $\gamma$  in white adipose tissue (WAT); and those of MCAD and PPAR $\alpha$  in liver were similar in CT and MT (data not shown). Taken together, these data show that the transcript levels of many genes involved in FA metabolism, as well as of a number of nuclear and mitochondrial genes encoding components of the mitochondrial electron transport chain, were selectively reduced in PPAR $\beta^{skm-/-}$  mouse skeletal muscles whose fibers were shifted toward a more fast-twitch, glycolytic type.

As skeletal muscle oxidative capacity decreased with time in PPAR $\beta^{skm-/-}$  mice, we subjected 43 week-old mice to endurance exercise performance tests. The treadmill running time and distance until exhaustion was ~30% lower in PPAR $\beta^{skm-/-}$  than in CT (Figure S2). These reductions in MT were not due to greater body weight of MT, as similar variations in endurance performance tests were observed with weight-matched CT and MT (data not shown). In contrast, spontaneous locomotor activity (determined with an open field test) was similar in CT and MT (data not shown). Thus, the lower number of slow oxidative fibers in MT resulted in markedly reduced capacity to sustain running exercise.

The decrease in PGC1 $\alpha$  transcripts in PPAR $\beta^{skm-/-}$  muscles prompted us to investigate whether PPARß might directly control PGC1a expression. Sequence analysis of the PGC1a promoter revealed a conserved putative PPRE (5'-AGGACA A AGGTCA-3'), located between nucleotides 2024 and 2043 and between nucleotides 1872 and 1891, upstream of the mouse (m) and human (h) PGC1a transcriptional initiation site, respectively (Figure 2A). Electrophoretic mobility shift assays showed that PPARB/RXRa heterodimers efficiently bound the PGC1a PPRE; no binding could be observed when it was mutated in its 3' and 5' repeated motifs (PGC1a PPREm; Figure 2B, compare lanes 1 and 2), and PPAR $\beta$ /RXR $\alpha$  binding to PGC1 $\alpha$ PPRE was efficiently competed out with an excess of unlabeled wild-type PPRE but not with PGC1 a PPREm (Figure 2B; lanes 3-6 and 7-10). Moreover, treatment of C2C12 myocytes with the PPARB-selective agonist GW501516 (Oliver et al., 2001) and the RXR selective agonist BMS649 (Roy et al., 1995) induced PGC1a transcripts by 4-fold (Figure 2C). To support the possibility that PPAR $\beta$  could control the activity of PGC1 $\alpha$ promoter in muscle cells, C2C12 myoblasts were transiently transfected with a luciferase reporter gene (pGL-PGC1a) driven by a 4 kb mouse PGC1a promoter/enhancer region and differentiated into myocytes. Addition of the PPARB-specific agonist GW501516 stimulated luciferase activity 2-fold, and this liganddependent stimulation of PGC1a promoter activity was abolished when its PPRE was mutated (pGL-PGC1am; Figure 2D). In contrast, the PPAR<sub>Y</sub>-selective ligand rosiglitazone stimulated the PGC1a promoter activity only 1.2-fold, and the PPARaselective ligand WY14643 had no effect (Figure 2D). Thus, PGC1 $\alpha$  promoter activity can be enhanced by liganded PPAR $\beta$ in muscle cells via a PPRE located between nucleotides 2024 and 2043 upstream of the mouse PGC1a start site.

Food intake and basal metabolic rate were similar in CT and MT (data not shown). However, PPAR $\beta^{skm-/-}$  mice fed a regular diet gained more weight than CT (Figures 3A and 3B; data not shown); 28 week-old PPAR $\beta^{skm-/-}$  mice were 5.5 g heavier than CT mice. This difference was not due to increased muscle weight (Figure 1A), but to increased body fat content and WAT weight (Figures 3C and 3D). Histological analysis of epidydimal fat pad revealed that adipocytes were hypertrophic in 28 week-old obese PPAR $\beta^{skm-/-}$  mice (Figure 3E), indicating that

## RESULTATS

#### SHORT ARTICLE

A Consensus PPRE: 5'CAAAACT AGGNCA A AGGTCA 3' h PGC1 $\alpha$  PPRE: -1872 5'AAAATTC AGGACA A AGGTCA 3' -1891 m PGC1 $\alpha$  PPRE: -2024 5'AAAATTC AGGACA A AGGTCA 3' -2043 PGC1 $\alpha$  PPREm: 5'AAAATTC ACCACA A ACCTCA 3'



Figure 2. Functional characterization of the PGC1α-PPRE

A) Sequence of the consensus, wild-type human and mouse, and mutated PGC1 $\alpha$ -PPRE.

B) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of radiolabeled PGC1 $\alpha$  PPRE using PPAR $\beta$  and RXR $\alpha$ . In vitro synthesized nuclear receptors were incubated with the wild-type (lanes 1 and 3–10) and mutant (lane 2) PGC1 $\alpha$  PPRE (PGC1 $\alpha$  PPREm), in the absence (lanes 1–3 and 7) or presence of increasing concentrations of unlabeled PGC1 $\alpha$  PPRE (lane 4–6) or PGC1 $\alpha$  PPREm (lane 8–10).

C) Relative PGC1 $\alpha$  transcript levels in C2C12 myocytes treated with vehicle or GW501516 and BMS649 (GW + BMS) (n = 3).

**D**) Luciferase activity was determined on C2C12 myoblast transfected with pGL3-basic, pGL-PGC1 $\alpha$ , or pGL-PGC1m luciferase reporter vectors, and grown in the absence or presence of GW501516 (GW), WY14643 (WY), or rosiglitazone (rosi). Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM, relative to vehicle-treated pGL3-transfected cells.

impaired muscular FA breakdown in PPAR $\beta^{skm-/-}$  animals leads to increased fatty acid storage in adipose tissue. Serum glucose, insulin, and triglyceride levels after a 6 hr fast were 1.2-, 1.8-, and 1.4-fold higher in 12 week-old MT than in CT mice, respectively (Figure 4A), and circulating nonesterified free fatty acid levels were slightly increased in MT (1.1-fold, which did not reach statistical significance; data not shown). Moreover, insulin efficiently decreased glucose levels in these mice when subjected to an intraperitoneal insulin tolerance test (Figure 4B). However, 8 month-old MT mice were insulinresistant and glucose-intolerant (Figures 4C and 4D), indicating that mice lacking PPAR $\beta$  in skeletal muscles develop an agedependent type 2 diabetes. Interestingly, serum levels of the adipokine adiponectin were 20% lower in aged MT than in aged CT, whereas those of leptin were similar (data not shown).

Upon an 8 week high fat diet (HFD) treatment that started at 5 weeks of age, the MT body weight was 35% higher in MT than CT (Figure 3B). Moreover, after 8 weeks of HFD feeding, TG serum levels were 25% higher in MT than in CT (Figure 3F), and MT were more insulin-resistant than CT when subjected to an intraperitoneal insulin tolerance test (Figure 3G).

### Discussion

Previous studies have suggested that PPAR $\beta$  could control skeletal muscle oxidative capacity and slow fiber-type formation in mice (Luquet et al., 2003; Tanaka et al., 2003; Wang et al., 2004). We show here that Cre recombinase-mediated selective ablation of PPAR $\beta$  in skeletal muscle myocytes results in an agedependent reduction of muscle oxidative capacity and induces a functional muscle fiber-type switching toward less oxidative fibers. Importantly, the fiber-type switching precedes obesity and diabetes and appears to be the cause and not the consequence of these metabolic disorders. Indeed, even though glucose homeostasis is impaired at an early time, only aged MT mice are insulin resistant. Interestingly, serum adiponectin levels, known to be decreased in insulin-resistant states (Kadowaki et al., 2006), were also decreased in aged MT mice. Thus, wholebody insulin resistance might appear when a critical fraction of the SO fibers have been converted to FG fibers and/or after reaching a "given stage" of obesity, when the levels of adipokines known to play an important role in whole body insulin sensitivity, are "altered" (Lazar, 2005). A similar decrease in muscle oxidative capacity was obtained by PPAR $\beta$  ablation in skeletal myocytes of adult mice, using transgenic mice expressing the tamoxifen-dependent Cre-ER<sup>T2</sup> recombinase under the skeletal actin promoter (Schuler et al., 2005), thus demonstrating that PPAR $\beta$  is instrumental in myocytes for the maintenance of their oxidative capacity.

Exercise training is known to increase PPARß levels in skeletal muscles (Luquet et al., 2003), and PPAR $\beta$  levels are higher in slow-twitch oxidative than in fast-twitch glycolytic muscles in mice (Wang et al., 2004). Our data therefore point to a mechanism whereby increased levels of PPARß could be instrumental in muscle fiber-type switch. PGC1a is known to play an important role in the formation/maintenance of slow muscle fibers (Leone et al., 2005; Lin et al., 2005). PGC1a levels are higher in slow-twitch oxidative than in fast-twitch glycolytic muscles in mice, and exercise training increases muscle PGC1 a levels via a calcium signaling cascade, including calcineurin, calmodulin dependent kinase IV (CaMKIV), myocyte enhancer factor 2 (MEF2), CREB, and nuclear factor of activated T cells (NFAT) (Lin et al., 2005; see Figure 4E). Importantly, we found in the mouse and human PGC1a promoter/enhancer region a conserved PPRE that specifically binds PPARβ/RXRα heterodimers in vitro. Moreover, the PPAR $\beta$ -selective agonist GW 501516 stimulates the activity of the mouse PGC1a promoter through this PPRE in C2C12 myocytes. In keeping with these findings, PGC1a transcript levels are reduced in skeletal muscles of  $\mathsf{PPAR}\beta^{\mathsf{skm}-/-}$  mouse mutants (Figure 1I), and  $\mathsf{PPAR}\beta\text{-selective}$ ligands enhance PGC1 a transcript levels in mouse skeletal muscles (Figure 2D; Tanaka et al., 2003). It appears therefore that



liganded PPAR $\beta$  participates in the formation/maintenance of slow muscle fiber type by stimulating PGC1 $\alpha$  expression in muscle cells (Figure 4E). However, it has been reported that PGC1 $\alpha$  levels are inversely correlated with intramuscular fatty acid levels in rodents (Benton et al. [2006] and references therein) and also that unsaturated but not saturated fatty-acids increased PGC1 $\alpha$  expression in differentiated myotubes (Staiger et al., 2005). This suggests that in skeletal muscles the ligands that activate PPAR $\beta$  are selected fatty acids or fatty-acid metabolites.

Interestingly, as PGC1 $\alpha$  is known to act as a PPAR $\beta$  coactivator (Dressel et al., 2003; Wang et al., 2003), the PGC1 $\alpha$  promoter activity can be enhanced through a feed-forward loop similar to that resulting from the interaction of PGC1 $\alpha$  with MEF2 (Handschin et al., 2003), another transcriptional activator that binds to the PGC1 $\alpha$  promoter. Together, these two feed-forward loops may ensure a stable transcription of PGC1 $\alpha$ , leading to efficient maintenance of slow fatigue-resistant muscle fibers, as well as to sustained increase in muscle mitochondrial oxidation capacity (Figure 4E). In this respect, we note that a recent report (Hondares et al., 2006) has shown that the PGC1 $\alpha$  gene is a direct target of PPAR $\gamma$  in brown and white adipocytes, which suggests that PGC1 $\alpha$  expression could be differentially regulated in adipocytes.

In summary, our data demonstrate that PPAR $\beta$  is required in skeletal muscles for the maintenance of slow oxidative fibers, and that this effect is mediated, at least in part, through the control of expression of PGC1 $\alpha$  at the transcriptional level. Furthermore, we have established that ablation of PPAR $\beta$  in mouse skeletal muscles leads to obesity and diabetes. As physical exercise is known to result in a PPAR $\beta$  increase in skeletal muscles, its beneficial effects in preventing obesity and diabetes could be mediated, at least in part, through induction of PPAR $\beta$  signaling at the level of the receptor and/or its cognate ligand(s). Whether this induction is triggered by muscle contraction through the calcium signaling cascade, as in the case of PGC1 $\alpha$ , remains to be investigated (Figure 4E).

#### Experimental procedures

#### Mice

Mice were maintained in a temperature- and humidity-controlled animal facility, with a 12 hr light/dark cycle and free access to water and a standard rodent chow (2800 kcal/kg, Usine d'Alimentation Rationelle, Villemoisson-sur-Orge, France). The HFD study was carried out with a chow containing 4,056 kcal/kg (fat: 1,600 kcal/kg and sucrose: 1,600 kcal/kg; research Diets, New Brunswick, New Jersey). HFD was given to mice at weaning. Body weight

**A)** Dorsal view of a 25 week-old regular diet fed CT and PPAR $\beta^{skm-/-}$  mouse. **B)** Body weight gain of CT and PPAR $\beta^{skm-/-}$  mice fed a regular (RD) or high fat (HFD) diet (n = 6–10) (RD cohorte: body weight at week 5: CT, 24 ± 1.8 g; MT, 22.3 ± 1.0 g; body weight gain between week 5 and 28: CT, 52%; MT, 88%; HFD cohorte: HFD: body weight at week 5; CT, 19, 3 ± 1.15 g; MT, 18.5 ± 1.87 g, p = 0, 37; body weight gain between week 5 and 13: CT, 70%; MT, 105%).

D) Relative epidydimal, subcutaneous, and perirenal WAT weight of 28 week-old RD-fed CT and MT mice.

E) Histology of epidydimal WAT of 28 week-old RD-fed CT and MT mice. Scale bar, 160 μm.

F) Serum triglyceride levels in 13 week-old HFD-fed CT and MT mice (n = 5).

Figure 3. Increased adiposity in aging PPAR $\beta^{skm-/-}$  animals

**c)** Total body fat content in 17 week-old RD-fed CT and MT mice determined by DEXA (n = 6-10).

**G)** Intraperitoneal insulin tolerance test in 13 week-old HFD-fed CT and MT mice (n = 4-6).

### SHORT ARTICLE



Figure 4. Impaired glucose homeostasis in PPAR $\beta^{skm-/-}$  mice and schematic model of exercice-induced fiber type switching

A) Serum glucose, insulin and triglyceride levels in 12 week-old CT and MT mice (n > 8).

**B–D**) Intraperitoneal insulin (**B** and **C**) and (**D**) glucose tolerance tests in 12 (**B**) and 32 (**C** and **D**) week-old mice (n = 4-6).

E) Schematic model of exercice-induced fiber-type switching. The PGC1 $\alpha$  promoter/enhancer region contains a PPRE, a MEF binding site (MEF-BS), and a cAMP response element (CRE). Muscle contraction induces a calcium-signaling pathway that activates CREB and MEF2 via CamKIV and calcineurinA (CnA) and thus stimulates PGC1 $\alpha$  promoter activity. Exercise increases PPAR $\beta$  levels (through an unknown mechanism) and may also increase the level of PPAR $\beta$  ligands (fatty acids, FA). Increased PPAR $\beta$  activity further enhances PGC1 $\alpha$  expression. Moreover, PGC1 $\alpha$  by coactivating MEF2 and PPAR $\beta$  provides a positive feed-forward signal to further increase PGC1 $\alpha$  expression. In turn, PGC1 $\alpha$  stimulates the expression of NRF1 and NRF2, thus leading to enhanced expression of

was determined at the indicated ages, and body-fat content was evaluated in anaesthetized mice by dual X-ray absorptiometry (DEXA; PIXIMUS, GE Medical Systems, Buc, France). Blood was collected from the retroorbital sinus after a 6 hr fast that started at the beginning of the light cycle, and serum glucose, insulin, and triglycerides levels were analyzed as described (Picard et al., 2002). Insulin and glucose tolerance tests were performed on 3 and 8–9 month-old mice that were fasted for 3 hr. Glucose concentrations were determined with a OneTouch<sup>®</sup> blood glucometer (LifeScan, Lissy les Moulineaux, France) in blood collected from the tail vein before (0 min) and 15, 30, 60, and 90 min after intraperitoneal injection of insulin (1 U/kg, bovine insulin from Sigma) or glucose (2g/kg).

Animals were killed by  $CO_2$  inhalation at the beginning of the light cycle, and tissues were collected, weighed, and frozen in liquid nitrogen or processed for biochemical and histological analysis.

#### Histological and histochemical analysis

Muscles were quickly frozen in dry ice-cooled isopentane. For NADH-tetrazolium reductase staining, 10  $\mu$ m cryosections were incubated in 0.2 M Tris, pH 7.4, containing 1.5 mM NADH and 1.5 mM nitrobluetetrazolium for 15 min at 55°C, dehydrated, and mounted. SO and FOG fibers are positively stained, whereas FG fibers remain unstained (Hamalainen and Pette, 1993). Epididymal WAT was fixed in Bouin's solution, dehydrated in ethanol, embedded in paraffin, and cut at a thickness of 10  $\mu$ m. Sections were deparaffinized, rehydrated, and stained with haematoxylin and eosin.

### Electrophoretic mobility shift assays

pSG5-based PPARβ and RXRα expression plasmids were in vitro transcribed/translated using the TnT<sup>®</sup> Quick coupled transcription/translation system according to the manufacturer's recommendations (Promega). EMSAs were performed as described (Rochette-Egly et al., 1994), using 0.05 pmol of end-labeled oligonucleotide pairs. The PGC1α-PPRE and the PGC1α-PPRE were obtained by annealing oligonucleotides 5'-GATC CAAAATTCAGGACAAAGGTCAG-3' and 5'-GATCCTGACCCTTGGTGGAATTTTAATA-3' and 5'-TATTAAAATTCACCACAAAACCTCATGGGGCT-3', respectively. Unlabeled oligonucleotide pairs were added to the binding reaction for competition experiments.

#### Cell culture and transfection assays

5.10<sup>4</sup> C2C12 myoblasts were seeded in 24-well plates and grown for 24 hr in proliferation medium (Dulbecco's modified Eagle medium [DMEM]; glucose, 1 g/l, supplemented with 20% delipidated FCS). 0.2  $\mu g$  pCMV- $\beta gal$  and 0.8 µg pGL-PGC1a, pGL-PGC1am or pGL3-basic (see Supplemental Data) was mixed with 3 µl of Fugene6 transfection reagent (Roche Diagnostics) in 100  $\mu I$  DMEM, according to the supplier's protocol. After 15 min at room temperature, 30 µl transfection mix was added to each well, and the medium was changed 7 hr later to differentiation medium (DMEM supplemented with 5% delipidated FCS), containing the PPAR $\alpha$  ligand Wy 14643 (10  $\mu$ M), the PPAR $\beta$  ligand GW501516 (1  $\mu$ M), or the PPAR $\gamma$  ligand rosiglitazone (50 µM). Sixteen hours later, cells were harvested, lysed, and assayed for β-galactosidase (Voegel et al., 1998) and luciferase activity (Promega). Each transfection was done in triplicate. Luciferase activity was normalized to the β-galactosidase activity, and data are expressed as fold difference relative to the normalized luciferase activity of pGL3-basic transfection in the absence ligand, which was set as 1.

For RNA preparation, 3.10<sup>5</sup> C2C12 myoblasts were seeded in 6-well plates and grown for 30 hr in proliferation medium supplemented with 20% delipidated FCS. The medium was changed 30 hr later to differentiation medium, containing 1  $\mu$ M GW501516 and 10  $\mu$ M BMS961 or vehicle, and cells were harvested 16 hr later.

#### Data analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Differences analyzed by a two-tailed Student's t test were considered statistically significant at p < 0.05 and are indicated by an asterisk in the figures.

nuclear-encoded mitochondrial genes. PGC1 $\alpha$  simultaneously regulates the switch to slow-twitch muscle fiber genes through coactivation of MEF2. PPAR $\beta$ /RXR heterodimers also stimulate the expression of genes involved in fatty acid uptake and  $\beta$ -oxidation, and PGC1 $\alpha$  may potentiate it.

#### Supplemental data

Supplemental Data include Supplemental Results, Supplemental Experimental Procedures, and two figures and can be found with this article online at http://www.cellmetabolism.org/cgi/content/full/4/5/407/DC1/.

#### Acknowledgments

We thank Dr. J. Melki for HSA-Cre mice, the staff of the mouse, histopathology and biochemistry of the ICS and IGBMC for technical assistance, J. Auwerx for helpful discussions, and the secretarial staff for preparation of the manuscript. This work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Collège de France, the Association pour la Recherche sur le cancer, the Fondation pour la Recherche Médicale, the Human Frontier Science Program, the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, the Swiss National Science Foundation, the Etat de Vaud, and the European Community. M.S. was supported by a Marie Curie Individual fellowship and an ARI fellowship, C.C. by an ARI fellowship, and F.A. by a Boehringer Ingelheim Fund fellowship.

Received: January 24, 2006 Revised: August 20, 2006 Accepted: October 3, 2006 Published: November 7, 2006

#### References

Aspnes, L.E., Lee, C.M., Weindruch, R., Chung, S.S., Roecker, E.B., and Aiken, J.M. (1997). Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. FASEB J. *11*, 573–581.

Benton, C.R., Han, X.X., Febbraio, M., Graham, T.E., and Bonen, A. (2006). Inverse relationship between PGC-1alpha protein expression and triacylglycerol accumulation in rodent skeletal muscle. J. Appl. Physiol. *100*, 377–383.

Berchtold, M.W., Brinkmeier, H., and Muntener, M. (2000). Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. Physiol. Rev. *80*, 1215–1265.

Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr. Rev. 20, 649–688.

Dressel, U., Allen, T.L., Pippal, J.B., Rohde, P.R., Lau, P., and Muscat, G.E. (2003). The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. Mol. Endocrinol. *17*, 2477–2493.

Escher, P., Braissant, O., Basu-Modak, S., Michalik, L., Wahli, W., and Desvergne, B. (2001). Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. Endocrinology *142*, 4195–4202.

Evans, R.M., Barish, G.D., and Wang, Y.X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. Nat. Med. *10*, 355–361.

Fluck, M., and Hoppeler, H. (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. *146*, 159–216.

Hamalainen, N., and Pette, D. (1993). The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. J. Histochem. Cytochem. *41*, 733–743.

Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P.T., and Spiegelman, B.M. (2003). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 7111–7116.

Hondares, E., Mora, O., Yubero, P., de la Concepcion, M.R., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (2006). Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. Endocrinology 147, 2829–2838.

Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., and Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. J. Clin. Invest. *116*, 1784–1792.

Lazar, M.A. (2005). How obesity causes diabetes: not a tall tale. Science 307, 373–375.

Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., et al. (2005). PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. PLoS Biol. 3, e101.

Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. Cell Metab. *1*, 361–370.

Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M., and Grimaldi, P.A. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. FASEB J. *17*, 2299–2301.

Metzger, D., Imai, T., Jiang, M., Takukawa, R., Desvergne, B., Wahli, W., and Chambon, P. (2005). Functional role of RXRs and PPARgamma in mature adipocytes. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 73, 51–58.

Miniou, P., Tiziano, D., Frugier, T., Roblot, N., Le Meur, M., and Melki, J. (1999). Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. Nucleic Acids Res. 27, e27.

Muoio, D.M., MacLean, P.S., Lang, D.B., Li, S., Houmard, J.A., Way, J.M., Winegar, D.A., Corton, J.C., Dohm, G.L., and Kraus, W.E. (2002). Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. J. Biol. Chem. 277, 26089–26097.

Oliver, W.R., Jr., Shenk, J.L., Snaith, M.R., Russell, C.S., Plunket, K.D., Bodkin, N.L., Lewis, M.C., Winegar, D.A., Sznaidman, M.L., Lambert, M.H., et al. (2001). A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *98*, 5306–5311.

Patti, M.E., Butte, A.J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, I., Costello, M., Saccone, R., et al. (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 8466–8471.

Petersen, K.F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D.L., DiPietro, L., Cline, G.W., and Shulman, G.I. (2003). Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. Science *300*, 1140–1142.

Picard, F., Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W., Chambon, P., and Auwerx, J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. Cell *111*, 931–941.

Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Pfister, V., Heyberger, S., Scheuer, I., Chambon, P., and Gaub, M.P. (1994). Detection of retinoid X receptors using specific monoclonal and polyclonal antibodies. Biochem. Biophys. Res. Commun. 204, 525–536.

Roy, B., Taneja, R., and Chambon, P. (1995). Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell differentiation by an RA receptor alpha (RAR alpha)-, RAR beta-, or RAR gamma-selective ligand in combination with a retinoid X receptor-specific ligand. Mol. Cell. Biol. *15*, 6481–6487.

Schuler, M., Ali, F., Metzger, E., Chambon, P., and Metzger, D. (2005). Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. Genesis *41*, 165–170.

Staiger, H., Staiger, K., Haas, C., Weisser, M., Machicao, F., and Haring, H.U. (2005). Fatty acid-induced differential regulation of the genes encoding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha and

## SHORT ARTICLE

-1beta in human skeletal muscle cells that have been differentiated in vitro. Diabetologia 48, 2115–2118.

Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R.X., Tachibana, K., et al. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid betaoxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 15924–15929.

Tanner, C.J., Barakat, H.A., Dohm, G.L., Pories, W.J., MacDonald, K.G., Cunningham, P.R., Swanson, M.S., and Houmard, J.A. (2002). Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *282*, E1191–E1196.

Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. EMBO J. *17*, 507–519.

Wang, Y.X., Lee, C.H., Tiep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H., and Evans, R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. Cell *113*, 159–170.

Wang, Y.X., Zhang, C.L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., Ham, J., Kang, H., and Evans, R.M. (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. PLoS Biol. 2, e294.

Wisloff, U., Najjar, S.M., Ellingsen, O., Haram, P.M., Swoap, S., Al-Share, Q., Fernstrom, M., Rezaei, K., Lee, S.J., Koch, L.G., and Britton, S.L. (2005). Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. Science *307*, 418–420.

Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., and Spiegelman, B.M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell 98, 115–124. Cell Metabolism, Volume 4

## Supplemental Data

# PGC1 $\alpha$ expression is controlled in skeletal muscles by PPAR $\beta$ , whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes

Michael Schuler, Faisal Ali, Céline Chambon, Delphine Duteil, Jean-Marc Bornert, Aubry Tardivel, Béatrice Desvergne, Walter Wahli, Pierre Chambon, and Daniel Metzger

## Results

## Generation of PPAR $\beta^{skm-/-}$ and PPAR $\beta^{(i)skm-/-}$ mice

PPARβ<sup>L2/+</sup> mice were intercrossed with HSA-Cre<sup>tg/0</sup> transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the human skeletal muscle α-actin promoter (Miniou et al., 1999) to produce HSA-Cre<sup>tg/0</sup>/PPARβ<sup>+/+</sup>, HSA-Cre<sup>0/0</sup>/PPARβ<sup>L2/+</sup> and HSA-Cre<sup>0/0</sup>/PPARβ<sup>L2/L2</sup> control (CT) mice, as well as HSA-Cre<sup>tg/0</sup>/PPARβ<sup>L2/L2</sup> mutant (MT). Conversion of PPARβ L2 alleles into PPARβ L-alleles occured, shortly after birth (Cifuentes-Diaz et al., 2001), in all HSA-Cre<sup>tg/0</sup>/PPARβ<sup>L2L2</sup> mouse skeletal muscles analysed (quadriceps, gastrocnemius, soleus, tibialis and abdominal muscle), whereas no PPARβ L- alleles were present in liver or tail (Figures S1A and S1B; data not shown). Moreover, PPARβ transcripts were readily detected by RT-PCR in skeletal muscles of 10 week-old CT mice, but not of HSA-Cre<sup>tg/0</sup>/PPARβ<sup>L2L2</sup> mice (Figure S1C; data not shown), demonstrating that PPARβ was efficiently and selectively ablated in skeletal muscle of HSA-Cre<sup>tg/0</sup>/PPARβ<sup>L2L2</sup> mutant mice, also called PPARβ<sup>skm-/-</sup>. No compensatory increase of PPARα and PPARγ expression was observed in skeletal muscles of PPARβ<sup>skm-/-</sup> mice (data not shown).

To selectively ablate PPAR $\beta$  in adult mouse skeletal muscle myocytes, PPAR $\beta^{L2/+}$  mice were intercrossed with HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> mice (Schuler et al., 2005), to generate HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/PPAR $\beta^{L2/L2}$  mice that were treated with Tamoxifen at 8 weeks (Metzger et al., 2005) (PPAR $\beta^{(i)skm-/-}$ ). Vehicle-treated HSA-Cre-ER<sup>T2(tg/0)</sup>/PPAR $\beta^{L2/L2}$  and Tamoxifen-treated PPAR $\beta^{L2/L2}$  mice were used as controls.

## **Experimental Procedures**

## Mice

The detailed description of the generation of PPAR $\beta^{L2/+}$  mice bearing one WT PPAR $\beta$  allele and one PPAR $\beta$  L2 allele, in which exon 4, encoding the N-terminal motif of the zinc finger motif of the DNA binding domain, is flanked by LoxP sites (floxed), will be presented elsewhere. Excision of the floxed PPAR $\beta$  exon 4 DNA segment was determined by Southern blotting on BgIII restricted DNA isolated from mouse tissues, with a 600 bp radiolabelled DNA segment amplified from mouse genomic DNA by PCR with the oligonucleotides 5'-AACGCCTACCTGAAAAACTT-3' and 5'-CCCCCTCACTCCACACAGAA-3'.

Exercise performance tests were performed on a motorized treadmill (LE 8700; Control Panlab Instrument). 43 week-old animals were accustomed to treadmill running for 3 days (10 min runs in the morning and in the afternoon; day 1, no incline and 15 cm/s belt speed in the morning and 20 cm/s in the afternoon; day 2, 10° incline and 20 cm/s belt speed in the morning and 25 cm/s in the afternoon; day 3, 15° incline and 25 cm/s belt speed). At day 4, following a warm up phase of 10 min (0° incline, 25 cm/s belt speed), animals were run for 50 min at a 15° incline and a belt speed of 25 cm/s, followed by 30 min at 20° incline and 28 cm/s. Thereafter, the belt speed was increased for 3 cm/s every 30 min, untill the animals were exhausted, as determined by their incapability to resist repetitive electrical shocks (Pederson et al., 2005).

## **RNA** preparation and analysis

RNA was isolated using RNA-Solv® Reagent (Omega Biotek). Five µg RNA were converted to cDNA with SuperScript<sup>™</sup> II reverse transcriptase (Invitrogen<sup>™</sup> life technologies) and oligo dT24 primers. Quantitative RT-PCR was performed by using the QuantiTect<sup>™</sup> SYBR® Green PCR kit (Qiagen S.A., France) according to the supplier's protocol. 36B4 RNA was used as an internal control. Sequences of primers are available upon request .

## Enzyme activity analysis in tissue extracts

Animals were killed at the end of the dark cycle and cell extracts from tibialis muscle were prepared by tissue homogenisation with a blender in a 1:20 dilution (w/v) of 150 mM phosphate buffer pH 7.6. After a 20 min incubation at 4°C, homogenates were centrifuged for 15 min at 2500 rpm, and lactate dehydrogenase (LDH), citrate synthase (CS) and  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase ( $\beta$ -HAD) activities were determined on the supernatants (Bass et al., 1969).

## **Plasmids**

pSG5-RXR $\alpha$  and -PPAR $\beta$  expression vectors were obtained by cloning the corresponding murine cDNAs into pSG5 (Green et al., 1988; Leid et al., 1992). pGL-PGC1 $\alpha$  was constructed by cloning a 4 kb DNA segment encompassing the PGC1 $\alpha$  promoter (nt 48952 – nt 52960; Genebank accession number: AC107227) that was PCR amplified from mouse genomic DNA with the oligonucleotides 5'-CGGGGTACCCAAGCATTCTGAGGACCATA-3' and 5'-

GGAAGATCTTTTTCAACTCCAATCCACTC-3', into the KpnI and BgIII restriction sites of the pGL3-basic vector (Promega). pGL-PGC1 $\alpha$ m, in which 2 nucleotides of each half site of the PGC1 $\alpha$  PPRE are mutated (see Fig. 2), was obtained by PCRmeditated site-directed mutagenesis. To mutate the 5' and 3' PPRE half site, a 477 bp and a 275 bp PCR product was amplified from pGL-PGC1 $\alpha$  with the primers 5'-AGCCCATGAGGTTTGTGGTGAATTTTAATA-3' and 5'-

AATACAGTAAAGTGAAAGAAAGAAATGCAG-3', and 5'-

AATCAGTGTGAGCAAGTTAAGATATCAAAA-3' and 5'-

TATTAAAATTCA<u>CC</u>ACAAACCTCATGGGCT-3' (the modified nucleotides are underlined), respectively. After overlap and extension, the resulting 722 bp PCR product was restricted with EcoRV and Spel, and ligated into the identically restricted pGL-PGC1 $\alpha$  vector.

## References

Bass, A., Brdiczka, D., Eyer, P., Hofer, S., and Pette, D. (1969). Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. Eur J Biochem *10*, 198-206.

Cifuentes-Diaz, C., Frugier, T., Tiziano, F. D., Lacene, E., Roblot, N., Joshi, V., Moreau, M. H., and Melki, J. (2001). Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. J Cell Biol *152*, 1107-1114.

Green, S., Issemann, I., and Sheer, E. (1988). A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering. Nucleic Acids Res *16*, 369.

Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J. Y., Staub, A., Garnier, J. M., Mader, S., and et al. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. Cell *68*, 377-395.

Metzger, D., Li, M., and Chambon, P. (2005). Targeted somatic mutagenesis in the mouse epidermis. Methods Mol Biol *289*, 329-340.

Miniou, P., Tiziano, D., Frugier, T., Roblot, N., Le Meur, M., and Melki, J. (1999). Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. Nucleic Acids Res *27*, e27.

Pederson, B. A., Cope, C. R., Irimia, J. M., Schroeder, J. M., Thurberg, B. L., Depaoli-Roach, A. A., and Roach, P. J. (2005). Mice with elevated muscle glycogen stores do not have improved exercise performance. Biochem Biophys Res Commun *331*, 491-496.

Schuler, M., Ali, F., Metzger, E., Chambon, P., and Metzger, D. (2005). Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. Genesis *41*, 165-170.



Figure S1. Skeletal muscle-selective PPAR $\beta$  ablation

A) Schematic representation of the mouse PPAR $\beta$  locus (+ allele, upper), the floxed PPAR $\beta$  L2 allele (middle) and the Cre-mediated exon 4 deleted PPAR $\beta$  L- allele (lower). Primers for RT-PCR (P1 and P2), LoxP sites (arrowheads), BgIII restriction sites, the probe for Southern hybridization, and the length of BgIII genomic DNA restriction segments are shown.

B) Southern blot analysis of genomic DNA extracted from muscles (Q, quadriceps ; G, gastrocnemius ; T, tibialis; S, soleus ; A, abdominal), liver (li) and tail (t) of 9 week-old PPAR $\beta^{+/+}$ , PPAR $\beta^{L2L2}$  and HSA-Cre<sup>tg/0</sup>/PPAR $\beta^{L2L2}$  (PPAR $\beta^{skm-/-}$ ) mice. (C) RT-PCR analysis of PPAR $\beta$  transcripts in gastrocnemius muscles of two 10 week-old control (CT) and PPAR $\beta^{skm-/-}$  (MT) mice. 36B4 RNA was used as a reference.





**Figure S2.** Decreased exercise performance in PPAR $\beta^{\text{skm-/-}}$  mice. Total treadmill running time (A) and distance (B) of 10 month-old CT and MT mice (n = 6-9). Note that the average absolute running time of CT mice is 220 minutes. Open bars: CT; Filled bars : MT; \* p < 0.05.

## DISCUSSION

Le muscle squelettique représente chez les mammifères 55% de la masse corporelle. Ses propriétés d'excitabilité, de contractilité et d'élasticité, lui permettent de générer force et mouvements, permettant à l'être vivant de se déplacer au sein de son environnement. Par ailleurs, il possède une fonction métabolique essentielle. C'est un site majeur d'utilisation du glucose et des acides gras qui constituent l'énergie nécessaire à la contraction musculaire. Cependant, malgré son importance physiologique, les mécanismes concernant son fonctionnement, particulièrement à l'âge adulte, demeurent mal connus. L'objectif de ce travail de thèse était de mieux caractériser les deux aspects fonctionnels du muscle : le contrôle de la masse et de la force musculaire d'une part, et le contrôle du métabolisme énergétique d'autre part.

Pour y parvenir, nous nous sommes intéressés aux rôles d'une classe de facteurs de transcription, les récepteurs nucléaires, et à ceux de leurs co-régulateurs. Parmi les membres de cette famille multigénique, je me suis intéressée au récepteur des glucocorticoïdes (GR) et à une de ces co-régulateurs, les co-activateurs des récepteurs aux stéroïdes (SRCs).

## I. Les co-régulateurs TIF2 et SRC-1 régulent la balance énergétique en modulant la respiration mitochondriale dans le muscle squelettique.

Les études des équipe des Pr. B O'Malley et J. Auwerx, concernant les souris TIF2-/-, avaient montré que TIF2 favorise la libération du glucose hépatique ainsi que l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux blanc, et régule négativement la thermogenèse adaptative dans le tissu adipeux brun (Chopra et al., 2008; Picard et al., 2002). Ces effets sont principalement attribués au fait que TIF2 stimule d'une part l'expression de la glucose-6 phosphatase dans les hépatocytes, en agissant en tant que co-activateur du récepteur nucléaire orphelin ROR $\alpha$ , et d'autre part, en modulant la prise en charge et le stockage des acides, via PPAR $\gamma$ , dans les adipocytes blancs, et en entrant en compétition avec SRC-1 pour la formation du complexe PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\gamma$  dans les adipocytes bruns.

Nous avons montré dans cette étude que TIF2 possède également un rôle métabolique majeur dans les muscles squelettiques. En effet, l'ablation sélective de TIF2 dans ce tissu résulte en une augmentation de la dépense énergétique, via un découplage entre la consommation d'oxygène et la production d'ATP au sein de la mitochondrie. Sous un régime standard, la prise alimentaire des souris mutantes TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> est augmentée afin de palier les besoins énergétiques de leurs muscles striés, et de maintenir un poids stable. De plus, l'augmentation de la dépense énergétique protège partiellement ces souris contre l'obésité

induite par un régime hypercalorique. Ainsi, TIF2 semble coordonner la balance énergétique dans les différents tissus jouant un rôle au niveau métabolique, en activant le stockage des acides gras dans le tissu adipeux blanc et en limitant la dissipation d'énergie dans le tissu adipeux brun et le muscle squelettique dans le cas d'une alimentation standard, et en favorisant la production de glucose hépatique lors d'une mise à jeun.

Cependant, alors que l'étude de Picard et coll. montre que l'absence constitutive de SRC-1 rend les souris plus promptes à développer une obésité sous une alimentation riche en graisses, du fait d'une diminution de leur thermogenèse adaptative (Picard et al., 2002), les souris SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup> ont une température et un poids similaire à celui des souris contrôles, que ce soit dans le cas d'une alimentation standard ou hypercalorique. Cependant, Wang et coll. n'observent pas de différences significatives entre le phénotype des souris contrôles et des souris SRC-1-/- (Wang et al., 2006b), suggérant que l'absence de SRC-1 n'a pas d'effets délétères majeurs au niveau du muscle squelettique chez la souris. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons également généré des souris SRC-1<sup>skm-/-</sup> dans lesquelles l'ablation de SRC-1 est faite de manière constitutive dans le muscle squelettique. Contrairement aux souris SRC-1<sup>(i)skm-/-</sup>, les souris SRC-1<sup>skm-/-</sup> nous permettront de connaître la contribution développementale de SRC-1 dans les myocytes.

Nos données montrent également que les niveaux d'UCP3 sont doublés dans les myocytes des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, et différentes études ont rapporté que la surexpression de cette protéine augmentait le découplage mitochondrial, la production de chaleur au niveau musculaire et réduisait la prise de poids dans le cas d'un régime alimentaire riche en graisse (Clapham et al., 2000; Son et al., 2004; Tiraby et al., 2007). Ainsi, l'augmentation du découplage mitochondrial des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> pourrait résulter, au moins en partie, de ces niveaux plus élevés d'UCP3. Par ailleurs, il est probable que la surexpression d'UCP2 dans les muscles squelettiques des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> puisse contribuer à l'augmentation de la thermogenèse (Schrauwen and Hesselink, 2002). Cependant, si, comme il a été décrit dans d'autres études (Bezaire et al., 2005; Cadenas et al., 2002), UCP3 et UCP2 n'induisent pas de découplage mitochondrial, il est possible que TIF2 régule négativement l'expression d'une ou plusieurs autres protéines découplantes au niveau musculaire. Quelque soit l'hypothèse envisagée, nos résultats montrent que TIF2 limite la fuite protonique dans les muscles, optimisant ainsi le couplage entre l'oxydation et la phosphorylation.

Du fait que l'expression d'UCP3 est régulée par différents récepteurs nucléaires interagissant avec les co-régulateurs de la famille des p160, incluant le récepteur activé par les proliférateurs des peroxisomes  $\beta$  (PPAR $\beta$ ) (Acin et al., 1999; Gong et al., 1997; Solanes et al., 2003), TIF2 pourrait réprimer l'activité de ce récepteur dans les myofibres du muscle

## DISCUSSION

squelettique. Cependant, nos expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisées dans des cellules musculaires de souris C2C12 n'ont pas révélé la présence à l'état endogène de TIF2 sur les segments d'ADN entourant les éléments de réponse à PPAR<sub>β</sub> (PPRE), localisés sur la région promotrice d'UCP3, en présence ou absence du ligand de PPAR<sub>β</sub> GW501516. De plus, alors que les niveaux de TIF2 sont fortement diminués dès la première semaine suivant l'ablation du gène, les niveaux des transcrits d'UCP3, de même que ceux d'UCP2 et PGC-1a, ne sont augmentés qu'un mois après, indiguant ainsi que la protéine TIF2 endogène pourrait ne pas réprimer leur expression de manière directe dans de conditions basales. Par ailleurs, nous avons trouvé que les niveaux de SRC-1 sont augmentés précocement suite à l'ablation de TIF2, suggérant ainsi fortement que SRC-1 serait capable de stimuler l'expression d'UCP3. Cette hypothèse a été étayée par une étude en cellule C2C12 différenciées, dans lesquelles la surexpression de SRC-1 promeut la liaison de SRC-1 au segment d'ADN du promoteur d'UCP3 contenant le PPRE. augmentant de ce fait l'expression de ce gène. Ainsi, bien que les niveaux d'UCP3 soient inchangés dans les souris déficientes pour SRC-1 dans les muscles squelettiques. l'activation transcriptionnelle d'UCP3 dans les fibres déplétées en TIF2 est dépendante de SRC-1. Ainsi, ces données indiquent que les niveaux endogènes de SRC-1 et TIF2 n'exercent qu'un faible contrôle de la transcription d'UCP3 en conditions basales, alors que la surexpression de SRC-1 augmente son expression. Nos données in vitro montrent également que la surexpression de TIF2 contre l'induction d'UCP3 causée par SRC-1 en l'absence de ligand PPAR<sub>β</sub>, mais n'inhibe pas l'augmentation des niveaux d'UCP3 induite par le GW501516. Ainsi, en fonction de son niveau d'expression et de la présence de ligand PPAR $\beta$ , soit TIF2 ne module pas l'expression d'UCP3, soit il agit en tant que co-répresseur transcriptionnel, alors que SRC-1 stimule l'expression d'UCP3, vraisemblablement en coactivant PPAR $\beta$ .

Du fait que la plupart des défauts induits par l'absence de TIF2 dans les fibres musculaires sont dépendants de SRC-1, et que la surexpression d'UCP3 dans ce tissu génère des défauts proches de ceux observés chez les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> (Clapham et al., 2000; Son et al., 2004; Tiraby et al., 2007), nos données suggèrent fortement que TIF2 contrôle d'importants fonctions métaboliques au sein du muscle strié en limitant les niveaux de SRC-1, et par conséquent ceux d'UCP3, réduisant ainsi le découplage mitochondrial. Ces données montrent également que TIF2 et SRC-1 ont des effets opposés sur de nombreux gènes tels que PGC-1 $\alpha$ , mCPT1 et LPL, indiquant que ces co-régulateurs régulent de façon fine de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme. Il reste maintenant à déterminer si

les niveaux de TIF2 et SRC-1 sont modifiés dans des conditions physiopathologiques dans le muscle squelettique, et comment TIF2 contrôle les niveaux de SRC-1.

En accord avec les études précédentes (Figueiredo et al., 2009; Zoll et al., 2002), nos résultats montrent que les propriétés contractiles et métaboliques des muscles striés sont fortement affectées par un mode de vie sédentaire. En effet, les capacités oxydatives des souris contrôles diminuent progressivement entre 11 et 30 semaines, et cette diminution est associée à une conversion des fibres lentes en rapides. La cause de ces changement demeure inconnue, mais le stress oxydant et les dommages de la mitochondrie pourraient jouer un rôle majeur dans l'apparition du phénotype (Figueiredo et al., 2009; Short et al., 2005).

Contrairement à ce que l'on observe chez les souris contrôles, les capacités musculaires, aussi bien métaboliques que contractiles, sont maintenues chez les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> au cours du même laps de temps, et, contrairement aux souris sauvages, les mutants sont partiellement protégés contre le diabète de type 2. Le senseur des faibles niveaux d'ATP cellulaire, AMP kinase (AMPK), qui est stimulé en cas de restriction calorique ainsi que pendant l'exercice d'endurance pour activer le métabolisme oxydatif dans le muscle squelettique, est constitutivement activé dans les muscles des souris sédentaires des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, démontrant que ceux-ci sont dans un état de faible énergie cellulaire, et ce de manière chronique.

En accord avec les études précédentes montrant que l'AMPK, une fois activée, va induire les voies du métabolisme oxydatif (Jager et al., 2007), nous montrons que sa cible, l'acétylCoA carboxylase (ACC), est également constitutivement active dans les muscles des souris TIF2<sup>(I)skm-/-</sup>, augmentant de ce fait l'activité de mCPT1, l'enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation, et ainsi la consommation d'acide gras. AMPK induit également l'expression de PGC-1 $\alpha$ , un facteur clef de la stimulation du métabolisme oxydatif. Les niveaux de transcrits de PGC-1 $\alpha$  augmentent progressivement chez les souris TIF2<sup>(I)skm-/-</sup>, probablement du fait de l'augmentation des niveaux de SRC-1. De plus, l'augmentation d'activité de PGC-1 $\alpha$ , en étant phosphorylé par AMPK une fois actif d'une part (Jager et al., 2007), et désacétylé par SIRT1, sous la dépendance d'AMPK, d'autre part (Canto and Auwerx, 2009b) pourrait davantage stimuler la phosphorylation oxydative dans les muscles des souris TIF2<sup>(I)skm-/-</sup>. En effet, PGC-1 $\alpha$ , en co-activant de nombreux facteurs de transcription, stimule sa propre expression, mais aussi celle d'UCP2 et 3, ainsi que celle de nombreux facteurs contrôlant la formation et la maintenance des fibres lentes oxydatives (Arany, 2008; Puigserver et al., 2001; Rohas et al., 2007; St-Pierre et al., 2003; Wu et al., 1999). Ainsi, l'absence de TIF2, en

augmentant les niveaux de SRC-1, induit probablement un rétrocontrôle positif qui active le découplage mitochondrial et le métabolisme oxydatif. L'activation transcriptionnelle de mCPT1, induite par l'augmentation des niveaux de PGC-1α (Zhang et al., 2004) et/ou SRC-1 (voir ci-dessus), combinée à la dérépression de son activité par AMPK phosphorylée (Hoehn et al., 2010; Viollet et al., 2009), pourrait être un événement clef pour la stimulation du métabolisme oxydatif musculaire des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>. Il est notable que l'augmentation de l'activité mitochondriale est suffisante pour maintenir les niveaux énergétiques dans le muscle squelettique des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> pour une durée supérieure à deux mois dans des conditions de vie sédentaires, mais pas au cours d'un exercice d'endurance, et que la biogenèse mitochondriale est stimulée seulement à long terme.

En conclusion, la présente étude démontre que TIF2 limite le découplage mitochondrial afin d'optimiser la production d'ATP au cours de la phosphorylation oxydative dans les muscles squelettiques, principalement en maintenant de faibles niveaux de SRC-1 dans les myofibres. Ainsi, TIF2 possède un effet bénéfique chez les animaux sauvages, pour lesquels la nourriture est limitante et les besoins énergétiques élevés. Au contraire, dans des conditions de vie sédentaire et d'excès alimentaire, deux caractéristiques des sociétés industrialisées, l'optimisation de la production d'énergie induite par TIF2 dans les fibres du muscle squelettique, induit une conversion des fibres lentes oxydatives en fibres rapides glycolytiques, conduisant à un diabète de type 2 et au développement d'une obésité, conférant ainsi à TIF2 un effet délétère pour la santé. Diminuer l'efficacité métabolique par une réduction de l'activité de TIF2 ou augmentation de celle de SRC-1 dans les muscles striés représente ainsi une stratégie attractive pour contrer les désordres métaboliques induits par un mode de vie occidentalisé, tels que l'obésité et le diabète de type 2, même si le fait de pratiquer un exercice d'endurance sera compromis.

II. Les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> sont protégées contre le stress oxydant induit par l'ischémie/reperfusion et ont une longévité augmentée.

## a. Les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> ont une longévité augmentée.

Un autre aspect intéressant chez les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> est l'augmentation des niveaux et de l'activité de PGC-1α. En stimulant ainsi la synthèse de protéines mitochondriales, cette augmentation pourrait faciliter le remplacement des protéines endommagées par les ROS, et de ce fait contribuer à la préservation des fonctions mitochondriales. En effet, une faible augmentation des niveaux de PGC-1α dans les muscles squelettiques de souris adultes permet de maintenir les fonctions mitochondriales ainsi que l'intégrité musculaire de souris âgées (Wenz et al., 2009). De manière intéressant, les modifications phénotypiques observées chez les souris sédentaires TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> sont similaires à celles observées lors d'une restriction calorique prolongée, la seule condition environnementale qui augmente de façon constitutive la durée de vie chez les Mammifères (Canto and Auwerx, 2009a). Nos études en cours suggèrent que la longévité des souris sédentaires TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> est augmentée (Figure 1).



Figure 1 : Etude de la longévité des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> par rapport aux souris contrôles.

## b. Les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> sont protégées contre le stress oxydant induit par l'ischémie/reperfusion.

En diminuant faiblement la force protonmotrice, le découplage mitochondrial dans les muscles squelettiques des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> pourrait atténuer la production mitochondriale de radicaux libres ou ROS (reactive oxygen species), et protéger ainsi la cellule contre les dommages qu'ils occasionnent (Brand and Esteves, 2005). L'ischémie consiste en une diminution de l'approvisionnement en sang, et donc en une privation des organes en oxygène, glucose et autres métabolites. Elle génère une nécrose sévère des zones fortement irriquées telles que le cerveau, le cœur et le muscle squelettique. A l'inverse, l'apport en sang augmente brusquement durant la reperfusion, ce qui résulte en une augmentation des stress inflammatoire et oxydant, causant ainsi une forte production de ROS (Chan, 1996). L'ischémie et la reperfusion peuvent conduire à de sévères problèmes de santé, tels que l'infarctus du myocarde, ou à des complications au cours d'une transplantation d'organes (Garcia et al., 1996; Goode et al., 1994). Le lien entre production de ROS et capacités oxydatives des fibres musculaires reste controversé. En effet, il a été proposé que la modification métabolique d'un mode oxydatif vers une production d'ATP anaérobique limitait non seulement les effets délétères des ROS, mais protégeait également les myofibres contre le stress causé par l'ischémie/reperfusion, montrant ainsi que les dommages myofibrillaires sont plus sévères dans les fibres oxydatives (Aragones et al., 2008). Cependant, d'autres études ont montré que davantage de fibres de type 2 causait une augmentation de la production de radicaux libres par la mitochondrie (Anderson and Neufer, 2006).

Du fait de la reprogrammation génétique du métabolisme basal des souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, nous nous sommes intéressés à la réponse de ces souris vis-à-vis de l'ischémie/reperfusion (Figure 2A). Ainsi, en collaboration avec l'équipe du Pr. Bernard Gény, un groupe de 10 souris contrôles et 10 souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> a subi deux heures d'ischémie, causée par une ligation fémorale, suivies de deux heures de reperfusion. De manière intéressante, lorsque des souris contrôles sont soumises au stress de l'ischémie/reperfusion, les niveaux de transcrits TIF2 et SRC-3 sont fortement augmentés, renforçant l'idée d'un rôle des p160 dans le stress oxydant (Figure 2B). Au cours de l'ischémie, du fait que l'oxygène ne peut pas atteindre les tissus, le muscle entre en état d'hypoxie. Ainsi, nous avons d'abord observé que la respiration mitochondriale des animaux contrôles était fortement affectée par l'ischémie/reperfusion (Figure 2C et 2D), contrairement aux souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>. Par ailleurs, une coloration de la structure musculaire à l'hématoxyline de Harris et à l'éosine sur des coupes congelées de tibialis n'a pas révélé de différences entre contrôles et mutants non

## DISCUSSION

opérées (sham) (Figure 2E). Cependant, lorsque les souris contrôles sont soumises à l'ischémie/reperfusion, on observe une augmentation de l'espace intercellulaire, probablement due au stress inflammatoire, mais aussi des fibres entrant en nécrose ou en apoptose, dans lesquelles la membrane s'invagine et la structure de la myofibre n'est plus conservée (Figure 2E). En revanche, les muscles des souris mutantes semblent protégés contre ces dommages, et leurs muscles conservent une structure ordonnée (Figure 2E).

Les ROS sont connus pour interférer avec le métabolisme mitochondrial, pour oxyder les macromolécules, causer des mutations dans l'ADN, le vieillissement et la mort cellulaire (Ott et al., 2007). L'ischémie/reperfusion conduit à une destruction tissulaire, principalement via une production massive de ROS (Droge, 2002). Afin de déterminer l'augmentation de la production de ROS dans les muscles des animaux contrôles et mutantes, « sham » ou ischémiques, une coloration au dihydroéthidium (DHE) est appliquées sur des cryosections de tibialis. Le DHE est une molécule fluorescente qui interagit spécifiquement avec les ions superoxydes intracellulaires et est convertie en éthidium qui lie les doubles brins d'ADN (Miller et al., 1998). L'ischémie/reperfusion génère une grande quantité d'ion superoxyde chez les souris contrôles ; mais, bien que le signal soit également détecté chez les souris mutantes, il reste inférieur à celui des souris contrôles (Figure 2E et 2F).

La défense contre les ROS s'effectue en partie via les enzymes superoxide dismutase (SOD1 à 3) et Gluthation Peroxidase (GPx). Les SOD catalysent la dismutation de l'ion superoxyde, conduisant à la production de peroxyde d'hydrogène. La GPx réduit le péroxyde d'hydrogène pour former de l'eau, réduisant ainsi les effets délétères des ROS. Les niveaux des messagers de ces enzymes sont fortement augmentés chez les souris contrôles, suggérant leur besoin d'activer les mécanismes de défense contre une production excessive de ROS (Figure 2G). Au contraire, les niveaux de messagers des souris mutantes ischémiques restent similaires à ceux des souris mutantes « sham » (Figure 2G).

Les dommages occasionnés par l'ischémie/reperfusion activent également la mise en place de la réponse inflammatoire. Lors de la reperfusion, la soudaine accumulation de cellules immunitaires, causée par l'afflux sanguin, augmente encore cette réponse inflammatoire et, de ce fait, les dommages qu'elle occasionne. Afin de l'analyser, les niveaux des messagers de l'interleukine 6 (IL-6), des facteurs de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) et  $\beta$  (TNF $\beta$ ) ont été mesurés dans les muscles de souris contrôles et mutantes avant et après ischémie/reperfusion. L'IL-6 est une cytokine produite par le muscle squelettique. Ces niveaux sont fortement augmentés chez les contrôles ischémiques par rapport aux contrôles « sham », mais demeurent similaires chez les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> (Figure 2G). TNF $\alpha$  et TNF $\beta$  sont impliqués dans l'inflammation systémique, et largement exprimés dans les cellules

immunitaires, et ont un rôle important dans l'induction de l'apoptose. Leurs transcrits sont également fortement augmentés suite à l'ischémie/reperfusion chez les souris contrôles, contrairement aux souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> (Figure 2G).

Ainsi, ces résultats préliminaires indiquent que les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> sont protégées contre les effets délétères de l'ischémie/reperfusion. Cette étude sera poursuivie par l'étude des voies de signalisation conduisant à ce phénotype. Il est possible que les effets observés soient causés par une diminution des protéines Hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) prolyl hydroxylases (Phd) 1 à 3 (Figure 2G). En effet, il a été montré qu'une diminution de Phd1 protégeait les myocytes de l'ischémie/reperfusion (Aragones et al., 2008). De plus. même si les niveaux des messagers de Bax et Bcl2, deux facteurs impliqués dans l'apoptose, sont diminués chez les souris TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, il convient d'étudier leurs niveaux de phosphorylation afin de connaître leur activité. Nous pensons également caractériser davantage le phénotype des souris à l'ischémie/reperfusion en analysant les niveaux musculaires en caspase 3, un margueur d'apoptose, déterminer les cellules hypoxigues en utilisant un marquage au pimonidazole (détecté par l'anticorps Hydroxyprobe-1), ainsi que d'autres tests permettant de caractériser la prolifération cellulaire et la nécrose (marquage au Ki67, coloration au nitroblue tetrazolium). De plus, une étude en cours avec l'équipe du professeur Gény nous permettra de connaître la production de  $H_2O_2$ , mais aussi d'évaluer l'ouverture du pore de transition de la mitochondrie, qui est un signal pro-apoptotique. Il sera par ailleurs intéressant d'analyser de la même manière les effets de l'ischémie simple, ainsi que la facon dont les muscle des contrôles et les mutants récupèrent suite à un tel stress, et le rôle des autres p160, principalement SRC-3, dans le stress oxydant. Cette étude devrait ainsi permettre de mieux comprendre les voies de signalisation dans lesquelles les p160 sont impliqués, mais aussi de mettre en évidence de nouvelles pistes pour le traitement de nombreuses maladies impliquant une hypoxie telles que l'infarctus du myocarde.



**Figure 2 : Les souris TIF2**<sup>(i)skm-/-</sup> **sont résistantes au stress induit par l'ischémie/reperfusion.** A. Schéma représentatif de l'ischémie-reperfusion dans le muscle squelettique chez la souris. B. Niveaux relatifs des ARNs messagers des co-régulateurs de la famille des p160 au cours de l'ischémie-reperfusion chez des animaux contrôles et TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>. C. Consommation d'oxygène sur fibres isolées de quadriceps de souris contrôles et TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>, en absence (V0) et présence (VMAX) d'ADP, et de différents substrats (glutamate et malate pour V0 et VMAX, succinate et TMPD/ascorbate). D. Pourcentage de diminution de la consommation d'oxygène après ischémie chez des souris contrôles et TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> pour les différents complexes mitochondriaux. E. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine et au DHE de tibialis de souris contrôles et TIF2<sup>(i)skm-/-</sup> avant (sham) et après ischémie reperfusion. F. G. Niveaux relatifs des ARNs messagers defacteurs intervenant dans le stress oxydant (SOD1, 2 et 3, et GPTX), l'inflammation (IL6, TNF $\alpha$  et  $\beta$ ) et l'apoptose (BCL2, BAX et PHD1 à 3) au cours de l'ischémie-reperfusion chez des animaux contrôles et TIF2<sup>(i)skm-/-</sup>.

## III. SRC-3 n'est pas le régulateur métabolique majeur dans le muscle chez la souris.

Comme il a été montré précédemment, les niveaux de transcrits de SRC-3 sont fortement augmentés chez les souris contrôles suite aux dommages causés par l'ischémie/reperfusion. Nous avons ainsi généré des souris SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup>, dans lesquelles l'expression de SRC-3 est sélectivement abolie de manière inductible dans les muscles squelettiques de souris adultes. Avant d'analyser la réponse à l'ischémie/reperfusion de ces animaux, nous avons d'abord étudié leurs caractéristiques métaboliques en conditions basales. Nos données suggèrent cependant que, parmi les trois membres de la famille des p160, TIF2 serait le co-régulateur principal dans les muscles squelettiques à l'âge adulte. En effet, bien que l'étude de Costes et coll. montre que les souris SRC-3-/- sont maigres et résistantes à l'obésité induite par une alimentation hypercalorique, du fait d'une augmentation du métabolisme oxydatif dans les myofibres (Coste et al., 2008), nos résultats ne montrent aucune différence entre les muscles et le métabolisme des souris contrôles et des souris SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup>. En effet, le poids des souris SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> est similaire à celui des souris contrôles (Figure 3A), de même que le poids et la structure des muscles et des tissus adipeux blanc et brun (Figure 3B et 3C). De plus, alors qu'aucune compensation par les autres p160 n'a lieu (Figure 3D), nous n'observons pas de défauts au niveau de la thermogenèse des souris SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> (Figure 3E et 3F). De plus, les niveaux de glucose ainsi que les niveaux d'expression du transporteur de glucose Glut4 et ceux de l'enzyme PFK sont similaires entre les souris contrôles et les souris SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> (Figure 3G et 3H). Par ailleurs, lorsqu'elles sont soumises à un régime hypercalorique, les souris SRC-3(i)skm-/développent une obésité comme les souris contrôles (Figure 3I), et leurs niveaux de glucose sont identiques (Figure 3J). Contrairement aux souris SRC-3-/-, dont les capacités oxydatives sont augmentées, nous n'avons relevé aucune différence dans l'activité de la NADH déshydrogénase (Figure 4A), dans l'expression des gènes codant pour les enzymes des différents complexes mitochondriaux (Figure 4B), pour la biogenèse mitochondriale (Figure 4C), pour l'oxydation des acides gras (Figure 4D), ou pour les gènes activant le métabolisme oxydatif (Figure 4E). De plus, aucune différence dans les capacités contractiles n'a pu être mise en évidence (Figure 4F). Ces résultats indiquent que les défauts observés dans les muscles des souris SRC-3-/- sont probablement secondaires aux effets de la mutation dans d'autres organes métaboliques comme la graisse ou le foie, ou sont principalement développementaux. Afin de tester cette dernière hypothèse, nous générons actuellement des souris comportant une mutation constitutive de SRC-3 dans les myofibres.

Du fait que les niveaux de SRC-3 sont fortement augmentés chez les souris contrôles suite au stress généré par l'ischémie/reperfusion, et que SRC-3 est surexprimé dans de nombreux cancers (Anzick et al., 1997; Torres-Arzayus et al., 2004), nous souhaitons également observer la réaction des souris SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> face à ce stress. Comme ces souris n'ont pas de phénotype métabolique apparent, cette étude nous permettra de dissocier les effets du stress oxydant des capacités oxydatives de l'animal.



**Figure 3 : Les souris SRC-3**<sup>(i)skm-/-</sup> n'ont pas de défauts de thermogenèse. A. Poids des souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> sur une période allant de 12 à 35 semaines d'âge nourries avec une alimentation standard. B. Poids des différents muscles (gastrocnemius, soleus, tibialis, quadriceps et bulbocaverneux) et des tissus adipeux blanc et brun de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines. C. Coloration à l'hématoxyline-éosine de la structure des fibres musculaires du gastrocnemius et du soleus de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines. D. Niveaux relatifs d'ARNm des gènes codant pour différents p160 chez les souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines. E. Température corporelle de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines. F. Niveaux relatifs d'ARNm des gènes codant pour différents UCPs chez les souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines. G. Niveaux de glucose sanguin de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines. G. Niveaux de glucose sanguin de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines. J. Poids des souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines. J. Niveaux relatifs d'ARNm de GLUT4 et de la PFK chez les souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines d'âge nourries avec une alimentation hypercalorique. J. Niveaux de glucose sanguin de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées avec une alimentation hypercalorique. J. Niveaux de glucose sanguin de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> nourries avec une alimentation hypercalorique. J. Niveaux de glucose sanguin de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> nourries avec une alimentation hypercalorique. J. Niveaux de glucose sanguin de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> nourries avec une alimentation hypercalorique. J. Niveaux de glucose sanguin de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> nourries avec une alimentation hypercalorique. J. Niveaux de glucose sanguin de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> nourries avec une alimentation hy



**Figure 4 : Les capacités oxydatives des souris SRC-3**<sup>(i)skm-/-</sup> **ne sont pas modifiées**. A. Coloration de l'activité de la NADH déshydrogénase dans les parties lentes (slow) et rapides (fast) du gastrocnemius et dans le soleus de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines. B-F. Niveaux relatifs d'ARNm des gènes codant pour différentes sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale (B), de la biogenèse mitochondriale (C), de l'oxydation des acides gras (D), des senseurs métaboliques (E) et des protéines du cytosquelette contractile (F) de souris contrôles et SRC-3<sup>(i)skm-/-</sup> âgées de 25 semaines.

## IV. GR contribue à l'homéostasie musculaire chez la souris adulte

Bien que les glucocorticoïdes soient connus pour induire une atrophie musculaire, les mécanismes moléculaires par lesquels ils contrôlent la physiologie musculaire demeurent peu clairs. Nos résultats montrent que GR dans les myofibres non seulement transduisent le catabolisme musculaire induit par un traitement à la dexaméthasone et par une mise à jeun prolongée, mais exercent également des effets anti-anaboliques sur les fibres du muscle squelettique. Ces deux principaux points seront discutés ci-dessous.

## GR contrôle négativement les voies anaboliques dans les myofibres du muscle squelettique.

Nos résultats montrent que GR joue un rôle majeur dans l'homéostasie musculaire à l'âge adulte. En effet, nous avons démontré que dans des conditions basales, la masse et la force musculaires des souris GR<sup>(i)skm-/-</sup> étaient augmentées peu de temps après l'invalidation de GR, du fait d'une hyperplasie. Cette hyperplasie musculaire semble être indépendante d'IGF-I, du fait qu'aucune variation n'a été observée dans les niveaux de transcrits d'IGF-I dans les muscles des souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>. De plus, bien que les niveaux d'IGF-I soient négativement contrôlés par les glucocorticoïdes dans les muscles squelettiques, cette régulation est indépendante de GR dans les myofibres. En effet, suite à un traitement à la dexaméthasone ou à une mise à jeun prolongée, les niveaux transcriptionnels d'IGF-I diminuent de façon identique chez les souris contrôles et GR<sup>(i)skm-/-</sup>. De ce fait, les glucocorticoïdes pourraient contrôler de manière négative la production d'IGF-I soit via GR dans d'autres types de cellules musculaires comme les cellules satellites, soit de manière GR indépendante.

Du fait qu'Akt était hyper-phosphorylé chez les souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>, et ce malgré le fait qu'il n'y ait aucune différence dans les niveaux de transcrits d'IGF-I, il serait intéressant de tester les niveaux d'expression et/ou d'activité de la kinase responsable de l'activation d'Akt, PDK1, de même que celles de suppresseur de tumeurs PTEN, qui antagonise la voie PI3K (phosphoinositide 3 kinase)-Akt. Nous montrons également qu'au cours du catabolisme musculaire Akt est déphosphorylé sur la Thr308, mais hyper-phosphorylé sur la Ser473. La déphosphorylation d'Akt sur la Thr308 est cohérente avec une diminution des niveaux d'IGF-I, suite à un traitement à la dexaméthasone ou à un jeun prolongé. L'hyperphosphorylation d'Akt sur la Ser473 est quant à elle consécutive à une augmentation de l'activité mTORC2. Du fait que l'activité de mTORC1 est diminuée chez les souris contrôles dans ces conditions de stress, il semble que mTOR réside principalement dans le complexe mTORC2.

Il est intéressant de noter que les niveaux de REDD1 (voir pour revue (Ellisen, 2005)), un gène de réponse au stress activé au cours de l'hypoxie (Brugarolas et al., 2004), étaient diminués chez les souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>. Il a été montré que des niveaux réduits de REDD1 augmentaient la taille des cellules de Drosophile et de Mammifères (Reiling and Hafen, 2004; Sofer et al., 2005). Respectivement, des niveaux de REDD1 augmentés suite à un traitement aux glucocorticoïdes sont associés à une diminution de la taille cellulaire (Wang et al., 2006a; Wang et al., 2003b). Il a été montré que REDD1 régulait négativement l'activité de mTORC1 via les tuberous sclerosis complex 1 (TSC1) and 2 (TSC2) (Brugarolas et al., 2004; DeYoung et al., 2008; Ellisen, 2005). Dans cette étude, nous avons observé que l'activité de mTORC1 était augmentée suite à la diminution des niveaux d'epression de REDD1 chez les souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>, et réciproquement, nous avons trouvé que celle-ci était réduite chez les souris contrôles traitées à la dexaméthasone, ou suite à une mise à jeun prolongée, mais pas chez les souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>. L'activité de mTORC1 stimule la traduction des ARNm via les substrats S6K1 et 4E-BP1/elF4E (Beretta et al., 1996; Brunn et al., 1997; Gingras et al., 1998; Holz et al., 2005). La phosphorylation de 4E-BP1 par mTOR résulte en sa dissociation de eIF4E, permettant ainsi l'assemblage du complexe eIF4F et de ce fait la synthèse protéique (Gingras et al., 1998). De plus, il semble que S6K1 phosphoryle des régulateurs tels que eIF4B afin d'augmenter l'efficacité traductionnelle des ARNm possédant une extrémité 5'UTR structurée (Dorrello et al., 2006; Raught et al., 2004; Shahbazian et al., 2006). Ainsi, en limitant les niveaux de REDD1 dans les myofibres, l'absence de GR active la voie mTORC1 pour promouvoir la synthèse protéique et de ce fait augmenter la masse musculaire des souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>. Il serait intéressant de déterminer de quelle façon GR contrôle l'expression de REDD1 dans les myofibres. La séquence promotrice de REDD1 contient des éléments de régulation qui lient des facteurs de transcription tels que ELK1, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP), hepatic nuclear factor-4, NF-κB, p53 and HIF-1α (Lin et al., 2005b). Cependant, aucun élément de réponse à GR (GRE) n'a pour l'instant été découvert.

GR transduit de façon positive les voies cataboliques induites par un traitement à la dexaméthasone ou une mise à jeun prolongée dans le muscle squelettique.

Nous montrons que dans des conditions basales la perte de GR n'a pas de conséquences notoires sur les voies cataboliques. En effet, aucune variation n'a été détectée dans l'activité de FOXO3 ni de GSK3b, et aucune différence significative dans l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie, la voie des calpaïnes ou le protéasome n'a été trouvée chez les souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>. Il a été montré que la réduction des niveaux de GR

diminuait l'expression d'Atrogin1 et de Murf1 dans les cellules musculaires de souris C2C12, suggérant un rôle de GR dans le maintien des niveaux de base de ces ubiquitines ligases (Zhao et al., 2009). Il est possible qu'ils obtiennent ces résultats du fait qu'il réside de faibles concentrations de dexaméthasone dans le milieu de culture des cellules. Ceci a pu faiblement augmenter les niveaux d'expression d'Atrogin1 et de Murf1 dans les cellules contrôles, du fait que les cellules GR-/- sont incapables d'activer ces voies cataboliques, comme nous l'avons montré.

Nos résultats montrent également que l'ablation de GR dans les myofibres prévient la réduction de masse musculaire consécutive à un traitement à la dexaméthasone, et réduit fortement les effets d'une mise à jeun prolongée, montrant ainsi que la présence du récepteur est cruciale pour transduire les signaux atrophiques. Un traitement des muscles aux glucocorticoïdes induit un catabolisme musculaire en activant l'expression d'Atrogin1 et Murf1, à la fois *in vivo* et dans les cellules en culture (Bodine et al., 2001a; Clarke et al., 2007; Sacheck et al., 2004; Sandri et al., 2004; Schakman et al., 2008).

Un GRE a été identifié sur la région promotrice de Murf1 (Waddell et al., 2008), montrant que GR contrôle directement l'expression de MuRF1. Ceci est cohérant avec nos résultats qui montrent que Murf1 n'est pas induit après un traitement à la dexaméthasone ou un jeûne prolongé chez les souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>. Cependant, aucun GRE n'a jamais été décrit sur les promoteurs des autres gènes liés à l'atrophie musculaire (Lecker et al., 2004), même s'il a été prouvé que les glucocorticoïdes activent l'autophagie lysosomale en augmentant les niveaux d'expression de facteurs tels que Cathepsine L ou LC3 (Komamura et al., 2003; Laane et al., 2009). Comme aucune variation dans de tels gènes n'a été détectée chez les souris GR<sup>(i)skm-/-</sup> traitées à la dexaméthasone ou mises à jeun, il serait intéressant de déterminer si GR contrôle ces gènes au niveau transcriptionnel. L'augmentation des niveaux d'expression des gènes liés à l'atrophie musculaire suite à un traitement à la dexaméthasone ou une mise à jeun pourrait également être indirecte du fait que la présence de GR est essentielle pour l'activation de FOXO3 et de GSK3b qui régule positivement les voies de l'autophagie et du protéasome (Evenson et al., 2005; Mammucari et al., 2007; Sandri et al., 2004). Il sera intéressant de déterminer comment GR contrôle les activités de FOXO3 et de GSK3b dans les myofibres, et si des éléments de réponse à FOXO sont présents sur les régions promotrices des gènes liés à l'atrophie, comme c'est le cas pour Atrogin1, LC3 et BNIP3 (Mammucari et al., 2007; Sandri et al., 2004).

En résumé, nos résultats mettent en évidence la complexité de la voie de signalisation des glucocorticoïdes dans les muscles squelettiques. Nous montrons que GR régule

## DISCUSSION

finement la masse musculaire dans des conditions normales, et que c'est un inducteur essentiel de l'atrophie musculaire. Des rapports précédents ont montré que 15 jours de traitement au RU486, un antagoniste de GR, d'augmente pas la masse musculaire chez le rat (Pickering et al., 2003). De plus, le RU486 atténue la fonte musculaire dans certaines maladies (Schakman et al., 2008), mais ne parvient pas à limiter la cachexie (Llovera et al., 1995). Ceci pourrait résulter d'une inhibition incomplète des fonctions de GR, du fait que le RU486 n'exerce qu'un antagonisme partiel (Schulz et al., 2002). Il sera intéressant de déterminer quelles sont les cibles directes de GR dans le muscle squelettique. Pour ce faire, nous envisageons de réaliser une immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'un anticorps dirigé contre GR, suivie d'un séquençage de masse. En procédant de même dans d'autres tissus tels que la rate ou la peau, nous pourrons designer des cribles nous permettant d'identifier des modulateurs de GR qui conservent des capacités anti-inflammatoires sans induire de protéolyse dans les fibres musculaires, ou des antagonistes totaux de GR capables d'augmenter la masse musculaire sans effets sur le système immunitaire.

Il a récemment été rapporté qu'un traitement à la dexaméthasone des souris GR<sup>dim/dim</sup>, qui portent des allèles mutants de GR exprimant un GR comportant une mutation ponctuelle dans le domaine de liaison à l'ADN qui prévient sa liaison aux GREs, mais permet tout de même l'interaction avec des facteurs de transcription tels que NF-KB et AP1 (Reichardt *et al.*, 1998), induit une perte de masse musculaire de la même façon que des souris contrôles, indiquant que la majeure partie des effets des glucocorticoïdes sur l'atrophie musculaire ne sont pas médiés par GR lié aux GREs (Waddell *et al.*, 2008). Cependant, ces auteurs montrent également que GR contrôle l'expression de Murf1 de manière GRE-dépendente, et que ce contrôle n'est pas entièrement aboli chez les souris GR<sup>dim/dim</sup> (Waddell et al., 2008). Ainsi, étant donné que l'introduction de la mutation GR<sup>dim</sup> dans la lignée germinale peut induire des mécanismes compensatoires qui masquent partiellement les fonctions GR, des analyses complémentaires plus détaillées sont requises afin d'éclaircir la complexité des voies de signalisation des glucocorticoïdes dans les muscles squelettiques.

Pour ce faire, nous avons généré des souris exprimant la mutation GR<sup>dim</sup> de manière sélective dans les myofibres, en croisant des souris HSA-Cre-ER<sup>T2</sup>/GR<sup>L2/L2</sup> avec des souris GR<sup>dim/+</sup> (disponibles à l'European Mutant Mouse Archive ; ref. 02123) afin d'obtenir des souris pré-mutantes HSA-Cre-ER<sup>T2</sup>/GR<sup>L2/dim</sup>. L'injection de tels animaux au Tamoxifène nous a permis de générer des souris GR<sup>(i)skm-/dim</sup> qui expriment la protéine GR<sup>dim</sup> sélectivement dans les myofibres du muscle squelettique.

## DISCUSSION

Nos résultats préliminaires montrent que lors d'un traitement à la dexaméthasone, contrairement aux souris GR<sup>dim/dim</sup>, les souris GR<sup>(i)skm-/dim</sup> ne sont plus sensibles à l'atrophie musculaire (Figure 5A), tout comme les souris GR<sup>(i)skm-/-</sup>, et que l'induction de l'expression d'atrogènes tels que Atrogin1 est limitée et voire abolie, comme c'est le cas pour Murf1 (Figure 5B).



Figure 5 : Les souris GR<sup>(i)skm-/dim</sup> ne sont pas sensibles à l'atrophie musculaire induite par un traitement à la dexaméthasone.

A : Poids de la rate et des muscles quadriceps (quadri), gastrocnemien (gastro) et tibialis de souris contrôles ( $GR^{L2/L2}$ ),  $GR^{(i)skm-/-}$ ,  $GR^{(i)skm-/dim}$  et  $GR^{dim/dim}$ , suite à un traitement à la dexaméthasone (DEX) ou un véhicule (OIL). NS : non significatif. \* : p < 0,05.

B : Niveaux relatifs d'Atrogine1 et de Murf1 dans le muscle gastrocnémien de souris contrôles (GR<sup>L2/L2</sup>), GR<sup>(i)skm-/-</sup>, GR<sup>(i)skm-/dim</sup> et GR<sup>dim/dim</sup>, suite à un traitement à la dexaméthasone (DEX) ou un véhicule (OIL).

Une analyse phénotypique plus détaillée de ces animaux, associée à une étude par immunoprécipitation de la chromatine nous permettra de comprendre quels gènes sont encore sous la dépendance de GR chez ces animaux et d'éclaircir les voies de signalisation GR-dépendante mais GRE-indépendante dans le muscle squelettique.
## CONCLUSION

La conservation de l'intégrité des fonctions musculaires est essentielle à l'homéostasie de l'organisme. La population vieillissante étant de plus en plus importante, la perte de masse musculaire liée à l'âge (sarcopénie) devient un mal de plus en plus fréquent. De plus, les glucocorticoïdes, utilisés comme anti-inflammatoires dans le traitement de maladies chroniques telles que l'asthme induisent à long terme une fonte musculaire. La perte de masse musculaire, qu'elle soit d'origine naturelle ou médicamenteuse, possède un impact négatif sur la qualité de vie des individus car elle peut, entre autre, générer des chutes et des fractures osseuses, voire une immobilisation complète de l'individu. Par conséquent, il est essentiel de développer des thérapies pour lutter contre les pertes de fonctions musculaires et limiter les effets secondaires des glucocorticoïdes. De nouveaux composés (SGRM pour Selective Glucocorticoid Receptor Modulator) ciblant sélectivement certains tissus tels que le muscle squelettique, sont actuellement en cours de développement. Afin de faciliter le développement de ces SGRMs, il est essentiel de déterminer les mécanismes et les voies de signalisation par lesquels les glucocorticoïdes agissent sur un tissu donné. Au cours de ma thèse, j'ai démontré que les glucocorticoïdes, par le biais de leur récepteur, limitaient la masse des muscles squelettiques via l'inhibiteur de la voie mTOR, REDD1, mais aussi que le contrôle de la production du facteur de croissance IGF-I était dépendant des niveaux de glucocorticoïdes mais pas de la présence du récepteur. J'ai également montré que les voies contrôlant l'atrophie musculaire étaient strictement régulées par le récepteur des glucocorticoïdes dans les myofibres. Ainsi, notre travail ouvre de nouvelles voies concernant le développement de SGRMs qui cibleraient les muscles squelettiques pour réguler de manière concomitante les voies de signalisation anabolisme et le catabolisme musculaire.

Les désordres métaboliques tels que l'obésité, le diabète de type II et les risques cardiovasculaires (regroupés sous le terme de syndrome métabolique), constituent au même titre que la sarcopénie un problème majeur de santé publique. Notre travail a mis en évidence la contribution des SRCs dans le contrôle de la balance énergétique au niveau du muscle squelettique. En effet, l'invalidation de TIF2 sélectivement dans les myocytes contre partiellement les effets associés à une vie sédentaire (diminution des capacités oxydatives des muscles squelettiques), qui conduisent au développement d'une obésité et d'un diabète de type II, grâce à un découplage mitochondrial. Ainsi, l'étude détaillée des voies de signalisation contrôlées par TIF2 dans le muscle squelettique permettra la réalisation de composés à action sélective dans le muscle qui constitueront de nouvelles possibilités de traitement du syndrome métabolique.

## CONCLUSION

En conclusion, ce travail de thèse, en apportant une meilleure compréhension des mécanismes d'action du récepteur des glucocorticoïdes et des SRCs dans le muscle squelettique, facilitera le développement de nouvelles thérapies pour le traitement de la sarcopénie et du syndrome métabolique, respectivement. Cependant, il est important de préciser que l'exercice reste un élément clé pour préserver les fonctions musculaires. En effet, il permet d'une part de contrecarrer, au moins en partie, la perte musculaire liée à l'âge et d'autre part de prévenir le développement de l'obésité et des désordres métaboliques qui lui sont associés en conservant les capacités oxydatives des myofibres.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Abo-Hashema, K.A. and Wakil, S.J. (2001) Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science*, **291**, 2613-2616.
- Acin, A., Rodriguez, M., Rique, H., Canet, E., Boutin, J.A. and Galizzi, J.P. (1999) Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human uncoupling protein 3 (UCP3) gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **258**, 278-283.
- Adam-Vizi, V. and Chinopoulos, C. (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 639-645.
- Adams, C.M. (2007) Role of the transcription factor ATF4 in the anabolic actions of insulin and the anti-anabolic actions of glucocorticoids. *J Biol Chem*, **282**, 16744-16753.
- Adcock, I.M., Caramori, G. and Ito, K. (2006) New insights into the molecular mechanisms of corticosteroids actions. *Curr Drug Targets*, **7**, 649-660.
- Aguilar, V., Alliouachene, S., Sotiropoulos, A., Sobering, A., Athea, Y., Djouadi, F., Miraux, S., Thiaudiere, E., Foretz, M., Viollet, B., Diolez, P., Bastin, J., Benit, P., Rustin, P., Carling, D., Sandri, M., Ventura-Clapier, R. and Pende, M. (2007) S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase. *Cell Metab*, 5, 476-487.
- Akimoto, T., Pohnert, S.C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P.B., Williams, R.S. and Yan, Z. (2005) Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem*, 280, 19587-19593.
- Akimoto, T., Ribar, T.J., Williams, R.S. and Yan, Z. (2004) Skeletal muscle adaptation in response to voluntary running in Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase IV-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**, C1311-1319.
- Akiyama, T.E., Lambert, G., Nicol, C.J., Matsusue, K., Peters, J.M., Brewer, H.B., Jr. and Gonzalez, F.J. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet. J Biol Chem, 279, 20874-20881.
- Almon, R.R., DuBois, D.C., Yao, Z., Hoffman, E.P., Ghimbovschi, S. and Jusko, W.J. (2007) Microarray analysis of the temporal response of skeletal muscle to methylprednisolone: comparative analysis of two dosing regimens. *Physiol Genomics*, **30**, 282-299.
- Alzghoul, M.B., Gerrard, D., Watkins, B.A. and Hannon, K. (2004) Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo. *Faseb J*, **18**, 221-223.
- Amirouche, A., Durieux, A.C., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Mouret, C., Bigard, X., Peinnequin, A. and Freyssenet, D. (2009) Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology*, **150**, 286-294.
- Amri, E.Z., Bonino, F., Ailhaud, G., Abumrad, N.A. and Grimaldi, P.A. (1995) Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. J Biol Chem, 270, 2367-2371.
- Amthor, H., Macharia, R., Navarrete, R., Schuelke, M., Brown, S.C., Otto, A., Voit, T., Muntoni, F., Vrbova, G., Partridge, T., Zammit, P., Bunger, L. and Patel, K. (2007) Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1835-1840.
- Anderson, E.J. and Neufer, P.D. (2006) Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H(2)O(2) generation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **290**, C844-851.
- Anflous, K., Blondel, O., Bernard, A., Khrestchatisky, M. and Ventura-Clapier, R. (1998) Characterization of rat porin isoforms: cloning of a cardiac type-3 variant encoding an additional methionine at its putative N-terminal region. *Biochim Biophys Acta*, **1399**, 47-50.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M. and Meltzer, P.S. (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, 277, 965-968.
- Aragones, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirkx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H., Jeoung, N.H., Lambrechts, D., Bishop, T., Lafuste, P., Diez-Juan, A., Harten, S.K., Van Noten, P., De Bock, K., Willam, C., Tjwa, M., Grosfeld, A., Navet, R., Moons, L., Vandendriessche, T., Deroose, C., Wijeyekoon, B., Nuyts, J., Jordan, B., Silasi-Mansat, R., Lupu, F., Dewerchin, M., Pugh, C., Salmon, P., Mortelmans, L., Gallez, B., Gorus, F., Buyse, J., Sluse, F., Harris, R.A., Gnaiger, E., Hespel, P., Van Hecke, P., Schuit, F., Van Veldhoven, P., Ratcliffe, P., Baes, M., Maxwell, P. and Carmeliet, P. (2008) Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet*, 40, 170-180.
- Arany, Z. (2008) PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. *Curr Opin Genet Dev*, **18**, 426-434.
- Aronson, D., Dufresne, S.D. and Goodyear, L.J. (1997) Contractile activity stimulates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in rat skeletal muscle. *J Biol Chem*, **272**, 25636-25640.
- Arruda, A.P., Da-Silva, W.S., Carvalho, D.P. and De Meis, L. (2003) Hyperthyroidism increases the uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase. *Biochem J*, **375**, 753-760.

- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Goubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S. and Ricquier, D. (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*, **26**, 435-439.
- Artaza, J.N., Bhasin, S., Mallidis, C., Taylor, W., Ma, K. and Gonzalez-Cadavid, N.F. (2002) Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells. J Cell Physiol, 190, 170-179.
- Astrup, A., Bulow, J., Madsen, J. and Christensen, N.J. (1985) Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. *Am J Physiol*, **248**, E507-515.
- Aubert, J., Champigny, O., Saint-Marc, P., Negrel, R., Collins, S., Ricquier, D. and Ailhaud, G. (1997) Up-regulation of UCP-2 gene expression by PPAR agonists in preadipose and adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 238, 606-611.
- Awede, B.L., Thissen, J.P. and Lebacq, J. (2002) Role of IGF-I and IGFBPs in the changes of mass and phenotype induced in rat soleus muscle by clenbuterol. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, E31-37.
- Baar, K., Wende, A.R., Jones, T.E., Marison, M., Nolte, L.A., Chen, M., Kelly, D.P. and Holloszy, J.O. (2002) Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb J*, **16**, 1879-1886.
- Baek, S.H. and Rosenfeld, M.G. (2004) Nuclear receptor coregulators: their modification codes and regulatory mechanism by translocation. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 707-714.
- Baldwin, K.M., Herrick, R.E., Ilyina-Kakueva, E. and Oganov, V.S. (1990) Effects of zero gravity on myofibril content and isomyosin distribution in rodent skeletal muscle. *Faseb J*, **4**, 79-83.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M. and Chrousos, G.P. (1996) Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev*, **17**, 245-261.
- Bar-Shai, M., Carmeli, E. and Reznick, A.Z. (2005) The role of NF-kappaB in protein breakdown in immobilization, aging, and exercise: from basic processes to promotion of health. *Ann N Y Acad Sci*, **1057**, 431-447.
- Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E.S., Nelson, M.C., Olefsky, J.M., Boland, R. and Evans, R.M. (2002) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 303-308.
- Barbe, P., Larrouy, D., Boulanger, C., Chevillotte, E., Viguerie, N., Thalamas, C., Oliva Trastoy, M., Roques, M., Vidal, H. and Langin, D. (2001) Triiodothyronine-mediated up-regulation of UCP2 and UCP3 mRNA expression in human skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes. *Faseb J*, **15**, 13-15.
- Barclay, C.J., Woledge, R.C. and Curtin, N.A. (2009) Effects of UCP3 genotype, temperature and muscle type on energy turnover of resting mouse skeletal muscle. *Pflugers Arch*, **457**, 857-864.
- Barja, G. (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr*, **31**, 347-366.
- Barnes, P.J. (2006) Corticosteroid effects on cell signalling. Eur Respir J, 27, 413-426.
- Barry, S.C. and Gallagher, C.G. (2003) Corticosteroids and skeletal muscle function in cystic fibrosis. *J Appl Physiol*, **95**, 1379-1384.
- Bastien, J. and Rochette-Egly, C. (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*, **328**, 1-16.
- Belizario, J.E., Lorite, M.J. and Tisdale, M.J. (2001) Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia. *Br J Cancer*, **84**, 1135-1140.
- Bentzinger, C.F., Romanino, K., Cloetta, D., Lin, S., Mascarenhas, J.B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C.F., Brink, M., Zorzato, F., Hall, M.N. and Ruegg, M.A. (2008) Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab*, 8, 411-424.
- Beretta, L., Gingras, A.C., Svitkin, Y.V., Hall, M.N. and Sonenberg, N. (1996) Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *Embo J*, **15**, 658-664.
- Berger, J., Leibowitz, M.D., Doebber, T.W., Elbrecht, A., Zhang, B., Zhou, G., Biswas, C., Cullinan, C.A., Hayes, N.S., Li, Y., Tanen, M., Ventre, J., Wu, M.S., Berger, G.D., Mosley, R., Marquis, R., Santini, C., Sahoo, S.P., Tolman, R.L., Smith, R.G. and Moller, D.E. (1999) Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem*, **274**, 6718-6725.
- Bergmann, M.W., Staples, K.J., Smith, S.J., Barnes, P.J. and Newton, R. (2004) Glucocorticoid inhibition of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor from T cells is independent of control by nuclear factor-kappaB and conserved lymphokine element 0. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **30**, 555-563.
- Berthier, C. and Blaineau, S. (1997) Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. A review. *Biol Cell*, **89**, 413-434.
- Bezaire, V., Spriet, L.L., Campbell, S., Sabet, N., Gerrits, M., Bonen, A. and Harper, M.E. (2005) Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *Faseb J*, **19**, 977-979.

- Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Callegari, C., Clevenger, B., Phillips, J., Bunnell, T.J., Tricker, R., Shirazi, A. and Casaburi, R. (1996) The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. N Engl J Med, 335, 1-7.
- Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Yarasheski, K.E., Clevenger, B., Phillips, J., Lee, W.P., Bunnell, T.J. and Casaburi, R. (1997) Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 407-413.
- Bianco, A.C. and Silva, J.E. (1987) Optimal response of key enzymes and uncoupling protein to cold in BAT depends on local T3 generation. *Am J Physiol*, **253**, E255-263.
- Blommaart, E.F., Luiken, J.J. and Meijer, A.J. (1997) Autophagic proteolysis: control and specificity. *Histochem J*, **29**, 365-385.
- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z.Q., Valenzuela, D.M., DeChiara, T.M., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (2001a) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, **294**, 1704-1708.
- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J. and Yancopoulos, G.D. (2001b) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, **3**, 1014-1019.
- Boss, O., Samec, S., Desplanches, D., Mayet, M.H., Seydoux, J., Muzzin, P. and Giacobino, J.P. (1998a) Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *Faseb J*, **12**, 335-339.
- Boss, O., Samec, S., Kuhne, F., Bijlenga, P., Assimacopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., Giacobino, J.P. and Muzzin, P. (1998b) Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J Biol Chem*, **273**, 5-8.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. and Giacobino, J.P. (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett*, 408, 39-42.
- Bouillaud, F., Ricquier, D., Thibault, J. and Weissenbach, J. (1985) Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 445-448.
- Boveris, A., Oshino, N. and Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*, **128**, 617-630.
- Brand, M.D. (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. Exp Gerontol, 35, 811-820.
- Brand, M.D. and Esteves, T.C. (2005) Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*, **2**, 85-93.
- Branvold, D.J., Allred, D.R., Beckstead, D.J., Kim, H.J., Fillmore, N., Condon, B.M., Brown, J.D., Sudweeks, S.N., Thomson, D.M. and Winder, W.W. (2008) Thyroid hormone effects on LKB1, MO25, phospho-AMPK, phospho-CREB, and PGC-1alpha in rat muscle. J Appl Physiol, **105**, 1218-1227.
- Breuner, C.W., Lynn, S.E., Julian, G.E., Cornelius, J.M., Heidinger, B.J., Love, O.P., Sprague, R.S., Wada, H. and Whitman, B.A. (2006) Plasma-binding globulins and acute stress response. *Horm Metab Res*, **38**, 260-268.
- Breuner, C.W. and Orchinik, M. (2002) Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol*, **175**, 99-112.
- Brooke, M.H. and Kaiser, K.K. (1970) Muscle fiber types: how many and what kind? Arch Neurol, 23, 369-379.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W. and Kaelin, W.G., Jr. (2004) Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*, **18**, 2893-2904.
- Brun, S., Carmona, M.C., Mampel, T., Vinas, O., Giralt, M., Iglesias, R. and Villarroya, F. (1999) Activators of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha induce the expression of the uncoupling protein-3 gene in skeletal muscle: a potential mechanism for the lipid intake-dependent activation of uncoupling protein-3 gene expression at birth. *Diabetes*, **48**, 1217-1222.
- Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulic, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C., Jr. and Abraham, R.T. (1997) Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*, **277**, 99-101.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D. and Relaix, F. (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*, **202**, 59-68.
- Buttgereit, F. and Scheffold, A. (2002) Rapid glucocorticoid effects on immune cells. Steroids, 67, 529-534.
- Cadenas, S., Echtay, K.S., Harper, J.A., Jekabsons, M.B., Buckingham, J.A., Grau, E., Abuin, A., Chapman, H., Clapham, J.C. and Brand, M.D. (2002) The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem*, **277**, 2773-2778.
- Cai, D., Frantz, J.D., Tawa, N.E., Jr., Melendez, P.A., Oh, B.C., Lidov, H.G., Hasselgren, P.O., Frontera, W.R., Lee, J., Glass, D.J. and Shoelson, S.E. (2004) IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*, 119, 285-298.

- Cancela, L., Nemere, I. and Norman, A.W. (1988) 1 alpha,25(OH)2 vitamin D3: a steroid hormone capable of producing pleiotropic receptor-mediated biological responses by both genomic and nongenomic mechanisms. *J Steroid Biochem*, **30**, 33-39.
- Canepari, M., Cappelli, V., Pellegrino, M.A., Zanardi, M.C. and Reggiani, C. (1998) Thyroid hormone regulation of MHC isoform composition and myofibrillar ATPase activity in rat skeletal muscles. *Arch Physiol Biochem*, **106**, 308-315.
- Canto, C. and Auwerx, J. (2009a) Caloric restriction, SIRT1 and longevity. Trends Endocrinol Metab, 20, 325-331.
- Canto, C. and Auwerx, J. (2009b) PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*, **20**, 98-105.
- Carapeti, M., Aguiar, R.C., Chase, A., Goldman, J.M. and Cross, N.C. (1998) Assignment of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene to human chromosome band 2p23. *Genomics*, **52**, 242-244.
- Carlson, C.J., Booth, F.W. and Gordon, S.E. (1999) Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol*, **277**, R601-606.
- Carlson, J.C., Gruber, M.Y. and Thompson, J.E. (1983) A study of the interaction between progesterone and membrane lipids. *Endocrinology*, **113**, 190-194.
- Casas, F., Pessemesse, L., Grandemange, S., Seyer, P., Gueguen, N., Baris, O., Lepourry, L., Cabello, G. and Wrutniak-Cabello, C. (2008) Overexpression of the mitochondrial T3 receptor p43 induces a shift in skeletal muscle fiber types. *PLoS One*, **3**, e2501.
- Chakravarthy, M.V., Abraha, T.W., Schwartz, R.J., Fiorotto, M.L. and Booth, F.W. (2000) Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem*, **275**, 35942-35952.
- Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M. and Evans, R.M. (1996) Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*, **383**, 99-103.
- Chambon, P. (2005) The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol*, **19**, 1418-1428.
- Chan, C.B., MacDonald, P.E., Saleh, M.C., Johns, D.C., Marban, E. and Wheeler, M.B. (1999) Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes*, **48**, 1482-1486.
- Chan, P.H. (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. Stroke, 27, 1124-1129.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W. and Stallcup, M.R. (1999a) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, **284**, 2174-2177.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y. and Evans, R.M. (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, **90**, 569-580.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D. and Evans, R.M. (1999b) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell*, **98**, 675-686.
- Chen, J.D. and Evans, R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, **377**, 454-457.
- Chen, S.L., Dowhan, D.H., Hosking, B.M. and Muscat, G.E. (2000) The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev*, **14**, 1209-1228.
- Chin, E.R. (2004) The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. *Proc Nutr Soc*, **63**, 279-286.
- Chin, E.R., Olson, E.N., Richardson, J.A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J.M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R. and Williams, R.S. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev*, **12**, 2499-2509.
- Chopra, A.R., Louet, J.F., Saha, P., An, J., Demayo, F., Xu, J., York, B., Karpen, S., Finegold, M., Moore, D., Chan, L., Newgard, C.B. and O'Malley, B.W. (2008) Absence of the SRC-2 coactivator results in a glycogenopathy resembling Von Gierke's disease. *Science*, **322**, 1395-1399.
- Clapham, J.C., Arch, J.R., Chapman, H., Haynes, A., Lister, C., Moore, G.B., Piercy, V., Carter, S.A., Lehner, I., Smith, S.A., Beeley, L.J., Godden, R.J., Herrity, N., Skehel, M., Changani, K.K., Hockings, P.D., Reid, D.G., Squires, S.M., Hatcher, J., Trail, B., Latcham, J., Rastan, S., Harper, A.J., Cadenas, S., Buckingham, J.A., Brand, M.D. and Abuin, A. (2000) Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*, 406, 415-418.
- Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., Rakhilin, S.V., Stitt, T.N., Patterson, C., Latres, E. and Glass, D.J. (2007) The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasonetreated skeletal muscle. *Cell Metab*, 6, 376-385.
- Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibe, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J.M., Eychenne, F., Larzul, C., Laville, E., Meish, F., Milenkovic, D., Tobin, J., Charlier, C. and Georges, M. (2006) A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet*, **38**, 813-818.

- Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K. and Schutz, G. (1995) Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev*, **9**, 1608-1621.
- Combaret, L., Adegoke, O.A., Bedard, N., Baracos, V., Attaix, D. and Wing, S.S. (2005) USP19 is a ubiquitin-specific protease regulated in rat skeletal muscle during catabolic states. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **288**, E693-700.
- Combaret, L., Tilignac, T., Claustre, A., Voisin, L., Taillandier, D., Obled, C., Tanaka, K. and Attaix, D. (2002) Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. *Biochem J*, **361**, 185-192.
- Conti, B., Sanchez-Alavez, M., Winsky-Sommerer, R., Morale, M.C., Lucero, J., Brownell, S., Fabre, V., Huitron-Resendiz, S., Henriksen, S., Zorrilla, E.P., de Lecea, L. and Bartfai, T. (2006) Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span. *Science*, **314**, 825-828.
- Coppola, A., Liu, Z.W., Andrews, Z.B., Paradis, E., Roy, M.C., Friedman, J.M., Ricquier, D., Richard, D., Horvath, T.L., Gao, X.B. and Diano, S. (2007) A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab*, **5**, 21-33.
- Coste, A., Louet, J.F., Lagouge, M., Lerin, C., Antal, M.C., Meziane, H., Schoonjans, K., Puigserver, P., O'Malley, B.W. and Auwerx, J. (2008) The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1{alpha}. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 17187-17192.
- Costelli, P., Muscaritoli, M., Bonetto, A., Penna, F., Reffo, P., Bossola, M., Bonelli, G., Doglietto, G.B., Baccino, F.M. and Rossi Fanelli, F. (2008) Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest*, **38**, 531-538.
- Couplan, E., del Mar Gonzalez-Barroso, M., Alves-Guerra, M.C., Ricquier, D., Goubern, M. and Bouillaud, F. (2002) No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria. *J Biol Chem*, **277**, 26268-26275.
- Craig, R. and Woodhead, J.L. (2006) Structure and function of myosin filaments. Curr Opin Struct Biol, 16, 204-212.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785-789.
- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J.A. and Carlstedt-Duke, J. (1991) Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem*, **266**, 3107-3112.
- Dai, Z., Wu, F., Yeung, E.W. and Li, Y. (2010) IGF-IEc expression, regulation and biological function in different tissues. *Growth Horm IGF Res.*
- Dardevet, D., Sornet, C., Savary, I., Debras, E., Patureau-Mirand, P. and Grizard, J. (1998) Glucocorticoid effects on insulinand IGF-I-regulated muscle protein metabolism during aging. *J Endocrinol*, **156**, 83-89.
- De Koninck, P. and Schulman, H. (1998) Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca2+ oscillations. *Science*, **279**, 227-230.
- de Meis, L., Arruda, A.P., da-Silva, W.S., Reis, M. and Carvalho, D.P. (2003) The thermogenic function of the sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase of normal and hyperthyroid rabbit. *Ann N Y Acad Sci*, **986**, 481-488.
- Decramer, M., Lacquet, L.M., Fagard, R. and Rogiers, P. (1994) Corticosteroids contribute to muscle weakness in chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*, **150**, 11-16.
- Dehoux, M., Van Beneden, R., Pasko, N., Lause, P., Verniers, J., Underwood, L., Ketelslegers, J.M. and Thissen, J.P. (2004) Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogin-1/MAFbx during fasting and diabetes. *Endocrinology*, **145**, 4806-4812.
- Dekhuijzen, P.N., Gayan-Ramirez, G., Bisschop, A., De Bock, V., Dom, R. and Decramer, M. (1995) Corticosteroid treatment and nutritional deprivation cause a different pattern of atrophy in rat diaphragm. *J Appl Physiol*, **78**, 629-637.
- Demarest, S.J., Martinez-Yamout, M., Chung, J., Chen, H., Xu, W., Dyson, H.J., Evans, R.M. and Wright, P.E. (2002) Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature*, **415**, 549-553.
- Deval, C., Mordier, S., Obled, C., Bechet, D., Combaret, L., Attaix, D. and Ferrara, M. (2001) Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. *Biochem J*, **360**, 143-150.
- DeYoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D. and Ellisen, L.W. (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*, **22**, 239-251.
- Dilworth, F.J., Fromental-Ramain, C., Yamamoto, K. and Chambon, P. (2000) ATP-driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR In vitro. *Mol Cell*, **6**, 1049-1058.
- Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E. and Pagano, M. (2006) S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, **314**, 467-471.
- Dressel, U., Allen, T.L., Pippal, J.B., Rohde, P.R., Lau, P. and Muscat, G.E. (2003) The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol*, **17**, 2477-2493.

- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G. and Wahli, W. (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, **68**, 879-887.
- Driessen, C., Bryant, R.A., Lennon-Dumenil, A.M., Villadangos, J.A., Bryant, P.W., Shi, G.P., Chapman, H.A. and Ploegh, H.L. (1999) Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol*, **147**, 775-790.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, 82, 47-95.
- Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J.L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S.R. and Mitch, W.E. (2004) Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest*, **113**, 115-123.
- Duchen, M.R. (2004) Roles of mitochondria in health and disease. Diabetes, 53 Suppl 1, S96-102.
- Dufour, E., Obled, A., Valin, C., Bechet, D., Ribadeau-Dumas, B. and Huet, J.C. (1987) Purification and amino acid sequence of chicken liver cathepsin L. *Biochemistry*, **26**, 5689-5695.
- Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J.C. and Brand, M.D. (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, **415**, 96-99.
- Ellisen, L.W. (2005) Growth control under stress: mTOR regulation through the REDD1-TSC pathway. *Cell Cycle*, **4**, 1500-1502.
- Enerback, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E. and Kozak, L.P. (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, **387**, 90-94.
- Engelmann, M., Landgraf, R. and Wotjak, C.T. (2004) The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol*, **25**, 132-149.
- Escriva, H., Delaunay, F. and Laudet, V. (2000) Ligand binding and nuclear receptor evolution. Bioessays, 22, 717-727.
- Eskelinen, E.L., Tanaka, Y. and Saftig, P. (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*, **13**, 137-145.
- Evenson, A.R., Fareed, M.U., Menconi, M.J., Mitchell, J.C. and Hasselgren, P.O. (2005) GSK-3beta inhibitors reduce protein degradation in muscles from septic rats and in dexamethasone-treated myotubes. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 2226-2238.
- Falkenstein, E., Norman, A.W. and Wehling, M. (2000) Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 2072-2075.
- Fang, C.H., Li, B.G., James, J.H., King, J.K., Evenson, A.R., Warden, G.D. and Hasselgren, P.O. (2005) Protein breakdown in muscle from burned rats is blocked by insulin-like growth factor i and glycogen synthase kinase-3beta inhibitors. *Endocrinology*, **146**, 3141-3149.
- Farid, M., Reid, M.B., Li, Y.P., Gerken, E. and Durham, W.J. (2005) Effects of dietary curcumin or N-acetylcysteine on NFkappaB activity and contractile performance in ambulatory and unloaded murine soleus. *Nutr Metab (Lond)*, **2**, 20.
- Faus, H. and Haendler, B. (2006) Post-translational modifications of steroid receptors. Biomed Pharmacother, 60, 520-528.
- Felbor, U., Kessler, B., Mothes, W., Goebel, H.H., Ploegh, H.L., Bronson, R.T. and Olsen, B.R. (2002) Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7883-7888.
- Figueiredo, P.A., Powers, S.K., Ferreira, R.M., Amado, F., Appell, H.J. and Duarte, J.A. (2009) Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **64**, 927-939.
- Fischbeck, K.H. (1997) Kennedy disease. J Inherit Metab Dis, 20, 152-158.
- Fitts, R.H., Romatowski, J.G., Peters, J.R., Paddon-Jones, D., Wolfe, R.R. and Ferrando, A.A. (2007) The deleterious effects of bed rest on human skeletal muscle fibers are exacerbated by hypercortisolemia and ameliorated by dietary supplementation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, C313-320.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D. and Warden, C.H. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*, **15**, 269-272.
- Flucher, B.E., Andrews, S.B., Fleischer, S., Marks, A.R., Caswell, A. and Powell, J.A. (1993) Triad formation: organization and function of the sarcoplasmic reticulum calcium release channel and triadin in normal and dysgenic muscle in vitro. *J Cell Biol*, **123**, 1161-1174.
- Fondell, J.D., Ge, H. and Roeder, R.G. (1996) Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8329-8333.
- Forgac, M. (1999) Structure and properties of the vacuolar (H+)-ATPases. J Biol Chem, 274, 12951-12954.
- Forman, B.M., Chen, J. and Evans, R.M. (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4312-4317.
- Fournier, M., Huang, Z.S., Li, H., Da, X., Cercek, B. and Lewis, M.I. (2003) Insulin-like growth factor I prevents corticosteroidinduced diaphragm muscle atrophy in emphysematous hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285, R34-43.

- Freyssenet, D., Irrcher, I., Connor, M.K., Di Carlo, M. and Hood, D.A. (2004) Calcium-regulated changes in mitochondrial phenotype in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **286**, C1053-1061.
- Fujii, N., Hayashi, T., Hirshman, M.F., Smith, J.T., Habinowski, S.A., Kaijser, L., Mu, J., Ljungqvist, O., Birnbaum, M.J., Witters, L.A., Thorell, A. and Goodyear, L.J. (2000) Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 1150-1155.
- Fukuda, M. (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem*, **266**, 21327-21330.
- Furukawa-Hibi, Y., Yoshida-Araki, K., Ohta, T., Ikeda, K. and Motoyama, N. (2002) FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *J Biol Chem*, **277**, 26729-26732.
- Furuno, K. and Goldberg, A.L. (1986) The activation of protein degradation in muscle by Ca2+ or muscle injury does not involve a lysosomal mechanism. *Biochem J*, 237, 859-864.
- Galani, A., Kitsiou-Tzeli, S., Sofokleous, C., Kanavakis, E. and Kalpini-Mavrou, A. (2008) Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. *Hormones (Athens)*, **7**, 217-229.
- Garcia, J.H., Lassen, N.A., Weiller, C., Sperling, B. and Nakagawara, J. (1996) Ischemic stroke and incomplete infarction. *Stroke*, **27**, 761-765.
- Gayan-Ramirez, G., Vanderhoydonc, F., Verhoeven, G. and Decramer, M. (1999) Acute treatment with corticosteroids decreases IGF-1 and IGF-2 expression in the rat diaphragm and gastrocnemius. *Am J Respir Crit Care Med*, **159**, 283-289.
- Gehin, M., Mark, M., Dennefeld, C., Dierich, A., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (2002) The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. *Mol Cell Biol*, **22**, 5923-5937.
- Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A. and Desnick, R.J. (1996) Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*, **273**, 1236-1238.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. and Laudet, V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, **58**, 685-704.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. and Laudet, V. (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, **58**, 685-704.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1986) Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*, **46**, 645-652.
- Gilson, H., Schakman, O., Combaret, L., Lause, P., Grobet, L., Attaix, D., Ketelslegers, J.M. and Thissen, J.P. (2007) Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology*, **148**, 452-460.
- Gingras, A.C., Kennedy, S.G., O'Leary, M.A., Sonenberg, N. and Hay, N. (1998) 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev*, **12**, 502-513.
- Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, **14**, 121-141.
- Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Rose, D.W., Kurokawa, R., Kamei, Y., Xu, L., Torchia, J., Ogliastro, M.H. and Westin, S. (1997) Mechanisms of transcriptional activation by retinoic acid receptors. *Biochem Soc Trans*, **25**, 602-605.
- Glickman, M.H. and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428.
- Goldberg, A.L., Tischler, M., DeMartino, G. and Griffin, G. (1980) Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle. *Fed Proc*, **39**, 31-36.
- Goldspink, G. (1999) Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat*, **194 ( Pt 3)**, 323-334.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. (2003) The calpain system. Physiol Rev, 83, 731-801.
- Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A. and Goldberg, A.L. (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14440-14445.
- Gomes-Marcondes, M.C. and Tisdale, M.J. (2002) Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett*, **180**, 69-74.
- Gong, D.W., He, Y., Karas, M. and Reitman, M. (1997) Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem*, **272**, 24129-24132.
- Gong, D.W., He, Y. and Reitman, M.L. (1999) Genomic organization and regulation by dietary fat of the uncoupling protein 3 and 2 genes. *Biochem Biophys Res Commun*, **256**, 27-32.
- Gong, D.W., Monemdjou, S., Gavrilova, O., Leon, L.R., Marcus-Samuels, B., Chou, C.J., Everett, C., Kozak, L.P., Li, C., Deng, C., Harper, M.E. and Reitman, M.L. (2000) Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem*, **275**, 16251-16257.
- Gonzalez-Cadavid, N.F., Taylor, W.E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma, K., Ezzat, S., Shen, R., Lalani, R., Asa, S., Mamita, M., Nair, G., Arver, S. and Bhasin, S. (1998) Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14938-14943.

- Goode, H.F., Webster, N.R., Howdle, P.D., Leek, J.P., Lodge, J.P., Sadek, S.A. and Walker, B.E. (1994) Reperfusion injury, antioxidants and hemodynamics during orthotopic liver transplantation. *Hepatology*, **19**, 354-359.
- Goodyear, L.J., Chang, P.Y., Sherwood, D.J., Dufresne, S.D. and Moller, D.E. (1996) Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, **271**, E403-408.
- Gordon, A.M., Homsher, E. and Regnier, M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle. Physiol Rev, 80, 853-924.
- Gordon, A.M., Huxley, A.F. and Julian, F.J. (1966) The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol*, **184**, 170-192.
- Grater, F., Shen, J., Jiang, H., Gautel, M. and Grubmuller, H. (2005) Mechanically induced titin kinase activation studied by force-probe molecular dynamics simulations. *Biophys J*, **88**, 790-804.
- Greenberg, C.C., Jurczak, M.J., Danos, A.M. and Brady, M.J. (2006) Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**, E1-8.
- Grey, J.Y., Connor, M.K., Gordon, J.W., Yano, M., Mori, M. and Hood, D.A. (2000) Tom20-mediated mitochondrial protein import in muscle cells during differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **279**, C1393-1400.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A. and Laudet, V. (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 950-964.
- Hafezi-Moghadam, A., Simoncini, T., Yang, Z., Limbourg, F.P., Plumier, J.C., Rebsamen, M.C., Hsieh, C.M., Chui, D.S., Thomas, K.L., Prorock, A.J., Laubach, V.E., Moskowitz, M.A., French, B.A., Ley, K. and Liao, J.K. (2002) Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*, 8, 473-479.
- Haguenauer, A., Raimbault, S., Masscheleyn, S., Gonzalez-Barroso Mdel, M., Criscuolo, F., Plamondon, J., Miroux, B., Ricquier, D., Richard, D., Bouillaud, F. and Pecqueur, C. (2005) A new renal mitochondrial carrier, KMCP1, is upregulated during tubular cell regeneration and induction of antioxidant enzymes. *J Biol Chem*, **280**, 22036-22043.
- Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Logue, S.E., Sayen, M.R., Jinno, M., Kirshenbaum, L.A., Gottlieb, R.A. and Gustafsson, A.B. (2007) Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ*, 14, 146-157.
- Handschin, C., Chin, S., Li, P., Liu, F., Maratos-Flier, E., Lebrasseur, N.K., Yan, Z. and Spiegelman, B.M. (2007) Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem*, 282, 30014-30021.
- Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P.T. and Spiegelman, B.M. (2003) An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7111-7116.
- Hardt, S.E. and Sadoshima, J. (2002) Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res*, **90**, 1055-1063.
- Harper, J.A., Stuart, J.A., Jekabsons, M.B., Roussel, D., Brindle, K.M., Dickinson, K., Jones, R.B. and Brand, M.D. (2002) Artifactual uncoupling by uncoupling protein 3 in yeast mitochondria at the concentrations found in mouse and rat skeletal-muscle mitochondria. *Biochem J*, 361, 49-56.
- Hasselgren, P.O. (1999) Glucocorticoids and muscle catabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2, 201-205.
- Hay, N. and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev, 18, 1926-1945.
- Heaton, G.M., Wagenvoord, R.J., Kemp, A., Jr. and Nicholls, D.G. (1978) Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem*, **82**, 515-521.
- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P. and Cato, A.C. (1994) A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *Embo J*, 13, 4087-4095.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, **387**, 733-736.
- Helge, J.W. and Kiens, B. (1997) Muscle enzyme activity in humans: role of substrate availability and training. *Am J Physiol*, **272**, R1620-1624.
- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C. and Cullinan, W.E. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*, 24, 151-180.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. Annu Rev Biochem, 67, 425-479.
- Hesselink, M.K., Keizer, H.A., Borghouts, L.B., Schaart, G., Kornips, C.F., Slieker, L.J., Sloop, K.W., Saris, W.H. and Schrauwen, P. (2001) Protein expression of UCP3 differs between human type 1, type 2a, and type 2b fibers. *Faseb J*, **15**, 1071-1073.
- Hill, M. and Goldspink, G. (2003) Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. J Physiol, **549**, 409-418.

- Hinz, B. and Hirschelmann, R. (2000) Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. *Pharm Res*, **17**, 1273-1277.
- Hoehn, K.L., Turner, N., Swarbrick, M.M., Wilks, D., Preston, E., Phua, Y., Joshi, H., Furler, S.M., Larance, M., Hegarty, B.D., Leslie, S.J., Pickford, R., Hoy, A.J., Kraegen, E.W., James, D.E. and Cooney, G.J. (2010) Acute or chronic upregulation of mitochondrial fatty acid oxidation has no net effect on whole-body energy expenditure or adiposity. *Cell Metab*, **11**, 70-76.
- Holloszy, J.O. and Coyle, E.F. (1984) Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol*, **56**, 831-838.
- Holmes, M.C. and Seckl, J.R. (2006) The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the brain. *Mol Cell Endocrinol*, **248**, 9-14.
- Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P. and Blenis, J. (2005) mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, **123**, 569-580.
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D.L. and Stallcup, M.R. (1996) GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4948-4952.
- Hood, D.A. (2001) Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, **90**, 1137-1157.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K. and et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, **377**, 397-404.
- Hornberger, T.A., Hunter, R.B., Kandarian, S.C. and Esser, K.A. (2001) Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C179-187.
- Hu, X. and Lazar, M.A. (1999) The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*, **402**, 93-96.
- Huang, H. and Tindall, D.J. (2007) Dynamic FoxO transcription factors. J Cell Sci, 120, 2479-2487.
- Huang, J. and Forsberg, N.E. (1998) Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12100-12105.
- Huang, Z.J., Edery, I. and Rosbash, M. (1993) PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature*, **364**, 259-262.
- Huang, Z.Q., Li, J., Sachs, L.M., Cole, P.A. and Wong, J. (2003) A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *Embo J*, **22**, 2146-2155.
- Hunter, R.B. and Kandarian, S.C. (2004) Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *J Clin Invest*, **114**, 1504-1511.
- Hunter, R.B., Stevenson, E., Koncarevic, A., Mitchell-Felton, H., Essig, D.A. and Kandarian, S.C. (2002) Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *Faseb J*, **16**, 529-538.
- Huxley, A.F. (1957) Muscle structure and theories of contraction. Prog Biophys Biophys Chem, 7, 255-318.
- Huxley, A.F. and Simmons, R.M. (1971) Proposed mechanism of force generation in striated muscle. Nature, 233, 533-538.
- Hyyti, O.M. and Portman, M.A. (2006) Molecular mechanisms of cross-talk between thyroid hormone and peroxisome proliferator activated receptors: focus on the heart. *Cardiovasc Drugs Ther*, **20**, 463-469.
- Iezzi, S., Di Padova, M., Serra, C., Caretti, G., Simone, C., Maklan, E., Minetti, G., Zhao, P., Hoffman, E.P., Puri, P.L. and Sartorelli, V. (2004) Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Dev Cell*, 6, 673-684.
- Ikemoto, M., Nikawa, T., Takeda, S., Watanabe, C., Kitano, T., Baldwin, K.M., Izumi, R., Nonaka, I., Towatari, T., Teshima, S., Rokutan, K. and Kishi, K. (2001) Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *Faseb J*, **15**, 1279-1281.
- Imae, M., Fu, Z., Yoshida, A., Noguchi, T. and Kato, H. (2003) Nutritional and hormonal factors control the gene expression of FoxOs, the mammalian homologues of DAF-16. *J Mol Endocrinol*, **30**, 253-262.
- Ing, N.H. (2005) Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biol Reprod*, **72**, 1290-1296.
- Issemann, I. and Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **347**, 645-650.
- Ito, M. and Roeder, R.G. (2001) The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol Metab*, **12**, 127-134.
- Izumiya, Y., Hopkins, T., Morris, C., Sato, K., Zeng, L., Viereck, J., Hamilton, J.A., Ouchi, N., LeBrasseur, N.K. and Walsh, K. (2008) Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab*, 7, 159-172.

- Jaburek, M., Varecha, M., Gimeno, R.E., Dembski, M., Jezek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L.A. and Garlid, K.D. (1999) Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem*, **274**, 26003-26007.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A. and Hall, M.N. (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, **6**, 1122-1128.
- Jackman, M.R. and Willis, W.T. (1996) Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *Am J Physiol*, **270**, C673-678.
- Jackman, R.W. and Kandarian, S.C. (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**, C834-843.
- Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J. and Spiegelman, B.M. (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 12017-12022.
- Jagoe, R.T., Redfern, C.P., Roberts, R.G., Gibson, G.J. and Goodship, T.H. (2002) Skeletal muscle mRNA levels for cathepsin B, but not components of the ubiquitin-proteasome pathway, are increased in patients with lung cancer referred for thoracotomy. *Clin Sci (Lond)*, **102**, 353-361.
- Jefferson, L.S., Fabian, J.R. and Kimball, S.R. (1999) Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 191-200.
- Jeukendrup, A.E. (2002) Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. Ann N Y Acad Sci, 967, 217-235.
- Jones, D., Round, J., De Haan, A. (2005) Physiologie du muscle squelettique: de la structure au mouvement.
- Jorgensen, S.B., Richter, E.A. and Wojtaszewski, J.F. (2006) Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol*, **574**, 17-31.
- Jorgensen, S.B., Wojtaszewski, J.F., Viollet, B., Andreelli, F., Birk, J.B., Hellsten, Y., Schjerling, P., Vaulont, S., Neufer, P.D., Richter, E.A. and Pilegaard, H. (2005) Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *Faseb J*, **19**, 1146-1148.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J*, **19**, 5720-5728.
- Kadonaga, J.T. (1998) Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell*, **92**, 307-313.
- Kalkhoven, E., Valentine, J.E., Heery, D.M. and Parker, M.G. (1998) Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *Embo J*, **17**, 232-243.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, **150**, 1507-1513.
- Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., Nishino, I. and Ezaki, O. (2004) Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem*, **279**, 41114-41123.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzel, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85, 403-414.
- Kanda, F., Takatani, K., Okuda, S., Matsushita, T. and Chihara, K. (1999) Preventive effects of insulinlike growth factor-I on steroid-induced muscle atrophy. *Muscle Nerve*, **22**, 213-217.
- Katunuma, N. and Kominami, E. (1983) Structures and functions of lysosomal thiol proteinases and their endogenous inhibitor. *Curr Top Cell Regul*, 22, 71-101.
- Kawano, Y. and Kypta, R. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. J Cell Sci, 116, 2627-2634.
- Kern, J.A., Lamb, R.J., Reed, J.C., Daniele, R.P. and Nowell, P.C. (1988) Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes. Posttranscriptional mechanisms. *J Clin Invest*, **81**, 237-244.
- Khaleeli, A.A., Betteridge, D.J., Edwards, R.H., Round, J.M. and Ross, E.J. (1983) Effect of treatment of Cushing's syndrome on skeletal muscle structure and function. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **19**, 547-556.
- Kiens, B. (2006) Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. Physiol Rev, 86, 205-243.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2001a) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep*, **2**, 330-335.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N. and Ohsumi, Y. (2001b) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*, **152**, 519-530.
- Kim, H.J., Kim, J.H. and Lee, J.W. (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with serum response factor and coactivates serum response element-mediated transactivations. *J Biol Chem*, **273**, 28564-28567.
- Kizaki, T., Suzuki, K., Hitomi, Y., Taniguchi, N., Saitoh, D., Watanabe, K., Onoe, K., Day, N.K., Good, R.A. and Ohno, H. (2002) Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9392-9397.

- Kliewer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K. and Evans, R.M. (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7355-7359.
- Kliewer, S.A., Xu, H.E., Lambert, M.H. and Willson, T.M. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res*, **56**, 239-263.
- Kline, W.O., Panaro, F.J., Yang, H. and Bodine, S.C. (2007) Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *J Appl Physiol*, **102**, 740-747.
- Koh, S.S., Chen, D., Lee, Y.H. and Stallcup, M.R. (2001) Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem*, **276**, 1089-1098.
- Komamura, K., Shirotani-Ikejima, H., Tatsumi, R., Tsujita-Kuroda, Y., Kitakaze, M., Miyatake, K., Sunagawa, K. and Miyata, T. (2003) Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovasc Drugs Ther*, **17**, 303-310.
- Kostyo, J.L. and Redmond, A.F. (1966) Role of protein synthesis in the inhibitory action of adrenal steroid hormones on amino acid transport by muscle. *Endocrinology*, **79**, 531-540.
- Kramerova, I., Kudryashova, E., Tidball, J.G. and Spencer, M.J. (2004) Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet*, **13**, 1373-1388.
- Kretz, O., Reichardt, H.M., Schutz, G. and Bock, R. (1999) Corticotropin-releasing hormone expression is the major target for glucocorticoid feedback-control at the hypothalamic level. *Brain Res*, **818**, 488-491.
- Laane, E., Tamm, K.P., Buentke, E., Ito, K., Kharaziha, P., Oscarsson, J., Corcoran, M., Bjorklund, A.C., Hultenby, K., Lundin, J., Heyman, M., Soderhall, S., Mazur, J., Porwit, A., Pandolfi, P.P., Zhivotovsky, B., Panaretakis, T. and Grander, D. (2009) Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ*, **16**, 1018-1029.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P. and Auwerx, J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, **127**, 1109-1122.
- Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D. and Daegelen, D. (2008) Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS One*, **3**, e3910.
- Lai, K.M., Gonzalez, M., Poueymirou, W.T., Kline, W.O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T.N., Economides, A.N., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (2004) Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol*, 24, 9295-9304.
- Lalani, R., Bhasin, S., Byhower, F., Tarnuzzer, R., Grant, M., Shen, R., Asa, S., Ezzat, S. and Gonzalez-Cadavid, N.F. (2000) Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *J Endocrinol*, **167**, 417-428.
- Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L.G., Hughes, S.M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edstrom, L., Ehler, E., Udd, B. and Gautel, M. (2005) The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 308, 1599-1603.
- Larsson, N.G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G.S. and Clayton, D.A. (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*, 18, 231-236.
- Lasa, M., Brook, M., Saklatvala, J. and Clark, A.R. (2001) Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Mol Cell Biol*, **21**, 771-780.
- Latres, E., Amini, A.R., Amini, A.A., Griffiths, J., Martin, F.J., Wei, Y., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (2005) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem*, **280**, 2737-2744.
- Laudet, V. (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*, **19**, 207-226.
- Lawler, J.M., Song, W. and Demaree, S.R. (2003) Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, **35**, 9-16.
- Le Grand, F. and Rudnicki, M.A. (2007) Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 628-633.
- Lean, M.E., James, W.P., Jennings, G. and Trayhurn, P. (1986) Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. *Clin Sci (Lond)*, **71**, 291-297.
- Lebon, V., Dufour, S., Petersen, K.F., Ren, J., Jucker, B.M., Slezak, L.A., Cline, G.W., Rothman, D.L. and Shulman, G.I. (2001) Effect of triiodothyronine on mitochondrial energy coupling in human skeletal muscle. *J Clin Invest*, **108**, 733-737.

- Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S.R., Mitch, W.E. and Goldberg, A.L. (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J*, **18**, 39-51.
- Lecker, S.H., Solomon, V., Mitch, W.E. and Goldberg, A.L. (1999) Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, **129**, 227S-237S.
- Lee, S.J. and McPherron, A.C. (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9306-9311.
- Lee, S.K., Kim, H.J., Na, S.Y., Kim, T.S., Choi, H.S., Im, S.Y. and Lee, J.W. (1998) Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem*, 273, 16651-16654.
- Lee, S.W., Dai, G., Hu, Z., Wang, X., Du, J. and Mitch, W.E. (2004) Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. J Am Soc Nephrol, 15, 1537-1545.
- Lee, S.W., Tsou, A.P., Chan, H., Thomas, J., Petrie, K., Eugui, E.M. and Allison, A.C. (1988) Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 1204-1208.
- Lee, Y.H., Koh, S.S., Zhang, X., Cheng, X. and Stallcup, M.R. (2002) Synergy among nuclear receptor coactivators: selective requirement for protein methyltransferase and acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol*, **22**, 3621-3632.
- Leo, C. and Chen, J.D. (2000) The SRC family of nuclear receptor coactivators. Gene, 245, 1-11.
- Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., Chen, Z., Holloszy, J.O., Medeiros, D.M., Schmidt, R.E., Saffitz, J.E., Abel, E.D., Semenkovich, C.F. and Kelly, D.P. (2005) PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol*, **3**, e101.
- Lesnefsky, E.J. and Hoppel, C.L. (2003) Ischemia-reperfusion injury in the aged heart: role of mitochondria. Arch Biochem Biophys, **420**, 287-297.
- Li, B.G., Hasselgren, P.O., Fang, C.H. and Warden, G.D. (2004) Insulin-like growth factor-I blocks dexamethasone-induced protein degradation in cultured myotubes by inhibiting multiple proteolytic pathways: 2002 ABA paper. *J Burn Care Rehabil*, **25**, 112-118.
- Li, H. and Chen, J.D. (1998) The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation. *J Biol Chem*, **273**, 5948-5954.
- Li, H., Gomes, P.J. and Chen, J.D. (1997) RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8479-8484.
- Li, J., O'Malley, B.W. and Wong, J. (2000) p300 requires its histone acetyltransferase activity and SRC-1 interaction domain to facilitate thyroid hormone receptor activation in chromatin. *Mol Cell Biol*, **20**, 2031-2042.
- Li, P., Waters, R.E., Redfern, S.I., Zhang, M., Mao, L., Annex, B.H. and Yan, Z. (2007) Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice. *Am J Pathol*, **170**, 599-608.
- Li, S., Czubryt, M.P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Wiebel, F.F., Nordheim, A. and Olson, E.N. (2005) Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1082-1087.
- Li, X., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2003a) Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol*, **23**, 3763-3773.
- Li, Y.P., Chen, Y., Li, A.S. and Reid, M.B. (2003b) Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **285**, C806-812.
- Li, Y.P., Schwartz, R.J., Waddell, I.D., Holloway, B.R. and Reid, M.B. (1998) Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *Faseb J*, **12**, 871-880.
- Liberman, A.C., Druker, J., Perone, M.J. and Arzt, E. (2007) Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, **18**, 45-56.
- Lin, B., Coughlin, S. and Pilch, P.F. (1998) Bidirectional regulation of uncoupling protein-3 and GLUT-4 mRNA in skeletal muscle by cold. *Am J Physiol*, **275**, E386-391.
- Lin, J., Handschin, C. and Spiegelman, B.M. (2005a) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*, **1**, 361-370.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., Lowell, B.B., Bassel-Duby, R. and Spiegelman, B.M. (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, **418**, 797-801.

- Lin, L., Stringfield, T.M., Shi, X. and Chen, Y. (2005b) Arsenite induces a cell stress-response gene, RTP801, through reactive oxygen species and transcription factors Elk-1 and CCAAT/enhancer-binding protein. *Biochem J*, **392**, 93-102.
- Liu, C.M., Yang, Z., Liu, C.W., Wang, R., Tien, P., Dale, R. and Sun, L.Q. (2007) Effect of RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Cancer Gene Ther*, **14**, 945-952.
- Liu, Y., Randall, W.R. and Schneider, M.F. (2005a) Activity-dependent and -independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle. *J Cell Biol*, **168**, 887-897.
- Liu, Y., Shen, T., Randall, W.R. and Schneider, M.F. (2005b) Signaling pathways in activity-dependent fiber type plasticity in adult skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, **26**, 13-21.
- Liu, Z., Jahn, L.A., Long, W., Fryburg, D.A., Wei, L. and Barrett, E.J. (2001a) Branched chain amino acids activate messenger ribonucleic acid translation regulatory proteins in human skeletal muscle, and glucocorticoids blunt this action. J Clin Endocrinol Metab, 86, 2136-2143.
- Liu, Z., Li, G., Kimball, S.R., Jahn, L.A. and Barrett, E.J. (2004) Glucocorticoids modulate amino acid-induced translation initiation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **287**, E275-281.
- Liu, Z., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2001b) Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12426-12431.
- Llovera, M., Garcia-Martinez, C., Agell, N., Lopez-Soriano, F.J. and Argiles, J.M. (1995) Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Cancer*, **61**, 138-141.
- Lloyd, J.B. (1996) Metabolite efflux and influx across the lysosome membrane. Subcell Biochem, 27, 361-386.
- Lofberg, E., Gutierrez, A., Wernerman, J., Anderstam, B., Mitch, W.E., Price, S.R., Bergstrom, J. and Alvestrand, A. (2002) Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *Eur J Clin Invest*, **32**, 345-353.
- Long, J., Wang, X., Gao, H., Liu, Z., Liu, C., Miao, M. and Liu, J. (2006) Malonaldehyde acts as a mitochondrial toxin: Inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria. *Life Sci*, **79**, 1466-1472.
- Lou, S.J. and Chen, Y.Z. (1998) The rapid inhibitory effect of glucocorticoid on cytosolic free Ca2+ increment induced by high extracellular K+ and its underlying mechanism in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **244**, 403-407.
- Louet, J.F., Coste, A., Amazit, L., Tannour-Louet, M., Wu, R.C., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Auwerx, J. and O'Malley, B.W. (2006) Oncogenic steroid receptor coactivator-3 is a key regulator of the white adipogenic program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17868-17873.
- Lowell, B.B., Ruderman, N.B. and Goodman, M.N. (1986) Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. *Biochem J*, **234**, 237-240.
- Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Sar, M., Tan, J., Higgs, H.N., Larson, R.E., French, F.S. and Wilson, E.M. (1988) The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol*, 2, 1265-1275.
- Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M. and Grimaldi, P.A. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *Faseb J*, **17**, 2299-2301.
- Ma, K., Mallidis, C., Artaza, J., Taylor, W., Gonzalez-Cadavid, N. and Bhasin, S. (2001) Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. Am J Physiol Endocrinol Metab, 281, E1128-1136.
- Ma, K., Mallidis, C., Bhasin, S., Mahabadi, V., Artaza, J., Gonzalez-Cadavid, N., Arias, J. and Salehian, B. (2003) Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. Am J Physiol Endocrinol Metab, 285, E363-371.
- Ma, X.M. and Blenis, J. (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 307-318.
- MacLean, H.E., Chiu, W.S., Notini, A.J., Axell, A.M., Davey, R.A., McManus, J.F., Ma, C., Plant, D.R., Lynch, G.S. and Zajac, J.D. (2008) Impaired skeletal muscle development and function in male, but not female, genomic androgen receptor knockout mice. *Faseb J*, 22, 2676-2689.
- Makara, G.B. and Haller, J. (2001) Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol*, **65**, 367-390.
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A.L., Schiaffino, S. and Sandri, M. (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*, 6, 458-471.
- Mammucari, C., Schiaffino, S. and Sandri, M. (2008) Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy*, **4**, 524-526.

- Manzur, A.Y., Kuntzer, T., Pike, M. and Swan, A. (2008) Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003725.
- Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S.W., Adams, S.H. and Pan, G. (1999) UCP4, a novel brainspecific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett*, **443**, 326-330.

Mayer, R.J. (2000) The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. Nat Rev Mol Cell Biol, 1, 145-148.

- McCall, G.E., Allen, D.L., Haddad, F. and Baldwin, K.M. (2003) Transcriptional regulation of IGF-I expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, **285**, C831-839.
- McCarthy, J.J. and Esser, K.A. (2007) Counterpoint: Satellite cell addition is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *J* Appl Physiol, **103**, 1100-1102; discussion 1102-1103.
- McFarlane, C., Hennebry, A., Thomas, M., Plummer, E., Ling, N., Sharma, M. and Kambadur, R. (2008) Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Exp Cell Res*, **314**, 317-329.
- McFarlane, C., Plummer, E., Thomas, M., Hennebry, A., Ashby, M., Ling, N., Smith, H., Sharma, M. and Kambadur, R. (2006) Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaBindependent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*, **209**, 501-514.
- McGarry, J.D. and Brown, N.F. (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*, **244**, 1-14.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B. and O'Malley, B.W. (1999a) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*, **20**, 321-344.
- McKenna, N.J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1999b) Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **69**, 3-12.
- McMahon, C.D., Popovic, L., Oldham, J.M., Jeanplong, F., Smith, H.K., Kambadur, R., Sharma, M., Maxwell, L. and Bass, J.J. (2003) Myostatin-deficient mice lose more skeletal muscle mass than wild-type controls during hindlimb suspension. Am J Physiol Endocrinol Metab, 285, E82-87.
- McPherron, A.C. and Lee, S.J. (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci* U S A, **94**, 12457-12461.
- Michalik, L., Desvergne, B., Tan, N.S., Basu-Modak, S., Escher, P., Rieusset, J., Peters, J.M., Kaya, G., Gonzalez, F.J., Zakany, J., Metzger, D., Chambon, P., Duboule, D. and Wahli, W. (2001) Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol*, **154**, 799-814.
- Miller, F.J., Jr., Gutterman, D.D., Rios, C.D., Heistad, D.D. and Davidson, B.L. (1998) Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res*, **82**, 1298-1305.
- Miller, R.J. (1992) Voltage-sensitive Ca2+ channels. J Biol Chem, 267, 1403-1406.
- Millet, L., Vidal, H., Andreelli, F., Larrouy, D., Riou, J.P., Ricquier, D., Laville, M. and Langin, D. (1997) Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *J Clin Invest*, **100**, 2665-2670.
- Mills, G.H., Kyroussis, D., Jenkins, P., Hamnegard, C.H., Polkey, M.I., Wass, J., Besser, G.M., Moxham, J. and Green, M. (1999) Respiratory muscle strength in Cushing's syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, **160**, 1762-1765.
- Minetti, G.C., Colussi, C., Adami, R., Serra, C., Mozzetta, C., Parente, V., Fortuni, S., Straino, S., Sampaolesi, M., Di Padova, M., Illi, B., Gallinari, P., Steinkuhler, C., Capogrossi, M.C., Sartorelli, V., Bottinelli, R., Gaetano, C. and Puri, P.L. (2006) Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nat Med*, **12**, 1147-1150.
- Misiti, S., Schomburg, L., Yen, P.M. and Chin, W.W. (1998) Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology*, **139**, 2493-2500.
- Mitch, W.E. and Goldberg, A.L. (1996) Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med*, **335**, 1897-1905.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct*, **27**, 421-429.
- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem*, **273**, 33889-33892.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, **152**, 657-668.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*, **15**, 1101-1111.
- Moldawer, L.L. and Copeland, E.M., 3rd. (1997) Proinflammatory cytokines, nutritional support, and the cachexia syndrome: interactions and therapeutic options. *Cancer*, **79**, 1828-1839.

- Mordier, S., Deval, C., Bechet, D., Tassa, A. and Ferrara, M. (2000) 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*, **275**, 29900-29906.
- Morissette, M.R., Cook, S.A., Foo, S., McKoy, G., Ashida, N., Novikov, M., Scherrer-Crosbie, M., Li, L., Matsui, T., Brooks, G. and Rosenzweig, A. (2006) Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. *Circ Res*, **99**, 15-24.
- Mortimore, G.E., Miotto, G., Venerando, R. and Kadowaki, M. (1996) Autophagy. Subcell Biochem, 27, 93-135.
- Mortimore, G.E., Poso, A.R. and Lardeux, B.R. (1989) Mechanism and regulation of protein degradation in liver. *Diabetes Metab Rev*, **5**, 49-70.
- Moss, F.P. and Leblond, C.P. (1971) Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec*, **170**, 421-435.
- Muller, F.L., Song, W., Jang, Y.C., Liu, Y., Sabia, M., Richardson, A. and Van Remmen, H. (2007) Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **293**, R1159-1168.
- Murgia, M., Serrano, A.L., Calabria, E., Pallafacchina, G., Lomo, T. and Schiaffino, S. (2000) Ras is involved in nerveactivity-dependent regulation of muscle genes. *Nat Cell Biol*, **2**, 142-147.
- Musaro, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L. and Rosenthal, N. (2001) Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*, 27, 195-200.
- Na, S.Y., Lee, S.K., Han, S.J., Choi, H.S., Im, S.Y. and Lee, J.W. (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem*, **273**, 10831-10834.
- Nader, G.A. and Esser, K.A. (2001) Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J Appl Physiol*, **90**, 1936-1942.
- Nagy, L., Kao, H.Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M. and Schwabe, J.W. (1999) Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev*, **13**, 3209-3216.
- Nakashima, K. and Yakabe, Y. (2007) AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**, 1650-1656.
- Naya, F.J., Mercer, B., Shelton, J., Richardson, J.A., Williams, R.S. and Olson, E.N. (2000) Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *J Biol Chem*, **275**, 4545-4548.
- Newton, R. (2000) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? Thorax, 55, 603-613.
- Nicholls, D.G., Bernson, V.S. and Heaton, G.M. (1978) The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl*, **32**, 89-93.
- Nieschlag, E., Hermann M. Behre (ed.). (2004) Testosterone (Action-Deficiency-Substitution).
- Ning, G., Jurecic, V., Baldini, A. and Xu, J. (1999) Structure and chromosomal locations of mouse steroid receptor coactivator gene family. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **35**, 481-486.
- Nishihara, E., Yoshida-Komiya, H., Chan, C.S., Liao, L., Davis, R.L., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2003) SRC-1 null mice exhibit moderate motor dysfunction and delayed development of cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, **23**, 213-222.
- Nordfors, L., Hoffstedt, J., Nyberg, B., Thorne, A., Arner, P., Schalling, M. and Lonnqvist, F. (1998) Reduced gene expression of UCP2 but not UCP3 in skeletal muscle of human obese subjects. *Diabetologia*, **41**, 935-939.
- Norman, A.W., Mizwicki, M.T. and Norman, D.P. (2004) Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 27-41.
- Notini, A.J., Davey, R.A., McManus, J.F., Bate, K.L. and Zajac, J.D. (2005) Genomic actions of the androgen receptor are required for normal male sexual differentiation in a mouse model. *J Mol Endocrinol*, **35**, 547-555.
- Nunes, M.T., Bianco, A.C., Migala, A., Agostini, B. and Hasselbach, W. (1985) Thyroxine induced transformation in sarcoplasmic reticulum of rabbit soleus and psoas muscles. *Z Naturforsch C*, **40**, 726-734.
- Ogier-Denis, E. and Codogno, P. (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1603**, 113-128.
- Ohanna, M., Sobering, A.K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P.A., Sotiropoulos, A. and Pende, M. (2005) Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol*, 7, 286-294.
- Ohsumi, Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nat Rev Mol Cell Biol, 2, 211-216.
- Ojuka, E.O., Jones, T.E., Han, D.H., Chen, M. and Holloszy, J.O. (2003) Raising Ca2+ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *Faseb J*, **17**, 675-681.
- Oliver, W.R., Jr., Shenk, J.L., Snaith, M.R., Russell, C.S., Plunket, K.D., Bodkin, N.L., Lewis, M.C., Winegar, D.A., Sznaidman, M.L., Lambert, M.H., Xu, H.E., Sternbach, D.D., Kliewer, S.A., Hansen, B.C. and Willson, T.M. (2001) A

selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5306-5311.

- Onate, S.A., Boonyaratanakornkit, V., Spencer, T.E., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Edwards, D.P. and O'Malley, B.W. (1998) The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem*, **273**, 12101-12108.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, **270**, 1354-1357.
- Ophoff, J., Van Proeyen, K., Callewaert, F., De Gendt, K., De Bock, K., Vanden Bosch, A., Verhoeven, G., Hespel, P. and Vanderschueren, D. (2009) Androgen signaling in myocytes contributes to the maintenance of muscle mass and fiber type regulation but not to muscle strength or fatigue. *Endocrinology*, **150**, 3558-3566.
- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Lane, J.T. and Thompson, M.P. (1991) Functional relationship of thyroid hormoneinduced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest*, **87**, 125-132.
- Orzechowski, A., Ostaszewski, P., Wilczak, J., Jank, M., Balasinska, B., Wareski, P. and Fuller, J., Jr. (2002) Rats with a glucocorticoid-induced catabolic state show symptoms of oxidative stress and spleen atrophy: the effects of age and recovery. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, **49**, 256-263.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, **12**, 913-922.
- Pallafacchina, G., Calabria, E., Serrano, A.L., Kalhovde, J.M. and Schiaffino, S. (2002) A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9213-9218.
- Park, S.H., Gammon, S.R., Knippers, J.D., Paulsen, S.R., Rubink, D.S. and Winder, W.W. (2002) Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J Appl Physiol*, **92**, 2475-2482.
- Parsons, S.A., Millay, D.P., Wilkins, B.J., Bueno, O.F., Tsika, G.L., Neilson, J.R., Liberatore, C.M., Yutzey, K.E., Crabtree, G.R., Tsika, R.W. and Molkentin, J.D. (2004) Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy. *J Biol Chem*, **279**, 26192-26200.
- Parsons, S.A., Wilkins, B.J., Bueno, O.F. and Molkentin, J.D. (2003) Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice. *Mol Cell Biol*, **23**, 4331-4343.
- Pascual, G. and Glass, C.K. (2006) Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab*, **17**, 321-327.
- Passaquin, A.C., Lhote, P. and Ruegg, U.T. (1998) Calcium influx inhibition by steroids and analogs in C2C12 skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol*, **124**, 1751-1759.
- Pattwell, D.M. and Jackson, M.J. (2004) Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev*, **32**, 14-18.
- Pattwell, D.M., McArdle, A., Morgan, J.E., Patridge, T.A. and Jackson, M.J. (2004) Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*, **37**, 1064-1072.
- Pearce, D. (1994) A mechanistic basis for distinct mineralocorticoid and glucocorticoid receptor transcriptional specificities. *Steroids*, **59**, 153-159.
- Pecqueur, C., Alves-Guerra, M.C., Gelly, C., Levi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F. and Miroux, B. (2001) Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. J Biol Chem, 276, 8705-8712.
- Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1999) Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev*, 13, 3198-3208.
- Peter, J.B., Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Gillespie, C.A. and Stempel, K.E. (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, **11**, 2627-2633.
- Peters, J.M., Lee, S.S., Li, W., Ward, J.M., Gavrilova, O., Everett, C., Reitman, M.L., Hudson, L.D. and Gonzalez, F.J. (2000) Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferatoractivated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*, **20**, 5119-5128.
- Pette, D. (1984) J.B. Wolffe memorial lecture. Activity-induced fast to slow transitions in mammalian muscle. *Med Sci Sports Exerc*, **16**, 517-528.
- Peuker, H., Conjard, A., Putman, C.T. and Pette, D. (1999) Transient expression of myosin heavy chain MHCI alpha in rabbit muscle during fast-to-slow transition. *J Muscle Res Cell Motil*, **20**, 147-154.
- Picard, F., Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W., Chambon, P. and Auwerx, J. (2002) SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*, **111**, 931-941.
- Pickering, W.P., Baker, F.E., Brown, J., Butler, H.L., Govindji, S., Parsons, J.M., Pawluczyk, I.Z., Walls, J. and Bevington, A. (2003) Glucocorticoid antagonist RU38486 fails to block acid-induced muscle wasting in vivo or in vitro. *Nephrol Dial Transplant*, **18**, 1475-1484.

- Pilegaard, H., Ordway, G.A., Saltin, B. and Neufer, P.D. (2000) Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **279**, E806-814.
- Ponsot, E., Zoll, J., N'Guessan, B., Ribera, F., Lampert, E., Richard, R., Veksler, V., Ventura-Clapier, R. and Mettauer, B. (2005) Mitochondrial tissue specificity of substrates utilization in rat cardiac and skeletal muscles. *J Cell Physiol*, 203, 479-486.
- Powell, C.E., Watson, C.S. and Gametchu, B. (1999) Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. *Endocrine*, **10**, 271-280.
- Pratt, W.B. and Toft, D.O. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, **18**, 306-360.
- Produit-Zengaffinen, N., Davis-Lameloise, N., Perreten, H., Becard, D., Gjinovci, A., Keller, P.A., Wollheim, C.B., Herrera, P., Muzzin, P. and Assimacopoulos-Jeannet, F. (2007) Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia*, **50**, 84-93.
- Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B. and Spiegelman, B.M. (1999) Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, **286**, 1368-1371.
- Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J.C., Zhang, C.Y., Krauss, S., Mootha, V.K., Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (2001) Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell*, **8**, 971-982.
- Putman, C.T., Kiricsi, M., Pearcey, J., MacLean, I.M., Bamford, J.A., Murdoch, G.K., Dixon, W.T. and Pette, D. (2003) AMPK activation increases uncoupling protein-3 expression and mitochondrial enzyme activities in rat muscle without fibre type transitions. *J Physiol*, **551**, 169-178.
- Qi, C., Zhu, Y., Pan, J., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Maeda, N., Subbarao, V., Pulikuri, S., Hashimoto, T. and Reddy, J.K. (1999) Mouse steroid receptor coactivator-1 is not essential for peroxisome proliferator-activated receptor alpharegulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1585-1590.
- Quigley, C.A., De Bellis, A., Marschke, K.B., el-Awady, M.K., Wilson, E.M. and French, F.S. (1995) Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev*, **16**, 271-321.
- Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C.P., Burakov, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Freedman, L.P. (1998) A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev*, **12**, 1787-1800.
- Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L., Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N. and Hershey, J.W. (2004) Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *Embo J*, 23, 1761-1769.
- Rehfeldt, C. (2007) In response to Point:Counterpoint: "Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy". J Appl Physiol, 103, 1104.
- Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. and Schutz, G. (1998) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*, 93, 531-541.
- Reichardt, H.M. and Schutz, G. (1998) Glucocorticoid signalling--multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol*, **146**, 1-6.
- Reiling, J.H. and Hafen, E. (2004) The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in Drosophila. *Genes Dev*, **18**, 2879-2892.
- Reis, M., Farage, M. and de Meis, L. (2002) Thermogenesis and energy expenditure: control of heat production by the Ca(2+)-ATPase of fast and slow muscle. *Mol Membr Biol*, **19**, 301-310.
- Reul, J.M. and de Kloet, E.R. (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, **117**, 2505-2511.
- Reynolds, T.H.t., Bodine, S.C. and Lawrence, J.C., Jr. (2002) Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem*, **277**, 17657-17662.
- Rhen, T. and Cidlowski, J.A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, **353**, 1711-1723.
- Rial, E., Gonzalez-Barroso, M., Fleury, C., Iturrizaga, S., Sanchis, D., Jimenez-Jimenez, J., Ricquier, D., Goubern, M. and Bouillaud, F. (1999) Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Embo J*, 18, 5827-5833.
- Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdiguian, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., Lefranc, G., Fardeau, M., Sebille, A. and Beckmann, J.S. (2000) Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated lkappaBalpha/nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *J Cell Biol*, **151**, 1583-1590.

- Richardson, R.S., Grassi, B., Gavin, T.P., Haseler, L.J., Tagore, K., Roca, J. and Wagner, P.D. (1999) Evidence of O2 supply-dependent VO2 max in the exercise-trained human quadriceps. *J Appl Physiol*, **86**, 1048-1053.
- Ricquier, D. and Bouillaud, F. (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J*, **345 Pt 2**, 161-179.
- Ricquier, D. and Kader, J.C. (1976) Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a soidum dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun*, **73**, 577-583.
- Risson, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., Corneloup, C., Richard-Bulteau, H., Vignaud, A., Baas, D., Defour, A., Freyssenet, D., Tanti, J.F., Le-Marchand-Brustel, Y., Ferrier, B., Conjard-Duplany, A., Romanino, K., Bauche, S., Hantai, D., Mueller, M., Kozma, S.C., Thomas, G., Ruegg, M.A., Ferry, A., Pende, M., Bigard, X., Koulmann, N., Schaeffer, L. and Gangloff, Y.G. (2009) Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *J Cell Biol*, **187**, 859-874.
- Robinson-Rechavi, M., Maina, C.V., Gissendanner, C.R., Laudet, V. and Sluder, A. (2005) Explosive lineage-specific expansion of the orphan nuclear receptor HNF4 in nematodes. *J Mol Evol*, **60**, 577-586.
- Rochat, A., Fernandez, A., Vandromme, M., Moles, J.P., Bouschet, T., Carnac, G. and Lamb, N.J. (2004) Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy. *Mol Biol Cell*, **15**, 4544-4555.
- Rochette-Egly, C. (2003) Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal*, **15**, 355-366.
- Rohas, L.M., St-Pierre, J., Uldry, M., Jager, S., Handschin, C. and Spiegelman, B.M. (2007) A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7933-7938.
- Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol*, **3**, 1009-1013.
- Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem*, **276**, 36865-36868.
- Rossi, A.E. and Dirksen, R.T. (2006) Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve*, **33**, 715-731.
- Rotwein, P., Pollock, K.M., Didier, D.K. and Krivi, G.G. (1986) Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem*, **261**, 4828-4832.
- Rowan, B.G., Weigel, N.L. and O'Malley, B.W. (2000) Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, **275**, 4475-4483.
- Rubink, D.S. and Winder, W.W. (2005) Effect of phosphorylation by AMP-activated protein kinase on palmitoyl-CoA inhibition of skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. *J Appl Physiol*, **98**, 1221-1227.
- Ruderman, N.B., Cacicedo, J.M., Itani, S., Yagihashi, N., Saha, A.K., Ye, J.M., Chen, K., Zou, M., Carling, D., Boden, G., Cohen, R.A., Keaney, J., Kraegen, E.W. and Ido, Y. (2003) Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase (AMPK): possible links between insulin resistance in muscle and early endothelial cell damage in diabetes. *Biochem Soc Trans*, **31**, 202-206.
- Ruderman, N.B. and Saha, A.K. (2006) Metabolic syndrome: adenosine monophosphate-activated protein kinase and malonyl coenzyme A. *Obesity (Silver Spring)*, **14 Suppl 1**, 25S-33S.
- Ruderman, N.B., Saha, A.K., Vavvas, D. and Witters, L.A. (1999) Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol*, **276**, E1-E18.
- Russell, A.P., Feilchenfeldt, J., Schreiber, S., Praz, M., Crettenand, A., Gobelet, C., Meier, C.A., Bell, D.R., Kralli, A., Giacobino, J.P. and Deriaz, O. (2003) Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes*, **52**, 2874-2881.
- Sacheck, J.M., Ohtsuka, A., McLary, S.C. and Goldberg, A.L. (2004) IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **287**, E591-601.
- Saftig, P., Hetman, M., Schmahl, W., Weber, K., Heine, L., Mossmann, H., Koster, A., Hess, B., Evers, M., von Figura, K. and et al. (1995) Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *Embo J*, **14**, 3599-3608.
- Saha, A.K., Schwarsin, A.J., Roduit, R., Masse, F., Kaushik, V., Tornheim, K., Prentki, M. and Ruderman, N.B. (2000) Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta -D-ribofuranoside. J Biol Chem, 275, 24279-24283.
- Saido, T.C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H. and Suzuki, K. (1992) Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem*, **267**, 24585-24590.

- Sakamoto, K., Arnolds, D.E., Ekberg, I., Thorell, A. and Goodyear, L.J. (2004) Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 419-425.
- Sakamoto, K., Aschenbach, W.G., Hirshman, M.F. and Goodyear, L.J. (2003) Akt signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **285**, E1081-1088.
- Sakamoto, K., Hirshman, M.F., Aschenbach, W.G. and Goodyear, L.J. (2002) Contraction regulation of Akt in rat skeletal muscle. *J Biol Chem*, **277**, 11910-11917.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Goubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Gregoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Miroux, B., Collins, S., Seldin, M., Richard, D., Warden, C., Bouillaud, F. and Ricquier, D. (1998)
  BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem*, **273**, 34611-34615.
- Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z.P., Lecker, S.H., Goldberg, A.L. and Spiegelman, B.M. (2006) PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 16260-16265.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H. and Goldberg, A.L. (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, **117**, 399-412.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D.M. (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, **14**, 1296-1302.
- Sartorelli, V. and Fulco, M. (2004) Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Sci STKE*, **2004**, re11.
- Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H. and Kato, S. (2003) Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **300**, 167-171.
- Sayen, M.R., Rohrer, D.K. and Dillmann, W.H. (1992) Thyroid hormone response of slow and fast sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase mRNA in striated muscle. *Mol Cell Endocrinol*, **87**, 87-93.
- Schafer, K. and Braun, T. (1999) Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h. *Nat Genet*, **23**, 213-216.
- Schafer-Korting, M., Kleuser, B., Ahmed, M., Holtje, H.D. and Korting, H.C. (2005) Glucocorticoids for human skin: new aspects of the mechanism of action. *Skin Pharmacol Physiol*, **18**, 103-114.
- Schakman, O., Gilson, H., de Coninck, V., Lause, P., Verniers, J., Havaux, X., Ketelslegers, J.M. and Thissen, J.P. (2005) Insulin-like growth factor-I gene transfer by electroporation prevents skeletal muscle atrophy in glucocorticoidtreated rats. *Endocrinology*, **146**, 1789-1797.
- Schakman, O., Gilson, H. and Thissen, J.P. (2008) Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol*, **197**, 1-10.
- Schiaffino, S., Bormioli, S.P. and Aloisi, M. (1976) The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy. *Virchows Arch B Cell Pathol*, **21**, 113-118.
- Schrauwen, P. and Hesselink, M. (2002) UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol*, **205**, 2275-2285.
- Schrauwen, P., Hoppeler, H., Billeter, R., Bakker, A.H. and Pendergast, D.R. (2001) Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **25**, 449-456.
- Schrauwen, P., Troost, F.J., Xia, J., Ravussin, E. and Saris, W.H. (1999) Skeletal muscle UCP2 and UCP3 expression in trained and untrained male subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **23**, 966-972.
- Schrauwen, P., Westerterp-Plantenga, M.S., Kornips, E., Schaart, G. and van Marken Lichtenbelt, W.D. (2002) The effect of mild cold exposure on UCP3 mRNA expression and UCP3 protein content in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26, 450-457.
- Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hubner, C., Riebel, T., Komen, W., Braun, T., Tobin, J.F. and Lee, S.J. (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*, **350**, 2682-2688.
- Schulz, M., Eggert, M., Baniahmad, A., Dostert, A., Heinzel, T. and Renkawitz, R. (2002) RU486-induced glucocorticoid receptor agonism is controlled by the receptor N terminus and by corepressor binding. J Biol Chem, 277, 26238-26243.
- Schulze, P.C., Fang, J., Kassik, K.A., Gannon, J., Cupesi, M., MacGillivray, C., Lee, R.T. and Rosenthal, N. (2005) Transgenic overexpression of locally acting insulin-like growth factor-1 inhibits ubiquitin-mediated muscle atrophy in chronic left-ventricular dysfunction. *Circ Res*, **97**, 418-426.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. and Rudnicki, M.A. (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, **102**, 777-786.
- Seifert, E.L., Bezaire, V., Estey, C. and Harper, M.E. (2008) Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export. *J Biol Chem*, **283**, 25124-25131.

- Severinghaus, J.W. (1994) Exercise O2 transport model assuming zero cytochrome PO2 at VO2 max. *J Appl Physiol*, **77**, 671-678.
- Shah, O.J., Kimball, S.R. and Jefferson, L.S. (2000a) Acute attenuation of translation initiation and protein synthesis by glucocorticoids in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **278**, E76-82.
- Shah, O.J., Kimball, S.R. and Jefferson, L.S. (2000b) Among translational effectors, p70S6k is uniquely sensitive to inhibition by glucocorticoids. *Biochem J*, **347**, 389-397.
- Shahbazian, D., Roux, P.P., Mieulet, V., Cohen, M.S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J.W., Blenis, J., Pende, M. and Sonenberg, N. (2006) The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *Embo J*, 25, 2781-2791.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A. and Brown, M. (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptorregulated transcription. *Cell*, **103**, 843-852.
- Shao, H., Chou, J., Baty, C.J., Burke, N.A., Watkins, S.C., Stolz, D.B. and Wells, A. (2006) Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptormediated activation. *Mol Cell Biol*, **26**, 5481-5496.
- Sharma, D. and Fondell, J.D. (2002) Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP/Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7934-7939.
- Sharma, M., Langley, B., Bass, J. and Kambadur, R. (2001) Myostatin in muscle growth and repair. *Exerc Sport Sci Rev*, **29**, 155-158.
- Sheppard, H.M., Harries, J.C., Hussain, S., Bevan, C. and Heery, D.M. (2001) Analysis of the steroid receptor coactivator 1 (SRC1)-CREB binding protein interaction interface and its importance for the function of SRC1. *Mol Cell Biol*, **21**, 39-50.
- Shin, Y.S., Fink, H., Khiroya, R., Ibebunjo, C. and Martyn, J. (2000) Prednisolone-induced muscle dysfunction is caused more by atrophy than by altered acetylcholine receptor expression. *Anesth Analg*, **91**, 322-328.
- Short, K.R., Bigelow, M.L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S. and Nair, K.S. (2005) Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5618-5623.
- Simonides, W.S., Brent, G.A., Thelen, M.H., van der Linden, C.G., Larsen, P.R. and van Hardeveld, C. (1996) Characterization of the promoter of the rat sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase 1 gene and analysis of thyroid hormone responsiveness. *J Biol Chem*, **271**, 32048-32056.
- Simonides, W.S., Thelen, M.H., van der Linden, C.G., Muller, A. and van Hardeveld, C. (2001) Mechanism of thyroidhormone regulated expression of the SERCA genes in skeletal muscle: implications for thermogenesis. *Biosci Rep*, 21, 139-154.
- Sionov, R.V., Kfir, S., Zafrir, E., Cohen, O., Zilberman, Y. and Yefenof, E. (2006) Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle*, **5**, 1017-1026.
- Smith, H.J. and Tisdale, M.J. (2003) Signal transduction pathways involved in proteolysis-inducing factor induced proteasome expression in murine myotubes. *Br J Cancer*, **89**, 1783-1788.
- Smith, I.J. and Dodd, S.L. (2007) Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle. *Exp Physiol*, **92**, 561-573.
- Smith, I.J., Lecker, S.H. and Hasselgren, P.O. (2008) Calpain activity and muscle wasting in sepsis. Am J Physiol Endocrinol Metab, 295, E762-771.
- Smith, R.E. and Horwitz, B.A. (1969) Brown fat and thermogenesis. Physiol Rev, 49, 330-425.
- Smith, S.M. and Vale, W.W. (2006) The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*, **8**, 383-395.
- Smoak, K.A. and Cidlowski, J.A. (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev*, **125**, 697-706.
- Sneddon, A.A., Delday, M.I., Steven, J. and Maltin, C.A. (2001) Elevated IGF-II mRNA and phosphorylation of 4E-BP1 and p70(S6k) in muscle showing clenbuterol-induced anabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**, E676-682.
- Soderlund, K. and Hultman, E. (1991) ATP and phosphocreatine changes in single human muscle fibers after intense electrical stimulation. *Am J Physiol*, **261**, E737-741.
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C.M. and Ellisen, L.W. (2005) Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol*, **25**, 5834-5845.
- Solanes, G., Pedraza, N., Iglesias, R., Giralt, M. and Villarroya, F. (2003) Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription. *Mol Endocrinol*, **17**, 1944-1958.
- Solomon, V., Baracos, V., Sarraf, P. and Goldberg, A.L. (1998) Rates of ubiquitin conjugation increase when muscles atrophy, largely through activation of the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12602-12607.

- Son, C., Hosoda, K., Ishihara, K., Bevilacqua, L., Masuzaki, H., Fushiki, T., Harper, M.E. and Nakao, K. (2004) Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle. *Diabetologia*, 47, 47-54.
- Song, Y.H., Li, Y., Du, J., Mitch, W.E., Rosenthal, N. and Delafontaine, P. (2005) Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. *J Clin Invest*, **115**, 451-458.
- Sorimachi, H., Ono, Y. and Suzuki, K. (2000) Skeletal muscle-specific calpain, p94, and connectin/titin: their physiological functions and relationship to limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Adv Exp Med Biol*, **481**, 383-395; discussion 395-387.
- Sorrentino, V. (2004) Molecular determinants of the structural and functional organization of the sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, **1742**, 113-118.
- Southgate, R.J., Neill, B., Prelovsek, O., El-Osta, A., Kamei, Y., Miura, S., Ezaki, O., McLoughlin, T.J., Zhang, W., Unterman, T.G. and Febbraio, M.A. (2007) FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle. J Biol Chem, 282, 21176-21186.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, **389**, 194-198.
- St-Pierre, J., Lin, J., Krauss, S., Tarr, P.T., Yang, R., Newgard, C.B. and Spiegelman, B.M. (2003) Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. J Biol Chem, 278, 26597-26603.
- Stellato, C. (2004) Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. Proc Am Thorac Soc, 1, 255-263.
- Stephenson, D.G. (2006) Tubular system excitability: an essential component of excitation-contraction coupling in fast-twitch fibres of vertebrate skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, **27**, 259-274.
- Stevenson, E.J., Giresi, P.G., Koncarevic, A. and Kandarian, S.C. (2003) Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *J Physiol*, **551**, 33-48.
- Stitt, T.N., Drujan, D., Clarke, B.A., Panaro, F., Timofeyva, Y., Kline, W.O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (2004) The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, **14**, 395-403.
- Stock, D., Leslie, A.G. and Walker, J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, **286**, 1700-1705.
- Suen, C.S., Berrodin, T.J., Mastroeni, R., Cheskis, B.J., Lyttle, C.R. and Frail, D.E. (1998) A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*, **273**, 27645-27653.
- Sutter-Dub, M.T. (2002) Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids*, **67**, 77-93.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *Embo J*, **20**, 5971-5981.
- Taillandier, D., Aurousseau, E., Meynial-Denis, D., Bechet, D., Ferrara, M., Cottin, P., Ducastaing, A., Bigard, X., Guezennec, C.Y., Schmid, H.P. and et al. (1996) Coordinate activation of lysosomal, Ca 2+-activated and ATPubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J*, **316** (Pt 1), 65-72.
- Tajbakhsh, S. and Buckingham, M.E. (1994) Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 747-751.
- Takeshita, A., Cardona, G.R., Koibuchi, N., Suen, C.S. and Chin, W.W. (1997) TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. J Biol Chem, 272, 27629-27634.
- Takeshita, A., Yen, P.M., Misiti, S., Cardona, G.R., Liu, Y. and Chin, W.W. (1996) Molecular cloning and properties of a fulllength putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology*, **137**, 3594-3597.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von Figura, K. and Saftig, P. (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406, 902-906.
- Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2503-2518.
- Tassa, A., Roux, M.P., Attaix, D. and Bechet, D.M. (2003) Class III phosphoinositide 3-kinase--Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem J*, **376**, 577-586.
- Taylor, R.W. and Turnbull, D.M. (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, **6**, 389-402.
- Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D.H., Jr., Kull, F.C., Jr. and Gonzalez-Cadavid, N. (2001) Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280, E221-228.
- te Pas, M.F., de Jong, P.R. and Verburg, F.J. (2000) Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family. *Mol Biol Rep*, **27**, 87-98.

- Teleman, A.A., Hietakangas, V., Sayadian, A.C. and Cohen, S.M. (2008) Nutritional control of protein biosynthetic capacity by insulin via Myc in Drosophila. *Cell Metab*, **7**, 21-32.
- Termin, A., Staron, R.S. and Pette, D. (1989) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry*, **92**, 453-457.
- Thompson, M.G. and Palmer, R.M. (1998) Signalling pathways regulating protein turnover in skeletal muscle. *Cell Signal*, **10**, 1-11.
- Tiao, G., Fagan, J., Roegner, V., Lieberman, M., Wang, J.J., Fischer, J.E. and Hasselgren, P.O. (1996) Energy-ubiquitindependent muscle proteolysis during sepsis in rats is regulated by glucocorticoids. *J Clin Invest*, **97**, 339-348.
- Tidball, J.G. and Spencer, M.J. (2000) Calpains and muscular dystrophies. Int J Biochem Cell Biol, 32, 1-5.
- Tiraby, C., Tavernier, G., Capel, F., Mairal, A., Crampes, F., Rami, J., Pujol, C., Boutin, J.A. and Langin, D. (2007) Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia*, **50**, 2190-2199.
- Tischler, M.E. (1994) Effect of the antiglucocorticoid RU38486 on protein metabolism in unweighted soleus muscle. *Metabolism*, **43**, 1451-1455.
- Tischler, M.E., Rosenberg, S., Satarug, S., Henriksen, E.J., Kirby, C.R., Tome, M. and Chase, P. (1990) Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. *Metabolism*, **39**, 756-763.
- Tomas, F.M. (1998) The anti-catabolic efficacy of insulin-like growth factor-I is enhanced by its early administration to rats receiving dexamethasone. *J Endocrinol*, **157**, 89-97.
- Tomas, F.M., Knowles, S.E., Owens, P.C., Chandler, C.S., Francis, G.L., Read, L.C. and Ballard, F.J. (1992) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. *Biochem J*, **282** (**Pt 1**), 91-97.
- Tomas, F.M., Munro, H.N. and Young, V.R. (1979) Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N tau-methylhistidine. *Biochem J*, **178**, 139-146.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1997) The transcriptional coactivator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, **387**, 677-684.
- Torres-Arzayus, M.I., Font de Mora, J., Yuan, J., Vazquez, F., Bronson, R., Rue, M., Sellers, W.R. and Brown, M. (2004) High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell*, **6**, 263-274.
- Tracy, K., Dibling, B.C., Spike, B.T., Knabb, J.R., Schumacker, P. and Macleod, K.F. (2007) BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol*, **27**, 6229-6242.
- Tremblay, F., Dubois, M.J. and Marette, A. (2003) Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle. *Front Biosci*, **8**, d1072-1084.
- Trendelenburg, A.U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S. and Glass, D.J. (2009) Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol*, **296**, C1258-1270.
- Turk, V., Turk, B. and Turk, D. (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. Embo J, 20, 4629-4633.
- Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol, 552, 335-344.
- Turrens, J.F., Alexandre, A. and Lehninger, A.L. (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, **237**, 408-414.
- Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J. and Thomas, G. (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, **431**, 200-205.
- Vamecq, J. and Draye, J.P. (1989) Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation. Essays Biochem, 24, 115-225.
- van der Velden, J.L., Langen, R.C., Kelders, M.C., Wouters, E.F., Janssen-Heininger, Y.M. and Schols, A.M. (2006) Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **290**, C453-462.
- van Eekelen, J.A., Rots, N.Y., Sutanto, W., Oitzl, M.S. and de Kloet, E.R. (1991) Brain corticosteroid receptor gene expression and neuroendocrine dynamics during aging. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **40**, 679-683.
- Veeman, M.T., Axelrod, J.D. and Moon, R.T. (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-cateninindependent Wnt signaling. *Dev Cell*, **5**, 367-377.
- Vidal-Puig, A., Solanes, G., Grujic, D., Flier, J.S. and Lowell, B.B. (1997) UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, **235**, 79-82.
- Vidal-Puig, A.J., Grujic, D., Zhang, C.Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., Muoio, D.M. and Lowell, B.B. (2000) Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem*, 275, 16258-16266.

- Viguerie, N. and Langin, D. (2003) Effect of thyroid hormone on gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **6**, 377-381.
- Viollet, B., Lantier, L., Devin-Leclerc, J., Hebrard, S., Amouyal, C., Mounier, R., Foretz, M. and Andreelli, F. (2009) Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci*, **14**, 3380-3400.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1998) The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *Embo J*, **17**, 507-519.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J*, **15**, 3667-3675.
- Voet, D., Voet, J.G. and Pratt, C.W. (2006) Fundamentals of Biochemistry, 2nd Edition.
- Vogler, S., Pahnke, J., Rousset, S., Ricquier, D., Moch, H., Miroux, B. and Ibrahim, S.M. (2006) Uncoupling protein 2 has protective function during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*, **168**, 1570-1575.
- Voisin, L., Breuille, D., Combaret, L., Pouyet, C., Taillandier, D., Aurousseau, E., Obled, C. and Attaix, D. (1996) Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca2+ -activated, and ubiquitinproteasome proteolytic pathways. J Clin Invest, 97, 1610-1617.
- Vyas, D.R., Spangenburg, E.E., Abraha, T.W., Childs, T.E. and Booth, F.W. (2002) GSK-3beta negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, C545-551.
- Waddell, D.S., Baehr, L.M., van den Brandt, J., Johnsen, S.A., Reichardt, H.M., Furlow, J.D. and Bodine, S.C. (2008) The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **295**, E785-797.
- Wagner, K.R., McPherron, A.C., Winik, N. and Lee, S.J. (2002) Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol*, **52**, 832-836.
- Walker, G., Pfeilschifter, J. and Kunz, D. (1997) Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-gamma-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoidinduced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation. J Biol Chem, 272, 16679-16687.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. and Eppenberger, H.M. (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J*, **281** (**Pt 1**), 21-40.
- Wan, M., Wu, X., Guan, K.L., Han, M., Zhuang, Y. and Xu, T. (2006) Muscle atrophy in transgenic mice expressing a human TSC1 transgene. *FEBS Lett*, **580**, 5621-5627.
- Wang, H., Kubica, N., Ellisen, L.W., Jefferson, L.S. and Kimball, S.R. (2006a) Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J Biol Chem*, 281, 39128-39134.
- Wang, Y.X., Lee, C.H., Tiep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H. and Evans, R.M. (2003a) Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, **113**, 159-170.
- Wang, Y.X., Zhang, C.L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., Ham, J., Kang, H. and Evans, R.M. (2004) Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol*, **2**, e294.
- Wang, Z., Malone, M.H., Thomenius, M.J., Zhong, F., Xu, F. and Distelhorst, C.W. (2003b) Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. J Biol Chem, 278, 27053-27058.
- Wang, Z., Qi, C., Krones, A., Woodring, P., Zhu, X., Reddy, J.K., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G. and Hunter, T. (2006b) Critical roles of the p160 transcriptional coactivators p/CIP and SRC-1 in energy balance. *Cell Metab*, **3**, 111-122.
- Wang, Z., Rose, D.W., Hermanson, O., Liu, F., Herman, T., Wu, W., Szeto, D., Gleiberman, A., Krones, A., Pratt, K., Rosenfeld, R., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000) Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13549-13554.
- Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A.P. and Gustafsson, J.A. (2003) Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol*, **17**, 1901-1909.
- Watts, A.G. (2005) Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol*, **26**, 109-130.
- Wei, W., Yang, H., Cao, P., Menconi, M., Chamberlain, C., Petkova, V. and Hasselgren, P.O. (2006) Degradation of C/EBPbeta in cultured myotubes is calpain-dependent. *J Cell Physiol*, **208**, 386-398.
- Weibel, E.R., Taylor, C.R. and Hoppeler, H. (1991) The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10357-10361.
- Welle, S., Bhatt, K., Pinkert, C.A., Tawil, R. and Thornton, C.A. (2007) Muscle growth after postdevelopmental myostatin gene knockout. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **292**, E985-991.
- Wenz, T., Rossi, S.G., Rotundo, R.L., Spiegelman, B.M. and Moraes, C.T. (2009) Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 20405-20410.

- Winder, W.W., Wilson, H.A., Hardie, D.G., Rasmussen, B.B., Hutber, C.A., Call, G.B., Clayton, R.D., Conley, L.M., Yoon, S. and Zhou, B. (1997) Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. J Appl Physiol, 82, 219-225.
- Wojcik, S., Nogalska, A., Engel, W.K. and Askanas, V. (2008) Myostatin and its precursor protein are increased in the skeletal muscle of patients with Type-II muscle fibre atrophy. *Folia Morphol (Warsz)*, **67**, 6-12.
- Wu, H., Kanatous, S.B., Thurmond, F.A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R. and Williams, R.S. (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*, **296**, 349-352.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C. and Spiegelman, B.M. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, **98**, 115-124.
- Wulf, A., Harneit, A., Kroger, M., Kebenko, M., Wetzel, M.G. and Weitzel, J.M. (2008) T3-mediated expression of PGC-1alpha via a far upstream located thyroid hormone response element. *Mol Cell Endocrinol*, **287**, 90-95.
- Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. Cell, 124, 471-484.
- Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C. and O'Malley, B.W. (2000) The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6379-6384.
- Xu, J. and O'Malley, B.W. (2002) Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev Endocr Metab Disord*, **3**, 185-192.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1998) Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*, **279**, 1922-1925.
- Xu, X., Decker, W., Sampson, M.J., Craigen, W.J. and Colombini, M. (1999) Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability. *J Membr Biol*, **170**, 89-102.
- Yan, J., Kuroyanagi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Tokumitsu, H., Tomoda, T., Shirasawa, T. and Muramatsu, M. (1998) Identification of mouse ULK1, a novel protein kinase structurally related to C. elegans UNC-51. *Biochem Biophys Res Commun*, 246, 222-227.
- Yang, S., Alnaqeeb, M., Simpson, H. and Goldspink, G. (1996) Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J Muscle Res Cell Motil*, **17**, 487-495.
- Yeh, S., Tsai, M.Y., Xu, Q., Mu, X.M., Lardy, H., Huang, K.E., Lin, H., Yeh, S.D., Altuwaijri, S., Zhou, X., Xing, L., Boyce, B.F., Hung, M.C., Zhang, S., Gan, L. and Chang, C. (2002) Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci* U S A, 99, 13498-13503.
- Yehuda, R. (2002) Post-traumatic stress disorder. N Engl J Med, 346, 108-114.
- Yu, K., Bayona, W., Kallen, C.B., Harding, H.P., Ravera, C.P., McMahon, G., Brown, M. and Lazar, M.A. (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem*, **270**, 23975-23983.
- Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J.L. and Inesi, G. (1993) H+ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca2+ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys J*, **64**, 1232-1242.
- Zalewska, T., Thompson, V.F. and Goll, D.E. (2004) Effect of phosphatidylinositol and inside-out erythrocyte vesicles on autolysis of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, **1693**, 125-133.
- Zamir, O., Hasselgren, P.O., von Allmen, D. and Fischer, J.E. (1991) The effect of interleukin-1 alpha and the glucocorticoid receptor blocker RU 38486 on total and myofibrillar protein breakdown in skeletal muscle. *J Surg Res*, **50**, 579-583.
- Zeviani, M. and Di Donato, S. (2004) Mitochondrial disorders. *Brain*, **127**, 2153-2172.
- Zhang, C.Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A.J., Boss, O., Kim, Y.B., Zheng, X.X., Wheeler, M.B., Shulman, G.I., Chan, C.B. and Lowell, B.B. (2001) Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*, **105**, 745-755.
- Zhang, C.Y., Parton, L.E., Ye, C.P., Krauss, S., Shen, R., Lin, C.T., Porco, J.A., Jr. and Lowell, B.B. (2006a) Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metab*, **3**, 417-427.
- Zhang, L., Zhou, R., Li, X., Ursano, R.J. and Li, H. (2006b) Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling: a possible mechanism for hippocampus atrophy in PTSD. *Med Hypotheses*, **66**, 1205-1208.
- Zhang, Y., Ma, K., Song, S., Elam, M.B., Cook, G.A. and Park, E.A. (2004) Peroxisomal proliferator-activated receptorgamma coactivator-1 alpha (PGC-1 alpha) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I alpha). *J Biol Chem*, **279**, 53963-53971.
- Zhao, W., Qin, W., Pan, J., Wu, Y., Bauman, W.A. and Cardozo, C. (2009) Dependence of dexamethasone-induced Akt/FOXO1 signaling, upregulation of MAFbx, and protein catabolism upon the glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **378**, 668-672.

- Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S. and Reddy, J.K. (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7921-7925.
- Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M. and Lee, S.J. (2002) Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*, **296**, 1486-1488.
- Zoll, J., Sanchez, H., N'Guessan, B., Ribera, F., Lampert, E., Bigard, X., Serrurier, B., Fortin, D., Geny, B., Veksler, V., Ventura-Clapier, R. and Mettauer, B. (2002) Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. J Physiol, 543, 191-200.
- Zong, H., Ren, J.M., Young, L.H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M.J. and Shulman, G.I. (2002) AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15983-15987.