



**HAL**  
open science

# Mécanismes moléculaires du contrôle de la masse musculaire sous l'action du $\beta$ 2-agoniste formotérol

Olivier Joassard

## ► To cite this version:

Olivier Joassard. Mécanismes moléculaires du contrôle de la masse musculaire sous l'action du  $\beta$ 2-agoniste formotérol. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2013. Français. NNT : 2013STET009T . tel-01001862

**HAL Id: tel-01001862**

**<https://theses.hal.science/tel-01001862>**

Submitted on 5 Jun 2014

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

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

Université Jean Monnet – Saint-Etienne  
Faculté de Médecine Jacques Lisfranc

## THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

Ecole Doctorale EDSIS n°488 : Sciences, Ingénierie, Santé

Spécialité : Biologie, Médecine et Santé

Option : Biologie et Physiologie de l'Exercice

# MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU CONTRÔLE DE LA MASSE MUSCULAIRE SOUS L'ACTION DU $\beta_2$ -AGONISTE FORMOTÉROL

Présentée et soutenue publiquement le 15 juillet 2013 par

**Olivier JOASSARD**

Devant le jury composé de :

**M. Xavier BIGARD**

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce, Paris

Rapporteur

**M. Guillaume PY**

Maître de Conférences, UMR 866, INRA, Université Montpellier 1

Rapporteur

**M. Dominique DARDEVET**

Directeur de Recherche, UMR 1019, INRA, Université Clermont-Ferrand

Examineur

**Mme Katia COLLOMP**

Professeur, Laboratoire CIAMS, Université Paris Sud – Université Orléans

Examineur

**Mme Phanélie BERTHON**

Maître de Conférences, EA4338, UFR CISM, Université de Savoie

Co-directrice de thèse

**M. Damien FREYSSENET**

Professeur, EA 4338, Université de Saint-Etienne

Directeur de thèse



# REMERCIEMENTS

Je souhaite, tout d'abord, remercier l'ensemble des membres du jury, les Professeurs Katia COLLOMP, Xavier BIGARD et Dominique DARDEVET ainsi que le Docteur Guillaume PY pour avoir accepté de juger ce travail.

L'ensemble des résultats de ces travaux de thèse a été obtenu au Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (LPE, EA4338) de la Faculté de Médecine de Saint-Etienne. Je remercie le Professeur Alain BELLI de m'avoir accueilli dans son service. Cette thèse a été réalisée en étroite collaboration avec le Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie du Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne. Merci aux Docteurs Thierry BASSET et Xavier DELAVENNE pour leur confiance et leurs conseils avisés.

Je suis redevable aux nombreuses personnes qui, au fil des années, ont su me conseiller et me soutenir. Sans eux, ce manuscrit de thèse n'aurait pas pu voir le jour. Qu'ils en soient remerciés.

Ce travail a été réalisé sous la direction de mon directeur de thèse le Professeur Damien FREYSSENET. Ma gratitude sans limite envers lui. Je le remercie chaleureusement de m'avoir suivi et de s'être tant investi dans ce travail et tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accordé sa confiance et sa disponibilité pendant toute la durée de celui-ci. Je garderai en souvenir la fois où nous avons fait (ou essayé de faire) une *via ferrata* à Rochetaillée sous des trombes d'eau et la grêle. Merci pour cette sortie labo qui devint une véritable expédition. Je suis également profondément reconnaissant envers ma co-directrice de thèse le Docteur Phanélie BERTHON pour le temps qu'elle m'a consacré malgré la distance géographique qui nous sépare depuis mon Master 1 jusqu'à aujourd'hui. Nos discussions ont largement contribué à l'avancée de ma formation.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Josiane CASTELLS pour sa joie de vivre communicative, son aide précieuse, son soutien et à Marie-Pierre BLANC qui m'a initié à la technique du Western Blot. Merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Régis BONNEFOY, pour les nombreux dépannages non seulement informatiques mais également techniques au laboratoire.

Je souhaite remercier le Professeur Christian DENIS, le Professeur Thierry BUSSO, et le Docteur Xavier DEVILLARD pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de donner des cours en Médecine et en STAPS. Merci au Docteur Frédéric COSTES, au Docteur Frédéric ROCHE, au Professeur Henri BENOIT, au Professeur Guillaume MILLET, et au Docteur Roger OULLION pour l'aide et les connaissances qu'ils m'ont apportées tout au long de mon parcours. Je souhaite les remercier pour m'avoir permis de bénéficier de leur expérience. Anne Cécile DURIEUX merci pour ton expérience partagée et tes conseils avisés. Un grand merci à Bernard Jean JASMIN et à toute son équipe pour m'avoir accueilli pendant mes vacances au Canada.

Merci à Ghislaine pour s'être occupée de mes rats lors du protocole formotérol et aux techniciennes du plateau de biologie (Marie-Laure, Sophie, Nicole...) pour leur bonne humeur et pour m'avoir permis de partager un bout de paillasses lors de mes recherches à l'Hôpital Nord.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux personnes avec qui j'ai été amené à travailler et auprès desquelles j'ai beaucoup appris. Merci à An NGO KIM TU, Lucile VINCENT, Julien VERNEY, Katia TOMAZIN qui ont partagé mon bureau au Pavillon 9. Merci à Pierre SAMOZINO, Philippe GIMENEZ et Mohamed Ali SAAFI (dit Momo) pour ces séances d'entraînement « musclées ». Merci à Nicolas PEYROT, Pascal EDOUARD et Estelle RAFFIN pour votre gentillesse. Merci à Aurélie DEFOUR, François FAVIER, Adel AMIROUCHE, Yann GALLOT, Marine DESGEORGES (qui m'a aidé à dompter les caprices du Western blot !!), Stéphanie CHANON et Anaïs BELLEDANT pour ton dynamisme et ton franc-parler (on se revoit bientôt au Canada !!). Je vous souhaite bonne continuation dans votre futur personnel et professionnel. Je tiens également à faire part de ma gratitude aux membres du GIMAP (Groupe sur l'Immunité des Muqueuses et des Agents Pathogènes) et du LBTO (Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux) pour leur bonne humeur, leur gentillesse et pour les nombreux services qu'ils nous ont rendu. Merci aux nombreux stagiaires qui ont animé le laboratoire : Justine, Adelina, Margaux, Léa, Damien, Jean, Floriane, David et Ludivine.

Merci aux partenaires financiers associés à la réalisation de ce travail de recherche sans qui ces travaux n'auraient pas pu voir le jour : l'Université Jean Monnet (UJM) de Saint-Etienne ainsi que l'Agence Française de Lutte contre le Dopage (AFLD) qui a contribué au

financement de ce travail de thèse en répondant favorablement à notre demande de subvention. Que tous soient ici vivement remerciés.

Plongé le nez dans la recherche, mes pensées vont vers les personnes tendres et vigilantes qui m'aident à me vider l'esprit. Merci à ceux qui me supportent et m'entourent : Claire (avec qui j'ai formé un binôme de « choc » en Licence) et Benoît (meilleur prof de guitare) pour leur oreille attentive et ces virées en Espagne et à Strasbourg, ma belle-famille et sans oublier Pauline pour son aide, ses encouragements, sa patience et son amour.

Pour leur patience, leurs conseils et pour la relecture de ce manuscrit de thèse, je le dédie à mes parents,

A mes amis,

A ma famille.



# **SOMMAIRE**





# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>19</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>20</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>21</b>
<b>ETAT DE LA LITTERATURE</b>	<b>31</b>
I. Description des $\beta_2$ -agonistes : structure et classification	35
II. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques : éléments de la famille des Récepteurs Couplés aux Protéines	39
II.1 De la théorie « des chaînes latérales » à l'émergence de la notion de récepteurs	39
II.2 La famille des RCPGs et les récepteurs $\beta$ -adrénergiques	41
II.2.1 La structure des RCPGs	41
II.2.2 Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques	43
II.2.3 Généralités sur les protéines G couplées aux récepteurs $\beta$ -adrénergiques	45
II.3 Affinité des $\beta_2$ -agonistes pour les récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques	47
II.4 Mécanismes de régulation des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques et de leur fonction	49
II.4.1 Régulation de la densité des récepteurs $\beta$ -adrénergiques	49
II.4.2 La phosphorylation et désensibilisation des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques	51
II.4.3 Internalisation et dégradation des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques	53
III. Effets généraux des $\beta_2$ -agonistes sur différents tissus de l'organisme	59
III.1 Le rein et le foie	59
III.2 Les glandes surrénales	61
III.3 L'os	61
III.4 Le tissu adipeux	65
III.5 Le muscle cardiaque	65
III.6 Le muscle strié squelettique	67
IV. Potentiel thérapeutique lié à l'utilisation des $\beta_2$ -agonistes : prévention de la perte de masse musculaire	73
IV.1 La sarcopénie : perte de masse musculaire liée à l'âge	73
IV.2 La dénervation	75
IV.3 L'inactivité par immobilisation ou suspension	75
IV.4 Les pathologies neuromusculaires	77
IV.4.1 La dystrophie musculaire de Duchenne	77
IV.4.2 La dystrophie musculaire fascioscapulohumérale	81
IV.4.3 La <i>myasthenia gravis</i> et la myopathie congénitale à central core	81
IV.4.4 La dystrophie musculaire congénitale avec déficit en mérosine	83
IV.4.5 Lésions médullaires et lésions du motoneurone	83
IV.4.6 L'amyotrophie spinale	85
IV.4.7 La maladie de Pompe	87
IV.5 Les pathologies chroniques et les pathologies associées à une perte à long-terme de la fonction musculaire	87
IV.5.1 La cachexie associée au cancer	87
IV.5.2 L'insuffisance cardiaque chronique	89
IV.5.3 L'accident vasculaire cérébral	89
IV.5.4 La bronchopneumopathie obstructive chronique	91
IV.5.5 Le sepsis	91
IV.5.6 La lésion musculaire liée à la température (brûlure, hyperthermie)	93

V. La performance musculaire et les $\beta_2$ -agonistes	95
V.1 La force musculaire et l'endurance chez l'animal	95
V.1.1 La force musculaire	95
V.1.2 L'endurance	97
V.2 Effets de l'inhalation et de l'administration orale de $\beta_2$ -agonistes sur la force musculaire et l'endurance chez l'humain	99
V.2.1 Inhalation des $\beta_2$ -agonistes	99
V.2.2 Administration orale des $\beta_2$ -agonistes	101
VI. Effets délétères liés à la prise de $\beta_2$ -agonistes	105
VI.1 Limitation à l'usage des $\beta_2$ -agonistes	105
VI.2 Prise involontaire de $\beta_2$ -agonistes et intoxication alimentaire	107
VI.3 Usage abusif des $\beta_2$ -agonistes par les athlètes	111
VII. Mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'effet anabolisant du muscle squelettique après stimulation $\beta_2$ -adrénergique	115
VII.1 La voie « canonique » des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques	115
VII.1.1 Les protéines G $\alpha$ impliquées dans l'hypertrophie du muscle squelettique	115
VII.1.2 L'adénylate cyclase	119
VII.1.3 Les phosphodiésterases	119
VII.1.4 La protéine kinase A	121
VII.1.5 Le facteur de transcription CREB	123
VII.2 Régulation transcriptionnelle des gènes cibles de CREB potentiellement impliqués dans l'hypertrophie musculaire	123
VII.3 Régulation post-transcriptionnelle <i>via</i> la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, initiateur de la traduction des protéines	129
VII.4 Régulation de la protéolyse	139
VII.4.1 La voie ubiquitine-protéasome : rôle dans la protéolyse musculaire	139
VII.4.2 Le système calpaïne/calpastatine et les $\beta_2$ -agonistes	141
VII.4.3 L'autophagie et le turnover protéique	143

## **HYPOTHESES ET OBJECTIFS** \_\_\_\_\_ **147**

## **MATERIEL ET METHODES** \_\_\_\_\_ **151**

Prélèvement tissulaire et conditionnement des échantillons	153
Coloration histochimique : Hemalun-Eosine-Safran (HES)	154
Coupes histologiques	155
Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse	156
Extraction protéique avec tampon complet sur tissu musculaire/cellules	159
Dosage de protéines	162
Hexokinase	163
Citrate Synthétase	165
Activité Chymotrypsine-Like	168
Activité Trypsine-Like	170
Luminex	172
Electrophorèse SDS-PAGE	174
Western Blot	179
Quantification du Western blot avec ImageJ	183
Dosage protéique (Spectromètre UV-1800)	184
Maintenance cellulaire (C2C12, L6)	185
Designer des amorces pour PCR	188
Purification de l'ARN	189
La qPCR	191

<b>RESULTATS</b>	<b>197</b>
<b>MANUSCRIT 1</b>	<b>199</b>
<b>MANUSCRIT 2</b>	<b>241</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>265</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>275</b>
<b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES</b>	<b>279</b>
<b>COMMUNICATIONS PAR AFFICHE</b>	<b>281</b>
<b>COMMUNICATIONS ORALES</b>	<b>297</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>307</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>325</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

### A

**Å** Angstrom  
**aa** acide aminé  
**A<sub>1</sub>-R** Récepteur A<sub>1</sub>-adrénergique  
**AC** Adénylate cyclase  
**A-CREB** dominant négatif de **CREB**  
**Actb** Actin beta  
**ActRIIB** Activin receptor type **II**  
**ADN** Acide désoxyribonucléique  
**ADO** Adénosine  
**ADP** Adénosine diphosphate  
**ADRB** gène du récepteur β-adrénergique  
**AICAR** 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-d-ribofuranoside  
**AIE** Asthme induit par l'exercice  
**AM** Acétoxyméthyl  
**AMA** Agence Mondiale Antidopage  
**Ambra1** Activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy protein-1  
**AMP** Adénosine monophosphate  
**AMPC** Adénosine monophosphate cyclique  
**AMPCP** α,β-methyleneadenosine-5'-diphosphate  
**AMPK** AMP-activated protein kinase  
**AP-2** β<sub>2</sub>-adaptine  
**ARNm** Acide ribonucléique messenger  
**Asp** Aspartate  
**Atg** Autophagy-related gene  
**ATP** Adénosine triphosphate  
**AUT** Attestation d'usage à des fins thérapeutiques

### B

**β-ARK** Beta adrenergic receptor kinase  
**β<sub>2</sub>-AR** Beta 2 adrenergic receptor  
**Bcl-2** B cell lymphoma-2  
**Bif-1** Bax-interacting factor-1  
**Bnip3** BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3  
**BPCO** Bronchopneumopathie chronique obstructive  
**BSA** bovin serum albumin

### C

**C5, C6, C7** nerfs spinaux cervicaux 5, 6, 7  
**Ca<sup>2+</sup>** calcium  
**Cbfa1** core binding factor α1  
**CBP** CREB-binding protein  
**CCV** clathrin-coated vesicles  
**CDC25** CDC25 homology domain  
**COOH** extrémité carboxyle  
**CREB** cAMP response element (CRE) binding protein

**D**

**DEP** Dishevelled-Egl-10-Pleckstrin domain  
**DMD** Dystrophie musculaire de Duchenne  
**DPCPX** 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine  
**DT** Domaine transmembranire  
**DUB** enzyme déubiquitinante  
**dy/dy** génotype dystrophique

**E**

**E3-ubiquitine ligase** enzyme type 3 ubiquitine ligase  
**EBP50/NHERF1** Ezrin-binding phosphoprotein of 50 kDa/sodium-hydrogen exchange regulatory factor 1  
**ECL** Extracellulaire  
**EDL** *extensor digitorum longus*  
**eIF2** eukaryotic initiation factor 2  
**eIF4E** eukaryotic initiation factor 4E  
**Epac** Exchange protein directly activated by cAMP  
**EPO** Erythropoïétine  
**ERK** Extracellular signal-regulated kinase  
**ERT** Enzyme-replacement therapy  
**ESCRT** Endosomal sorting complex required for transport

**F**

**FIP200** FAK family kinase-interacting protein of 200 kD  
**FoxO** Forkhead transcription factor  
**FRET** Fluorescence resonance energy transfer  
**FSHD** Dystrophie musculaire fascioscapulohumérale

**G**

**GAA** enzyme  $\alpha$ -glucosidase acide  
**Gabarapl** Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like  
**GAPDH** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
**GAS** *gastrocnemius*  
**G $\alpha$ <sub>i</sub>**  $\alpha$ -subunit of the inhibitory G protein  
**G $\alpha$ <sub>q</sub>**  $\alpha$ -subunit of the Gq protein  
**G $\alpha$ <sub>s</sub>**  $\alpha$ -subunit of the stimulatory G protein  
**G $\beta$  $\gamma$**   $\beta\gamma$ -subunit of the G protein  
**GDP** Guanosine diphosphate  
**GEF** Guanine exchange factor  
**GFP** Green fluorescent protein  
**GRK** G protein-coupled receptor kinase  
**GSK3** Glycogen synthase kinase 3  
**GTP** Guanosine triphosphate

**H**

**HDAC** Histone déacétylase de classe  
**HEK293** Human Embryonic Kidney 293 cells  
**HOPS** Homotypic vacuole fusion and protein sorting  
**Hprt** Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase

**I**

**IBMX** Isobutylméthylxanthine  
**ICL** Intracellulaire  
**IGF** Insulin growth factor  
**IGFBP** IGF-binding protein  
**INS-1** pancreatic insulinoma cell line  
**i.p.** intraperitonéale  
**IRS** Insulin receptor substrate  
**ISO** Isoprotérénol (ou isoprénaline)

**J**

**J** Joule  
**JHDM2a** JmjC-containing H3K9 demethylase  
**JNK** c-Jun N-terminal kinase  
**Jr** Jour

**K**

**Kd** Constante de dissociation  
**kDa** kilodalton  
**KO** Knockout

**L**

**LABA** Long-acting  $\beta_2$ -agonist  
**LAMP2** Lysosomal associated membrane protein 2  
**LC3b** Light chain 3 beta  
**LKB1** Tumor suppressor liver kinase B1

**M**

**MAFbx/Atrogin-1** Muscle atrophy F-box  
**mAKAP** muscle A kinase-anchoring protein  
**MAPK** Mitogen-activated protein kinase  
**Mdm2** Murine double minute 2  
**mdx** X-linked muscular dystrophy  
**MEF** Myocyte enhancer factor  
**MHC** Myosin heavy chain  
**min** minute  
**MKP-1** MAPK phosphatase-1  
**Mnd** Motor neuron degeneration  
**MRP** Multidrug resistance-related proteins  
**MSTN** Myostatine  
**mTOR** mammalian Target of rapamycine  
**MuRF1** Muscle RING finger1  
**Myf5** Myogenic factor 5  
**MyoD** Myogenic differentiation protein

**N**

**n.c.** pas de changement  
**n.d.** non déterminé  
**Nedd4** Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4



**NR4A** orphan nuclear receptor  
**n.s.** non significatif  
**NSF** N-Ethylmaleimide sensitive fusion protein

**P**

**Pax3** Paired box 3  
**PDE** Phosphodiesterase  
**PDK1** Phosphoinositide-dependent kinase-1  
**PE** Phosphatidylethanolamine  
**PGC-1 $\alpha$**  Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha  
**pH** potentiel hydrogène  
**Phe** Phénylalanine  
**Pi** Phosphate inorganique  
**PIP2** Phosphatidylinositol-biphosphate  
**PIP3** Phosphatidylinositol-triphosphate  
**PI3K** Phosphatidylinositol 3-kinase  
**PKA** Protéine kinase A  
**Pol II** ARN polymérase I  
**Protéine G** Guanine nucleotide-binding protein  
**PTX** Pertussis toxin

**R**

**RA** Ras-association domain  
**Rab** Ras-related GTPase  
**Rap1** Ras-like small GTPase protein 1  
**RCPG** Récepteur couplé aux protéines G  
**REM** Ras-exchanger motif  
**Rheb** Ras homolog enriched in brain  
**rpS6** ribosomal protein S6  
**RyR** Récepteur à la ryanodine

**S**

**S6K1** 40S ribosomal S6 kinase 1  
**SABA** Short-acting  $\beta$ -agonist  
**s.c.** sous-cutanée  
**sec** seconde  
**Ser** sérine  
**SERCA** Sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase  
**shPGC-1 $\alpha$**  small hairpin PGC-1 $\alpha$   
**shRNA** small hairpin RNA  
**SIK1** Salt-inducible kinase 1  
**SMA** Spinal muscular atrophy  
**Smad** Small mother against decapentaplegic  
**SMN** Survival motor neuron  
**SNARE** N-ethyl-maleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor  
**SNC** Système nerveux central  
**SNX27** Sorting nexin 27  
**SOL** soleus

**T****t<sub>1/2</sub>** temps de demi-vie**TA** *tibialis anterior***TBS** Tris buffered saline**Thr** thréonine**TNF- $\alpha$**  Tumor necrosis factor- $\alpha$ **TSC** Tuberosus sclerosis complex**U****Ub** Ubiquitination**Ulk1** Unc-51-like kinase 1**USP** Ubiquitin-specific protease**UVRAG** UV irradiation resistance-associated gene**V****VLVLE** Valine-Leucine-Valine-Leucine-Glutamate**VO<sub>2max</sub>** consommation maximale aérobie**Vps** Vacuolar protein sorting**W****W** Watt**WT** Wild type**007** 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP**007-AM** 007-acétoxyméthyl ester**4E-BP1** eIF4E binding protein 1

° degré

°C degré Celsius

% pourcentage

**-OH** groupement hydroxyle**-Cl** groupement chlorure**-NH<sub>2</sub>** groupement amine**pg,  $\mu$ g, mg, kg** picogramme, microgramme, milligramme, kilogramme**nm, m, km** nanomètre, mètre, kilomètre**mL, L** millilitre, litre **$\mu$ mol, mol** micromole, mole



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Nombre total de contrôles réalisés par les laboratoires accrédités par l'Agence Mondiale Antidopage et nombre de contrôles positifs détectés lors des Jeux Olympiques de Sydney (2000), Athènes (2004), Pékin (2008) et Londres (2012) .....	24
<b>Figure 2</b> : Nombre d'attestations d'usage à des fins thérapeutiques demandées lors des Jeux Olympiques et Paralympiques de 2004 (Athènes) et 2008 (Pékin) .....	26
<b>Figure 3</b> : Nombre de fois où les $\beta_2$ -agonistes (clenbutérol, fénotérol, formotérol, salbutamol, salmétérol et terbutaline) ont été détectés par an lors de contrôles antidopage .....	26
<b>Figure 4</b> : Nombre de publications citant dans le titre et/ou dans le résumé les $\beta_2$ -agonistes	34
<b>Figure 5</b> : Structures chimiques des $\beta_2$ -agonistes dérivées de l'adrénaline à durée d'action courte, longue et ultra-longue.....	34
<b>Figure 6</b> : Délai et durée d'action de différents $\beta_2$ -agonistes inhalés chez l'humain.....	36
<b>Figure 7</b> : Evènements liés à la découverte et à l'établissement du concept de récepteurs ....	38
<b>Figure 8</b> : Structure des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques couplés aux protéines G. ....	40
<b>Figure 9</b> : Formation du complexe récepteur $\beta_2$ -adrénergique-protéine G après stimulation par un $\beta_2$ -agoniste.....	44
<b>Figure 10</b> : Modèle d'interaction du formotérol, du salbutamol et du salmétérol avec le récepteur $\beta_2$ -adrénergique .....	46
<b>Figure 11</b> : Modèle d'exo-site proposé pour expliquer la durée d'action du salmétérol. ....	46
<b>Figure 12</b> : Cartographie des sites de phosphorylation de PKA et de GRK sur le récepteur $\beta_2$ -adrénergique .....	50
<b>Figure 13</b> : L'administration d'isoprotérénol induit le recrutement de $\beta$ -arrestine au niveau de la membrane plasmique de cellules HEK293 surexprimant les récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques .	52
<b>Figure 14</b> : Processus d'endocytose des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques assuré par la $\beta$ -arrestine 2.....	52
<b>Figure 15</b> : Mécanisme général d'endocytose du récepteur $\beta_2$ -adrénergique après sa stimulation par un $\beta_2$ -agoniste.....	54
<b>Figure 16</b> : Taux de synthèse protéique dans le muscle isolé <i>extensor digitorum longus</i> de rat après 30 minutes d'incubation avec du formotérol et du clenbutérol. ....	68
<b>Figure 17</b> : Taux de protéolyse dans le muscle isolé <i>extensor digitorum longus</i> de rat après 2 heures d'incubation avec du formotérol et du clenbutérol.....	68
<b>Figure 18</b> : Visualisation par imagerie par résonance magnétique de l'effet anti-atrophique du clenbutérol sur le <i>tibialis anterior</i> de rat après 14 et 28 jours de dénervation.....	74
<b>Figure 19</b> : Représentation schématique du gène <i>SMN</i> .....	84
<b>Figure 20</b> : Analyse par Western Blot du contenu protéique du récepteur mannose-6-phosphate dans le muscle <i>tibialis anterior</i> à la suite d'un traitement au clenbutérol. ....	86
<b>Figure 21</b> : Contenu en glycogène dans différents muscles squelettiques de souris KO-GAA mâles après administration de clenbutérol .....	86
<b>Figure 22</b> : Effet du clenbutérol sur le temps de nage et sur la vitesse de course de rats mâles .....	96
<b>Figure 23</b> : Effet du clenbutérol sur la distance parcourue par jour lors d'un exercice volontaire de course réalisé par des rats mâles .....	96
<b>Figure 24</b> : Modèle de l'interaction indirecte entre le récepteur $\beta_2$ -adrénergique couplé à la protéine $G\alpha_s$ et le récepteur $A_1$ -adénosine couplé à la protéine $G\alpha_i$ .....	116
<b>Figure 25</b> : Structure de l'adénylate cyclase .....	118
<b>Figure 26</b> : Représentation de l'activation de la protéine kinase A par l'AMPc .....	120
<b>Figure 27</b> : Modèle représentant le rôle de CREB dans le muscle squelettique .....	124

<b>Figure 28</b> : Gènes cibles du facteur de transcription CREB dans le muscle squelettique ....	124
<b>Figure 29</b> : Le clenbutérol augmente l'expression et le contenu protéique de PGC-1 $\alpha$ 4 .....	126
<b>Figure 30</b> : PGC-1 $\alpha$ 4 induit une hypertrophie des myotubes et l'inhibition de PGC-1 $\alpha$ 4 bloque l'hypertrophie induite par le clenbutérol. ....	126
<b>Figure 31</b> : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR impliquée dans l'hypertrophie musculaire .....	128
<b>Figure 32</b> : Effets de 14 jours de traitement au clenbutérol ou avec co-administration de rapamycine sur la masse musculaire chez le rat.....	130
<b>Figure 33</b> : Organisation des protéines Epac.....	134
<b>Figure 34</b> : L'AMPC induit un changement de conformation de la protéine Epac et l'active. ....	136
<b>Figure 35</b> : La phosphorylation d'Akt sur les résidus thréonine 308 et sérine 473 provoquée par le 007-AM est inhibée par ESI-09 .....	136
<b>Figure 36</b> : Représentation schématique de la signalisation mise en jeu lors de l'autophagie. ....	142
<b>Figure 37</b> : Activation d'Epac par la molécule 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM, alias 007-AM .....	149
<b>Figure 38</b> : Principe du spectromètre de masse.....	156

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Distribution des récepteurs $\beta_1$ - et $\beta_2$ -adrénergiques chez l'humain, le porc et le rat .....	42
<b>Tableau 2</b> : Sélection d'études examinant les effets sur la masse musculaire et la composition en types de fibre des $\beta_2$ -agonistes sur différents muscles squelettiques de rat. ....	66
<b>Tableau 3</b> : Effet de l'inhalation de $\beta_2$ -agonistes sur la performance chez des sujets sains non-asthmatiques .....	98
<b>Tableau 4</b> : Effet de la prise orale de $\beta_2$ -agonistes sur la performance chez des sujets sains non-asthmatiques.....	100
<b>Tableau 5</b> : Etudes examinant les effets des $\beta_2$ -agonistes sur la calpaïne et la calpastatine <i>in vivo</i> . ....	140
<b>Tableau 6</b> : Caractéristiques des amorces utilisées .....	195

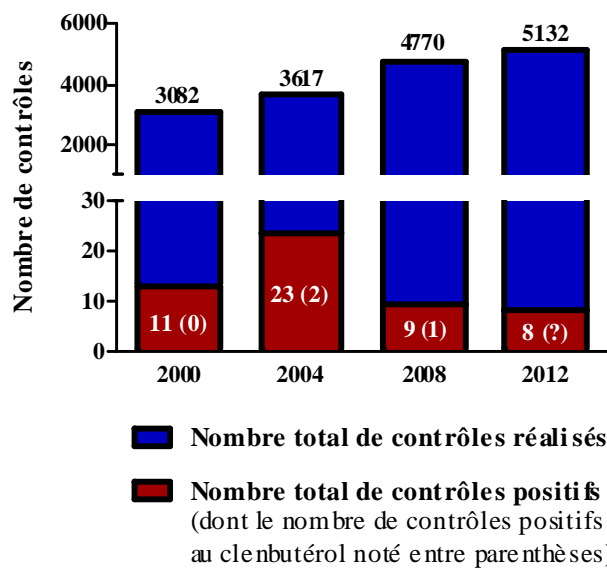
# **INTRODUCTION**

## **GENERALE**



**INTRODUCTION**  
**GENERALE**

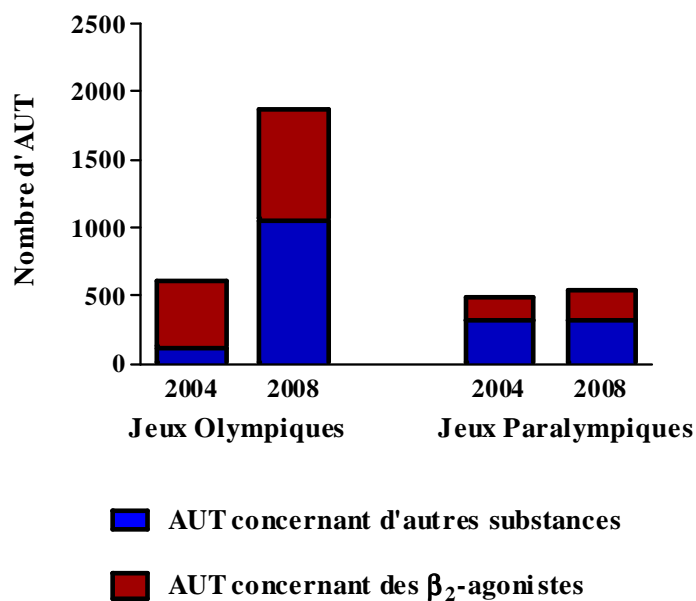




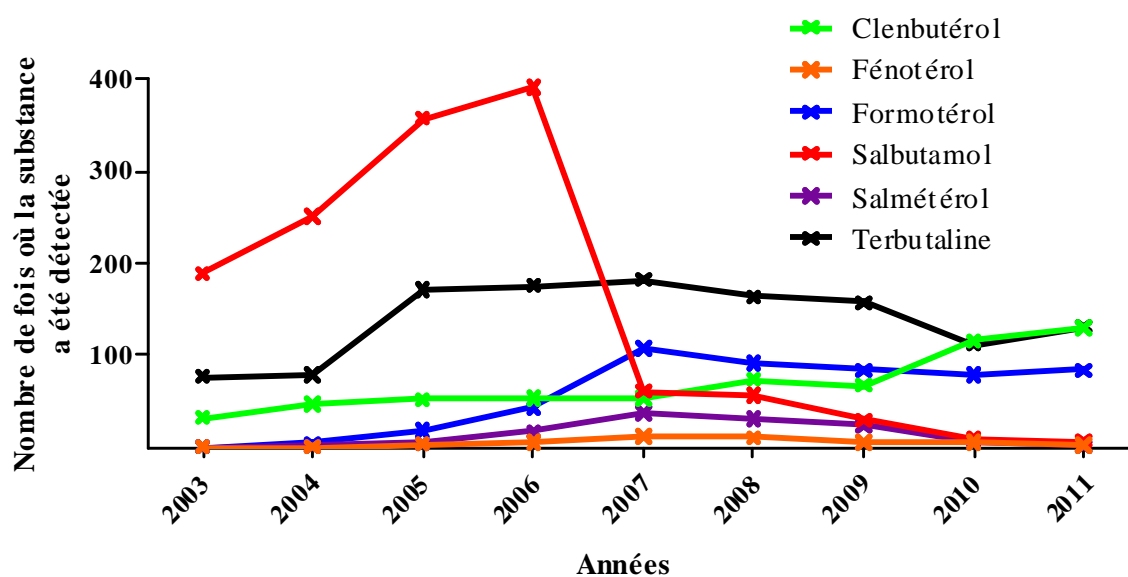
**Figure 1 :** Nombre total de contrôles réalisés par les laboratoires accrédités par l'Agence Mondiale Antidopage (AMA) et nombre de contrôles positifs détectés lors des Jeux Olympiques de Sydney (2000), Athènes (2004), Pékin (2008) et Londres (2012) [mise à jour sur la base de l'article de (Tsivou *et al.*, 2006)].

En Egypte, tout comme dans l'Antiquité grecque, sont relatés les premiers faits s'apparentant à l'usage de substances stimulantes à base de figes sèches, de vin, d'eau de vie, de champignons hallucinogènes ou de graines de sésame [pour revue (Yesalis & Bahrke, 2002)]. A l'époque des gladiateurs romains, la consommation de stimulants était très répandue pour surmonter la fatigue et les blessures dues aux combats. La plupart de ces substances stimulantes était dérivée de plantes, tout comme l'atteste la consommation de feuilles de coca par les civilisations d'Amérique de Sud, de graines de kola (*cola acuminata*, *cola nitida*) par les Africains, et de feuilles de pituri par les Aborigènes d'Australie [pour revue (Yesalis & Bahrke, 2002)]. Entre 1850 et 1890, les boxeurs utilisaient de l'eau de vie, de la cocaïne et de la strychnine durant les entraînements et les matchs [pour revue (Yesalis & Bahrke, 2002)]. Depuis, de nouvelles substances sont apparues grâce au développement de la pharmacologie et de la médecine (Holt *et al.*, 2009). En 1933, le mot « doping » fit son apparition dans le dictionnaire anglais. Ce n'est que plus tard que le dopage sportif fut défini comme étant le fait « d'utiliser des substances ou des procédés de nature à modifier artificiellement les capacités d'un sportif ou à masquer l'emploi de substances ou procédés ayant cette propriété » (Article L3631-1 du Code de la Santé Publique). C'est ainsi qu'en 2000, lors des Jeux Olympiques de Sydney, 11 cas de dopage ont été décelés. Quatre ans plus tard, 23 cas positifs ont été détectés lors des Jeux Olympiques d'Athènes (**Figure 1**) (Tsiyou *et al.*, 2006). De nos jours, la clientèle des agents dopants, et plus particulièrement des anabolisants, ne se limite plus seulement aux athlètes désireux d'augmenter leur masse musculaire, leur performance et leur capacité de récupération, mais s'étend aussi aux individus impliqués dans des activités non compétitives.

Face à ces constats alarmants, une grande connaissance des mécanismes d'action et une extrême vigilance des pratiques d'utilisation des molécules dopantes s'imposent.



**Figure 2 :** Nombre d'attestations d'usage à des fins thérapeutiques (AUT) demandées lors des Jeux Olympiques et Paralympiques de 2004 (Athènes) et 2008 (Pékin) (Rapports d'activité AMA 2004 et 2008)



**Figure 3 :** Nombre de fois où les  $\beta_2$ -agonistes (clenbutérol, fénotérol, formotérol, salbutamol, salmétérol et terbutaline) ont été détectés par an lors de contrôles antidopage (Rapports AMA).

Parmi les substances dopantes, nous trouvons les  $\beta_2$ -agonistes, bronchodilatateurs largement prescrits pour le traitement de l'asthme (Anderson & Wilkins, 1977) et la prévention de l'asthme induit par l'exercice (AIE) (Anderson *et al.*, 1991; Patessio *et al.*, 1991; Green & Price, 1992). Une ventilation soutenue lors des entraînements et lors de compétitions, ainsi que l'exposition à de nombreux facteurs environnementaux comme le froid, l'air sec, la présence de chlore dans l'eau de piscine et le pollen, sont les principales causes d'AIE chez les athlètes (Helenius *et al.*, 1998a; Helenius *et al.*, 1998b). C'est la raison pour laquelle la prévalence de l'AIE est plus importante chez les athlètes de haut niveau que celle du reste de la population (Larsson *et al.*, 1993). Cependant, une recrudescence du nombre d'athlètes se déclarant asthmatiques (McKenzie *et al.*, 2002), et réclamant la prescription de  $\beta_2$ -agonistes à des fins thérapeutiques est constatée (Figure 2). A cause de la suspicion d'un probable effet ergogénique (**Figure 3**), l'ensemble des  $\beta_2$ -agonistes a été interdit selon le Code Mondial Antidopage. Toutefois, pour ne pas pénaliser les athlètes réellement asthmatiques, certaines molécules appartenant à la famille des  $\beta_2$ -agonistes comme le salbutamol, le salmétérol, et le formotérol, sont autorisées lorsqu'elles sont administrées par inhalation et avec un seuil limite à ne pas dépasser (limite au-dessus de laquelle le sportif sera considéré comme positif) (Agence Mondiale Antidopage 2013).

Les données récentes dans le domaine de la biologie musculaire ont permis d'identifier un certain nombre d'acteurs mis en jeu dans la réponse biologique du tissu musculaire aux  $\beta_2$ -agonistes. L'un de ces acteurs est la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR), voie d'activation majeure des synthèses protéiques dans le tissu musculaire. Son activation est généralement à l'origine d'une hypertrophie musculaire, alors que son inhibition s'accompagne généralement d'une atrophie musculaire [pour revue (Glass, 2005; Favier *et al.*, 2008)]. La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est stimulée par l'administration de  $\beta_2$ -agoniste chez le rat, induisant ainsi une hypertrophie musculaire (Sneddon *et al.*, 2001). L'inactivation de la voie PI3K/Akt/mTOR par la rapamycine inhibe l'hypertrophie musculaire induite par le  $\beta_2$ -agoniste (Kline *et al.*, 2007), démontrant pour la première fois que les effets du  $\beta_2$ -agoniste sont directement liés à l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. Les  $\beta_2$ -agonistes agissent sur la cellule musculaire *via* les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques couplés aux protéines G (Hinkle *et al.*, 2002). Ces données récentes nous amènent à nous questionner sur la nature de la connexion entre la voie canonique dépendante des protéines G, activée par les  $\beta_2$ -agonistes, et la voie PI3K/Akt/mTOR. Epac (Exchange protein activated directly by



cAMP), une protéine d'échange récemment découverte (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998) pourrait constituer ce lien moléculaire entre ces deux voies de signalisation.

Le travail de thèse présenté ici s'intéresse non seulement aux mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la masse musculaire, mais analyse également la cinétique de réponse des voies de synthèse et de dégradation protéiques sous l'action du  $\beta_2$ -agoniste formotérol. De plus, ce travail apporte de nouvelles connaissances sur le lien moléculaire existant entre la voie dépendante des  $\beta_2$ -agonistes et la voie PI3K/Akt/mTOR.

Le manuscrit est divisé en trois grandes parties. La première concerne la revue de la littérature qui s'articule en sept chapitres décrivant successivement les  $\beta_2$ -agonistes (Chapitre I), puis les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Chapitre II), ainsi que les effets généraux des  $\beta_2$ -agonistes sur différents tissus de l'organisme (Chapitre III). Le Chapitre IV sera consacré au potentiel thérapeutique lié à l'utilisation des  $\beta_2$ -agonistes. Le Chapitre V présentera la performance musculaire en réponse à l'administration de  $\beta_2$ -agonistes, tandis que le Chapitre VI traitera des effets délétères liés à la prise de  $\beta_2$ -agonistes. Le dernier chapitre mettra en lumière les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'effet anabolisant du muscle squelettique après stimulation  $\beta_2$ -adrénergique (Chapitre VII). La deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée aux résultats obtenus durant cette thèse, qui seront finalement discutés dans la dernière partie.

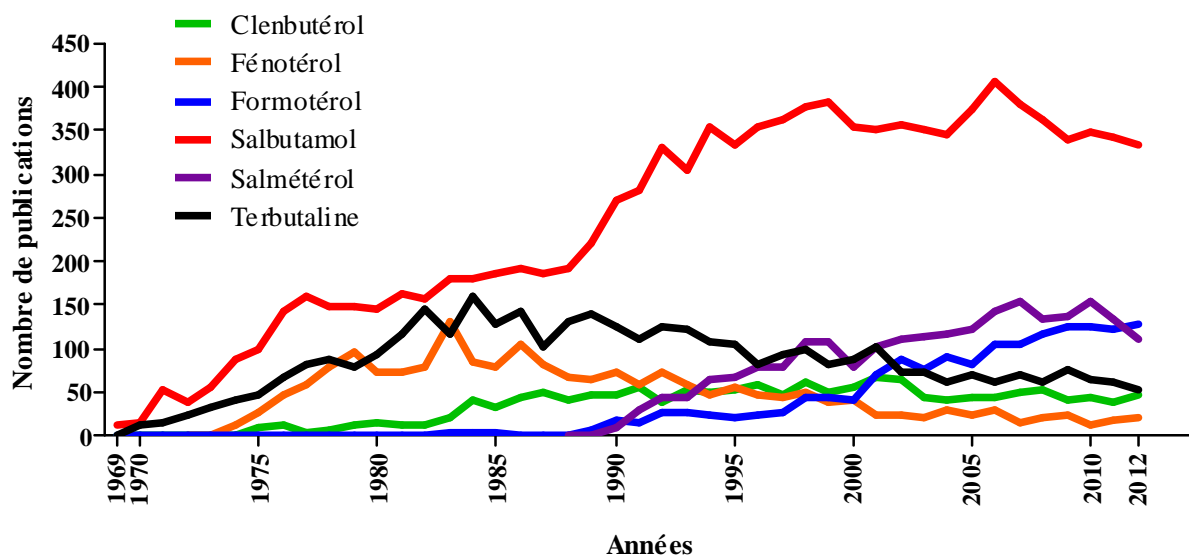


**ETAT DE LA  
LITTERATURE**

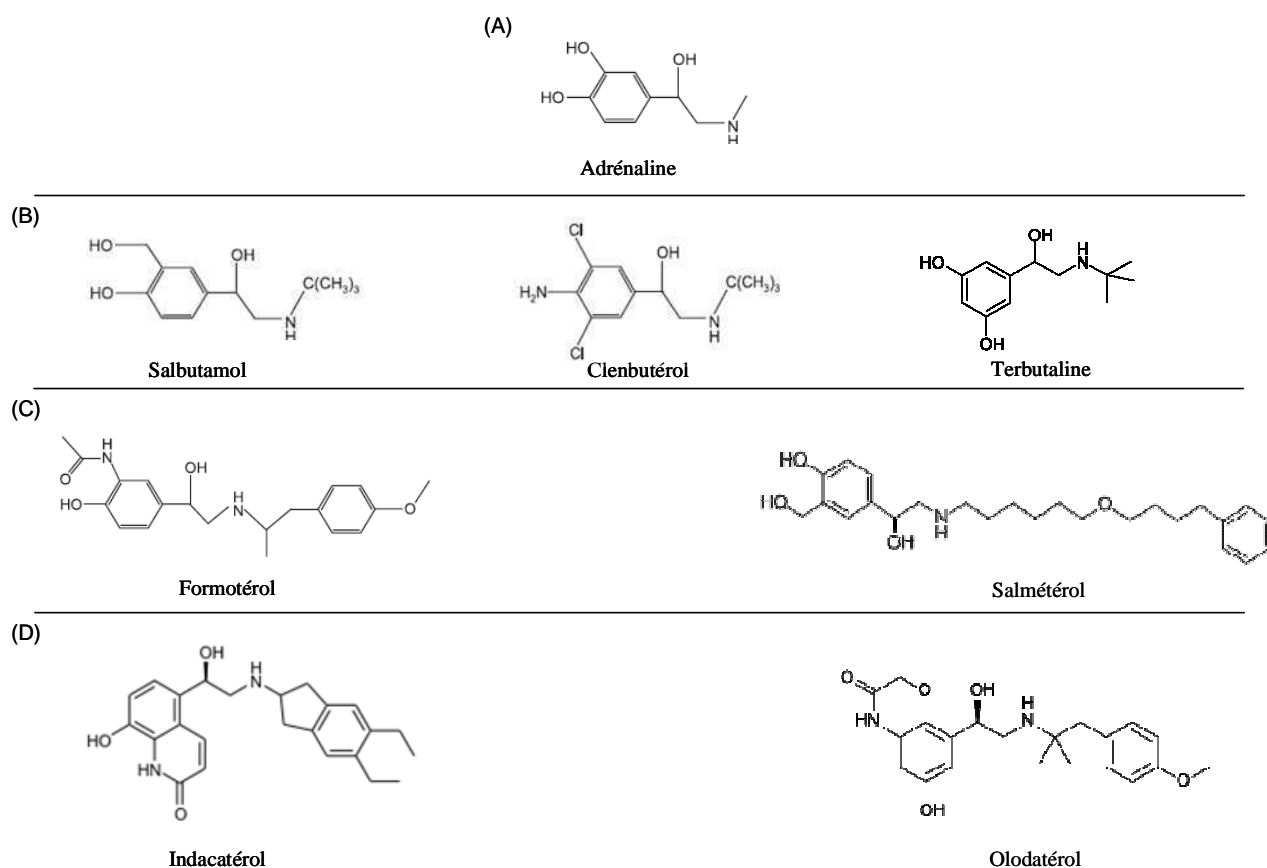




**ETAT DE LA  
LITTERATURE**



**Figure 4 :** Nombre de publications citant dans le titre et/ou dans le résumé les  $\beta_2$ -agonistes (d'après le site Pubmed)



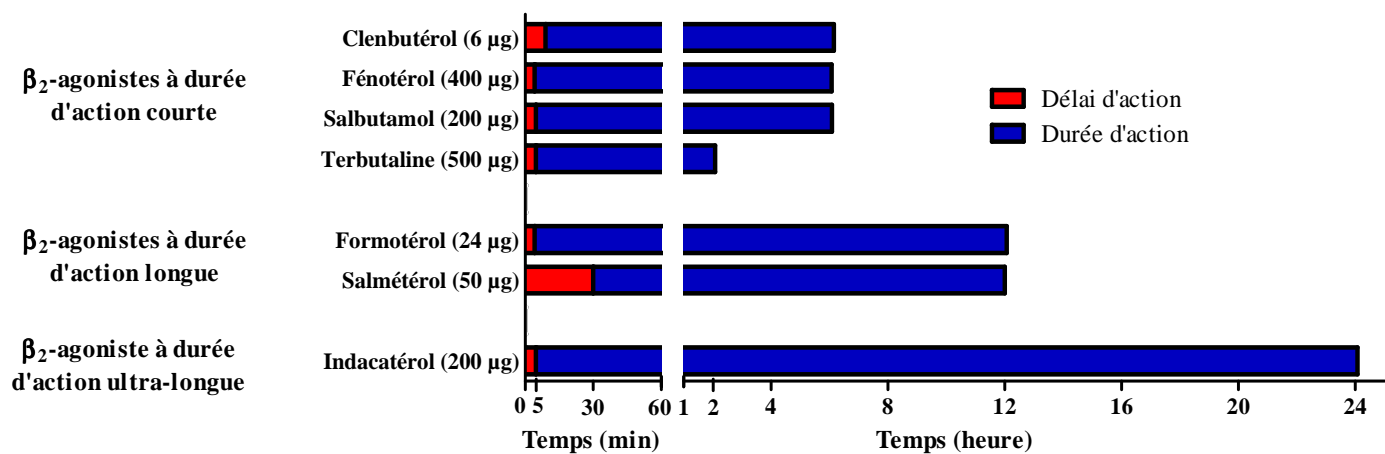
**Figure 5 :** Structures chimiques des  $\beta_2$ -agonistes dérivées de l'adrénaline (A) à durée d'action courte (B), longue (C) et ultra-longue (D).

En 2008, le Ministère de la Santé et des Sports a lancé un programme de recherche visant à mieux connaître les pratiques dopantes dans le but d'améliorer la prévention. Dans ce contexte, il a été proposé d'analyser des forums Internet dont le contenu portait sur des échanges sur le dopage. D'après cette étude, menée de Juillet 2002 à Janvier 2011, le  $\beta_2$ -agoniste clenbutérol est la 9<sup>ème</sup> substance la plus citée sur les forums étudiés (Trabal *et al.*, 2010). Le nombre de publications impliquant plus largement les  $\beta_2$ -agonistes est en constante augmentation dans la littérature, indiquant que ces molécules ont un réel intérêt pour la communauté scientifique (**Figure 4**).

## I. Description des $\beta_2$ -agonistes : structure et classification

Les  $\beta_2$ -agonistes ont une structure chimique dérivée de celle de l'adrénaline. Ils possèdent un noyau benzène auquel sont rattachés des groupements hydroxyles (-OH), chlorure (-Cl) ou amine (-NH<sub>2</sub>). Néanmoins, les nouvelles générations de  $\beta_2$ -agonistes possèdent une structure chimique plus complexe, caractérisée par l'addition d'une longue chaîne carbonée contenant un, voire plusieurs noyaux benzène (**Figure 5**). Cette chaîne carbonée, responsable de la durée d'action des  $\beta_2$ -agonistes, permet de classer ces molécules en 3 catégories selon leur durée d'action :

- les  $\beta_2$ -agonistes à durée d'action courte (short-acting  $\beta_2$ -agonists ou SABAs) (3-6 heures) parmi lesquels nous distinguons le pirbutérol, le fénotérol, la terbutaline, le clenbutérol et le salbutamol (ou albutérol). Les SABAs sont prescrits en première intention dans la crise d'asthme, ou en prévention de l'asthme d'effort, comme traitement en aigu des symptômes. Synthétisé en 1966, le salbutamol a fait l'objet d'études chez le chien, le chat et le porc (Cullum *et al.*, 1969), ainsi que chez des patients asthmatiques (Choo-Kang *et al.*, 1969) au Royaume-Uni dans les années qui ont suivi sa synthèse. A partir de 1969, le salbutamol a été mis sur le marché sous la marque déposée Ventoline et a été très largement utilisé ces quarante dernières années pour le traitement de l'asthme. Le salbutamol produit une bronchodilatation rapide, mais possède une courte durée d'action, obligeant son administration plusieurs fois par jour. C'est la raison pour laquelle d'autres  $\beta_2$ -agonistes à durée d'action plus longue ont été développés (**Figure 6**).

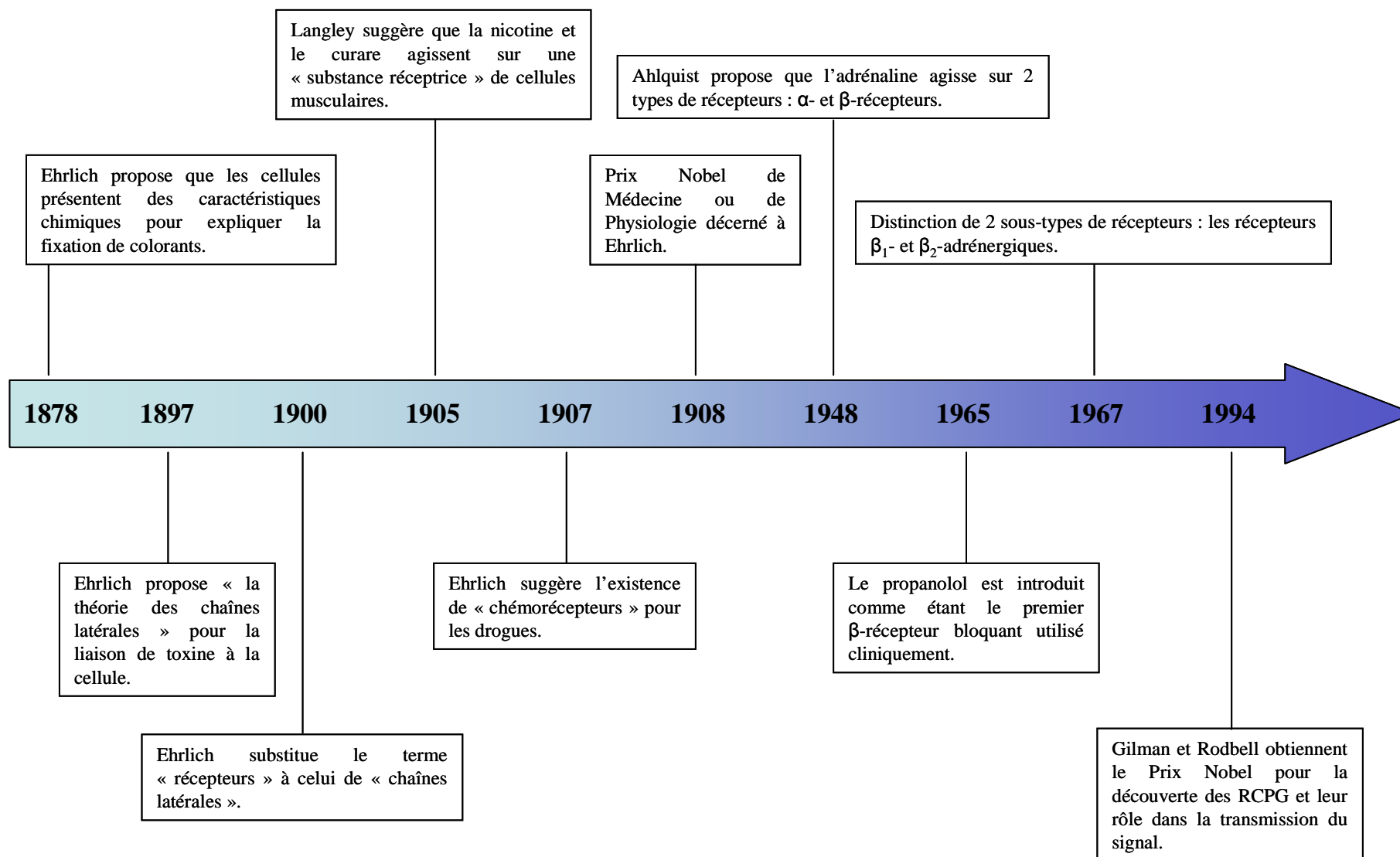


**Figure 6** : Délai et durée d'action de différents  $\beta_2$ -agonistes inhalés chez l'humain [modifié d'après (Sears & Lotvall, 2005)].

- les  $\beta_2$ -agonistes à durée d'action longue (long-acting  $\beta_2$ -agonists ou LABAs) (12 heures) parmi lesquels nous trouvons le salmétérol et le formotérol (van Noord *et al.*, 1996; Ringdal *et al.*, 1998). Les LABAs sont recommandés en complément de corticostéroïdes inhalés pour le traitement à long terme de l'asthme. Ainsi, après une unique inhalation, ces  $\beta_2$ -agonistes agissent pendant 12 heures (et sont donc inhalés à deux reprises dans une journée) (**Figure 6**). Néanmoins, l'exposition prolongée aux  $\beta_2$ -agonistes se traduit par de nombreux effets secondaires tels que des migraines, des palpitations cardiaques et des tremblements (Palmqvist *et al.*, 1997; Guhan *et al.*, 2000), limitant ainsi leur utilisation. De plus, le fait de doubler les absorptions par les voies respiratoires en une journée de ces  $\beta_2$ -agonistes peut induire une augmentation significative de l'incidence de ces effets, réduisant ainsi l'efficacité du traitement. C'est la raison pour laquelle, le développement de  $\beta_2$ -agonistes inhalés quotidiennement en une seule prise pourrait être d'un grand intérêt pour le patient.

- les  $\beta_2$ -agonistes à durée d'action ultra-longue (24 heures) (ultra-LABAs), l'indacatérol, l'olodatérol, le vilantérol et le carmotérol représentent la nouvelle génération de bronchodilatateurs (Battram *et al.*, 2006; Naline *et al.*, 2007). C'est dans le but de réduire aussi bien le nombre de prises que l'incidence des effets secondaires que les ultra-LABAs, caractérisés par une action rapide et une durée d'action de 24 heures, ont été développés (Battram *et al.*, 2006; Beeh *et al.*, 2007; Naline *et al.*, 2007) (**Figure 6**).

**Les  $\beta_2$ -agonistes ont été développés avec comme objectif premier de traiter l'asthme. Néanmoins, en clinique, des effets secondaires sont observés à la suite d'un traitement aux  $\beta_2$ -agonistes et la recherche tente de limiter ces effets en développant de nouveaux  $\beta_2$ -agonistes. Ces dernières années, ont été développés des  $\beta_2$ -agonistes à durée d'action ultra-longue. Cependant, à l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur cette nouvelle génération de  $\beta_2$ -agonistes. Le délai d'action, ainsi que la durée d'action des  $\beta_2$ -agonistes dépendent principalement des propriétés physico-chimiques, responsables de la liaison des  $\beta_2$ -agonistes aux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.**



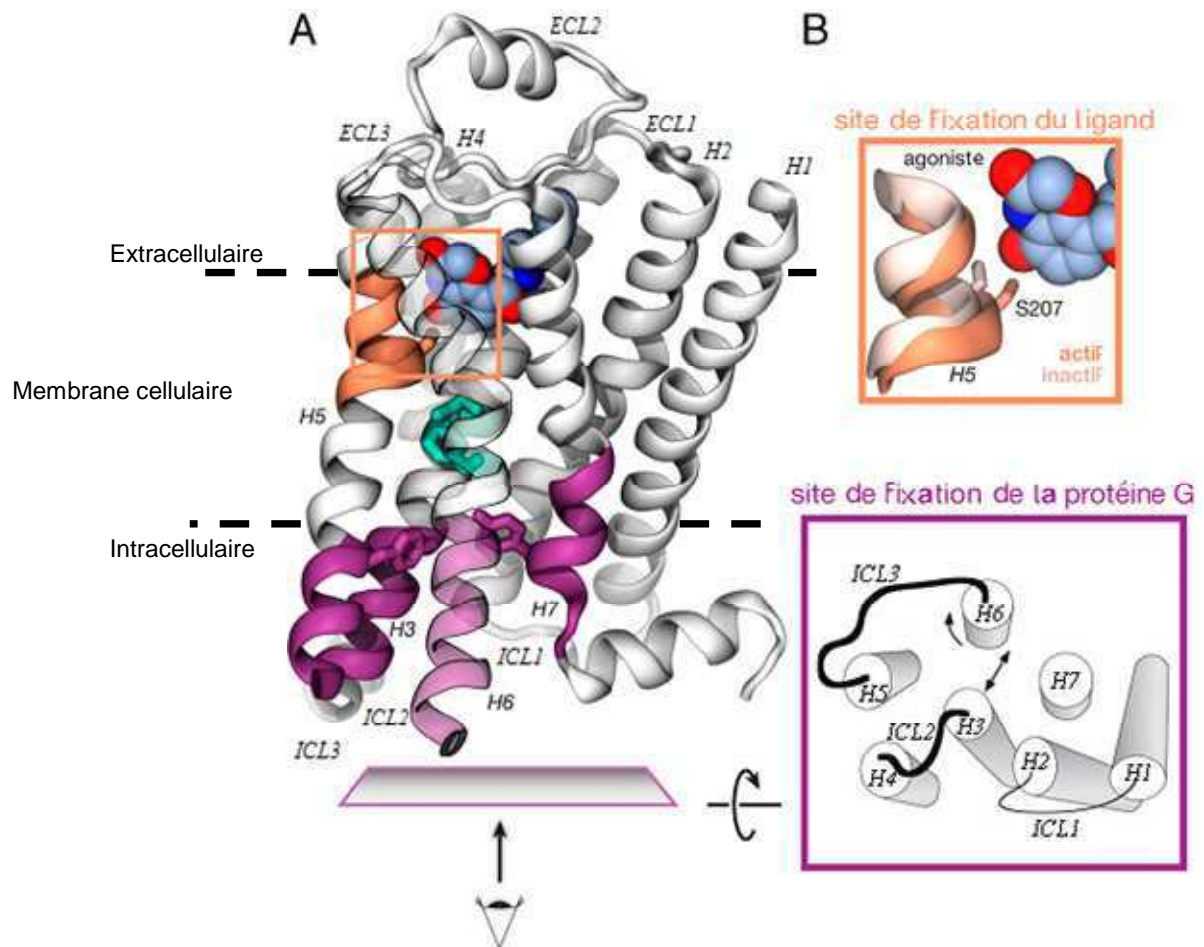
**Figure 7 :** Evènements liés à la découverte et à l'établissement du concept de récepteurs [modifié d'après (Maehle *et al.*, 2002; Bosch & Rosich, 2008)].

## II. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques : éléments de la famille des Récepteurs Couplés aux Protéines

### II.1 De la théorie « des chaînes latérales » à l'émergence de la notion de récepteurs

En 1878, à la suite d'expériences menées avec des colorants cellulaires, émergea l'idée que des molécules puissent se fixer sur des sites spécifiques de la cellule [pour revue (Drews, 2000)]. Par la suite, en 1897, Paul Ehrlich (1854-1915) développa la « théorie des chaînes latérales » (« side-chain theory ») (Witebsky, 1954). Celle-ci suggérait que des « chaînes latérales » de la cellule puissent lier certaines toxines. La théorie selon laquelle une molécule ne peut agir si elle n'est pas fixée a été énoncée par Ehrlich à Londres lors du Congrès International de Médecine (Ehrlich, 1913). En 1900, Ehrlich introduisit le terme « récepteur » comme étant un substitut du terme « chaîne-latérale réceptive » (« receptive side-chain »). A la même époque (1905), le physiologiste britannique John Newport Langley (1852–1925), qui étudiait les effets de la nicotine et du curare sur la cellule musculaire, proposait l'existence de « substances réceptrices » qui pouvaient être bloquées par des antagonistes ou activées par l'action d'agonistes (Langley, 1905). Lauréat du Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1908, Ehrlich collabora avec Langley pour développer la théorie du récepteur. Ils étendirent le concept aux « chémorécepteurs » pour décrire l'interaction entre les drogues et les cellules. Après l'isolation de l'adrénaline par Abel en 1897, à partir de glandes médullo-adrénales de mouton [pour revue (Molkou, 2010)], Dale suggérait un mécanisme réceptif à cette hormone (Dale, 1906). Ce n'est finalement qu'en 1948 qu'Ahlquist définit les deux sous-types de récepteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ - « adrénotropiques » plus connus actuellement sous le terme de récepteurs adrénérgiques (Ahlquist, 1948; Bylund, 2007), capables de lier l'adrénaline (**Figure 7**). Ce n'est que plus tard que nous nous sommes aperçus que les récepteurs adrénérgiques appartenaient à une famille beaucoup plus large : la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).





**Figure 8 :** Structure des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques couplés aux protéines G.

Les hélices (de H1 à H7), les boucles intra- (ICL1, ICL2 et ICL3) et extracellulaires (ECL1, ECL2 et ECL3) sont représentées en gris, le site de fixation du ligand en orange et le site de fixation de la protéine G en violet. Le  $\beta_2$ -agoniste est de couleur bleue et rouge.

**A :** Vue transmembranaire du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. Cette représentation montre la localisation des sites accueillant le ligand et la protéine G. La boucle intracellulaire 3 (ICL3) n'est pas représentée sur ce schéma.

**B :** Vue détaillée du site de fixation du ligand [au niveau de la sérine 207 (S207)] et du site de fixation de la protéine G (vue de dessous de la membrane) [modifié d'après (Bockaert & Pin, 1999; Dror *et al.*, 2011)].

## II.2 La famille des RCPGs et les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) constituent la famille la plus importante des récepteurs de la membrane plasmique. Chez les vertébrés, environ 1% du génome code pour les RCPGs (Venter *et al.*, 2001; Fredriksson *et al.*, 2003). D'une façon similaire, 5 % du génome du ver *Caenorhabditis elegans* code pour ces récepteurs [pour revue (Bargmann, 1998)]. Ils sont activés par une grande variété de ligands, allant du simple photon aux ions, en passant par les acides aminés, les acides gras, les neurotransmetteurs (acétylcholine, sérotonine, dopamine), les peptides/polypeptides, les enzymes protéolytiques, les hormones (adrénaline, noradrénaline, glucagon) [pour revue (Bockaert & Pin, 1999)], et sont la cible de nombreuses molécules synthétiques comme les  $\beta_2$ -agonistes.

### II.2.1 La structure des RCPGs

De multiples études menées dans les années 80 ont permis de révéler la structure de ces récepteurs. Tous les RCPGs ont en commun une architecture à 7 domaines transmembranaires, organisés en hélices, connectés les uns aux autres par des boucles extracellulaires (ECL1, ECL2 et ECL3) et intracellulaires (ICL1, ICL2 et ICL3) (**Figure 8**). Structurellement, les RCPGs présentent une extrémité amino-terminale en contact avec le milieu extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale cytoplasmique. Plusieurs systèmes de classification, basés sur l'homologie de leur séquence, ont permis de décrire cette grande famille de récepteurs. C'est ainsi que plus de 800 RCPGs ont été identifiés à ce jour chez l'humain et classés en 5 grandes familles : les récepteurs « glutamate » (G, composée de 24 membres), « rhodopsine » (R, composée de 752 membres), « adhesion » (A, composée de 27 membres), « frizzled/taste2 » (F, composée de 23 membres) et « secretine » (S, composée de 20 membres) (Fredriksson & Schioth, 2005). A cette liste s'ajoutent 23 « autres récepteurs » qui n'appartiennent à aucune des 5 grandes familles citées précédemment (Fredriksson *et al.*, 2003). Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons à la famille des récepteurs à la rhodopsine qui possède de loin le plus grand nombre de récepteurs.

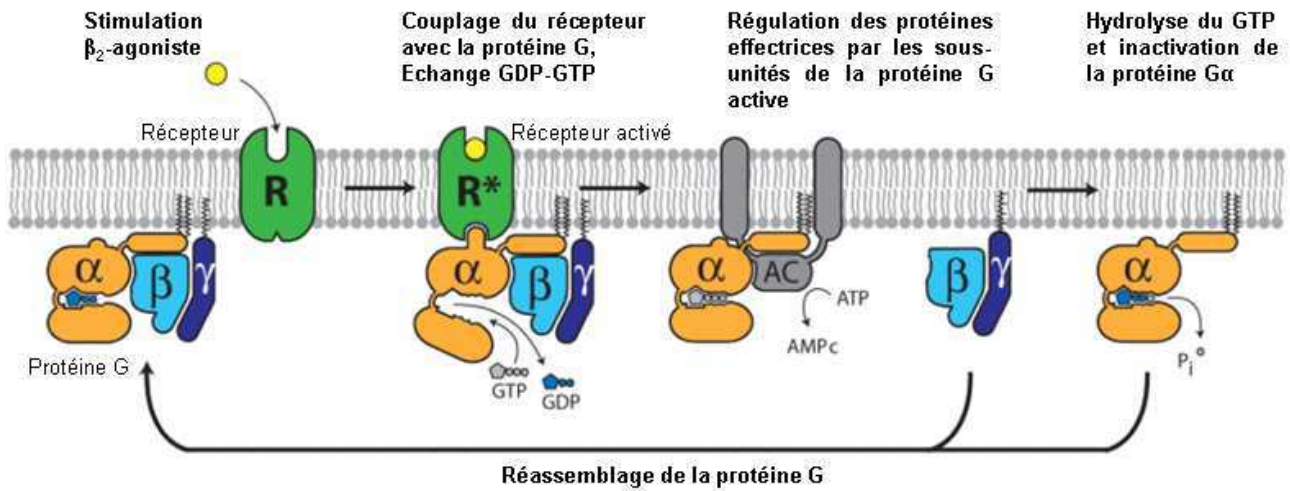
**Tableau 1 :** Distribution des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques chez l'humain, le porc et le rat [d'après (Snavely *et al.*, 1982; Lew & Summers, 1985; Liggett *et al.*, 1988; Snell & Evans, 1988; Kim *et al.*, 1991; Revelli *et al.*, 1991; Mersmann, 1998; Liang & Mills, 2002)].

Récepteurs $\beta$ -adrénergiques	Chez l'humain		Chez le porc		Chez le rat	
	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_1$	$\beta_2$
Cœur	65% dans l'atrium 75% dans le ventricule	35% dans l'atrium 25% dans le ventricule	70%	30%	80%	20%
Foie	20%	80%	50%	50%	20%	80%
Muscle squelettique	5% ( <i>gastrocnemius</i> )	95% ( <i>gastrocnemius</i> )	60%	40%	< 5% ( <i>plantaris</i> ) 18% ( <i>soleus</i> )	> 95% ( <i>plantaris</i> ) 82% ( <i>soleus</i> )
Poumon	27%	73%	60%	40%	15%	85%
Rein	63%	37%	65%	35%	70%	30%
Tissu adipeux	40%	60%	80%	20%	80%	20%

## II.2.2 Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Les récepteurs à la rhodopsine sont subdivisés en 4 groupes principaux ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ). Des analyses phylogéniques ont montré que les récepteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques appartiennent au groupe  $\alpha$  (groupe des récepteurs amine) de la famille des récepteurs à la rhodopsine (Fredriksson *et al.*, 2003). Il est possible de distinguer plusieurs sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques : les récepteurs  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - et  $\beta_3$ -adrénergiques, codés par trois gènes distincts (*ADRB1*, *ADRB2* et *ADRB3*). Le **tableau 1** présente la distribution hétérogène des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques dans divers tissus de différentes espèces animales. Il a été mis en évidence la présence de récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques, principalement dans le tissu adipeux. Néanmoins, leur localisation a été décrite dans d'autres organes comme les muscles lisses du côlon et de l'*ileum* chez le rat (Evans *et al.*, 1996), et dans le côlon chez l'humain (Krief *et al.*, 1993). L'expression de ces récepteurs dans le cœur serait due à des dépôts intrinsèques de tissu adipeux. En revanche, l'existence de récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques n'a pu être mise en évidence dans le muscle squelettique chez l'humain et le rat (Krief *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1996). L'existence d'un quatrième type de récepteur a été suggérée, mais sa présence dans le muscle squelettique n'a pas été prouvée. Le récepteur putatif  $\beta_4$ -adrénergique semble être un état particulier du récepteur  $\beta_1$ -adrénergique. En effet, le récepteur  $\beta_4$ -adrénergique a été découvert dans les cellules adipeuses et le cœur, où le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique est présent en quantité importante (Granneman, 2001).

Expérimentalement, l'utilisation d'antagonistes aux récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques a permis de suggérer que les effets anaboliques du clenbutérol sur le muscle squelettique étaient l'œuvre de l'activation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Choo *et al.*, 1992). Ce résultat a été par la suite, confirmé à partir de souris  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_1$ - $\beta_2$  knockout (Hinkle *et al.*, 2002). Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques représentent quasiment la totalité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques présents à la surface membranaire des cellules musculaires striées squelettiques (Kim *et al.*, 1991). Chez le rat, des analyses par radioligands ont révélé que les muscles à contraction lente possédaient une plus grande densité de récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques que les muscles à contraction rapide (Williams *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 1991; Ryall *et al.*, 2002; Ryall *et al.*, 2006). Au contraire, quantifiée par Western blot, la densité membranaire des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques est plus importante dans les muscles à contraction rapide (McCormick *et al.*, 2010). Cette dernière observation ne nous permet pas de conclure d'une manière définitive sur la densité membranaire des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques dans les différents types de muscles.



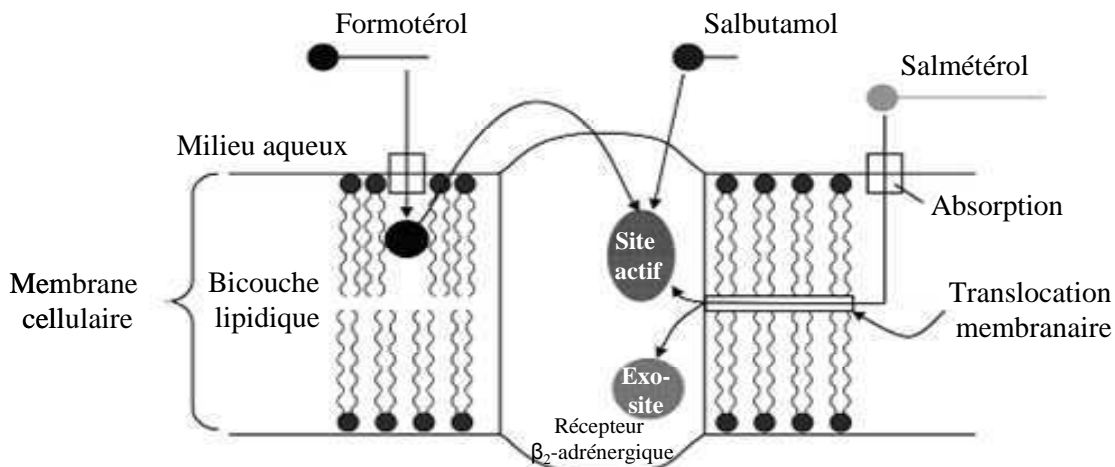
**Figure 9** : Formation du complexe récepteur  $\beta_2$ -adrénergique-protéine G après stimulation par un  $\beta_2$ -agoniste.  $\alpha$ , sous-unité  $\alpha$  de la protéine G ;  $\beta$ , sous-unité  $\beta$  de la protéine G ;  $\gamma$ , sous-unité  $\gamma$  de la protéine G ; AC, adénylate cyclase ; AMP<sub>c</sub>, adénosine monophosphate cyclique ; ATP, adénosine triphosphate ; GDP, guanosine diphosphate ; GTP, guanosine triphosphate ;  $P_i$ , phosphate inorganique ; R, récepteur  $\beta_2$ -adrénergique inactivé ;  $R^*$ , récepteur  $\beta_2$ -adrénergique activé par le  $\beta_2$ -agoniste [modifié d'après (Rasmussen et al., 2012)].

Paradoxalement, les muscles à contraction rapide semblent plus sensibles à une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique que les muscles à contraction lente (Ryall *et al.*, 2002; Ryall *et al.*, 2006; Kline *et al.*, 2007). Ceci pourrait être, en partie, dû au fait que les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques des muscles à contraction lente sont plus sujets à la phosphorylation que les muscles à contractions rapide (McCormick *et al.*, 2010), à la suite d'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique.

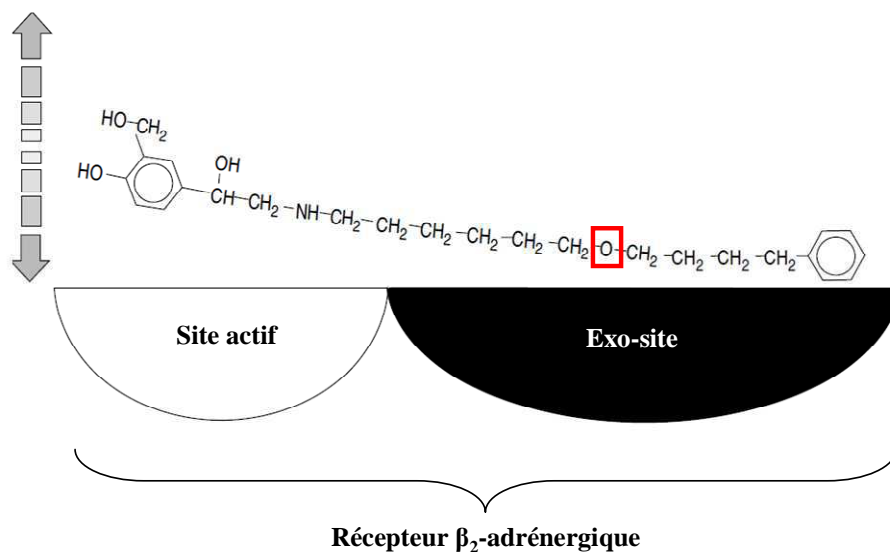
### II.2.3 Généralités sur les protéines G couplées aux récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Les protéines G sont localisées dans l'espace cytoplasmique et agissent de façon intracellulaire, en interaction avec les boucles intracellulaires ICL2 et ICL3 du récepteur. La protéine G est un complexe hétérotrimérique composé des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  de la protéine G forment un dimère qui se lie à la membrane plasmique intracellulaire au niveau de la sous-unité  $\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  de la protéine G ( $G\alpha$ ), dans son état inactif, demeure attachée au dimère  $G\beta\gamma$  (Bockaert & Pin, 1999). Une fois le récepteur activé, un changement de conformation des boucles intracellulaires est observé, laissant apparaître un site de liaison (Chung *et al.*, 2011; Dror *et al.*, 2011). Dès lors que le ligand se fixe sur le récepteur  $\beta$ -adrénergique, une molécule de GDP (guanosine diphosphate) est libérée de la sous-unité  $G\alpha$ , et la liaison d'une molécule de GTP (guanosine triphosphate) sur la sous-unité  $G\alpha$  s'en suit. Ceci a pour rôle d'activer la sous-unité  $G\alpha$  et de dissocier la sous-unité  $G\alpha$  du dimère  $G\beta\gamma$  (**Figure 9**) (Rasmussen *et al.*, 2012).

Etant donné qu'il existe au moins 27  $G\alpha$ , 5  $G\beta$  et 13  $G\gamma$  sous-types (Venter *et al.*, 2001), il y a donc un nombre très important de combinaisons  $G\alpha\beta\gamma$  qui peut contrôler une diversité de signaux intracellulaires induits par les RCPGs. La sous-unité  $G\alpha$  peut être divisée en 4 grandes familles :  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$  et  $G\alpha_{12/13}$ , qui régulent chacune une grande variété de signaux intracellulaires.



**Figure 10 :** Modèle d'interaction du formotérol, du salbutamol et du salmétérol avec le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique [modifié d'après (Johnson, 2001)].



**Figure 11 :** Modèle d'exo-site proposé pour expliquer la durée d'action du salmétérol. La longue chaîne latérale aliphatique du salmétérol se lie à l'exo-site permettant à la tête d'angler sur et en dehors du site actif du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, le pivot étant l'atome d'oxygène de la chaîne latérale [modifié d'après (Anderson *et al.*, 1994)].

### II.3 Affinité des $\beta_2$ -agonistes pour les récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques

La taille moléculaire ainsi que la structure des  $\beta_2$ -agonistes déterminent la manière avec laquelle la molécule va interagir avec le récepteur (**Figure 10**). La région protéique du récepteur (le site actif) qui fixe les  $\beta_2$ -agonistes a été identifiée. Ce site actif, avec lequel les  $\beta_2$ -agonistes vont interagir pour exercer leurs effets biologiques, est localisé approximativement à 15 Å (1.5 nm) à l'intérieur du récepteur. Des résidus aspartate (Asp<sup>113</sup>), sérine (Ser<sup>204</sup> et Ser<sup>207</sup>) et phénylalanine (Phe<sup>259</sup> et Phe<sup>290</sup>) sont indispensables à la fixation des  $\beta_2$ -agonistes au récepteur (Anderson *et al.*, 1994; Coleman *et al.*, 1996; Johnson, 2001).

Le salbutamol est une molécule de 11 Å de longueur et de nature hydrophile, accédant directement au site actif du récepteur. Ceci entraîne donc une action rapide sur la relaxation des tissus respiratoires et la bronchodilatation chez les patients. Néanmoins, de par sa nature hydrophile, la persistance du salbutamol sur le site actif du récepteur est de courte durée, induisant une durée d'action de 4 à 6 heures.

Le formotérol est, quant à lui, de nature légèrement lipophile. Il interagit directement avec le site actif du récepteur expliquant la rapidité d'action observée cliniquement. De plus, une petite quantité de formotérol est captée dans la membrane cellulaire d'où il va progressivement interagir avec le site actif du récepteur. Ceci explique la longue durée d'action du formotérol (12 heures) (Anderson *et al.*, 1994).

Le salmétérol est une molécule 10 000 fois plus lipophile que le salbutamol d'une longueur de 25 Å. Il pénètre rapidement (en moins d'une minute) dans la membrane cellulaire. La molécule diffuse ensuite latéralement dans la membrane cellulaire jusqu'au site actif du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. Ce processus est lent (30 minutes) et justifie le délai d'action lent du salmétérol. Le mécanisme d'action du salmétérol impliquerait l'interaction de la chaîne latérale du salmétérol avec un site de fixation auxiliaire : c'est la théorie de l'exo-site (**Figure 11**) (Coleman *et al.*, 1996). Cette théorie repose sur le fait que dès que la chaîne latérale de la molécule s'associe avec l'exo-site, la molécule ne peut se dissocier du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. A l'inverse, la tête de la molécule (comportant le groupement benzène) peut librement s'accrocher et se décrocher du site actif, le pivot étant l'atome d'oxygène de la chaîne latérale. La position de cet atome d'oxygène est donc déterminante pour la durée





d'action du  $\beta_2$ -agoniste. Pour expliquer le délai et la durée d'action des  $\beta_2$ -agonistes, une seconde théorie, dite « du modèle de diffusion micro-cinétique », repose davantage sur l'interaction des  $\beta_2$ -agonistes avec les lipides membranaires, plutôt que sur l'interaction  $\beta_2$ -agoniste-récepteur adrénergique (présentée par la théorie de l'exo-site). En d'autres termes, cette seconde théorie propose que le salmétérol soit retenu par les lipides membranaires et se répartisse à l'intérieur de la membrane plasmique, créant ainsi un gradient de concentration, permettant à la membrane d'agir comme « un réservoir » pour le  $\beta_2$ -agoniste (Anderson *et al.*, 1994; Coleman *et al.*, 1996). Le salmétérol étant plus lipophile, aurait de ce fait un délai d'action plus long que celui du salbutamol et du formotérol, mais une durée d'action plus longue que le salbutamol [pour revue (Johnson, 2001)]. Cette théorie soulève également la question d'une possible diffusion passive du salmétérol à travers la membrane cellulaire.

## **II.4 Mécanismes de régulation des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques et de leur fonction**

### **II.4.1 Régulation de la densité des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques**

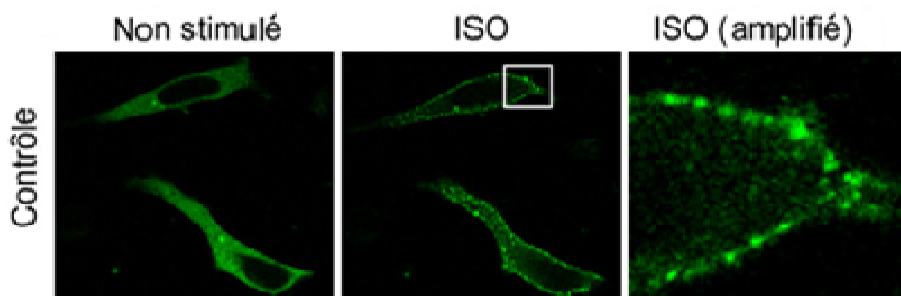
Peu d'études se sont intéressées à la synthèse des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. D'une manière intéressante, une étude *in vitro*, sur cellules de muscle lisse, a montré une augmentation maximale, observée une heure après l'administration d'adrénaline, en ARNm et en protéines membranaires des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Collins *et al.*, 1989). Dans le muscle squelettique, les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont très largement représentés par rapport aux récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques (Sillence *et al.*, 1993). Ainsi, la mesure, par radioligand, de la densité membranaire des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, représente principalement les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Sillence *et al.*, 1993; Ryall *et al.*, 2004). Dix et 18 semaines d'entraînement en endurance induisent une augmentation de la densité membranaire des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques dans le muscle *soleus* de rat (Buckenmeyer *et al.*, 1990; Plourde *et al.*, 1993). En revanche, l'âge ne semble pas avoir d'effet sur la densité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Elfellah *et al.*, 1989; Ryall *et al.*, 2004). Enfin, il a été reporté une augmentation de la densité des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques 2 jours après une lésion myotoxique à la bupivacaïne dans le muscle *extensor digitorum longus* (Beitzel *et al.*, 2007).



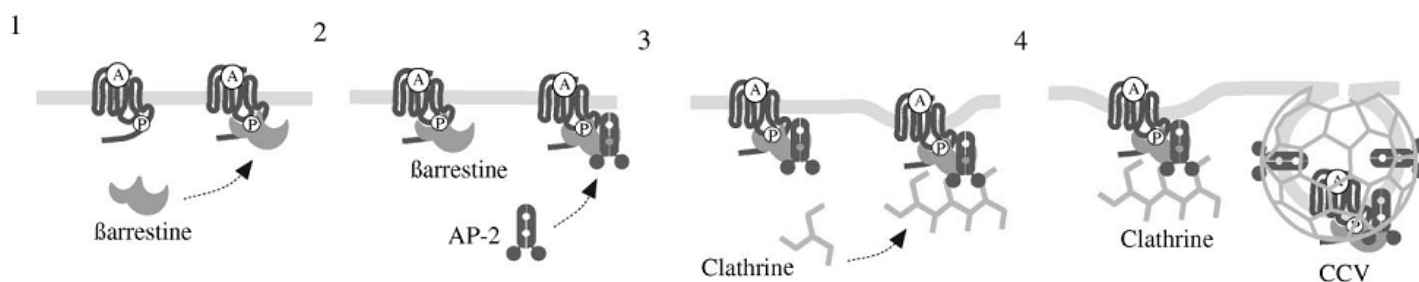
A l'inverse, 24 heures après l'administration d'adrénaline, une diminution de la densité membranaire des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques est observée (Collins *et al.*, 1989), suggérant que l'augmentation de la densité de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est transitoire. De plus, un entraînement en endurance de 12 semaines diminue la densité membranaire des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques dans le muscle *gastrocnemius* (Nieto *et al.*, 1997). Ces résultats soulignent donc le fait que l'effet d'un entraînement en endurance, sur la densité des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, est spécifique au muscle étudié. Deux et 5 jours de traitement au fénotérol ne semblent pas diminuer cette densité dans les muscles *extensor digitorum longus* et *soleus* de rat (Beitzel *et al.*, 2007). En revanche, 7 jours d'exposition à l'isoprotérénol diminue la densité membranaire des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans le *soleus* de chat (Hedberg *et al.*, 1984). Par ailleurs, un traitement plus long au clenbutérol (2 mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> pendant 18 jours) diminue la densité membranaire des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques des muscles de rat (Rothwell *et al.*, 1987). De la même manière, 3 et 4 semaines de traitement au fénotérol (1,4 mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> et 2,8 mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup>) (Ryall *et al.*, 2002; Beitzel *et al.*, 2004; Ryall *et al.*, 2004) et au clenbutérol (2 mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup>) (Ryall *et al.*, 2002), induisent une diminution de la densité des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques dans les muscles *extensor digitorum longus* et/ou *soleus* de rat. Ces résultats étaient également observés avec de plus faibles doses de formotérol et de salmétérol (25  $\mu$ g.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup>) (Ryall *et al.*, 2006). Néanmoins, 1, 7 et 28 jours de traitement au formotérol ne modifient pas le niveau d'expression en ARNm des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Koopman *et al.*, 2010), suggérant qu'un traitement prolongé diminue la population totale de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sans modifier le niveau d'expression en ARNm de ces récepteurs.

#### II.4.2 Phosphorylation et désensibilisation des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques

La désensibilisation rapide des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques résulte de leur phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) et par certains membres de la famille des kinases spécifiques aux RCPGs : les GRKs (G protein-coupled receptor kinase). Parmi cette famille, nous trouvons la sous-famille des  $\beta$ -adrenergic receptor kinases (les  $\beta$ -ARKs). La phosphorylation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques peut être spécifique aux récepteurs activés par le  $\beta_2$ -agoniste. Dans ce cas précis, nous parlerons de désensibilisation homologue. Elle fait intervenir les GRKs qui phosphorylent le récepteur sur les résidus sérine 355 et 356 situés sur l'extrémité COOH du récepteur (Seibold *et al.*, 2000) (**Figure 12**).



**Figure 13** : L'administration d'isoprotérénol (ISO,  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), pendant 10 minutes, induit le recrutement de  $\beta$ -arrestine au niveau de la membrane plasmique de cellules HEK293 surexprimant les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. La fluorescence de la  $\beta$ -arrestine 2 couplée GFP est visualisée par microscopie confocale. Avant la stimulation du  $\beta$ -agoniste, la  $\beta$ -arrestine 2 couplée GFP est uniformément distribuée dans le cytosol. Dès l'addition du  $\beta$ -agoniste, la  $\beta$ -arrestine 2 couplée GFP est colocalisée avec le récepteur dans les zones ponctuées de la membrane plasmique [modifié d'après (Whalen *et al.*, 2007)].



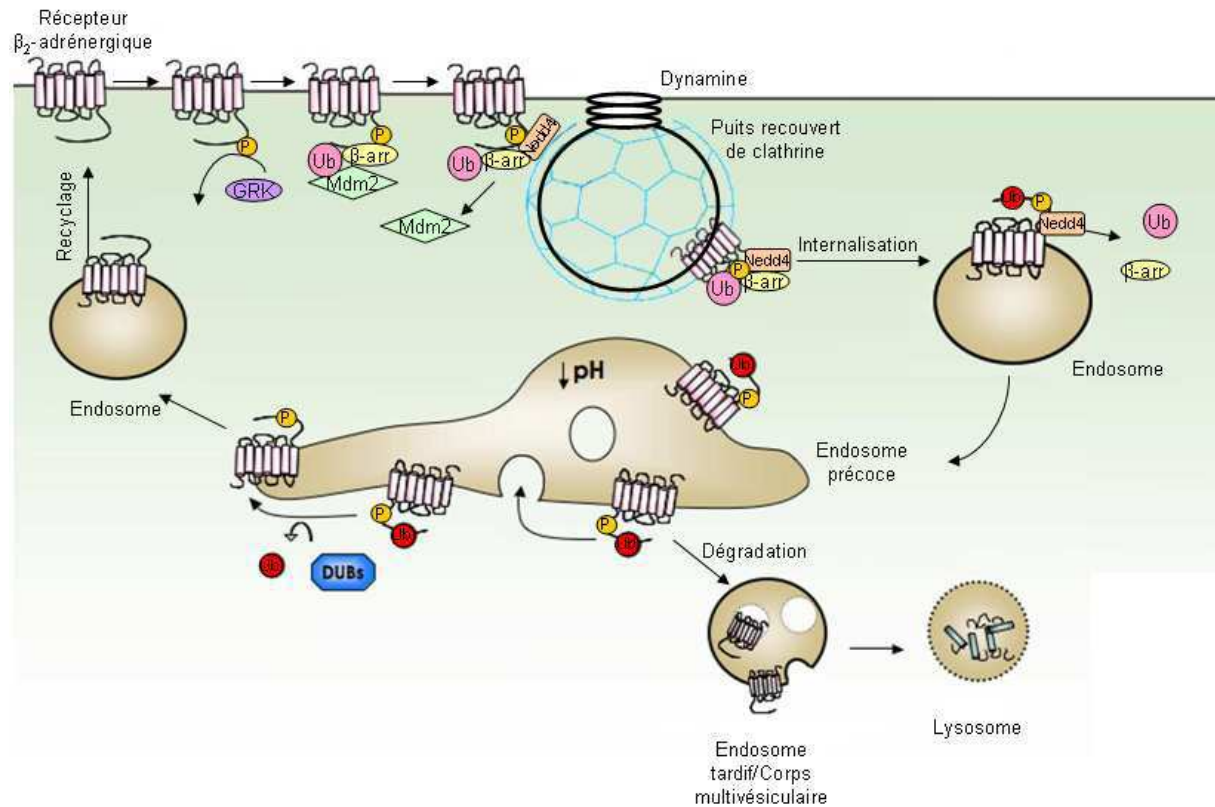
**Figure 14** : Processus d'endocytose des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques assuré par la  $\beta$ -arrestine 2. Après la fixation du  $\beta_2$ -agoniste (A) sur le récepteur et sa phosphorylation par la GRK, la  $\beta$ -arrestine 2 est recrutée (étape 1). Dans un premier temps, la  $\beta$ -arrestine 2 interagit avec la protéine  $\beta_2$ -adaptine (AP-2) (étape 2), puis la clathrine (étape 3) pour initier l'assemblage d'un réseau de clathrine et la formation de vésicules (puits) recouvertes de clathrine (CCV, clathrin-coated vesicles) (étape 4) [modifié d'après (Claing *et al.*, 2002)].

A ce jour, six isoformes de la famille des GRKs ont été identifiées (numérotées GRK1 à GRK6) et elles diffèrent suivant leur localisation et leur substrat (Inglese *et al.*, 1993). Ainsi, les isoformes GRK2 et GRK5 sont retrouvées dans le muscle squelettique de rat (Jones *et al.*, 2003) et l'ARNm de GRK6 est exprimé dans le muscle squelettique humain (Benovic & Gomez, 1993). Chez le rat, une expression plus importante de GRK2 et de GRK5 dans les muscles rapides (*gastrocnemius* et *extensor digitorum longus*), par rapport au muscle lent (*soleus*), est observée (Jones *et al.*, 2003). D'une façon intéressante, une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique n'augmente le contenu protéique ni de GRK2, ni celui de GRK5, que ce soit dans le muscle *gastrocnemius* ou dans le muscle *soleus* (Jones *et al.*, 2003). *In vivo*, l'inhibition pharmacologique de l'activité de GRK2 entraîne une diminution de la phosphorylation et de la désensibilisation des récepteurs (Whalen *et al.*, 2007), prolongeant ainsi la réponse intracellulaire induite par l'isoprotérénol.

A l'inverse, la phosphorylation peut être non spécifique et impliquer d'autres récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, non nécessairement activés par le  $\beta_2$ -agoniste. Nous parlerons alors de désensibilisation hétérologue. Cette dernière intervient à la suite d'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique et implique PKA qui phosphoryle les résidus sérine 261 et 262 situés au niveau de la troisième boucle intracellulaire (ICL3) du récepteur (Nobles *et al.*, 2011).

### II.4.3 Internalisation et dégradation des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques

A la suite de la phosphorylation du récepteur par les GRKs, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine 2 est observé (**Figure 13**). Cette protéine cytoplasmique, est phosphorylée et activée par la caséine kinase II (Lin *et al.*, 2002), puis se lie faiblement à l'extrémité COOH du récepteur. La  $\beta$ -arrestine 2 se lie à la protéine  $\beta_2$ -adaptine (AP-2) et à la clathrine, composants structurels des vésicules formées au niveau de la membrane plasmique et permettant l'internalisation de l'ensemble protéique (**Figure 14**) (Kim & Benovic, 2002). La  $\beta$ -arrestine 2 se lie ensuite à deux E3 ubiquitines ligases : Mdm2 (murine double minute 2) et Nedd4 (neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4) qui agissent différemment pour réguler le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. Ainsi, Mdm2 provoque l'ubiquitination de la  $\beta$ -arrestine 2 et régule l'étape initiale de l'endocytose du récepteur (Shenoy *et al.*, 2001). Nedd4 induit l'ubiquitination du récepteur pour cibler les récepteurs dans les lysosomes (Shenoy *et al.*, 2008). Il est suggéré que Nedd4 dissocie Mdm2 de la  $\beta$ -arrestine 2 et inactive Mdm2 (Shenoy *et al.*, 2008). Néanmoins, il est clairement établi que



**Figure 15 :** Mécanisme général d'endocytose du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique après sa stimulation par un  $\beta_2$ -agoniste.  $\beta$ -arr,  $\beta$ -arrestine 2 ; DUBs, enzymes déubiquitinantes ; GRK, G protein-coupled receptor kinase ; Mdm2, murine double minute 2 ; Nedd4, neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4 ; Ub (en rose), ubiquitination de la  $\beta$ -arrestine 2 par Mdm2 ; Ub (en rouge), ubiquitination du récepteur par Nedd4 [modifié d'après (Malik & Marchese, 2012)].

Mdm2 et Nedd4 fonctionnent d'une manière séquentielle à diverses étapes du processus d'endocytose du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (Shenoy *et al.*, 2008). Le rôle de la  $\beta$ -arrestine 2 serait donc de recruter Nedd4 au niveau du récepteur situé à la membrane plasmique dans le but de l'ubiquitiner. L'internalisation du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique qui s'ensuit l'oriente vers le recyclage à la membrane plasmique ou la dégradation [pour revue, (Moore *et al.*, 2007)].

Peu de données décrivent le mécanisme responsable de l'orientation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques dans la voie de recyclage plutôt que dans celle de la dégradation. Les récepteurs internalisés après activation par un  $\beta_2$ -agoniste sont adressés dans un premier temps dans des endosomes, puis dans des corps multivésiculaires (Malik & Marchese, 2012). C'est à l'intérieur de ces corps multivésiculaires que s'effectue le tri des récepteurs qui seront envoyés soit vers des voies de recyclage, soit de dégradation. Les corps multivésiculaires subissent ainsi un processus de maturation qui se termine par la fusion avec un lysosome et la dégradation de leur contenu. L'ubiquitination du récepteur fournit un signal crucial pour l'adressage vers cette dernière voie. Ainsi, des protéines, dont les ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) acheminent le récepteur ubiquitiné vers les lysosomes pour qu'ils soient dégradés (Hislop & von Zastrow, 2011; Malik & Marchese, 2012) (**Figure 15**).

D'autres protéines, à l'inverse, sont capables de déubiquitiner le récepteur pour l'acheminer vers la voie de recyclage. C'est le cas des enzymes déubiquitinantes (DUB) telles que les protéases ubiquitine-specific USP33 et USP20 (Berthouze *et al.*, 2009; Shenoy *et al.*, 2009), EBP50/NHERF1 (ezrin-binding phosphoprotein of 50 kDa/sodium-hydrogen exchange regulatory factor 1), NSF (N-Ethylmaleimide sensitive fusion protein) et SNX27 (sorting nexin 27) (Lauffer *et al.*, 2010). *In vitro*, dans des cellules de rein (HEK293) surexprimant des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, il semblerait que ces récepteurs soient rapidement recyclés à la membrane après leur internalisation. En effet, *in vivo*, en présence d'isoprotérénol, le temps d'endocytose d'un récepteur  $\beta_2$ -adrénergique est de 3,9 minutes et de 11,2 minutes pour le recyclage. En présence de salbutamol, le temps d'endocytose est plus long (~25 minutes), alors que le temps de recyclage demeure le même (Morrison *et al.*, 1996), suggérant qu'en présence de salbutamol, le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique reste plus longtemps à la membrane, temps nécessaire pour l'induction de sa réponse intracellulaire. La seule étude portant sur le muscle squelettique a montré qu'à la suite d'une incubation de 30 minutes avec le  $\beta$ -agoniste non spécifique isoprotérénol (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), la densité de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques à la membrane cellulaire était diminuée de moitié dans le muscle *soleus* avec un demi-temps





d'internalisation très rapide ( $t_{1/2} = 5$  minutes) (Jensen *et al.*, 2002). De plus, une large fraction, mais pas la totalité, des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques internalisés retourne à la surface membranaire lorsque le traitement au  $\beta$ -agoniste est arrêté (Jensen *et al.*, 2002). Néanmoins, à notre connaissance, aucune donnée n'est, pour l'heure, disponible concernant la cinétique d'endocytose et de recyclage des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques à la suite de stimulation par des  $\beta_2$ -agonistes *in vitro* dans des cellules musculaires et/ou *in vivo* dans le muscle squelettique.

**Une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique prolongée entraîne une atténuation rapide de la réponse biologique induite par la phosphorylation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Ce processus est plus connu sous le terme de désensibilisation et implique la phosphorylation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. A la suite de sa phosphorylation, le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique est internalisé et déphosphorylé pour être ensuite recyclé à la membrane plasmique ou dégradé. Dans l'organisme, la proportion de récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques est variable selon l'espèce et le tissu considérés, suggérant une grande variété de réponses biologiques intracellulaires.**



### III. Effets généraux des $\beta_2$ -agonistes sur différents tissus de l'organisme

Depuis la fin des années 1980 et le début des années 1990, de nombreuses études se sont intéressées aux effets des  $\beta_2$ -agonistes sur une variété importante d'espèces animales. En particulier, l'intérêt de ces études s'est porté sur le clenbutérol [4-Amino- $\alpha$ -(*t*-butylaminométhyl)-3,5-dichlorobenzyl alcool] et les conséquences de son utilisation sur la composition corporelle de ces espèces animales.

#### III.1 Le rein et le foie

Bien que le rein et le foie ne représentent, respectivement, qu'environ 0,4 et 3 % de la masse corporelle chez l'humain, ce sont des organes vitaux de l'organisme. Quelle que soit l'espèce animale considérée, ils présentent des récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques à leur surface (Tableau 1 du Chapitre II.2.2.). Le clenbutérol ne semble pas avoir d'effet sur la masse absolue du rein (Emery *et al.*, 1984; Agbenyega & Wareham, 1990; Carter *et al.*, 1991; Cartana *et al.*, 1994; Page *et al.*, 2004) et du foie (Emery *et al.*, 1984; Cartana *et al.*, 1994; Carbo *et al.*, 1997; Page *et al.*, 2004). En revanche, certaines études montrent une diminution de 8 % à 17 % de la masse du foie (Reeds *et al.*, 1986; Agbenyega & Wareham, 1990; Choo *et al.*, 1992), et du rein (-8 %) après l'administration de clenbutérol (Reeds *et al.*, 1986). Ramenée au poids de l'animal, la masse du rein est diminuée de 6 à 12 % chez des rats jeunes (3 mois), adultes (12 mois) et âgés (23 mois) traités avec ce  $\beta_2$ -agoniste ( $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ) pendant 21 jours (Carter *et al.*, 1991). Ainsi, le clenbutérol semble produire des effets controversés sur la masse du rein et du foie, contrairement à d'autres  $\beta_2$ -agonistes comme le fénotérol (Emery *et al.*, 1984), le salbutamol (Choo *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1994) et la terbutaline (Auman *et al.*, 2001) qui n'ont pas d'effet sur la masse de ces deux organes. D'une manière intéressante, l'administration de clenbutérol s'accompagnerait d'une augmentation de 31 % de la concentration en glycogène du foie (MacLennan & Edwards, 1989). Néanmoins, l'étude de Cartana *et al.* (1994) ne confirme pas ces résultats (Cartana *et al.*, 1994). Des études *in vivo*, sur des modèles animaux, ont suggéré que de fortes concentrations non physiologiques de  $\beta_2$ -agonistes (albutérol,  $50 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  en intraveineux), étaient nécessaires pour stimuler la production d'EPO (érythropoïétine)



(Gross & Fisher, 1978; Przala *et al.*, 1979; Jelkmann & Bauer, 1980). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'humain avec le même mode d'administration (fénotérol,  $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ , pendant 6 heures) (Gleiter *et al.*, 1997). Pourtant, ces résultats n'ont pas été confirmés après inhalation de salbutamol (0,8 mg, 4 fois par jour pendant 2 semaines) chez l'humain (Berglund *et al.*, 2002). Ainsi, la production rénale de la glycoprotéine érythropoïétine par les  $\beta_2$ -agonistes serait dépendante des doses et de la voie d'administration de ces derniers.

### III.2 Les glandes surrénales

L'administration de  $\beta_2$ -agonistes ne s'accompagne pas systématiquement d'une augmentation de la masse des glandes surrénales (Ryall *et al.*, 2002). Néanmoins, il a été montré une hyperplasie des cellules adrénocorticales (Illera *et al.*, 1998). Cette hyperplasie s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion, par les glandes surrénales, de la corticostérone et d'adrénaline chez le rat (Cardoso & Stock, 1998; Silvan *et al.*, 2007). Cependant, les effets du clenbutérol sur la composition corporelle ne sont pas diminués après l'ablation des glandes surrénales chez le rat (Rothwell & Stock, 1988), suggérant que les stéroïdes surrénaux ne sont pas nécessairement impliqués dans l'action des  $\beta_2$ -agonistes (Rothwell & Stock, 1988).

### III.3 L'os

L'os est un tissu dynamique innervé qui se remodèle. Il est formé de deux compartiments : l'os trabéculaire et l'os cortical. La masse osseuse est maintenue constante par deux processus : la résorption osseuse par les ostéoclastes et la formation osseuse par les ostéoblastes. Les cellules ostéoblastiques primaires présentent des récepteurs adrénergiques à leur surface (Takeda *et al.*, 2002; Togari, 2002) dont les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Kellenberger *et al.*, 1998). Des études se sont donc intéressées aux effets des  $\beta_2$ -agonistes et des  $\beta$ -bloquants sur le tissu osseux. Ainsi, le clenbutérol réduirait fortement la perte osseuse après dénervation (Zeman *et al.*, 1991) ou après suspension des pattes arrières de rats (Bloomfield *et al.*, 1997). De façon contradictoire, des résultats *in vitro* ont montré que l'isoprotérénol stimulait l'ostéoclastogénèse (Takeuchi *et al.*, 2001). Par la suite, des études *in vivo* ont confirmé ces premiers résultats *in vitro*. Ainsi, le clenbutérol ( $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  pendant 4 semaines) inhiberait la croissance longitudinale de l'os et diminuerait le contenu



minéral osseux chez le rat (Kitaura *et al.*, 2002). Un traitement de plus longue durée (6 semaines) au clenbutérol (2 mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup>) s'accompagne d'une réduction de la densité minérale osseuse du *tibia*, du *tibial proximal* et des vertèbres, avec une altération de la micro-architecture de l'os comme en témoigne la diminution du nombre et du volume des trabécules osseuses (Bonnet *et al.*, 2005). Cette diminution du contenu minéral osseux et de la densité minérale osseuse (Cavalié *et al.*, 2002) proviendrait d'une baisse de l'activité ostéoblastique et/ou d'une augmentation de la résorption osseuse. Or, un traitement prolongé de 6 semaines au clenbutérol n'a pas d'effet sur l'ostéocalcine, un marqueur de la formation osseuse, alors qu'un traitement au  $\beta_2$ -agoniste augmente la déoxyypyridinoline, un marqueur de la résorption osseuse (Bonnet *et al.*, 2005). Ainsi, le clenbutérol agirait davantage sur la résorption osseuse que sur la formation osseuse (Cavalié *et al.*, 2002). De plus, l'isoprotérénol semble agir sur l'expression génique des ostéoblastes en diminuant l'expression de *Cbfa1* (Takeda *et al.*, 2002), un facteur de transcription contrôlant la différenciation ostéoblastique (Ducy *et al.*, 1999). Des souris déficientes en récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (KO  $\beta_2$ -AR) présentent une augmentation de la masse osseuse par rapport à des souris wild-type (WT), en lien avec une diminution de la déoxyypyridinoline (Elefteriou *et al.*, 2005). Inversement, des souris traitées au propranolol, un  $\beta$ -bloquant, présentent une augmentation de la masse osseuse (Takeda *et al.*, 2002). Les premiers résultats chez l'humain d'un traitement aux  $\beta$ -bloquants font état d'une diminution du risque de fracture, en partie grâce à l'augmentation de la densité minérale osseuse (Pasco *et al.*, 2004). Néanmoins, les résultats obtenus par la suite n'ont pas permis de valider clairement ces premiers résultats (Reid *et al.*, 2005a). En effet, à l'inverse, le propranolol diminuerait de façon significative la concentration d'ostéocalcine dans le sérum des patients (Reid *et al.*, 2005b) et pourrait ainsi être associé à une augmentation du risque de fractures (Rejnmark *et al.*, 2004). Inhalés, en association avec les corticostéroïdes, les  $\beta_2$ -agonistes n'ont pas d'effets clairement définis sur la densité minérale osseuse (Pasaoglu *et al.*, 2006). Malgré quelques études contradictoires, ces données expérimentales semblent indiquer que les  $\beta_2$ -agonistes induisent une résorption osseuse. Dépendants notamment de la voie d'administration et de la dose, les effets des  $\beta_2$ -agonistes et des  $\beta$ -bloquants, sur l'os humain, demeurent une question ouverte.





### III.4 Le tissu adipeux

L'administration de clenbutérol est associée à une diminution significative de la masse de tissu adipeux (Ricks *et al.*, 1984; Choo *et al.*, 1992; Kearns *et al.*, 2001; Bricout *et al.*, 2004). Cette diminution s'observe aussi bien chez des rats jeunes (3 mois) que chez des rats âgés (23 mois) (Carter *et al.*, 1991). Des études *in vitro* menées sur une lignée cellulaire d'adipocytes 3T3-L1 traités au clenbutérol montrent une limitation de l'adipogénèse par le  $\beta_2$ -agoniste qui s'ajoute à une augmentation de la lipolyse. Ainsi, le clenbutérol et l'isoprotérénol augmentent la libération de glycérol due à l'hydrolyse des triglycérides (Kim *et al.*, 2010b). Le clenbutérol, en réduisant le contenu en gouttelettes lipidiques, diminuerait la taille des cellules adipeuses (Zhang *et al.*, 2007) et augmenterait l'apoptose du tissu adipeux (Page *et al.*, 2004). D'un point de vue moléculaire, l'isoprotérénol induit la lipolyse en permettant la phosphorylation et l'activation de la lipase hormonosensible (Clifford *et al.*, 2000), dépendante de la protéine kinase A (Garton *et al.*, 1989). De plus, l'isoprotérénol phosphoryle la perilipine A (Clifford *et al.*, 2000), qui se dissocie de la protéine CGI-58, coactivateur de l'adipose triglyceride lipase et active ainsi l'hydrolyse des triglycérides [pour revue (Zechner *et al.*, 2009)]. Concomitante avec l'activation de l'adipose triglyceride lipase, la lipase hormonosensible migre du cytosol vers l'intérieur des gouttelettes lipidiques et hydrolyse le diglycéride, produit par l'adipose triglyceride lipase (Zechner *et al.*, 2009). *In vivo*, il a été révélé une augmentation des acides gras plasmatiques libres après traitement à la terbutaline, suggérant un accroissement de la lipolyse chez le sujet sain (Haffner *et al.*, 1993).

### III.5 Le muscle cardiaque

Il est décrit dans la littérature une augmentation de la fréquence cardiaque après administration de  $\beta_2$ -agonistes (Eisemann *et al.*, 1988; Daubert *et al.*, 2007). Une hypertrophie du myocarde est également couramment reportée chez le rat et la souris après traitement au clenbutérol (Carbo *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1999; Duncan *et al.*, 2000; Sneddon *et al.*, 2000; Oishi *et al.*, 2002), au formotérol (Busquets *et al.*, 2004; Ryall *et al.*, 2006), au salmétérol (Carbo *et al.*, 1997) et au fénotérol (Ryall *et al.*, 2004). Cette hypertrophie, caractérisée par une augmentation du contenu protéique du cœur induite par les  $\beta_2$ -agonistes (Deshaies *et al.*, 1981; Bates & Pell, 1991), s'accompagne de profondes modifications structurelles et fonctionnelles du muscle cardiaque. Les premières publications, datant des années 1960, ont

**Tableau 2 :** Sélection d'études examinant les effets sur la masse musculaire et la composition en types de fibre des  $\beta_2$ -agonistes sur différents muscles squelettiques de rat.

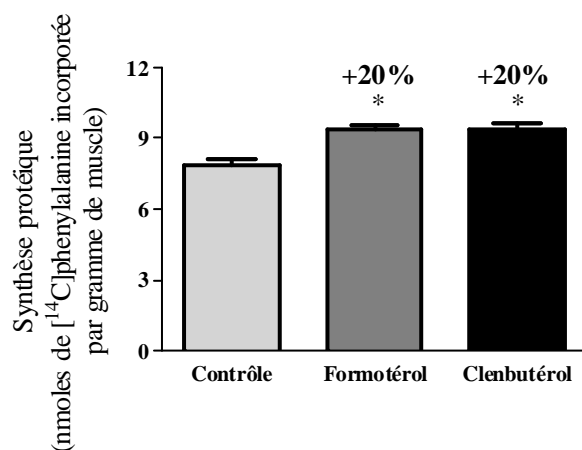
$\beta_2$ -agonistes	Dose	Voie d'administration	Durée du traitement	Gain de masse musculaire	Surface de fibre		Proportion de fibre				Références
					Type I	Type II	Type I	Type IIa	Type IIx	Type IIb	
Clenbutérol	0,6 mg.jour <sup>-1</sup>	Orale (eau de boisson)	2 semaines	n.s. ( <i>soleus</i> )	n.d.		95 ↘ 67%	5 ↗ 25%	0 ↗ 4%	0 ↗ 3%	(Ricart-Firinga <i>et al.</i> , 2000)
Clenbutérol	0,6 mg.jour <sup>-1</sup>	Orale (eau de boisson)	2 semaines	+18% ( <i>soleus</i> )	n.d.		95 ↘ 73%	5 ↗ 22%	0 ↗ 3%	0 ↗ 2%	(Bozzo <i>et al.</i> , 2003)
Clenbutérol	0,6 mg.jour <sup>-1</sup>	Orale (eau de boisson)	2 semaines	+9% ( <i>soleus</i> )	n.d.		95 ↘ 72%	5 ↗ 23%	0 ↗ 3%	0 ↗ 2%	(Stevens <i>et al.</i> , 2000)
				+16% (EDL)	n.d.		n.c. (4%)	n.c. (12%)	n.c. (28%)	n.c. (56%)	
				+20% (GAS)	n.d.		n.c. (16%)	22 ↘ 13%	n.c. (28%)	n.c. (40%)	
Clenbutérol	1,6 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	Orale (eau de boisson)	2 semaines	n.s. ( <i>soleus</i> )	n.s.	+11%	n.c. (68%)	n.c. (32%)			(Zeman <i>et al.</i> , 1988)
			4 semaines	n.s. ( <i>soleus</i> )	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
			8 semaines	n.d. ( <i>soleus</i> )	n.s.	+17%	68 ↘ 46%	32 ↗ 54%			
			12 semaines	+25% ( <i>soleus</i> )	+9%	+40%	88 ↘ 63%	12 ↗ 37%			
			2 semaines	+23% (EDL)	+12%	+63%	n.c. (1%)	n.c. (99%)			
			4 semaines	+24% (EDL)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
			12 semaines	+18% (EDL)	+36%	+23%	n.c. (2%)	n.c. (98%)			
Clenbutérol	4 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	Orale (eau de boisson)	4 semaines	+27% ( <i>soleus</i> )	n.s.	+63%	93 ↘ 79%	7 ↗ 21%			(Oishi <i>et al.</i> , 2002)
Clenbutérol	2 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	Orale (gavage)	4 semaines	n.s. ( <i>soleus</i> )	n.s.	+90%	99 ↘ 68%	1 ↗ 32%			(Bricout <i>et al.</i> , 2004)
Clenbutérol	2 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	Injection s.c.	2 semaines	+17% ( <i>soleus</i> )	n.d.		93 ↘ 84%	7 ↗ 11%	0 ↗ 2%	0 ↗ 3%	(Dodd <i>et al.</i> , 1996)
				+16% ( <i>plantaris</i> )	n.d.		n.c. (3%)	n.c. (16%)	n.c. (40%)	n.c. (42%)	
				+18% (GAS)	n.d.		n.c. (8%)	n.c. (11%)	n.c. (32%)	n.c. (48%)	
Clenbutérol	2 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	Injection s.c.	6 semaines	+17% ( <i>soleus</i> )	n.s.	+25%	95 ↘ 90%	5 ↗ 10%			(Criswell <i>et al.</i> , 1996)
Clenbutérol	2 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	Injection i.p.	4 semaines	+20% (EDL)	+12%	+9%	n.c. (3%)	n.c. (15%)	n.c. (39%)	n.c. (43%)	(Ryall <i>et al.</i> , 2002)
Fénotérol	2,8 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	Injection i.p.	4 semaines	+27% (EDL) +26% ( <i>soleus</i> )	+34% n.s.	+31% +22%	n.c. (3%) 82 ↘ 72%	18 ↘ 14% 13 ↗ 22%	n.c. (40%) n.c. (5%)	n.c. (40%) n.d.	(Ryall <i>et al.</i> , 2002)
Formotérol	25 µg.kg <sup>-1</sup>	Injection i.p.	4 semaines	+23% (EDL) n.s. ( <i>soleus</i> )	+50% n.s.	+32% +20%	n.c. (3%) 94 ↘ 88%	21 ↘ 10% 5 ↗ 10%	n.c. (40%) n.c. (2%)	37 ↗ 45% n.d.	(Ryall <i>et al.</i> , 2007)
Salbutamol	2 x 0,3 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	Injection i.p.	3 jours	n.d. ( <i>soleus</i> )	+13%	+14%	90 ↘ 83%	10 ↗ 17%			(Soic-Vranic <i>et al.</i> , 2005)
			6 jours		+18%	n.s.	90 ↘ 85%	10 ↗ 15%			
			9 jours		+13%	n.s.	90 ↘ 86%	10 ↗ 14%			
			12 jours		n.s.	+9%	90 ↘ 83%	10 ↗ 17%			
			14 jours		n.s.	+8%	90 ↘ 79%	10 ↗ 21%			

EDL, *extensor digitorum longus* ; GAS, *gastrocnemius* ; i.p., intraperitonéale ; n.d., non déterminé ; n.s., non significatif ; n.c., pas de changement ; s.c., sous-cutanée ; ↗, augmentation ; ↘, diminution.

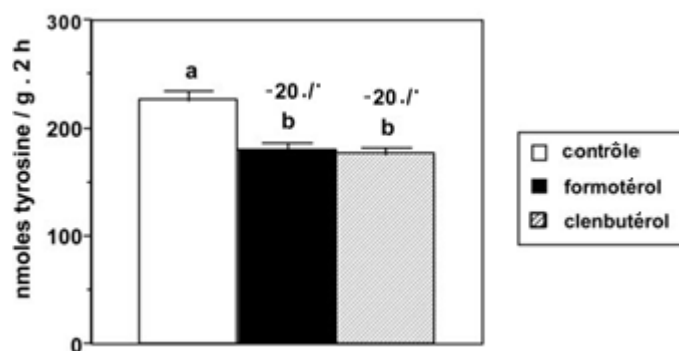
porté sur des doses importantes (comprises entre 80 et 320 mg.kg<sup>-1</sup>) d'isoprotérénol (ou isoprénaline) qui est un agoniste non spécifique des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Des injections d'isoprotérénol à des singes (Maruffo, 1967) et des tortues (Ostadal *et al.*, 1968) s'accompagnent d'une nécrose cellulaire, également observée avec du clenbutérol (Burniston *et al.*, 2002). Cette nécrose fait suite à une augmentation de l'apoptose (Shizukuda *et al.*, 1998; Burniston *et al.*, 2005a) et serait principalement dépendante des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques (Goldspink *et al.*, 2004), majoritaires dans le cœur, bien que les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques semblent également impliqués dans une moindre mesure (Burniston *et al.*, 2005b). En réponse à la nécrose cellulaire, une fibrose est observée (Benjamin *et al.*, 1989). Elle serait due à la stimulation de la synthèse de collagène (Patiyal & Katoch, 2006), dont les infiltrations se trouveraient non seulement au niveau de la paroi du ventricule gauche, mais également autour des vaisseaux sanguins (Duncan *et al.*, 2000). L'accumulation de cette protéine non contractile contribuerait à l'augmentation de la rigidité ventriculaire et à l'altération des propriétés contractiles du myocarde (Duncan *et al.*, 2000).

### III.6 Le muscle strié squelettique

De nombreuses études, menées au cours de ces 30 dernières années, ont décrit une hypertrophie du muscle squelettique consécutive à l'administration de  $\beta_2$ -agonistes. L'effet anabolique de l'isoprotérénol sur le muscle squelettique a été décrit pour la première fois en 1981 (Deshaies *et al.*, 1981). Les effets spécifiques des  $\beta_2$ -agonistes ont été, par la suite, reportés chez les poulets d'élevage (Dalrymple *et al.*, 1984), le bœuf (Ricks *et al.*, 1984), le veau (Eisemann *et al.*, 1988) et l'agneau (Beermann *et al.*, 1987; Bohorov *et al.*, 1987). Ces résultats ont été largement repris et étendus chez le rat (Emery *et al.*, 1984; Zeman *et al.*, 1988; MacLennan & Edwards, 1989; Bricout *et al.*, 2004), la souris (Dupont-Versteegden *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 1999; Hinkle *et al.*, 2002) et le chien (Zhang *et al.*, 1996). Le gain de masse musculaire varie de 10 à 30 % dans les muscles *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* et *tibialis anterior* de rat (Reeds *et al.*, 1986; Zeman *et al.*, 1987; MacLennan & Edwards, 1989) (**Tableau 2**) et de souris (Lynch *et al.*, 1996; Lynch *et al.*, 1999). La grande disparité des résultats dépend de la dose administrée de  $\beta_2$ -agonistes (de 1  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  à 4  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ) (Ryall *et al.*, 2006), de la nature du  $\beta_2$ -agoniste (durée d'action courte *versus* longue) (Harcourt *et al.*, 2007), de la durée du traitement (de 1 jour à 12 mois) (Koopman *et al.*, 2010) et de la voie d'administration du  $\beta_2$ -agoniste (injection



**Figure 16 :** Taux de synthèse protéique dans le muscle isolé *extensor digitorum longus* de rat après 30 minutes d'incubation avec du formotérol ( $10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ) et du clenbutérol ( $10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ). Ce taux est exprimé en nanomoles de [ $^{14}$ C] phénylalanine incorporée par gramme de muscle. \*p < 0,05 statistiquement différent du groupe Contrôle [modifié d'après (Busquets *et al.*, 2004)].



**Figure 17 :** Taux de protéolyse dans le muscle isolé *extensor digitorum longus* de rat après 2 heures d'incubation avec du formotérol ( $10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ) et du clenbutérol ( $10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ ). Ce taux est exprimé en nanomoles de tyrosine par gramme de muscle. a est significativement différent de b (p < 0,05) [modifié d'après (Busquets *et al.*, 2004)].

intrapéritonéale ou sous-cutanée, administration orale par la nourriture ou *via* l'eau de boisson) (Moore *et al.*, 1994). Bien que la première étude n'ait pas permis de montrer une augmentation de la synthèse protéique à la suite d'un traitement au clenbutérol (Reeds *et al.*, 1986), l'hypertrophie musculaire s'accompagne d'une augmentation du contenu en ARN totaux et en protéines (Emery *et al.*, 1984; Choo *et al.*, 1992), ainsi que d'une augmentation de la synthèse protéique (Emery *et al.*, 1984; Busquets *et al.*, 2004; Navegantes *et al.*, 2004) (**Figure 16**) et/ou une diminution de la protéolyse *in vitro* et *in vivo* (Navegantes *et al.*, 2000, 2001; Busquets *et al.*, 2004) (**Figure 17**).

De plus, l'hypertrophie du muscle squelettique induite par les  $\beta_2$ -agonistes, est associée à des modifications de la typologie des fibres musculaires. Ainsi, nous observons une diminution de la proportion de fibres à contraction lente exprimant l'isoforme de chaîne lourde de myosine (MHC) de type I (de 95 à 70 % dans le muscle *soleus*), et une augmentation de la proportion des fibres à contraction rapide exprimant les MHC de type II (de 5 à 30 % dans le muscle *soleus*) (Zeman *et al.*, 1988; Criswell *et al.*, 1996; Dodd *et al.*, 1996; Ricart-Firinga *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2000; Oishi *et al.*, 2002; Ryall *et al.*, 2002; Bozzo *et al.*, 2003; Bricout *et al.*, 2004; Soic-Vranic *et al.*, 2005; Ryall *et al.*, 2007). A ceci s'ajoute une augmentation de la surface de section des fibres exprimant la MHC de type I et celles exprimant les MHC de type II (Tableau 2).

L'implication des cellules satellites dans l'hypertrophie musculaire est matière à débats (O'Connor & Pavlath, 2007) et dépendant du stimulus hypertrophiant. Concernant l'hypertrophie induite par les  $\beta_2$ -agonistes, de nombreuses études ont montré que l'administration de  $\beta_2$ -agonistes induisait une hypertrophie musculaire sans augmentation du nombre de noyaux nucléaires originaires des cellules satellites, en référence à la quantité d'ADN inchangée (Maltin *et al.*, 1989; O'Connor *et al.*, 1991; Nash *et al.*, 1994). Ces données supportent donc le fait que l'hypertrophie induite par les  $\beta_2$ -agonistes serait indépendante des cellules satellites. Cependant, la participation des cellules satellites n'est pas à exclure étant donné que l'administration de clenbutérol stimule la prolifération de cellules satellites (Roberts & McGeachie, 1992). Enfin, l'expression de gènes impliqués dans le recrutement, la prolifération et la différenciation des cellules satellites est également augmentée en présence de  $\beta_2$ -agonistes (Spurlock *et al.*, 2006; Toledo *et al.*, 2011). L'irradiation par des rayons gamma, qui détruisent et empêchent la prolifération des cellules satellites, permettrait de



déterminer la réelle implication des cellules satellites dans l'hypertrophie induite par les  $\beta_2$ -agonistes.

Enfin, dans le muscle squelettique, l'administration de  $\beta_2$ -agoniste diminue le contenu en glycogène (MacLennan & Edwards, 1989; Maltin *et al.*, 1990; Cartana *et al.*, 1994) et augmente la concentration en lactate présent dans le muscle squelettique après traitement au  $\beta_2$ -agoniste (MacLennan & Edwards, 1989; Cartana *et al.*, 1994).

**Expérimentalement, l'administration de  $\beta_2$ -agonistes à des doses 10 à 20 fois supérieures à la dose thérapeutique montre des effets anabolisants sur le muscle strié squelettique, ainsi qu'une lipolyse importante. L'intérêt de l'usage de ces substances, en dehors du traitement de l'asthme, a été d'augmenter la masse musculaire et de diminuer la masse grasse chez des animaux d'élevage. Par la suite, et grâce à ces propriétés anabolisantes, les  $\beta_2$ -agonistes ont été utilisés pour atténuer voire inverser la perte de masse musculaire induite par diverses pathologies musculaires.**



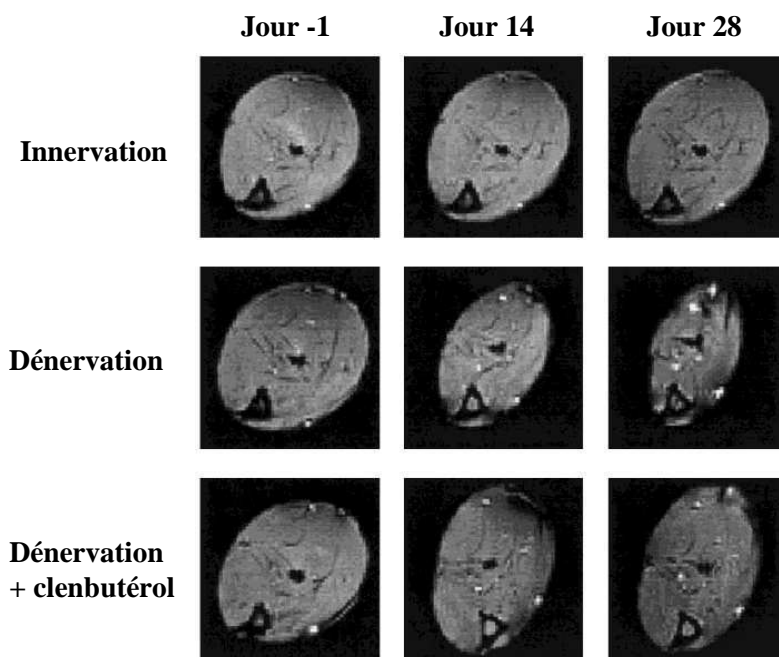


## IV. Potentiel thérapeutique lié à l'utilisation des $\beta_2$ -agonistes : prévention de la perte de masse musculaire

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (voir dans la partie Annexe).

### IV.1 La sarcopénie : perte de masse musculaire liée à l'âge

La sarcopénie est un terme utilisé pour décrire la perte lente et progressive de masse musculaire associée à la baisse de la force musculaire (Lynch *et al.*, 2001a) et à l'augmentation de la fatigabilité liée à l'âge. Cette atrophie musculaire joue un rôle considérable dans l'incapacité physique, la perte d'autonomie et la mortalité liée au vieillissement. Au vu des effets anaboliques des  $\beta_2$ -agonistes sur le muscle squelettique, ces molécules pourraient être utilisées comme approches thérapeutiques pour prévenir/limiter la perte de masse musculaire induite par l'âge. Ainsi, le clenbutérol ( $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  pendant 21 jours) augmente la masse musculaire de rats âgés (+24 %) (Carter *et al.*, 1991). De la même manière, le fénotérol ( $1,4 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  pendant 4 semaines) et le clenbutérol ( $2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  pendant 4 semaines) restaurent la masse musculaire et la force de rats âgés (Smith *et al.*, 2002; Ryall *et al.*, 2004), même à faibles doses (formotérol,  $25 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  pendant 4 semaines) (Ryall *et al.*, 2007). Cependant, un traitement aux  $\beta_2$ -agonistes cause une légère augmentation de la fatigabilité des muscles *extensor digitorum longus* et *soleus* (Ryall *et al.*, 2004) due à une diminution des activités enzymatiques oxydatives (Smith *et al.*, 2002; Ryall *et al.*, 2004). Enfin, l'augmentation protéique de l'isoforme spécifique des muscles à contraction rapide, SERCA1 (sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase 1), dans le muscle *gastrocnemius* de rats âgés, suggère que le fénotérol restaurerait la perte de l'activité de SERCA1 observée avec l'âge (Schertzer *et al.*, 2005).



**Figure 18 :** Visualisation par imagerie par résonance magnétique de l'effet anti-atrophique du clenbutérol sur le *tibialis anterior* de rat après 14 et 28 jours de dénervation [modifié d'après (Cockman *et al.*, 2001)].

## IV.2 La dénervation

La suppression expérimentale de l'innervation musculaire ou son altération par écrasement du nerf, ou par section du nerf sciatique chez le rongeur induit une perte de masse musculaire. Plusieurs études ont démontré les effets bénéfiques de l'administration de  $\beta_2$ -agonistes chez le rat ayant subi une dénervation des muscles *soleus* et/ou *gastrocnemius* (Maltin *et al.*, 1986; Maltin *et al.*, 1987; Zeman *et al.*, 1987; Babij & Booth, 1988; Maltin *et al.*, 1989; Agbenyega & Wareham, 1990). D'une façon générale, ces études s'accordent sur une récupération partielle de la masse musculaire et une augmentation de la synthèse protéique en présence de  $\beta_2$ -agonistes, alors qu'à l'inverse, le taux de dégradation protéique était diminué (Maltin *et al.*, 1987; Agrawal *et al.*, 2003). Cette récupération partielle de la masse musculaire pourrait provenir, en partie, de l'activation des cellules satellites (Maltin *et al.*, 1989; Maltin & Delday, 1992). L'imagerie par résonance magnétique permet de visualiser l'effet anti-atrophique du clenbutérol après dénervation (**Figure 18**) (Cockman *et al.*, 2001). D'un point de vue moléculaire, la dénervation augmente l'expression de *MyoD* et de *myogénine*, ainsi que le nombre de récepteurs nicotiques à l'acétylcholine dans le muscle *soleus* de rat. L'administration de clenbutérol à des rats dénervés réprime non seulement l'expression de *MyoD* et de *myogénine*, mais réduit aussi le nombre de récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (Maltin *et al.*, 1993a), mimant ainsi les effets de l'innervation. Par ailleurs, une régénération du nerf sciatique de rat (basée sur le nombre d'axones et le degré de myélinisation) (Frerichs *et al.*, 2001) et une récupération locomotrice à la suite d'une contusion de la moëlle épinière (Zeman *et al.*, 1999), étaient observées après l'administration de clenbutérol, suggérant ainsi l'hypothèse d'une action directe du  $\beta_2$ -agoniste sur le motoneurone. A ce jour, une seule étude a montré que le clenbutérol ( $\sim 2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  pendant 3 mois) atténuait l'atrophie musculaire induite par la dénervation chez l'humain (Jiang *et al.*, 2011).

## IV.3 L'inactivité par immobilisation ou suspension

La suspension des membres inférieurs, l'immobilisation plâtrée, l'alitement, les vols spatiaux, sont des conditions simulant l'inactivité et produisant une atrophie marquée du muscle squelettique. Une immobilisation plâtrée de 10 jours est associée à une diminution du contenu en ARNm des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques dans le muscle *soleus* (Sato *et al.*, 2011),



suggérant que la baisse du niveau d'expression de ces récepteurs jouent un rôle non négligeable dans l'atrophie musculaire. L'administration de clenbutérol ( $1 \text{ à } 2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ) s'oppose à l'atrophie musculaire, induite par la suspension des membres inférieurs, en restaurant la masse musculaire du *plantaris* (Yimlamai *et al.*, 2005), du *tibialis anterior* (Yimlamai *et al.*, 2005), du *soleus* (Babij & Booth, 1988; Stevens *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2001), du *gastrocnemius* (Babij & Booth, 1988; Stevens *et al.*, 2000) et de l'*extensor digitorum longus* (Stevens *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2001). D'un point de vue moléculaire, le clenbutérol diminue l'accumulation de conjugués ubiquitinés et l'activité du protéasome dans les muscles *plantaris* et *tibialis anterior* (Yimlamai *et al.*, 2005) dans des conditions de suspension. Le clenbutérol amplifie également la transition des fibres MHCI vers MHCII, induite par des conditions de suspension (Stevens *et al.*, 2000), et permet une récupération complète du diamètre des fibres rapides, qui sont les plus touchées par deux semaines de protocole de suspension (Ricart-Firinga *et al.*, 2000). A notre connaissance, la seule étude impliquant des sujets humains subissant une suspension unilatérale du membre inférieur gauche, a montré une augmentation du travail total concentrique et excentrique, de la puissance moyenne concentrique et excentrique après un traitement au salbutamol ( $16 \text{ mg.jour}^{-1}$  pendant 40 jours). Ces résultats ont été principalement relevés chez les femmes (Caruso *et al.*, 2008).

#### **IV.4 Les pathologies neuromusculaires**

La faiblesse et l'atrophie musculaire sont des caractéristiques communes à de nombreuses pathologies neuromusculaires. Bien qu'il existe des différences entre les molécules, les  $\beta_2$ -agonistes ont montré leur efficacité à augmenter la masse et la force musculaire. D'une façon importante, les  $\beta_2$ -agonistes peuvent également exercer des effets thérapeutiques *via* la régulation de l'expression de gènes qui ne sont pas directement impliqués dans l'anabolisme du muscle squelettique.

##### **IV.4.1 La dystrophie musculaire de Duchenne**

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une pathologie létale liée au chromosome X, dont l'incidence est de 1/3500 chez le garçon. Cette pathologie est causée par la mutation du gène codant pour la protéine sub-sarcolemmale dystrophine. L'absence de



dystrophine entraîne une fragilité de la membrane des cellules musculaires, la mort des fibres musculaires et le remplacement éventuel du muscle squelettique par du tissu adipeux et du tissu conjonctif fibreux (Deconinck & Dan, 2007). L'intervention pharmacologique avec des  $\beta_2$ -agonistes fait partie des pistes de recherche thérapeutique pour limiter la perte de masse musculaire induite par cette pathologie (Radley *et al.*, 2007). La souris *mdx*, modèle animal de la DMD, est caractérisée par la présence de noyaux centraux dans approximativement 60 % des fibres des muscles *extensor digitorum longus* et *soleus* (Lynch *et al.*, 2001a) et du diaphragme (Harcourt *et al.*, 2007). Indicatrice de la régénération musculaire, la proportion des noyaux en position centrale dans le diaphragme n'est pas modifiée après administration de formotérol aussi bien chez des souris sauvages que chez des souris *mdx* (Harcourt *et al.*, 2007). Par contre, la dégénérescence du muscle squelettique, chez des souris *mdx*, est grandement réduite à la suite d'un traitement au clenbutérol, comme en témoigne l'augmentation du nombre et de la taille des fibres musculaires dans le *plantaris* et le *soleus* (Zeman *et al.*, 2000). Enfin, l'utilisation d'un modèle de dégénérescence/régénération musculaire, la lésion myotoxique, a montré que les  $\beta_2$ -agonistes favorisaient une régénération structurelle et fonctionnelle du muscle de rat après une telle lésion (Beitzel *et al.*, 2004; Bricout *et al.*, 2004; Beitzel *et al.*, 2007).

Malgré quelques divergences (Lynch *et al.*, 1999, 2000), la plupart des études reportent que l'administration de  $\beta_2$ -agonistes augmente la masse du muscle squelettique et la force absolue de souris *mdx* (Rothwell & Stock, 1985; Dupont-Versteegden, 1996; Hayes & Williams, 1998; Lynch *et al.*, 2001b; Harcourt *et al.*, 2007). Cependant, la force spécifique du muscle squelettique (force normalisée à la surface de section du muscle) n'est pas augmentée en réponse à l'administration de clenbutérol (Rothwell & Stock, 1985; Dupont-Versteegden *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 2000). De la même manière, le clenbutérol n'induit pas de bénéfice sur la fonction du diaphragme, également affecté dans le cas d'une DMD (Lynch *et al.*, 2001b). De plus, une augmentation de la fatigabilité a été reportée au niveau du muscle squelettique du membre inférieur et du diaphragme en réponse à l'administration de clenbutérol (Dupont-Versteegden *et al.*, 1995). Fait intéressant, des molécules plus récentes, comme le formotérol, améliorent les propriétés morphologiques et fonctionnelles du muscle squelettique et du diaphragme chez des souris *mdx*, sans aucune augmentation de la fatigue (Harcourt *et al.*, 2007). Chez le patient humain atteint de DMD ou d'une dystrophie musculaire de Becker, l'administration de salbutamol (de 8 à 12 mg.jour<sup>-1</sup> pendant 12 ou 28 semaines) induit un modeste, mais néanmoins significatif gain de masse du muscle squelettique et de force





(Fowler *et al.*, 2004; Skura *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats laissent à penser que les  $\beta_2$ -agonistes peuvent être employés dans le traitement de la DMD.

#### **IV.4.2 La dystrophie musculaire fascioscapulohumérale**

La dystrophie musculaire fascioscapulohumérale (FSHD) est une atteinte héréditaire du muscle. Un traitement au salbutamol (16 ou 32 mg.jour<sup>-1</sup> pendant 23 semaines) d'une faible cohorte de patients atteints de FSHD augmente la masse musculaire, alors que la force musculaire reste inchangée (Kissel *et al.*, 1998; Kissel *et al.*, 2001). Néanmoins, la masse musculaire revient à sa valeur initiale lorsque le traitement est arrêté, suggérant qu'un tel traitement a un effet bénéfique transitoire. L'addition d'un programme d'entraînement en force ne montre pas d'effet synergique à l'administration du  $\beta_2$ -agoniste seul (van der Kooi *et al.*, 2004; van der Kooi *et al.*, 2007).

#### **IV.4.3 La myasthénie gravis et la myopathie congénitale à central core**

La myasthénie gravis est une maladie neuromusculaire auto-immune (des anticorps produits par l'organisme détruisent les récepteurs à l'acétylcholine) due à un défaut de transmission de l'influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire (Conti-Fine *et al.*, 2006). La myopathie congénitale à central core est causée par une mutation génétique du récepteur à la ryanodine (Quinlivan *et al.*, 2003). Ces deux pathologies sont caractérisées par une faiblesse musculaire et une fatigabilité importante. L'administration de terbutaline (2,5 mg.jour<sup>-1</sup> pendant 2 semaines) (Soliven *et al.*, 2009) ou de salbutamol (2 mg, 3 fois par jour) (Sadeh *et al.*, 2011) à des patients atteints de myasthénie gravis, en adjonction de la thérapie spécifique, augmente la force et la masse musculaire. De la même manière, le traitement au salbutamol (8 mg.kg<sup>-1</sup> pendant 3, 6 ou 12 mois) chez des patients atteints de la myopathie congénitale à central core ou à multi-minicores entraîne une augmentation de la masse musculaire (Messina *et al.*, 2004; Schreuder *et al.*, 2010). D'une façon importante, les capacités motrices, de langage et d'écriture sont également améliorées, suggérant que les  $\beta_2$ -agonistes pourraient aussi exercer une action centrale, en plus de leur action périphérique sur le muscle squelettique (Messina *et al.*, 2004; Schreuder *et al.*, 2010).

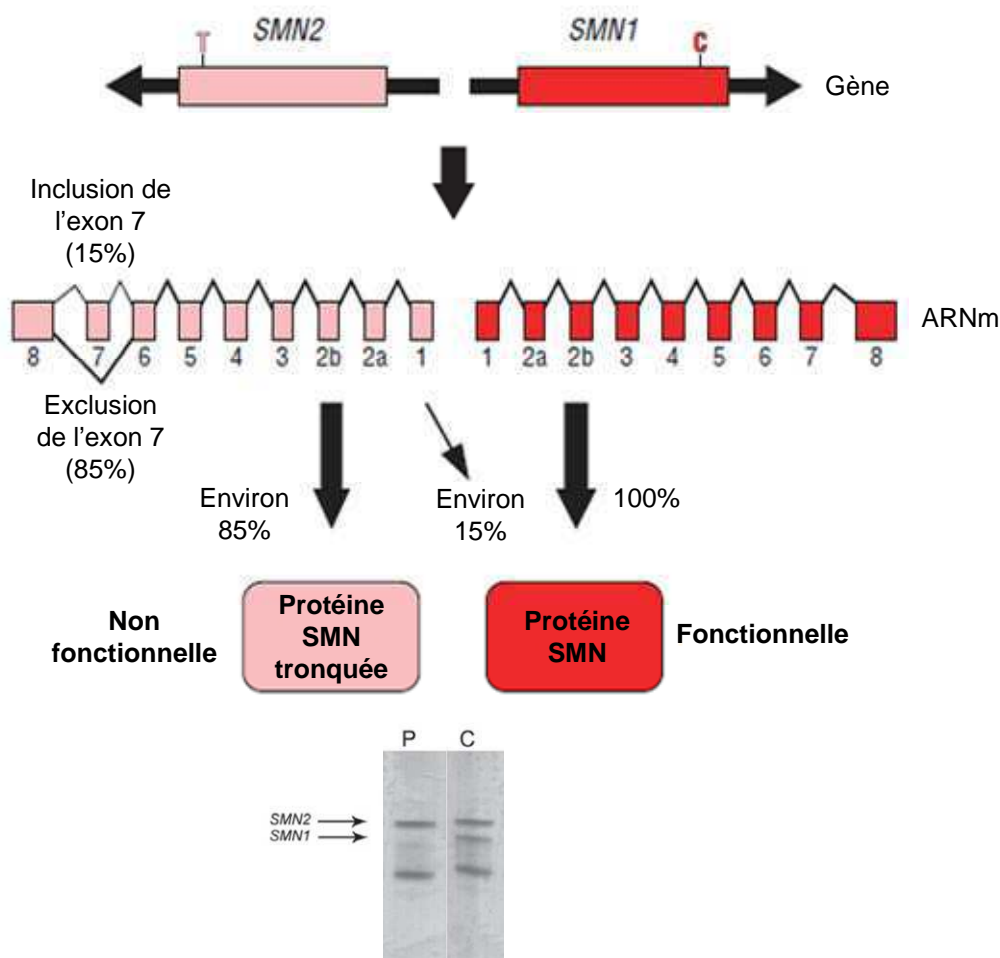


#### IV.4.4 La dystrophie musculaire congénitale avec déficit en mérosine

La dystrophie musculaire congénitale avec déficit en mérosine est d'origine génétique. Elle est due à une anomalie du gène codant pour la mérosine, une protéine constitutive de la matrice extracellulaire du muscle, qui intervient dans la protection et la réparation du muscle (Allamand & Guicheney, 2002). Le traitement au clenbutérol ( $2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  pendant 3 semaines) de souris *dy/dy*, un modèle de dystrophie musculaire congénitale avec déficit en mérosine, caractérisée par une mort prématurée, augmente la force et la masse musculaires (Hayes & Williams, 1998), tout comme l'espérance de vie des animaux. Une amélioration de la fonction respiratoire du diaphragme serait impliquée dans l'augmentation de la survie de l'animal (Hayes & Williams, 1998).

#### IV.4.5 Lésions médullaires et lésions du motoneurone

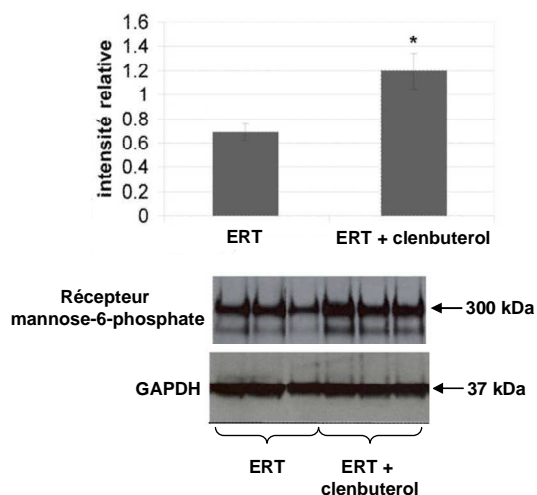
Des études réalisées sur divers modèles d'atteinte motoneuronale induisant une perte de masse musculaire (dénervation, lésion de la moëlle épinière) démontrent clairement un effet neurogénique des  $\beta_2$ -agonistes. La régénération des nerfs périphériques est stimulée par l'administration de clenbutérol, en association avec l'amélioration de la force et de la masse musculaires, ainsi que de la locomotion (Zeman *et al.*, 1999; Fitton *et al.*, 2001; Frerichs *et al.*, 2001; Zeman *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2010; Ung *et al.*, 2010). Dans un modèle de dégénérescence du motoneurone (souris *Mnd*), l'administration de clenbutérol augmente la régénération du motoneurone, améliore la fonction synaptique et retarde la perte de fonction du motoneurone (Zeman *et al.*, 2004; Zeman *et al.*, 2006). Des gains de masse musculaire et de force associés à un retard dans l'apparition de la maladie et à une augmentation de la longévité sont également observés dans le modèle murin de sclérose latérale amyotrophique à la suite d'un traitement au clenbutérol ( $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ) (Teng *et al.*, 2006). Un essai clinique réalisé sur 10 patients lésés au niveau de la moëlle épinière (en C5, C6 ou C7) montre que l'administration orale ( $80 \text{ mg.jour}^{-1}$  pendant 4 semaines) de métoprotérénol, un  $\beta_2$ -agoniste modérément sélectif, induit une augmentation significative de la force musculaire de l'avant-bras (Signorile *et al.*, 1995).



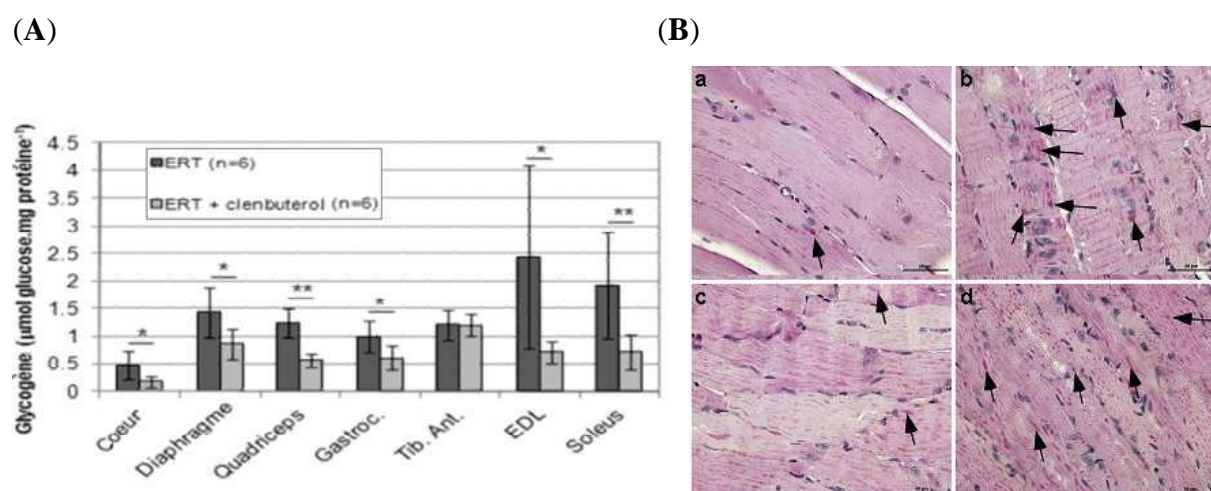
**Figure 19** : Représentation schématique du gène *SMN* (survival motor neuron). L'amplification par PCR de l'exon 7 du gène *SMN* montre la délétion du gène *SMN1* chez un patient atteint d'amyotrophie spinale (SMA). C = contrôle sain, P = patient SMA [modifié d'après (Zanoteli *et al.*, 2010; Kolb & Kissel, 2011)].

#### IV.4.6 L'amyotrophie spinale

L'amyotrophie spinale (SMA) est causée par une anomalie génétique du gène *SMN1* (survival motor neuron) qui code pour la protéine SMN, nécessaire à la survie du motoneurone (Lefebvre *et al.*, 1995). La diminution de l'abondance de cette protéine entraîne la mort des cellules neuronales, occasionnant ainsi une dégénérescence du muscle squelettique. Chez l'humain, 2 copies du gène *SMN* existent, *SMN1* et *SMN2*. La transcription du gène *SMN1* produit un ARNm qui code pour la protéine SMN complète. Le gène *SMN2* est identique au gène *SMN1* à une exception près : une base azotée cytosine (C) est remplacée par une base azotée thymine (T), provoquant une exclusion de l'exon 7 lors de la transcription (Lorson *et al.*, 1999). La protéine résultante, tronquée, est non fonctionnelle et rapidement dégradée. Néanmoins, l'exclusion de l'exon 7 de l'ARNm de *SMN2* n'est pas systématique et une petite fraction d'ARNm (15 %) code pour la protéine SMN normale. L'amyotrophie spinale (SMA) est causée par délétion ou mutation du gène *SMN1*, et les patients atteints de cette pathologie sont donc dépendants du gène *SMN2* pour produire la protéine SMN fonctionnelle (**Figure 19**). Un traitement au salbutamol ( $6 \text{ mg}\cdot\text{jour}^{-1}$ , de 3 à 6 mois) administré à de jeunes patients atteints de SMA augmente la force et la masse musculaire, sans manifestation d'effets secondaires (Kinali *et al.*, 2002; Pane *et al.*, 2008). Deux études ont démontré que le salbutamol augmentait le niveau en protéine SMN grâce à une augmentation rapide et significative du transcrit *SMN2* dans les fibroblastes des patients (Angelozzi *et al.*, 2008) et dans les leucocytes (Tiziano *et al.*, 2010), en promouvant l'inclusion de l'exon 7 dans le transcrit *SMN2*. De toute évidence, ces études fournissent de solides arguments pour explorer davantage l'efficacité clinique du salbutamol dans le traitement de patients atteints de SMA. Enfin, ces données montrent que les  $\beta_2$ -agonistes peuvent exercer un effet thérapeutique en modulant l'expression de gènes qui ne sont pas directement impliqués dans l'anabolisme du muscle squelettique.



**Figure 20** : Analyse par Western Blot du contenu protéique du récepteur mannose-6-phosphate dans le muscle *tibialis anterior* à la suite d'un traitement au clenbutérol. \* Significativement différent du groupe ERT (thérapie par remplacement de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase acide) [modifié d'après (Koeberl *et al.*, 2011)].



**Figure 21** : Contenu en glycogène dans différents muscles squelettiques de souris KO-GAA mâles (KO de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase acide, mimant la maladie de Pompe) après administration de clenbutérol. (A) Représentation graphique de la concentration en glycogène. (B) Marquage par coloration Periodic-acid Schiff du glycogène dans le diaphragme (a et b) après traitement au clenbutérol et ERT (a) ou après ERT seule (b) ; le *quadriceps* (c et d) après traitement au clenbutérol et ERT (c) ou après ERT seule (d). Les souris étaient traitées 4 fois par semaine avec de la GAA recombinante ( $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) (groupe ERT) et sacrifiées une semaine après la dernière injection. L'autre groupe recevait en plus du clenbutérol (groupe ERT + clenbutérol). \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,001$ , significativement différent du groupe ERT. EDL, *extensor digitorum longus* ; ERT, thérapie par remplacement de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase acide ; Gastroc., *gastrocnemius* ; Tib. Ant., *tibialis anterior* [modifié d'après (Koeberl *et al.*, 2011; Koeberl *et al.*, 2012)].

#### IV.4.7 La maladie de Pompe

La maladie de Pompe est caractérisée par une déficience de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase acide (également appelée maltase acide ou GAA), responsable de la dégradation du glycogène. Cette déficience entraîne une accumulation de glycogène dans les lysosomes causant ainsi une fatigue et des dommages musculaires (van der Ploeg & Reuser, 2008). Un traitement au salbutamol (de 8 à 12 mg.jour<sup>-1</sup> pendant un an) de patients atteints de la maladie de Pompe, en adjonction de la thérapie spécifique, augmente la force et la masse musculaires (Angelini *et al.*, 2004). De plus, le clenbutérol améliore l'efficacité de la thérapie par substitution de l'enzyme GAA, en augmentant l'expression du récepteur mannose-6-phosphate (**Figure 20**), qui permet une meilleure dégradation du glycogène par les lysosomes (**Figure 21**) (Koeberl *et al.*, 2011; Koeberl *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). Ceci contribuerait à une augmentation de la force musculaire (Koeberl *et al.*, 2011; Koeberl *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

### IV.5 Les pathologies chroniques et les pathologies associées à une perte à long-terme de la fonction musculaire

#### IV.5.1 La cachexie associée au cancer

La cachexie associée au cancer est un syndrome multifactoriel paranéoplasique menant à une réduction significative de la masse corporelle, due principalement à la perte du tissu adipeux et du muscle squelettique (Fearon *et al.*, 2012). Depuis les premières études menées en 1991 par Chance (Chance *et al.*, 1991a) et Stallion (Stallion *et al.*, 1991), de nombreux travaux ont examiné les effets des  $\beta_2$ -agonistes sur des modèles animaux de cachexie cancéreuse. Toutes ces études ont montré que les  $\beta_2$ -agonistes (cimatérol, clenbutérol, formotérol et salmétérol) atténuent et/ou inversaient la perte de masse musculaire (Hyltander *et al.*, 1993; Stallion *et al.*, 1993; Costelli *et al.*, 1995a; Stallion *et al.*, 1995; Carbo *et al.*, 1997; Busquets *et al.*, 2004; Fuster *et al.*, 2007), avec une amélioration de la fonction musculaire et des capacités d'exercice (Busquets *et al.*, 2011). Cependant, ces effets peuvent varier en fonction de la molécule administrée, le rétablissement le plus important étant observé avec le clenbutérol, comparé au salbutamol et au salmétérol





(Carbo *et al.*, 1997). Le clenbutérol peut également exercer un effet bénéfique en association avec d'autres agents anti-cancéreux comme la roxithromycine et le naproxène (Piffar *et al.*, 2003; Kenley *et al.*, 2008). De multiples mécanismes ont été identifiés comme pouvant contribuer à l'effet anti-cachectique des  $\beta_2$ -agonistes dans le traitement de la cachexie associée au cancer : *i*) une diminution de la dégradation protéique dans le muscle squelettique (Stallion *et al.*, 1991; Costelli *et al.*, 1995a; Busquets *et al.*, 2004) et une augmentation de la synthèse protéique (Stallion *et al.*, 1995; Busquets *et al.*, 2004), *ii*) une diminution des acides aminés comme source de production d'énergie par le muscle squelettique (Costelli *et al.*, 1995b), *iii*) une réduction de l'apoptose du muscle squelettique (Busquets *et al.*, 2004), *iv*) une régulation négative du contenu protéique en myostatine et de l'expression du *récepteur à l'activine B* (ActRIIB) (Busquets *et al.*, 2012), en association avec une augmentation de l'expression de la *follistatine* (Busquets *et al.*, 2012).

#### **IV.5.2 L'insuffisance cardiaque chronique**

La perte de masse musculaire est un facteur fréquent de co-morbidité chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque et contribue à réduire la capacité d'exercice et la force musculaire (Fulster *et al.*, 2013). Le traitement de patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique avec des  $\beta_2$ -agonistes (clenbutérol, salbutamol) a conduit à des résultats mitigés. Un traitement de 3 semaines au salbutamol augmente la force du muscle respiratoire chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique (Harrington *et al.*, 2000), mais ne minimise pas les anomalies du *quadriceps* ni n'augmente la capacité d'exercice. A l'inverse, une autre étude a suggéré que l'administration de clenbutérol chez des patients menait à une augmentation de la masse maigre et une augmentation de la force maximale (Kamalakkannan *et al.*, 2008). Cependant, l'endurance et la durée d'exercice diminuaient après l'administration de clenbutérol (Kamalakkannan *et al.*, 2008). Ainsi, l'utilisation de  $\beta_2$ -agonistes dans le traitement de l'insuffisance cardiaque doit être considérée avec précaution, en raison des bénéfices limités sur le muscle squelettique et des effets négatifs reportés sur le muscle cardiaque (voir ci-dessus III.5.).

#### **IV.5.3 L'accident vasculaire cérébral**

L'hémiplégie, la séquelle la plus répandue après un accident vasculaire cérébral, est associée à une atrophie des muscles squelettiques hémiplégiques (English *et al.*, 2010).



L'administration de clenbutérol a une activité neuroprotectrice contre l'ischémie cérébrale (Culmsee *et al.*, 1999; Culmsee *et al.*, 2004). Paradoxalement, l'inhibition de la voie de signalisation induite par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (en utilisant des antagonistes aux récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques ou des souris KO aux récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques) réduit également les atteintes cérébrales post-ischémiques (Han *et al.*, 2009). Ainsi, l'utilisation de  $\beta_2$ -agonistes comme stratégie neuroprotectrice n'est pas complètement résolue et reste matière à débat. A notre connaissance, les effets de l'administration de  $\beta_2$ -agonistes sur l'atrophie du muscle squelettique hémiparétique n'ont, à ce jour, jamais été documentés dans un modèle animal d'accident vasculaire cérébral.

#### **IV.5.4 La bronchopneumopathie obstructive chronique**

Des dysfonctionnements du muscle squelettique apparaissent souvent chez des patients atteints de bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO), affectant ainsi leur qualité de vie et risquant même d'augmenter leur mortalité (Marquis *et al.*, 2002). L'utilisation des  $\beta_2$ -agonistes pour le traitement de patients atteints de BPCO est très largement répandue. Tirer partie de cette thérapie pour augmenter la masse musculaire serait d'un grand intérêt clinique. Cependant, les données sur ce sujet restent limitées, et suggèrent que l'administration de  $\beta_2$ -agonistes à des patients BPCO induit une meilleure tolérance à l'effort (D'Agostino *et al.*, 2010). Les effets sur le muscle squelettique d'un traitement à long terme de  $\beta_2$ -agonistes restent à déterminer chez des patients BPCO.

#### **IV.5.5 Le sepsis**

Le sepsis correspond à un état inflammatoire systémique causé par des infections sévères. Il est associé à une perte importante de masse musculaire. L'atrophie est compensée par l'administration de clenbutérol, avec une récupération complète de la masse du muscle *gastrocnemius* de rat cinq jours après inoculation d'endotoxine (Choo *et al.*, 1989). Plusieurs tentatives ont été menées pour vérifier l'implication des  $\beta_2$ -agonistes dans ces conditions de perte musculaire. Ainsi, l'administration d'IBMX, un inhibiteur des phosphodiésterases qui augmente la concentration en AMPc, réduit la dégradation protéique dans le muscle squelettique d'animaux ayant un sepsis, alors que le H89, un inhibiteur de PKA, bloque complètement l'effet antiprotéolytique de l'IBMX (Lira *et al.*, 2007). Le sepsis peut également induire des dysfonctionnements au niveau du diaphragme, ce qui risquerait



d'entraîner des insuffisances respiratoires. La terbutaline limite ces effets délétères du sepsis sur le diaphragme chez le rat (Ito *et al.*, 2006).

#### **IV.5.6 La lésion musculaire liée à la température (brûlure, hyperthermie)**

L'élévation de la température corporelle, observée dans de nombreuses pathologies (hyperthermie maligne et sepsis), augmente la protéolyse du muscle squelettique (Hall-Angeras *et al.*, 1990; Luo *et al.*, 2000; Ametller *et al.*, 2011). L'addition de formotérol réduit significativement la dégradation protéique induite par l'hyperthermie sans affecter la synthèse protéique (Ametller *et al.*, 2011). Cependant, la pertinence physiologique de cet effet anti-catabolique doit être considérée avec précautions car les  $\beta_2$ -agonistes exercent un effet thermogénique (production de chaleur) (Mogilnicka *et al.*, 1985; Cartana & Stock, 1995).

Les brûlures sévères induisent une réponse catabolique soutenue qui cause la perte à long terme de la force et de la masse musculaires (Hart *et al.*, 2000). Dans un modèle animal de brûlure sévère, l'administration de clenbutérol est capable de restaurer la dépense d'énergie et d'améliorer le gain de poids corporel, la masse musculaire et le contenu protéique du muscle squelettique (Chance *et al.*, 1991b; Martineau *et al.*, 1993; Hollyoak *et al.*, 1995).

**Au regard de l'augmentation de la masse musculaire induite par les  $\beta_2$ -agonistes, l'usage de ces derniers dans le traitement des pathologies associées à la perte de masse musculaire est d'un grand intérêt. D'une façon intéressante, les  $\beta_2$ -agonistes peuvent également exercer un effet thérapeutique en modulant l'expression de gènes qui ne sont pas directement impliqués dans l'anabolisme du muscle squelettique. Compte tenu de l'effet des  $\beta_2$ -agonistes sur la régulation de la masse musculaire, il est tout naturel de se questionner de leurs effets sur la performance chez des sujets sains.**



## V. La performance musculaire et les $\beta_2$ -agonistes

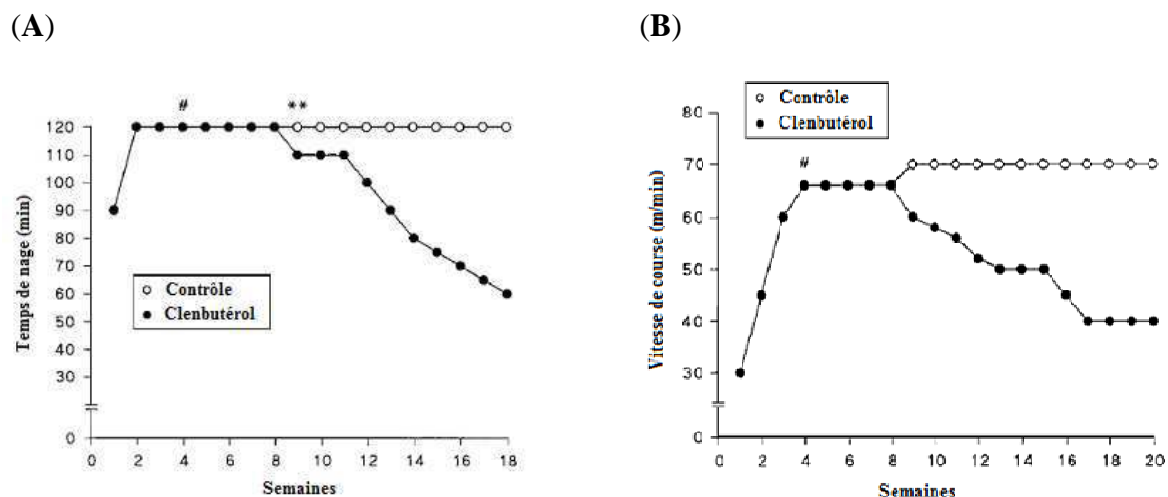
De nombreuses études se sont intéressées aux effets de l'administration de  $\beta_2$ -agonistes sur la performance à l'exercice. Ces dernières seront discutées dans ce chapitre.

### V.1 La force musculaire et l'endurance chez l'animal

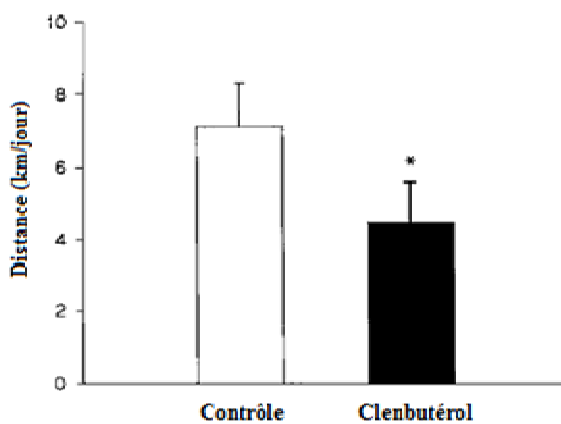
#### V.1.1 La force musculaire

En accord avec l'augmentation de la masse musculaire, l'administration de  $\beta_2$ -agonistes (formotérol et clenbutérol) augmentait la force musculaire absolue de 12 à 20 % dans les muscles *extensor digitorum longus* et *soleus* de souris, en conditions isométriques (Lynch *et al.*, 1999; Harcourt *et al.*, 2007) et de rats traités au fénotérol (Beitzel *et al.*, 2004). D'une manière intéressante, cette augmentation de la force musculaire persistait plusieurs semaines après l'arrêt du traitement (Ryall *et al.*, 2007). Cependant, la force spécifique restait inchangée, suggérant que la production de force en réponse à l'administration de  $\beta_2$ -agoniste était principalement due à l'augmentation de la masse musculaire (Hayes & Williams, 1998; Lynch *et al.*, 1999; Beitzel *et al.*, 2004; Harcourt *et al.*, 2007). De plus, une accumulation de dépôt de collagène (protéine non contractile) dans le périnysium du muscle *gastrocnemius* (Kumar & Sharma, 2006; Patiyal & Katoch, 2006), qui altère les propriétés mécaniques de la fibre musculaire, est observée. Nous notons également une accumulation de collagène autour des vaisseaux sanguins (Kumar & Sharma, 2006), une diminution de la densité capillaire (Suzuki *et al.*, 1997) et une diminution du flux sanguin (Rothwell *et al.*, 1987; Beitzel *et al.*, 2004). Ceci augmenterait la distance de diffusion de l'oxygène, réduirait l'apport d'oxygène au tissu musculaire et la résistance à la fatigue lors de contraction prolongée.





**Figure 22 :** Effet du clenbutérol sur le temps de nage (A) et sur la vitesse de course (B) de rats mâles. L'administration de clenbutérol à la quatrième semaine est représentée par #. La diminution significative du temps de nage est représentée par \*\* [modifié d'après (Duncan *et al.*, 2000)].



**Figure 23 :** Effet du clenbutérol sur la distance parcourue par jour lors d'un exercice volontaire de course réalisé par des rats mâles. \* $p < 0,05$  significativement différent du groupe Contrôle [modifié d'après (Duncan *et al.*, 2000)].

### V.1.2 L'endurance

Pour analyser l'effet des  $\beta_2$ -agonistes sur l'endurance, des rats ont réalisé, soit un programme de 20 semaines de sprint sur tapis motorisé (70 m.min<sup>-1</sup> avec une inclinaison de 15°), soit un protocole de 18 semaines de nage (5 jours.semaine<sup>-1</sup>), soit un programme volontaire, de 16 semaines de course sur roue d'exercice. Les rats traités au clenbutérol (2 mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup>) étaient incapables de compléter les protocoles de natation et de sprint (**Figure 22**) (Duncan *et al.*, 2000). De plus, les rats traités couraient sur une distance moindre (-57 %) que les rats non traités au  $\beta_2$ -agoniste, lors de l'exercice volontaire (**Figure 23**). De la même manière, il a été observé, chez la souris, une diminution de 60 % du temps de course et une diminution de la performance (-58 %) après l'administration de clenbutérol (Ingalls *et al.*, 1996). La transition de fibres lentes vers les fibres rapides, caractéristique de l'administration de  $\beta_2$ -agonistes (Chapitre III.6.), contribuerait à la diminution de la capacité des animaux lors d'exercices d'endurance (Ingalls *et al.*, 1996; Duncan *et al.*, 2000). Une diminution des activités enzymatiques oxydatives, telle que celle de la succinate déshydrogénase (Suzuki *et al.*, 1997), en présence de clenbutérol, pourrait aussi contribuer à réduire la performance musculaire lors d'exercices. Enfin, en l'absence de stimulation  $\beta_2$ -adrénergique, il apparaît qu'une période d'entraînement prolongée induirait, à elle seule, une baisse de l'activité adrénergique. En effet, 12 semaines d'entraînement induisent une diminution de la densité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, de l'activité de l'adénylate cyclase et du contenu membranaire des protéines  $G\alpha_s$  dans le muscle *gastrocnemius* de rat (Nieto *et al.*, 1997). En outre, la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique, du muscle *gastrocnemius* de rat, par le clenbutérol, induit une augmentation plus importante de la masse du muscle dans le groupe contrôle que dans le groupe entraîné (Murphy *et al.*, 1996), suggérant qu'un entraînement en endurance limiterait les effets musculaires induits par le  $\beta_2$ -agoniste.

**Tableau 3** : Effet de l'inhalation de  $\beta_2$ -agonistes sur la performance chez des sujets sains non-asthmatiques [modifié d'après (Wolfarth *et al.*, 2010; Pluim *et al.*, 2011)]

Substance	Dose (en $\mu\text{g}$ )	Nombre et sexe des sujets	Caractéristiques des sujets	Paramètres mesurés	Résultats	Référence
Formotérol	12	10 ♂	Athlètes Elite	$\text{VO}_{2\text{max}}$ ( $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) Puissance maximale (W)	67,5 → 66,5 885 ↔	(Stewart <i>et al.</i> , 2002)
Salbutamol	200	17 ♂	Athlètes Elite (sport de force)	Puissance maximale ( $\text{W.kg}^{-1}$ ) Travail total ( $\text{J.kg}^{-1}$ )	18,51 → 18,63 150,05 → 151,99	(Morton <i>et al.</i> , 1993)
Salbutamol	360	8 ♂ 7 ♀	Athlètes amateurs	Puissance maximale (W) Travail total (J)	858,3 ↗ 886,6 (+3%) 10,9 → 11,1	(Signorile <i>et al.</i> , 1992)
Salbutamol	400	15 ♂	Cyclistes Elite	Puissance maximale (W) $\text{VO}_{2\text{max}}$ ( $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) Temps sur 20 km (min)	798 → 803 63,6 → 63,1 35,02 → 34,82	(Norris <i>et al.</i> , 1996)
Salbutamol	400	10 ♂	Athlètes Elite	$\text{VO}_{2\text{max}}$ ( $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) Puissance maximale (W)	67,5 → 67,8 885 → 877	(Stewart <i>et al.</i> , 2002)
Salbutamol	800	16 ♂	Cyclistes et triathlètes Elite	Temps d'endurance (70% $\text{W}_{\text{max}}$ ) (sec)	3927,6 ↗ 4010,2 (+2% au contre la montre)	(van Baak <i>et al.</i> , 2004)
Salbutamol	800	18 ♂	Coueurs de longue distance, biathlètes, fondeurs Elite	$\text{VO}_{2\text{max}}$ ( $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) Temps de course jusqu'à épuisement (85% $\text{VO}_{2\text{max}}$ ) (sec)	73,9 → 73,8 246,6 → 234,6	(Carlsen <i>et al.</i> , 1997)
Salbutamol	200 800	12 ♂	Triathlètes Elite	Temps d'endurance (85% $\text{VO}_{2\text{max}}$ ) (sec)	1398 → 1411 1398 → 1260	(Goubault <i>et al.</i> , 2001)
Salbutamol	200 800	11 ♂	Triathlètes, cyclistes, coueurs de longue distance	Nombre total de contractions submaximales du quadriceps avant épuisement	72 ↗ 78 (+8%) 72 ↗ 82 (+14%)	(Decorte <i>et al.</i> , 2013)
Salbutamol	8000	9 ♂	Triathlètes, cyclistes, footballeurs	Puissance maximale (W) $\text{VO}_{2\text{max}}$ ( $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )	406 → 409 66 ↔	(Elers <i>et al.</i> , 2012)
Salmétérol	42	11 ♂	Cyclistes Elite	Puissance maximale (W) Travail total (J)	1050,73 → 1052,27 23093 → 23595	(McDowell <i>et al.</i> , 1997)
Salmétérol	50	16 ♂	Cyclistes et triathlètes Elite	Puissance maximale (W) Travail total (J)	1219,8 → 1208,9 10412 → 10381	(Morton <i>et al.</i> , 1996)
Salmétérol	50	8 ♂	Fondeurs Elite (environnement à -15°C)	$\text{VO}_{2\text{max}}$ ( $\text{L.min}^{-1}$ )	5,7 ↔	(Sue-Chu <i>et al.</i> , 1999)
Salmétérol	50	18 ♂	Coueurs de longue distance, biathlètes, fondeurs Elite	$\text{VO}_{2\text{max}}$ ( $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) Temps de course jusqu'à épuisement (85% $\text{VO}_{2\text{max}}$ ) (sec)	73,9 → 74,0 246,6 → 235,2	(Carlsen <i>et al.</i> , 1997)

$\text{VO}_{2\text{max}}$ , consommation maximale aérobie ; ♀, femme ; ♂, homme ; →, pas de modifications significatives ; ↔ valeur identique avant et après traitement ; ↗, augmentation.

## V.2 Effets de l'inhalation et de l'administration orale de $\beta_2$ -agonistes sur la force musculaire et l'endurance chez l'humain

### V.2.1 Inhalation des $\beta_2$ -agonistes

Des études randomisées en double aveugle chez des athlètes hommes et femmes ont été menées pour déterminer les effets ergogéniques de l'inhalation de  $\beta_2$ -agonistes sur la performance. L'ensemble de ces études est représenté dans le **Tableau 3**. Certaines études, dont l'une comprenant parmi sa cohorte des sportifs amateurs, ont montré, à ce jour, une augmentation significative (+3 %) de la puissance musculaire (Signorile *et al.*, 1992), du temps de course (+2 %) (van Baak *et al.*, 2004) et de l'endurance du *quadriceps* (Decorte *et al.*, 2013). Ces trois études sont les seules, à ce jour, à démontrer un effet positif de l'inhalation de salbutamol sur la performance chez l'athlète. D'une façon générale, les études réalisées s'accordent pour dire que l'utilisation de salbutamol, inhalé à des doses thérapeutiques (200  $\mu\text{g}$ ) (Morton *et al.*, 1993; Goubault *et al.*, 2001), ou 2 (Norris *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 2002), ou 4 (Carlsen *et al.*, 1997; Goubault *et al.*, 2001) voire 40 (Elers *et al.*, 2012) fois supérieures à cette dose n'entraîne pas, chez des athlètes d'endurance et de force Elite, de modification de la performance. De la même manière, l'inhalation de formotérol (Carlsen *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2002) et de salmétérol (Morton *et al.*, 1996; Carlsen *et al.*, 1997; McDowell *et al.*, 1997) n'ont pas d'effet sur la performance physique. En conditions extrêmes, lorsque l'organisme est exposé à des températures de  $-10^\circ\text{C}$ ,  $-15^\circ\text{C}$  et  $-20^\circ\text{C}$ , l'inhalation de  $\beta_2$ -agonistes n'a pas d'effet sur la capacité aérobie (Sue-Chu *et al.*, 1999; Tjorhom *et al.*, 2007). Enfin, une seule étude a décrit une diminution du temps avant l'épuisement des sujets après un traitement à dose thérapeutique au salbutamol (Heir & Stemshaug, 1995). Ainsi, au vu de la littérature, et malgré quelques études contradictoires, l'inhalation de  $\beta_2$ -agonistes ne semble pas avoir d'effets bénéfiques majeurs sur la performance.

**Tableau 4** : Effet de la prise orale de  $\beta_2$ -agonistes sur la performance chez des sujets sains non-asthmatiques [modifié d'après (Collomp *et al.*, 2010; Pluim *et al.*, 2011)].

Substance	Population	Dose	Performance	Lactate sanguin	Glucose sanguin	Acides gras libres	Index de fatigue	Référence
Salbutamol	Sport de loisir	4 mg (dose unique)	Force musculaire ↗, endurance ↗, débit expiratoire ↗	↗		=		(van Baak <i>et al.</i> , 2000)
Salbutamol	Sport de loisir	4 mg (dose unique)	Puissance moyenne et maximale ↗	=	↗		=	(Collomp <i>et al.</i> , 2005)
Salbutamol	Sport de loisir	6 mg (dose unique)	Endurance ↗	↗	↗	↗		(Collomp <i>et al.</i> , 2000a)
Salbutamol	Sport de loisir	6 mg (dose unique)	Puissance moyenne =					(Collomp <i>et al.</i> , 2002)
Salbutamol	Sport de loisir	6 mg (dose unique)	Force musculaire =				=	(Crivelli <i>et al.</i> , 2011)
Salbutamol	Sport de loisir	6 mg (dose unique)	Puissance développée ↗	↗	↗			(Sanchez <i>et al.</i> , 2012b)
Salbutamol	Sport de loisir	12 mg.j <sup>-1</sup> pendant 3 semaines	Endurance ↗	=	↘	↗		(Collomp <i>et al.</i> , 2000b)
Salbutamol	Sédentaires/entraînés en force	12 mg.j <sup>-1</sup> pendant 3 semaines	Puissance max ↗	↗			=	(Le Panse <i>et al.</i> , 2005)
Salbutamol	Sport de loisir	12 mg.j <sup>-1</sup> pendant 3 semaines	Puissance développée ↗	↗	=			(Sanchez <i>et al.</i> , 2012b)
Salbutamol	Sédentaires/sport de loisir	12 mg.j <sup>-1</sup> pendant 4 semaines	Puissance maximale ↗	↗			=	(Le Panse <i>et al.</i> , 2006)
Salbutamol	Entraînés en résistance	16 mg.j <sup>-1</sup> pendant 2 semaines	Force musculaire ↗					(Caruso <i>et al.</i> , 2005)
Salbutamol	bonne santé	16 mg.j <sup>-1</sup> pendant 3 semaines	Force musculaire ↗					(Martineau <i>et al.</i> , 1992)
Salbutamol	Entraînés en résistance	16 mg.j <sup>-1</sup> pendant 6 semaines	Force musculaire ↗					(Caruso <i>et al.</i> , 1995)
Terbutaline	Sport de loisir	8 mg (dose unique)	Force maximale ↘, endurance =					(Sanchez <i>et al.</i> , 2012a)

↗ augmentation ; ↘ diminution ; = pas de modification

### V.2.2 Administration orale des $\beta_2$ -agonistes

Contrairement à l'inhalation, la prise orale de salbutamol par des personnes non asthmatiques, pratiquant ou non régulièrement des sports d'endurance (cyclisme, course de longue distance), améliore la force musculaire (Martineau *et al.*, 1992; Caruso *et al.*, 1995; van Baak *et al.*, 2000), la puissance anaérobie maximale (Le Panse *et al.*, 2005), la puissance développée (Sanchez *et al.*, 2012b), ainsi que l'endurance (Collomp *et al.*, 2000a; Collomp *et al.*, 2000b; van Baak *et al.*, 2000). De plus, le salbutamol pris oralement n'induit pas une fatigue musculaire à l'effort (Collomp *et al.*, 2005; Le Panse *et al.*, 2005; Crivelli *et al.*, 2011). Cet agent semble donc avoir un effet ergogénique contrairement à la terbutaline qui diminue la force maximale et n'a pas d'effet sur l'endurance (Sanchez *et al.*, 2012a) (**Tableau 4**). Enfin, il semblerait qu'un traitement en aigu (6 mg) au salbutamol produise un effet sur la performance plus important qu'un traitement prolongé (12 mg.jour<sup>-1</sup> pendant 3 semaines) (Sanchez *et al.*, 2012b). Ainsi, comparée au traitement en aigu, la performance, plus faible, observée avec un traitement prolongé au  $\beta_2$ -agoniste, impliquerait très certainement une désensibilisation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, menant à une baisse de la performance. Etant donné qu'aucune étude menée chez des sujets sains n'a montré un quelconque effet anabolisant du salbutamol, la théorie selon laquelle l'effet du  $\beta_2$ -agoniste sur la performance résulterait de ses propriétés anaboliques peut être exclue. Des effets centraux et périphériques peuvent être suggérés pour expliquer l'augmentation de la performance sans augmentation de la masse musculaire après stimulation  $\beta_2$ -adrénergique chez l'humain. Ainsi, il a été proposé que le salbutamol induisait une augmentation de la performance en stimulant le système nerveux central (SNC) (Collomp *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que l'injection de salbutamol ou de clenbutérol exerçait un rôle central en augmentant la concentration du tryptophane (Hallberg *et al.*, 1981; Lenard *et al.*, 2003), du 5-hydroxytryptophane (le précurseur de la sérotonine) (Hallberg *et al.*, 1981; Waldmeier, 1981) et de la sérotonine (Waldmeier, 1981) dans diverses aires du cerveau de rat et de souris. Or, une augmentation de la concentration en sérotonine est suspectée d'induire une fatigue centrale (Davis *et al.*, 2000), ce qui pourrait jouer un rôle sur la performance. Récemment, un élément de réponse a été apporté et décrit que la prise orale, en aigu, de salbutamol ne modifie pas la commande centrale (Crivelli *et al.*, 2011). Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats. D'autres travaux suggèrent que les  $\beta_2$ -agonistes pourraient agir sur la performance en permettant un relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  dû à la phosphorylation, par PKA, du récepteur à la ryanodine du réticulum endoplasmique (Andersson *et al.*, 2012). Enfin, une



augmentation du recrutement d'unités motrices pourrait être impliquée dans l'effet ergogénique du salbutamol, comme cela a été suggéré par Martineau *et al.* (1992).

**En conclusion, malgré quelques études contradictoires, il semblerait que l'inhalation de  $\beta_2$ -agonistes n'induit pas d'effets notables sur la performance d'athlètes non-asthmatiques. A l'inverse, certaines études ont montré un effet bénéfique de la prise orale de  $\beta_2$ -agonistes chez des sujets sains. Cependant, ces études ne concernent que le salbutamol. Pour l'heure, il n'y a aucune évidence d'un quelconque effet anabolique des  $\beta_2$ -agonistes (par inhalation ou prise orale) chez des patients/sujets asthmatiques ou non sans une optique de dopage. Néanmoins, l'utilisation de  $\beta_2$ -agonistes en clinique ou dans le cadre d'une pratique dopante n'est pas sans effets secondaires.**





## VI. Effets délétères liés à la prise de $\beta_2$ -agonistes

Le clenbutérol est un médicament vétérinaire autorisé aux Etats-Unis et en France sous le nom de Ventipulmin. Ce  $\beta_2$ -agoniste, soumis à une prescription médicale obligatoire, est indiqué dans le traitement de pathologies respiratoires chez le cheval ( $0,8-3,2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 2 fois par jour) (Drug Enforcement Administration, 2011). Néanmoins, le clenbutérol est autorisé dans le traitement du spasme bronchique chez l'humain, dans différents pays d'Europe (Allemagne, Autriche, Espagne, Grèce, Italie, Portugal, République Tchèque), d'Amérique du Sud (Mexique) et d'Asie. Dans ces cas, la dose recommandée de clenbutérol pour un patient asthmatique est de 20 à 40  $\mu\text{g}$  pris oralement deux fois par jour, ou 20  $\mu\text{g}$  par inhalation (3 fois par jour, doses prises à 8 heures d'intervalles). Les autres  $\beta_2$ -agonistes, le formotérol, le salbutamol et l'indacatérol inhalés sont approuvés/prescrits dans le traitement de l'asthme.

### VI.1 Limitation à l'usage des $\beta_2$ -agonistes

L'utilisation de  $\beta_2$ -agonistes en clinique ou dans le cadre d'une pratique dopante n'est pas sans effets secondaires qui limitent ainsi leur prescription. Les manifestations cliniques, rapportées à la suite de la prise de  $\beta_2$ -agonistes, associent à des degrés divers une tachycardie, des tremblements, des palpitations, des vomissements, une hypersudation, des céphalées, de l'anxiété, une hyperglycémie, une hyperthermie, des myalgies (Anderson & Wilkins, 1977; Comité de coordination de toxicovigilance, 2010). Le muscle cardiaque est un des tissus les plus touchés par l'administration de  $\beta_2$ -agonistes, comme l'atteste le chapitre III.5 de ce manuscrit. Ainsi, une hypertrophie cardiaque et une infiltration de collagène dans les parois du ventricule gauche, associée à la réduction de la pression du ventricule gauche sont fréquemment décrites dans la littérature (Carbo *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1999; Sneddon *et al.*, 2000; Burniston *et al.*, 2002; Ryall *et al.*, 2002; Sleeper *et al.*, 2002; Busquets *et al.*, 2004; Ryall *et al.*, 2004; Ryall *et al.*, 2006). Néanmoins, ces constatations ne sont pas systématiques (Carbo *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1998; Soppa *et al.*, 2005; Ryall *et al.*, 2006) et les différences dans les résultats obtenus des études proviennent essentiellement du  $\beta_2$ -agoniste utilisé, de la dose administrée, ainsi que de la durée du traitement. D'une manière remarquable, l'hypertrophie cardiaque, induite par les  $\beta_2$ -agonistes, est entièrement réversible après cessation du traitement chez le rat (Cartana *et al.*, 1994; Ryall *et al.*, 2007). Il convient également de mentionner que l'hypertrophie cardiaque, associée à l'administration de



$\beta_2$ -agonistes, peut atténuer l'atrophie des myocytes associée à des dispositifs d'assistance du ventricule gauche, et conférer ainsi des bénéfices physiologiques (Soppa *et al.*, 2005). Dans le muscle squelettique, il a été décrit, non seulement une accumulation de collagène dans le muscle *gastrocnemius* (Kumar & Sharma, 2006; Patiyal & Katoch, 2006), qui altère les propriétés contractiles de la fibre musculaire, mais également de l'apopto-nécrose dans le muscle *soleus*, suggérant un remodelage de la fibre musculaire en présence de clenbutérol (Douillard *et al.*, 2011). Bien que les  $\beta_2$ -agonistes augmentent la masse musculaire, il est à noter l'effet négatif de ces agents sur l'endurance chez l'animal (Ingalls *et al.*, 1996; Duncan *et al.*, 2000). Un autre effet adverse décrit chez l'animal, lors de l'administration de  $\beta_2$ -agonistes, est l'augmentation de la fatigabilité musculaire (Dupont-Versteegden *et al.*, 1995; Ryall *et al.*, 2004). En revanche, il semblerait que les  $\beta_2$ -agonistes n'affectent pas la fatigabilité chez l'humain (Collomp *et al.*, 2005; Le Panse *et al.*, 2005; Crivelli *et al.*, 2011). Enfin, aucune augmentation de la fatigue n'a été reportée en présence de formotérol chez l'animal (Harcourt *et al.*, 2007) et de salbutamol chez l'humain (Fowler *et al.*, 2004), soulignant l'intérêt du développement de molécules de nouvelle génération. En conclusion, l'utilisation des  $\beta_2$ -agonistes pour le traitement de la perte de masse musculaire doit faire appel au préalable à une analyse détaillée du rapport bénéfice/risque.

## VI.2 Prise involontaire de $\beta_2$ -agonistes et intoxication alimentaire

Dans de nombreux pays, le clenbutérol est illégalement utilisé dans les élevages bovins, le but étant d'avoir une plus grande masse musculaire et une diminution de la masse grasse (voir chapitre III). Néanmoins, la viande tend à être plus dure à la suite d'un traitement aux  $\beta_2$ -agonistes, l'augmentation du tissu conjonctif fibreux et du collagène diminuant sa tendreté (Luno *et al.*, 1999). Cependant, l'administration de clenbutérol aux animaux d'élevage, entraîne l'accumulation de résidus de clenbutérol dans la viande destinée à la consommation humaine (Pleadin *et al.*, 2010), causant un nombre important d'intoxications. Dans les années 1990, l'émergence de nombreux cas d'empoisonnement alimentaire dus au clenbutérol chez l'humain, à la suite d'une consommation de foie de veau ou de bœuf, a mis en lumière ce problème. Au Mexique, en 2006, une large étude, impliquant 9 villes du pays, a montré que 17 % de la viande analysée était positive au clenbutérol (Pena Betancurt *et al.*, 2008), bien que cette substance soit interdite dans les élevages. L'analyse de la viande dans un état au Nord du Mexique a montré que 76 % de la viande était contaminée par de faibles



doses de clenbutérol, comprises entre 0,1 et 6,12  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Estrada-Montoya *et al.*, 2008). En 2010, une équipe d'athlètes Allemands de retour de leur compétition en Chine a été contrôlée avec de faibles quantités ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de clenbutérol dans les urines. Cette découverte a mis en lumière la possibilité d'une prise non intentionnelle/involontaire de clenbutérol par l'alimentation. Pour vérifier ces observations, 28 volontaires Allemands, préalablement testés négatifs au  $\beta_2$ -agoniste, ont été envoyés en Chine. A leur retour, 22 (soit 79 % de la totalité des volontaires) présentaient des traces de clenbutérol dans leurs urines. Seuls 6 volontaires dont 1 végétarien ne présentaient pas de trace de clenbutérol. Ceci montre clairement un problème de contamination générale de la viande, et ceci malgré l'interdiction de l'utilisation de clenbutérol pour le bétail (Guddat *et al.*, 2012). Néanmoins, les échantillons analysés dans ces études présentaient des concentrations très faibles par rapport à celles reportées dans des cas d'empoisonnement décrits dans certains pays (Martinez-Navarro, 1990; Pulce *et al.*, 1991; Salleras *et al.*, 1995; Brambilla *et al.*, 1997; Sporano *et al.*, 1998). En revanche, la contamination de la viande par le clenbutérol pourrait avoir une incidence sur la santé du consommateur, et pourrait être une source de risque de contrôle anti-dopage positif, par inadvertance, dans le sport (Guddat *et al.*, 2012). Cet argument a été très récemment exposé par le cycliste professionnel, Alberto Contador, qui a fait valoir que la présence de clenbutérol dans ses urines, lors d'un contrôle antidopage réalisé sur le Tour de France 2010, était due à l'ingestion de viande contaminée. De l'avis du Tribunal Arbitral du Sport, et sur la base des preuves produites, la présence de clenbutérol a été plus vraisemblablement causée par l'ingestion de suppléments nutritifs contaminés. Alberto Contador a donc été reconnu coupable d'une infraction de dopage par le Tribunal Arbitral du Sport et suspendu pour une durée de deux ans (Tribunal Arbitral du Sport, 2012).

Les expositions accidentelles, liées à une prise involontaire, au clenbutérol restent minoritaires. Moins d'un cas sur cinq est lié à ce type d'exposition ; les autres cas étant liés à une exposition volontaire au clenbutérol (Comité de coordination de toxicovigilance, 2010). Environ 40 % des expositions volontaires sont attribuables au mésusage du clenbutérol lors d'une pratique dopante (Comité de coordination de toxicovigilance, 2010).



### VI.3 Usage abusif des $\beta_2$ -agonistes par les athlètes

Les  $\beta_2$ -agonistes, pris en quantités supérieures aux doses thérapeutiques, ont un effet anabolisant sur le muscle qui a été clairement démontré *in vivo* chez l'animal (Dalrymple *et al.*, 1984; Emery *et al.*, 1984; Beermann *et al.*, 1987; Bohorov *et al.*, 1987; Eisemann *et al.*, 1988; Zeman *et al.*, 1988). Bien qu'il soit très difficile de comparer les doses effectives chez le rat avec celles utilisées chez l'humain, certains auteurs ont tenté de transposer les doses de l'animal à l'humain. Il a donc été suggéré que la dose de  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  administrée au rat correspondait à une dose non toxique de  $1.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  chez l'humain (Maltin *et al.*, 1993b). Les  $\beta_2$ -agonistes, du fait de leur action hypertrophiante sur le muscle squelettique et de leur effet lipolytique, sont très utilisés dans le domaine du culturisme (Chodorowski & Sein Anand, 1997; Kierzkowska *et al.*, 2005; Daubert *et al.*, 2007). Ainsi, les athlètes adeptes de culturisme consomment des  $\beta_2$ -agonistes à des concentrations bien supérieures (plusieurs mg par jour) à celles recommandées d'ordinaire pour le traitement de l'asthme, conduisant ainsi à une augmentation de la masse musculaire et à une diminution de la masse grasse, notamment juste avant les compétitions (Chodorowski & Sein Anand, 1997; Kierzkowska *et al.*, 2005). De plus, ces molécules sont souvent combinées avec d'autres drogues comme les stéroïdes anabolisants et l'hormone de croissance. Chez l'humain, il a été décrit certains cas d'empoisonnement suite à la prise illicite de  $\beta_2$ -agonistes. En effet, un jeune Polonais de 21 ans (Chodorowski & Sein Anand, 1997) et un Américain de 31 ans, tous deux adeptes du culturisme (Daubert *et al.*, 2007) et utilisant du clenbutérol, ont été admis à l'hôpital. Ils présentaient les symptômes d'un empoisonnement : palpitations, sensations de vertiges, malaises, nervosité, myalgies, nausées, vomissements, sueur. Les premiers signes cliniques sont apparus quelques heures après l'ingestion du  $\beta_2$ -agoniste et ont disparu après quelques jours d'hospitalisation. Plus récemment, le cas d'un infarctus du myocarde a été décrit chez un jeune culturiste Polonais de 17 ans à la suite d'une prise volontaire de clenbutérol ( $40 \text{ mg.jour}^{-1}$  pendant 2 jours suivi d'un arrêt de 2 jours) (Kierzkowska *et al.*, 2005). Ces cas soulignent donc le fait qu'il est important de connaître les risques potentiels des  $\beta_2$ -agonistes sur la santé. Du fait de la dégradation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Chapitre II.4.3.), les  $\beta_2$ -agonistes sont très souvent pris pendant deux à trois semaines en administration discontinue (cycles ON de 2-3 jours de traitement en alternance avec des cycles OFF de 2 jours sans traitement) (Prather *et al.*, 1995). Le mode d'utilisation du clenbutérol est généralement basé sur des expériences, empiriques, personnelles d'usagers consommateurs du





$\beta_2$ -agoniste et dépassent de loin les doses thérapeutiques (200  $\mu\text{g}$  pris oralement, une à trois fois par jour, pendant des cycles de 6 à 12 semaines) (Daubert *et al.*, 2007). Le clenbutérol est vendu, à bas prix, illégalement dans des magasins diététiques comme compléments alimentaires ou sur Internet, limitant ainsi les contrôles sur l'utilisation de cet agent anabolisant (Daubert *et al.*, 2007). Ainsi, la connaissance des propriétés des  $\beta_2$ -agonistes, ainsi que les mécanismes de régulation de ces molécules est d'un intérêt capital dans le domaine sportif et médical.

**L'utilisation de  $\beta_2$ -agonistes lors d'une pratique dopante n'est pas sans effets secondaires en raison des doses anormales prises. Les dangers des  $\beta_2$ -agonistes sont particulièrement mis en exergue lorsque la santé du consommateur est mise en jeu, notamment lors de contaminations alimentaires à grande ampleur liées à l'absorption involontaire de  $\beta_2$ -agonistes ; certains pays les utilisant chez le bétail, pour le développement de la masse musculaire. Bien que les  $\beta_2$ -agonistes, pris en grande quantité, soient connus pour leurs propriétés anabolisantes, les voies de signalisation mises en jeu lors de l'hypertrophie musculaire restent encore à approfondir.**



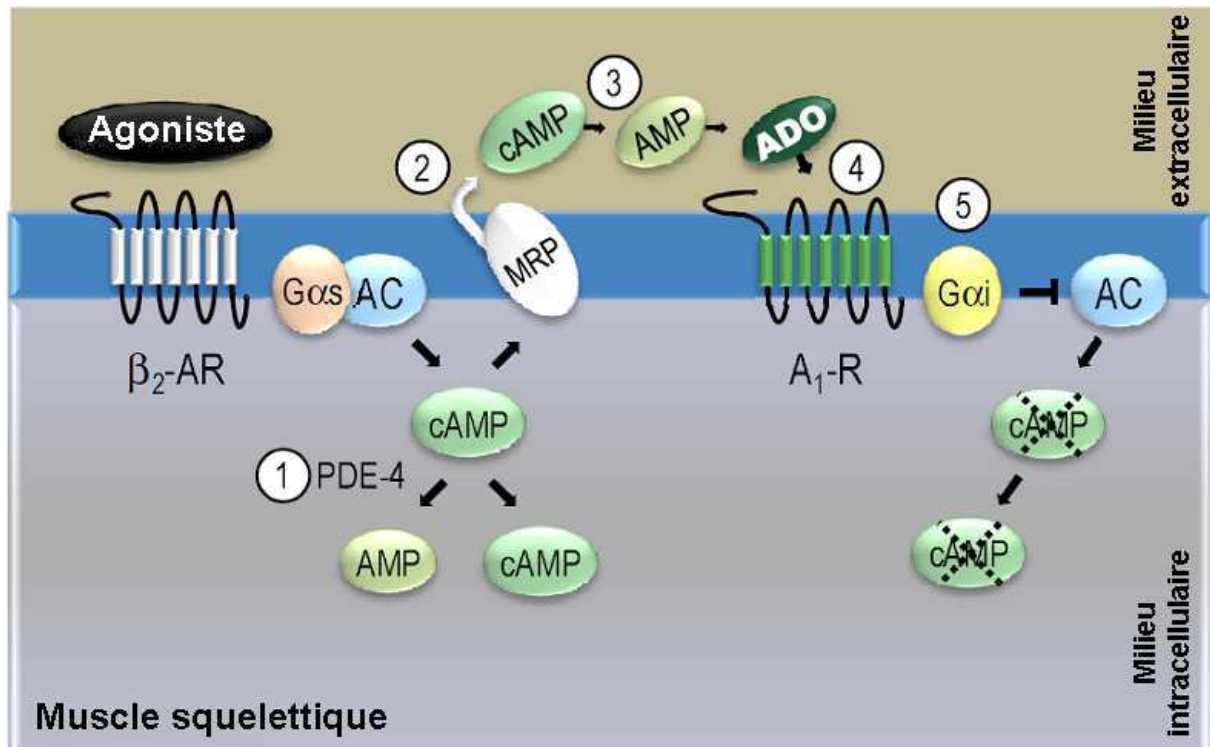
## **VII. Mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'effet anabolisant du muscle squelettique après stimulation $\beta_2$ -adrénergique**

L'action des  $\beta_2$ -agonistes sur le muscle squelettique nécessite sa fixation sur le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique situé au niveau de la membrane cellulaire. Une fois le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique activé par le  $\beta_2$ -agoniste, la molécule de GTP se fixe sur la sous-unité  $G\alpha_s$  et active l'adénylate cyclase, conduisant à l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. Ceci va permettre la fixation des molécules d'AMPc sur la protéine kinase A et induire diverses voies de signalisation intracellulaire menant à l'hypertrophie musculaire.

### **VII.1 La voie « canonique » des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques**

#### **VII.1.1 Les protéines $G\alpha$ impliquées dans l'hypertrophie du muscle squelettique**

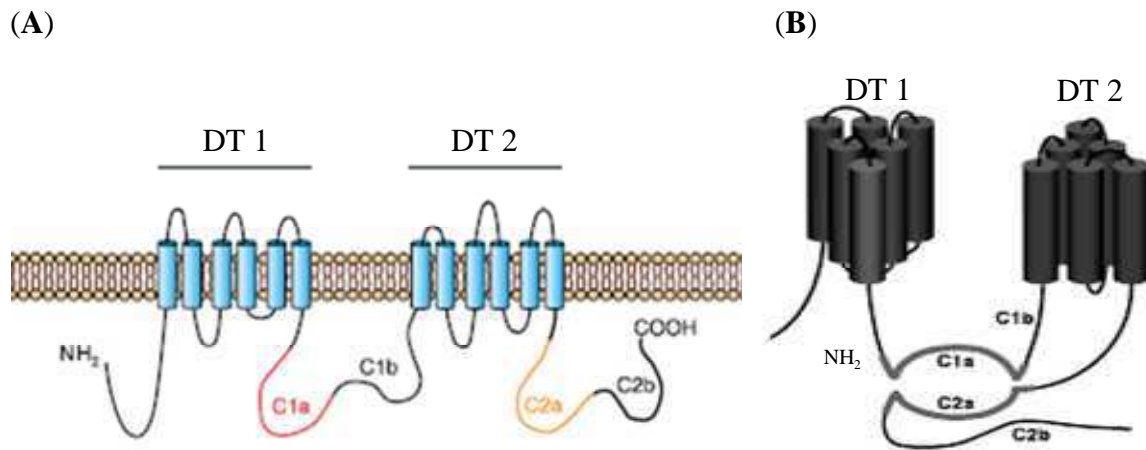
Une étude récente, menée sur des souris KO pour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, a mis en évidence une réduction de la masse du muscle squelettique de ces animaux (Bacurau *et al.*, 2009), démontrant l'importance de ces récepteurs. Une déficience en sous-unité  $G\alpha_s$  de la protéine (souris KO), spécifiquement dans le muscle, induit une réduction de la masse musculaire avec une production de force inférieure au groupe de souris sauvages (Chen *et al.*, 2009). Cette diminution de production de force s'accompagne d'un changement de typologie des fibres musculaires avec une augmentation de fibres exprimant les MHC de type I (Chen *et al.*, 2009). L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine  $G\alpha_s$ , couplée au récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, est impliquée dans l'hypertrophie musculaire et pourrait jouer un rôle dans l'effet anabolisant induit par les  $\beta_2$ -agonistes. Dans le muscle squelettique, sont présentes les protéines  $G\alpha_s$  (stimulant l'adénylate cyclase),  $G\alpha_i$  (inhibant l'adénylate cyclase) (Suzuki *et al.*, 1998) et  $G\alpha_{q/11}$  (Strathmann & Simon, 1990; Bose *et al.*, 2001). Dans le diaphragme (muscle mixte) de rat [composé de 40 % de fibres I et 60 % de fibres II d'après (Kilarski & Sjoström, 1990)], la proportion en protéines  $G\alpha_s$  n'est pas différente de celle en protéines  $G\alpha_i$  et  $G\alpha_{q/11}$  (Andrade-Lopes *et al.*, 2011). En revanche, bien que l'expression en ARNm de  $G\alpha$



**Figure 24 :** Modèle de l'interaction indirecte entre le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique ( $\beta_2$ -AR) couplé à la protéine  $G_s$  et le récepteur  $A_1$ -adénosine ( $A_1$ -R) couplé à la protéine  $G_i$ . L'activation du récepteur  $\beta_2$ -AR par le  $\beta_2$ -agoniste induit l'activation de l'adénylate cyclase (AC) via  $G_s$ . L'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc est suivie d'un efflux d'AMPc via les multidrug resistance-related proteins (MRP), et la conversion de l'AMPc en AMP par les ecto-phosphodiesterases et de l'AMP en adénosine par les ecto-nucléotidases. L'adénosine extracellulaire pourrait agir au niveau du récepteur  $A_1$ -R, couplé à la protéine  $G_i$ , et ainsi inhiber l'activité de l'AC. Pour démontrer ce cheminement, différentes étapes (numérotées de ① à ⑤) ont été inhibées/bloquées permettant de mettre en évidence l'implication de chacune dans cette cascade d'événements. ① le rolipram, inhibiteur sélectif des phosphodiesterases (PDE)-4 ; ② le probénécide, inhibiteur du transporteur d'anion organique ; ③ l'AMPCP, inhibiteur d'ecto-5'nucléotidase ; ④ le CGS 15943 et le DPCPX, non-sélectif et sélectif inhibiteur du récepteur  $A_1$ -R ; et ⑤ la toxine pertussique PTX, inhibiteur de la sous-unité protéique  $G_i$  [modifié d'après (Duarte *et al.*, 2012)].

et de  $G\alpha_i$  diminue au cours du développement (Suzuki *et al.*, 1998), le muscle *gastrocnemius* de souris semble exprimer davantage d'ARNm  $G\alpha_s$  que d'ARNm  $G\alpha_i$  à l'âge adulte (Suzuki *et al.*, 1998). Néanmoins, aucune étude ne rapporte la proportion relative des sous-unités de la protéine G dans le muscle strié squelettique, soulignant le manque de connaissance dans ce domaine.

Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont principalement couplés aux protéines  $G\alpha_s$  mais ils peuvent également induire une réponse intracellulaire *via* le complexe  $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$  dans la lignée cellulaire musculaire L6 (Nevzorova *et al.*, 2006) et dans le muscle squelettique de rat (Gosmanov *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2007). De la même manière, il a été décrit dans les cellules HEK293, une commutation des protéines  $G\alpha_s$  en  $G\alpha_i$  à la suite d'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique par l'isoprotérénol (Daaka *et al.*, 1997). D'après ce modèle, la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique induit l'activation de la protéine kinase A, qui phosphoryle à son tour le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique. S'en suit donc une commutation de la protéine  $G\alpha_s$  en protéine  $G\alpha_i$ . Cette dernière se dissocie de la protéine  $G\beta\gamma$  qui induirait l'activation des voies de signalisation dépendantes des MAPKs (Daaka *et al.*, 1997). Une autre étude *in vitro*, sur des cellules C2C12, a montré que l'activation, par adénovirus, de la protéine  $G\alpha_{i2}$  (isoforme de  $G\alpha_i$  la plus abondante dans les myotubes) augmentait le diamètre des myotubes, en réponse à une augmentation de la synthèse protéique (Minetti *et al.*, 2011). L'activation de la protéine  $G\alpha_{i2}$  bloque l'atrophie du muscle squelettique induite par le TNF- $\alpha$  et inhibe l'expression de l'E3-ubiquitine ligase *MuRF1*, impliquée dans la voie de dégradation protéique ubiquitine-protéasome (Minetti *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent donc que les protéines  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_{i2}$  pourraient, toutes deux, être impliquées dans l'hypertrophie musculaire induite par les  $\beta_2$ -agonistes. A l'inverse, il a été décrit, dans le diaphragme de souris, un dialogue entre le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique couplé à la protéine  $G\alpha_s$  et le récepteur  $A_1$ -adénosine, couplé à la protéine  $G\alpha_i$  à la suite d'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique par le clenbutérol (Duarte *et al.*, 2012). En inhibant l'adénylate cyclase, la protéine  $G\alpha_i$  agirait comme un rétro-contrôle négatif en contrôlant finement la concentration intracellulaire d'AMPc et limiterait ainsi la réponse intracellulaire induite par la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique (Duarte *et al.*, 2012) (**Figure 24**). Ainsi, contrairement à la protéine  $G\alpha_s$ , il semblerait que l'implication de la protéine  $G\alpha_i$  sur l'hypertrophie musculaire soit encore matière à débat.



**Figure 25** : Structure de l'adénylate cyclase. (A) Cette dernière est constituée de 5 domaines majeurs : une région  $\text{NH}_2$  terminale, deux domaines transmembranaires (DT 1 et DT 2) et deux domaines cytoplasmiques ayant une activité catalytique (C1 et C2). C1a et C2a sont les régions catalytiques hautement conservées liant l'ATP qui se dimérisent pour former le site catalytique (B). Les domaines C1b et C2b sont moins conservés. [modifié d'après la revue de (Willoughby & Cooper, 2007)].

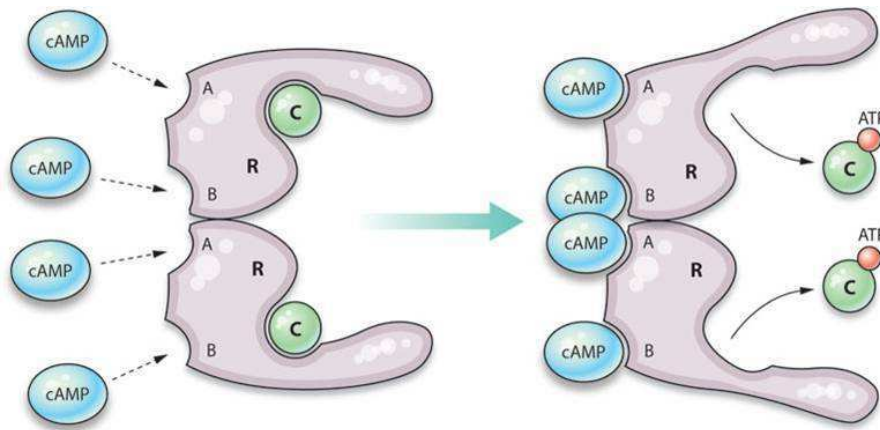
### VII.1.2 L'adénylate cyclase

L'adénylate cyclase catalyse la conversion de l'ATP en AMPc et joue ainsi un rôle prépondérant dans la signalisation induite par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Il existe neuf isoformes de l'adénylate cyclase (AC1-AC9) plus une forme soluble (sAC), qui présentent toutes une structure similaire avec une région NH<sub>2</sub>-terminale, deux domaines transmembranaires hydrophobes, auxquels s'ajoutent deux domaines cytoplasmiques ayant une activité catalytique [pour revue (Willoughby & Cooper, 2007)] (**Figure 25**). Dans le muscle squelettique, seules les isoformes AC2, AC6, AC7 et AC9 sont présentes avec une prédominance des isoformes AC2 et AC9 (Torgan & Kraus, 1996; Suzuki *et al.*, 1998). Au cours du développement, dans le muscle *gastrocnemius* de souris, l'expression des isoformes AC2 et AC9 est augmentée à l'inverse des isoformes AC6 et AC7 (Suzuki *et al.*, 1998). Enfin, la forskoline, un activateur de l'AC, ainsi que l'adrénaline et l'isoprotérénol augmentent de façon dose-dépendante l'activité de l'AC dans les muscles *gastrocnemius* (Williams *et al.*, 1984; Suzuki *et al.*, 1998) et *soleus* (Williams *et al.*, 1984). Cette augmentation d'activité, en présence de doses croissantes d'isoprotérénol, est plus importante dans le muscle *soleus* que celle du muscle *gastrocnemius* (Williams *et al.*, 1984).

### VII.1.3 Les phosphodiésterases

Les phosphodiésterases (PDEs) sont des enzymes responsables de la dégradation par hydrolyse de l'AMPc en 5'-AMP. La concentration intracellulaire en AMPc est donc déterminée par la balance entre la production d'AMPc par l'AC, et sa dégradation par les PDEs. Le muscle squelettique contient plusieurs isoformes de PDE dont PDE4, PDE7 et PDE8 (Bloom, 2002). Cependant, PDE4 apparaît comme étant celle qui contribue le plus à l'hydrolyse de l'AMPc dans le muscle squelettique (Bloom, 2002). Les PDEs contiennent 2 sites de fixation pour PKA qui phosphoryle et active les PDEs (Sette & Conti, 1996). Ainsi, PKA exerce un rétro-contrôle négatif en limitant la production d'AMPc. L'administration d'inhibiteurs de PDE non sélectifs (pentoxifylline) ou spécifiques de PDE4 (cilomilaste, rolipram) réduit la perte de masse musculaire (en particulier celle du muscle *tibialis anterior*) induite par une immobilisation plâtrée ou une dénervation (Hinkle *et al.*, 2005). De plus, le rolipram prévient la perte de force des muscles *extensor digitorum longus* et *soleus* en condition d'atrophie (Hinkle *et al.*, 2005). L'administration de pentoxifylline ou d'isobutyl-méthyl-xanthine à des rats ayant un sepsis, augmente la concentration en AMPc dans





**Figure 26 :** Représentation de l'activation de la protéine kinase A (PKA) par l'AMPc. A l'état inactif, PKA est un tétramère composé de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C). Chaque sous-unité régulatrice possède deux sites de fixation à l'AMPc (A et B). La fixation de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices de PKA libère les sous-unités catalytiques qui se lient à l'ATP [d'après (Murray, 2008)].

le muscle *extensor digitorum longus* et réduit la protéolyse du muscle squelettique (Lira *et al.*, 2007). Le taux en TNF- $\alpha$ , augmenté 3 heures après le sepsis, est bloqué en présence de pentoxifylline (Lira *et al.*, 2007), suggérant que la voie de signalisation induite par l'AMPc est impliquée dans l'hypertrophie du muscle squelettique. *In vitro*, l'effet anti-protéolytique de l'isobutyl-méthyl-xanthine est inhibé par le H89, un inhibiteur sélectif de PKA (Lira *et al.*, 2007), supportant l'idée que l'activation de la voie dépendante de l'AMPc, par l'intermédiaire de PKA, est un mécanisme de régulation pour empêcher une dégradation protéique excessive dans le muscle squelettique.

#### VII.1.4 La protéine kinase A

PKA est l'effecteur moléculaire de l'AMPc le plus couramment étudié. PKA est un hétérotétramère composé de 2 sous-unités régulatrices (R) et de 2 sous-unités catalytiques (C) (Taylor, 1989). Chaque sous-unité régulatrice de PKA présente 2 sites de fixation (A et B) susceptibles de recevoir chacun une molécule d'AMPc. Ainsi, 4 molécules d'AMPc se lient aux 2 sous-unités régulatrices et activent PKA (**Figure 26**). PKA agit dans la cellule musculaire grâce à sa liaison avec des protéines kinases d'ancrage A (mAKAP), qui permettent de localiser PKA dans des régions bien spécifiques de la cellule (Beene & Scott, 2007). Ainsi, mAKAP a été identifiée dans la membrane périnucléaire et au niveau du réticulum sarcoplasmique, un site de stockage de  $\text{Ca}^{2+}$  (Beene & Scott, 2007). La liaison de l'AMPc sur PKA va induire un changement de conformation de cette protéine et va initier la dissociation des sous-unités régulatrices des sous-unités catalytiques (**Figure 26**) (Murray, 2008). Une fois libérées, ces dernières lient l'ATP, devenant ainsi catalytiquement actives. Elles vont ensuite entraîner, par fixation directe, la phosphorylation de protéines cibles. C'est le cas du récepteur à la ryanodine (RyR1) qui est phosphorylé par PKA sur les résidus sérine 2843 et 2844, induisant ainsi la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique dans le muscle squelettique (Andersson *et al.*, 2012). De même, PKA phosphoryle le phospholambane, protéine du réticulum sarcoplasmique, activant ainsi SERCA, permettant le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum sarcoplasmique (Schertzer *et al.*, 2005). Enfin, les sous-unités catalytiques actives peuvent également entrer dans le noyau par diffusion passive et activer certaines protéines cibles comme le facteur de transcription CREB.

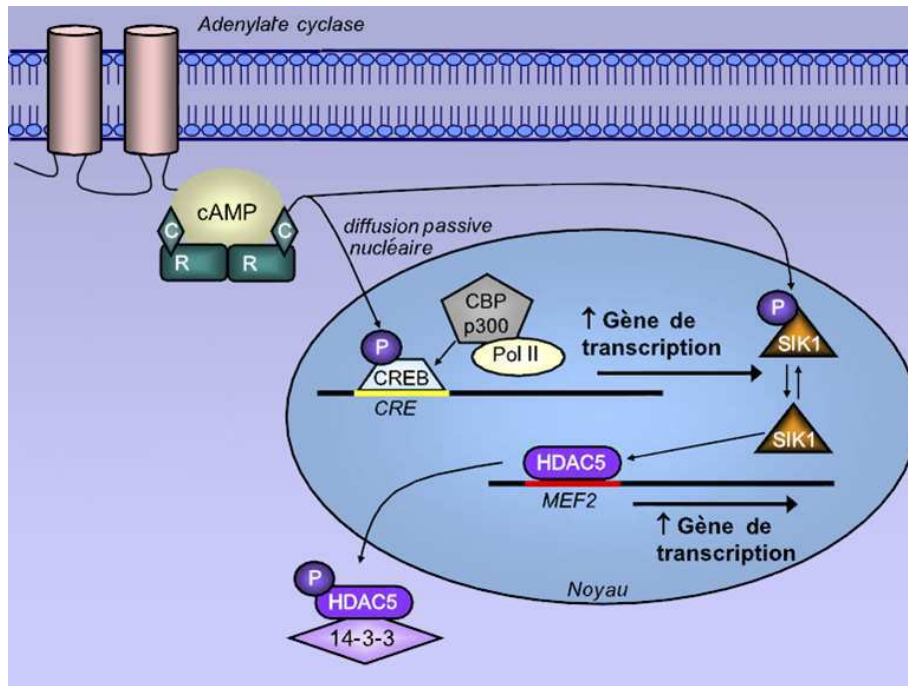


### VII.1.5 Le facteur de transcription CREB

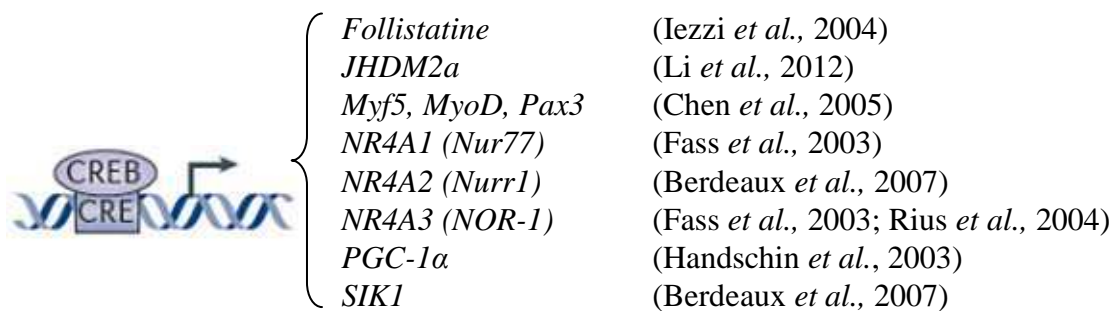
Les sous-unités catalytiques de PKA phosphorylent et activent également le facteur de transcription CREB [cAMP response element (CRE) binding protein]. La protéine CREB se lie à la région CRE (séquence palindromique consensus TGACGTCA) située dans le promoteur de gènes cibles. La phosphorylation de CREB sur son résidu sérine 133 permet la transcription de gènes cibles, grâce au recrutement de coactivateurs transcriptionnels, CBP (CREB-binding protein) (Chrivia *et al.*, 1993; Kwok *et al.*, 1994) et p300 (Arany *et al.*, 1994). Tous deux régulent l'activité transcriptionnelle *via* leur association avec l'ARN polymérase II (Nakajima *et al.*, 1997). Ces co-facteurs possèdent une activité intrinsèque histone acétyltransférase qui augmente la transcription. Ainsi, l'inhibition pharmacologique de l'activité histone acétyl-transférase du complexe CBP/p300 empêche la formation de myotubes et inhibe l'expression de protéines MHC (Polesskaya *et al.*, 2001).

## VII.2 Régulation transcriptionnelle des gènes cibles de CREB potentiellement impliqués dans l'hypertrophie musculaire

Dans le muscle squelettique, en réponse à une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique, le facteur de transcription CREB est phosphorylé par PKA. La voie de signalisation induite par CREB semble indispensable dans le muscle squelettique. Pour preuve, des souris dominantes-négatives transgéniques de la protéine CREB dans le muscle squelettique ont un phénotype dystrophique caractérisé par une perte progressive de la masse musculaire, l'apparition de l'inflammation et d'une nécrose musculaire (Berdeaux *et al.*, 2007). Grâce à l'utilisation du dominant négatif de CREB (A-CREB), il a été possible de déterminer les gènes cibles spécifiques de CREB. Ainsi, le facteur de transcription CREB régule positivement l'expression de la sérine/thréonine kinase SIK1 (salt-inducible kinase 1) (Berdeaux *et al.*, 2007). A son tour, SIK1 semble réguler des gènes spécifiques du muscle *via* la phosphorylation et la séquestration cytoplasmique des histones déacétylases de classe II (HDAC5). Lorsqu'elles sont présentes dans le noyau, ces dernières se lient à MEF (myocyte-specific enhancer factor) et inhibent ainsi l'expression de gènes spécifiques du muscle. L'inactivation des HDACs de classe IIa par SIK1 augmente l'activité transcriptionnelle de MEF2, menant ainsi à l'augmentation de l'expression de gènes spécifiques du muscle



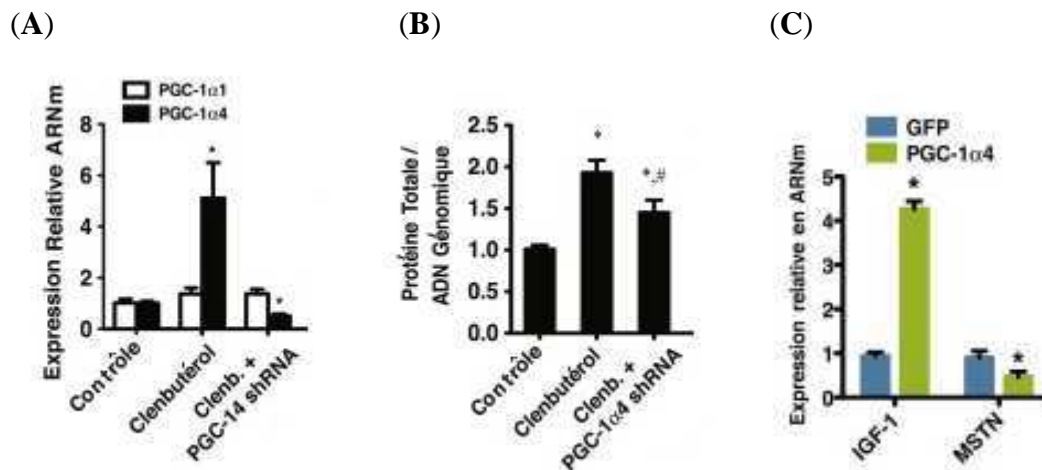
**Figure 27 :** Modèle représentant le rôle de CREB dans le muscle squelettique. En réponse à une stimulation adrénérquique, CREB stimule la transcription de gènes en régulant l'expression de SIK1. A la suite de sa déphosphorylation sur la Ser577, SIK1 augmente l'activité de MEF2 et inactive les HDACs de classe II. Ceci induit l'expression des gènes cibles de MEF2. C, sous-unité catalytique de la protéine kinase A ; cAMP, adénosine monophosphate cyclique ; CBP, CREB-binding protein ; CREB, cAMP response element (CRE) binding protein ; HDAC5, histone déacétylase de classe II ; MEF2, myocyte enhancer factor ; p300, E1A binding protein ; Pol II, ARN polymérase II ; R, sous-unité régulatrice de la protéine kinase A ; SIK1, salt-inducible kinase 1 [modifié d'après (Lynch & Ryall, 2008)].



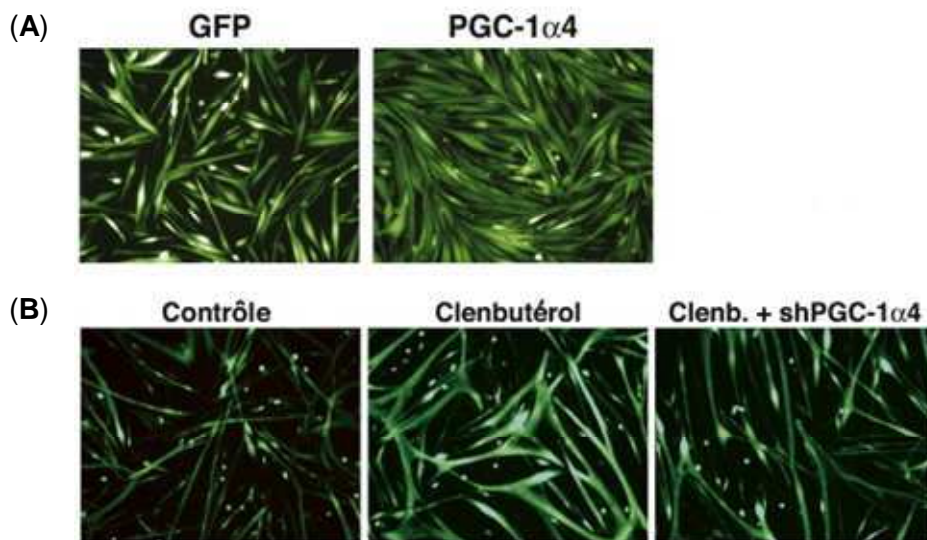
**Figure 28 :** Gènes cibles du facteur de transcription CREB dans le muscle squelettique. L'utilisation du dominant négatif de CREB (A-CREB) confirme que ces gènes sont régulés par CREB. JHDM2a, JmjC-containing H3K9 demethylase; Myf5, myogenic factor 5; MyoD, myogenic differentiation protein; Pax3, paired box 3; NR4A, orphan nuclear receptor; PGC-1α, peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha; SIK1, salt-inducible kinase 1.

(Berdeaux *et al.*, 2007) (**Figure 27**). De plus, CREB active d'autres gènes cibles dont les récepteurs nucléaires orphelins *NR4A1* (*Nur77*) (Fass *et al.*, 2003), *NR4A2* (*Nurr1*) (Berdeaux *et al.*, 2007) et *NR4A3* (*NOR-1*) (Fass *et al.*, 2003; Rius *et al.*, 2004) (**Figure 28**). Ainsi, une stimulation *in vitro*, par l'isoprotérénol, (Maxwell *et al.*, 2005; Pearen *et al.*, 2006; Chao *et al.*, 2007; Myers *et al.*, 2009) et *in vivo*, par le formotérol (Pearen *et al.*, 2008) augmente transitoirement l'expression de *NOR-1*, *Nur77* et *Nurr1*. L'inhibition de l'expression de *NOR-1*, *in vitro*, est associée à une augmentation de l'expression de *myostatine* (Pearen *et al.*, 2006), un régulateur négatif de la masse musculaire. Or, il a été identifié que la région promotrice de *NOR-1* était une cible pour l'élément CRE dans le muscle squelettique (Fass *et al.*, 2003). Ceci suggère qu'une augmentation de la phosphorylation de CREB, sous-jacente à une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique, entraînerait une augmentation de l'expression de *NOR-1* qui, en inhibant l'expression de *myostatine*, induirait une hypertrophie musculaire. De plus, *Nur77*, principalement exprimé dans les muscles glycolytiques à contraction rapide (*quadriceps*, *extensor digitorum longus* et *tibialis anterior*), est un régulateur positif du métabolisme du glucose dans le muscle squelettique (Chao *et al.*, 2007).

D'autres gènes sont également contrôlés par CREB. En effet, il a été montré une augmentation de l'expression d'une histone déméthylase, JHDM2a (JmJc-containing H3K9 demethylase), à la suite d'une stimulation par l'isoprotérénol (Tateishi *et al.*, 2009) et par le clenbutérol (Li *et al.*, 2012). Cette augmentation serait dépendante de la voie  $\beta_2$ /cAMP/PKA/p-CREB (Li *et al.*, 2012). En réduisant le niveau de déméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 des cellules musculaires, cette histone déméthylase serait principalement impliquée dans la régulation du métabolisme oxydatif. Ainsi, des souris *JHDM2a* *-/-* sont caractérisées par une hypertrophie adipocytaire (Inagaki *et al.*, 2009) et par un phénotype obèse (Okada *et al.*, 2010). En revanche, aucun changement de masse musculaire n'était observé entre ces souris et des souris saines (*JHDM2a* *+/+*) (Inagaki *et al.*, 2009). Néanmoins, la perte de fonction de *JHDM2a* diminue l'oxydation des acides gras et la libération de glycérol dans le muscle squelettique (Tateishi *et al.*, 2009), suggérant un rôle de *JHDM2a* dans le métabolisme oxydatif des triglycérides du muscle squelettique.



**Figure 29** : Le clenbutérol augmente l'expression (A) et le contenu protéique de PGC-1 $\alpha$ 4 (B). PGC-1 $\alpha$ 4 augmente l'expression d'*IGF-1* et de la myostatine (MSTN) *in vitro* (C). shRNA, short hairpin RNA. \*p < 0,05 significativement différent du groupe Contrôle ; #p < 0,05 significativement différent du groupe Clenbutérol [modifié d'après (Ruas *et al.*, 2012)].



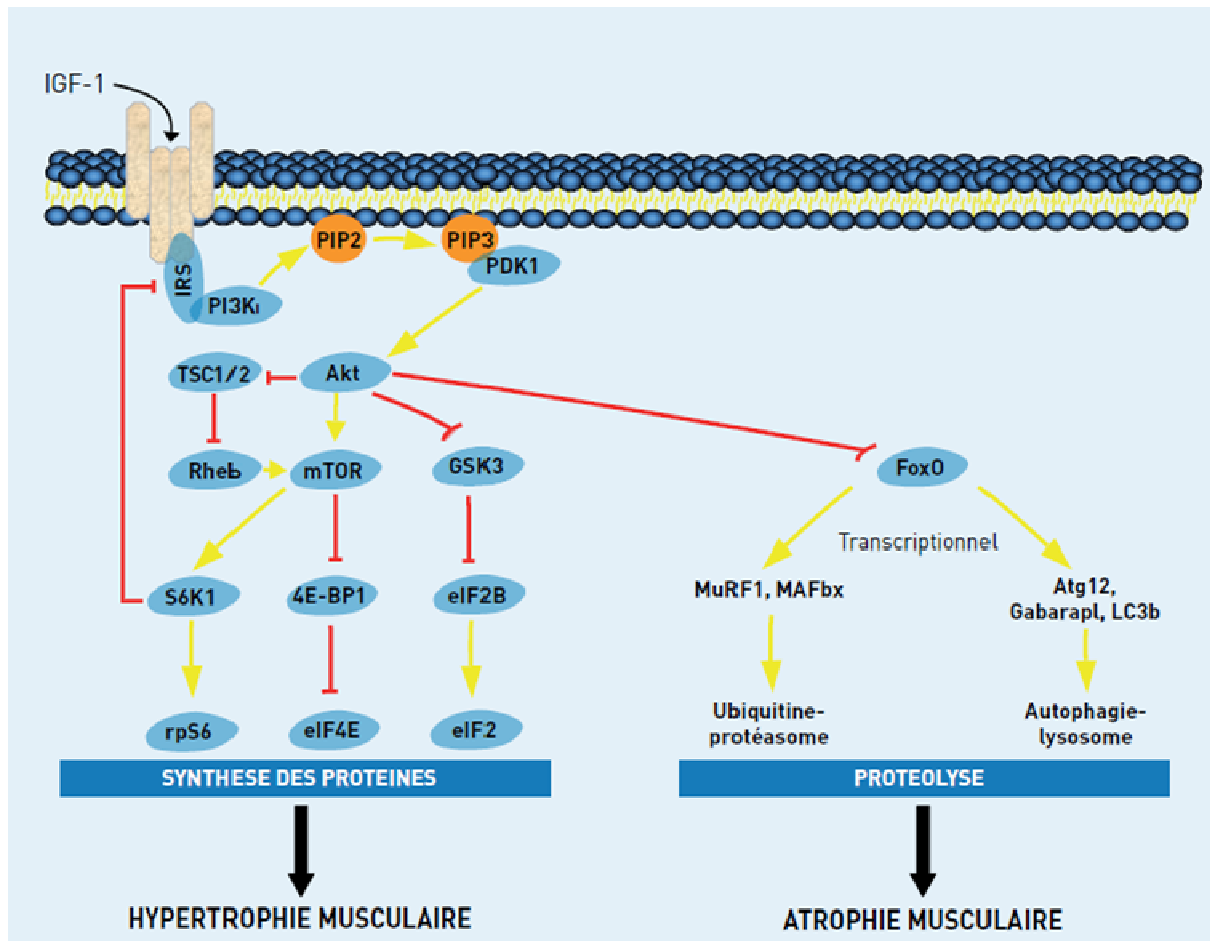
**Figure 30** : PGC-1 $\alpha$ 4 induit une hypertrophie des myotubes (A) et l'inhibition de PGC-1 $\alpha$ 4 par short hairpin RNA (shPGC-1 $\alpha$ 4) bloque l'hypertrophie induite par le clenbutérol (B) [modifié d'après (Ruas *et al.*, 2012)].

D'une manière intéressante, la follistatine, un inhibiteur de la myostatine semble être une autre cible du facteur de transcription CREB. En effet, il a été montré que le dominant négatif de CREB (A-CREB) réduisait la transcription de la follistatine dans les cellules musculaires C2C12 (Iezzi *et al.*, 2004). Ce résultat sous-entend donc qu'une augmentation de l'expression de CREB, stimulée par un  $\beta_2$ -agoniste entraînerait une hypertrophie musculaire en augmentant la transcription de follistatine. De plus, une étude *in vivo* a montré que le clenbutérol augmentait la transcription de *PGC-1 $\alpha$ 4* (**Figure 29 A-B**), un répresseur de l'expression de la *myostatine* et un activateur de l'expression d'*IGF-I* (**Figure 29 C**) (Ruas *et al.*, 2012). Or, l'inhibition de *PGC-1 $\alpha$ 4* bloque l'hypertrophie musculaire induite par le clenbutérol (**Figure 30**) (Ruas *et al.*, 2012), suggérant que la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique serait à l'origine de l'augmentation de la transcription de *PGC-1 $\alpha$ 4*, nécessaire à l'induction de l'hypertrophie musculaire. De plus, l'induction de *PGC-1 $\alpha$*  est dépendante de CREB. En effet, des cellules C2C12 dominantes négatives de CREB abolissent l'induction de *PGC-1 $\alpha$*  en réponse à une stimulation de la calcium/calmodulin-dépendent protein kinase IV (Handschin *et al.*, 2003). Enfin, il a été montré, *in vivo*, que CREB régulait positivement la transcription du facteur myogénique *Myf5* (Chen *et al.*, 2005). Bien que l'activation directe entre le facteur de transcription CREB et le promoteur de *PGC-1 $\alpha$ 4* n'ait pas été décrite, l'augmentation de la transcription de *Myf5* par *PGC-1 $\alpha$ 4* (Ruas *et al.*, 2012), pourrait suggérer l'existence d'une voie CREB/*PGC-1 $\alpha$ 4*/*Myf5* impliquée dans l'hypertrophie musculaire.

De plus, l'activation pharmacologique de PKA entraîne une transactivation du promoteur de la calpastatine (Cong *et al.*, 1998), un inhibiteur des protéases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , les calpaïnes (Navegantes *et al.*, 2001). Ceci démontre que la transcription du gène de la calpastatine peut être régulée positivement par PKA. L'augmentation du niveau en protéine (Koopman *et al.*, 2010) et de la phosphorylation de la calpastatine (Pontremoli *et al.*, 1992), en réponse à une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique, indique que la régulation de la calpastatine se fait à la fois au niveau de l'abondance de la protéine calpastatine, mais également au niveau post-traductionnel *via* la régulation de son activité. Néanmoins, il reste encore à déterminer si l'expression du gène de la calpastatine est directement régulée par le facteur de transcription CREB (Averna *et al.*, 2003).

Enfin, il a été montré que l'AMPK phosphorylait des facteurs de transcription appartenant à la famille de CREB (Thomson *et al.*, 2008). Dans les muscles *gastrocnemius* et *tibialis anterior*, ainsi que dans le cœur de souris KO-LKB1, la phosphorylation de CREB



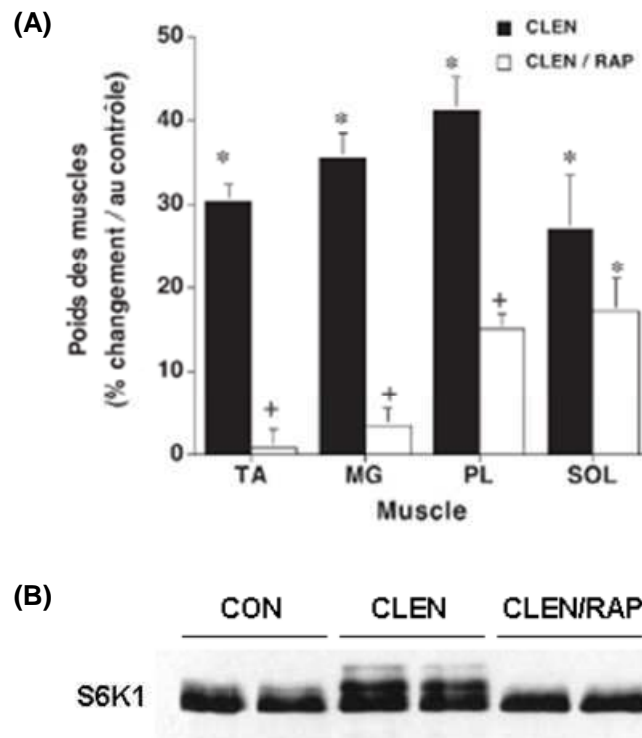


**Figure 31 :** Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR impliquée dans l’hypertrophie musculaire. L’activation de PI3K résulte de la phosphorylation de phosphatidylinositol-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-triphosphate (PIP3). Akt est phosphorylé et activée par la protéine kinase dépendante du phosphoinositide (PDK). Une fois activé, Akt active mammalian target of rapamycin (mTOR) en phosphorylant tuberous sclerosis complex (TSC) 2. Cette phosphorylation bloque l’habilité de TSC2 à agir comme GTPase sur Rheb, menant à l’accumulation de Rheb-GTP. Rheb-GTP active mTOR, qui phosphoryle à son tour des protéines effectrices cibles telles que 4E-BP1 et S6K1. TSC2 peut également être activée par GSK3 qui est inhibée par Akt. S6K1 exerce un rétro-contrôle négatif sur IRS en le phosphorylant. Akt intervient également sur la protéolyse en inhibant FoxO qui agit lui-même de façon transcriptionnelle sur le système ubiquitine-protéasome et le système autophagie-lysosome. Atg12, autophagy-related gene 12 ; eIF2, eukaryotic initiation factor 2 ; eIF4E, eukaryotic initiation factor 4E ; FoxO, Forkhead transcription factor ; Gabarapl, Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like ; GSK3, glycogen synthase kinase 3 ; GTP, guanosine triphosphate ; IGF-I, insulin-growth factor I ; IRS, insulin receptor substrate ; LC3b, light chain 3 beta ; MAFbx, Muscle atrophy F-box ; MurF1, Muscle RING finger 1 ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; Rheb, ras homolog enriched in brain ; rpS6, ribosomal protein S6 ; S6K1, 40S ribosomal S6 kinase 1 ; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 [modifié d’après (Freysenet, 2010)].

était plus faible que dans le cas de souris sauvages, suggérant que l'AMPK pourrait jouer un rôle dans le maintien du niveau basal de phosphorylation de CREB (Thomson *et al.*, 2008). Ces dernières observations nous amènent donc à nous questionner sur le rôle joué par l'AMPK dans l'hypertrophie musculaire induite par la voie de signalisation dépendante de CREB. De plus, il a été montré dans un modèle de surcharge chez des souris sauvages et déficientes en LKB1, que l'hypertrophie musculaire observée était associée à l'activation de l'AMPK $\alpha$ (1) (McGee *et al.*, 2008). Ainsi, l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK n'est donc pas à exclure dans le cas d'une augmentation importante de l'hypertrophie musculaire (Mounier *et al.*, 2009).

### VII.3 Régulation post-transcriptionnelle *via* la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, initiatrice de la traduction des protéines

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et plus spécifiquement dans la croissance des fibres musculaires (Bodine *et al.*, 2001b; Fingar *et al.*, 2002). Régulant les étapes clés de l'initiation de la traduction, elle est la voie de régulation majeure de la synthèse protéique dans le tissu musculaire. En effet, son activation est généralement à l'origine d'une hypertrophie musculaire, alors que son inhibition s'accompagne généralement d'une atrophie (**Figure 31**) [pour revues, (Glass, 2005; Favier *et al.*, 2008)]. La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est stimulée par l'administration de clenbutérol chez le rat comme en témoigne l'augmentation du niveau de phosphorylation de S6K1, un acteur clé de cette voie de signalisation (Sneddon *et al.*, 2001). Ces résultats ont par la suite été largement confirmés avec le même  $\beta_2$ -agoniste par Kline *et coll.* (Kline *et al.*, 2007). Cet auteur propose que l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR est induite par la protéine G $\beta\gamma$ , comme cela est démontré dans des cardiomyocytes (Zhu *et al.*, 2001). De façon encore plus intéressante, il est rapporté que la rapamycine, un inhibiteur de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, inhibe l'hypertrophie musculaire induite par le clenbutérol (**Figure 32**) (Kline *et al.*, 2007), démontrant pour la première fois que les effets du clenbutérol sont aussi dus à l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. En accord avec ces résultats, le clenbutérol et le formotérol augmentent la phosphorylation de 4E-BP1, Akt et rpS6 (Koopman *et al.*, 2010; Douillard *et al.*, 2012).



**Figure 32 :** (A) Effets de 14 jours de traitement au clenbutérol (CLEN) ou avec co-administration de rapamycine (CLEN/RAP) sur la masse musculaire chez le rat. (B) Western blot montrant le niveau de phosphorylation de la protéine S6 kinase 1 (S6K1) dans le *medial gastrocnemius* (MG) chez le rat. CON, contrôle ; PL, *plantaris* ; SOL, *soleus* ; TA, *tibialis anterior* [modifié d'après (Kline *et al.*, 2007)].

Un des principaux régulateurs positifs de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est IGF-I (Insulin-like growth factor I) (Rommel *et al.*, 2001). Une surexpression d'IGF-I induit une hypertrophie musculaire (Coleman *et al.*, 1995). En présence de clenbutérol, la concentration d'IGF-I dans le sérum n'est pas augmentée (Awede *et al.*, 2002). En revanche, des changements locaux de la concentration en IGF-I induits par le muscle squelettique pourraient être à l'origine de l'effet anabolique du clenbutérol. Ainsi, le clenbutérol active l'expression d'*IGF-I* dans le *soleus* (Awede *et al.*, 2002; Mounier *et al.*, 2007) et d'*IGF-II* dans le *plantaris* (Sneddon *et al.*, 2001). Il augmente également les niveaux peptidiques d'IGF-I dans le muscle squelettique *soleus* de rat (Awede *et al.*, 2002) sans augmenter l'expression des récepteurs IGF-1R (Mounier *et al.*, 2007). L'augmentation transitoire en ARNm d'*IGF-II* est associée à une augmentation en ARNm d'*IGFBP* (IGF-binding protein) 4 et 5 (Awede *et al.*, 2002). Les protéines IGFBPs, associées à la membrane cellulaire, à proximité d'un récepteur à l'insuline, permettraient de lier l'IGF-II, stimulant ainsi la myogénèse (Ren *et al.*, 2008). L'ARNm d'*IGF-I* est augmenté transitoirement après 3 jours de traitement au clenbutérol et revient à sa valeur initiale à 5 jours (Awede *et al.*, 2002). Cette augmentation transitoire de l'expression d'*IGF-I* pourrait provenir de l'activation de PGC-1 $\alpha$ 4 induit dans le muscle squelettique de souris en présence de clenbutérol (Ruas *et al.*, 2012). Le peptide IGF-I est, quant à lui, augmenté dès un jour de traitement au clenbutérol et retourne à son niveau de base après 5 jours (Awede *et al.*, 2002), comme l'attestent les résultats obtenus après 14 jours de traitement au clenbutérol dans le *medial gastrocnemius* (Kline *et al.*, 2007) et le *tibialis anterior* de rat (Yimlamai *et al.*, 2005). Ainsi, IGF-I pourrait intervenir dans l'hypertrophie musculaire, durant les premiers jours du traitement au  $\beta_2$ -agoniste (Abo *et al.*, 2012).

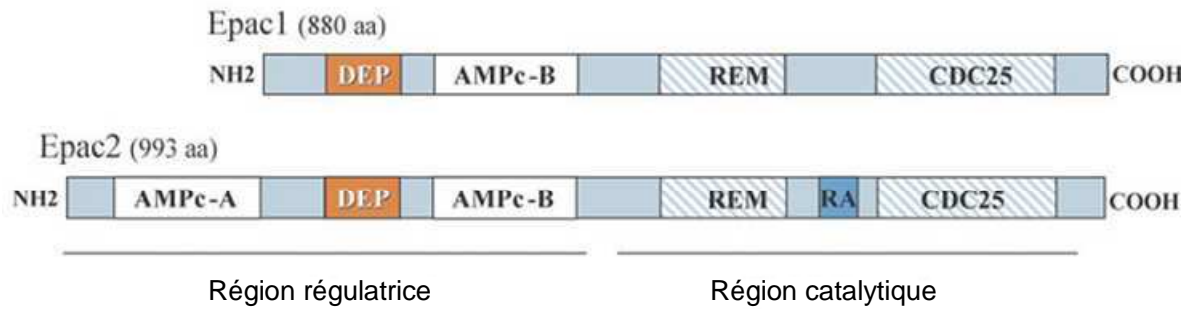
De plus, il a été montré dans la littérature qu'ERK1/2 était impliquée dans la régulation de la voie PI3K/Akt/mTOR en inhibant TSC2 (Ma *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2007; Miyazaki *et al.*, 2011). L'inhibition d'ERK1/2 diminue l'expression de SERCA1 induite par l'isoprotérénol, laissant envisager un rôle pour ERK1/2 dans l'hypertrophie des muscles rapides, induite par une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique (Shi *et al.*, 2007). Ainsi, l'inactivation de ERK1/2 inhibe l'hypertrophie des muscles rapides induite par le clenbutérol (Shi *et al.*, 2007) ou l'IGF-1 (Haddad & Adams, 2004). Un traitement à l'isoprotérénol augmente la phosphorylation d'ERK1/2 dans les muscles *soleus* et *plantaris* de rat (Gosmanov *et al.*, 2002). L'inhibition de la sous-unité G $\alpha_i$  en présence de toxine pertussis bloque l'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2, induite par le  $\beta_2$ -agoniste isoprotérénol, dans le muscle



*soleus* mais pas dans le muscle *plantaris* (Gosmanov *et al.*, 2002), suggérant d'une part qu'ERK1/2 est dépendant de la sous-unité  $G\alpha_i$ , comme cela a déjà été démontré dans le muscle cardiaque (Zou *et al.*, 1999; Baillie *et al.*, 2003) et d'autre part que cette dépendance est muscle spécifique (Gosmanov *et al.*, 2002). En revanche, le  $\beta_2$ -agoniste clenbutérol semble augmenter davantage la phosphorylation d'ERK1/2 dans les muscles à contraction rapide (*tibialis anterior*, *gastrocnemius*) que ceux à contraction lente (*soleus*) (Shi *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent donc que l'activation d'ERK1/2 par les  $\beta_2$ -agonistes est nécessaire et/ou soutient l'hypertrophie du muscle à contraction rapide. Néanmoins, certains travaux reportent une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 dans l'atrophie musculaire induite par une suspension des membres inférieurs (Kato *et al.*, 2002). De la même manière, l'activation d'ERK1/2 dans des myotubes C2C12 provoquerait une diminution de leur taille (Rommel *et al.*, 1999), alors que l'inhibition d'ERK1/2 entraînerait un phénotype hypertrophique similaire à celui observé après traitement à l'IGF-1 (Rommel *et al.*, 1999). Ces dernières données soulignent donc le rôle controversé d'ERK1/2 dans la régulation de la masse musculaire.

La kinase AMPK, senseur clé de l'état énergétique intracellulaire, est un régulateur négatif de la voie PI3K/Akt/mTOR (Inoki *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2004). Ainsi, l'activation pharmacologique *in vivo* de l'AMPK par l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-ribo-nucleoside) est associée à une réduction de la phosphorylation d'Akt, de S6K1 et de 4E-BP1, et se traduit par une inhibition de la synthèse protéique dans le muscle *gastrocnemius* de rat (Bolster *et al.*, 2002). Les  $\beta_2$ -agonistes n'affectent pas la phosphorylation de la protéine AMPK *in vitro* (Hutchinson & Bengtsson, 2006) et *in vivo* dans le muscle *tibialis anterior* de souris (Douillard *et al.*, 2012). En revanche, *in vitro*, l'AMPK était phosphorylée dans des cellules musculaires de rat (L6) après un traitement à la cirazoline, un agoniste aux récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques (Hutchinson & Bengtsson, 2006). Ces résultats suggèrent que seule la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, couplés aux protéines  $G\alpha_q$ , induit une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK.

La myostatine, membre de la famille des transforming growth factor- $\beta$ , est un peptide régulant négativement la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans le muscle squelettique et donc l'hypertrophie musculaire (Amirouche *et al.*, 2009). La myostatine semble être impliquée dans la régulation de l'hypertrophie musculaire induite par les  $\beta_2$ -agonistes.

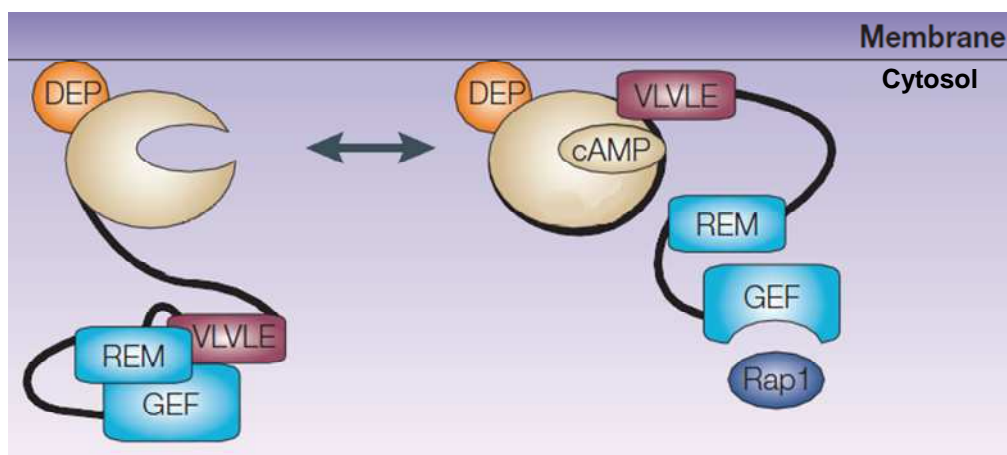


**Figure 33 :** Organisation des protéines Epac. Le domaine DEP est responsable de l'association d'Epac avec les membranes cellulaires. CDC25 stabilisé par le domaine REM permet l'échange de GDP en GTP sur les protéines Rap GTPases. Dans son état inactif, la région régulatrice N-terminale d'Epac interagit directement avec la région catalytique et inhibe l'activité guanine exchange factor (GEF). La liaison, avec une grande affinité, de l'AMPc sur le domaine AMPc-B induit des changements de conformation de la protéine Epac et libère le site catalytique permettant à Epac d'activer Rap GTPase. aa, acides aminés ; AMPc, AMPc binding domain ; CDC25, CDC25 homology domain ; DEP, Dishevelled-Egl-10-Pleckstrin domain ; GDP, guanosine diphosphate ; GTP, guanosine triphosphate ; RA, Ras-association domain ; REM, Ras-exchanger motif [modifié d'après (Metrich *et al.*, 2009)].

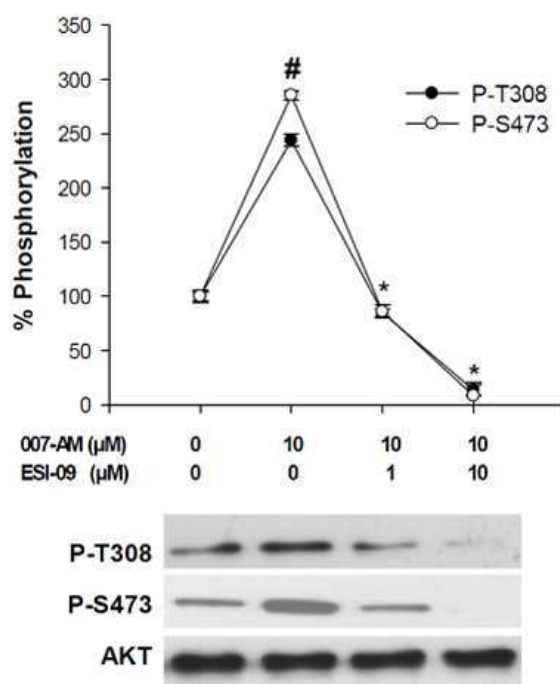
Contrairement à IGF-I qui interviendrait dans les premiers jours d'un traitement aux  $\beta_2$ -agonistes, l'augmentation de l'expression de myostatine ainsi que celle de la phosphorylation de Smad2/3 observées après 21 jours de traitement au clenbutérol limiterait l'hypertrophie musculaire induite par le  $\beta_2$ -agoniste (Abo *et al.*, 2012). De plus, l'expression de la myostatine est inhibée par PGC-1 $\alpha$ 4 en présence de clenbutérol (Ruas *et al.*, 2012). Une étude *in vivo* a montré que l'administration de clenbutérol à des souris hypermusclées KO-myostatine produisait un effet hypertrophique additif (Kim *et al.*, 2011). Ces données soulignent donc le potentiel thérapeutique de la combinaison de la suppression de la myostatine et du traitement aux  $\beta_2$ -agonistes pour prévenir ou inverser le processus d'atrophie musculaire.

A la fin des années 1990, la protéine Epac (exchange protein directly activated by cAMP) a été découverte et pourrait intervenir comme étant le lien moléculaire entre la voie dépendante des  $\beta_2$ -agonistes et la voie PI3K/Akt/mTOR. La protéine Epac est une guanine exchange factor (GEF) pour les petites protéines Ras-like GTPases (Rap1 et Rap2). Epac présente deux isoformes : Epac1 (ou cAMP-GEFI) et Epac2 (cAMP-GEFII). Ces isoformes sont réparties différemment dans l'organisme. Ainsi, l'ARNm *Epac1* a été détecté dans le cœur, le rein, le pancréas, le foie, la prostate, les ovaires, la thyroïde, la trachée, certaines régions du cerveau, ainsi que dans le muscle squelettique (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). L'expression d'*Epac2*, quant à elle, semble être restreinte au cerveau, et aux glandes surrénales (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). La protéine Epac est divisée en deux régions, l'une régulatrice et l'autre catalytique (**Figure 33**). Epac1 contient un domaine unique liant l'AMPc ( $K_d = 2,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), alors qu'Epac 2 en contient deux, un de faible affinité (cAMP-A) ( $K_d = 87 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), et un autre de plus forte affinité (cAMP-B) ( $K_d = 1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (de Rooij *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2003). Nous pouvons donc en déduire que l'AMPc présente une plus faible affinité pour Epac que pour PKA ( $K_d = 0,1-1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), certainement due au remplacement du glutamate présent dans la séquence protéique de PKA par un groupement glutamine dans la protéine Epac (Enserink *et al.*, 2002; Rehmann *et al.*, 2003). De telles observations suggèrent qu'Epac est activée dans une région cellulaire où la production d'AMPc est fortement stimulée ou dans un compartiment cellulaire où l'activité des phosphodiéstérases est faible (Holz *et al.*, 2006). L'AMPc induit un changement de conformation de la protéine Epac et l'active. Il a été montré *in vivo* que l'isoprotérénol induisait une hypertrophie cardiaque corrélée ( $R=0,79$ ) à une augmentation de l'expression en ARNm *Epac1* (+59 %) et *Epac2* (+36 %)





**Figure 34** : L'AMPc induit un changement de conformation de la protéine Epac et l'active. La détection par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a permis de décrire ce changement de conformation. A la suite de la liaison de l'AMPc, la séquence VLVLE (Valine-Leucine-Valine-Leucine-Glutamate) peut interagir avec la région régulatrice, enlevant l'inhibition du domaine REM sur le domaine GEF. cAMP, cyclic adenosine monophosphate ; DEP, Dishevelled-Egl-10-Pleckstrin domain ; GEF, guanine nucleotide exchange factor ; Rap1, Ras-like small GTPase 1 ; REM, Ras-exchanger motif [modifié d'après (Bos, 2003)].



**Figure 35** : La phosphorylation d'Akt sur les résidus thréonine 308 (P-T308) et sérine 473 (P-S473) provoquée par le 007-AM est inhibée par ESI-09 (inhibiteur spécifique d'Epac). Les cellules pancréatiques (INS-1) étaient stimulées avec du 007-AM ( $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) après un pré-traitement aux concentrations indiquées de ESI-09. # Significativement différent du groupe contrôle ( $p < 0,02$ ) ; \* significativement différent du groupe stimulé avec  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de 007-AM seul ( $p < 0,02$ ) [modifié d'après (Almahariq *et al.*, 2013)].

(Ulucan *et al.*, 2007). De plus, l'infection par un adénovirus Epac de cardiomyocytes, permettant de surexprimer Epac, induisait non seulement une hypertrophie mais également l'expression de gènes marqueurs de l'hypertrophie comme l' $\alpha$ -actinine (Morel *et al.*, 2005). La surexpression, par transfection plasmidique d'Epac, *in vitro*, dans des cellules HEK293, a permis de décrire une augmentation de la phosphorylation d'Akt sur les résidus sérine 473 et thréonine 308, en réponse à une stimulation de la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase (Mei *et al.*, 2002). L'ajout de l'inhibiteur de PKA (H89) augmentait davantage la phosphorylation d'Akt (Mei *et al.*, 2002), suggérant d'une part qu'Epac et que PKA agissent selon des voies de signalisation distinctes, et d'autre part qu'Epac pourrait être impliqué dans le processus d'hypertrophie *via* l'activation de la protéine Akt. Afin de distinguer les différentes voies de signalisation mises en jeu par PKA d'une part, et par les protéines Epac d'autre part, des analogues de l'AMPc spécifiques de chacune des protéines ont été développés (Enserink *et al.*, 2002). Le 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, également appelé 007, est un agoniste sélectif des protéines Epac. Les effets physiologiques d'Epac1 dans le muscle squelettique ont été récemment étudiés en utilisant le 007 (Brennesvik *et al.*, 2005; Baviera *et al.*, 2010). Ces deux études indiquent qu'Epac pourrait être le lien moléculaire entre la voie de signalisation induite par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. De plus, *ex vivo*, sur du muscle isolé de rat, le 007 réduit la protéolyse dépendante du protéasome (Baviera *et al.*, 2010). Néanmoins, aucune étude *in vivo* ou *in vitro*, portant sur la perte génétique de la fonction d'Epac, n'a pu impliquer cette protéine dans le muscle squelettique. Des souris KO pour le gène *Epac1* ont été produites mais le phénotype du muscle squelettique n'a pas été discuté dans l'étude (Suzuki *et al.*, 2010) (**Figure 34**). Cependant, l'application du 007 est limitée de par sa faible perméabilité membranaire, principalement à cause du groupement phosphate chargé négativement. Pour atténuer ce phénomène, un groupement ester acétoxyméthyl (AM) a été introduit pour masquer le groupement phosphate négatif (molécule 007-AM) (Vliem *et al.*, 2008), et induire ainsi une perméabilité membranaire accrue. Ceci permet à la molécule 007-AM de rentrer d'une manière efficace dans la cellule, où le groupement ester sera ensuite éliminé soit directement par hydrolyse, soit par les estérases cellulaires pour libérer le composé 007. Ces caractéristiques permettent de réduire d'un facteur 100 la concentration active du composé par rapport au 007 (Vliem *et al.*, 2008). En 2012, ont été développés des inhibiteurs spécifiques d'Epac (ESI-08, ESI-09, HJC0197 et HJC0198) qui diminuent la phosphorylation d'Akt Thr<sup>308</sup> et Ser<sup>473</sup> dans des cellules pancréatiques (INS-1) (Almahariq *et al.*, 2013) (**Figure 35**) et dans les cellules de rein HEK293 (Chen *et al.*, 2012). Néanmoins, à l'heure actuelle, ces



inhibiteurs n'ont pas encore été employés en présence d'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique. Ainsi, ils pourraient être d'un grand intérêt pour approfondir les mécanismes intracellulaires dépendants de PKA menant à une hypertrophie musculaire.

## VII.4 Régulation de la protéolyse

L'hypertrophie musculaire induite par le clenbutérol s'accompagne également d'une diminution de la protéolyse *in vitro* et *in vivo* (Navegantes *et al.*, 2000, 2001; Busquets *et al.*, 2004). Dans le muscle squelettique, différents systèmes impliqués dans la protéolyse existent.

### VII.4.1 La voie ubiquitine-protéasome : rôle dans la protéolyse musculaire

Deux E3 ubiquitine ligases, *MuRF1* et *MAFbx/Atrogin-1*, sont transcrites d'une façon importante dans le muscle squelettique après une dénervation, une immobilisation, une suspension, un traitement au dexaméthasone et à l'interleukine 1 (Bodine *et al.*, 2001a). De plus, il a été montré que des souris déficientes pour les gènes *MuRF1* ou *MAFbx/Atrogin-1* étaient partiellement résistantes à l'atrophie musculaire, démontrant pour la première fois le rôle crucial de la voie ubiquitine-protéasome dans la régulation de la masse musculaire (Bodine *et al.*, 2001a). Les expressions de *MuRF1* et *MAFbx/Atrogin-1* sont induites par les facteurs de transcription de la famille FoxO (FoxO1 et FoxO3a) qui sont séquestrés dans le cytoplasme lorsqu'ils sont phosphorylés par Akt (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004). Ainsi, la surexpression de FoxO1 induit une atrophie musculaire (Kamei *et al.*, 2004). Le clenbutérol diminue l'accumulation de conjugués ubiquitine et l'activité du protéasome dans le muscle (Yimlamai *et al.*, 2005) dans des conditions d'atrophie musculaire, suggérant l'implication des  $\beta_2$ -agonistes dans la suppression de l'activité de FoxO. De la même manière, le clenbutérol atténue l'expression transcriptionnelle de *MuRF1* et *MAFbx/Atrogin-1* dans des conditions de perte musculaire (Kline *et al.*, 2007; Goncalves *et al.*, 2009). De plus, le formotérol diminue l'activité chymotrypsine-like du protéasome dans le muscle *gastrocnemius* de rat (Busquets *et al.*, 2004), en accord avec la diminution de la vitesse de dégradation des protéines. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les  $\beta_2$ -agonistes inhibent la voie de signalisation ubiquitine-protéasome, contribuant ainsi à l'hypertrophie musculaire induite par les  $\beta_2$ -agonistes.

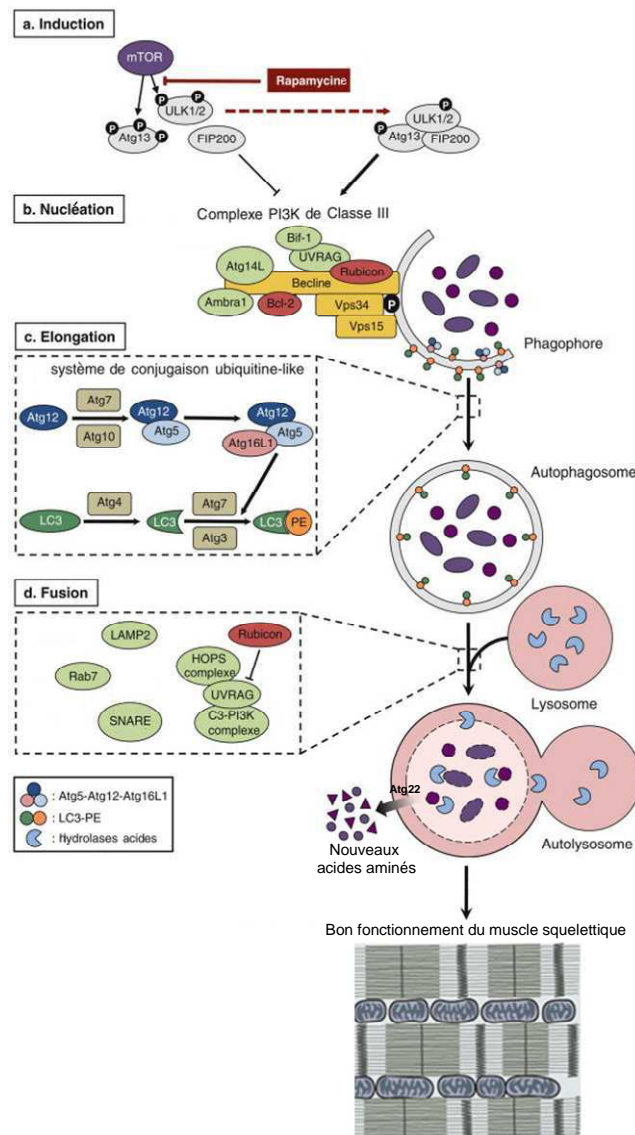
**Tableau 5** : Etudes examinant les effets des  $\beta_2$ -agonistes sur la calpaïne et la calpastatine *in vivo*.

$\beta_2$ -agonistes	Dose	Voie d'administration	Durée du traitement	Modèle animal (muscle)	Effets des $\beta_2$ -agonistes sur la calpaïne		Effets des $\beta_2$ -agonistes sur la calpastatine	Références
					$\mu$ - calpaïne (I)	m- calpaïne (II)		
Cimatérol	10 mg.kg <sup>-1</sup> de nourriture	orale (dans la nourriture)	3 semaines	Agneau (L)	↘ activité (-55%)	n.d.	n.d.	(Wang & Beermann, 1988)
			3 semaines		→ activité		n.d.	
			6 semaines		↘ activité (-70%)	n.d.	n.d.	
			6 semaines		→ activité		n.d.	
Cimatérol	1,5 mg.kg <sup>-1</sup>	orale (dans la nourriture)	16 semaines	Bœuf (LD)	→ activité	↗ activité (+27%) → ARNm (+30%)	↗ activité (+76%) ↗ ARNm (+97%)	(Parr <i>et al.</i> , 1992)
Clenbutérol	5 mg.kg <sup>-1</sup> de nourriture	orale (dans la nourriture)	24 heures	Porc (L)	n.d.	→ protéine calpaïne 3	n.d.	(Sensky <i>et al.</i> , 2006)
Clenbutérol	1 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	injection s.c.	21 jours	Souris (TA)	↗ activité		↘ protéine endogène (-35%)	(Douillard <i>et al.</i> , 2012)
Clenbutérol	4 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	injection s.c.	6 heures 12 heures 3 jours 9 jours 14 jours 21 jours	Rat (EDL, SOL)	→ activité ↗ activité ↗ activité ↗ activité ↗ activité ↗ activité		n.d.	(Douillard <i>et al.</i> , 2011)
Clenbutérol	1 mg.kg <sup>-1</sup> de nourriture	orale (dans la nourriture)	27 jours	Veau (L)	→ activité	→ activité	↗ activité (+38%)	(Geesink <i>et al.</i> , 1993)
Clenbutérol	1,6 mg.jour <sup>-1</sup>	orale (dans le lait)	4 semaines	Veau (LT)	→ activité	↗ activité (+69%)	↗ activité (+64%)	(Garssen <i>et al.</i> , 1995)
Clenbutérol	10 mg.jour <sup>-1</sup>	orale (dans la nourriture)	5 semaines	Boeuf (LT)	↘ activité (de -31 à -54%)	→ activité	↗ activité (de +49% à +137%)	(Luno <i>et al.</i> , 1999)
Clenbutérol	2 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	orale (dans la nourriture)	6 semaines	Agneau (LD)	→ activité ↘ activité (-25%)	↗ activité (+100%)	↗ activité (+99%)	(Higgins <i>et al.</i> , 1988)
Formotérol	2 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	injection i.p.	7 jours	Rat (GAS)	n.d.	↗ ARNm (+87%)	n.d.	(Busquets <i>et al.</i> , 2004)
Formotérol	2 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	injection i.p.	15 jours	Souris (GAS)	n.d.	↗ ARNm (+36%)	n.d.	(Busquets <i>et al.</i> , 2004)
Formotérol	0,1 mg.kg <sup>-1</sup> .jour <sup>-1</sup>	injection i.p.	1 jour 7 jours 28 jours	Souris (TA)	↘ activité ; → ARNm ↘ activité ; → ARNm → activité ; → ARNm		→ ARNm ; → protéine → ARNm ; ↗ protéine (+30%). → ARNm ; → protéine	(Koopman <i>et al.</i> , 2010)
L-644-969	4 mg.kg <sup>-1</sup> de nourriture	orale (dans la nourriture)	6 semaines	Agneau (L)	→ activité	↗ activité (+25%)	↗ activité (+63%)	(Koochmaraie <i>et al.</i> , 1991)
Salbutamol	100 mg.jour <sup>-1</sup>	orale (dans le lait)	4 semaines	Veau (LT)	→ activité	↗ activité (+59%)	↗ activité (+51%)	(Garssen <i>et al.</i> , 1995)

EDL, *extensor digitorum longus* ; GAS, *gastrocnemius* ; i.p., intraperitonéale ; L, *longissimus* ; LD, *longissimus dorsi* ; LT, *longissimus thoracis* ; n.d., non déterminé ; s.c., sous-cutanée ; SOL, *soleus* ; TA, *tibialis anterior* ; ↗, augmentation ; ↘, diminution ; →, pas de modification significative.

#### VII.4.2 Le système calpaïne/calpastatine et les $\beta_2$ -agonistes

Le muscle squelettique contient trois protéases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , la calpaïne I ( $\mu$ -calpaïne), la calpaïne II (m-calpaïne), qui sont exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme, et la calpaïne III (p94) spécifique au muscle (Jones *et al.*, 1999). La calpaïne I est activée par de faibles concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$ , alors que la calpaïne II est activée par de fortes concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$ . L'activité des calpaïnes est augmentée dans le muscle de souris dystrophiques (Spencer *et al.*, 1995) et l'inhibition des calpaïnes augmente la force musculaire chez des souris *mdx* (Burdi *et al.*, 2006). L'activité de ces 3 protéases est régulée négativement par la calpastatine. La surexpression de la calpastatine induirait une hypertrophie musculaire et protégerait contre l'atrophie musculaire (Tidball & Spencer, 2002; Otani *et al.*, 2004). La stimulation de la voie dépendante de l'AMPC augmente à la fois la transcription du gène, mais également la phosphorylation de la calpastatine (Cong *et al.*, 1998). En présence de formotérol ( $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), aucune modification de l'expression de calpaïne II *in vitro* n'est observée (Amettler *et al.*, 2011). Peu de données relatent l'effet de l'administration de  $\beta_2$ -agonistes sur la calpaïne III. Ainsi, il semblerait que la traduction de la protéine calpaïne III ne soit pas modifiée en présence de clenbutérol *in vivo* (Sensky *et al.*, 2006). La plupart des études ont montré que les  $\beta_2$ -agonistes diminuaient d'une part la protéolyse dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (Navegantes *et al.*, 2001), mais également l'activité de la calpaïne I (Higgins *et al.*, 1988; Wang & Beermann, 1988; Luno *et al.*, 1999), et augmentaient, d'une façon surprenante, celle de la calpaïne II (Higgins *et al.*, 1988; Koohmaraie *et al.*, 1991; Parr *et al.*, 1992; Garssen *et al.*, 1995; Busquets *et al.*, 2004) (**Tableau 5**). Bien qu'une étude récente ait décrit une diminution de la quantité de protéine calpastatine en présence de clenbutérol (Douillard *et al.*, 2012), la majorité des études montre une augmentation de l'activité de la calpastatine (Higgins *et al.*, 1988; Koohmaraie *et al.*, 1991; Parr *et al.*, 1992; Geesink *et al.*, 1993; Garssen *et al.*, 1995; Luno *et al.*, 1999). Ces derniers résultats suggèrent que les  $\beta_2$ -agonistes, en augmentant l'activité de la calpastatine, inhibent le système protéolytique dépendant de la calpaïne, soutenant ainsi l'hypertrophie musculaire.



**Figure 36 :** Représentation schématique de la signalisation mise en jeu lors de l'autophagie. a. mTOR joue un rôle central dans la suppression de l'induction de l'autophagie en liant et phosphorylant le complexe ULK1/2-Atg13-FIP200. Lorsque l'autophagie est stimulé (avec de la rapamycine notamment), mTOR est réprimée et cause ainsi une hypophosphorylation du complexe ULK1/2-Atg13-FIP200, menant à l'induction de l'autophagie. b. La formation du phagophore est induite par le complexe PI3K de classe III, composé de trois protéines : Vps34, Vps15 et Becline1. L'activité de ce complexe dépend de nombreux régulateurs positifs (en vert) ou négatifs (en rouge) qui s'associent avec Becline1. c. L'élongation de l'autophagosome implique deux systèmes de conjugaison ubiquitine-like, Atg12 et LC3, qui s'associent avec le phagophore et finalisent sa formation. d. L'autophagosome fusionne avec le lysosome. Après maturation de cet ensemble, celui-ci forme un autolysosome sous l'action de régulateurs positifs (en vert) ou négatifs (en rouge). La membrane interne et les constituants de l'autolysosome sont dégradés par les hydrolases acides et exportés dans le cytoplasme pour une utilisation ultérieure. Ambra1, activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy protein-1 ; Atg, autophagy genes ; Bcl-2, B cell lymphoma-2 ; Bif-1, Bax-interacting factor-1 ; FIP200, FAK family kinase-interacting protein of 200 kD ; HOPS, homotypic vacuole fusion and protein sorting ; LAMP2, lysosomal Associated Membrane Protein 2 ; LC3, light chain 3 ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; PE, phosphatidylethanolamine ; (C3) PI3K, (class III) phosphatidylinositol 3-kinase ; Rab7, Ras-related GTPase 7 ; SNARE, N-ethyl-maleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor ; ULK1/2, Unc-51-like kinase 1/2 ; UVRAG, UV irradiation resistance-associated gene ; Vps, vacuolar protein sorting [modifié d'après (Kim *et al.*, 2010a)].

### VII.4.3 L'autophagie et le turnover protéique

Dans le muscle squelettique, la phosphorylation de FoxO3a induite par les  $\beta_2$ -agonistes empêche l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'autophagie (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). L'autophagie est un processus catabolique par lequel des portions de cytoplasme incluant des protéines agrégées et des organelles endommagées se retrouvent englobées par une double membrane, formant ainsi des vésicules. Ces dernières vont fusionner avec des lysosomes, ce qui va former des autophagosomes qui vont dégrader, hydrolyser et servir au recyclage de ce contenu. Les éléments résultants, ainsi dégradés, retournent dans le cytosol où ils serviront à la synthèse de nouvelles molécules nécessaires au maintien de l'activité cellulaire (**Figure 36**). L'autophagie est un processus finement régulé et des anomalies la concernant engendrent/sont associées à de multiples pathologies (cancer, myopathies et neurodégénérescence) (Mizushima *et al.*, 2008). L'impact des  $\beta_2$ -agonistes sur l'autophagie est un mécanisme encore méconnu. Il a été montré, dans le muscle squelettique de souris, que les  $\beta_2$ -agonistes ne modifiaient pas la transcription en ARNm de *LC3* (Koopman *et al.*, 2010; Goncalves *et al.*, 2012) et de *gabapll1* (Goncalves *et al.*, 2012), des acteurs majeurs de l'autophagie. Néanmoins, la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par l'isoprotérénol augmente le flux autophagique dans les fibroblastes cardiaques de rat (Aranguiz-Urroz *et al.*, 2011), ce qui pourrait suggérer une implication des  $\beta_2$ -agonistes dans l'autophagie.





**En conclusion, les effets anaboliques des  $\beta_2$ -agonistes sont attribués à l'activation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques qui sont directement couplés à des protéines  $G\alpha_s$  et indirectement à  $G\alpha_i$ . Après stimulation de ces récepteurs, la voie « canonique » des  $\beta_2$ -agonistes faisant intervenir la protéine kinase A (PKA) et CREB, induit la transcription de gènes spécifiques du muscle impliqués dans l'induction de l'hypertrophie musculaire. Néanmoins, la voie PKA/CREB ne semble pas être la seule mise en jeu lors d'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique puisque des marqueurs de l'initiation de la traduction, dépendants de la voie PI3K/Akt/mTOR, sont également activés. Ainsi, les  $\beta_2$ -agonistes régulent positivement la synthèse protéique, en partie, grâce à l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. Néanmoins, le lien moléculaire entre la voie « canonique des  $\beta_2$ -agonistes » et la voie PI3K/Akt/mTOR reste encore à définir. La protéine Epac semble être un bon candidat. Le développement d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques offre un grand intérêt pour élucider l'action de cette protéine dans la signalisation intracellulaire. En plus de réguler positivement la synthèse protéique, les  $\beta_2$ -agonistes diminuent la dégradation des protéines en inhibant la voie ubiquitine-protéasome et en activant la calpastatine, un inhibiteur de la voie protéolytique dépendante du calcium. Enfin, peu de données existent à ce jour sur l'effet des  $\beta_2$ -agonistes sur l'autophagie.**

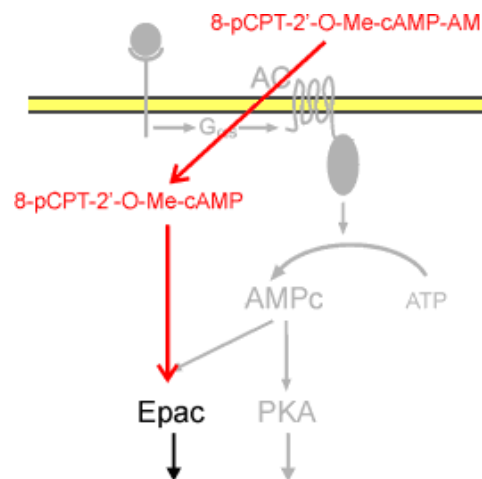


# **HYPOTHESES ET OBJECTIFS**



Le premier objectif de ce travail a été de déterminer les événements moléculaires responsables de l'hypertrophie du muscle squelettique après une stimulation aiguë (1 jour) et prolongée (3 et 10 jours) de formotérol. Nous avons émis l'hypothèse que l'activation de la voie de signalisation Akt/mTOR, en réponse à l'administration de formotérol, serait associée à une régulation temporelle des voies ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome.

De plus, le lien moléculaire entre la voie canonique PKA/CREB stimulée par les  $\beta_2$ -agonistes et la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR mérite d'être approfondi. Depuis le début des années 2000 et le développement de nouveaux analogues de l'AMPc, nous disposons de nouvelles molécules agissant en aval du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique et permettant de s'affranchir de l'impact des  $\beta_2$ -agonistes sur les récepteurs. Développer de tels produits permet notamment d'éviter la désensibilisation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques lors d'une exposition prolongée aux  $\beta_2$ -agonistes. Parmi ces produits, le 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM, alias 007-AM, un activateur spécifique d'Epac, pourrait exercer une action anabolisante sur le tissu musculaire comparable à celle exercée par les  $\beta_2$ -agonistes et jouer ainsi le rôle de lien moléculaire entre la voie stimulée par les  $\beta_2$ -agonistes et la voie de signalisation Akt/mTOR (**Figure 37**). Notre second objectif est de déterminer l'effet du 007-AM sur la masse musculaire et son implication sur la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.



**Figure 37** : Activation d'Epac par la molécule 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM, alias 007-AM (Vliem *et al.*, 2008).



**MATERIEL ET  
METHODES**





## Prélèvement tissulaire et conditionnement des échantillons

---

### Références

- Xylazine 2 % (Bayer)
- Kétamine 50 mg.mL<sup>-1</sup> (Panpharma)
- Colle Optimal Cutting Temperature (O.C.T) Compound (VWR 361603E)

### Principe

Après la fin du traitement au  $\beta_2$ -agoniste, les muscles sont prélevés sur l'animal vivant profondément anesthésié par un mélange de Xylazine et Kétamine. Les muscles sont directement et systématiquement pesés entiers avant leur conditionnement. A la suite du prélèvement, l'animal est sacrifié par une surdose de produit anesthésique.

### Protocole

Le muscle entier (de la souris) ou la portion centrale du muscle (du rat) est plongé dans de l'azote liquide jusqu'à congélation complète de l'échantillon. Pour l'histologie, la portion centrale du muscle *tibialis anterior* est fixée sur un support de liège à l'aide d'une colle et instantanément plongée dans l'azote liquide pendant 30 secondes. Pour réaliser une extraction protéique, l'échantillon est préalablement réduit en poudre sous azote liquide à l'aide d'un pilon.

## Coloration histochimique : Hemalun-Eosine-Safran (HES)

---

La coloration à l'hémalun-éosine-safran permet de mettre en évidence les noyaux et le cytoplasme. Cette coloration associe une laque nucléaire (hémalun), un colorant cytoplasmique (l'éosine) et un colorant du collagène III (le safran). A la suite d'une coloration HES, les noyaux apparaissent en bleu, le cytoplasme en rose et la matrice extracellulaire en jaune.

1. Tremper la lame pendant 5 min à température ambiante dans l'hémalun.
2. Rincer abondamment à l'eau.
3. Tremper la lame 10 secondes dans un bain d'acide chlorhydrique dilué (1 mL HCl dans 250 mL d'eau).
4. Rincer abondamment à l'eau.
5. Tremper la lame 2 min à température ambiante dans de l'éosine 2 % (v/v).
6. Rincer abondamment à l'eau.
7. Rincer à l'alcool absolu.
8. Tremper la lame 5 min à température ambiante dans du safran.
9. Rincer abondamment à l'eau.
10. Déshydrater les coupes dans des bains successifs d'alcool.
11. La fixation des colorants est assurée par un bain de xylène pur.
12. Fixer une lamelle de protection à l'aide d'une résine de montage (Eukitt).
13. Laisser sécher les lames sous la hotte.

## Coupes histologiques

Des coupes transverses de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur du muscle *tibialis anterior* (TA) ont été réalisées chez les rats traités pendant 10 jours (2000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de poids de corps de formotérol) (Sigma Aldrich F9552) à l'aide d'un cryostat ( $-20^\circ\text{C}$ ) microtome (Microm HM 560). Ces coupes ont été colorées à l'hémalun-éosine-safran.

### Détermination de la surface de section transversale

Les coupes étaient observées au microscope photonique, relié à une caméra et un ordinateur équipé des logiciels videoApple, AdobePhotoshop-5 et NIH-1.63. Huit à onze images étaient acquises pour chaque muscle de TA de manière à avoir la totalité de la surface de la section transversale du muscle. Les images étaient ensuite enregistrées dans le logiciel AdobePhotoshop-5 puis importées dans le logiciel NIH 1.63 pour le calcul de surface totale. L'unité de mesure de la surface était le millimètre carré ( $\text{mm}^2$ ) et l'échelle de mesure était fixée à 200 pixels/ $\text{mm}^2$ .

### Estimation du nombre de fibres musculaires

Pour estimer le nombre de fibres musculaires, les acquisitions étaient réalisées comme précédemment décrit avec un grossissement  $\times 100$ . L'acquisition des images s'est faite sur la diagonale du muscle allant du bord supérieur externe vers le bord inférieur interne. Cinq champs disposés dans les sections de chaque muscle étaient choisis et la surface de section de  $1062 \pm 309$  fibres par muscle était déterminée. Pour chaque image, le comptage des fibres était fait sur une surface de  $1,6 \text{ mm}^2$  représentant 5 % de la surface totale du muscle à un grossissement  $\times 100$ . L'unité de mesure de la surface était le  $\text{mm}^2$  et l'échelle de mesure était fixée à 500 pixels/ $\text{mm}^2$ . Les analyses étaient réalisées à l'aide d'un microscope optique connecté à un logiciel d'analyse d'images (ImageJ analysis software).

### Mesure de la surface des fibres musculaires

La mesure des surfaces de fibre a été réalisée avec le logiciel NIH 1.63 image. Après avoir établi l'échelle de mesure, nous avons mesuré un total de 300 fibres par muscle sur un total de quatre à neuf acquisitions (en fonction de la taille du muscle).

### Détermination de la distribution des fibres de type I et II

Pour la détermination de la distribution des fibres de type I et II, les coupes de muscles étaient fixées avec de l'acétone à  $-20^\circ\text{C}$ , perméabilisées avec 0,1 % Triton X-100/PBS, et incubées avec des anticorps primaires spécifiques (NCL-MHCf Novocastra) puis avec des anticorps secondaires marqués FITC. Les images numériques étaient obtenues grâce à un microscope à fluorescence (Olympus IX81) connecté à un logiciel d'analyse d'image (ImageJ analysis software).

## Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse

La Chromatographie Liquide Ultra-haute Performance (UPLC) (Acquity Ultra Performance LC, Waters) est couplée à un spectromètre de masse triple-quadripôle en tandem (MS/MS) (Waters Quattro micro). La colonne de séparation utilisée est une Luna 3 $\mu$  C18 (2) Mercury Phenomenex 20 x 4mm avec une température de 40°C et une granulométrie de 5  $\mu$ m.

### Principe et description de la chromatographie liquide

La méthode chromatographique est une technique séparative des différents solutés d'un échantillon. Le mécanisme de séparation s'explique par l'affinité des solutés pour la phase stationnaire qui tend à les retenir mais aussi par leur solubilité dans la phase mobile. Cet appareil est formé de :

- réservoirs à solvants qui sont des pompes qui délivrent en continu la phase mobile,
- l'injecteur qui est une boucle d'injection qui permet d'injecter un volume fixe de l'échantillon dans la colonne,
- une colonne de séparation qui contient la phase stationnaire,
- le compartiment de dépôt de l'échantillon.

Le système chromatographique contient 2 phases : une phase mobile et une phase stationnaire.

La phase mobile, hydrophile et polaire circule constamment dans le système chromatographique grâce à l'action de pompes. Cette phase est formée d'un mélange de 2 solvants : un aqueux et un organique. L'échantillon à étudier est déposé dans les puits d'une plaque et va être prélevé par une aiguille. L'échantillon va être ensuite envoyé aux colonnes grâce à l'action de la boucle d'injection. Dans la colonne de séparation se trouve la phase stationnaire constituée de billes de silice. L'échantillon passe au travers de la colonne. Plus les solutés seront apolaires et plus ils seront retenus par la colonne. Les interactions des différents solutés avec la phase stationnaire ralentissent plus ou moins la migration à travers la colonne selon les propriétés respectives de chaque molécule. L'élution va se dérouler grâce au gradient c'est-à-dire une modification des proportions de chacun des 2 solvants. Le temps de rétention va permettre de juger la rétention des molécules.

### Principe et description du spectromètre de masse «en tandem».

Son principe repose sur la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).

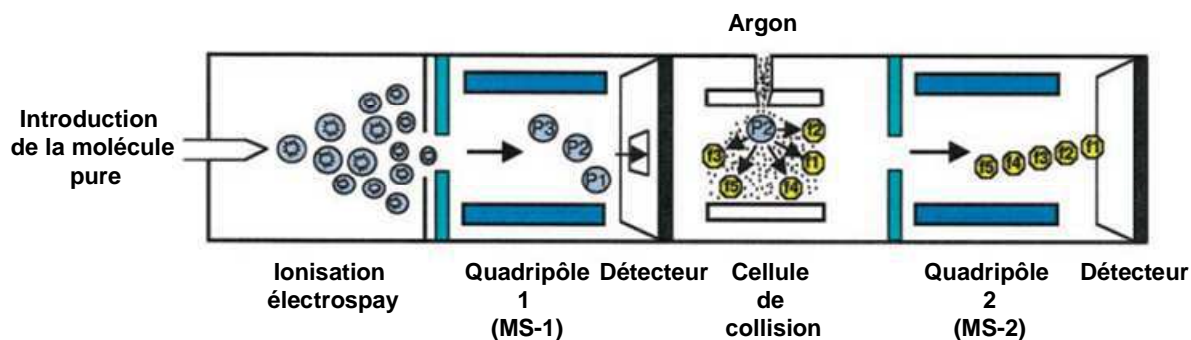


Figure 38 : Principe du spectromètre de masse [modifié d'après (Li & Assmann, 2000)]

Le flux de phase mobile provenant de la chromatographie arrive dans l'électrospray où il est vaporisé à pression atmosphérique. L'électrospray a une fonction de production d'ions. Les molécules vont être chargées et dispersées. Les ions créés passent alors dans le triple quadripôle : tout d'abord dans l'analyseur 1 qui est un filtre de masse puis dans la cellule de collision où il va se produire une fragmentation. Cette cellule est remplie d'un gaz inerte : l'argon et ses atomes neutres vont entrer en collision avec les ions. Lors de ces chocs, l'énergie cinétique est convertie en énergie interne ce qui provoque un fractionnement de la molécule en fragments caractéristiques de cette dernière. Les molécules passent ensuite dans l'analyseur 2 qui est du même type que l'analyseur 1. Pour finir, les ions arrivent sur une dynode qui va convertir le courant ionique en courant électrique (**Figure 38**).

La spectrométrie de masse a une double sélectivité car l'analyseur 1 va sélectionner un ion parent, idéalement la molécule entière protonée, suivant un ratio  $m/z$  fixé. Cet ion parent sera ensuite divisé en fragments caractéristiques appelés ions fils. Ces ions seront eux aussi sélectionnés selon leur ratio  $m/z$  dans l'analyseur 2.

### Optimisation des paramètres

L'étape d'infusion permet de déterminer le ratio  $m/z$  de l'ion moléculaire protoné (ion parent) et des ions de fragmentation (ions fils). L'ion fils majoritaire est utilisé comme ion de quantification alors que les autres ions vont servir d'ions de confirmation pour l'identification du composé analysé. Elle consiste à injecter une solution pure directement dans la source du spectromètre sans passer par le système chromatographique. L'infusion permet de définir les paramètres du spectromètre de masse tels que :

- la tension de capillaire qui aide à capter les protons  $H^+$  lors de l'ionisation (2 kV),
- l'énergie de collision est l'énergie pour que les molécules de gaz rentrent en collision avec les ions parents (20 V pour le 007 et 25 V pour le 007-AM),
- le flux de gaz à la sortie du cône (35 L/h pour le 007 et 45 L/h pour le 007-AM).

### Déprotéinisation

La déprotéinisation est une étape d'élimination des protéines plasmatiques. Le Nordiazéпам D5 va servir à la fois d'étalon interne et va permettre de déprotéiniser notre phase induisant un arrêt de la réaction. L'étalon interne a pour rôle d'atténuer les erreurs pré analytiques et analytiques.

### Produits chimiques et réactifs

- Le 8- (4- Chlorophenylthio)- 2'- O- methyladenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP) (007) et le 8- (4- Chlorophenylthio)- 2'- O- methyladenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate, acetoxymethyl ester (007-AM) étaient synthétisés par Biolog Life Science Institute (Bremen, Allemagne).
- Le méthanol et le plasma de souris étaient respectivement obtenus par Fischer Scientific GmbH (Schwerte, Allemagne) et Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).
- Le milieu de différenciation (DMEM + 2 % de sérum de cheval) provenait de chez PAA (Les Mureaux, France).

Le Nordiazéпам D5 était utilisé comme étalon interne.

Un filtre de 0,2  $\mu m$  de polyvinylidène fluorure était utilisé pour les phases mobiles et fourni par Interchim (Montluçon, France).

### Préparation des échantillons

Les solutions mères de 007 ( $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et de 007-AM ( $0,56 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) étaient préparées extemporanément dans du méthanol. Ces solutions étaient ensuite diluées au  $10^{\text{ème}}$  dans du méthanol. Une calibration était effectuée pour chacune des 3 phases : méthanol, plasma de souris et milieu de différenciation. Un volume ( $25 \text{ }\mu\text{L}$ ) du calibrateur était ensuite prélevé aux temps, T 0 min, T 5 min, T 15 min, T 30 min, T 1h, T 2h et T 24h puis ajouter instantanément à l'étalon interne (Nordiazépan D5). Après 4 min de centrifugation à 10 800 rpm, le surnageant était prélevé puis injecté dans le système de Chromatographie Liquide Ultra-haute Performance (UPLC).

## Extraction protéique avec tampon complet sur tissu musculaire/cellules

### Références

- Tris HCL : Tris hydrochloride (PM = 157,6 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich T3253)
- NaCl : Sodium chloride (PM = 58,44 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich S5886)
- EDTA : Acide éthylène diamine tétracyclique (PM = 292,2 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich EDS)
- EGTA : Acide éthylène glycol-bisβaminoéthyléther tétraacétique (PM = 380,35 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich E4378)
- β-glycérophosphate (PM = 216,04 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich G6251)
- Sodium fluorure (PM = 41,99 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich S7920)
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> : Sodium orthovanadate (PM = 183,91 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich S6508)
- Acide okadaïque (PM = 826,98 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich O7760)
- Benzamidine (PM = 156,61 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich B6506)
- PMSF : Phénylméthanesulfomyl fluoride (PM = 174,19 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich P7626)
- Aprotinin (PM = 6511,44 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich A1153)
- Leupeptin (PM = 475,59 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich L8511)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich T8532)
- DPBS (PAA H15-002)

### Protocole

#### Les solutions

EDTA	200 mmol.L <sup>-1</sup>	pH = 8,0
EGTA	200 mmol.L <sup>-1</sup>	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	100 mmol.L <sup>-1</sup>	
Acide okadaïque	605 μmol.L <sup>-1</sup>	
Benzamidine	300 mmol.L <sup>-1</sup>	
PMSF	100 mmol.L <sup>-1</sup>	
Aprotinine	1 μg.μl <sup>-1</sup>	
Leupeptine	1 μg.μl <sup>-1</sup>	



préparation du tampon complet

Concentration solution finale	Concentration solution mère	Volume solution finale, mL					
		5 mL	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL	50 mL
Tris HCl 50 mmol.L <sup>-1</sup> , mg		39,4	78,8	157,6	236,4	315,2	394,0
NaCl 100 mmol.L <sup>-1</sup> , mg		29,2	58,4	116,9	175,3	233,8	292,2
EDTA 2 mmol.L <sup>-1</sup> , µL	200 mmol.L <sup>-1</sup>	50	100	200	300	400	500
EGTA 2 mmol.L <sup>-1</sup> , µL	200 mmol.L <sup>-1</sup>	50	100	200	300	400	500
β-glycérophosphate 50 mmol.L <sup>-1</sup> , mg		54	108	216	324	432	540
Sodium fluorure 50 mmol.L <sup>-1</sup> , mg		10,5	21,0	42,0	63,0	84,0	105,0
Sodium orthovanadate 1 mmol.L <sup>-1</sup> , µL	100 mmol.L <sup>-1</sup>	50	100	200	300	400	500
Acide okadaïque 120 nmol.L <sup>-1</sup> , µL	605 µmol.L <sup>-1</sup>	1	2	4	6	8	10
Benzamidine 3 mmol.L <sup>-1</sup> , µL	300 mmol.L <sup>-1</sup>	50	100	200	300	400	500
PMSF 1 mmol.L <sup>-1</sup> , µL	100 mmol.L <sup>-1</sup>	50	100	200	300	400	500
Aprotinine 10 µg.mL <sup>-1</sup> , µL	1 µg.µL <sup>-1</sup>	50	100	200	300	400	500
Leupeptine 10 µg.mL <sup>-1</sup> , µL	1 µg.µL <sup>-1</sup>	50	100	200	300	400	500
Triton X-100 1%, µL		100	200	400	600	800	1000

Combiner les différents réactifs. Ajuster le pH à 7,4. Ajuster le volume final dans une éprouvette graduée. Conserver à 4°C.

Inhibiteurs de protéases (à rajouter si on ne désire pas mesurer l'activité du protéasome) :

- Benzamidine
- PMSF
- Aprotinine
- Leupeptine

Inhibiteurs de phosphatases :

- Sodium fluorure
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>
- Acide okadaïque

mode opératoire pour tissu musculaire

1. Peser environ 20-25 mg de tissu dans un tube eppendorf refroidi.
2. Ajouter le tampon complet de façon à réaliser une dilution finale 1/20<sup>ème</sup> (poids/volume).
3. Homogénéiser le tissu 2 fois pendant 10 secondes dans la glace à l'Ultraturax.
4. Centrifuger à 12 000 g pendant 20 min à 4°C.
5. Récupérer le surnageant et aliquoter sous 50 µL.
6. Conserver à -80°C.

*mode opératoire pour cellules*

1. Rincer 2 fois chaque boîte ou puits avec du DPBS contenant du calcium.
2. Ajouter 250  $\mu\text{L}$  de tampon complet pour une boîte de 10 cm ou 2 x 50  $\mu\text{L}$ /puits pour une plaque 6 puits.
3. Racler avec une spatule.
4. Récupérer le tampon dans un tube eppendorf préalablement refroidi dans la glace.
5. Répéter les étapes 2, 3 et 4.
6. Vortexer vigoureusement.
7. Réaliser 3 cycles de congélation (azote liquide) – décongélation (température ambiante). Entre chaque cycle, soniquer 10 secondes.
8. Centrifuger à 10 000 g pendant 10 min à 4°C.
9. Récupérer le surnageant et aliquoter sous 50  $\mu\text{L}$ .
10. Conserver à -80°C.

## Dosage de protéines

### Références

- Bovine Serum Albumine (BSA) (PAA K41-001)
- Protein assay reagent A (BioRad 500-0113)
- Protein assay reagent B (BioRad 500-0114)

### Principe

Le kit BioRad permet de mesurer la concentration en protéines d'un extrait (réaction similaire à celle de Lowry) par colorimétrie. Pour cela, il est nécessaire d'effectuer une courbe étalon qui mesure l'absorbance d'une solution de BSA dont la concentration protéique est connue.

### Protocole

#### Courbe étalon :

Elle est réalisée à partir d'une solution de BSA à  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  (conservation à  $4^{\circ}\text{C}$ ).

Protéines, $\mu\text{g}$	0	10	20	30	40	50
$\Delta\text{H}_2\text{O}$ , $\mu\text{L}$	195	190	185	180	175	170
Tampon d'extraction, $\mu\text{L}$	5					
BSA $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , $\mu\text{L}$	0	5	10	15	20	25
Solution A, $\mu\text{L}$	100					
Solution B, $\mu\text{L}$	800					

1. Ajouter les différentes solutions dans l'ordre décrit ci-dessus directement dans la cuve de spectrophotométrie. Afin d'obtenir une coloration homogène, l'addition de la solution B doit se faire tout en vortexant. Faire les mesures en double.
2. Incuber 15 min à température ambiante à l'abri de la lumière.
3. Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 750 nm.

#### Dosage protéique d'un extrait :

Pour la mesure de la concentration des extraits protéiques, 5 à 10  $\mu\text{L}$  d'extrait doivent normalement suffire. Faire les mesures en double voire en triple pour les extraits protéiques.

$\Delta\text{H}_2\text{O}$ , $\mu\text{L}$	195	190
Extrait protéique, $\mu\text{L}$	5	10
Solution A, $\mu\text{L}$	100	100
Solution B, $\mu\text{L}$	800	800

1. Ajouter les différentes solutions dans l'ordre décrit ci-dessus directement dans la cuve de spectrophotométrie. Afin d'obtenir une coloration homogène, l'addition de la solution B doit se faire tout en vortexant.
2. Incuber 15 min à température ambiante à l'abri de la lumière.
3. Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 750 nm.

## Hexokinase

### Références

- Tris : Trizma Base (PM = 121,14 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich T1503)
- MgCl<sub>2</sub> : Magnésium chlorure (PM = 203,31 g.mol<sup>-1</sup>) (Prolabo 25 108.295)
- Glucose (PM = 180,16 g.mol<sup>-1</sup>) (Prolabo 24 370.294)
- NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (PM = 787,4 g.mol<sup>-1</sup>) (Roche 128058)
- ATP : Adénosine triphosphate (PM = 605,2 g.mol<sup>-1</sup>) (Roche 519 979)
- DTT : Dithiothreitol (PM = 154,3 g.mol<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich D9163)
- G6P : Glucose-6-phosphate (PM = 304,2 g.mol<sup>-1</sup>) (Roche 127 027)
- G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase (Roche 127 655)
- Fluorimètre (SFM 25 Kontron Instruments)

### Principe

En présence de glucose et d'ATP, l'hexokinase (HK) va produire du glucose-6-phosphate et de l'ADP. Les conditions expérimentales permettent d'obtenir rapidement une situation d'équilibre. La modification de l'équilibre réactionnel est rendue possible par la consommation du glucose-6-phosphate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Il en résulte une production de NADH,H<sup>+</sup> et de gluconolactone-6-phosphate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui est directement proportionnelle à l'activité de l'hexokinase.



### Protocole

#### Solutions

Tris	1 mol.L <sup>-1</sup>	pH = 8,0
MgCl <sub>2</sub>	400 mmol.L <sup>-1</sup>	
Glucose	100 mmol.L <sup>-1</sup>	
NADP	100 mmol.L <sup>-1</sup>	
ATP	200 mmol.L <sup>-1</sup>	
DTT	10 %	
G6P	10 mmol.L <sup>-1</sup>	
G6PDH	117 U.mL <sup>-1</sup>	

## Préparation du milieu réactionnel (MR)

Solution stock	Volume à rajouter	Concentration finale
Tampon Tris 1 mol.L <sup>-1</sup> pH = 8,0	5 mL	50 mmol.L <sup>-1</sup>
MgCl <sub>2</sub> 400 mmol.L <sup>-1</sup>	500 µL	2 mmol.L <sup>-1</sup>
NADP 100 mmol.L <sup>-1</sup>	75 µL	75 µmol.L <sup>-1</sup>
Glucose 100 mmol.L <sup>-1</sup>	2 mL	2 mmol.L <sup>-1</sup>
DTT 10 %	100 µL	0,01 %

Ajuster le volume final à 100 mL avec ΔH<sub>2</sub>O dans une éprouvette graduée.

Etalonnage du fluorimètre

$\lambda_{\text{excitation}} = 340 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{émission}} = 450 \text{ nm}$

Faire le point haut à 150 sur 10 nmoles de G6P et le 0 sur 0 nmoles de G6P.

Courbe étalon

Faire une dilution du G6P à 10 mmol.L<sup>-1</sup> au 1/20<sup>ème</sup> pour avoir une solution finale de G6P à 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>.

nmoles de G6P	0	2,5	5	7,5	10
Milieu réactionnel, mL	←————— 1 —————→				
G6P 0,5 mmol.L <sup>-1</sup> , µL	0	5	10	15	20
Δ H <sub>2</sub> O, µL	50	45	40	35	30
G6PDH, µL	←————— 10 —————→				

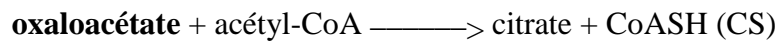
Incuber 20 min dans l'obscurité à température ambiante.

Mode opératoire

1. Mettre 1 mL de milieu réactionnel.
2. Ajouter 10 µL G6PDH.
3. Ajouter 2,5 µL d'extrait.
4. Attendre 4 min à température ambiante.
5. Déclencher la réaction en ajoutant 10 µL d'ATP 200 mmol.L<sup>-1</sup>.
6. Suivre la réaction pendant 15 min.

## Citrate Synthétase

### Principe



*Abréviations* : CS, citrate synthétase ; CoA, coenzyme A ; MDH, malate déshydrogénase.

En présence de  $\text{NAD}^+$  et de malate, MDH va produire de l'oxaloacétate et du  $\text{NADH,H}^+$ . Les conditions expérimentales permettent d'obtenir rapidement une situation d'équilibre. La modification de l'équilibre réactionnel est rendue possible par la consommation d'oxaloacétate due à CS en présence d'acétyl-CoA. Il en résulte que la production de  $\text{NADH,H}^+$  et d'oxaloacétate par MDH est proportionnelle à l'activité CS (asservissement de la réaction catalysée par MDH à la réaction catalysée par CS).

*Activité* :

- vaste externe (homme) : 10-14  $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  muscle frais.
- soléaire (rat) : 10-15  $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais.
- EDL (rat) : 9  $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais.

### Réactifs

\* Tris 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH = 8,0

Peser 12,1 g de Tris (PM = 121,1  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Compléter jusqu'à 90 mL avec  $\Delta\text{H}_2\text{O}$ . Ajuster à pH = 8,0. Ajuster le volume final à 100 mL avec  $\Delta\text{H}_2\text{O}$  dans une éprouvette graduée.

\* Acétyl-CoA 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Dissoudre 10 mg d'acétyl-CoA (Sigma A2056 ; PM = 809,6  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) avec 2,45 mL  $\Delta\text{H}_2\text{O}$ . Aliquoter sous 50  $\mu\text{L}$  et conserver à  $-20^\circ\text{C}$ . **Attention** : l'acétyl-CoA une fois décongelé ne peut être recongelé.

\* EDTA 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Peser 584,4 mg d'EDTA (PM = 292,2  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Compléter jusqu'à 10 mL avec  $\Delta\text{H}_2\text{O}$  dans une éprouvette graduée. Ajuster éventuellement le pH autour de 7,4-7,5 pour obtenir une meilleure dissolution. Aliquoter sous 500  $\mu\text{L}$  et conserver à  $-20^\circ\text{C}$ .

\* Malate 250  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Peser 445 mg de malate (Sigma M-9138, PM = 178,1  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec  $\Delta\text{H}_2\text{O}$  dans une éprouvette graduée. Aliquoter sous 250  $\mu\text{L}$  et conserver à  $-20^\circ\text{C}$ .

\* MDH (Roche 127 256)

1200  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  (5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) soit 6000  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Vérifier la concentration en protéine et l'activité qui varie légèrement suivant les lots. Ajuster le volume pour le milieu réactionnel en fonction.

\*  $\text{NAD}^+$  50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Peser 331,7 mg  $\text{NAD}^+$  (Roche 127 965 ; PM = 663,4  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec  $\Delta\text{H}_2\text{O}$  dans une éprouvette graduée. Aliquoter sous 250  $\mu\text{L}$  et conserver à  $-20^\circ\text{C}$ .

\* NADH,H<sup>+</sup> 1 mmol.L<sup>-1</sup>

Peser 7,1 mg NADH,H<sup>+</sup> (Roche 107 735 ; PM = 709,4 g.mol<sup>-1</sup>). Noter la pesée exactement. Dissoudre dans un volume final de 10 mL avec ΔH<sub>2</sub>O dans une éprouvette graduée. Recalculer la concentration exacte en fonction de la pesée

\* Triton X-100 10 %

Pipeter 1 mL de Triton X-100. Compléter le volume jusqu'à 10 mL avec ΔH<sub>2</sub>O dans une éprouvette graduée. Conserver à température ambiante dans un Falcon 15 mL.

### Préparation du milieu réactionnel

Les concentrations finales indiquées correspondent aux concentrations finales dans 1 mL dans le tube de mesure.

Solution stock	Volume à rajouter	Concentration finale
Tris 1 mol.L <sup>-1</sup> pH = 8,0	5 mL	100 mmol.L <sup>-1</sup>
EDTA 200 mmol.L <sup>-1</sup>	500 μL	2 mmol.L <sup>-1</sup>
Malate 250 mmol.L <sup>-1</sup>	250 μL	1,25 mmol.L <sup>-1</sup>
NAD <sup>+</sup> 50 mmol.L <sup>-1</sup>	250 μL	0,25 mmol.L <sup>-1</sup>
MDH 6000 unités.mL <sup>-1</sup>	50 μL	6 unités.mL <sup>-1</sup>

Ajuster le volume final à 48,5 mL avec ΔH<sub>2</sub>O dans une éprouvette graduée.

### Étalonnage :

On construit la courbe étalon avec des concentrations croissantes de NADH,H<sup>+</sup> 1 mmol.L<sup>-1</sup>

#### Plan de pipetage pour l'étalonnage :

nmoles de NADH,H <sup>+</sup>	0	2	4	6	8	10
NADH,H <sup>+</sup> 1 mmol.L <sup>-1</sup> , μL	0	2	4	6	8	10
ΔH <sub>2</sub> O, μL	30	28	26	24	22	20
MR, μL	←————— 970 μL —————→					

Mesurer au fluorimètre : λ<sub>excitation</sub> = 340 nm ; λ<sub>émission</sub> = 450 nm

## Mesure de la vitesse de réaction

### Dilution des échantillons :

- Soléaire (rat): 10  $\mu\text{L}$  au  $1/20^{\text{ème}}$
- EDL (rat) : 10  $\mu\text{L}$  au  $1/20^{\text{ème}}$
- TA (rat) : 10  $\mu\text{L}$  au  $1/30^{\text{ème}}$
- Vaste externe humain : 10  $\mu\text{L}$  au  $1/10^{\text{ème}}$

### Ajouter dans l'ordre les réactifs suivants :

- 970  $\mu\text{L}$  MR
- 10  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 10 % au milieu réactionnel.
- 10  $\mu\text{L}$  d'homogénat ou de suspension mitochondriale à la dilution appropriée.
- attendre 6 min à température ambiante afin de permettre au Triton X-100 de solubiliser les membranes mitochondriales.
- déclencher la réaction en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  d'acétyl-CoA 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  (soit 50 nmoles d'acétyl-CoA par mL de milieu de réactionnel).
- attendre au moins 8 min à température ambiante (la réaction est plus stable et plus régulière)
- suivre la réaction au fluorimètre ( $\lambda_{\text{excitation}} = 340 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 450 \text{ nm}$ ) pendant plusieurs minutes.



La protéolyse ubiquitine ATP dépendante joue un rôle majeur dans la dégradation des protéines musculaires. La dégradation est assurée par un complexe protéolytique comprenant le protéasome 26S, lui-même constitué du protéasome 20S, le cœur de la machinerie protéolytique, et de 2 complexes de régulation 19S. Le protéasome présente 5 activités enzymatiques différentes dont trois principales : l'activité chymotrypsine-like (la principale), l'activité trypsine-like et l'activité caspase-like (PGPH).

Pour chacune de ces 3 activités « -like », un peptide spécifique lié à un AMC est utilisé comme substrat fluorogénique. La reconnaissance du substrat par le site actif de l'enzyme détermine la coupure de la liaison entre l'AMC et le tétrapeptide. La fluorescence de la molécule d'AMC, qui est alors libérée, peut être suivie au fluorimètre à 460 nm. La spécificité de la réaction peut être vérifiée à l'aide d'un inhibiteur spécifique.

## Activité Chymotrypsine-Like

Le peptide Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC est ici utilisé comme substrat fluorogénique. La spécificité de la réaction peut être vérifiée à l'aide d'un inhibiteur spécifique du complexe 20S, le peptide Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-CHO.

### Réactifs et solutions

#### Milieu réactionnel :

Le milieu réactionnel est un tampon imidazole 60 mmol.L<sup>-1</sup> pH = 7,4.

Peser 408,6 mg d'imidazole (PM = 68,1 g.mol<sup>-1</sup>). Dissoudre dans 90 mL ΔH<sub>2</sub>O.

Ajuster le pH à 7,4, puis compléter le volume final à 100 mL avec ΔH<sub>2</sub>O dans une éprouvette graduée.

#### Solution AMC étalon :

La solution étalon est une solution de 7-amino-4-méthyl-coumarin (Sigma A-9891, PM = 175,2 g.mol<sup>-1</sup>). Peser 7 mg d'AMC et dissoudre avec 10 mL de DMSO dans une éprouvette graduée (solution mère à 4 mmol.L<sup>-1</sup>). Aliquoter et conserver à -20°C à l'abri de la lumière. Le jour de l'expérimentation, faire une dilution au 1/400<sup>ème</sup> de cette solution mère avec ΔH<sub>2</sub>O, soit 5 μL d'AMC et 1995 μL ΔH<sub>2</sub>O pour obtenir une solution finale à 10 μmol.L<sup>-1</sup>. Cette solution sera utilisée pour l'étalonnage.

#### Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Suc-LLVY-AMC) 10 mmol.L<sup>-1</sup> :

Reprendre 25 mg de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Bachem I-1395, PM = 763,9 g.mol<sup>-1</sup>) avec 3,27 mL de DMSO. Aliquoter sous 100 μL et conserver à -20°C.

#### Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-CHO 10 mmol.L<sup>-1</sup> :

Reprendre 5 mg de Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-CHO (Bachem C-3900, PM = 618,8 g.mol<sup>-1</sup>) avec 801 μL de DMSO. Aliquoter sous 20 μL et conserver à -20°C.

### Etalonnage

pmoles AMC	0	40	80	120	160	200
AMC 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , $\mu\text{L}$	0	4	8	12	16	20
MR, $\mu\text{L}$	1000	996	992	988	984	980

Faire une calibration du fluorimètre entre 0 et 150.  $\lambda_{\text{excitation}} = 380 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{émission}} = 460 \text{ nm}$

### Mesure de la vitesse de réaction

Les extraits sont préparés avec un tampon HOOD. Ajouter dans l'ordre les réactifs suivants :

Muscle frais	Muscle lyophilisé	Extrait cellulaire
980 $\mu\text{L}$ MR	965 $\mu\text{L}$ MR	985 $\mu\text{L}$
32 $\mu\text{g}$ de protéine (environ 10 $\mu\text{L}$ d'extrait protéique)	40 $\mu\text{g}$ de protéine (environ 25 $\mu\text{L}$ d'extrait protéique)	5 $\mu\text{L}$ pur
10 $\mu\text{L}$ de Suc-LLVY-AMC 10 $\text{mmol.L}^{-1}$ (100 nmoles, soit 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ final dans le tube)		

Suivre la réaction au fluorimètre ( $\lambda_{\text{excitation}} = 380 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 460 \text{ nm}$ ) pendant 10-20 min. Pour s'assurer de la spécificité de la réaction (en cas de changement de fournisseur par exemple), ajouter les réactifs suivants :

- 978  $\mu\text{L}$  de MR
- 30-40  $\mu\text{g}$  de protéine (environ 10  $\mu\text{L}$  d'extrait protéique)
- 2  $\mu\text{L}$  d'inhibiteur Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leu-CHO 10  $\text{mmol.L}^{-1}$ , soit 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  final dans le tube de mesure
- laisser incuber 15 min à température ambiante
- ajouter 10  $\mu\text{L}$  de Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC 10 mM (soit 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  final dans le tube de mesure). En présence d'inhibiteur, la fluorescence n'évolue pas.

Ordre de grandeur : 150-200  $\text{pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protéine (tissu frais)

10  $\text{pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protéine (tissu lyophilisé)

## Activité Trypsine-Like

Le peptide Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC est ici utilisé comme substrat fluorogénique. La spécificité de la réaction peut être vérifiée à l'aide d'un inhibiteur spécifique : la leupeptine.

### Réactifs et solutions

#### Milieu réactionnel

Tris-HCl (PM = 157,6 g.mol <sup>-1</sup> )	1,97 g
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O (PM = 203,3 g.mol <sup>-1</sup> )	508,25 mg
DTT (PM = 154,2 g.mol <sup>-1</sup> )	38,55 mg

Ajuster le pH à 8 et compléter le volume à 250 mL avec ΔH<sub>2</sub>O à l'aide d'une éprouvette graduée.

#### Solution AMC étalon :

Voir activité chymotrypsine-like

#### Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC (Boc-LSTR-AMC) 2 mmol.L<sup>-1</sup>

Reprendre 5 mg de Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC (Sigma B-4636 ou Bachem I-1940, PM = 732,8 g.mol<sup>-1</sup>) dans 3410 μL de DMSO (possibilité de reprendre avec 2 mL DMSO et 1410 μL ΔH<sub>2</sub>O). Aliquoter sous 500 μL et conserver à -20°C.

### Etalonnage

Si la vitesse de réaction attendue est faible, il est possible de faire une courbe étalon entre 0 et 100 pmoles d'AMC.

pmoles AMC	0	40	80	120	160	200
AMC 10 μmol.L <sup>-1</sup> , μL	0	4	8	12	16	20
MR, μL	1000	996	992	988	984	980

Faire une calibration du fluorimètre entre 0 et 150. λ<sub>excitation</sub> = 380 nm et λ<sub>émission</sub> = 460 nm  
Attention : le substrat Sigma possède une autofluorescence importante.

### Mesure de la vitesse de réaction

Les extraits sont préparés avec un tampon HOOD. Ajouter dans l'ordre les réactifs suivants :

Muscle frais	Muscle lyophilisé	Extrait cellulaire
957,5 μL MR	940 μL MR	960 μL
24 μg de protéine (environ 7,5 μL d'extrait protéique)	40 μg de protéine (environ 25 μL d'extrait protéique)	5 μL pur
35 μL Boc-LSTR-AMC 2 mmol.L <sup>-1</sup>		

Suivre la réaction au fluorimètre ( $\lambda_{\text{excitation}} = 380 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 460 \text{ nm}$ ) toutes les 15 min pendant 120 min.

Pour s'assurer de la spécificité de la réaction, ajouter les réactifs suivants :

- 972  $\mu\text{L}$  de MR
- 8  $\mu\text{L}$  d'extrait protéique pur
- 10  $\mu\text{L}$  d'inhibiteur leupeptine  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$
- laisser incuber 15 min à température ambiante
- ajouter 10  $\mu\text{L}$  de Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ . En présence d'inhibiteur,

la fluorescence n'évolue pas.

Ordre de grandeur :  $20 \text{ pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protéine (tissu frais)

$7 \text{ pmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protéine (tissu lyophilisé)

## Luminex

### Principe

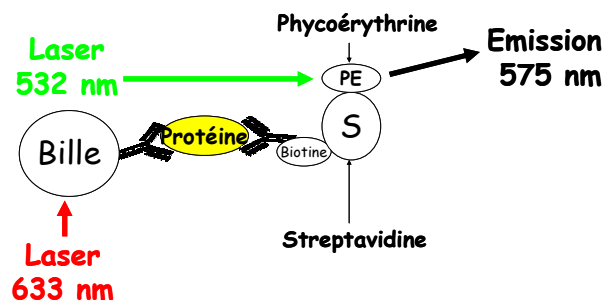
Ce système multi-analytique est constitué d'un cytomètre en flux à deux lasers. La puissance de ce système réside dans le fait qu'il est possible d'analyser simultanément jusqu'à 100 types de microsphères par puits. Les applications sont nombreuses. Les deux plus grands domaines concernés sont la génétique grâce à la réaction d'hybridation moléculaire, et l'immunologie, grâce à la réaction antigène-anticorps. C'est cette dernière réaction que l'on utilisera pour la révélation de protéines d'intérêt.

- les microsphères :

Il s'agit de billes de 5,6 µm de diamètre marquées par incubation dans des bains renfermant un mélange de deux solutions fluorescentes. La solution fluorescente est piégée à l'intérieur de la microsphère. En variant la proportion des deux fluorochromes, on obtient une gamme de 100 microsphères, avec pour chacune un ratio unique selon l'intensité de la fluorescence émise par les deux fluorochromes dans leur spectre d'émission respectif : fluorescence rouge (675 nm) et infra-rouge (>715 nm).

- le cytomètre :

Il comporte un laser rouge à diode (633 nm) excitant les fluorochromes à l'intérieur des microsphères, permettant ainsi d'identifier précisément la microsphère et ainsi la protéine d'intérêt, et un laser vert (532 nm) qui excite le fluorochrome reporter (phycoérythrine PE) lié à la biotine, permettant dans ce cas de quantifier la protéine d'intérêt.



### Solutions

Dilution des anticorps et fluorochromes :

Billes	1/40 <sup>ème</sup>
Biotine	1/40 <sup>ème</sup>
Phycoérythrine PE	1/50 <sup>ème</sup>

### Protocole

1. Imbiber les puits de la plaque 96 puits avec de l'assay buffer. Aspirer.
2. Charger les billes. Aspirer.
3. Laver les puits avec 50 µL d'assay buffer avec aspiration. Répéter cette opération 2 fois.
4. Charger les extraits.
5. Incuber toute la nuit à 4°C sous agitation (30 secondes à forte puissance puis plus doucement). Le lendemain, aspirer.
6. Laver les puits avec 50 µL d'assay buffer avec aspiration. Répéter cette opération 2 fois.
7. Charger la biotine.

8. Incuber 1 heure à température ambiante sous agitation (30 secondes à forte puissance puis plus doucement). Aspirer.
9. Laver les puits avec 50  $\mu\text{L}$  d'assay buffer avec aspiration. Répéter cette opération 2 fois.
10. Charger la phycoérythrine (PE).
11. Incuber 15 min à température ambiante (30 secondes à forte puissance puis plus doucement).
12. Ajouter l'amplificateur.
13. Incuber 15 min à température ambiante sous agitation (30 secondes à forte puissance puis plus doucement). Aspirer.
14. Laver les puits avec 50  $\mu\text{L}$  d'assay buffer avec aspiration. Répéter cette opération 2 fois.
15. Resuspendre les extraits avec 150  $\mu\text{L}$  d'assay buffer par puits.
16. Lire la plaque avec le Luminex.

## Electrophorèse SDS-PAGE

### Solutions

#### Ammonium persulfate 10 %

Peser 0,5 g d'ammonium persulfate (Sigma A9164). Ajuster le volume à 5 mL avec  $\Delta\text{H}_2\text{O}$ .

#### Glycérol 50 %

Réchauffer le glycérol à 50°C pendant 30 min.

20 mL de glycérol 100%

20 mL  $\Delta\text{H}_2\text{O}$

Conserver à température ambiante.

#### SDS 10 %

Peser 25 g de SDS. Ajuster le volume final avec 250 mL  $\Delta\text{H}_2\text{O}$  dans une éprouvette graduée.

Conserver à température ambiante.

#### Tampon 4x pour gel de séparation

1,5 mol.L<sup>-1</sup> Tris                      18,15 g Tris base (PM = 121,1 g.mol<sup>-1</sup>)

Ajuster le pH à 8,8 avec HCl. Ajuster le volume final à 100 mL avec  $\Delta\text{H}_2\text{O}$ . Conserver à 4°C.

#### Tampon 4x pour gel de concentration

0,5 mol.L<sup>-1</sup> Tris                      6 g Tris base (PM = 121,1 g.mol<sup>-1</sup>)

Ajuster le pH à 6,8 avec HCl. Ajuster le volume final à 100 mL avec  $\Delta\text{H}_2\text{O}$ . Conserver à 4°C.

#### Bleu de bromophénol 1 %

Peser 100 mg de bleu de bromophénol. Dissoudre avec 10 mL  $\Delta\text{H}_2\text{O}$ . Conserver à 4°C.

#### Solution A : acrylamide/bisacrylamide 40 % (29:1) (Sigma A7802)

38,7 % (w/v) acrylamide

1,3 % (w/v) bisacrylamide

Conserver à 4°C au réfrigérateur à l'abri de la lumière (substance neurotoxique).

#### Temed (Sigma T-9281)

Conserver sous la Sorbonne, à température ambiante.

#### Tampon d'échantillon 4x (Laemmli buffer)

Tris 250 mmol.L<sup>-1</sup>                      1,51 g Tris base (PM = 121,1 g.mol<sup>-1</sup>)

Glycérol 20 %                      20 mL glycérol 50 %

SDS 4 %                      20 mL SDS 10 %

Bleu bromophénol 0,04 %              20 mg bleu bromophénol

Ajuster le pH à 6,8 avec une solution HCl. Compléter le volume final à 45 mL avec  $\Delta\text{H}_2\text{O}$  dans une éprouvette graduée. Aliquoter sous 1 mL. Solution stable plusieurs mois à température ambiante. Le jour de l'expérimentation ajouter 10 % (v/v) de  $\beta$ -mercaptoéthanol (50  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoéthanol pour 450  $\mu\text{L}$  de tampon). Si le  $\beta$ -mercaptoéthanol n'est pas requis (voir fiche technique des anticorps primaires), compléter alors avec  $\Delta\text{H}_2\text{O}$  (50  $\mu\text{L}$   $\Delta\text{H}_2\text{O}$  pour 450  $\mu\text{L}$  de tampon).

Tampon électrophorèse

	<i>1x</i>	<i>10x</i>
Tris 25 mmol.L <sup>-1</sup>	3 g Tris base (PM = 121,1 g.mol <sup>-1</sup> )	30 g
Glycine 192 mmol.L <sup>-1</sup>	14,41 g glycine (PM = 75,07 g.mol <sup>-1</sup> )	144,1 g
SDS 0,1 %	10 mL SDS 10 %	100 mL

Ajouter 950 mL ΔH<sub>2</sub>O. Vérifier le pH qui doit être autour de 8,3-8,4 sans ajustement. Ajuster le volume final à 1 litre dans une éprouvette graduée. Conserver à 4°C.

Solution de coloration au bleu de Coomassie

1 g Brilliant Blue G (Sigma B 0770)  
 450 mL méthanol  
 450 mL ΔH<sub>2</sub>O  
 100 mL acide acétique glacial

Agiter toute la nuit, puis filtrer pour enlever les particules de colorant non dissoutes. Stable plusieurs mois à température ambiante.

Solution de décoloration

100 mL méthanol  
 100 mL acide acétique glacial  
 800 mL ΔH<sub>2</sub>O

Stable plusieurs mois à température ambiante.

**Préparation du gel****A. Mise en place des plaques d'électrophorèse**

Porter des gants pour l'ensemble de la préparation. Nettoyer les plaques au micro 90 en vérifiant l'absence d'impuretés à leurs surfaces. Rincer abondamment avec ΔH<sub>2</sub>O. Enlever les dernières impuretés à l'aide de l'air comprimé. Les mettre en place en suivant les indications du fournisseur (BioRad). Vérifier l'ajustement des plaques et des spacers (1,5 mm) afin d'éviter les fuites lors du coulage.

**B. Préparation et coulage du gel de séparation**

Le pourcentage en acrylamide/bisacrylamide du gel de séparation est déterminé en fonction de la taille des protéines d'intérêt.

% en acrylamide	Résolution
15 %	15 à 70 kDa
12 %	15 à 90 kDa
10 %	30 à 100 kDa
7,5 %	40 à 200 kDa
gradient progressif	60 à 212 kDa

Prévoir 8 mL pour un mini-gel Protean III avec spacer de 1,5 mm. À préparer le jour de l'expérimentation.



Pour 1 mini-gel

	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
Acrylamide/bis Solution A 40 %	1,5 mL	2 mL	2,5 mL	3 mL
Tampon 4x gel de séparation	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
SDS 10 %	80 $\mu$ L	80 $\mu$ L	80 $\mu$ L	80 $\mu$ L
$\Delta$ H <sub>2</sub> O	4,42 mL	3,92 mL	3,42 mL	2,92 mL

Les concentrations finales de Tris et SDS sont respectivement de 0,375 mol.L<sup>-1</sup> et 0,1 %.

Pour 2 mini-gels

	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
Acrylamide/bis Solution A 40 %	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL
Tampon 4x gel de séparation	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL
SDS 10 %	160 $\mu$ L	160 $\mu$ L	160 $\mu$ L	160 $\mu$ L
$\Delta$ H <sub>2</sub> O	8,84 mL	7,84 mL	6,84 mL	5,84 mL

Les concentrations finales de Tris et SDS sont respectivement de 0,375 mol.L<sup>-1</sup> et 0,1%.

La copolymérisation de l'acrylamide et du bisacrylamide est initiée par l'addition d'ammonium persulfate (APS) au 1/200<sup>ème</sup> (v/v) et d'un accélérateur le tétraméthyléthyléthylènediamine (TEMED) au 1/2000<sup>ème</sup> (v/v). Attendre que les réactifs soient à température ambiante, puis préparer le gel comme indiqué ci-dessous :

Solutions	1 mini-gel	2 mini-gels
Solution gel de séparation	8 mL	16 mL
APS	80 $\mu$ L	160 $\mu$ L
Temed	4 $\mu$ L	8 $\mu$ L

Couler à l'aide d'une pipette. Le niveau doit être ajusté de telle sorte que le niveau soit à 1-1,5 cm environ en dessus du bord supérieur de la plus petite plaque. Ajouter immédiatement et délicatement  $\Delta$ H<sub>2</sub>O. La polymérisation complète nécessite environ 45 min. Rincer la surface du gel avec  $\Delta$ H<sub>2</sub>O. À ce stade le gel peut être conservé 24 heures à 4°C. Dans ce cas, ajouter du tampon 1x gel de séparation pour éviter que le gel ne se dessèche.

### C. Préparation et coulage du gel de concentration

Le gel de concentration est un gel à 4 %. Prévoir 2,5 mL pour un mini-gel Protean III avec spacer de 1,5 mm. À préparer le jour de l'expérimentation.

	1 mini-gel	2 mini-gels
	4 %	4 %
Acrylamide/bis Solution A 40 %	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Tampon 4x gel de concentration	625 $\mu$ L	1,25 mL
SDS 10 %	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Bleu bromophénol 1%	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L
$\Delta$ H <sub>2</sub> O	1,5 mL	3 mL

Les concentrations finales de Tris, SDS et bleu de bromophénol sont respectivement de 0,125 mol.L<sup>-1</sup>, 0,1% et 0,04%.

La copolymérisation de l'acrylamide et du bisacrylamide est initiée par l'addition d'ammonium persulfate (APS) au 1/100<sup>ème</sup> (v/v) et d'un accélérateur le tétraméthyléthyléthylènediamine (TEMED) au 1/1000<sup>ème</sup> (v/v). Attendre que les réactifs soient à température ambiante, puis préparer le gel comme indiqué ci-dessous :

Solutions	1 mini-gel	2 mini-gels
Solution gel de concentration	2,5 mL	5 mL
APS	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Temed	2,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

Verser le gel de concentration avec une pipette, puis mettre le peigne en position. Laisser polymériser au moins 30 min.

#### D. Mise en place des plaques d'électrophorèse dans la cuve

Dégager le cadre de coulage. Avec une feuille de papier enlever les débris polymérisés au bas du gel. Mettre en place les plaques avec leurs supports dans la cuve d'électrophorèse. Verser le tampon d'électrophorèse de façon à égaliser les niveaux de part et d'autre des plaques. Enlever délicatement les peignes, puis nettoyer les puits à l'aide d'une seringue de façon à enlever les débris de gel qui pourraient affecter la migration.

### Préparation, chargement et migration des échantillons

#### A. Préparation

Dans un tube Eppendorf 0,5 mL combiner 3 volumes d'échantillon protéique à 1 volume de tampon d'échantillon 4x contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 % (v/v). Vortexer.

*NB* : attention certains anticorps primaires ne nécessitent pas de  $\beta$ -mercaptoéthanol (voir la fiche technique de l'anticorps). Dans ce cas ajouter 10 % (v/v)  $\Delta$ H<sub>2</sub>O.

Chauffer à 100°C pendant 3 min.

Centrifuger brièvement (3 secondes) pour récupérer le volume. Charger ensuite rapidement les échantillons dans les puits.

#### B. Chargement

Charger délicatement l'échantillon dans le puits en utilisant les cônes prévus à cet effet. Faire attention à ne pas introduire de bulles d'air. Prévoir un puits pour le marqueur de poids moléculaire (5  $\mu$ L). Mettre en place la cuve d'électrophorèse dans le bac de glace.

**C. Migration**

Fixer les électrodes. Des bulles d'air doivent se former lorsque le courant passe. Le front de migration est indiqué par le bleu de bromophénol contenu dans le tampon d'échantillon et le gel de concentration.

Faire migrer à 80 V pendant 15 min puis augmenter la tension (90 V puis 110 V) et laisser migrer plusieurs heures.

Couper l'alimentation. Enlever les plaques délicatement. Couper le coin gauche en haut du gel afin de garder l'orientation.

## Western Blot

### A. Solutions

#### Tris Buffered Saline 10X (TBS 10X)

Tris 100 mmol.L <sup>-1</sup>	12,11 g de Tris base (PM = 121,1 g.mol <sup>-1</sup> )
NaCl 1,5 mol.L <sup>-1</sup>	87,66 g de NaCl (PM = 58,44 g.mol <sup>-1</sup> )

Ajouter environ 950 mL ΔH<sub>2</sub>O dans un bécher. Ajuster le pH à 7,5. Ajuster le volume final à 1 litre dans une éprouvette graduée avec ΔH<sub>2</sub>O. Autoclaver. Diluer au 1/10<sup>ème</sup> dans une éprouvette graduée pour utilisation (100 mL de TBS 10X + 900 mL ΔH<sub>2</sub>O).

Conserver à température ambiante.

#### TBS 1 X-Tween-20 0,05 %

Tris 10 mmol.L <sup>-1</sup>
NaCl 150 mmol.L <sup>-1</sup>
Tween-20 0,05 %

A 1 litre de tampon TBS 1X, ajouter 500 μL de Tween-20 préalablement réchauffé à 40°C. Bien agiter. Conserver à température ambiante.

#### Tampon de transfert (tampon Towbin)

	<b>1x</b>	<b>10x</b>
Tris 25 mmol.L <sup>-1</sup>	3,03 g de Tris base	30,3 g Tris
Glycine 192 mmol.L <sup>-1</sup>	14,4 g de glycine	144 g glycine
Méthanol 20 % (SDS 0,1 %)	200 mL de méthanol (1 g SDS)	(10 g SDS)

Si le tampon est préparé 10X, le méthanol est ajouté lors de la dilution du 10X, c'est à dire 100 mL tampon 10X, 700 mL ΔH<sub>2</sub>O et 200 mL méthanol.

Ajuster le volume à 950 mL avec ΔH<sub>2</sub>O dans un bécher. Le pH doit être environ de 8,6 ± 0,2. Le méthanol améliore l'absorption sur une membrane de nitrocellulose, mais diminue l'efficacité du transfert. L'ajout de SDS 0.1 % dans le tampon de transfert augmente l'efficacité du transfert, mais diminue la capacité de la membrane à fixer les protéines.

#### Rouge Ponceau

Ponceau S 0,2 %
Acide trichloroacétique 3 %
Acide sulfosalicylique 3 %

Ajouter 180 mL ΔH<sub>2</sub>O à 20 mL de Ponceau S concentré (Sigma P 7767).

### Transfert liquide sur membrane des protéines

#### A. Préparation de la membrane de transfert

Mesurer la taille exacte du gel qui devra être transféré.

Découper 2 morceaux de papier de transfert légèrement supérieurs à la taille du gel soit 8,5 x 6 mm (Gel-blotting paper GB 003, Schleicher & Schuell).

Découper un morceau de membrane de nitrocellulose de la taille des papiers. Faire un repère pour orienter la membrane en coupant un coin de la membrane. Utiliser des membranes de porosité 0,2 μm pour les protéines de poids moléculaires inférieurs à 100 kDa. Sinon utiliser les membranes 0,45 μm.

Tremper très progressivement la membrane de nitrocellulose dans le tampon de transfert (dans du méthanol pur pour les membranes PVDF). Laisser à 4°C pendant 30 min. Cette étape est importante car elle permet d'éviter la formation de micro-bulles qui pourraient affecter le transfert.

### **B. Le transfert**

Enlever le gel de concentration. Faire un repère afin d'orienter le gel en coupant le coin supérieur gauche. Tremper le gel pendant 30 min dans le tampon de transfert à 4°C afin d'éliminer l'excès de SDS.

Faire tremper les feuilles de blotting paper dans le tampon de transfert.

Tremper un pad mousse dans le tampon de transfert. Le disposer sur la face négative noire du sandwich, proche du côté avec les charnières.

Prendre une feuille de blotting paper et la disposer sur le pad mousse. Chasser les bulles en roulant une pipette sur le papier de transfert.

Déposer délicatement le gel en mettant le coin coupé en haut à droite.

Disposer la membrane de transfert sur le gel en faisant correspondre les entailles. Ne pas enfermer de bulles entre le gel et la membrane.

Prendre une seconde feuille de blotting paper et la disposer sur la membrane. Chasser les bulles en roulant une pipette sur le papier de transfert sans trop appuyer pour ne pas dilater le gel. Tremper un pad mousse dans le tampon de transfert. Le disposer sur le haut du sandwich.

Fermer délicatement le sandwich. Le mettre en place dans son support, noir contre noir et blanc contre rouge.

Mettre en place la cuve de transfert dans la glace. Mettre en place le support dans la cuve de transfert, puis verser du tampon de transfert jusqu'à ce que le gel soit complètement immergé. Positionner ensuite le système réfrigérant contenant de la glace.

Transférer à ampérage constant à 4°C pendant plusieurs heures, généralement 400 mA pendant 2 heures.

Au terme du transfert, prélever délicatement le gel et la membrane pour les mettre à colorer dans 2 solutions : rouge Ponceau pour la membrane et bleu de Coomassie pour le gel.

### **Coloration au rouge Ponceau (étape facultative)**

Cette étape est facultative. Elle permet cependant de vérifier que le transfert des protéines du gel sur la membrane a correctement fonctionné.

Tremper pendant 5 min la membrane dans la solution de rouge Ponceau sous agitation.

Sauver le Ponceau pour une utilisation ultérieure. Rincer la membrane avec du TBS 1 X, et observer les bandes de protéines colorées en rouge.

Laver deux fois la membrane avec du TBS 1 X pendant 5 min (2 x 5 min) de façon à décolorer complètement la membrane. Les bandes rouges ont alors complètement disparues.

### **Coloration et décoloration**

Le processus de coloration/décoloration permet de visualiser les bandes protéiques du gel. Il est généralement effectué après le transfert afin de vérifier la qualité de ce transfert. Après coloration tout transfert sera impossible car les protéines ont été fixées par le colorant.

Laisser incuber le gel pendant 4 heures dans la solution de bleu de Coomassie sous agitation. Sauver la solution de coloration pour une autre utilisation.

Ajouter la solution de décoloration. Mettre une feuille de papier absorbant ce qui permettra de piéger le colorant qui est libéré.

Réaliser un autre bain lorsque la solution de décoloration est saturée par le colorant.

Répéter l'opération jusqu'à ce que le gel soit complètement décoloré (ou laisser sous agitation toute la nuit en recouvrant de papier d'aluminium pour emprisonner l'odeur). Sauver les derniers bains de décoloration pour une réutilisation.

Déposer le gel sur une feuille de papier Whatman. Sécher pendant 45 min avec le sécheur de gel.

### **Blocage de la membrane**

Cette étape permet de bloquer les sites de fixation potentiels non spécifiques des anticorps sur la membrane en la saturant avec des protéines du lait (caséine). Il en résultera une diminution du bruit de fond lors de la révélation.

Préparer une solution 5 % Régilait délipidé dans du TBS 1X (5 g de Régilait/100 mL de TBS 1X). Agiter pendant 5 min pour dissoudre le Régilait.

Faire tremper la membrane pendant au moins une heure sous agitation à température ambiante dans la solution TBS 1X-Régilait 5 %.

Laver la membrane avec du TBS 1X pendant 10 min.

### **Marquage de la membrane avec l'anticorps primaire**

Préparer une solution 1 % Régilait dans du TBS 1X (0,5 g de Régilait/50 mL de TBS 1X) ou une solution 5 % BSA dans du TBS (0,5 g de BSA/10 mL) selon fiche technique de l'anticorps. Le détergent Tween-20 (0,05 % à 1 %) peut être ajouté pour diminuer la fixation non spécifique de l'anticorps.

Recouvrir une plaque en verre avec du parafilm. La disposer dans un plateau.

Préparer l'anticorps primaire à la dilution appropriée dans TBS 1X-Régilait 1 %. Les anticorps primaires sont généralement préparés pour être utilisés à des dilutions allant de 1/250<sup>ème</sup> à 1/1000<sup>ème</sup>. Compter environ 4 mL de TBS 1X-Régilait 1 % pour une membrane entière.

Déposer la solution contenant l'anticorps sur le parafilm, puis disposer la membrane de telle sorte que la face avant (face protéique) soit au contact du parafilm. Eviter la formation de bulles qui pourraient prévenir la fixation de l'anticorps.

Déposer ensuite 1 mL de solution contenant l'anticorps sur la face arrière. Disposer une coupelle remplie d'eau. Recouvrir avec du papier aluminium.

Laisser incuber une heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

Laver ensuite 2 fois la membrane avec TBS 1X-Tween-20 0,05 % pendant 5 min (2 x 5 min).

Laver la membrane avec TBS 1X pendant 10 min.

### **Marquage de la membrane avec l'anticorps secondaire**

Recouvrir une plaque en verre avec du parafilm.

Préparer l'anticorps secondaire à la dilution appropriée dans TBS 1X-Régilait 1 % préparé lors du marquage avec l'anticorps primaire. Les anticorps secondaires sont généralement préparés à des dilutions s'étendant de 1/1500<sup>ème</sup> à 1/5000<sup>ème</sup> (en fonction du système de révélation). Vérifier la compatibilité de l'anticorps secondaire avec l'hôte dans lequel a été produit l'anticorps primaire : si l'anticorps primaire a été produit chez le lapin, s'assurer que l'anticorps secondaire est bien un anti-lapin. Compter environ 2 mL TBS 1X-Régilait 1% pour un mini-gel. Le détergent Tween-20 (0,05 % à 1 %) peut être ajouté pour diminuer la fixation non spécifique de l'anticorps secondaire.

Déposer 1 mL de TBS 1X-Régilait 1 % sans anticorps sur le parafilm, puis disposer la membrane de telle sorte que la face arrière non protéique soit au contact du parafilm.

Déposer ensuite 2 mL de TBS 1X-Régilait 1 % avec anticorps sur la face protéique de la membrane. S'assurer que la totalité de la membrane est recouverte. Recouvrir l'ensemble pour le protéger.

Laisser incuber une heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

Laver ensuite 2 fois la membrane avec TBS 1X-Tween 0,05 % pendant 5 min (2 x 5 min). Laver la membrane avec TBS 1X pendant 10 min.

## Révélation de la membrane

### A. Préparation des réactifs de développement et de révélation

Développeur : 50 mL développeur + 200 mL  $\Delta\text{H}_2\text{O}$ . Conserver à l'abri de la lumière dans un flacon bouché recouvert de papier aluminium.

Fixateur : 50 mL fixateur + 200 mL  $\Delta\text{H}_2\text{O}$ . Conserver à l'abri de la lumière dans un flacon bouché recouvert de papier aluminium.

### B. Réaction de révélation (en chambre noire)

Préparer la solution de révélation en ajoutant un volume de solution A et un volume de solution B (ECL, Amersham RPN2109) (le volume de la solution A est identique à celui de la solution B). Compter environ 3 mL au total par mini-gel.

Enlever l'excès de la dernière solution de rinçage. Déposer la membrane face protéique en avant sur une plaque de verre.

Recouvrir complètement la membrane avec la solution de révélation. Laisser incuber une min à l'abri de la lumière. La technique de révélation est basée sur la réaction chimioluminescente catalysée par HorseRadish Peroxidase en présence du substrat luminol.

Enlever rapidement l'excès de solution de révélation, puis déposer la membrane, face protéique sur le dessus, dans une cassette prévue à cet effet. Recouvrir la membrane avec un transparent type rétroprojecteur en évitant la formation de bulles. Ne pas sécher complètement la membrane qui doit toujours rester humide.

Placer le film directement contre la membrane recouverte du transparent. Noter les contours de la membrane sur le film. Fermer la cassette. **Attention ne pas exposer les films à la lumière blanche.**

Les temps d'exposition sont variables et dépendent de l'abondance de la protéine d'intérêt, de l'activité HRP et de la sensibilité du système de révélation. Généralement, se fixer un temps d'exposition de 15 min, puis l'ajuster en fonction de l'intensité du signal.

### C. Développement du film

Placer en série 3 bacs d'incubation contenant dans l'ordre le développeur, de l'eau du robinet et le fixateur.

Une fois le temps d'exposition écoulé, prendre le film de la cassette. Le tremper entièrement pendant 1 min dans le développeur.

Rincer ensuite le film dans le bac contenant de l'eau du robinet.

Tremper ensuite entièrement le film dans la solution de fixation pendant 3 min.

Rincer abondamment le film à l'eau du robinet. Laisser sécher.

Vérifier que le signal n'est pas surexposé. Sinon recommencer l'exposition avec un temps plus court, ou attendre une dizaine de minutes avant de remettre le film au contact de la membrane.

## Quantification du Western blot avec ImageJ

Scanner le film (enregistrer sous forme IMG ou JPEG)

Tableau de quantification :

	Intensité Tâche	Aire	Intensité Blanc	(Intensité Tâche - Blanc) x Aire	Intensité Tâche	Aire	Intensité Blanc	(Intensité Tâche - Blanc) x Aire	Moyenne des 2
Tâche 1									
Tâche n									
Tâche n+1									

Ouvrir le film : *File > Open > Film n°*

Aller dans : *Edit > Invert*

Aller dans : *Image > Type > 8-bit*

Paramétrer le logiciel : *Analyze > Set Scale > Distance in Pixels : 1 mm > Known*

*Distance : 1 > Pixel Aspect Ratio : 1.0 > Unit of Length : mm (scale : 1 pixel/mm)*

*Analyze > Set Measurements :*

Area

Mean Gray Value

Entourer la tâche à l'aide de « *Polygon selections* » puis cliquer sur *Analyze > Measure* ou Ctrl + M. On obtient un tableau de résultats avec l'aire et l'intensité moyenne de la tâche.

- Pour le Blanc, entourer une partie du blanc en dessus de chaque tâche Ceci représentera l'intensité moyenne du bruit de fond.

Reproduire la quantification 2 fois

Calculer :  $(\text{Intensité}_{\text{Tâche}} - \text{Intensité}_{\text{Blanc}}) \times \text{Aire}_{\text{Tâche}}$

Faire la moyenne des 2 quantifications obtenues.





## Maintenance cellulaire (C2C12, L6)

### Les réactifs

Dulbecco's Phosphate buffered Saline (DPBS) avec  $\text{Ca}^{2+}$   
Biowhittaker BE-12-604F  
DPBS/1.25 mM EDTA sans  $\text{Ca}^{2+}$   
Peser 183 mg EDTA pour 500 mL DPBS  
Trypsine-EDTA 1X  
Sigma T-3924  
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)  
Biowhittaker BE-17-512F  
Pénicilline/Streptomycine  
Sigma P-0781  
Amphotéricine B  
Sigma A-2942  
Fetal Calf Serum (FCS ou FBS)  
PAA A15-151 500 mL  
Horse Serum  
PAA B11-021 100 mL  
Diméthyl sulfoxyde  
Sigma D-5879

MILIEU DE PROLIFERATION: 500 mL de DMEM High Glucose + 5 mL de Pénicilline/Streptomycine (soit 1 % P/S) + 50 mL FBS Gold (soit 10 % FBS Gold) + 5 mL d'Amphotéricine B.

MILIEU DE DIFFERENCIATION: 500 mL de DMEM High Glucose + 5 mL de Pénicilline/Streptomycine (soit 1 % P/S) + 10 mL serum de cheval (soit 2 % sérum de cheval) + 5 mL d'Amphotéricine B (soit 1 %)

### Protocole de trypsination

Mettre en route le bain-marie (à 37°C) 30 min avant de commencer la trypsination. Mettre dans le bain-marie un Falcon de trypsine, du milieu de culture DMEM, du **DPBS avec  $\text{Ca}^{2+}$**  et du **DPBS sans  $\text{Ca}^{2+}$** .

Rentrer toutes ces bouteilles dans le PSM.

1. Prendre la flasque contenant les cellules (adhérentes et non adhérentes). Aspirer ou verser le milieu de culture (contenant les cellules non adhérentes) dans un béccher javellisé. Récupérer les cellules adhérentes par trypsination.

2. Rincer 1 fois les cellules adhérentes avec 5 mL de **DPBS avec  $\text{Ca}^{2+}$**  pour une boîte de 100 mm, ou avec 25 mL de **DPBS avec  $\text{Ca}^{2+}$**  pour une flasque. *Préalablement, rincer « l'aspirateur » avec de l'éthanol.* Aspirer ou verser le milieu dans le béccher javellisé.

3. Rincer avec 5 mL de **DPBS sans  $\text{Ca}^{2+}$**  pour boîte de 100 mm, ou avec 25 mL de **DPBS sans  $\text{Ca}^{2+}$**  pour une flasque. *Préalablement, rincer « l'aspirateur » avec de l'éthanol.* Aspirer ou verser le milieu dans le béccher javellisé.

4. Ajouter 2,5 mL de **DPBS sans  $\text{Ca}^{2+}$**  + 250  $\mu\text{L}$  de Trypsine pour une boîte de 100 mm, ou 9 mL de **DPBS sans  $\text{Ca}^{2+}$**  + 1 mL de Trypsine pour une flasque.

5. Répartir la solution sur toute la surface de la flasque par un mouvement circulaire.

6. Incuber la flasque pendant 3 min à 37°C. Pendant le temps d'incubation, préparer des Falcons.

7. Choquer la boîte ou la flasque afin de bien décoller les cellules adhérentes restantes.

8. Récupérer les cellules de la boîte dans un Falcon 15 mL ou dans un Falcon 50 mL pour les cellules issues de la flasque.

9. Rincer avec 5 mL de **DPBS avec Ca<sup>2+</sup>** pour inhiber l'activité de la trypsine pour une boîte de 100 mm, ou avec 10 mL de **DPBS avec Ca<sup>2+</sup>** pour une flasque. Verser le contenu dans le tube Falcon précédemment utilisé.

Réitérer cette étape une seconde fois.

10. Centrifuger à 800 g (2 000 rpm) pendant 3 min à température ambiante.

11. Eliminer le surnageant et resuspendre délicatement les cellules dans un volume adéquat de **DMEM** (1 mL voire 1,5 mL).

12. Flucher (resuspendre) 29 fois les cellules.

### Numération cellulaire

1. Dans un tube eppendorf (1,5 mL), ajouter 10 µL de **DPBS avec Ca<sup>2+</sup>**, 2,5 µL de bleu trypan et 12,5 µL de suspension cellulaire (agitée au préalable) (sous le PSM). Le bleu trypan (qui se colore les noyaux des cellules mortes) permet de différencier les cellules mortes (bleues) des cellules vivantes. Bien agiter la suspension cellulaire lors du pipetage afin que la prise reflète au mieux la concentration réelle dans le tube. Déposer 10 µL par capillarité entre lame et lamelle sur une lame de Neubauer.

2. Calculer la moyenne de 2 comptages de la façon suivante :

$C = n/v$  où  $c$  est la concentration cellulaire (cellules.mL<sup>-1</sup>),  $n$  le nombre moyen de cellules comptées et  $v$  le volume de comptage sur la lame. Ce volume est de 0.1 mm<sup>3</sup> soit 10<sup>-4</sup> mL pour une lame Neubauer. La formule devient :

$N_{total} = n \times 10\ 000 \times 2 \times V$ , le facteur 2 tenant compte de la dilution lors de la préparation des cellules et le facteur  $V$  tenant compte du volume total de reprise des cellules au terme de la trypsination.

### Ensemencement des cellules

Pour un ensemencement dans une flasque de culture ou répartition dans des boîtes de culture :

1. Faire une numération.

2. Resuspendre les cellules avec un volume approprié de DMEM de façon à obtenir la concentration cellulaire souhaitée (20 mL de DMEM + 500 µL de cellules dans le milieu **DPBS avec Ca<sup>2+</sup>**. Ensemencer.

P.S. : - 1 flasque de 175 cm<sup>2</sup> contient 750 000 cellules.

- 1 boîte de 100 mm contient 250 000 cellules.

- 1 plaque 6 puits contient 40 000 cellules/puits.

Volume à respecter pour les ensemencements :

Boite 60 mm : 4 mL

Boîte 100 mm : 10 mL

Flasque de propagation 175 cm<sup>2</sup> : 20 mL

### E. Différenciation des cellules

1. Dans la bouteille de DMEM (500 mL), ajouter 5 mL de **Pénicilline/Streptomycine** (soit environ 1 % de **Pénicilline/Streptomycine**) et 10 mL de **Fetal Horse Serum** (soit

environ 2 % de **Fetal Horse Serum**). Ce nouveau milieu constituera le milieu de différenciation. Chauffer ce milieu au bain-marie (37°C).

2. Aspirer le milieu DMEM des boîtes et ajouter 10 mL de ce milieu de différenciation.

3. Mettre les boîtes dans l'incubateur.

### Congélation des cellules

A partir de cultures secondaires :

1. Eliminer le milieu de culture.

2. Trypsiniser les cellules.

3. Centrifuger à 800 g pendant 3 min à température ambiante.

4. Eliminer le surnageant et resuspendre délicatement les cellules avec un volume adéquat de DMEM.

5. Faire une numération cellulaire. Pendant la numération, centrifuger les cellules à 800 g pendant 3 min à température ambiante.

6. Resuspendre le culot de cellules avec la solution de congélation de façon à avoir une concentration finale de 1 million de cellules.mL<sup>-1</sup> de solution de congélation. Transférer les cellules dans un cryotube stérile. Noter le type cellulaire, la concentration exacte, le nombre de passage et la date sur le tube.

7. Mettre le cryotube à -20°C pendant 24 heures, puis à -80°C pendant 24 heures, puis le transférer dans N<sub>2</sub> liquide.

A partir de cellules satellites fraîchement extraites :

1. Après la dernière centrifugation (300 g x 20 min), resuspendre les cellules (1 mL.g<sup>-1</sup> de tissu) avec du DMEM 10 % HS + 10 % FCS.

2. Prélever 20 µL pour faire une numération. Pendant la numération, centrifuger à 1500 g pendant 2 min à température ambiante.

3. Resuspendre le culot de cellules avec la solution de congélation de façon à avoir une concentration finale de 1 à 2 millions de cellules.mL<sup>-1</sup> de solution de congélation. Transférer les cellules dans un cryotube stérile. Noter le type cellulaire, la concentration exacte et la date sur le tube.

4. Mettre le cryotube à -80°C pendant 24 heures, puis le transférer dans N<sub>2</sub> liquide.

Bien respecter la procédure permet de diminuer le nombre de cellules mortes lors de la mise en culture.

### Décongélation des cellules

1. Réchauffer les cellules directement à 37°C. Les transvaser dans un tube Falcon 15 mL. Ajouter 4 mL de sérum par million de cellules afin de réduire la concentration en DMSO.

2. Centrifuger à 800 g x 3 min afin d'éliminer le DMSO.

3. Resuspendre les cellules avec du milieu de prolifération. Utiliser environ 1 million de cellules pour ensemercer une flasque de 175 cm<sup>2</sup>.

## Designer des amorces pour PCR

### Trouver la séquence codante du gène voulu

Aller sur le site PubMed, taper le gène voulu et noter sa séquence codante.

### Designer des amorces

Allez sur le site Primer3, [Primer designing tool](#).

Copier la séquence codante du gène voulu, obtenue précédemment sur PubMed.

Les amorces sont établies selon les critères suivants :

- Les amorces doivent avoir une taille d'environ 20 pb ;
- La taille de l'amplikon doit être comprise entre 70 et 150 pb ;
- La température d'hybridation de l'amorce ( $T_m$ ) à la séquence codante doit être le plus proche de 60°C (température Optimale) ;
- La différence de  $T_m$  des amorces forward et reverse ne doit pas excéder 4°C ;
- L'amorce doit finir par une base forte G ou C en 3' ;
- Il ne doit pas y avoir :
  - o + de 2 G ou C dans les 3 dernières bases en 3' ;
  - o + de 3 G ou C dans les 6 dernières bases en 3' ;
  - o de G en 5' ;
  - o + de C que de G dans l'amorce.
- Le pourcentage de GC doit être < 60 % ;
- La self complémentarité doit être < 6 ;
- L'amorce doit être à cheval sur 2 exons ;
- Le pourcentage de GC doit être approximativement le même dans l'amorce forward et dans l'amorce reverse.

Une fois les amorces forward et reverse sélectionnées, les positionner sur la séquence codante du gène et isoler la séquence de l'amplikon. Vérifier que les amorces sont bien spécifiques au gène recherché (Primer Blast).

Sur le site « Mfold », entrer la séquence de l'amplikon dans le menu « Applications-DNA folding form », et visualiser les repliements potentiels de la séquence. Ces repliements empêcheront la bonne fixation de l'amorce sur la séquence du gène. Il faut donc s'assurer que l'amplikon se replie le moins possible. Si ce n'est pas le cas, redesigner de nouvelles amorces en étant plus sélectif.

## Purification de l'ARN

### Points importants avant de commencer :

Sauf pour les étapes 4 et 9, travailler entre 15 et 25°C. Travailler rapidement.

Centrifuger à 20-25°C (T° ambiante, 11 000 g)

Tampon RLT : redissoudre tout précipité dans le tampon RLT par chauffage. Ajouter le  $\beta$ -mercaptoéthanol avant utilisation : 10  $\mu$ L pour 1 mL de tampon RLT (le mélange se conserve à T° ambiante jusqu'à un mois). On peut remplacer le  $\beta$ -mercaptoéthanol par du DTT 2 mol.L<sup>-1</sup>.

Tampon RPE : avant la première utilisation ajouter 4 volumes d'éthanol (96-100 %) à 1 volume de tampon.

Préparer la solution stock de DNase 1 : dissoudre dans 550  $\mu$ L d'eau RNase-free. Ne pas ouvrir le flacon mais injecter l'eau à travers le bouchon avec une seringue et une aiguille RNase-free. Mélanger doucement par inversion. **Ne pas vortexer.**

Pour un stockage à long terme, répartir la solution en aliquots pour usage unique et conserver à -20°C (jusqu'à 9 mois). Les aliquots décongelés se conservent 6 semaines à 2-8°C. **Ne pas recongeler.**

Les tampons RLT et RW1 contiennent de l'isothiocyanate de guanidium (GITC). Ces sels peuvent former des composants hautement réactifs en présence de javel. Pour le nettoyage, utiliser un détergent de laboratoire et de l'eau.

### Procédure de la purification de l'ARN : par RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen 74104)

1. Mettre le block chauffant ou le bain-marie à 55°C.
2. Disrupt (dans la glace) et homogénéiser au moyen d'un Ultraturrax : dans un tube de 2 mL (fond rond) placer  $\leq 30$  mg de tissu dans 300  $\mu$ L de tampon RLT (+ $\beta$ -mercaptoéthanol). Faire plonger le rotor dans le mélange. Mettre la vitesse maximale jusqu'à ce que le lysat soit homogène (2 x 10 secondes).
3. Ajouter 590  $\mu$ L d'eau RNase-free, puis 10  $\mu$ L de Protéinase K.  
Mélanger soigneusement par pipetage en flux-reflux.
4. Incuber 10 min à 55°C.
5. Centrifuger 3 min à 11 000 g .  
Un petit culot de débris se forme, parfois accompagné d'un voile fin à la surface du surnageant.
6. Transférer le surnageant dans un nouveau tube (environ 900  $\mu$ L) de 2 mL. Eviter de transférer un peu du culot, bien qu'une petite quantité de débris puisse ne pas affecter la procédure.  
En cas de présence du voile, positionner la pointe de la pipette en dessous, le voile viendra se coller à l'extérieur de la pointe et ne sera pas transféré.
7. Ajouter 0,5 volume d'éthanol pur à 96-100 % au lysat (autour de 450  $\mu$ L).  
Mélanger par pipetage en flux-reflux.  
**Ne pas centrifuger.**  
Un précipité peut se former sans effet sur la procédure.
8. Transférer 700  $\mu$ L de l'échantillon (y compris le précipité) sur la colonne RNeasy dans un tube collecteur de 2 mL.  
Fermer le couvercle.  
Centrifuger 15 secondes à 11 000 g.  
Jeter l'éluat.

- Conserver le tube collecteur pour la phase suivante.
9. Répéter l'étape 8 avec le reste du lysat.  
Conserver le tube collecteur pour la phase suivante.
  10. Ajouter 350  $\mu\text{L}$  de tampon RW1 à la colonne RNeasy.  
Fermer le couvercle.  
Centrifuger 15 secondes à 11 000 g pour laver la membrane.  
Jeter l'éluat.  
Conserver le tube collecteur pour la phase 13.
  11. Ajouter 10  $\mu\text{L}$  de la solution stock de DNase 1 à 70  $\mu\text{L}$  de tampon RDD.  
Mélanger délicatement par inversion.  
Note : DNase 1 est particulièrement sensible à la dénaturation physique.  
Centrifuger brièvement pour récupérer le liquide resté sur les parois.  
**Ne pas vortexer**
  12. Ajouter le mélange DNase 1 directement dans la colonne sur la membrane RNeasy.  
Incuber 15 min à 20-30°C (T° ambiante).
  13. Ajouter 350  $\mu\text{L}$  de tampon RW1 à la colonne RNeasy.  
Fermer le couvercle.  
Réutiliser le tube collecteur de l'étape 10 et le conserver pour la suite.  
Centrifuger 15 secondes à 11 000 g.  
Jeter l'éluat.
  14. Ajouter 500  $\mu\text{L}$  de tampon RPE à la colonne RNeasy.  
Fermer le couvercle.  
Centrifuger 15 secondes à 11 000 g pour laver la membrane.  
Jeter l'éluat.
  15. Ajouter 500  $\mu\text{L}$  de tampon RPE à la colonne RNeasy.  
Fermer le couvercle.  
Centrifuger 2 min à 11 000 g pour laver la membrane.  
La plus longue centrifugation permet de sécher la membrane, de telle sorte que l'éthanol est complètement éliminé. Les résidus d'éthanol pourraient interférer par la suite.
  16. Après la centrifugation, ôter soigneusement la colonne du tube collecteur afin d'éviter tout contact avec l'éluat.  
Changer le tube collecteur. Fermer le couvercle.  
Centrifugation 1 min à 11 000 g.
  17. Placer la colonne RNeasy dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL.  
Ajouter 40  $\mu\text{L}$  d'eau RNase-free sur la membrane.  
Pour une bonne dissolution de l'ARN dans l'eau, 5 min d'attente à T° ambiante.  
Fermer le couvercle.  
Centrifuger 1 min à 11 000 g pour éluer le RNA.

Les éluats d'ARN sont stockés à -20°C.

Mesure des concentrations en ARN et protéines (2  $\mu\text{L}$  d'ARN dans 98  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O) :

Dans UVette

Shimadzu

DO 260 nmol.L<sup>-1</sup> et 280 nmol.L<sup>-1</sup>

Calcul des concentrations en ARN des échantillons :

$\Delta\text{DO} = 1 : 40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dilution au 1/50<sup>ème</sup>.

## La qPCR

### Conservation des muscles

Tous les tissus sont congelés dans l'azote liquide et conservé au  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. Pour les prélèvements de plus de 30 mg ils sont ensuite réduits en poudre, en conservant la chaîne du froid.

Pour les prélèvements de moins de 30 mg utiliser un petit potter ou le turrax

Dans tous les cas, l'échantillon est repris dans du RLT et trituré à l'aide de cônes ou seringues de diamètre décroissant jusqu'à 25G ou broyé à l'Ultraturax.

### Extraction de l'ARN :

Dans le cas de muscle utiliser les RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits Qiagen

Etape DNase obligatoire.

### Conservation de l'ARN

A  $-20^{\circ}\text{C}$ , voire à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour une conservation plus longue.

### Mesure de la concentration en ARN

Spectro UV1800 SHIMADZU

Biomethod puis

Ou 8 longueurs d'ondes

Faire 0 avec Basecorr. compartiment de mesure vide.

260 nm (ARN) et 280 nm (Protéines)

5  $\mu\text{L}$  d'échantillon dans 95  $\mu\text{L}$  d'eau soit une dilution au  $1/20^{\text{ème}}$ .

Ratio 260/280 doit être supérieur à 1,8

$\Delta\text{DO} = 1 = 40 \mu\text{g d'ARN.mL}^{-1}$

### Calibrateur

Il est constitué d'un mélange de tous les échantillons étudiés pour une étude donnée. Il est utilisé pour établir la courbe d'efficacité de chaque gène (intérêt et de référence) à partir de 4 (ou plus) dilutions.

Sur chaque plaque de qPCR sur les échantillons, une de ces dilutions servira d'étalon interne.

Pour la constitution du calibrateur, deux stratégies sont possibles :

1) avant la RT, prélever un même volume de chaque échantillon. Mesurer la concentration en ARN. Ramener à  $200 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ . On peut aussi faire le mélange à partir des échantillons déjà ramenés à  $200 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ .

2) après la RT, prélever un même volume de chaque échantillon d'ADNc.

On privilégie la stratégie 1. Le rendement de la transcription sera le même pour le calibrateur et les échantillons.

### Dilutions des échantillons

Les concentrations en ARN sont ramenées à  $200 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$  pour faciliter le pipetage dans les étapes de RT.



## Reverse transcriptase

Eurogentec Core Kit

Volume final : 10  $\mu\text{L}$  ou 20  $\mu\text{L}$ . On privilégie 20 $\mu\text{L}$ .

Dans le cas où les concentrations en ARN sont ramenées à 200  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  et pour un volume final de 20  $\mu\text{L}$ , le volume d'échantillon est de 2  $\mu\text{L}$  soit 400 ng d'ARN dans le tube.

Sinon les volumes d'échantillon sont ajustés pour que la quantité ARN par tube soit de 400 ng : un volume autour de 2  $\mu\text{L}$  assure un meilleur confort de pipetage.

RT + : le milieu réactionnel contient tous les composants et le produit de la réaction est l'ADNc qui sera utilisé par la suite en qPCR

RT- : le milieu réactionnel contient tous les composants SAUF l'enzyme Reverse Transcriptase (remplacée par de l'eau) et il ne doit pas y avoir d'ADNc produit.

Dans le cas inverse, l'échantillon d'ARN de départ est certainement contaminé.

Prévoir le volume de calibrateur qui sera nécessaire pour établir les courbes d'efficacité et les points étalon. On peut multiplier le nombre de tube de RT pour obtenir un stock d'ADNc.

Chaque échantillon en général est soumis à une RT+ et à une RT-.

Prévoir dans chaque cas un tube sans ADNc, remplacé par de l'eau permettant de déterminer si les composants du kit de RT sont contaminés.

Voir tableau :

Reverse transcriptase	RT+	RT-
Concentration en ARN de l'échantillon $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	200	200
Quantité d'ARN ng dans vol.final 20 $\mu\text{L}$	400	400
Tampon 10x $\mu\text{L}$	2	2
MgCl <sub>2</sub> (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) $\mu\text{L}$	4	4
dNTP (2,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) $\mu\text{L}$	4	4
Random nonamer (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) $\mu\text{L}$ ou Oligo d(T)15 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1	1
Rnase Inhibitor 20 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	0,4	0,4
Euroscript RT 50 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	0,5	0
Rnase-free water $\mu\text{L}$	6,1	6,6
Volume échantillon $\mu\text{L}$	2	2
Volume total $\mu\text{L}$	20	20

Programme :

Eppendorf Mastercycler Gradient.

- 10 min à 25°C      30 min à 48°C      5 min à 95°C      hold 4°C

### Vérification de la RT :

Pour mettre en évidence la présence d'ADNc (RT+) (facultatif) ou de son absence (RT-) (obligatoire), chaque produit est soumis à un PCR « classique » qualitative : Kit HotStarTaq (Qiagen).

Les conditions du volume final et des concentrations en amorces doivent être les mêmes que celles utilisées dans la qPCR. On travaille à partir de dilutions des échantillons post RT (en général au 1/50<sup>ème</sup>).

Les amorces sont celles d'un gène de référence : Hprt, Ppia ou S26.

Voir tableau

PCR contrôle RT	RT-	RT+	Eau	Conc./tube
Tampon 10x $\mu\text{L}$	2	2	2	1,00
MgCl <sub>2</sub> 25 mmol.L <sup>-1</sup> , $\mu\text{L}$	1,92	1,92	1,92	2,40 mmol.L <sup>-1</sup>
Sol.Q 5x $\mu\text{L}$	4	4	4	1,00
dNTP 10 mmol.L <sup>-1</sup> , $\mu\text{L}$	0,96	0,96	0,96	0,48 mmol.L <sup>-1</sup>
Oligo right 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , $\mu\text{L}$	0,4	0,8	0,4	0,40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Oligo left 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , $\mu\text{L}$	0,4	0,8	0,4	0,40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
HotStarTaq 5U. $\mu\text{L}^{-1}$	0,2	0,2	0,2	0,05 U. $\mu\text{L}^{-1}$
Eau milliQ $\mu\text{L}$	7,99	7,19	7,99	
Volume de produit de RT (dilué au 1/50 <sup>ème</sup> ) $\mu\text{L}$	2	2	2	
Volume total dans tube $\mu\text{L}$	20	20	20	

Remarque : Sol Q optionnelle.

Programme :

Eppendorf Mastercycler Gradient

15 min à 95°C : activation de la HotStarTaq

(5 sec. à 95°C 20 sec. à 60°C 30 sec. à 72°C) 45 cycles

10 min à 72°C Hold 4°C

### Migration sur gel

Gel agarose 1,2 % dans TAE 1x + (2  $\mu\text{L}$  pour 50 mL de gel)

12  $\mu\text{L}$  d'échantillon + 4  $\mu\text{L}$  de tampon de charge sans bromophénol + 4  $\mu\text{L}$  Gel Red 1/10000<sup>ème</sup>

PM : 5  $\mu\text{L}$  « Fermentas » + 5  $\mu\text{L}$  Gel Red 1/10000<sup>ème</sup>

90 volts pendant 1 heure

Révélation sous UV et photos : RT- pas de bandes, RT+ bandes correspondant au PM du gène de référence.

### qPCR

Ssofast Evagreen Supermix de Bio-Rad

Etablissement de la courbe d'efficacité :

Volume final : 20  $\mu\text{L}$

Volume échantillon : 2  $\mu\text{L}$

Concentration des amorces : 400 nmol.L<sup>-1</sup> pour le premier essai. Elle est ajustée pour les essais suivants si l'efficacité n'est pas satisfaisante.

Dilution en cascade du produit de RT du calibrateur avec eau RNase-free :

1/5<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup>, 1/20<sup>ème</sup>, 1/40<sup>ème</sup>, 1/80<sup>ème</sup>, 1/160<sup>ème</sup>.

Chaque échantillon est mesuré en triplicat.

Chaque gène de référence et d'intérêt fait l'objet d'une courbe d'efficacité en utilisant les 6 dilutions du calibrateur. Voir tableau

qPCR Courbe efficacité				
Dilution du calibrateur	1/5	1/160	Eau	Conc./tube
Mix Evagreen 2x $\mu\text{L}$ BIORAD	10	10	10	
Oligo forward 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , $\mu\text{L}$	0,8	0,8	0,8	0,40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Oligo reverse 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , $\mu\text{L}$	0,8	0,8	0,8	0,40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
Eau milliQ $\mu\text{L}$	6,4	6,4	8,4	
Volume échantillon $\mu\text{L}$	2	2	0	
Volume total dans tube $\mu\text{L}$	20	20	20	

Programme usuel :

C1000/CFX96 Bio-Rad

2 min à 95°C : activation de l'enzyme

(5 sec. à 95°C 5 sec. à 60°C 5 sec. à 72°C) 45 cycles

Courbe de fusion de 65 à 95°C.

La T° d'hybridation varie avec le Tm des amorces. Dans certains cas le temps d'élongation peut varier.

La T° est ajustée pour les essais suivants si l'efficacité n'est pas satisfaisante.

Valeurs recevables :

Efficacité : de 95 à 105%

R<sup>2</sup> = le plus proche de 1,000

Pente : de 3,33 à 3,60

Lorsque les courbes d'efficacité sont satisfaisantes, on peut passer aux échantillons.

Même procédure.

On choisit la dilution la plus judicieuse qui donne un cycle de sortie autour de 30.

### Stratégie de plaque

Plaque de 96 puits (de préférence Low Profile transparent)

Etude d'un gène par plaque Echantillons en duplicat voire triplicat.

La dernière ligne est réservée aux contrôles internes à savoir : un point du calibrateur avec le gène d'intérêt de la plaque, en triplicat.

**Tableau 6 : Caractéristiques des amorces utilisées**

Gene	GeneBank accession no.	Séquence 5'-3'	Longueur de l'amplicon	Concentration des amorces (nmol.L <sup>-1</sup> )	Efficacité de qPCR (%)	Tm (°C)
Actb	NM_031144.2	Fwd: GTCCACCCGCGAGTACAACCTT Rev: TTGCACATGCCGGAGCCGTT	120	200	99,9	56
Atg5	NM_001014250.1	Fwd: TGTCTCTGCTGTCCTGTTGG Rev: GGAGCCAAAAAGGAAAAAGG	133	200	105,3	60
Bnip3	NM_053420.3	Fwd: AGATTGGATATGGGATTGGTCAAG Rev: CCCTTTCCTCATAACGCTTGTG	121	500	100,5	60
Cathepsine B	NM_022597.2	Fwd: CCATCGCACAGATCAGAGAC Rev: CCACATTGACTCGGCCATTG	111	400	100,3	60
Cathepsine L	NM_013156.2	Fwd: CACAATGGGGAGTACAGCAAC Rev: TGTGCTTCTGGTGGCGATAG	118	400	98	59
Fbxo32 (Atrogin)	NM_133521.1	Fwd: TCCGTGCTGGTGGGCAACAT Rev: AAGCACACAGGCAGGTCCGT	137	200	100,1	60
Gabarapl1	NM_172036.3	Fwd: AGGAGCATCCGTTCGAGAAG Rev: AGGTCCCCTATCCGAGCTTTG	112	400	101	59
Gnai1	NM_013145.1	Fwd: TCCTGGACCTGACCAGAGTTC Rev: AGGACCATCTTTCGCCTTCTC	87	300	95,3	60
Gnaq	NM_031036.1	Fwd: TCCAGGAATGCTACGATAGACGGCG Rev: AAGGGTCAGCCACACGGTCCA	90	200	100,1	62
Gnas1	NM_001024823.4	Fwd: TCAACGACTGCCGTGACATC Rev: CCTATGGTGGGTGATCAACTG	148	400	117,4	60
Hprt1	NM_012583.2	Fwd: CCTCAGTCCCAGCGTCGTGATT Rev: TCAGCACACAGAGGGCCACAA	197	400	100,1	58
Map1lc3b	NM_022867.2	Fwd: ACGGCTTCCTGTACATGGTC Rev: GTGGGTGCCTACGTTCTGAT	171	200	100	60
Myostatine (Mstn)	NM_019151.1	Fwd: TGACGGCTCTTTGGAAGATGACGA Rev: ATATCCACAGCTGGGCCTTTACCA	170	400	100	60
Murf1	NM_080903.1	Fwd: TGCAGCGGATCACTCAGGAGCA Rev: TGAGCGGCTTGGCACTCAGA	164	400	100,1	58
Tfeb	NM_001025707.1	Fwd: ACTTCCAGTCGCCACCACCAGT Rev: GCTGACGTGGGCAGCAAAC	155	200	100,1	60
ULK1	NM_001108341.1	Fwd: CATGACCTCCCTTGCATGTAAC Rev: ACCAGGTGGTGGGTAAGGAAC	106	400	100,1	60



# **RESULTATS**



# **MANUSCRIT 1**





Traditionnellement utilisés pour prévenir et réduire les symptômes de l'asthme et de la bronchoconstriction induite par l'exercice, les  $\beta_2$ -agonistes, pris en quantités supérieures aux doses thérapeutiques, ont un effet hypertrophiant qui a été clairement démontré *in vivo*. Un certain nombre d'acteurs sont mis en jeu dans la réponse biologique du tissu musculaire aux  $\beta_2$ -agonistes. L'un de ces acteurs est la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, voie d'initiation de la traduction, ayant un rôle majeur dans la synthèse protéique. Bien que l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR soit bien documentée en réponse à l'administration de  $\beta_2$ -agonistes, la cinétique de cette réponse mérite d'être approfondie. Ceci est particulièrement important étant donné qu'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique prolongée pourrait mener à une désensibilisation et à une diminution de la densité des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques.

Dans ce contexte, cette première étude a pour objectif de déterminer la cinétique des événements moléculaires responsables de l'hypertrophie du muscle squelettique induite par le formotérol, un  $\beta_2$ -agoniste de nouvelle génération qui possède un délai d'action court et une durée d'action longue. Cette étude portera non seulement sur la régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR mais également sur la régulation de la voie ubiquitine-protéasome et de la voie autophagie-lysosome, en réponse au formotérol.



**Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle**

Olivier Roger JOASSARD<sup>1</sup>, Adel AMIROUCHE<sup>1</sup>, Yann Simon GALLOT<sup>1</sup>, Marine Maud DESGEORGES<sup>1</sup>, Josiane CASTELLS<sup>1</sup>, Anne-Cécile DURIEUX<sup>1</sup>, Phanélie BERTHON<sup>2</sup>, Damien Gilles FREYSSENET<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Savoie, F-73376 Le Bourget du Lac, France

Corresponding author: Damien Freyssenet  
Laboratoire de Physiologie de l'Exercice  
Faculté de Médecine  
15 rue Ambroise Paré  
42023 Saint Etienne Cedex 2  
Tel: 033 4 77 42 14 77  
Fax: 033 4 77 42 14 78  
Email: damien.freyssenet@univ-st-etienne.fr

accepté dans

International Journal of Biochemistry & Cell Biology



**Abstract**

Administration of  $\beta_2$ -agonists triggers skeletal muscle anabolism and hypertrophy. We investigated the time course of the molecular events responsible for rat skeletal muscle hypertrophy in response to 1, 3 and 10 days of formoterol administration (i.p. 2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ). A marked hypertrophy of rat *tibialis anterior* muscle culminated at day 10. Phosphorylation of Akt, ribosomal protein S6, 4E-BP1 and ERK1/2 was increased at day 3, but returned to control level at day 10. This could lead to a transient increase in protein translation and could explain previous studies that reported increase in protein synthesis following  $\beta_2$ -agonist administration. Formoterol administration was also associated with a significant reduction in *MAFbx/atrogin-1* mRNA level (day 3), suggesting that formoterol can also affect protein degradation of MAFbx/atrogin1 targeted substrates, including MyoD and eukaryotic initiation factor-3f (eIF3-f). Surprisingly, mRNA level of autophagy-related genes, *light chain 3 beta (LC3b)* and *gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1 (Gabarapl1)*, as well as lysosomal hydrolases, *cathepsin B* and *cathepsin L*, was significantly and transiently increased after 1 and/or 3 days, suggesting that autophagosome formation would be increased in response to formoterol administration. However, this has to be relativized since the mRNA level of *Unc-51-like kinase1 (Ulk1)*, *BCL2/adenovirus E1B interacting protein3 (Bnip3)*, and *transcription factor EB (TFEB)*, as well as the protein content of Ulk1, Atg13, Atg5-Atg12 complex and p62/Sqstm1 remained unchanged or was even decreased in response to formoterol administration. These results demonstrate that the effects of formoterol are mediated, in part, through the activation of Akt-mTOR pathway and that other signaling pathways become more important in the regulation of skeletal muscle mass with chronic administration of  $\beta_2$ -agonists.

**Keywords:** Akt-mTOR pathway; Autophagy;  $\beta_2$ -agonist; hypertrophy; MAFbx/atrogin-1; ubiquitin-proteasome

*Abbreviations:* Actb, actin beta; Atg, autophagy-related; Bnip3, BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3; BSA, bovine serum albumin; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CREB, cAMP response element binding protein; EDL, *extensor digitorum longus*; eIF3-f, eukaryotic initiation factor 3 subunit f; Epac, exchange protein activated directly by cAMP; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FoxO3, forkhead box O3; Gabarap11, gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein; GAS, *gastrocnemius*; G $\alpha_i$ ,  $\alpha$ -subunit of the inhibitory G protein; G $\alpha_q$ ,  $\alpha$ -subunit of the Gq protein; G $\alpha_s$ ,  $\alpha$ -subunit of the stimulatory G protein; Hpirt, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; IGF-1, insulin growth factor-1; IRS-1, insulin receptor substrate-1; LC3b, light chain 3 beta; MEF2, myocyte enhancer factor 2 ; mTOR, mammalian target of rapamycin; MuRF1, muscle RING finger-1; p62/Sqstm1, sequestosome 1; PE, phosphatidylethanolamine; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) coactivator 1 $\alpha$ ; PKA, protein kinase A; Rap, Ras-related protein; rpS6, ribosomal protein S6; SOL, *soleus*; TA, *tibialis anterior*; TBS, tris-buffered saline; TFEB, transcription factor EB; TSC2, tuberous sclerosis complex 2; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1; Ulk1, Unc-51-like kinase 1.

## 1. Introduction

$\beta_2$ -adrenoceptor-selective agonists ( $\beta_2$ -agonists) are derived from the chemical structure of adrenaline. They are traditionally used for the treatment of bronchospasm associated with asthma and the treatment of symptomatic patient with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) to induce a bronchodilatation by relaxing airway smooth muscle (Cazzola et al., 1997). However, when experimentally used in animals, chronic administration of  $\beta_2$ -agonists is also known to trigger a gain in skeletal muscle mass. For instance, administration of formoterol (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ), clenbuterol (2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) or fenoterol (2,800  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) for 28 days increases skeletal muscle mass by about 20-30% (Gehrig et al., 2010; Koopman et al., 2010; Ryall et al., 2002). Even lower doses, such as 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  of formoterol for 28 days (Ryall et al., 2006), as well as shorter duration treatment (2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  of formoterol for 7 days), also triggers skeletal muscle hypertrophy (Busquets et al., 2004).  $\beta_2$ -agonist chronic administration can also attenuate skeletal muscle mass loss induced by different experimental settings including denervation (Zeman et al., 1987), hindlimb unloading (Yimlamai et al., 2005), and dexamethasone treatment (Agbenyega and Wareham, 1992), as well as in several muscle wasting conditions such as neuromuscular diseases and chronic diseases (see Joassard et al., 2013 for review).

The hypertrophy and anti-atrophy effects of  $\beta_2$ -agonists can be explained by their actions on the balance between protein synthesis and protein degradation. Previous studies indicate that chronic administration of  $\beta_2$ -agonists not only increases muscle protein synthesis (Busquets et al., 2004; Emery et al., 1984; Koopman et al., 2010; MacLennan and Edwards, 1989; Navegantes et al., 2004), but also decreases muscle protein degradation (Busquets et al., 2004; Navegantes et al., 2000; Navegantes et al., 2001), thus leading to a net positive nitrogen balance. Activation of the Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway stimulates protein translation in skeletal muscle (Bodine et al., 2001b; Rommel et al., 2001) and inhibits protein degradation via the inhibition of both ubiquitin-proteasome (Bodine et al., 2001a; Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004) and autophagy-lysosome pathways (Mammucari et al., 2007; Zhao et al., 2007). The activation of Akt-mTOR pathway and the subsequent inhibition of ubiquitin-proteasome pathway has been documented in response to  $\beta_2$ -agonist administration (Kline et al., 2007; Koopman et al., 2010; Sneddon et al., 2001), but the kinetic of this response in relation to the regulation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome



pathways is currently unknown. This is of particular importance since prolonged  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation can lead to receptor desensitization and decrease  $\beta_2$ -adrenoceptor density (Beitzel et al., 2004; Rothwell et al., 1987; Ryall et al., 2002; Ryall et al., 2004; Ryall et al., 2006), thus leading to rapid dampening of receptor function and down-regulation of Akt-mTOR pathway. This also raises the question of the existence of other mechanisms that would be activated to sustain the hypertrophy. Finally, it is currently unknown whether  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation regulates autophagy-lysosome pathway in skeletal muscle.

The aim of this study was therefore to provide a detailed analysis of the molecular events and signaling pathways involved in the hypertrophy triggered by 1, 3 and 10 days of  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation by formoterol. Formoterol was used because unlike to the first generation of  $\beta_2$ -agonists like clenbuterol, the addition of a long carbon chain containing a second benzene ring confers a rapid onset and long duration of action (van Noord et al., 1996). In this study, we also examined the hypothesis that activation of Akt-mTOR signaling pathway in response to formoterol administration is temporally associated with the regulation of both ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Ethical approval of the procedure

Experiments were approved by Jean Monnet University Animal Care and Use Committee, and were carried out in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals.

### 2.2. Animals

Thirty-four male Wistar rats ( $224 \pm 19$  g) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). The animals were maintained under a constant 12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. Rats were allocated into a control group ( $n = 10$ ) or a formoterol-treated group (3 groups,  $n = 6-10$ /group). Formoterol-treated animals received daily intraperitoneal (i.p.) injections of  $2,000 \mu\text{g/kg}$  of formoterol (Sigma-Aldrich, l'Isle d'Abeau, France) in 0.9% endotoxin free NaCl for 1, 3 and 10 days. Control rats were injected with the saline solution for 10 days. Body weight and food intake were measured daily.

### 2.3. Tissue removal

Tissue removal was realized 24 hours after the last formoterol injection. At the indicated time points, animals were anesthetized (i.p. injection of 90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine). *Tibialis anterior* (TA) muscle was carefully dissected and trimmed of tendons and any non-muscle tissue and weighed. Central portions of right TA muscle were mounted in embedding medium and frozen in thawing isopentane and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for subsequent analysis. The remaining right TA muscle and the entire left TA muscle were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for later analyses. *Soleus*, *extensor digitorum longus* (EDL), and *gastrocnemius* muscles were carefully removed and weighed. Rats were sacrificed as a consequence of heart excision, while deeply anesthetized.

### 2.4. Histomorphometric analysis

TA muscle transverse sections ( $12 \mu\text{m}$ ) of rats treated with  $2,000 \mu\text{g/kg}$  of formoterol for 10 days were cut in a refrigerated ( $-20^\circ\text{C}$ ) cryostat (Microm HM 560, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France), and stained with hemalun-eosin-safran. Eight to 11 photographs covering the entire muscle section were used to determine the whole muscle

cross-sectional area. Five fields consistently positioned across muscle sections were chosen. The cross-sectional area of  $1,062 \pm 309$  fibers per muscle was determined. Digital images of stained sections were captured using an upright light microscope (Eclipse E400, Nikon, Badhoevedorp, The Netherlands) connected to a digital camera (Coolpix 990, Nikon). Images were quantified using ImageJ analysis software.

### 2.5. RNA isolation, cDNA synthesis and real-time PCR

Total RNA was extracted from 20-30 mg of TA muscle using the RNeasy Fibrous tissue mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. cDNA was generated from 400 ng of RNA using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The selected forward and reverse primer sequences are listed in Table 1. Real time PCR was performed in a 20  $\mu$ l final volume and optimized concentrations for each primer using the SsoFast EvaGreen Super mix (Bio-Rad) and a CFX96 Real Time PCR Detection System, C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). Two reference genes, *actin beta* (*Actb*) and *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase* (*Hprt*), were used to normalize the expression levels of genes of interest, as previously described (Pfaffl, 2001).

### 2.6. Protein isolation

TA muscles were homogenized (1:20 dilution wt:vol) in ice-cold buffer (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, and 120 nM okadaic acid, all reagents from Sigma-Aldrich). Homogenates were centrifuged at 12,000 g for 20 min at 4°C, and the resulting supernatants analyzed for total protein content (Bio-Rad DC Protein Assay) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

### 2.7. Immunoblotting

Equal amount of protein (50  $\mu$ g) were resolved on 12.5% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred to 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membranes. After Ponceau S staining, membranes were blocked (1 h at room temperature with Tris-buffered saline (TBS) containing 5% non-fat dried milk), and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Antibodies directed against Akt, Akt<sup>Thr308</sup>, Akt<sup>Ser473</sup>, CREB, CREB<sup>Ser133</sup>, ERK1/2, ERK1/2<sup>Thr202/Tyr204</sup>, 4E-BP1, 4E-BP1<sup>Thr37/46</sup>, IRS-1, IRS-1<sup>Ser636/639</sup>, rpS6 and rpS6<sup>Ser235/236</sup> were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Antibodies directed against Atg5-

Atg12 complex, Atg13, LC3b, sequestosome1 (p62/Sqstm1) and  $\alpha$ -tubulin were from Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Antibodies directed against  $\beta_2$ -adrenoceptor (sc-569),  $\beta_2$ -adrenoceptor<sup>Ser355/356</sup> (sc-33182) and Ulk1 (sc-22191) were from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Antibodies directed against FoxO3a and FoxO3a<sup>Thr32</sup> were from Millipore (St. Quentin-en-Yvelines, France). Membranes were then washed 3 times in TBS and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-rabbit or a rabbit anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako, Trappes, France). After 3 x 5 min washes in TBS-Tween, immunocomplexes were visualized using an enhanced chemiluminescence detection method (GE Healthcare, Orsay, France). The films were scanned and quantified using ImageJ analysis software.  $\alpha$ -tubulin immunoblots were used to check for equal protein loading between samples.

### 2.8. Enzyme assays

Chymotrypsin-like and trypsin-like proteasome enzyme activities were fluorometrically determined ( $\lambda_{exc} = 380$  nm;  $\lambda_{em} = 460$  nm) by using Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Bachem, Weil am Rhein, Germany) and Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Sigma-Aldrich), respectively, as fluorogenic substrates (Berthon et al., 2007).

### 2.9. Statistical analysis

All values are expressed as means  $\pm$  SEM. Control and formoterol-treated groups were compared using a one-way analysis of variance. Scheffe's *post hoc* test was used to determine significant differences between groups. Statistic analyses were performed using StatView version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The  $\alpha$ -level of significance was set at 0.05.

### 3. Results

#### 3.1. Formoterol administration induces hypertrophy of rat skeletal muscle

Daily injections of formoterol (2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) for 10 days induced a marked hypertrophy (20-30%) of *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* and *tibialis anterior* (TA) muscles (Table 2). With the exception of *extensor digitorum longus* muscle, this effect could be observed as soon as 3 days of formoterol administration. Interestingly, lower doses of formoterol (20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  and 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) also induced muscle hypertrophy (Supplemental Table S1). Accordingly, whole TA muscle cross-sectional area (Fig. 1A) and TA muscle fiber cross-sectional area (Fig. 1B-C) were also significantly increased by 22% and 26%, respectively, in animals that received formoterol for 10 days. Muscle hypertrophy was associated with an increase in both total RNA content and muscle protein content (Supplemental Fig. S1). Altogether, these data indicate that muscle protein accretion is rapidly and strongly induced in response to  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation.

#### 3.2. Formoterol administration increases $\beta_2$ -adrenoceptor protein content and CREB phosphorylation on Ser<sup>133</sup>

We first determined the expression level of proteins involved in  $\beta_2$ -adrenoceptor signal transduction. Total  $\beta_2$ -adrenoceptor protein content was markedly increased by about 5.5-fold at day 3 ( $P < 0.001$ ) and returned below control values at day 10 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2A). Desensitization of  $\beta_2$ -adrenoceptor by G protein coupled receptor kinases, which has been reported in response to  $\beta_2$ -agonist administration (Hausdorff et al., 1989) can be determined by the phosphorylation of Ser residues at positions 355 and 356 in the C terminal domain of the receptor (Seibold et al., 2000).  $\beta_2$ -adrenoceptor phosphorylation was transiently increased by about 90% at day 3 of formoterol administration ( $P < 0.001$ ) and returned below control values at day 10 ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2B). Consequently, when expressed relative to the total amount of  $\beta_2$ -adrenoceptor, the phosphorylation level of  $\beta_2$ -adrenoceptor was significantly reduced at all time points (Fig. 2C).

mRNA level of  $G\alpha$  subunits was next determined. mRNA level of the *stimulatory*  $G\alpha$  subunit ( $G\alpha_{s1}$ ), the predominant  $G\alpha$  protein subunit isoforms in skeletal muscle (Suzuki et al., 1998), and  $G\alpha_q$  subunit remained unchanged in response to formoterol administration (Fig. 2D). mRNA level of the *inhibitory*  $G\alpha$  subunit ( $G\alpha_{i1}$ ) was transiently elevated after 3 days of formoterol administration (Fig. 2D).

Canonical  $\beta_2$ -adrenoceptor signaling pathway involves the activation of protein kinase A (PKA) by cAMP leading to the phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) on Ser<sup>133</sup> and the expression of CREB-responsive genes (Altarejos and Montminy, 2011). CREB phosphorylation was significantly increased at day 3 (Fig. 2E), indicating that the  $\beta_2$ -adrenoceptor-CREB pathway was activated. However, after multiple injections of formoterol (10 days), CREB phosphorylation returned to control levels (Fig. 2E). Total CREB protein content remained unchanged.

### 3.3. Formoterol administration transiently activates the Akt-mTOR pathway

Total protein content of Akt, rpS6, and 4E-BP1 remained virtually unchanged during the entire experimental period. Formoterol administration activated the Akt-mTOR pathway as evidenced by the significant increase in Akt phosphorylation (Thr<sup>308</sup> and Ser<sup>473</sup>) at day 3, together with a significant increase in eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) (Thr<sup>37/46</sup>) and ribosomal protein (rp) S6 (Ser<sup>235/236</sup>) phosphorylation at days 1 and 3 (Fig. 3A-C). Phosphorylation level returned to control values (Akt and 4E-BP1) and even below control values (rpS6) at day 10. Lower doses of formoterol (20 and 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  for 10 days) gave similar results (Supplemental Fig. S2).

$\beta_2$ -agonists have been proposed to trigger skeletal muscle hypertrophy by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) (Shi et al., 2007). ERK1/2 phosphorylation was significantly increased at days 1 and 3, and returned to control values at day 10 (Fig. 4A). Importantly, insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation on Ser<sup>636/639</sup>, which induces a negative feedback on Akt-mTOR pathway (Harrington et al., 2004; Tzatsos and Kandror, 2006), was significantly increased by about 3-fold after 10 days of formoterol administration (Fig. 4B). Furthermore, expression of *myostatin*, which negatively regulates the Akt-mTOR pathway in skeletal muscle (Amirouche et al., 2009), was also increased ( $P < 0.001$ ) in response to 10 days of formoterol administration (Fig. 4C). Altogether, these data suggest that the observed hypertrophy at day 10 was no longer sustained by an activation of Akt-mTOR pathway. They also suggest that the inhibition of Akt-mTOR pathway after 10 days of formoterol administration could be explained by a negative regulatory function of both IRS-1 and myostatin on Akt-mTOR pathway.

### 3.4. Regulation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration

Phosphorylation of forkhead box O3a (FoxO3a) transcription factor by Akt triggers the cytoplasmic sequestration of FoxO3a. This prevents its nuclear translocation and the transcriptional activation of its target genes, such as E3 ubiquitin ligases of the ubiquitin-proteasome pathway (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004), as well as the expression of autophagy-related genes (Mammucari et al., 2007; Zhao et al., 2007). In agreement with the increased phosphorylation of Akt, FoxO3a phosphorylation on Thr<sup>32</sup> was significantly increased after 3 days of formoterol administration (Fig. 5A). This was associated with a reduction in *muscle atrophy F-box (MAFbx/atrogin-1)* mRNA level (Fig. 5B), whereas *Muscle RING finger1 (MuRF1)* mRNA level remained unchanged (Fig. 5C). Chymotrypsin-like and trypsin-like activities remained also unchanged (Fig. 5D).

Surprisingly, the mRNA level of autophagy-related genes, *light chain 3 beta (LC3b)* and *gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1 (Gabarapl1)*, as well as lysosomal hydrolases, *cathepsin B* and *cathepsin L*, was significantly increased in response to 1 and/or 3 days of formoterol administration (Fig. 6A). In support to the mRNA data, LC3b-I, the unlipidated cytoplasmic form, and LC3b-II, the lipidated membrane-bound form arising from the conjugation of soluble LC3b-I to phosphatidylethanolamine (PE), were transiently increased in response to 1 and 3 days of formoterol administration (Fig. 6B). Consequently, the LC3b-II-to-LC3b-I ratio tended to decrease after 3 days of formoterol administration (Fig. 6C). To get further insights into the regulation of autophagy-lysosome pathway, we extended our analysis to the expression of other genes. mRNA level of *Unc-51-like kinase 1 (Ulk1)*, *Bcl2/adenovirus E1B interacting protein3 (Bnip3)* and *transcription factor EB (TFEB)* were either unchanged or even decreased in response to formoterol administration (Fig. 7A). Protein level of Ulk1 (Fig. 7B), Atg13 (Fig. 7C), Atg5-Atg12 complex (Fig. 7D) and sequestosome 1 (p62/Sqstm1) (Fig. 7E) remained also unchanged in response to formoterol administration.

### 3. Discussion

In the present study, we provide new insights into the regulation of intracellular events triggered by short-term administration of  $\beta_2$ -agonists. The data indicate that formoterol rapidly and transiently activates both  $\beta_2$ -adrenoceptor-CREB and Akt-mTOR pathways, together with a down-regulation of *MAFbx/atrogin-1* mRNA level and an up-regulation of *LC3b*, *Gabarapl1*, *cathepsin B* and *cathepsin L* mRNA level.

The increased CREB phosphorylation after 3 days of formoterol administration indicates that stimulation of  $\beta_2$ -adrenoceptor coupled to  $G\alpha_s$  increased cAMP production, activated adenylate cyclase, and ultimately increased phosphorylation of CREB transcription factor. Loss and gain of function studies strongly suggest that CREB-dependent transcription is probably involved in the hypertrophic action of formoterol. Indeed, mice expressing a dominant-negative *CREB* transgene harbour a dystrophic phenotype due to the absence of regulation of the transcriptional activity of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) (Berdeaux et al., 2007). *CREB* null mutant mice also exhibit strong myogenic defects with reduced expression of myogenic transcription factors MyoD and Myf5 during embryogenesis (Chen et al., 2005). Therefore, these studies point to an important role of CREB in the regulation of muscle-specific gene expression through the regulation of myogenic transcription factors. However, this needs to be confirmed in adult skeletal muscle cells. In differentiated C2C12 myotubes, CREB has been shown to interact with MyoD on *follistatin* promoter, thus promoting *follistatin* gene expression (Iezzi et al., 2004). Follistatin is known to induce skeletal muscle hypertrophy, notably by inhibiting myostatin (Gilson et al., 2009), a negative regulator of skeletal muscle mass (Amirouche et al., 2009; Durieux et al., 2007; McPherron et al., 1997). *Follistatin* gene expression has not been determined in the present study, but *myostatin* mRNA level remained unchanged after 3 days of formoterol administration, whereas CREB phosphorylation was increased at this time, suggesting that such a regulation is probably not involved in the present study.  $\beta_2$ -agonist-induced expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 1 could also contribute to the hypertrophy induced by formoterol. Indeed, *PGC-1 $\alpha$ 1* mRNA level is increased in response to formoterol administration in mouse skeletal muscle (Koopman et al., 2010; Pearen et al., 2008), and CREB increases PGC-1 $\alpha$ 1 expression in differentiated C2C12 myotubes (Handschin et al., 2003). Furthermore, elevated expression of PGC-1 $\alpha$ 1 in skeletal muscle limits muscle wasting (Geng et al., 2011; Sandri et al., 2006; Wenz et al., 2009). This



effect is mediated by PGC-1 $\alpha$ 1 interaction with FoxO3 transcription factor, which reduces the capacity of FoxO3 to transcribe *MAFbx/atrogin-1* and *MuRF1* promoters (Brault et al., 2010; Sandri et al., 2006). The reduction in *MAFbx/atrogin-1* expression observed in the present study (see below) could thus be partly explained by such a mechanism. Although the gain in muscle mass culminated at day 10, CREB phosphorylation had returned to control level at this time, suggesting that other signaling pathways are involved in the increase skeletal muscle mass with chronic administration of  $\beta_2$ -agonists.

The increased phosphorylation of Akt, rpS6 and 4E-BP1 after 1 and/or 3 days of formoterol administration supports the notion that the hypertrophy effect of formoterol is mediated through the stimulation of protein translation initiation by Akt-mTOR pathway (Kline et al., 2007; Koopman et al., 2010; Sneddon et al., 2001). This is in agreement with previous studies showing that  $\beta_2$ -agonists can increase protein synthesis in skeletal muscle (Busquets et al., 2004; Emery et al., 1984; Koopman et al., 2010; MacLennan and Edwards, 1989; Navegantes et al., 2004). This also raises the question of the molecular mechanism(s) involved in the coupling between  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation and activation of Akt-mTOR pathway. Previous studies have shown that  $\beta_2$ -adrenoceptor utilized G $\alpha_i$ -G $\beta\gamma$  to activate Akt-mTOR pathway in cardiomyocytes (Zhu et al., 2001), but also ERK1/2 in HEK293 cells (Daaka et al., 1997; Shenoy et al., 2006). In agreement with these findings,  $\beta_2$ -agonists promote skeletal muscle hypertrophy with concomitant activation of Akt-mTOR pathway [present study; (Kline et al., 2007; Koopman et al., 2010; Sneddon et al., 2001)] and ERK1/2 (Shi et al., 2007). In the present study, ERK1/2 phosphorylation was also increased 3 days after formoterol administration, and this was associated with a concomitant increase in G $\alpha_{i1}$  mRNA level. Although direct coupling between  $\beta_2$ -adrenoceptor and G $\alpha_{i1}$  has not been determined in the present study, these data raise the interesting possibility that  $\beta_2$ -adrenoceptor coupling to G $\alpha_i$ -G $\beta\gamma$ , could activate Akt-mTOR pathway and ERK1/2 to trigger skeletal muscle hypertrophy in response to formoterol administration. Recent evidences also suggest that exchange protein activated by cAMP (Epac) may directly couple intracellular increase in cAMP concentration to the activation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Epac is a guanine exchange factor activated by cAMP for Ras-related protein (Rap) 1 and 2 (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). 007, an Epac-specific cAMP analogue (Enserink et al., 2002), has been shown to potentiate Akt phosphorylation stimulated by insulin in rat *soleus* muscle in a similar manner as adrenalin does (Brennesvik et al., 2005), suggesting that Epac may mediate crosstalk between  $\beta_2$ -adrenoceptor and Akt-mTOR pathway. More recently, it

was also shown that incubation of rat *extensor digitorum longus* muscle with 007 increased Akt phosphorylation (Baviera et al., 2010). It remains therefore to determine whether such a mechanism triggers the activation of Akt-mTOR pathway in the present study.

As previously observed for CREB phosphorylation, phosphorylation of Akt and 4E-BP1 returned to control levels or even below (rpS6) at day 10, suggesting that other signaling pathways become activated to sustain skeletal muscle hypertrophy. Chronic  $\beta_2$ -agonist administration can decrease  $\beta_2$ -adrenoceptor density (Beitzel et al., 2004; Rothwell et al., 1987; Ryall et al., 2002; Ryall et al., 2004; Ryall et al., 2006), potentially leading to a decrease in Akt-mTOR pathway signal transduction. However,  $\beta_2$ -adrenoceptor phosphorylation was markedly decreased at day 10, suggesting that a decrease in receptor sensitization is probably not involved in the down-regulation of Akt-mTOR pathway. By contrast, we cannot exclude that the down-regulation of Akt/mTOR pathway at day 10 was not due to a decrease in  $\beta_2$ -adrenoceptor content, which was markedly reduced at day 10.

The increase in IRS-1 phosphorylation at day 10, suggests that chronic formoterol administration can lead to IRS-1 inhibition and the subsequent down-regulation of Akt-mTOR pathway. Similarly, we also report an increase in *myostatin* expression at day 10. Myostatin negatively regulates the Akt-mTOR pathway (Amirouche et al., 2009). The increased myostatin expression at day 10 could thus contribute to down-regulate the Akt-mTOR pathway. Furthermore, this may also limit the extent of skeletal muscle hypertrophy and could protect myofibers from the potential harmful effects of an excessive increase in skeletal muscle mass (Abo et al., 2012).

The concomitant increase in FoxO3a phosphorylation and decrease in *MAFbx/atrogen-1* mRNA level after 3 days of formoterol administration are in agreement with the reported increase of Akt phosphorylation at day 3. *MAFbx/atrogen-1* promotes degradation of MyoD (Tintignac et al., 2005), a key muscle transcription factor, and eIF3-f (eukaryotic initiation factor-3f), an activator of translation initiation (Lagirand-Cantaloube et al., 2008). Therefore, a decrease in *MAFbx/atrogen-1* expression could specifically regulate muscle-specific gene expression via the regulation of MyoD expression, and protein translation via the regulation of eIF3-f protein content. In agreement with this hypothesis, MyoD protein level is increased in response to clenbuterol administration (Bricout et al., 2004). It should be noted, however, that a recent study has demonstrated that *MAFbx/atrogen-1* can interact with sarcomeric proteins (Lokireddy et al., 2011), but it is currently unknown whether this interaction results in ubiquitination of the target proteins. By contrast to *MAFbx/atrogen-1*, *MuRF1* expression remained unchanged after formoterol administration. *MuRF1* is associated with the loss of

myofibrillar proteins including troponin I (Kedar et al., 2004), myosin heavy chains (Clarke et al., 2007; Cohen et al., 2009; Fielitz et al., 2007), myosin light chains (Cohen et al., 2009) and actin (Polge et al., 2011). The unchanged *MuRF1* expression observed in the present study suggests that alteration in myofibrillar protein degradation is probably not involved in skeletal muscle hypertrophy. In support of this hypothesis, and in agreement with previous observations (Koopman et al., 2010), proteasome enzyme activities remained unchanged in response to formoterol administration.

One surprising finding of the present study was the increase in *LC3b*, *Gabarapl1*, *cathepsin B* and *cathepsin L* transcripts, as well as the increase in unlipidated and lipidated forms of LC3b. LC3b and *Gabarapl1* are required in the biogenesis of autophagosomes. LC3b mediates the elongation of the phagophore membrane (Nakatogawa et al., 2007; Weidberg et al., 2010; Xie et al., 2008), whereas *Gabarapl1* would be involved in a downstream step by sealing autophagosomes (Weidberg et al., 2010). Our data would therefore suggest that autophagosome formation would be increased in response to formoterol administration. Furthermore, the increased expression of *cathepsin B* and *cathepsin L*, further suggests that downstream of autophagosome formation, the bulk degradation of autophagosome content by lysosomal proteases could be also increased in response to formoterol administration. However, this interpretation has to be relativized. Indeed, the mRNA level of autophagy-related genes *Ulk1*, *Bnip3* and *TFEB*, as well as the protein content of *Ulk1*, *Atg13*, *Atg5-Atg12* complex and *p62/Sqstm1* remained unchanged or was even decreased in response to formoterol administration. Altogether, these data suggest that the autophagy-lysosome pathway would be not activated in response to formoterol administration. It remains to determine the physiological relevance of the reported increase in LC3b-I, LC3b-II, as well in the increase in *Gabarapl1* and lysosomal proteases mRNA level.

In summary, the present findings demonstrate that formoterol does activate Akt-mTOR pathway. Activation of Akt and its downstream targets 4E-BP1 and rpS6 can lead to increase in protein translation and could explain previous studies that reported increase in protein synthesis following  $\beta_2$ -agonist administration. The mechanisms through which formoterol activates Akt-mTOR pathway are currently unknown, but could possibly involve  $\beta_2$ -adrenoceptor coupling to  $G\alpha_i$  and/or activation of Epac by cAMP. The ability of formoterol to repress *MAFbx/Atrogin1* transcript suggests that formoterol can also affect protein degradation of *MAFbx/Atrogin1* targeted substrates, including MyoD and eIF3-f. Finally, the observation that the highest gain in skeletal muscle mass was observed after 10 days of

formoterol administration, i.e. when both  $\beta_2$ -adrenoceptor-CREB and Akt-mTOR pathways had returned to control levels, strongly suggest that other signaling pathways are activated to sustain the anabolic response. It is clear from these data that multiple pathways mediate the effects of formoterol in skeletal muscle. A better knowledge of the actions of  $\beta_2$ -agonists in skeletal muscle could lead to the development of pharmacological strategies aimed at treating skeletal muscle atrophy.

**Acknowledgements**

Robin Candau and Guillaume Py (Faculté des Sciences du Sport, Université Montpellier Sud-de-France, Montpellier, France) are gratefully acknowledged for their support. Ludivine Ducreux is gratefully acknowledged for her technical help. No author had any financial or personal conflict of interest. This work was supported by the Agence Française de Lutte contre le Dopage and the World Anti-Doping Agency. JOR was supported by an Allocation Doctorale de Recherche from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. DMM is supported by an Allocation Doctorale de Recherche from the Région Rhône-Alpes (ARC2 Qualité de vie et vieillissement).

**Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR analysis.**

Gene	GeneBank accession no.	Primer sequences 5'-3'	Tm (°C)
<i>Actb</i> ( <i>Actb</i> )	NM_031144.2	Fwd: GTCACCCCGAGTACAACCTT Rev: TTGCACATGCCGGAGCCGT	56
<i>Bnip3</i> ( <i>Bnip3</i> )	NM_053420.3	Fwd: AGATTGGATATGGGATTGGTCAAG Rev: CCCTTCTTCATAACGCTTGTG	60
<i>Cathepsin B</i>	NM_022597.2	Fwd: CCATCGCACAGATCAGAGAC Rev: CCACATTGACTCGGCCAATTG	60
<i>Cathepsin L</i>	NM_013156.2	Fwd: CACAATGGGGAGTACAGCAAC Rev: TGTGCTTCTGGTGGCGATAG	59
<i>Gabrarap1l</i>	NM_172036.3	Fwd: AGGAGCATCCGTTTCGAGAAG Rev: AGGTCCCCTATCCGAGCTTTG	59
<i>Gat1</i> ( <i>Gnat1</i> )	NM_013145.1	Fwd: TCCTGGACCTGACCAGAGTTC Rev: AGGACCATCTTTCGCCTTCTC	60
<i>Gaq</i> ( <i>Gnaq</i> )	NM_031036.1	Fwd: TCCAGGAATGCTACGATAGACGGCG Rev: AAGGGTCAGCCACCGGTCCA	62
<i>Gas1</i> ( <i>Gnas</i> )	NM_001024823.4	Fwd: TCAACGACTGCCGTGACATC Rev: CCTATGGTGGGTGATCAACTG	60
<i>Hprt1</i> ( <i>Hprt1</i> )	NM_012583.2	Fwd: CCTCAGTCCAGCGTCGTGATT Rev: TCAGCACACAGAGGGCCACAAA	58
<i>LC3b</i> ( <i>Map1lc3b</i> )	NM_022867.2	Fwd: ACGGCTTCCTGTACATGGTC Rev: GTGGGTGCCTACGTTCTGAT	60
<i>MAFbx/atrogen-1</i> ( <i>Fbxo32</i> )	NM_133521.1	Fwd: TCCGTGCTGGTGGGCAACAT Rev: AAGCACACAGGCAGGTCGGT	60
<i>MuRF1</i> ( <i>Trim63</i> )	NM_080903.1	Fwd: TGCAGCGGATCACTCAGGAGCA Rev: TGAGCGGCTTGGCACTCAGA	58
<i>Myostatin</i> ( <i>Mstn</i> )	NM_019151.1	Fwd: TGACGGCTCTTTGGAAGATGACGA Rev: ATATCCACAGCTGGGCCTTACCA	60
<i>Tfeb</i> ( <i>Tfeb</i> )	NM_001025707.1	Fwd: ACTTCCAGTCGCCACCACCAGT Rev: GCTGACGTGGGCAGCAAAC	60
<i>Ulk1</i> ( <i>Ulk1</i> )	NM_001108341.1	Fwd: CATGACCTCCCTTGCATGTAAC Rev: ACCAGGTGGTGGTAAGGAAC	60

Primers were designed using Primer 3 software from gene sequences obtained from GeneBank. Primer specificity was determined using a BLAST search.

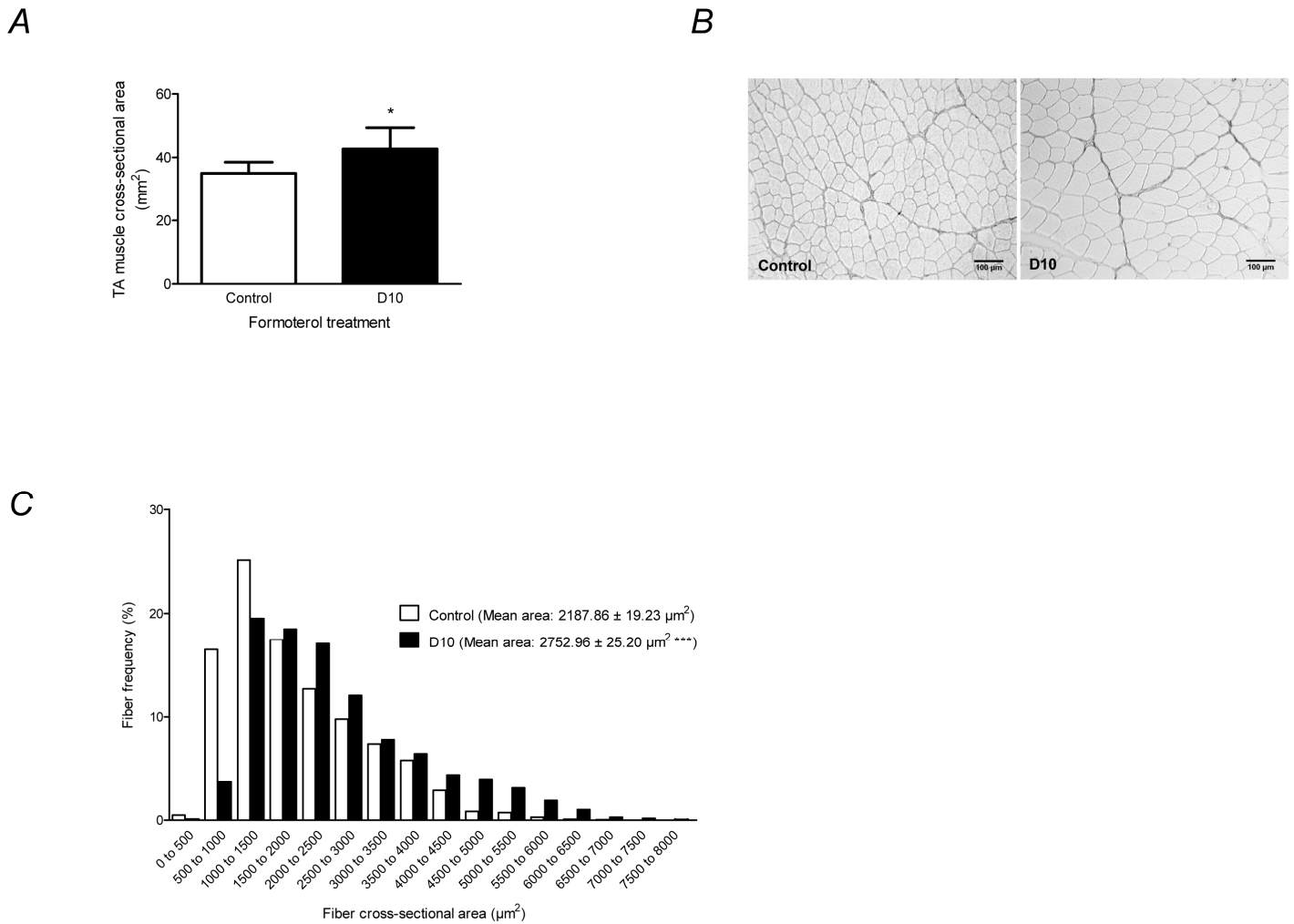
**Table 2. Effect of formoterol administration on *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* and *tibialis anterior* muscle mass.**

	EDL	GAS	SOL	TA
Control	128.0 ± 2.4	1,601 ± 27.0	108.2 ± 1.9	525.6 ± 5.9
D1	131.9 ± 1.6	1,679 ± 38.0	105.8 ± 2.5	553.9 ± 9.4
D3	136.6 ± 3.0	1,748 ± 47.0 <sup>a</sup>	125.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	573.5 ± 10.0 <sup>a</sup>
D10	155.1 ± 5.5 <sup>b</sup>	2,097 ± 57.6 <sup>b</sup>	128.9 ± 4.4 <sup>b</sup>	655.7 ± 20.9 <sup>b</sup>

EDL, *extensor digitorum longus*; GAS, *gastrocnemius*; SOL, *soleus*; TA, *tibialis anterior*.

D1, D3 and D10: 1, 3 and 10 days of formoterol administration (2,000 µg/kg). Data are means ± SEM (n = 6-10/group) and are expressed in milligrams. <sup>a</sup>*P* < 0.01 and <sup>b</sup>*P* < 0.001: significantly different from control group.

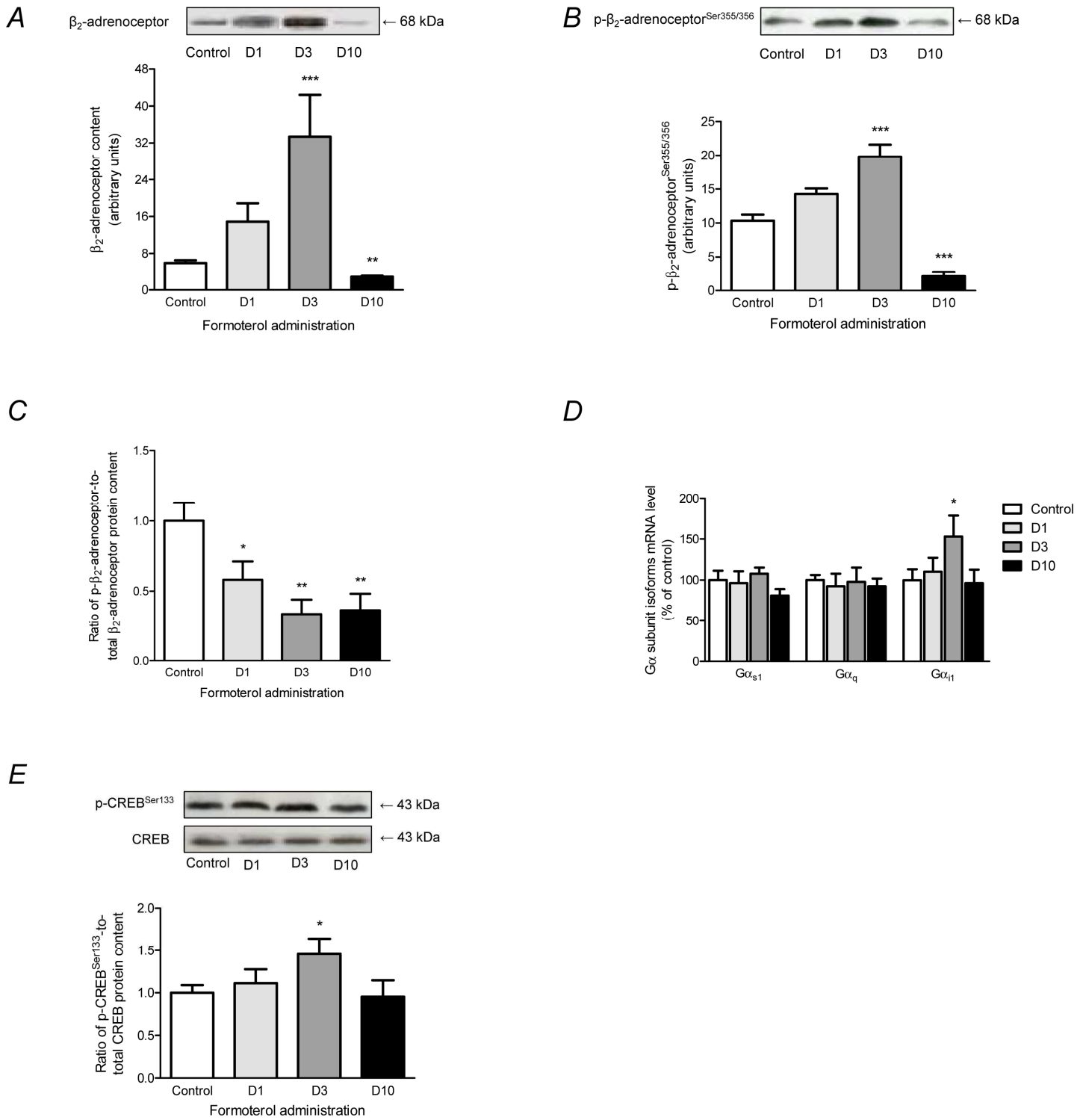
Figure 1



**Figure 1. Effect of formoterol administration on *tibialis anterior* muscle histomorphometry.** (A) Whole muscle cross-sectional area. (B) Magnified view of representative muscle sections in response to 10 days (D10) of formoterol administration (2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Scale bars represent 100  $\mu\text{m}$ . (C) Frequency histogram of muscle fiber cross-sectional area. Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 10/\text{group}$ ). \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ : significantly different from control group.

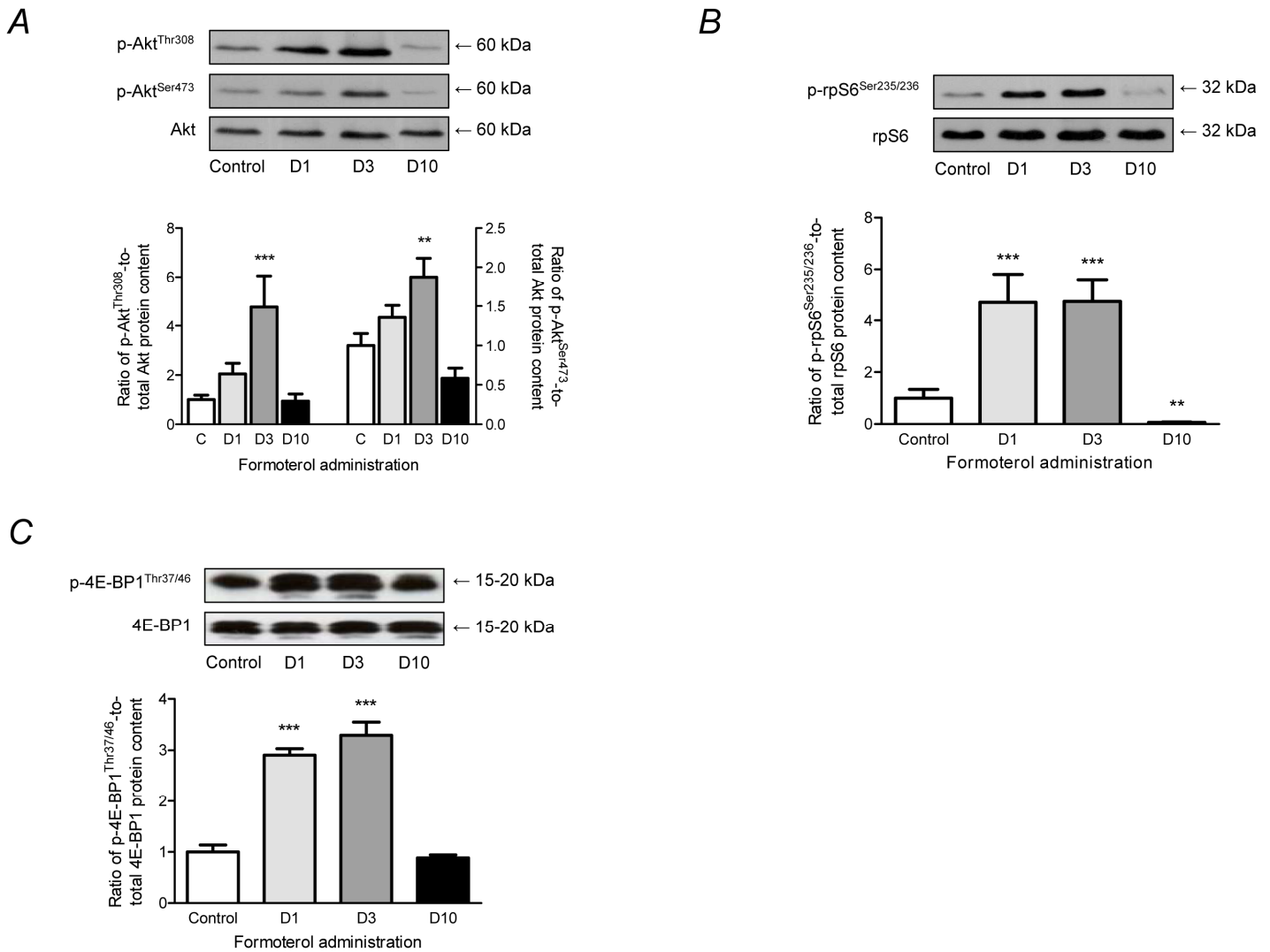


Figure 2



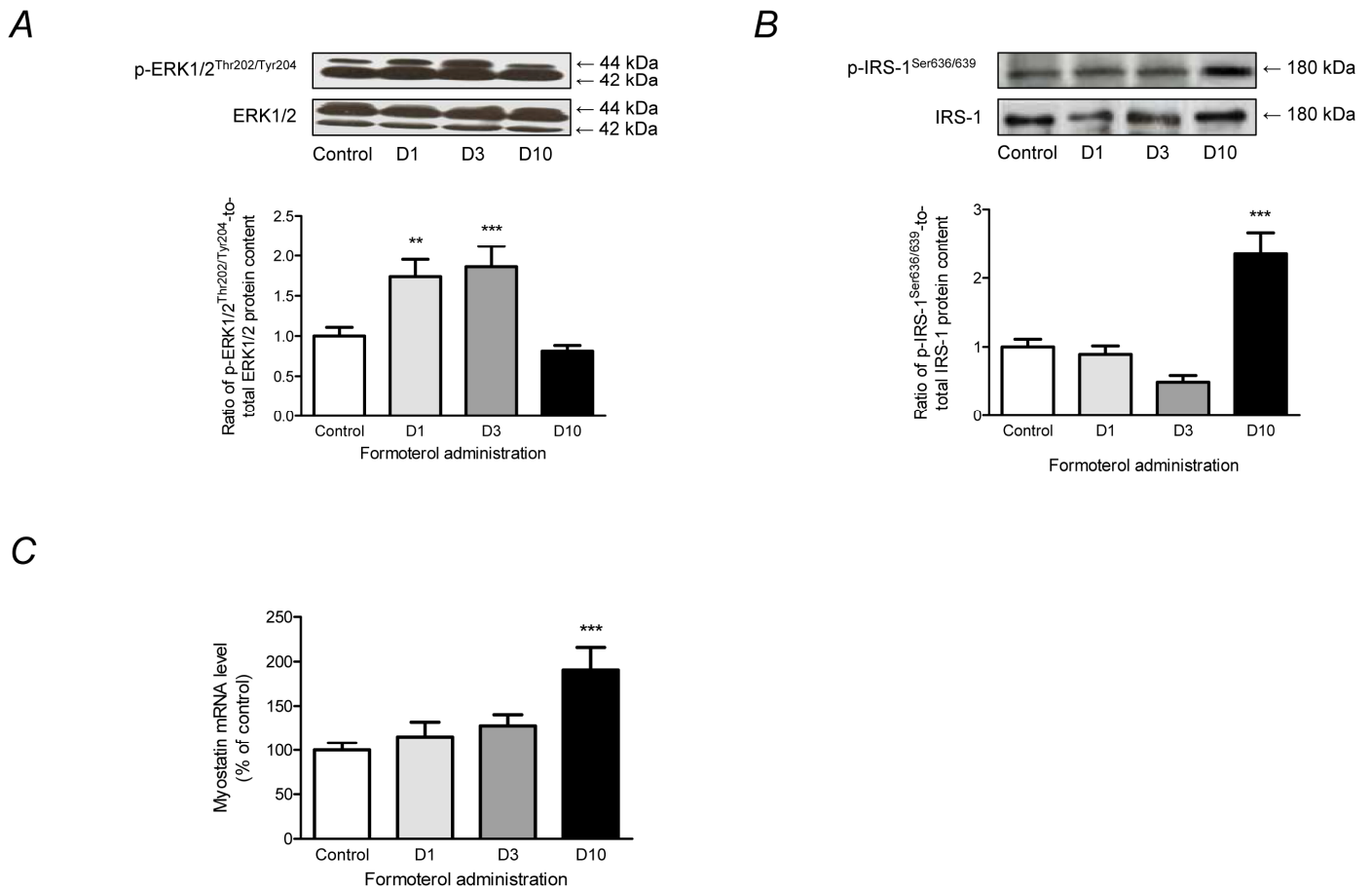
**Figure 2. Effect of formoterol administration on  $\beta_2$ -adrenoceptor protein content,  $\beta_2$ -adrenoceptor phosphorylation, mRNA level of  $G\alpha$  subunits and CREB phosphorylation in *tibialis anterior* muscle.** Representative immunoblot (upper panel) and quantification (lower panel) of (A)  $\beta_2$ -adrenoceptor total protein content and (B)  $\beta_2$ -adrenoceptor phosphorylation on Ser<sup>355</sup> and Ser<sup>356</sup> in response to 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). (C) Ratio between the content of  $\beta_2$ -adrenoceptor phosphorylation and  $\beta_2$ -adrenoceptor protein content. (D) mRNA level of  $G\alpha_{s1}$ ,  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{i1}$  subunit isoforms. (E) Representative immunoblot (upper panel) and corresponding ratio of CREB phosphorylation on Ser<sup>133</sup> to total CREB form (lower panel). The total amount of phosphorylated and non-phosphorylated CREB form remained unchanged (upper panel). Values are means  $\pm$  SEM (n=6-10/group). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ : significantly different from control group.

Figure 3



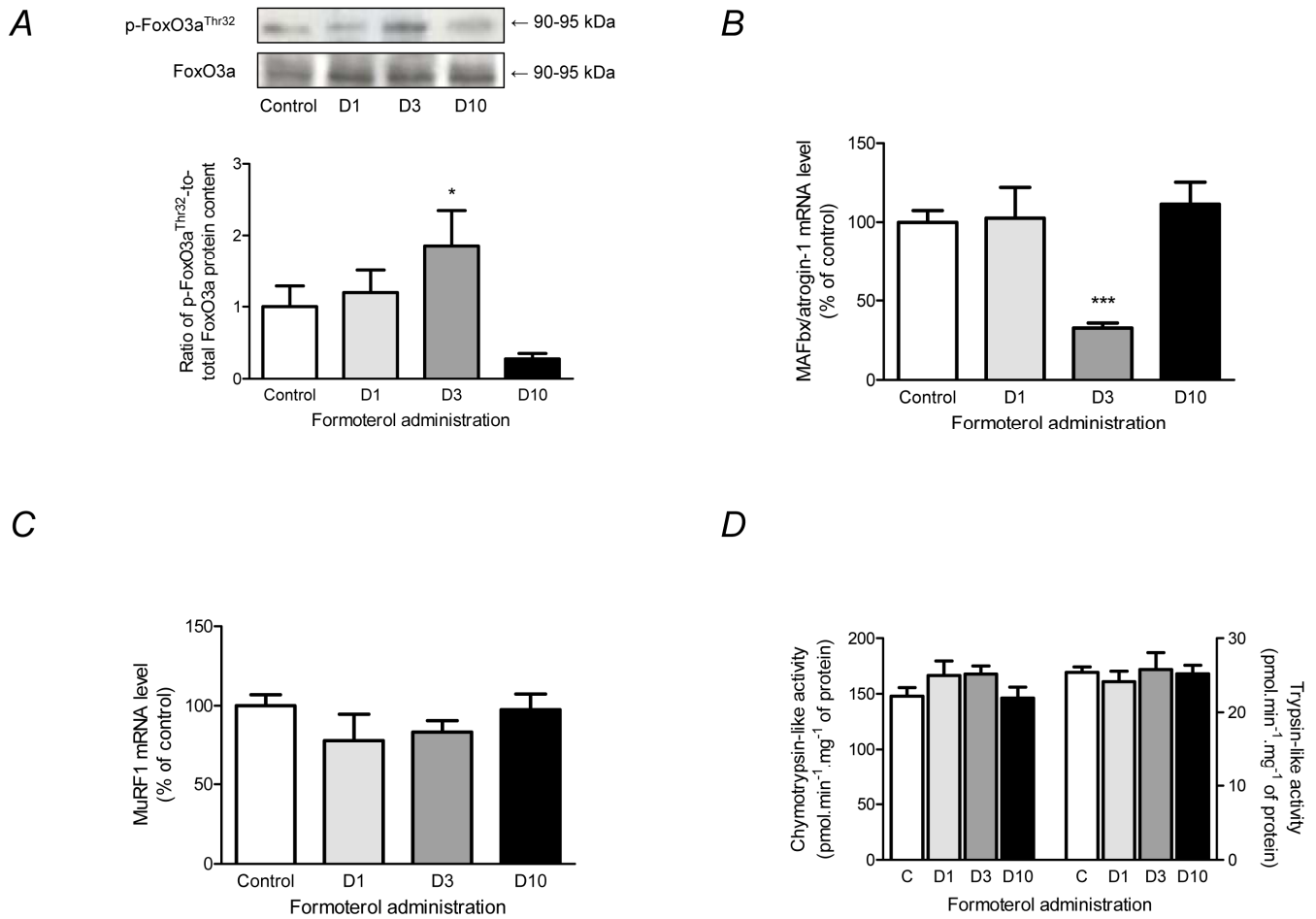
**Figure 3. Regulation of Akt/mTOR signaling pathway in response to formoterol administration in *tibialis anterior* muscle.** Representative immunoblot (upper panel) and corresponding ratio of protein phosphorylation to total protein form (lower panel). (A) Akt phosphorylation on Ser<sup>473</sup> and Thr<sup>308</sup>, (B) rp-S6 phosphorylation on Ser<sup>235</sup> and Ser<sup>236</sup>, (C) 4E-BP1 phosphorylation on Thr<sup>37</sup> and Thr<sup>46</sup>. The total amount of phosphorylated and non-phosphorylated forms remained unchanged (upper panel). Western blotting analysis was performed after 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Values are means  $\pm$  SEM (n=6-10/group). \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ : significantly different from control group.

Figure 4



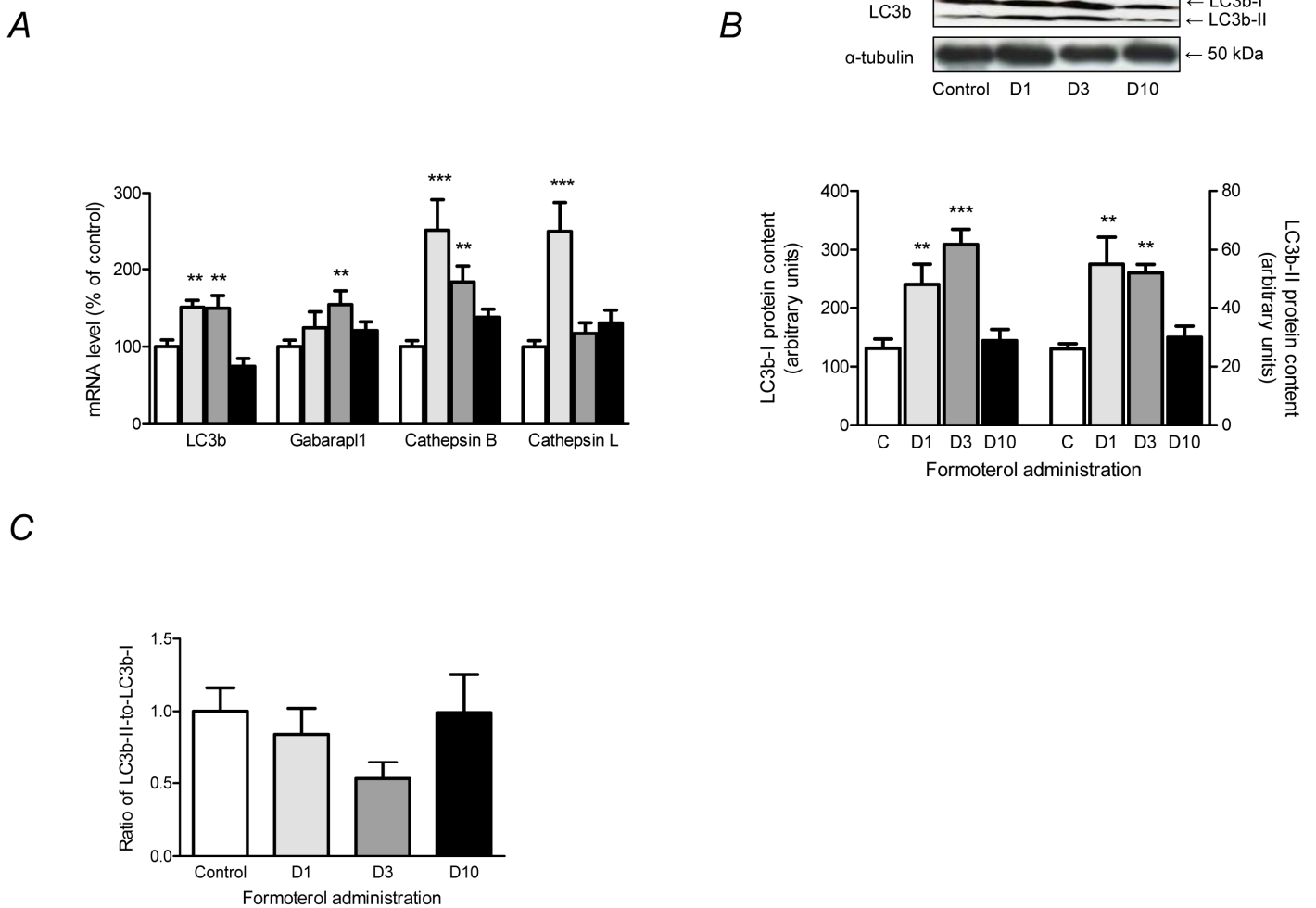
**Figure 4. Effect of formoterol administration on ERK1/2 phosphorylation, IRS-1 phosphorylation and *myostatin* mRNA level in *tibialis anterior* muscle. (A-B)** Representative immunoblot (upper panel) and corresponding ratio of phosphorylated form relative to total form of (A) ERK1/2 on Thr<sup>202</sup> and Tyr<sup>204</sup> and (B) IRS-1 phosphorylation on Ser<sup>636</sup> and Ser<sup>639</sup> after 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2,000  $\mu$ g/kg). The total amount of phosphorylated and non-phosphorylated forms remained unchanged. (C) *Myostatin* mRNA level. Values are means  $\pm$  SEM (n=6-10/group). \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ : significantly different from control group.

Figure 5



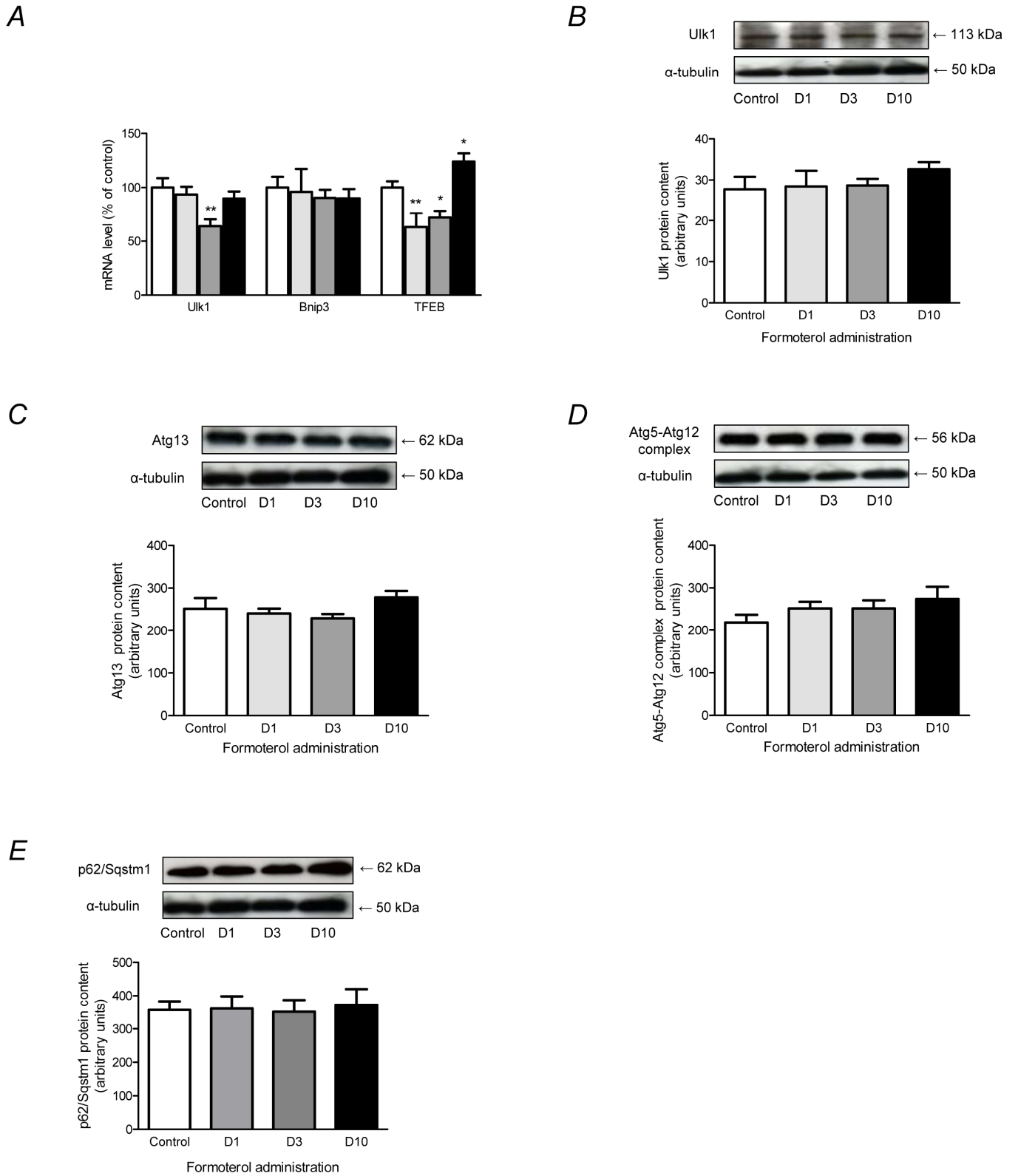
**Figure 5. Effect of formoterol administration on FoxO3a phosphorylation, *MAFbx/atrogenin-1*, *MuRF1* mRNA level and proteasome activities in *tibialis anterior* muscle.** (A) Representative immunoblot (upper panel) and corresponding ratio (lower panel) of FoxO3a phosphorylation on Thr<sup>32</sup> relative to total FoxO3a form after 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). FoxO3a total protein content remained unchanged (upper panel). (B) *Atrogenin-1* and (C) *MuRF-1* mRNA levels. (D) Chymotrypsin- and trypsin-like enzymatic activities of proteasome. Values are means  $\pm$  SEM (n=6-10/group). \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ : significantly different from control group.

Figure 6



**Figure 6. Effect of formoterol administration on mRNA level and protein content of autophagy-lysosome related genes in *tibialis anterior* muscle.** (A) *LC3b*, *Gabarapl1*, *Cathepsin B* and *Cathepsin L* mRNA levels after 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Values are expressed in percentage of control group. (B) Representative immunoblots (upper panel) and quantification (lower panel) of LC3b-I and LC3b-II protein content and (C) representative graph of the ratio LC3b-II to LC3b-I. Values are means  $\pm$  SEM (n=6-10/group). \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ : significantly different from control group.

Figure 7



**Figure 7. Effect of formoterol administration on mRNA level and protein content of autophagy-related genes in *tibialis anterior* muscle.** (A) *Ulk1*, *Bnip3* and *TFEB* mRNA levels after 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Values are expressed in percentage of control group. (B-E) Representative immunoblot (upper panel) and quantification (lower panel) of (B) *Ulk1*, (C) *Atg13* protein content, (D) *Atg5-Atg12* complex protein content, and (E) *p62/SQSTM1* protein content. Values are means  $\pm$  SEM (n=6-10/group). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ : significantly different from control group.



### Supplemental material

Experiments were approved by Jean Monnet University Animal Care and Use Committee, and were carried out in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals. Thirty male Wistar rats ( $224 \pm 19$  g) were purchased from Charles River Laboratories. The animals were maintained under a constant 12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. Rats were allocated into either control (n = 10) or formoterol treated groups (n=20). Treated animals received either 20 or 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of formoterol (Sigma-Aldrich) in 0.9% endotoxin free NaCl once daily via intraperitoneal (i.p.) injections for 10 days (n=10/group). Control rats were injected with the saline solution for 10 days. Body weight and food intake were measured daily. At the end of the experimental period, animals were anesthetized (i.p. injection of 90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine). *Tibialis anterior* (TA) muscles carefully dissected and trimmed of tendons and any non-muscle tissue and weighted were rapidly frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80°C for later analysis. *Soleus*, *extensor digitorum longus*, and *gastrocnemius* muscles were carefully removed and weighed. Rats were sacrificed as a consequence of heart excision, while deeply anaesthetized.

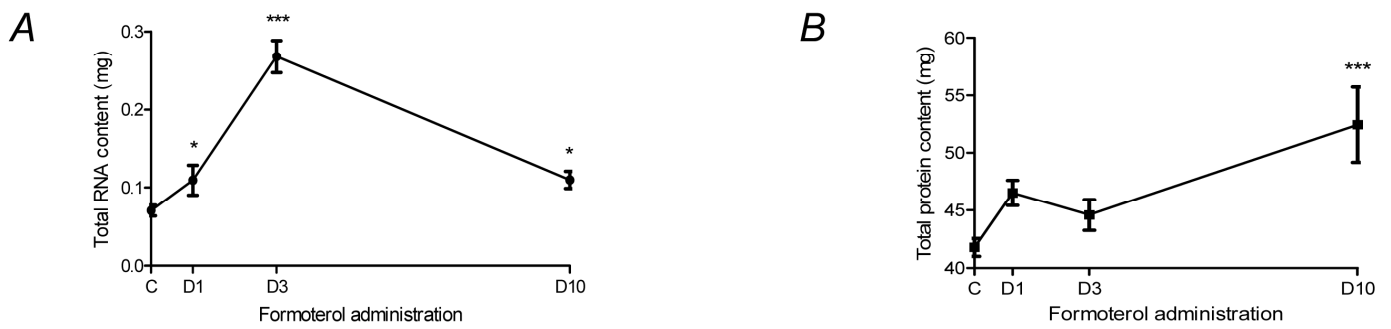
**Table S1. Effect of daily formoterol administration on *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* and *tibialis anterior* muscle mass.**

	EDL	GAS	SOL	TA
Control	128.0 ± 7.0	1,636.2 ± 105.4	110.7 ± 8.5	533.8 ± 40.7
20 µg/kg	144.6 ± 6.9 <sup>b</sup>	1,837.6 ± 101.8 <sup>b</sup>	122.5 ± 12.1 <sup>a</sup>	612.8 ± 33.8 <sup>b</sup>
200 µg/kg	146.4 ± 12.2 <sup>b</sup>	1,914.2 ± 149.3 <sup>b</sup>	120.0 ± 9.4 <sup>a</sup>	628.8 ± 48.1 <sup>b</sup>

EDL, *extensor digitorum longus*; GAS, *gastrocnemius*; SOL, *soleus*; TA, *tibialis anterior*.

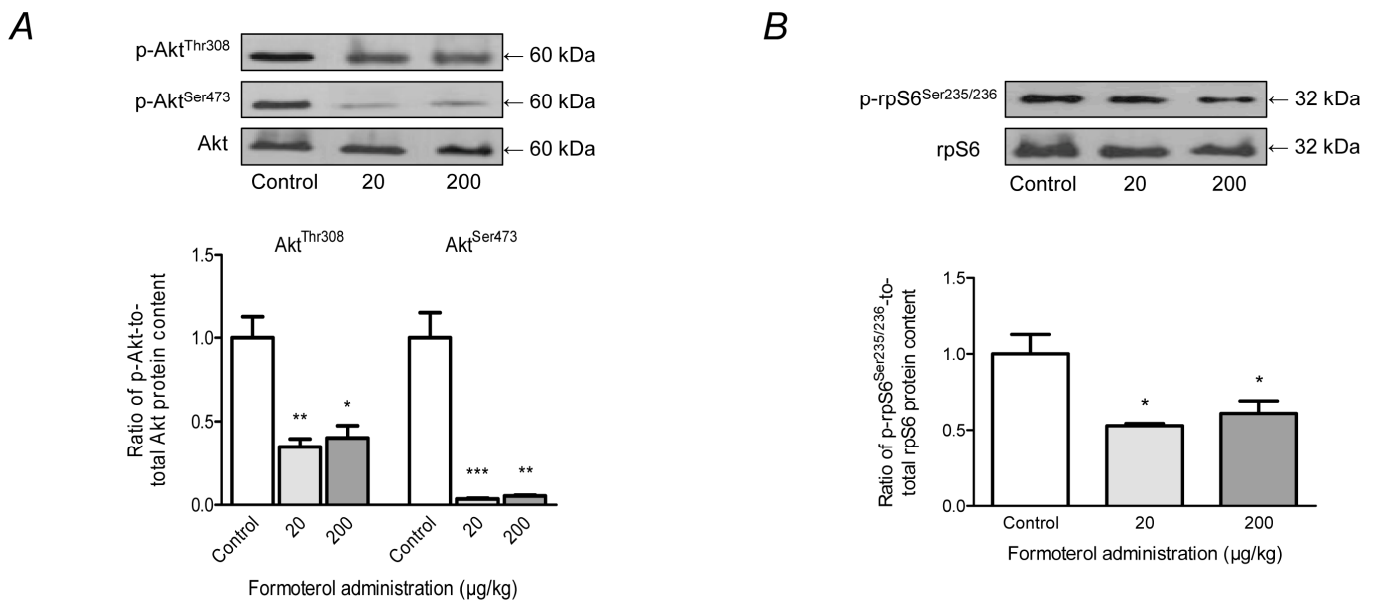
Doses of 20 and 200 µg/kg of formoterol were daily i.p. injected for 10 days. Muscle mass is expressed in milligrams. Data are means ± SEM (n = 10/group). <sup>a</sup>*P* < 0.01 and <sup>b</sup>*P* < 0.001: significantly different from control group.

## Suppl Fig. 1



**Figure S1. Effect of daily formoterol administration on total RNA content and total protein content in *tibialis anterior* muscle.** (A) Total RNA content in response to 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). (B) Total protein content at D1, D3 and D10. Values are means  $\pm$  SEM (n = 6-10/group). \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ : significantly different from control group.

## Suppl Fig. 2



**Figure S2. Regulation of Akt/mTOR pathway in response to formoterol administration in *tibialis anterior* muscle.** Representative immunoblot (upper panel) and quantification (lower panel) of (A) Akt phosphorylation on Thr<sup>308</sup> and Ser<sup>473</sup>, (B) rp-S6 phosphorylation on Ser<sup>235</sup> and Ser<sup>236</sup> after 10 days of formoterol administration at 20 μg/kg and 200 μg/kg. The total amount of phosphorylated and non-phosphorylated forms remained unchanged (upper panel). Values are means ± SEM (n = 10/group). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001: significantly different from control group.

## References

- Abo T, Iida RH, Kaneko S, Suga T, Yamada H, Hamada Y, et al. IGF and myostatin pathways are respectively induced during the earlier and the later stages of skeletal muscle hypertrophy induced by clenbuterol, a beta(2)-adrenergic agonist. *Cell Biochemistry and Function* 2012.
- Agbenyega ET, Wareham AC. Effect of clenbuterol on skeletal muscle atrophy in mice induced by the glucocorticoid dexamethasone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 1992; 102: 141-5.
- Altarejos JY, Montminy M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011; 12: 141-51.
- Amirouche A, Durieux AC, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, et al. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology* 2009; 150: 286-94.
- Baviera AM, Zanon NM, Navegantes LC, Kettelhut IC. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. *Molecular Cell Endocrinology* 2010; 315: 104-12.
- Beitzel F, Gregorevic P, Ryall JG, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. Beta2-adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury. *Journal of Applied Physiology* 2004; 96: 1385-92.
- Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton GD, et al. SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nature Medicine* 2007; 13: 597-603.
- Berthon P, Duguez S, Favier FB, Amirouche A, Feasson L, Vico L, et al. Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. *Pflügers Arch* 2007; 454: 625-33.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001a; 294: 1704-8.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology* 2001b; 3: 1014-9.
- Brault JJ, Jespersen JG, Goldberg AL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 19460-71.
- Brennesvik EO, Ktori C, Ruzzin J, Jebens E, Shepherd PR, Jensen J. Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: implications for cross talk between insulin and adrenaline. *Cellular Signalling* 2005; 17: 1551-9.
- Bricout VA, Serrurier BD, Bigard AX. Clenbuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles. *Acta Physiologica Scandinavica* 2004; 180: 271-80.
- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Research* 2004; 64: 6725-31.
- Cazzola M, Spina D, Matera MG. The use of bronchodilators in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 1997; 10: 129-44.
- Chen AE, Ginty DD, Fan CM. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature* 2005; 433: 317-22.

- Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metabolism* 2007; 6: 376-85.
- Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *Journal of Cell Biology* 2009; 185: 1083-95.
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997; 390: 88-91.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 1998; 396: 474-7.
- Durieux AC, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Padeloup M, et al. Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* 2007; 148: 3140-7.
- Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ, Winter PD. Chronic effects of beta 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Bioscience Reports* 1984; 4: 83-91.
- Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, et al. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature Cell Biology* 2002; 4: 901-6.
- Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, et al. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 2486-95.
- Gehrig SM, Koopman R, Naim T, Tjoakarfa C, Lynch GS. Making fast-twitch dystrophic muscles bigger protects them from contraction injury and attenuates the dystrophic pathology. *American Journal of Pathology* 2010; 176: 29-33.
- Geng T, Li P, Yin X, Yan Z. PGC-1alpha promotes nitric oxide antioxidant defenses and inhibits FOXO signaling against cardiac cachexia in mice. *American Journal of Pathology* 2011; 178: 1738-48.
- Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2009; 297: E157-64.
- Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 7111-6.
- Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *Journal of Cell Biology* 2004; 166: 213-23.
- Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 12657-65.
- Iezzi S, Di Padova M, Serra C, Caretti G, Simone C, Maklan E, et al. Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Developmental Cell* 2004; 6: 673-84.
- Joassard OR, Durieux AC, Freyssenet DG.  $\beta_2$ -adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.025>

- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 1998; 282: 2275-9.
- Kedar V, McDonough H, Arya R, Li HH, Rockman HA, Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 18135-40.
- Kline WO, Panaro FJ, Yang H, Bodine SC. Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *Journal of Applied Physiology* 2007; 102: 740-7.
- Koopman R, Gehrig SM, Leger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT, et al. Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic  $\beta$ -adrenoceptor stimulation in mice. *Journal of Physiology* 2010; 588: 4811-23.
- Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *Embo Journal* 2008; 27: 1266-76.
- Lokireddy S, McFarlane C, Ge X, Zhang H, Sze SK, Sharma M, et al. Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. *Molecular Endocrinology* 2011; 25: 1936-49.
- MacLennan PA, Edwards RH. Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass. Evidence that clenbuterol stimulates muscle  $\beta$ -adrenoceptors to induce hypertrophy. *Biochemical Journal* 1989; 264: 573-9.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metabolism* 2007; 6: 458-71.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* 1997; 387: 83-90.
- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 2007; 130: 165-78.
- Navegantes LC, Resano NM, Baviera AM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2004; 286: E642-7.
- Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2000; 279: E663-8.
- Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Catecholamines inhibit  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proteolysis in rat skeletal muscle through  $\beta(2)$ -adrenoceptors and cAMP. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2001; 281: E449-54.
- Pearn MA, Myers SA, Raichur S, Ryall JG, Lynch GS, Muscat GE. The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of  $\beta$ -adrenergic signaling, regulates gene expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle. *Endocrinology* 2008; 149: 2853-65.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: e45.
- Polge C, Heng AE, Jarzaguat M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L, et al. Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *Faseb Journal* 2011; 25: 3790-802.
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature Cell Biology* 2001; 3: 1009-13.

- Rothwell NJ, Stock MJ, Sudera DK. Changes in tissue blood flow and beta-receptor density of skeletal muscle in rats treated with the beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol. *British Journal of Pharmacology* 1987; 90: 601-7.
- Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 2002; 283: R1386-94.
- Ryall JG, Plant DR, Gregorevic P, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. *Journal of Physiology* 2004; 555: 175-88.
- Ryall JG, Sillence MN, Lynch GS. Systemic administration of beta2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147: 587-95.
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1{alpha} protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 16260-5.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004; 117: 399-412.
- Seibold A, Williams B, Huang ZF, Friedman J, Moore RH, Knoll BJ, et al. Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway. *Molecular Pharmacology* 2000; 58: 1162-73.
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, et al. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 1261-73.
- Shi H, Zeng C, Ricome A, Hannon KM, Grant AL, Gerrard DE. Extracellular signal-regulated kinase pathway is differentially involved in beta-agonist-induced hypertrophy in slow and fast muscles. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2007; 292: C1681-9.
- Sneddon AA, Delday MI, Steven J, Maltin CA. Elevated IGF-II mRNA and phosphorylation of 4E-BP1 and p70(S6k) in muscle showing clenbuterol-induced anabolism. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2001; 281: E676-82.
- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular Cell* 2004; 14: 395-403.
- Suzuki Y, Shen T, Poyard M, Best-Belpomme M, Hanoune J, Defer N. Expression of adenylyl cyclase mRNAs in the denervated and in the developing mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 1998; 274: C1674-85.
- Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 2847-56.
- Tzatsos A, Kandror KV. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 2006; 26: 63-76.
- van Noord JA, Smeets JJ, Raaijmakers JA, Bommer AM, Maesen FP. Salmeterol versus formoterol in patients with moderately severe asthma: onset and duration of action. *European Respiratory Journal* 1996; 9: 1684-8.



- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *Embo Journal* 2010; 29: 1792-802.
- Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT. Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106: 20405-10.
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Molecular Biology of the Cell* 2008; 19: 3290-8.
- Yimlamai T, Dodd SL, Borst SE, Park S. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Applied Physiology* 2005; 99: 71-80.
- Zeman RJ, Ludemann R, Etlinger JD. Clenbuterol, a beta 2-agonist, retards atrophy in denervated muscles. *American Journal of Physiology* 1987; 252: E152-5.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism* 2007; 6: 472-83.
- Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98: 1607-12.

## **MANUSCRIT 2**



La découverte récente de la protéine Epac dans le muscle squelettique a ouvert de nouvelles perspectives de recherche quant au lien moléculaire entre la voie de signalisation induite par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.

Dans ce contexte, cette seconde étude a pour objectif de déterminer si le 007-AM pourrait être une molécule de substitution à l'utilisation des  $\beta_2$ -agonistes dans le muscle squelettique. Pour cela, nous avons étudié, *in vivo*, d'une part, l'effet de 7 jours de traitement au 007-AM sur la masse musculaire de souris et son implication éventuelle sur la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. D'autre part, pour compléter les résultats obtenus *in vivo*, nous avons examiné la régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR en réponse à un traitement au 007-AM *in vitro* sur cellules musculaires C2C12 et testé la stabilité du 007-AM dans le plasma de souris.



**Régulation de la voie PI3K/Akt/mTOR par l'analogue de l'AMPc, 007-AM,  
*in vivo et in vitro* dans le muscle squelettique**

Olivier Roger JOASSARD<sup>1</sup>, Marine Maud DESGEORGES<sup>1</sup>, Xavier DELAVENNE<sup>2</sup>,  
Phanélie BERTHON<sup>3</sup>, Damien Gilles FREYSSENET<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Pharmacologie et de toxicologie, Hôpital Universitaire, F-42055 Saint-Etienne, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Savoie, F-73376 Le Bourget du Lac, France

Auteur correspondant : Damien Freyssenet  
Laboratoire de Physiologie de l'Exercice  
Faculté de Médecine  
15 rue Ambroise Paré  
42023 Saint Etienne Cedex 2  
Tel: 033 4 77 42 14 77  
Fax: 033 4 77 42 14 78  
Email: [damien.freyssenet@univ-st-etienne.fr](mailto:damien.freyssenet@univ-st-etienne.fr)



**RESUME**

L'administration de  $\beta_2$ -agoniste induit l'activation de la voie canonique des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques impliquant la protéine kinase A (PKA) et le facteur de transcription CREB. Or, il a également été montré qu'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique induisait une hypertrophie musculaire, en partie grâce à l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. Néanmoins, le lien moléculaire entre la voie canonique des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et la voie PI3K/Akt/mTOR reste encore inconnu. La découverte récente de la protéine Epac dans le muscle squelettique ainsi que le développement d'activateurs spécifiques de cette molécule (comme le 007-AM) ont ouvert de nouvelles perspectives de recherche quant à ce lien moléculaire entre ces deux voies. Dans cette étude, nous avons analysé les effets d'un traitement de 7 jours au 007-AM *in vivo* sur le muscle squelettique de souris. D'après nos résultats, 7 jours de traitement au 007-AM n'entraînent pas d'hypertrophie musculaire. Néanmoins, *in vitro*, sur cellules C2C12, le 007-AM active la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. L'absence d'hypertrophie musculaire, obtenue après 7 jours de traitement *in vivo*, proviendrait certainement de l'instabilité du 007-AM dans le plasma de souris.



## INTRODUCTION

Une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique du muscle squelettique s'accompagne d'une augmentation de la production d'AMPC par l'adénylate cyclase (McCormick *et al.*, 2010) qui active notamment la protéine kinase A (PKA). Cette dernière active à son tour le facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein) (Koopman *et al.*, 2010) qui cible de nombreux gènes (Zhang *et al.*, 2005) dont certains sont impliqués dans la régulation de la masse musculaire (Berdeaux *et al.*, 2007). Parallèlement, il est relativement bien décrit que l'augmentation de la masse musculaire, à la suite de l'administration de  $\beta_2$ -agonistes, se fait, en partie, grâce à la stimulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (Sneddon *et al.*, 2001; Kline *et al.*, 2007; Koopman *et al.*, 2010). Il a été rapporté que la rapamycine, un inhibiteur de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, bloquait l'hypertrophie musculaire induite par le clenbutérol (Kline *et al.*, 2007), confirmant pour la première fois que les effets du clenbutérol étaient dus à l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. Bien que l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR soit bien documentée en réponse à l'administration de  $\beta_2$ -agonistes, les mécanismes par lesquels les  $\beta_2$ -agonistes ciblent cette voie le sont beaucoup moins. La découverte de la protéine d'échange directement activée par l'AMPC, Epac, pourrait fournir de nouvelles perspectives de recherche (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). En effet, Epac est un facteur d'échange impliqué dans la transformation de GDP en GTP pour les petites protéines Ras-like GTPases, Rap1 et Rap2. Epac présente 2 isoformes Epac1 et Epac2, réparties différemment dans l'organisme. L'ARNm *Epac1* a été détecté dans différents organes dont le muscle cardiaque et le muscle squelettique (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). L'expression en ARNm *Epac2*, quant à elle, semble être restreinte au cerveau, et aux glandes surrénales (Kawasaki *et al.*, 1998). La surexpression, par transfection d'Epac, *in vitro*, dans des cellules HEK293, a permis de décrire une augmentation de la phosphorylation d'Akt sur les résidus sérine 473 et thréonine 308, en réponse à une stimulation de la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase (Mei *et al.*, 2002). L'ajout de l'inhibiteur de PKA (H89) augmentait davantage la phosphorylation d'Akt (Mei *et al.*, 2002), suggérant d'une part qu'Epac et PKA agiraient selon des voies de signalisation distinctes, et d'autre part qu'Epac pourrait être impliquée dans le processus d'hypertrophie *via* l'activation de la protéine Akt.

Afin de distinguer les différentes voies de signalisation mises en jeu par PKA d'une part, et par les protéines Epac d'autre part, des analogues de l'AMPC spécifiques de chacune des protéines ont été développés (Enserink *et al.*, 2002). Le 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP,

également appelé 007, est un agoniste sélectif des protéines Epac. Les effets physiologiques d'Epac1 dans le muscle squelettique ont été récemment étudiés en utilisant le 007 (Brennesvik *et al.*, 2005; Baviera *et al.*, 2010). Ces deux études indiquent qu'Epac pourrait être le lien moléculaire entre la voie de signalisation induite par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. De plus, *ex vivo*, sur du muscle isolé de rat, le 007 réduit la protéolyse dépendante du protéasome (Baviera *et al.*, 2010). Cependant, l'application du 007 est limitée de par sa faible perméabilité membranaire, principalement à cause du groupement phosphate chargé négativement. Pour atténuer ce phénomène, un groupement ester acétoxyméthyl (AM) a été introduit pour masquer le groupement phosphate négatif (molécule 007-AM) (Vliem *et al.*, 2008), et accroître ainsi sa perméabilité membranaire. Ceci permet à la molécule 007-AM de rentrer d'une manière efficace dans la cellule, où le groupement ester sera ensuite éliminé soit directement par hydrolyse, soit par les estérases cellulaires pour libérer le composé 007. Ces caractéristiques permettent de réduire d'un facteur 100 la concentration active du composé par rapport au 007 (Vliem *et al.*, 2008). Pour l'heure, aucune étude *in vivo* n'a montré les effets des analogues spécifiques de l'AMPc, spécifiques d'Epac sur la masse musculaire.

Sur la base de ces observations, le but de cette étude était de déterminer si le 007-AM pourrait être une molécule de substitution à l'utilisation des  $\beta_2$ -agonistes dans le muscle squelettique. Pour cela, nous avons étudié d'une part les effets moléculaires du 007-AM *in vivo* sur le muscle squelettique de souris et *in vitro* sur cellules C2C12 et d'autre part, la stabilité du 007-AM et de son produit de dégradation, le 007.

## MATERIEL ET METHODES

### Approbation éthique du protocole

L'ensemble des expériences menées sur des rats et des souris a été approuvé par le Comité des Soins et d'Utilisation des animaux d'expérimentations de l'Université Jean Monnet. Ces expériences ont été effectuées conformément aux directives communautaires européennes pour l'utilisation d'animaux de laboratoire.

### Animaux

Vingt et un rats mâles Wistar ( $224 \pm 19$  g) et 42 souris mâles C57BL/6JRj ( $25,6 \pm 0,3$  g) ont été respectivement fournis par les Laboratoires Charles River (L'Arbresle, France) et les Laboratoires Janvier (Saint Berthevin, France). Tous les animaux étaient maintenus sous un cycle jour-nuit de 12 h avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*.

Les rats étaient répartis soit en un groupe contrôle ( $n = 7$ ), soit en un groupe traité avec du formotérol (2 groupes,  $n = 6-8$ /groupe). Les animaux traités recevaient quotidiennement des injections intrapéritonéales (i.p.) de  $2000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de formotérol (Sigma-Aldrich, l'Isle d'Abeau, France) dans 0.9 % de NaCl pendant 1 et 3 jours.

Les souris étaient réparties en un groupe contrôle ( $n = 8$ ), un groupe 007-AM [3 groupes,  $n = 8-9$ /groupe, injections i.p. quotidiennes de 1000, 2500 ou  $5000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de 007-AM (Biolog Life Science Institute, Bremen, Allemagne)] ou en un groupe traité au formotérol ( $n = 9$ ,  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de formotérol). Les animaux étaient traités pendant 7 jours. Le 007-AM et le formotérol étaient dilués dans une solution de NaCl 0,9 %.

Les rats et souris des groupes contrôles étaient injectés avec une solution saline (NaCl 0,9 %), respectivement pendant 3 et 7 jours. Le poids des animaux ainsi que la consommation de nourriture étaient mesurés quotidiennement.

### Prélèvements musculaires

Aux temps indiqués, les animaux étaient anesthésiés par injection en i.p. d'un mélange de  $90 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de kétamine et de  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de xylazine. Les muscles *tibialis anterior* (TA) et *gastrocnemius* (GAS) étaient soigneusement disséqués, nettoyés des tendons et de tout-autre tissu non musculaire, et pesés. Les muscles TA et GAS étaient rapidement congelés dans de l'azote liquide et conservés à  $-80^\circ\text{C}$  pour des analyses ultérieures. Les muscles *soleus* et *extensor digitorum longus* étaient également délicatement prélevés et pesés. Les animaux étaient sacrifiés par l'excision du cœur, alors qu'ils étaient toujours sous anesthésie.

### **Culture cellulaire**

Des cellules musculaires de souris C2C12 (ATCC CRL-1772) étaient cultivées dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) supplémenté en sérum de veau fœtal (20 %) (Gold, PAA, A15-151), en pénicilline-streptomycine (P/S) 1 % (Sigma P-0781) et en amphotéricine B (Amph B) (1 %) (Sigma A-2942) à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub> dans l'air dans des boîtes de 10 cm de diamètre. Lorsque les cellules atteignaient 80 % de confluence, elles étaient mises en différenciation pendant 7 jours dans du DMEM supplémenté avec du sérum de cheval 2% (PAA B11-021), 1 % de P/S et 1 % Amph B (milieu de différenciation). Les myotubes étaient ensuite soumis à un stress métabolique consistant en 2 heures de DMEM sans sérum de cheval 2%. Après ce laps de temps, les myotubes étaient renutris avec le milieu de différenciation avec du formotérol (2 et 20 nmol.L<sup>-1</sup>) ou du 007-AM (0,1 µmol.L<sup>-1</sup>, 1 µmol.L<sup>-1</sup> et 10 µmol.L<sup>-1</sup>). Les cellules C2C12 traitées avec l'inhibiteur spécifique de PKA, le H89 (5 µmol.L<sup>-1</sup>), le recevaient 30 minutes avant l'addition de formotérol (2 nmol.L<sup>-1</sup>). Les myotubes du groupe contrôle étaient cultivés en présence de diméthylsulfoxyde. Les données provenaient de 4-5 boîtes indépendantes.

### **Extraction protéique**

Les muscles TA et GAS, respectivement de rat et de souris étaient homogénéisés (dilution 1:20 poids:volume) dans un tampon gardé au frais (pH 7,4, 50 mM de Tris HCl, 100 mM de NaCl, 2 mM d'EDTA, 2 mM d'EGTA, 50 mM de β-glycerophosphate, 50 mM de sodium fluoride, 1 % de Triton X-100, 1 mM de sodium orthovanadate, et 120 nM d'acide okadaïque ; tous ces réactifs provenaient de Sigma-Aldrich). Les cellules étaient décollées de leur support et les protéines étaient extraites à 4°C avec le même tampon frais. Les homogénats musculaires et cellulaires étaient centrifugés à 12000 g pendant 20 minutes à 4°C, et le surnageant était collecté et analysé pour mesurer le contenu protéique total (Bio-Rad DC Protein Assay) en utilisant de l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard.

### **Western immunoblotting**

La même quantité de protéine (50 µg) était déposée sur des gels SDS-polyacrylamide de 12,5 %. Les protéines étaient transférées sur des membranes de nitrocellulose de 0,45 µm. Après coloration au rouge Ponceau, les membranes étaient bloquées (1 heure à température ambiante avec du tampon Tris (Tris-buffered saline (TBS) contenant 5 % de lait écrémé en poudre), puis incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. Les anticorps dirigés contre les protéines Akt, Akt<sup>Thr308</sup>, CREB<sup>Ser133</sup>, Epac, 4E-BP1, 4E-BP1<sup>Thr37/46</sup>, ribosomal

protein (rp) S6 and rpS6<sup>Ser235/236</sup> provenaient de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). L'anticorps dirigé contre l' $\alpha$ -tubuline provenait de Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Les membranes étaient ensuite lavées 3 fois dans du TBS puis incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire chèvre anti-lapin ou lapin anti-souris conjugué horseradish peroxidase (Dako, Trappes, France). Après 3 lavages de 5 minutes dans du TBS-Tween, les immunocomplexes étaient visualisés en utilisant une méthode de détection par chemiluminescence (GE Healthcare, Orsay, France). Les films étaient scannés et quantifiés grâce au logiciel d'analyse d'images ImageJ. Les immunoblots d' $\alpha$ -tubuline étaient utilisés pour vérifier que la quantité de protéines déposées au départ était identique entre les échantillons.

### **Analyse de la stabilité par chromatographie liquide**

Nous avons à la fois mesuré la stabilité du 007-AM et de son produit de dégradation, le 007 par Chromatographie Liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

#### ***Produits chimiques et réactifs***

Le 8- (4- Chlorophenylthio)- 2'- O- methyladenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (007) et le 8- (4- Chlorophenylthio)- 2'- O- methyladenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate, acetoxymethyl ester (007-AM) étaient synthétisés par Biolog Life Science Institute (Bremen, Allemagne). Le méthanol et le plasma de souris étaient respectivement obtenus par Fischer Scientific GmbH (Schwerte, Allemagne) et Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le milieu de différenciation (DMEM + 2 % de sérum de cheval) provenait de chez PAA (Les Mureaux, France). Le Nordiazépam D5 était utilisé comme étalon interne. Un filtre de 0,2  $\mu$ m de polyvinylidène fluorure était utilisé pour les phases mobiles et fourni par Interchim (Montluçon, France).

#### ***Préparation des échantillons***

Les solutions mères de 007 (2,5 mg.mL<sup>-1</sup>) et de 007-AM (0,56 mg.mL<sup>-1</sup>) étaient préparées extemporanément dans du méthanol. Ces solutions étaient ensuite diluées au 10<sup>ème</sup> dans du méthanol. Une calibration était effectuée pour chacune des 3 phases : méthanol, plasma de souris et milieu de différenciation. Un volume (25  $\mu$ L) du calibrateur était ensuite prélevé aux temps, T0 min, T15 min, T30 min, T1 h, T2 h, T24 h et T48 h (pour le méthanol et le plasma de souris) puis ajouter instantanément à l'étalon interne (Nordiazépam D5). Après 4

minutes de centrifugation à 10 800 rpm, le surnageant était prélevé puis injecté dans le système de Chromatographie Liquide Ultra-haute Performance (UPLC).

### ***Chromatographie Liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem***

Le système UPLC (Acquity Ultra Performance LC, Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France) est couplé à un spectromètre de masse triple-quadrupôle en tandem (MS/MS) (Waters Quattro micro). La colonne de séparation, du système UPLC, utilisée est une Luna MercuryMS C18 (20 mm x 4 mm x 3  $\mu$ m) de chez Phenomenex (Saint-Quentin en Yvelines, France). La séparation chromatographique était réalisée à 40°C. La phase mobile était constituée d'un mélange de A : eau distillée contenant 0,1 % d'acide formique et de B : acétonitrile contenant 0,1 % d'acide formique. Afin d'optimiser les paramètres du spectromètre de masse pour chacune des molécules 007-AM et 007, les molécules pures étaient injectées directement dans le spectromètre de masse. Ainsi, il a été possible de déterminer la tension du capillaire (2 kV), l'énergie de collision (25 V pour le 007-AM et 20 V pour le 007) et le flux de gaz à la sortie du cône (45 L.h<sup>-1</sup> pour le 007-AM et 35 L.h<sup>-1</sup> pour le 007). L'acquisition des données était réalisée grâce au logiciel MassLynx V4.1 (Waters).

### **Analyses statistiques**

L'ensemble des valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. Les groupes contrôles, 007-AM et formotérol étaient comparés en utilisant une analyse de variance à un facteur (ANOVA 1). Un test *post hoc* de Scheffe était réalisé pour déterminer une éventuelle différence significative entre les groupes. Les analyses statistiques étaient effectuées en utilisant StatView version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Le seuil de significativité  $\alpha$  a été fixé à 0,05 pour l'ensemble des comparaisons.

## RESULTATS/DISCUSSION

**Trois jours de traitement au formotérol induisaient une augmentation du contenu total en protéine Epac dans le muscle tibialis de rat.** Trois jours de traitement au formotérol induisaient une hypertrophie du muscle *tibialis anterior* (Fig. 1A). Cette hypertrophie était associée à une augmentation significative du contenu total de la protéine Epac après l'administration de formotérol pendant 3 jours (Fig. 1B). Ces résultats suggéraient que le formotérol augmentait le contenu total en protéine Epac *in vivo*, qui pourrait être impliqué dans l'hypertrophie musculaire. En effet, *in vivo*, il a été montré que l'isoproterenol induisait une hypertrophie cardiaque corrélée à une augmentation de l'expression en ARNm *Epac1* (+59 %) et *Epac2* (+36 %) (Ulucan *et al.*, 2007). De plus, l'infection de cardiomyocytes par un adénovirus Epac induisait non seulement une hypertrophie mais également l'expression de gènes marqueurs de l'hypertrophie comme l' $\alpha$ -actinine (Morel *et al.*, 2005). L'ensemble de ces résultats suggère donc qu'Epac pourrait être impliqué dans l'hypertrophie musculaire induite par l'administration de  $\beta_2$ -agonistes.

***In vivo*, l'activation spécifique d'Epac par le 007-AM n'augmentait pas la masse musculaire.** Pour évaluer les effets de l'activation de la protéine Epac sur la masse musculaire, nous avons administré pendant 7 jours du 8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-méthyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate, acétoxyméthyle ester, plus connu sous le terme de 007-AM, à des souris, à la dose de 1000, 2500 ou 5000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Quelque soit la dose, le 007-AM n'augmentait pas la masse des muscles *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* et *tibialis anterior* de souris. A l'inverse, l'administration de formotérol (1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), pendant 7 jours, induisait une augmentation significative de +9% de la masse des muscles *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* et *tibialis anterior* (Fig. 2A). Bien que la masse musculaire ne soit pas augmentée en présence de 007-AM, nos résultats montraient une augmentation de la phosphorylation de la protéine Akt<sup>Thr308</sup> (Fig. 2B). Les formes totales d'Akt (Fig. 2C), de S6 (Fig. 2D) et de 4E-BP1 (Fig. 2E) restaient inchangées. Au vu de ces résultats, il est à envisager que la molécule de 007-AM est instable, rendant son action sur le muscle squelettique limitée.

**Stabilité du 007-AM dans différentes phases.** Il est possible de tester la stabilité du 007-AM et de son produit de dégradation le 007 par UPLC. Ainsi, il apparaissait que le 007-AM et le 007 étaient stables dans le solvant polaire méthanol (Fig. 3A et B). A l'inverse, le 007-AM était instable dans le plasma de souris alors que le 007 semblait posséder une plus

grande stabilité dans cette même phase (Fig. 3A et B). Dans le milieu de différenciation de culture cellulaire (DMEM + sérum de cheval 2 %), le 007-AM avait une demi-vie de 30 minutes et était détectable pendant 2 heures (Fig. 3C). C'était le temps choisi pour effectuer nos mesures sur la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR *in vitro*. Le 007, quant à lui, était stable au moins pendant 2 heures dans le milieu de différenciation (Fig. 3D).

***In vitro, sur cellules musculaires C2C12, le 007-AM active la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.*** Nous avons dans un premier temps vérifié que le 007-AM activait spécifiquement Epac (Fig. 3A) et que son action était PKA-indépendante. Ainsi, le 007-AM augmentait le contenu total en protéine Epac (Fig. 4A) et n'activait pas la protéine PKA, au regard de l'absence de phosphorylation de la protéine CREB sur la sérine 133 (Fig. 4B). Ainsi, le 007-AM agissait spécifiquement sur Epac, indépendamment de PKA. Néanmoins, contrairement au résultat obtenu *in vivo* avec la dose de 2000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  chez le rat, *in vitro*, le formotérol n'augmentait pas le contenu total en protéine Epac. Pour évaluer si l'activation spécifique d'Epac pouvait augmenter des marqueurs de l'initiation de la traduction, nous avons quantifié par western blot le niveau de phosphorylation des protéines S6 et 4E-BP1. Ainsi, le 007-AM augmentait la phosphorylation de la protéine S6, sur les résidus sérine 235/236, de manière dose-dépendante (Fig. 4C). Le 007-AM augmentait la phosphorylation de la protéine 4E-BP1 à la plus faible dose uniquement (Fig. 4D). Considéré comme un contrôle positif, activateur de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, le formotérol augmentait également la phosphorylation des protéines S6 et 4E-BP1 d'une manière dose-dépendante (Fig. 4C et D). D'une manière intéressante, un prétraitement de 30 minutes avec l'inhibiteur de PKA, le H89, ne modifiait pas la phosphorylation de S6 et de 4E-BP1 induite par le formotérol, suggérant que PKA n'était pas impliqué dans l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.

Ainsi, bien que le 007-AM n'augmente pas la masse musculaire *in vivo*, il semblerait que cette molécule active la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR *in vitro*. D'autres expériences seraient nécessaires pour valider nos résultats. Le fait qu'aucune étude *in vivo*, utilisant un analogue de l'AMPC, n'ait été réalisée à l'heure actuelle, proviendrait de l'instabilité du 007-AM dans le plasma. A ce jour, la seule étude *in vivo*, portant sur la délétion du gène *Epac1* chez des souris KO, et qui aurait pu apporter des précisions sur le rôle d'Epac dans la régulation de la masse musculaire, n'a pas décrit le phénotype du muscle squelettique de ces souris (Suzuki *et al.*, 2010). Enfin, en 2012, ont été développés des inhibiteurs spécifiques d'Epac (ESI-08, ESI-09, HJC0197 et HJC0198) qui diminuent la phosphorylation d'Akt Thr<sup>308</sup> et Ser<sup>473</sup> dans des cellules pancréatiques (INS-1) (Almahariq *et al.*, 2013) (Figure



35) et dans les cellules de rein HEK293 (Chen *et al.*, 2012). Bien que ces inhibiteurs n'aient, pour l'heure, pas encore été employés en présence d'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique, ils pourraient être d'un grand intérêt pour approfondir les mécanismes intracellulaires dépendants de PKA menant à une hypertrophie musculaire. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de recherche sur le rôle d'Epac dans l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.

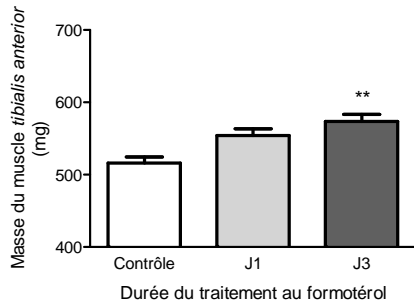
En conclusion, contrairement au formotérol, 7 jours de traitement au 007-AM, l'analogue de l'AMPC activant spécifiquement la protéine Epac, n'induisait pas une hypertrophie musculaire. En revanche, il semblerait qu'*in vitro* sur cellules musculaires C2C12, le 007-AM active la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. L'absence d'hypertrophie musculaire proviendrait probablement de l'instabilité du 007-AM dans le plasma.

**REMERCIEMENTS**

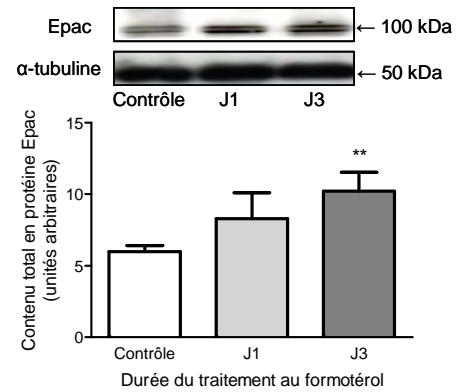
Ce travail a été financé par l'Agence Française de Lutte contre le Dopage. Olivier Joassard était soutenu financièrement par une Allocation Doctorale de Recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Aucun conflit d'intérêt personnel ou financier n'est à déclarer par les auteurs.

Figure 1

A

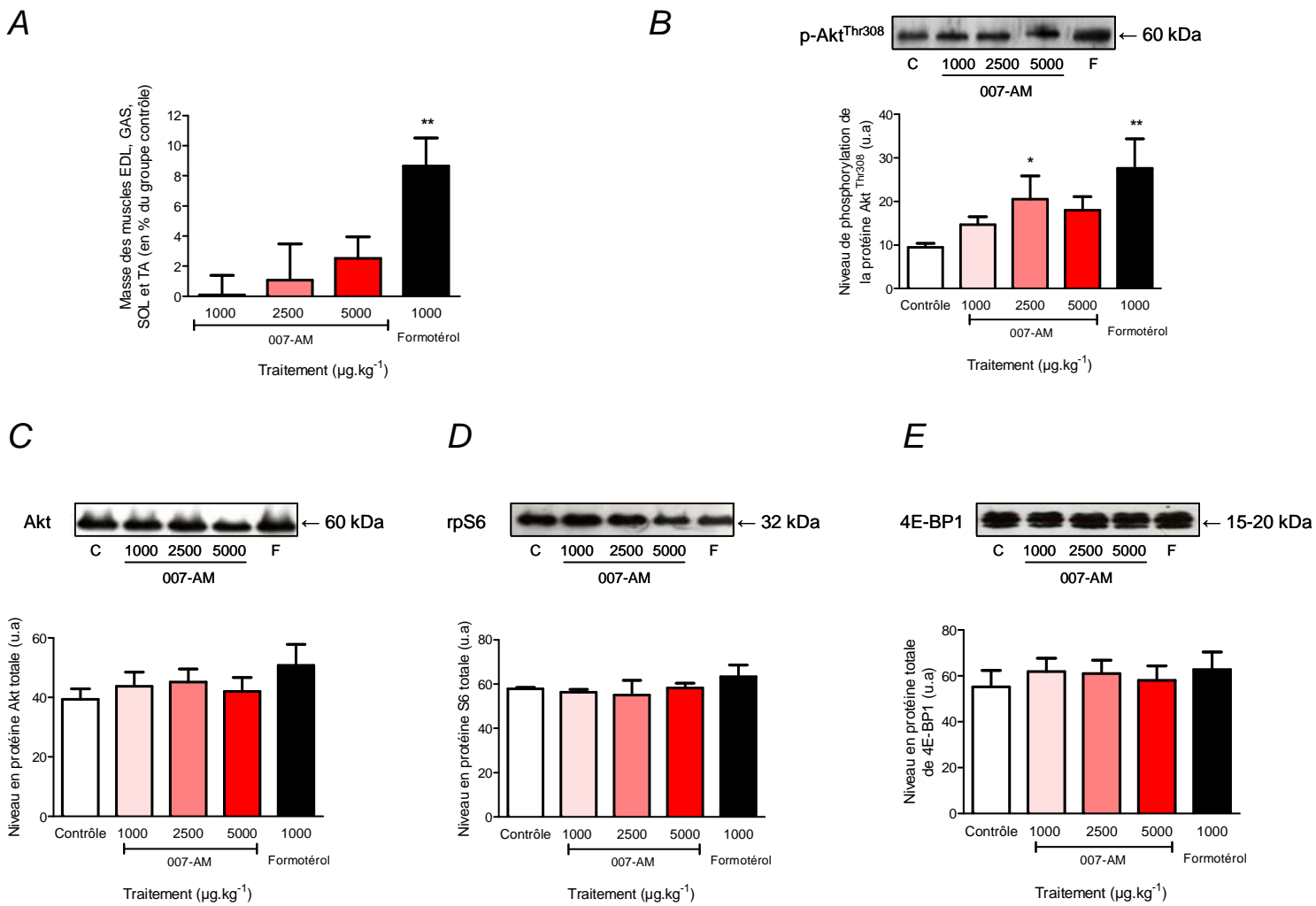


B



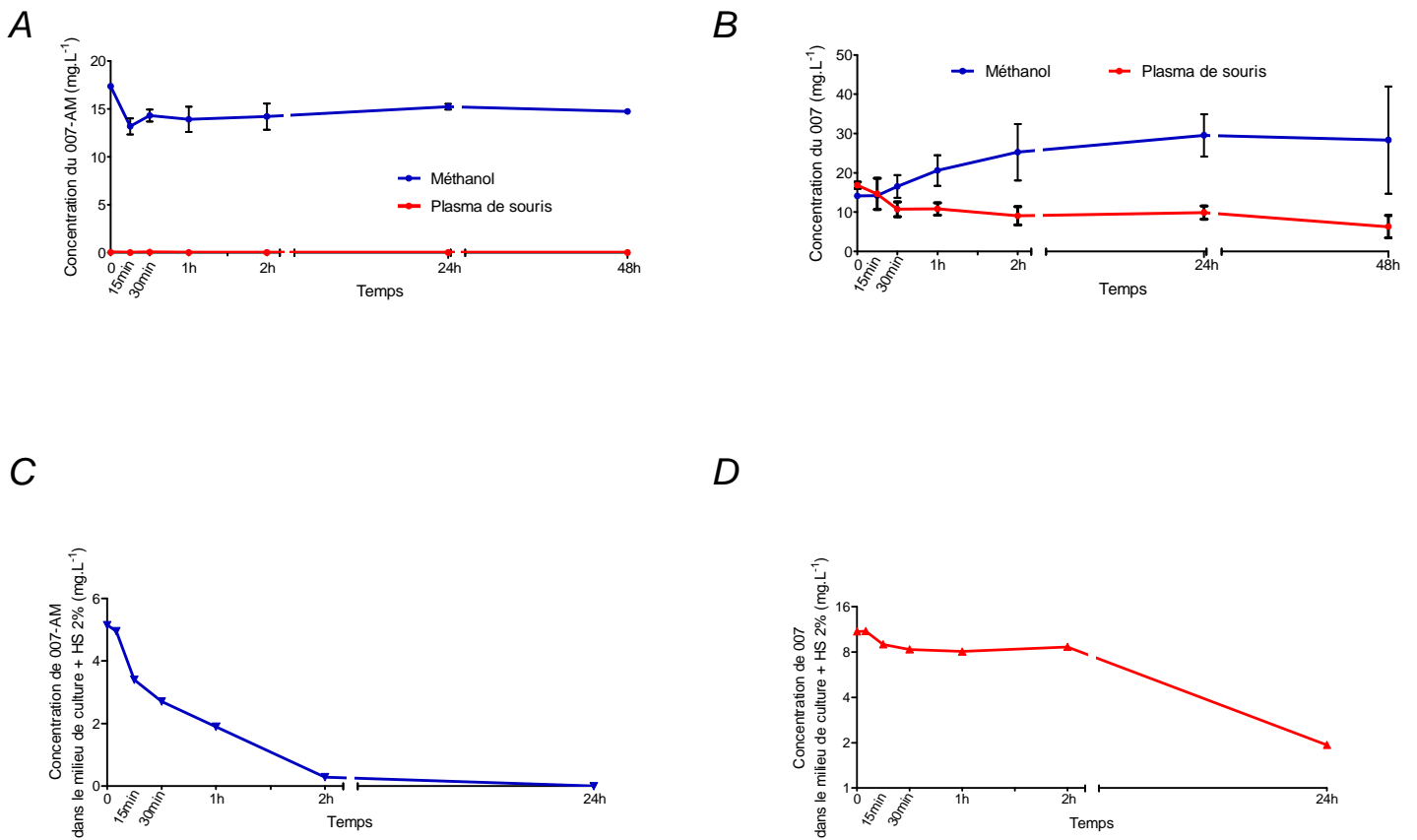
**Figure 1 : Effet du formotérol sur la masse du muscle *tibialis anterior* de rat et sur le contenu total en protéine Epac.** (A) Masse du muscle *tibialis anterior* exprimée en mg après 1 (J1) et 3 (J3) jours de traitement au formotérol. (B) Immunoblot représentatif du contenu total en protéine Epac (en haut) et sa quantification (en dessous). Le Western blot était réalisé après 1 (J1) et 3 (J3) jours de traitement au formotérol ( $2000 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). L'immunoblot de l' $\alpha$ -tubuline est utilisé pour vérifier que la charge initiale des protéines était identique entre les extraits. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM ( $n = 6-8/\text{groupe}$ ). \*\* $P < 0,01$  : significativement différent du groupe contrôle.

Figure 2



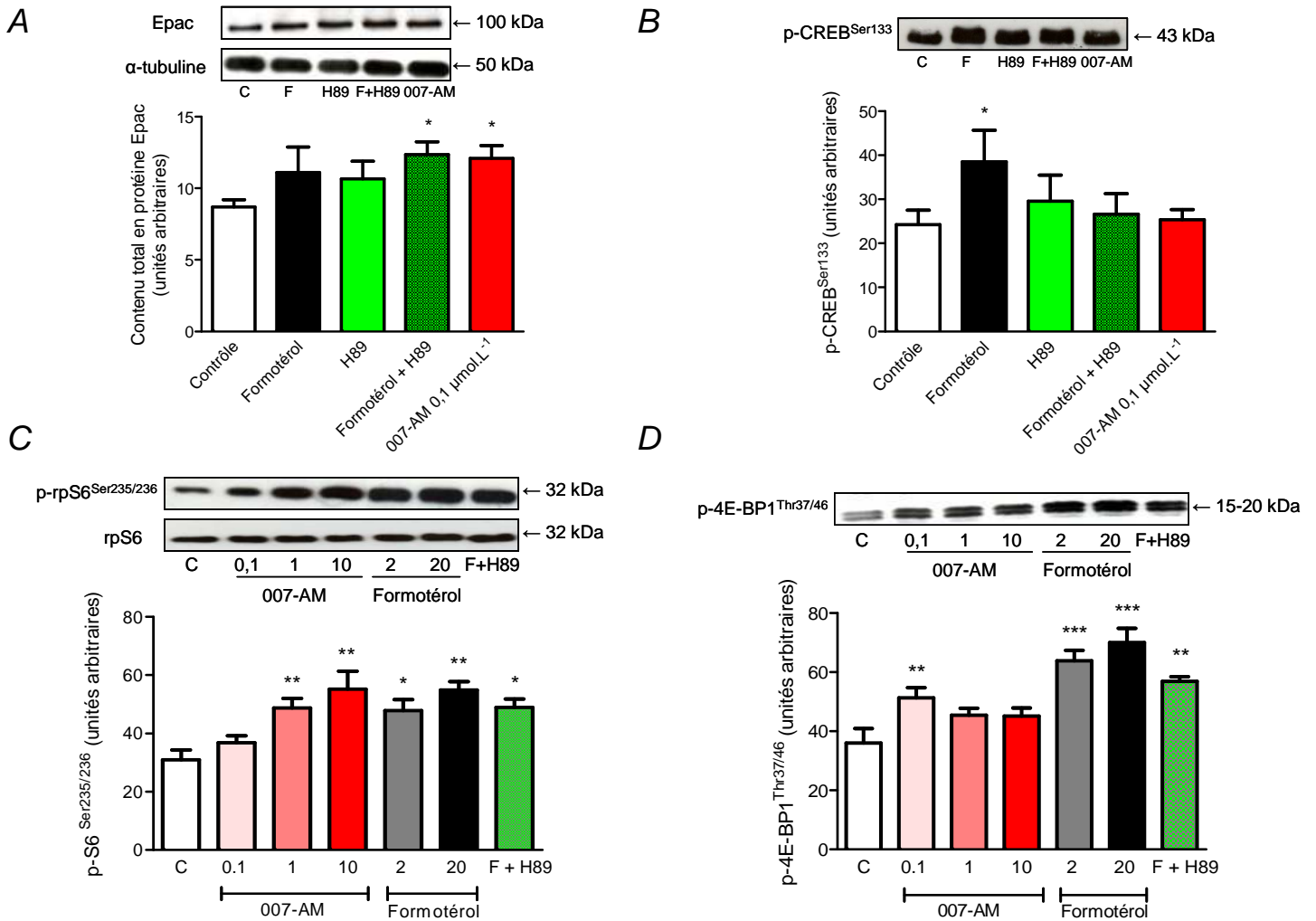
**Figure 2 : Effet du 007-AM sur la masse des muscles EDL, GAS, SOL, TA et régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans le muscle *gastrocnemius* de souris.** (A) La masse de l'ensemble des muscles EDL, GAS, SOL et TA est exprimée en % du groupe contrôle. (B) Niveau de phosphorylation de la protéine Akt<sup>Thr308</sup>. (C) Niveau en protéine totale Akt, (D) rpS6 et (E) 4E-BP1. Les souris étaient traitées en i.p. pendant 7 jours avec du 007-AM (1000, 2500 ou 5000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) ou du formotérol (F, 1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM (n = 8-9/groupe). \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  : significativement différent du groupe contrôle (C). EDL, *extensor digitorum longus* ; GAS, *gastrocnemius* ; SOL, *soleus* ; TA, *tibialis anterior*.

Figure 3



**Figure 3 : Stabilité du 007-AM et du 007 dans différentes phases.** Stabilité du 007-AM (A) et du 007 (B) dans le méthanol et le plasma de souris. Stabilité du 007-AM (C) et du 007 (D) dans le milieu de culture + sérum de cheval (HS) 2 %. La stabilité était mesurée aux temps T0 min, T 15min, T 30min, T1 h, T2 h, T24 h et T48 h (uniquement dans le méthanol et le plasma de souris). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM provenant de 3-4 analyses indépendantes pour la stabilité du 007-AM et du 007 dans le méthanol et le plasma de souris.

Figure 4



**Figure 4 : Effets de l'activation d'Epac sur la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR *in vitro*.** Contenu total en protéine Epac (A) et niveau de phosphorylation de la protéine CREB<sup>Ser133</sup> (B) de cellules musculaires C2C12 après un traitement de 2 heures au formotérol (2 nmol.L<sup>-1</sup>), au H89 (5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ou au 007-AM (0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Les cellules traitées au formotérol + H89 (F+H89), recevaient, 30 minutes avant l'ajout de formotérol, l'inhibiteur de PKA. (C) Immunoblot représentatif du niveau de phosphorylation de la protéine rpS6<sup>Ser235/236</sup> (en haut) et sa quantification (en dessous). (D) Immunoblot représentatif du niveau de phosphorylation de la protéine 4E-BP1<sup>Thr37/46</sup> (en haut) et sa quantification (en dessous). (C et D) Les cellules C2C12 étaient traitées soit avec du formotérol (2 et 20 nmol.L<sup>-1</sup>) ou du 007-AM (0,1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  et 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Les cellules C2C12 traitées avec l'inhibiteur spécifique de PKA, le H89 (5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), le recevaient 30 minutes avant l'addition de formotérol (2 nmol.L<sup>-1</sup>) (groupe F+H89). \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,001$  : significativement différent du groupe contrôle.

**REFERENCES**

- Almahariq M, Tsalkova T, Mei FC, Chen H, Zhou J, Sastry SK, Schwede F & Cheng X. (2013). A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. *Molecular pharmacology* **83**, 122-128.
- Baviera AM, Zanon NM, Navegantes LC & Kettelhut IC. (2010). Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* **315**, 104-112.
- Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton GD & Montminy M. (2007). SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nature medicine* **13**, 597-603.
- Brennesvik EO, Ktori C, Ruzzin J, Jebens E, Shepherd PR & Jensen J. (2005). Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: implications for cross talk between insulin and adrenaline. *Cellular signalling* **17**, 1551-1559.
- Chen H, Tsalkova T, Mei FC, Hu Y, Cheng X & Zhou J. (2012). 5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydropyrimidines as potent antagonists targeting exchange proteins directly activated by cAMP. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **22**, 4038-4043.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A & Bos JL. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.
- Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL & Bos JL. (2002). A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature cell biology* **4**, 901-906.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE & Graybiel AM. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science (New York, NY)* **282**, 2275-2279.
- Kline WO, Panaro FJ, Yang H & Bodine SC. (2007). Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *J Appl Physiol* **102**, 740-747.
- Koopman R, Gehrig SM, Leger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT & Lynch GS. (2010). Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic {beta}-adrenoceptor stimulation in mice. *The Journal of physiology* **588**, 4811-4823.
- McCormick C, Alexandre L, Thompson J & Mutungi G. (2010). Clenbuterol and formoterol decrease force production in isolated intact mouse skeletal muscle fiber bundles through a beta2-adrenoceptor-independent mechanism. *J Appl Physiol* **109**, 1716-1727.
- Mei FC, Qiao J, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Quilliam LA & Cheng X. (2002). Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 11497-11504.
- Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompre AM, Vandecasteele G & Lezoualc'h F. (2005). cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research* **97**, 1296-1304.

- Sneddon AA, Delday MI, Steven J & Maltin CA. (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.
- Suzuki S, Yokoyama U, Abe T, Kiyonari H, Yamashita N, Kato Y, Kurotani R, Sato M, Okumura S & Ishikawa Y. (2010). Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *The Journal of biological chemistry* **285**, 24248-24259.
- Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai Y, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotsu S & Ishikawa Y. (2007). Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *American journal of physiology* **293**, H1662-1672.
- Vliem MJ, Ponsioen B, Schwede F, Pannekoek WJ, Riedl J, Kooistra MR, Jalink K, Genieser HG, Bos JL & Reimann H. (2008). 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM: an improved Epac-selective cAMP analogue. *Chembiochem* **9**, 2052-2054.
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA & Montminy M. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4459-4464.





# **DISCUSSION**



Au regard de la littérature, le gain de masse musculaire, à la suite d'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique, dépend de la nature du  $\beta_2$ -agoniste (durée d'action courte *versus* longue) (Harcourt *et al.*, 2007), de la voie d'administration du  $\beta_2$ -agoniste (injection intrapéritonéale ou sous-cutanée, administration orale par la nourriture ou *via* l'eau de boisson) (Moore *et al.*, 1994), de la dose de  $\beta_2$ -agoniste administrée (de  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  à  $4 \text{mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ ) (Ryall *et al.*, 2006) et de la durée du traitement (de 1 jour à 12 mois) (Koopman *et al.*, 2010). Chacun des paramètres sera discuté dans le paragraphe suivant.

Les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques représentent 90 à 95% de la totalité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques présents à la surface de la membrane des cellules musculaires striées squelettiques (Kim *et al.*, 1991). C'est la raison pour laquelle, nous avons choisi d'administrer un agoniste spécifique des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, le formotérol. Ce dernier a la particularité d'avoir un délai d'action court et une durée d'action longue. En nous basant sur la littérature, il semblerait que les effets hypertrophiques les plus prononcés soient obtenus lorsque le  $\beta_2$ -agoniste est administré par voie intrapéritonéale (Tableau 2 du chapitre III). De plus, le formotérol a fait l'objet de nombreuses études *in vivo* portant sur des traitements de longue durée (4 semaines) (Ryall *et al.*, 2006; Harcourt *et al.*, 2007; Ryall *et al.*, 2007; Gehrig *et al.*, 2010). En revanche, peu d'études se sont intéressées aux effets à courts termes du formotérol (quelques jours) sur la masse musculaire et la voie d'initiation de la traduction PI3K/Akt/mTOR (Busquets *et al.*, 2004; Koopman *et al.*, 2010). Dans ce contexte, et dans le but d'avoir un effet hypertrophique marqué des muscles squelettiques, nous avons choisi d'administrer la dose non-toxique de  $2000 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  à des rats comme cela a été fait, durant 7 jours, dans l'étude de Busquets *et al.* (2004) (Busquets *et al.*, 2004). Dans le souci d'apporter de nouvelles connaissances sur la régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, à la suite de l'administration de formotérol, nous avons donc choisi de traiter quotidiennement des rats pendant 1, 3 et 10 jours. Enfin, dans notre étude, bien que le poids des muscles *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* et *tibialis anterior* ait été pesé, nous avons choisi de travailler principalement sur ce dernier, qui est un muscle à contraction rapide plus sensible aux stimulations  $\beta_2$ -adrénergiques que les muscles à contraction lente (Yimlamai *et al.*, 2005; Kline *et al.*, 2007).

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la masse musculaire sous l'action du formotérol. Dans notre étude, 10 jours de traitement au formotérol, à la dose de  $2000 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ , induisaient une hypertrophie des muscles *extensor digitorum longus* (+21 %), *gastrocnemius* (+31 %), *soleus*

(+19 %) et *tibialis anterior* (+25 %). Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans d'autres études utilisant du clenbutérol (Emery *et al.*, 1984) et du formotérol (Busquets *et al.*, 2004; Koopman *et al.*, 2010). Même de faibles doses de formotérol (20  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  et 200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , pendant 10 jours) induisaient une hypertrophie musculaire, illustrant clairement l'effet anabolisant du  $\beta_2$ -agoniste sur le muscle squelettique. Il a été montré que des doses aussi faibles que 1  $\mu\text{g.kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$  de formotérol, pendant 4 semaines, pouvaient provoquer une hypertrophie du muscle squelettique, sans toutefois induire une augmentation de masse du myocarde (Ryall *et al.*, 2006).

A travers cette discussion, un certain nombre de points seront plus spécifiquement abordés et concerneront *i*) les voies de signalisation, autres que la voie PI3K/Akt/mTOR, qui sont activées par le formotérol, *ii*) le facteur d'échange Epac qui pourrait être le lien moléculaire entre la voie « canonique » des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, *iii*) un probable couplage direct des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques avec PI3K, expliquant une activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR à la suite d'une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique, *iv*) l'implication des protéines  $G\alpha_i$  dans l'hypertrophie musculaire, et *v*) l'induction de la lipodation de LC3 sans augmentation d'autres marqueurs de l'autophagie en réponse à l'administration de formotérol.

### **1. Des voies de signalisation, autres que la voie PI3K/Akt/mTOR, sont activées après 10 jours de traitement au formotérol pour soutenir la réponse anabolique du muscle squelettique.**

De la même manière que les  $\beta_2$ -agonistes, l'activation du récepteur CRF2, un autre RCPG, par l'urocortine 2 permet d'induire une hypertrophie des muscles *tibialis anterior* et *medial gastrocnemius*, et de limiter l'atrophie musculaire après immobilisation plâtrée (Hinkle *et al.*, 2003). D'une façon surprenante, et comparable à ce que l'on observait après 10 jours de traitement au formotérol dans notre étude, l'urocortine 2 inhibait la phosphorylation de la protéine Akt, induite par l'insuline (Chen *et al.*, 2006), suggérant que l'hypertrophie induite par l'urocortine 2 est indépendante de l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR. Ces observations soutiennent donc l'idée que des voies de signalisation, autres que la voie PI3K/Akt/mTOR, sont activées pour induire/soutenir une hypertrophie du muscle squelettique.

Ainsi, et dans le but d'identifier des voies de signalisation, autres que la voie PI3K/Akt/mTOR, induites par les  $\beta_2$ -agonistes et impliquées dans l'hypertrophie musculaire, nous avons élargi notre étude bibliographique à l'ensemble des  $\beta$ -agonistes. En outre, il a été montré que l'administration d'isoprotérénol à des rats induisait une hypertrophie cardiaque associée à une augmentation du niveau d'expression en ARNm de *JunB* (Brand *et al.*, 1993). A l'inverse, l'expression en ARNm de *JunB* est réprimée lors de multiples conditions d'atrophie musculaire telles que la dénervation, la cachexie, la lésion de la moëlle épinière et le jeûne (Lecker *et al.*, 2004; Sacheck *et al.*, 2007), suggérant que JunB interviendrait dans la régulation de la masse musculaire. Ainsi, l'inhibition de JunB par siRNA cause une perte de masse musculaire du *tibialis anterior* de souris (Raffaello *et al.*, 2010). En revanche, la surexpression de JunB bloque l'atrophie induite par la dexaméthasone dans des myotubes et par la dénervation du muscle *tibialis anterior* (Raffaello *et al.*, 2010). En conditions normales, JunB, surexprimé *in vitro* et *in vivo*, induit une hypertrophie des myotubes et du *tibialis anterior*, en stimulant la synthèse protéique indépendamment de l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR (Raffaello *et al.*, 2010). En effet, en se liant directement à FoxO3, JunB bloque la liaison de FoxO3 sur les promoteurs *MAFbx/Atrogin-1* et *MuRF1* réduisant ainsi la dégradation protéique du muscle squelettique (Raffaello *et al.*, 2010). En revanche, JunB n'inhibe pas la voie autophagie-lysosome, mais seulement la voie ubiquitine-protéasome. Enfin, JunB supprime l'expression de myostatine et diminue la phosphorylation de Smad3, induisant ainsi une hypertrophie musculaire. Ainsi, dans notre étude, ce facteur de transcription JunB pourrait être un élément de réponse pour expliquer l'hypertrophie musculaire obtenue après 10 jours de traitement au formotérol. Cependant, JunB étant un gène de réponse immédiate (Pearen *et al.*, 2009), avec une réponse maximale observée 1 heure après l'injection de formotérol (Pearen *et al.*, 2009) et 4 heures après l'injection d'isoprotérénol (Brand *et al.*, 1993), pourrait agir précocement sur l'hypertrophie du muscle squelettique à la suite du traitement au formotérol, mais il est peu probable que JunB intervienne dans l'hypertrophie musculaire obtenue à J10.

La régulation, par CREB, des gènes cibles impliqués dans la régulation de la masse musculaire, a été décrite dans l'état de la littérature. L'utilisation du dominant-négatif de CREB, A-CREB, a permis de montrer que ce facteur de transcription était également capable de réguler le gène de réponse immédiate *c-fos* (Fass *et al.*, 2003). Il a été mis en évidence que l'hypertrophie cardiaque, induite par l'isoprotérénol, augmentait le niveau d'expression en ARNm de *c-fos* (Brand *et al.*, 1993). Bien qu'aucune augmentation du niveau d'expression en

ARNm de *c-fos* n'ait été observée en présence de clenbutérol dans les muscles *soleus* et *plantaris*, l'hypertrophie de ces muscles, induite par le clenbutérol, était associée à une augmentation rapide (24 heure pour le *soleus* et 6 heures pour le *plantaris*) et significative du niveau d'expression en ARNm de *c-myc*, un autre gène de réponse immédiate (Whitelaw & Hesketh, 1992). Cette augmentation du niveau d'expression apparaît comme un évènement précoce dans la réponse hypertrophique du muscle squelettique (Whitelaw & Hesketh, 1992). De ce fait, et de la même manière que JunB, les gènes de réponse immédiate que sont *c-fos* et *c-myc* pourraient être impliqués précocement dans l'hypertrophie musculaire induite par les  $\beta_2$ -agonistes. En revanche, l'éventualité que *c-fos* et *c-myc* aient un effet sur l'hypertrophie musculaire, induite par le formotérol à J10, est faible.

Au final, il semblerait que des voies de signalisation, autres que la voie PI3K/Akt/mTOR, soient activées pour soutenir l'hypertrophie musculaire induite par le formotérol à J10. Néanmoins, en l'état actuel de nos connaissances de la littérature, il nous est impossible de les définir.

## **2. Le facteur d'échange Epac est le lien moléculaire entre la voie « canonique » des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques et la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.**

Dans notre seconde étude, nous avons montré que l'administration de formotérol augmentait le contenu total en protéine Epac dans le muscle *tibialis anterior* de rat. Cette augmentation était associée à une augmentation de l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (Manuscrit 1). Des travaux récents ont décrit que la protéine Epac pouvait coupler l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc à l'activation de PI3K par l'intermédiaire de la protéine Rap1 (Brennesvik *et al.*, 2005; Baviera *et al.*, 2010), et ainsi activer la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. La protéine PI3K possédant un domaine de liaison Ras dans sa structure, il a été montré, *in vitro*, que la forme active de Rap1 (appartenant à la famille Ras) interagissait directement avec PI3K (Kortholt *et al.*, 2010). Ceci suggère donc que l'activation de la protéine Rap1 par le facteur d'échange Epac pourrait agir directement sur PI3K pour activer la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR et induire ainsi une hypertrophie musculaire. Dans notre étude *in vivo*, le contenu protéique d'Epac était augmenté de façon significative après 3 jours de traitement au formotérol, suggérant que la protéine Epac pourrait participer à l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR en réponse à une stimulation  $\beta_2$ -adrénergique. Pour confirmer ces dires, les résultats

préliminaires de notre seconde étude ont décrit une activation de la voie PI3K/Akt/mTOR *in vitro* en présence de l'activateur spécifique d'Epac, analogue de l'AMPc, le 007-AM. Néanmoins, prise *in vivo* pendant 7 jours, cette molécule n'induit pas une hypertrophie musculaire, suggérant qu'un traitement au 007-AM de plus longue durée (3 semaines) serait nécessaire pour avoir un effet notable. De plus, d'après nos résultats en pharmacologie, il semblerait que le 007-AM soit dégradé très rapidement (en quelques secondes) dans le plasma, contrairement au 007 qui semble être stable plus longtemps (plusieurs heures).

*Il serait donc envisageable d'administrer, sur du plus long terme (3 semaines par exemple), la molécule de 007-AM à des souris pour déterminer si l'activation spécifique d'Epac induit une hypertrophie musculaire. Dans le but d'éviter sa dégradation plasmatique, et compte tenu du prix élevé de cet analogue de l'AMPc, il serait intéressant de voir l'effet de son injection en intra-musculaire. Enfin, le développement très récent d'inhibiteurs spécifiques d'Epac (Chen et al., 2012; Almahariq et al., 2013) pourrait permettre de vérifier l'effet de cette protéine sur la régulation de la masse musculaire.*

### **3. Il existe un couplage direct des récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques avec PI3K, expliquant l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR à la suite d'une stimulation $\beta_2$ -adrénergique.**

Contrairement à l'hypothèse précédente, qui suggère une action indirecte entre les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, des études récentes ont suggéré une action directe entre les RCPGs et PI3K. L'activation, *in vitro*, du récepteur couplé à la protéine  $G\alpha_s$ , Fzd7 (Frizzled 7), un RCPG activé par Wnt7a, induit une hypertrophie des myotubes (von Maltzahn *et al.*, 2012). Il a été montré que l'inhibition de la protéine  $G\alpha_s$  par siRNA, tout comme l'inhibition spécifique de l'association des protéines  $G\alpha_s$  et  $G\beta\gamma$ , en présence de suramine, étaient capables d'inhiber l'hypertrophie induite par Wnt7a (von Maltzahn *et al.*, 2012). Ces observations suggèrent que les protéines  $G\alpha_s$  et  $G\beta\gamma$  sont impliquées dans la régulation de la masse musculaire. De plus, l'analyse par co-immunoprécipitation a démontré que le récepteur Fzd7 se liait, non seulement à la protéine  $G\alpha_s$ , mais également à la sous-unité régulatrice p85 de PI3K, suggérant une action directe du RCPG sur la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (von Maltzahn *et al.*, 2012). L'importance de cette sous-unité régulatrice de PI3K a été montrée en générant des souris KO qui présentaient à la fois une diminution de l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR, mais



également une diminution de la taille des fibres musculaires (Luo *et al.*, 2006). Il serait donc envisageable de penser que ce mécanisme pourrait être similaire pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune étude n'a montré un lien direct entre les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et PI3K.

*Savoir comment les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques couplés à la protéine  $G\alpha_s$  activent la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, initiateur de la traduction de protéine, fournirait des éléments clés pour comprendre le processus d'hypertrophie musculaire induit par les  $\beta_2$ -agonistes et découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la perte de masse musculaire. Ainsi, il serait envisageable d'étudier le lien direct entre le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique et PI3K par co-immunoprécipitation dans le muscle squelettique.*

#### **4. Implication des protéines $G\alpha_i$ dans l'hypertrophie musculaire.**

Dans le muscle squelettique, l'isoforme prédominante de la protéine G est la sous-unité stimulatrice  $G\alpha_s$  de l'activité de l'adénylate cyclase (Suzuki *et al.*, 1998). Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence l'existence des isoformes  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{i1}$  et  $\alpha_q$  de la protéine G. Les expressions en ARNm des sous-unités  $G\alpha_{s1}$  et  $G\alpha_q$  n'étaient pas modifiées en réponse à l'administration de formotérol. En revanche, 3 jours de traitement au formotérol augmentaient le niveau en ARNm de la sous-unité  $\alpha_i$  de la protéine G. Bien que le niveau en protéine  $G\alpha_i$  n'ait pas été mesuré dans notre étude, il a été suggéré, dans le muscle squelettique diaphragme de souris, que l'activation de la protéine  $G\alpha_i$  couplé au récepteur  $A_1$ -adénosine pourrait réprimer la réponse induite par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et la protéines  $G\alpha_s$  (Duarte *et al.*, 2012). Une augmentation de la quantité de protéines  $G\alpha_i$  pourrait ainsi agir comme un mécanisme limitant l'hypertrophie musculaire induite par le formotérol. A l'inverse, une étude récente a démontré que l'activation de la protéine  $G\alpha_{i2}$  stimulait l'hypertrophie musculaire et inhibait l'atrophie musculaire induite par TNF- $\alpha$  (Minetti *et al.*, 2011). Les études contradictoires de Minetti *et al.*, (2011) et Duarte *et al.*, (2012) soulignent donc l'ambiguïté de la réponse induite la protéine  $G\alpha_i$  sur la régulation de la masse musculaire.

*En perspective, il serait intéressant de mesurer le niveau d'expression de la sous-unité  $G\alpha_{i2}$ , impliquée dans l'hypertrophie musculaire (Minetti *et al.*, 2011) et de confirmer les*

*résultats de notre étude sur le niveau d'expression en ARNm en analysant le niveau protéique de Ga<sub>s</sub>, Ga<sub>i</sub> et Ga<sub>q</sub>, ainsi que leur couplage fonctionnel avec le récepteur.*

### **5. L'administration de formotérol induit la lipidation de LC3 sans augmentation d'autres marqueurs de l'autophagie**

L'administration de formotérol pendant 1 (J1) et 3 jours (J3) augmente le niveau d'expression en ARNm de *LC3b*, ainsi que le contenu protéique en LC3b-II, qui est étroitement corrélé au nombre d'autophagosomes (Kabeya *et al.*, 2000). Il serait nécessaire de confirmer ces résultats par microscopie électronique. Toutefois, la mesure des niveaux en ARNm (*Atg5*, *Bnip3*, *TFEB*, et *Ulk1*) et en protéines de gènes impliqués dans l'induction (*Atg13* et *Ulk1*) et la formation de pré-autophagosomes (le complexe *Atg5/Atg12*) ne sont pas augmentés, voire diminués, à la suite de l'administration de formotérol, soutenant l'idée que le formotérol n'induirait pas une activation complète de la voie autophagie-lysosome. Ces résultats viennent compléter ceux obtenus par Koopman *et al.* (2010), qui suggère que les expressions en ARNm de marqueurs de la voie autophagie-lysosome ne sont pas modifiées en réponse à l'administration de formotérol (100 µg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> pendant 1, 7 et 28 jours). La protéine p62, également connue sous le terme sequestosome 1 (SQSTM1), fonctionne comme une protéine adaptatrice qui lie les protéines ubiquitinées à LC3 (Pankiv *et al.*, 2007). Ainsi, les corps cytoplasmiques contenant à la fois la protéine p62, les protéines ubiquitinées et LC3 sont dégradées par l'autophagie (Bjorkoy *et al.*, 2005; Pankiv *et al.*, 2007). En outre, dans notre étude, le contenu en protéine p62 n'est pas modifié, confortant l'idée selon laquelle l'administration de formotérol ne régule pas la voie autophagie-lysosome. Pour l'heure, nous n'avons aucun argument pouvant expliquer la lipidation de LC3 à J1 et J3 ainsi que la diminution de celle-ci à J10.

Récemment, la phosphorylation de LC3 par PKA a été démontrée (Cherra *et al.*, 2010). Ainsi, *in vitro*, dans des cellules neuronales, PKA inhiberait l'autophagie en phosphorylant directement la protéine LC3 sur la sérine 12 (Cherra *et al.*, 2010). A l'inverse, la déphosphorylation de LC3 était associée à une augmentation de l'induction de l'autophagie comme l'attestait un traitement à la rapamycine, inhibiteur de mTOR, qui déphosphoryle LC3. La protéine mTOR fonctionnerait comme un régulateur de l'autophagie en empêchant le transport nucléaire du facteur de transcription EB (TFEB). Ce dernier régule l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse lysosomale et régule positivement l'autophagie (Settembre *et al.*, 2011). TFEB est phosphorylé par mTOR au niveau de la Sérine 211, permettant ainsi

l'association de TFEB avec la protéine de séquestration 14-3-3 et sa rétention dans le cytosol (Martina *et al.*, 2012). L'inhibition de mTOR provoque la dissociation de TFEB avec la protéine 14-3-3 et induit ainsi la translocation de la protéine TFEB dans le noyau (Martina *et al.*, 2012) où elle peut augmenter la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'autophagie et la biogénèse lysosomale (Settembre *et al.*, 2011). Dans notre étude, et bien que le niveau en protéine de TFEB ainsi que sa phosphorylation n'aient pas été mesurés, l'administration de formotérol diminue de manière significative l'expression en ARNm de TFEB à J1 et J3, alors qu'elle augmente à J10. Ceci suggère une régulation transcriptionnelle de TFEB en présence de formotérol qui permettrait d'inhiber la biogénèse lysosomale et l'autophagie durant les premiers jours d'hypertrophie musculaire.

*Pour confirmer les résultats sur LC3, il serait opportun de déterminer le nombre de zones denses de fluorescence de LC3 par marquage GFP (par électrotransfert de gène, transfection par adénovirus, utilisation de souris LC3-GFP) en réponse à un traitement au formotérol. Il serait intéressant de mesurer la phosphorylation de LC3 sur la sérine 12, induite par l'activation de PKA, à la suite de l'administration de formotérol. De plus, il serait approprié d'analyser le niveau protéique de la perméase Atg22, protéine membranaire qui intervient en fin de processus de l'autophagie en permettant l'efflux d'acides aminés après la dégradation protéique (Yang *et al.*, 2006). Pour l'heure, l'anticorps anti-Atg22 n'est pas encore commercialisé. Enfin, l'analyse du niveau protéique TFEB, ainsi que sa phosphorylation permettraient de conforter nos résultats.*

# **CONCLUSION**



Comme annoncé précédemment dans l'état de la littérature, les  $\beta_2$ -agonistes, du fait de leur action hypertrophiante sur le muscle squelettique, sont utilisés dans le domaine sportif dans le cadre d'une pratique dopante. Néanmoins, l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués dans cette hypertrophie musculaire sont encore loin d'être connus. Notre étude tente d'apporter de nouveaux éléments de réponse mais beaucoup de questions restent en suspens comme les voies de signalisation mises en jeu lors de l'hypertrophie musculaire, induite par un traitement prolongé aux  $\beta_2$ -agonistes, ainsi que l'implication de la protéine  $G\alpha_i$  sur le développement de la masse musculaire.

Expérimentalement chez l'animal, l'administration de  $\beta_2$ -agonistes induit une hypertrophie et une force musculaires qui peuvent persister plusieurs semaines après l'arrêt du traitement. Cet arrêt de traitement serait comparable à une suspension chez l'athlète. Ainsi, comme le titrait le 7 août 2012, un article publié par l'entraîneur de Christine Arron, sur le site d'information Le Monde.fr, « Une suspension efface-t-elle les effets du dopage ? » Pendant combien de temps les athlètes bénéficient-ils des modifications physiologiques causées par la prise de substances interdites ? Au vu des résultats expérimentaux chez l'animal, il est tout naturel de se poser cette question étant donné que des athlètes suspendus plusieurs mois pour dopage furent médaillés à leur retour à la compétition aux Jeux Olympiques de Londres en 2012. Pour l'heure, aucune étude n'a été publiée sur l'humain et des recherches complémentaires sur ce sujet seraient nécessaires pour déterminer combien de temps l'action anabolique des  $\beta_2$ -agoniste persiste chez l'humain.



**COMMUNICATIONS  
SCIENTIFIQUES**





## COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

JOASSARD O., AMIROUCHE A., GALLOT Y.S., BERTHON P., FREYSSNET D.  
**ACTIVATION AND INHIBITION OF Akt/mTOR SIGNALING PATHWAY IN RAT SKELETAL MUSCLE AFTER A FORMOTEROL TREATMENT.** International Congress of Translational Research in Human Nutrition, Clermont-Ferrand (*Mars 2010*).

JOASSARD Olivier, DEFOUR Aurélia, BARTHELEMY Jean-Claude, SABIDO Odile, BECHET Daniel, BERTHON Phanélie, FREYSSNET Damien. **WESTERN BLOT ET LUMINEX : DES TECHNIQUES DIFFERENTES, DES RESULTATS SIMILAIRES.** 11<sup>ème</sup> Colloque Rhône-Alpes de Quantimétrie Cellulaire, Saint-Etienne (*Juin 2010*).

JOASSARD O., AMIROUCHE A., GALLOT Y S., BERTHON P., FREYSSNET D.  
**ACTIVATION AND INHIBITION OF Akt/mTOR SIGNALING PATHWAY IN RAT SKELETAL MUSCLE AFTER A FORMOTEROL TREATMENT** Institut Fédératif de Recherche en Sciences et Ingénierie de la Santé – IFRESIS, Saint-Etienne (*Novembre 2010*).

JOASSARD O., CASTELLS J., PEREK N., DELAVENNE X., BERTHON P., FREYSSNET D. **LA MOLECULE X, PRODUIT DOPANT DE SUBSTITUTION DES  $\beta_2$ -AGONISTES ?** Journée de la Recherche de l'Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie, Santé - ED SIS, Saint-Etienne (*Mai 2011*).

JOASSARD O., AMIROUCHE A., GALLOT Y S., CASTELLS J., BERTHON P., FREYSSNET D.  
**REGULATION TEMPORELLE DES VOIES DE LA PROTEOLYSE PAR LE  $\beta_2$ -AGONISTE FORMOTEROL DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE RAT.** 5<sup>ème</sup> Congrès Commun de la Société Française de Médecine de l'Exercice et du Sport (SFMES) et de la Société Française de Traumatologie du Sport (SFTS), Grenoble (*Octobre 2012*).



Ce travail a fait l'objet d'un poster lors de  
International Congress of Translational Research in Human Nutrition  
Clermont-Ferrand, Mars 2010

**ACTIVATION AND INHIBITION OF Akt/mTOR SIGNALING  
PATHWAY IN RAT SKELETAL MUSCLE AFTER A FORMOTEROL  
TREATMENT**

<sup>1</sup> JOASSARD O., <sup>1</sup> AMIROUCHE A., <sup>1</sup> GALLOT Y.S., <sup>2</sup> BERTHON P., <sup>1</sup> FREYSSENET D.

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (LPE), EA 4338, Université Jean Monnet, F-42023 Saint-Etienne, France.

<sup>2</sup> Département STAPS, UFR CISM, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac Cedex, France.

## ACTIVATION AND INHIBITION OF Akt/mTOR SIGNALING PATHWAY IN RAT SKELETAL MUSCLE AFTER A FORMOTEROL TREATMENT

JOASSARD O., AMIROUCHE A., GALLOT Y.S., BERTHON P., FREYSSENET D.

**Aims:** Traditionally used as bronchodilator for the treatment of asthma,  $\beta_2$ -agonists are effective in inducing muscle hypertrophy. It has been shown that  $\beta_2$ -agonist activated the Akt/mTOR signaling pathway involved in skeletal muscle hypertrophy. Nevertheless, the link between the cAMP-dependant pathway triggered by  $\beta_2$ -agonists and Akt/mTOR signaling pathway remained unknown. To determine the mechanisms by which  $\beta_2$ -agonists trigger Akt/mTOR pathway activation, we first studied the effects of 10-day formoterol treatments on Akt/mTOR signaling pathway in rat skeletal muscle.

**Methods:** Twenty  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ( $n = 8$ ), 200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ( $n = 8$ ) and 2000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ( $n = 10$ ) of the  $\beta_2$ -agonist, formoterol, were daily administered i.p in male Wistar rats ( $238 \pm 4\text{g}$ ) during 10 days. Control animals ( $234 \pm 7\text{g}$ ;  $n = 17$ ) received the vehicle. Body weight (BW) and fat mass were determined (20, 200 and 2000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Fiber cross-sectional area (CSA) and fiber type composition were measured on *Tibialis anterior* (TA) skeletal muscle (2000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Phosphorylation of Akt (Thr308 and Ser473) and ribosomal S6 (Ser235/236) proteins were assessed by western blot on TA muscle (20, 200 and 2000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

**Results:** Formoterol administration significantly increased BW and decreased fat mass in all groups. The formoterol treatment induced a marked hypertrophy of TA muscle in a dose-dependent manner (12 %, 15 % and 25 % for 20, 200 and 2000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectively). When considering the highest formoterol dose, fiber CSA was increased by 20 % ( $p < 0.05$ ) and fiber type composition remained unchanged. Surprisingly, analysis of Akt/mTOR signaling pathway in the 3 groups showed a significant dephosphorylation of Akt on Thr308 and Ser473. S6 phosphorylation on Ser235/236 was also significantly decreased.

**Conclusions:** Due to the hypertrophy of TA muscle, the formoterol treatment likely stimulates an increase in protein synthesis. However, the upregulation of the Akt/mTOR signaling pathway probably occurs at earlier time points. The paradoxical inhibition of the Akt/mTOR signaling pathway in response to 10-day of formoterol treatments may result from a desensitization of  $\beta_2$ -adrenoceptors that would trigger a negative feedback on this signaling pathway. The study of formoterol effects at earlier time points (1 and 3 days) is currently under investigation.

# ACTIVATION AND INHIBITION OF Akt/mTOR SIGNALING PATHWAY IN RAT SKELETAL MUSCLE AFTER A FORMOTEROL TREATMENT

<sup>1</sup>JOASSARD O, <sup>1</sup>AMIROUCHE A, <sup>1</sup>GALLOT Y.S, <sup>2</sup>BERTHON P, <sup>1</sup>FREYSSENET D

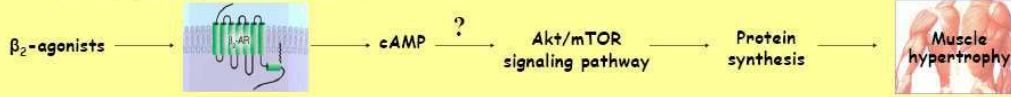


<sup>1</sup> Exercise Physiology Laboratory, EA 4338, University Jean Monnet, 42023 Saint Etienne, France.  
<sup>2</sup> Department STAPS, UFR CISM, University of Savoie, 73376 Le Bourget du Lac Cedex, France.



INTRODUCTION

$\beta_2$ -agonists, such as formoterol, are involved in skeletal muscle hypertrophy. Akt/mTOR signaling pathway plays a major role by positively regulating protein synthesis. Nevertheless, the molecular link between the cAMP-dependent pathway triggered by  $\beta_2$ -agonists and Akt/mTOR signaling pathway remains unknown. The main goal of this study is to determine the molecular mechanisms by which  $\beta_2$ -agonists trigger Akt/mTOR pathway activation. In the present study, we first investigated the dose-response and time course response of Akt/mTOR pathway in rat skeletal muscle after a formoterol treatment.

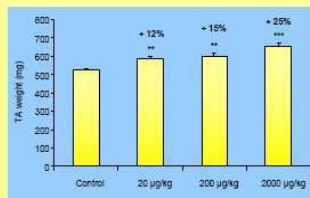


METHODS

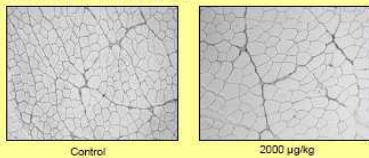
**1** Animals: Wistar rats (224 ± 19 g) received a 10-day formoterol treatment (1 injection per day) with four groups: Vehicle (n = 8), 20 µg/kg (n = 8), 200 µg/kg (n = 8), and 2000 µg/kg (n = 8).  
**2** 2000 µg/kg formoterol (1 injection per day) was administered at 1, 3, and 10 days post-treatment. Measurements included Tibialis Anterior (TA) fiber cross-sectional area (CSA) and fiber type composition (2000 µg/kg), and analysis of Akt/mTOR signaling pathway by Western blot (20, 200, 2000 µg/kg). Statistics (ANOVA 1) + Fisher post-hoc test: \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 significantly different from Control.

RESULTS 1

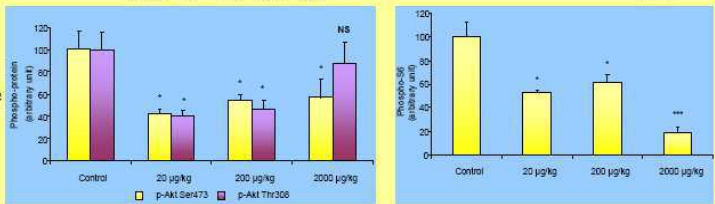
A 10-day formoterol treatment induced a dose-dependent hypertrophy of the TA muscle.



Fiber CSA was increased by 20% (p<0.05) and fiber type composition remained unchanged.



Analysis of Akt/mTOR signaling pathway showed a significant dephosphorylation of Akt on Thr308 and Ser473, and S6 on Ser235/236. Total Akt and S6 protein level remained unchanged (data not shown).

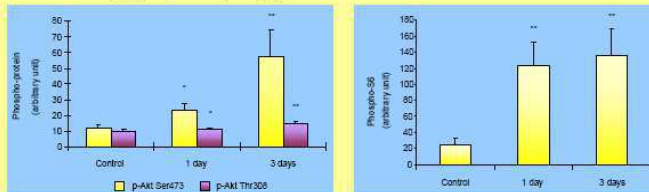


Hypothesis: desensitization of Akt/mTOR signaling pathway (10-day formoterol treatment).

Hypothesis: activation of Akt/mTOR signaling pathway at earlier time points.

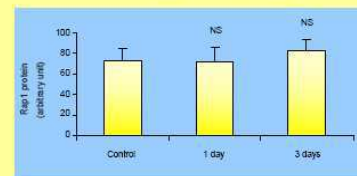
RESULTS 2

One- and 3-day formoterol treatment induced an activation of Akt/mTOR signaling pathway.



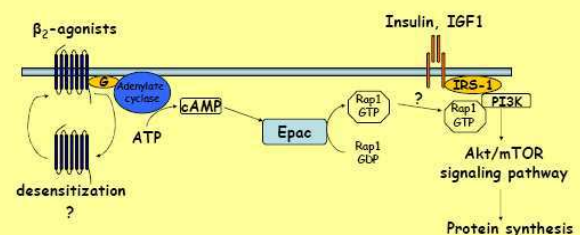
A cAMP-downstream signaling target activated by  $\beta_2$ -agonists is Epac (Exchange protein activated directly by cAMP), a guanine exchange factor (GEF) which activates the small GTPase Rap1.

Total Rap1 remained unchanged after 1 and 3 days of formoterol treatment.



CONCLUSION

One- and 3-day formoterol treatment likely stimulates an increase in protein synthesis by activating the Akt/mTOR signaling pathway. Determination of the activation of the small GTPase Rap1 and its potential association with PI3K is currently under investigation. The paradoxical inhibition of this pathway at 10 days may result from a desensitization of  $\beta_2$ -adrenoceptors that would trigger a negative feedback on this signaling pathway.



Ce travail a fait l'objet d'un poster lors du  
11<sup>ème</sup> Colloque Rhône-Alpes de Quantimétrie Cellulaire  
Saint-Etienne, Juin 2010

**WESTERN BLOT ET LUMINEX : DES TECHNIQUES DIFFERENTES,  
DES RESULTATS SIMILAIRES**

<sup>1</sup>JOASSARD Olivier, <sup>1</sup> DEFOUR Aurélia, <sup>4</sup> BARTHELEMY Jean-Claude, <sup>1</sup> SABIDO Odile,  
<sup>3</sup> BECHET Daniel, <sup>2</sup> BERTHON Phanélie, <sup>1</sup> FREYSSINET Damien

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (LPE), EA 4338, Université Jean Monnet, F-42023  
Saint-Etienne, France.

<sup>2</sup> Département STAPS, UFR CISM, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac Cedex,  
France.

<sup>3</sup> INRA UMR 1019, Unité Nutrition Humaine, St Genès Champanelle, France.

<sup>4</sup> CHU Saint-Etienne, France.

## WESTERN BLOT ET LUMINEX : DES TECHNIQUES DIFFERENTES, DES RESULTATS SIMILAIRES

JOASSARD O., DEFOUR A., BARTHELEMY J.C., SABIDO O., BECHET D., BERTHON P., FREYSSINET D.

**Introduction et but de l'étude :** Le WESTERN BLOT est une technique utilisée en routine pour l'analyse de l'expression de protéines. Cette technique de biologie moléculaire peut être comparée à une technologie récente qu'est le LUMINEX. Cette dernière possède de nombreuses applications. Le but de cette étude a été de comparer les résultats obtenus avec le WESTERN BLOT et le LUMINEX sur la voie de signalisation intracellulaire Pi3K/Akt/mTOR sur 2 protocoles distincts. La technique du LUMINEX peut-elle être une technique de substitution du WESTERN BLOT ?

**Méthodes :** Le WESTERN BLOT est une méthode d'identification de protéines réalisée par séparation électrophorétique sur gel, suivie d'un transfert sur membrane. Cette étape est suivie d'un marquage à l'aide d'un anticorps spécifique connu de la protéine recherchée, et de la révélation de l'anticorps fixé. La technique de LUMINEX, quant à elle, allie l'utilisation de microsphères fluorescentes à une double lecture après excitation par 2 lasers.

**Résultats :** L'étude de la protéine S6-P a montré une bonne corrélation ( $R^2 = 0,52$ ) entre les 2 techniques pour le protocole de dénutrition-renutrition sur myotubes C2C12. L'étude de S6-P nous suggère des résultats similaires ( $R^2 = 0,8$ ) avec les 2 techniques pour le protocole d'injection de formotérol. Une corrélation moins marquée est à noter ( $R^2 = 0,35$ ) pour la protéine Akt Ser<sup>437</sup> sur ce même protocole. Le tableau comparatif de chaque technique souligne l'intérêt de l'utilisation du LUMINEX quant au temps de travail et au nombre de protéines lues simultanément.

**Discussion/Conclusions :** Nous observons, dans l'ensemble, une bonne corrélation des résultats du WESTERN BLOT et ceux du LUMINEX aussi bien pour le protocole de dénutrition-renutrition que pour le protocole d'injection de formotérol. Néanmoins, des discordances sont à noter. D'après cette étude, le LUMINEX est simple d'utilisation et semble être moins chronophage et plus sensible que le WESTERN BLOT. De plus, la possibilité de multiplexage des analyses pour le LUMINEX souligne l'intérêt de cette technique qui pourrait, à l'avenir, être une technique de substitution du Western Blot.





# WESTERN BLOT ET LUMINEX : DES TECHNIQUES DIFFERENTES DES RESULTATS SIMILAIRES



UNIVERSITE DE LYON

<sup>1</sup>JOASSARD O., <sup>1</sup>DEFOUR A., <sup>3</sup>BARTHELEMY J.C., <sup>1</sup>SABIDO O., <sup>4</sup>BECHET D., <sup>2</sup>BERTHON P., <sup>1</sup>FREYSSENET D.

<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, EA 4338, Université Jean Monnet, 42023 Saint Etienne, France.  
<sup>2</sup>Département STAPS, UFR CISM, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac Cedex, France.  
<sup>3</sup>CHU Saint-Etienne, France.  
<sup>4</sup>INRA UMR 1019, Unité Nutrition Humaine, St Genès Champanelle, France.

INTRODUCTION

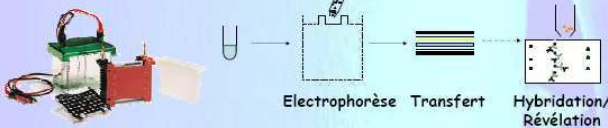
Le WESTERN BLOT est une technique couramment utilisée en biologie moléculaire pour l'analyse de l'expression de protéines. Technologie récente, le LUMINEX possède de nombreuses applications en immunologie, infectiologie, génétique, cancérologie ou en biochimie. Le but de cette étude a été d'analyser la voie de signalisation intracellulaire Pi3K/Akt/mTOR par Western blot et par Luminex.

PRINCIPE

## WESTERN BLOT

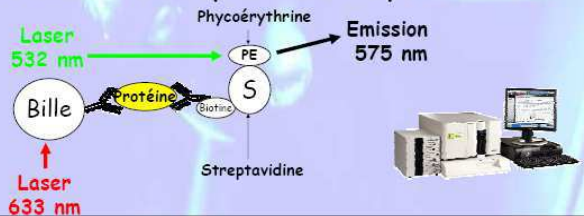
Méthode d'identification de protéines :

- séparation électrophorétique sur gel
- transfert sur membrane
- marquage à l'aide d'un anticorps spécifique
- révélation de l'anticorps fixé.



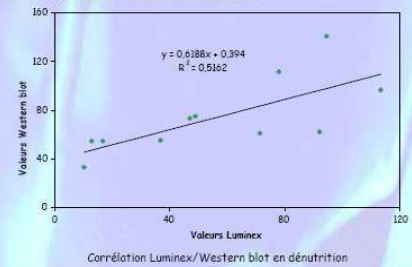
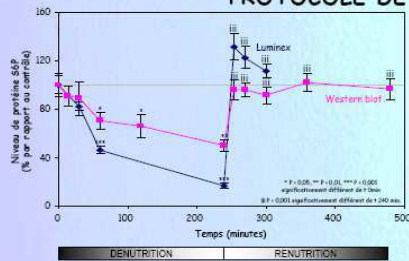
## LUMINEX

Fondée sur le principe de la cytométrie en flux, cette technique allie l'utilisation de microsphères fluorescentes à une double lecture après excitation par 2 lasers.



RESULTATS

### PROTOCOLE DE DENUTRITION - RENUTRITION SUR MYOTUBES C2C12



### PROTOCOLE D'INJECTION DE FORMOTEROL SUR TISSU MUSCULAIRE DE RATS

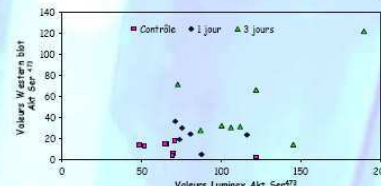
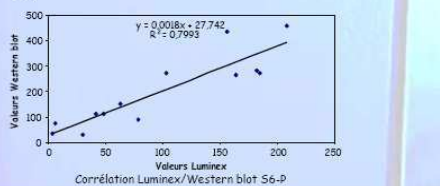
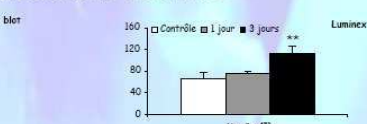
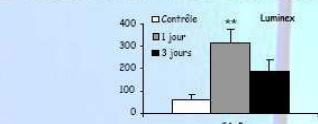
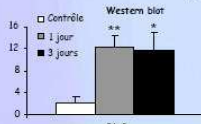


TABLEAU COMPARATIF

		Western blot	Luminex
Nombre d'échantillons		18 ou 28	94
Nombre de protéines lues simultanément		1	5
Temps de travail	Temps de manip avec incubation (h)	36	20
	Temps traitement des données approximatif (min)	90	60
Coût des réactifs par analyte et par échantillon (€)		2.5	5

DISCUSSION

La technique Luminex est utilisée en routine pour mesurer le niveau d'expression de cytokines. Le Western blot, quant à lui, reste la technique de référence pour l'analyse semi-quantitative des protéines. La comparaison des résultats de ces 2 techniques, sur des protocoles différents (cellules, tissus musculaires), montre l'intérêt de la technique du Luminex à des fins de recherche dans l'exploration des voies de signalisation intracellulaire. Le Luminex apparaît donc, comme étant une technique de substitution du Western blot.

Ce travail a fait l'objet d'un poster lors de  
Institut Fédératif de Recherche en Sciences et Ingénierie de la Santé - IFRESIS  
Saint-Etienne, Novembre 2010

**ACTIVATION AND INHIBITION OF Akt/mTOR SIGNALING  
PATHWAY IN RAT SKELETAL MUSCLE AFTER A FORMOTEROL  
TREATMENT**

<sup>1</sup>JOASSARD O., <sup>1</sup> AMIROUCHE A., <sup>1</sup> GALLOT Y S., <sup>2</sup> BERTHON P., <sup>1</sup> FREYSSENET D.

<sup>1</sup> Exercise Physiology Laboratory, University of Lyon; F-42023 Saint-Etienne, France.

<sup>2</sup> Department STAPS, UFR CISM, University of Savoie; 73376 Le Bourget du Lac Cedex, France.



# ACTIVATION AND INHIBITION OF Akt/mTOR SIGNALING PATHWAY IN RAT SKELETAL MUSCLE AFTER A FORMOTEROL TREATMENT

<sup>1</sup> JOASSARD O, <sup>1</sup> AMIROUCHE A, <sup>1</sup> GALLOT Y.S, <sup>2</sup> BERTHON P, <sup>1</sup> FREYSSENET D

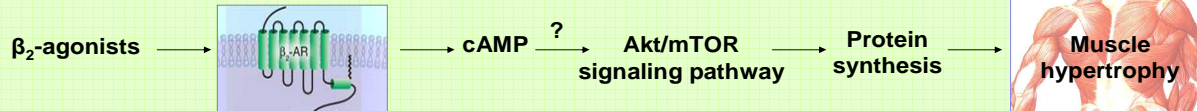


<sup>1</sup> Exercice Physiology Laboratory, University of Lyon ; F-42023 Saint Etienne, France.  
<sup>2</sup> Department STAPS, UFR CISM, University of Savoie, 73376 Le Bourget du Lac Cedex, France.



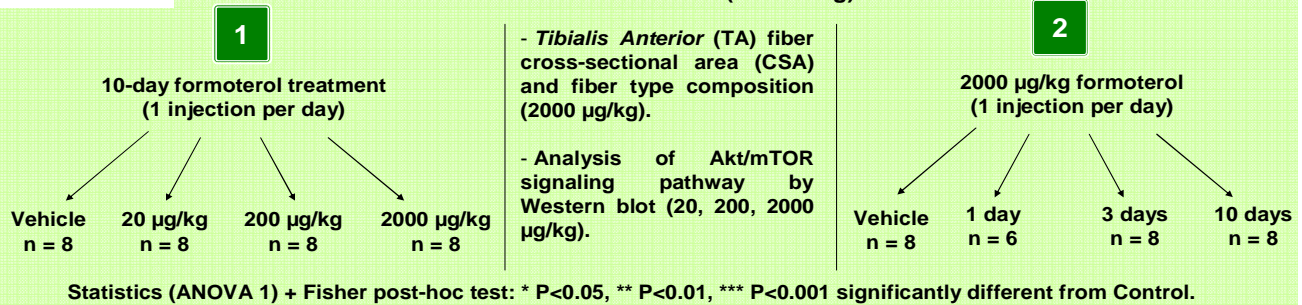
## INTRODUCTION

$\beta_2$ -agonists, such as formoterol, are involved in skeletal muscle hypertrophy. Akt/mTOR signaling pathway plays a major role by positively regulating protein synthesis. Nevertheless, the molecular link between the cAMP-dependent pathway triggered by  $\beta_2$ -agonists and Akt/mTOR signaling pathway remains unknown. The main goal of this study is to determine the molecular mechanisms by which  $\beta_2$ -agonists trigger Akt/mTOR pathway activation. In the present study, we first investigated the dose-response and time course response of Akt/mTOR pathway in rat skeletal muscle after a formoterol treatment.



## METHODS

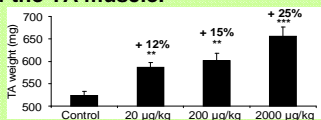
Animals: Wistar rats (224 ± 19 g)



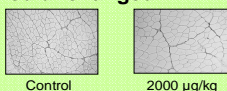
## RESULTS

1

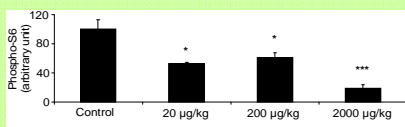
A 10-day formoterol treatment induced a dose-dependent hypertrophy of the TA muscle.



Fiber CSA was increased by 20% (p<0.05) and fiber type composition remained unchanged.



Analysis of Akt/mTOR signaling pathway showed a significant dephosphorylation of Akt on Thr308 and Ser473 (data not shown), and S6 on Ser235/236. Total Akt and S6 protein level remained unchanged (data not shown).

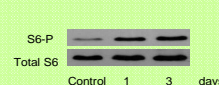
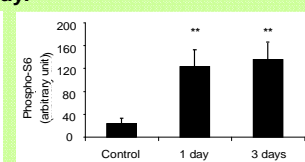
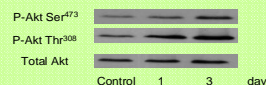
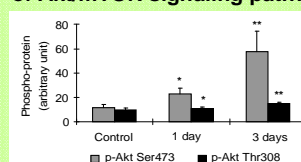


Hypothesis: desensitization of Akt/mTOR signaling pathway (10-day formoterol treatment).

Hypothesis: activation of Akt/mTOR signaling pathway at earlier time points.

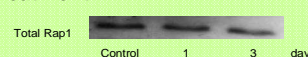
2

One- and 3-day formoterol treatment induced an activation of Akt/mTOR signaling pathway.



A cAMP-downstream signaling target activated by  $\beta_2$ -agonists is Epac (Exchange protein activated directly by cAMP), a guanine exchange factor (GEF) which activates the small GTPase Rap1.

Total Rap1 remained unchanged after 1 and 3 days of formoterol treatment.



## CONCLUSION

One- and 3-day formoterol treatment likely stimulates an increase in protein synthesis by activating the Akt/mTOR signaling pathway. Determination of the activation of the small GTPase Rap1 and its potential association with PI3K is currently under investigation. The paradoxical inhibition of this pathway at 10 days may result from a desensitization of  $\beta_2$ -adrenoceptors that would trigger a negative feedback on this signaling pathway.

Ce travail a fait l'objet d'un poster lors de la  
Journée de la Recherche de l'Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie, Santé - ED SIS  
Saint-Etienne, Mai 2011

**LA MOLECULE X, PRODUIT DOPANT DE SUBSTITUTION DES  $\beta_2$ -  
AGONISTES ?**

<sup>1</sup>JOASSARD O., <sup>1</sup>CASTELLS J., <sup>1</sup>PEREK N., <sup>3</sup>DELAVENNE X., <sup>2</sup>BERTHON P.,  
<sup>1</sup>FREYSSENET D.

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon ; F-42023 Saint-Etienne, France.

<sup>2</sup> Département STAPS, UFR CISM, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac Cedex, France.

<sup>3</sup> Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie, Hôpital Universitaire, F-42055 Saint-Etienne, France.



# LA MOLECULE X, PRODUIT DOPANT DE SUBSTITUTION DES $\beta_2$ -AGONISTES ?



<sup>1</sup> JOASSARD O, <sup>1</sup> CASTELLS J, <sup>1</sup> PEREK N, <sup>3</sup> DELAVENNE X, <sup>2</sup> BERTHON P, <sup>1</sup> FREYSSENET D



<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon ; F-42023 Saint Etienne, France.  
<sup>2</sup> Département STAPS, UFR CISM, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac Cedex, France.  
<sup>3</sup> Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie, Hôpital Universitaire, F-42055 Saint-Etienne, France.



## Introduction

Les  $\beta_2$ -agonistes, comme le formotérol, sont des produits dopants impliqués dans le phénomène d'hypertrophie du muscle squelettique. Ils régulent positivement la synthèse protéique via la voie de signalisation Akt/mTOR. De plus, les  $\beta_2$ -agonistes jouent un rôle prépondérant sur le métabolisme énergétique. C'est la raison pour laquelle ces substances sont interdites par l'Agence Mondiale Antidopage (AMA). Dans cette étude, nous analyserons les effets de la molécule X sur la masse musculaire ainsi que sur des marqueurs du métabolisme énergétique (hexokinase et citrate synthétase).

## Matériel et méthodes

7 jours de traitement



C57Bl6/J

Groupe contrôle (n=8)

Groupe formotérol (1 000  $\mu\text{g/kg}$ ) (n=8)

Groupes molécule X (500, 1 000, 2 500, 5 000  $\mu\text{g/kg}$ ) (n=8)

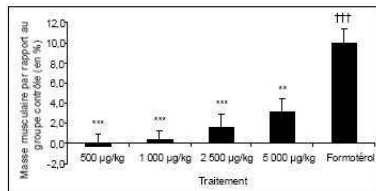
- Prélèvement des muscles : *gastrocnemius*, *tibialis anterior*, *extensor digitorum longus*, *soleus*

- Analyse de la voie de signalisation Akt/mTOR par Western blot (S6P et Akt<sup>Thr308</sup>)

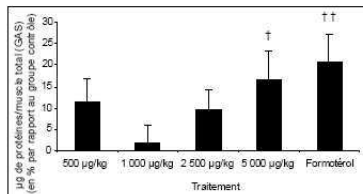
- Fluorimétrie pour les activités enzymatiques

## Résultats

La molécule X tend à augmenter la masse musculaire.

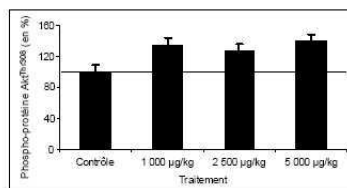
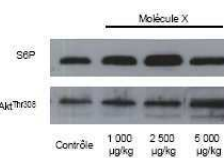


La molécule X augmente la quantité de protéines dans le muscle *gastrocnemius* (GAS).



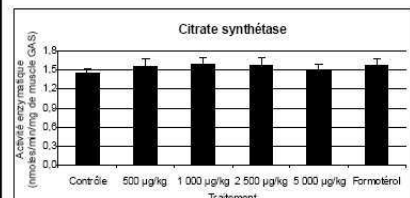
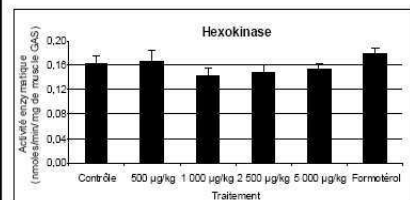
\*\*\* P<0.01 ; \*\*\* P<0.001 significativement différent du Formotérol  
 \* P<0.05 ; † P<0.01 ; †† P<0.001 significativement différent du Contrôle

La voie de signalisation Akt/mTOR régule positivement la synthèse protéique.



La molécule X tend à activer la voie de signalisation Akt/mTOR.

La molécule X ne modifie pas l'activité enzymatique de l'hexokinase (glycolyse) et de la citrate synthétase (cycle de Krebs).



## Discussion

Nos résultats préliminaires suggèrent que la molécule X pourrait stimuler la synthèse protéique en activant la voie de signalisation Akt/mTOR. Néanmoins, un traitement de 7 jours à la molécule X n'est pas suffisant pour induire des effets métaboliques. Ce travail sera poursuivi en mettant au point une méthode de dépistage de la molécule X et en approfondissant ses effets biologiques.

Ce travail a fait l'objet d'un poster lors du  
5<sup>ème</sup> Congrès Commun de la Société Française de Médecine de l'Exercice et du Sport  
(SFMES) et de la Société Française de Traumatologie du Sport (SFTS)  
Grenoble, Octobre 2012

**REGULATION TEMPORELLE DES VOIES DE LA PROTEOLYSE PAR LE  
 $\beta_2$ -AGONISTE FORMOTEROL DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE  
RAT**

<sup>1</sup> JOASSARD O., <sup>1</sup> AMIROUCHE A., <sup>1</sup> GALLOT Y S., <sup>1</sup> CASTELLS J., <sup>2</sup> BERTHON P.,  
<sup>1</sup> FREYSSENET D.

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon ; F-42023 Saint-Etienne,  
France.

<sup>2</sup> Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac,  
France.

## **REGULATION TEMPORELLE DES VOIES DE LA PROTEOLYSE PAR LE $\beta_2$ -AGONISTE FORMOTEROL DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE RAT**

O. JOASSARD, A. AMIROUCHE, Y. S. GALLOT, J. CASTELLS, P. BERTHON, D. FREYSSENET

### **Introduction**

Le métabolisme protéique musculaire est en grande partie régulée par la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, voie de signalisation qui contrôle de façon coordonnée la synthèse et la dégradation des protéines, en activant d'une part l'initiation de la traduction et en inhibant d'autre part les voies protéolytiques ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome.

Traditionnellement utilisés comme bronchodilatateurs pour traiter l'asthme, les  $\beta_2$ -agonistes, comme le formotérol, administrés à forte dose, induisent une hypertrophie du muscle squelettique. Même s'il est maintenant bien décrit que l'administration de  $\beta_2$ -agonistes active la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, peu ou pas de données sur les effets aigus ou chroniques de l'administration de  $\beta_2$ -agonistes sur la voie ubiquitine-protéasome et la voie autophagie-lysosome existent. Dans ce contexte, notre objectif est de déterminer les effets temporels de l'administration de  $\beta_2$ -agonistes sur les voies de la protéolyse.

### **Matériels utilisés et méthodes/Résultats**

L'administration de formotérol (2 mg.kg<sup>-1</sup> de poids de corps) en i.p pendant 1, 3 et 10 jours (J1, J3 et J10) chez des rats males Wistar (224 ± 19 g) augmentait significativement la masse musculaire et diminuait la masse grasse. Le traitement au formotérol induisait une hypertrophie marquée du muscle *Tibialis Anterior* (5 %, 10 % [p < 0,05] et 25 % [p < 0,001] pour J1, J3 et J10, respectivement). La section transversale des fibres musculaires était augmentée de 20 % à J10 (p < 0,05), mais la composition en type de fibres restait inchangée. D'un point de vue moléculaire, 1 et 3 jours de traitement au formotérol induisaient une augmentation de la phosphorylation des protéines Akt (Thr<sup>308</sup> et Ser<sup>473</sup>) et S6 (Ser<sup>235/236</sup>), alors qu'un traitement de 10 jours déphosphorylait ces mêmes protéines, indiquant qu'une exposition prolongée au formotérol inhibe la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. En accord avec l'augmentation de la phosphorylation de la protéine FoxO3a à J3 et sa diminution non significative à J10, les niveaux en ARNm de *MuRF1* et *MAFbx* étaient diminués à J1 et J3 et augmentés à J10, suggérant une régulation temporelle de la voie ubiquitine-protéasome. Le traitement au formotérol induisait une augmentation du contenu en protéine LC3B, impliquée dans la voie de signalisation autophagie-lysosome. A l'inverse, Ulk1, gène impliqué dans l'autophagie était diminué de façon significative à J3.

**Conclusion**

Nos données suggèrent l'existence d'une inhibition de la voie ubiquitine-protéasome à J1 et J3 probablement sous l'action de l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR par le formotérol. Prises ensemble, ces données témoignent donc d'une régulation coordonnée de la voie PI3K/Akt/mTOR et de la voie ubiquitine-protéasome par le formotérol. *In fine*, ceci pourrait permettre de stimuler la synthèse des protéines. L'augmentation de l'expression de certains acteurs de la voie autophagie-lysosome à cette même période témoignerait d'une activation de la voie autophagie-lysosome. Bien que paradoxale cette activation pourrait permettre de mettre à disposition des acides aminés pour le tissu musculaire.



# REGULATION TEMPORELLE DE L'EXPRESSION UBIQUITINE LIGASE ET DE L'AUTOPHAGIE APRES TRAITEMENT AU $\beta_2$ -AGONISTE FORMOTEROL DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE RAT



<sup>1</sup>JOASSARD O, <sup>1</sup>AMIROUCHE A, <sup>1</sup>GALLOT Y.S, <sup>1</sup>CASTELLS J, <sup>2</sup>BERTHON P, <sup>1</sup>FREYSSENET D

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, EA 4338, Université Jean Monnet, 42023 Saint Etienne, France.  
<sup>2</sup> Département STAPS, UFR CISM, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac Cedex, France.  
 \* olivier.joassard@voila.fr



## INTRODUCTION

Traditionnellement utilisés pour traiter l'asthme, les  $\beta_2$ -agonistes, comme le formotérol, administrés à forte dose induisent une hypertrophie du muscle squelettique, en partie via l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt. Néanmoins, peu de données sur les effets temporels de l'administration de  $\beta_2$ -agoniste sur la voie ubiquitine-protéasome et la voie autophagie-lysosome existent.

## OBJECTIF

Déterminer les effets temporels de l'administration de  $\beta_2$ -agoniste sur les voies de la protéolyse.

## MATERIEL et METHODES

2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  formotérol (1 injection par jour)

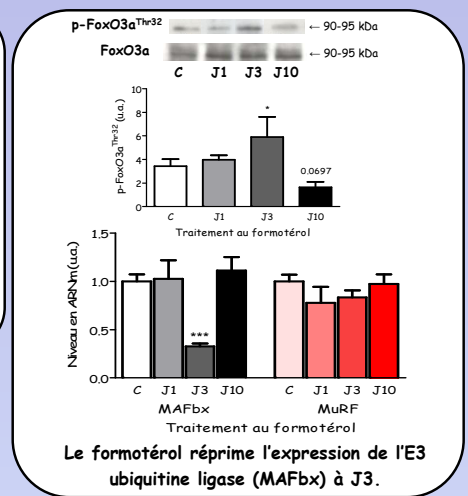
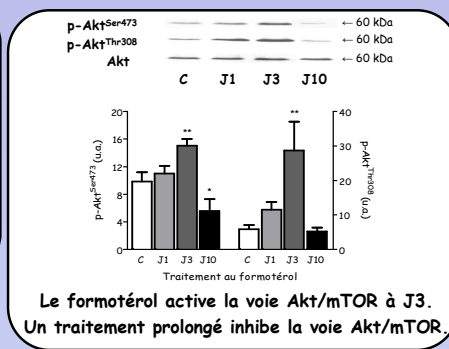
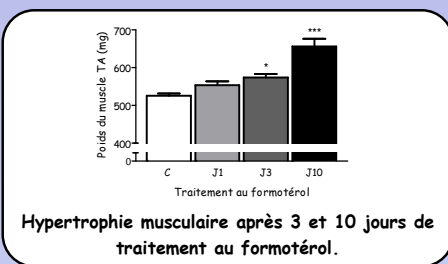
Animaux : rats males Wistar (224  $\pm$  19 g)

Contrôle (C) n = 8, 1 jour (J1) n = 6, 3 jours (J3) n = 8, 10 jours (J10) n = 8

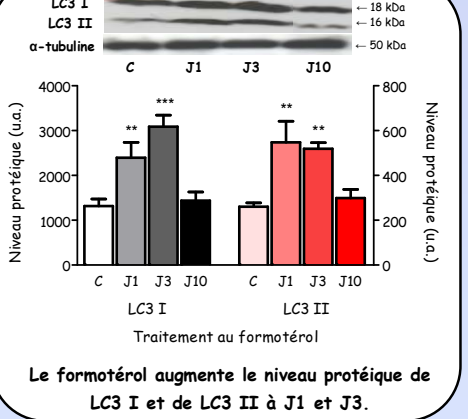
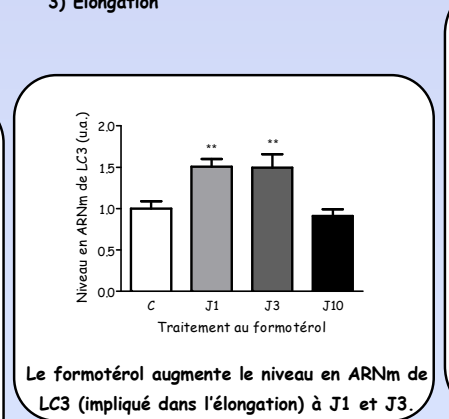
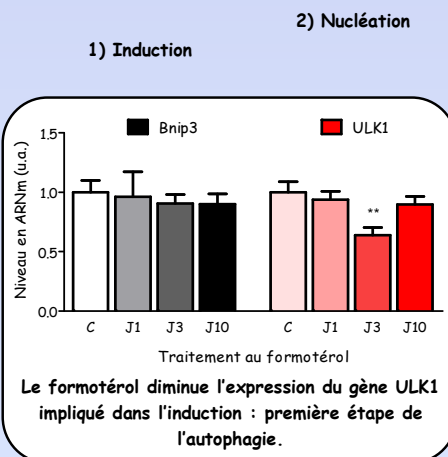
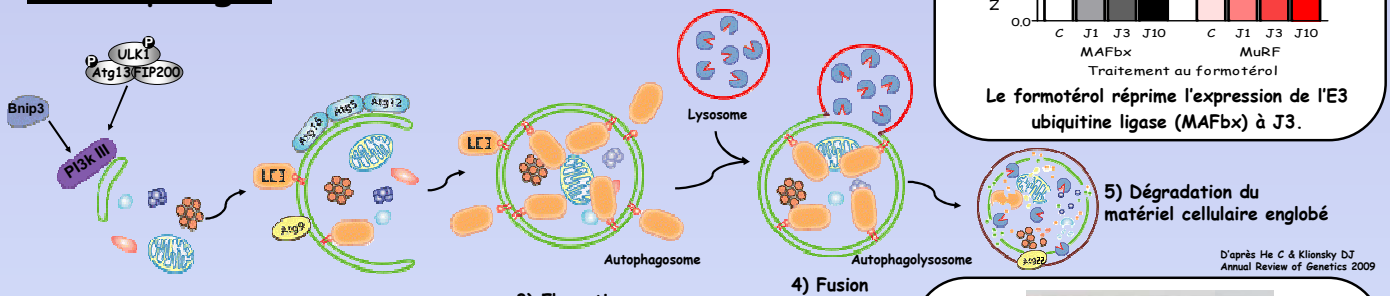
- Analyses des voies de signalisation Akt/mTOR, ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome par Western blot et RT-PCR.

- Statistiques : ANOVA 1 + Fisher post-hoc test \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001, significativement différent du groupe Contrôle.

## RESULTATS



## L'autophagie



## CONCLUSION

Au regard de l'hypertrophie du muscle *Tibialis Anterior*, on observe une stimulation de la voie Akt/mTOR à 3 jours de traitement au formotérol. En parallèle, l'expression réprimée de l'E3 ubiquitine ligase (MAFbx) suggère que la voie ubiquitine-protéasome puisse être inhibée à J3. En condition d'hypertrophie musculaire induite par les  $\beta_2$ -agonistes, la phase d'induction et la phase d'élongation semblent être régulées de façons distinctes. Ainsi, la voie autophagie-lysosome est activée à J1 et J3 et pourrait agir en réponse à de fortes stimulations au  $\beta_2$ -agoniste et permettre ainsi un turnover protéique plus important nécessaire à l'hypertrophie du muscle squelettique.

## COMMUNICATIONS ORALES

JOASSARD O., AMIROUCHE A., GALLOT Y. S., CASTELLS J., PEREK N., BERTHON P., FREYSSNET D. **REGULATION PHARMACOLOGIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION Akt/mTOR DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE PAR LE FORMOTEROL ET LE 007-AM.** 4<sup>ème</sup> Congrès Commun de la Société Française de Médecine du Sport (SFMS) et de la Société Française de Traumatologie du Sport (SFTS), Caen (*Septembre 2011*) (Session « Jeunes Chercheurs »).

MILLET G.P., VERNEY J., JOASSARD O., BANKOLE C., MILLET G.Y. **ACUTE RESPONSES INDUCED BY ULTRA-TRAIL.** 4<sup>th</sup> International Congress Mountain, Sport & Health, Rovereto (Italie) (*Novembre 2011*).

O. JOASSARD, A. AMIROUCHE, Y. S. GALLOT, J. CASTELLS, N. PEREK, P. BERTHON AND D. FREYSSNET. **PHARMACOLOGICAL REGULATION OF AKT/mTOR SIGNALING PATHWAY IN SKELETAL MUSCLE IN RESPONSE TO FORMOTEROL AND 007-AM TREATMENTS.** Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique (P2T), Dijon, (*Avril 2012*).



Ce travail a fait l'objet d'une communication orale lors du  
4<sup>ème</sup> Congrès Commun de la Société Française de Médecine du Sport (SFMS) et de la Société  
Française de Traumatologie du Sport (SFTS)  
Caen, Septembre 2011 (Session « Jeunes Chercheurs »)

**REGULATION PHARMACOLOGIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION  
Akt/mTOR DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE PAR LE FORMOTEROL ET  
LE 007-AM**

<sup>1</sup> JOASSARD O., <sup>1</sup> AMIROUCHE A., <sup>1</sup> GALLOT Y S., <sup>1</sup> CASTELLS J., <sup>1</sup> PEREK N.,  
<sup>2</sup> BERTHON P., <sup>1</sup> FREYSSENET D.

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon ; F-42023 Saint-Etienne,  
France.

<sup>2</sup> Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac,  
France.

**Ce travail a valu le Prix « Jeune Chercheur »**

**décerné par**

**J. Lecocq et X. Bigard**

## REGULATION PHARMACOLOGIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION Akt/mTOR DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE PAR LE FORMOTEROL ET LE 007-AM

O. JOASSARD, A. AMIROUCHE, Y. S. GALLOT, J. CASTELLS, P. BERTHON, D. FREYSSENET

### Introduction

Traditionnellement utilisés comme bronchodilatateurs pour traiter l'asthme, les  $\beta_2$ -agonistes, comme le formotérol, administrés à forte dose induisent une hypertrophie du muscle squelettique. Il a été montré que les  $\beta_2$ -agonistes régulaient positivement la synthèse protéique en activant la voie de signalisation Akt/mTOR. Néanmoins, la connexion entre la voie dépendante de l'AMPc déclenchée par les  $\beta_2$ -agonistes et la voie Akt/mTOR reste encore inconnue. Récemment, un analogue de l'AMPc, le 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM (007-AM), a été décrit comme étant une molécule alternative à l'utilisation des  $\beta_2$ -agonistes. En effet, le 007-AM stimulerait la voie Akt/mTOR en agissant en aval du  $\beta_2$ -récepteur, probablement *via* l'activation spécifique de la protéine Epac (protéine d'échange directement activée par l'AMPc). Dans ce contexte, notre objectif est de déterminer les mécanismes par lesquels les  $\beta_2$ -agonistes activent la voie de signalisation Akt/mTOR. Pour cela, nous avons a) étudié la dose-réponse et la cinétique de marqueurs de la voie Akt/mTOR dans le muscle squelettique de rat après traitement au formotérol et b) examiné les effets du 007-AM sur la masse musculaire et le métabolisme énergétique.

### Matériels utilisés et méthodes/Résultats

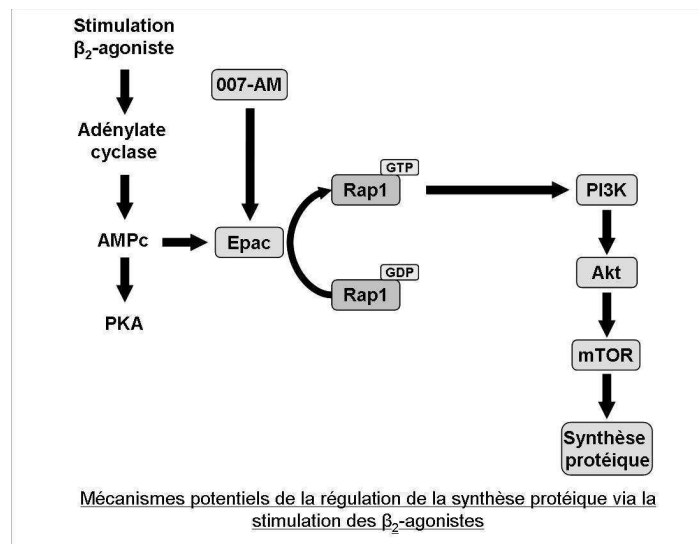
a) l'administration de formotérol en i.p [0.02 mg.kg<sup>-1</sup> (n = 8), 0.2 mg.kg<sup>-1</sup> (n = 8) et 2 mg.kg<sup>-1</sup> (n = 10)] chez des rats males Wistar (224 ± 19 g) augmentait significativement la masse musculaire et diminuait la masse grasse. Dix jours de traitement au formotérol induisaient une hypertrophie marquée du muscle *Tibialis Anterior* de manière dose-dépendante (12 %, 15 % et 25 % pour 0,02, 0,2, 2 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivement). La section transversale des fibres musculaires était augmentée de 20% (p < 0,05), mais la composition en type de fibres restait inchangée (2 mg.kg<sup>-1</sup>). D'une façon surprenante, l'analyse de la voie Akt/mTOR soulignait une déphosphorylation significative des protéines Akt (Thr308 et Ser473) et S6 (Ser235/236) pour les 3 groupes. En revanche, 1 et 3 jours de traitement au formotérol (2 mg.kg<sup>-1</sup>) induisaient une augmentation de la phosphorylation des protéines Akt et S6, indiquant qu'une exposition prolongée au formotérol inhibe la voie de signalisation Akt/mTOR.

b) l'administration de 007-AM en i.p [0,5, 1, 2,5 et 5 mg.kg<sup>-1</sup> (n = 8/groupe)] chez des souris males C57Bl6/J (26 ± 2 g) tendait à augmenter la masse musculaire d'une manière dose-dépendante. Un accroissement significatif de 16 % (p < 0,05) de la quantité totale de protéines était obtenu dans le muscle *Gastrocnemius* (5 mg.kg<sup>-1</sup>). En accord avec ces observations, nos analyses préliminaires de la

voie Akt/mTOR indiquent une activation de cette voie de signalisation, suggérant une stimulation des synthèses protéiques dans les muscles de ces animaux.

### Conclusion

Au regard de l'hypertrophie du muscle *Tibialis Anterior*, 1 et 3 jours de traitement au formotérol stimulent la synthèse protéique. La paradoxale inhibition de la voie de signalisation Akt/mTOR après 10 jours de traitement au formotérol pourrait résulter d'une désensibilisation des  $\beta_2$ -récepteurs et/ou d'un rétro-contrôle négatif de certains acteurs de cette voie de signalisation. Le 007-AM pourrait stimuler la synthèse protéique en activant la voie Akt/mTOR et ainsi être une molécule de substitution à l'utilisation des  $\beta_2$ -agonistes. La question est de savoir si un traitement prolongé au 007-AM pourrait induire un effet métabolique plus marqué qu'à 7 jours.



Ce travail a fait l'objet d'une communication orale lors du  
4<sup>th</sup> International Congress Mountain, Sport & Health  
Rovereto (Italie), Novembre 2011

## **ACUTE RESPONSES INDUCED BY ULTRA-TRAIL**

MILLET G.P.<sup>1</sup>, VERNEY J.<sup>2</sup>, JOASSARD O.<sup>3</sup>, BANKOLE C.<sup>3</sup>, MILLET G.Y.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Sport Sciences, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne,  
Lausanne, Switzerland

<sup>2</sup> Faculty of Sport Sciences, Clermont-Ferrand, France.

<sup>3</sup> Exercise Physiology Laboratory, Jean Monnet University, Saint-Etienne, France.

**ACUTE RESPONSES INDUCED BY ULTRA-TRAIL**MILLET G.P., VERNEY J., JOASSARD O., BANKOLE C., MILLET G.Y.

**Introduction.** Despite the success of ultra-endurance Mountain running, shown by the popularity of ultra-trails as the Ultra Tour du Mont-Blanc (UTMB) around the Mont-Blanc or the Tor des Géants (TdG) around the Val d'Aoste, the physiological consequences of such events are poorly understood. However, investigating acute responses and the time course of recovery is of the highest interest for the physiologists aiming to better understand the human limits and the aetiology of fatigue (Millet *et al.*, 2011). The aim of this study was to investigate the post-race time course effects of the UTMB (166 km; positive/negative elevation of 9500 m) on the acute responses ( $\text{VO}_2$  kinetics, HR recovery and HR variability) to a moderate cycling exercise.

**Methods.** Twenty-two male runners participated to this study for the pre- and post- measurements whereas eleven of them took part to the recovery phase (days +2; +5; +9 and +16). 34 subjects were initially recruited but only 22 (i.e. 65%) were able to complete the race (Millet *et al.*, 2011). The subjects performed a 6-min cycling exercise at an intensity corresponding to 50% of his estimated peak power output. Prior to exercise for 6 min and immediately after for 10 min, they sat passively.

Gas exchange ( $\text{K}4^{\text{b}2}$ ; Cosmed, Rome, Italy), RPE, RR intervals (S810, Polar, Kempele, Finland) and hemodynamic variables (Physioflow, Manatec, Paris, France) were recorded. “On”- and “Off”-transient phases  $\text{VO}_2$  kinetics were modelled as a bi- or mono-exponential function (TD;  $\tau$ ; A) by iterative procedure (Borrani *et al.*, 2001). Heart rate recovery (HRR) was assessed as follows (Buchheit *et al.*, 2007): the absolute difference between the final HR at exercise completion and the HR recorded after 1 min of recovery (HRR1); the time constant of the HR decay obtained by fitting the 10-min post-exercise HR recovery into a first-order exponential decay curve (HRR $\tau$ ); the first 30 s (from the 10<sup>th</sup> to the 40<sup>th</sup> s) of HRR *via* semi-logarithmic regression analysis (T30). The parasympathetic reactivation was assessed by the time-varying vagal-related index RMSSD for each of the subsequent 30-s segments of recovery. The other temporal and spectral HRV variables were analysed on the last 5 min of the recovery period.

**Results.** Post-UTMB values of RPE ( $15.5 \pm 3.1$  vs.  $10.4 \pm 1.3$ ),  $\tau$  of the “off” $\text{VO}_2$  kinetics ( $44.9 \pm 6.8$  vs.  $35.2 \pm 4.7$  s), economy ( $17.8 \pm 2.0$  vs.  $15.7 \pm 1.1$   $\text{mlO}_2 \cdot \text{W}^{-1}$ ) were higher ( $p < 0.05$ ) than Pre-UTMB values but returned to baseline rapidly (day +2 or +5).



Similarly, HRR was deteriorated at post- (HRR1:  $40.3 \pm 3.9$  vs.  $51.9 \pm 15.5$  bpm; HRR $\tau$ :  $55.5 \pm 21.3$  vs.  $32.0 \pm 17.8$  s; T30:  $153.5 \pm 53.6$  vs.  $93.5 \pm 49.9$  s) but all HRR indices returned to pre-values at day +2.

HRV indices were decreased ( $p < 0.01$ ) in post- (HRV:  $522 \pm 393$  vs.  $1771 \pm 1574$  ms<sup>2</sup>.Hz<sup>-1</sup>; HF:  $69 \pm 90$  vs.  $348 \pm 526$  ms<sup>2</sup>.Hz<sup>-1</sup>; LF:  $181 \pm 125$  vs.  $831 \pm 766$  ms<sup>2</sup>.Hz<sup>-1</sup>) but remained lower than baseline for the whole period studied; i.e. 16 days. However, of interest is that at day +2, one observed a high parasympathetic reactivation and high HF ( $366 \pm 447$  ms<sup>2</sup>.Hz<sup>-1</sup>) that were not different to pre- values.

**Discussion.** The time course of the physiological responses to a moderate exercise during the period following an ultra-endurance event has never been reported. We showed that the VO<sub>2</sub> kinetics and HRR were recovered quickly (i.e. in less than 5 days) whereas the autonomic function remained altered for 16 days. To note that after an Ironman, the autonomic function reached baseline values within 3 days (Gratze *et al.*, 2005). In our view, it highlights that UTMB induced a high level of fatigue that was maintained for at least 2 weeks although the muscular and metabolic functions might be restored faster. The “rebound” in parasympathetic function at day +2 is a novel and surprising result. This might be linked to fluid exchange and reduction of oedema observed at this time.

*Borrani F, Candau R, Millet GY, Perrey S, Fuchslocher J, Rouillon JD (2001) Is the VO2 slow component dependent on progressive recruitment of fast-twitch fibers in trained runners? Journal of Applied Physiology 90: 2212-2220.*

*Buchheit M, Laursen PB, Ahmaidi S (2007) Parasympathetic reactivation after repeated sprint exercise. Am J Physiol Heart Circ Physiol 293: H133-141*

*Gratze G, Rudnicki R, Urban W, Mayer H, Schlogl A, Skrabal F (2005) Hemodynamic and autonomic changes induced by Ironman: prediction of competition time by blood pressure variability. Journal of Applied Physiology 99: 1728-1735*

*Millet GY, Tomazin K, Verges S, Vincent C, Bonnefoy R, Boisson RC, Gergele L, Feasson L, Martin V (2011) Neuromuscular consequences of an extreme mountain ultra-marathon. PLoS ONE 6: e17059*

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale lors du  
Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique (P2T)  
Dijon (France), Avril 2012

**PHARMACOLOGICAL REGULATION OF AKT/mTOR SIGNALING  
PATHWAY IN SKELETAL MUSCLE IN RESPONSE TO FORMOTEROL AND  
007-AM TREATMENTS**

O. JOASSARD<sup>a</sup>, A. AMIROUCHE<sup>a</sup>, Y. S. GALLOT<sup>a</sup>, J. CASTELLS<sup>a</sup>, N. PEREK<sup>a</sup>, P. BERTHON<sup>b</sup>  
AND D. FREYSSENET<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Exercise Physiology Laboratory, University of Lyon, Saint-Etienne, France.*

<sup>b</sup> *Exercise Physiology Laboratory, University of Savoie, Le Bourget du Lac, France.*

**Ce travail a valu le Prix de la « Meilleure Communication Orale »**

**décerné par**

**D. Rivière**

## PHARMACOLOGICAL REGULATION OF AKT/mTOR SIGNALING PATHWAY IN SKELETAL MUSCLE IN RESPONSE TO FORMOTEROL AND 007-AM TREATMENTS

O. JOASSARD, A. AMIROUCHE, Y. S. GALLOT, J. CASTELLS, N. PEREK, P. BERTHON AND D. FREYSSENET

Traditionally used as bronchodilator for the asthma treatment,  $\beta_2$ -agonists, such as formoterol, are effective in inducing muscle hypertrophy. It has been shown that  $\beta_2$ -agonists positively regulated protein synthesis by activating the Akt/mTOR signaling pathway. Nevertheless, the molecular links between the cAMP-dependant pathway triggered by  $\beta_2$ -agonists and Akt/mTOR pathway remain unknown. Recently, a cAMP analogue, the “007-AM”, which is a potent and specific agonist of an exchange protein directly activated by cAMP (Epac), has been described to be an alternative to the use of  $\beta_2$ -agonists. It stimulates the Akt/mTOR pathway by acting downstream from the  $\beta_2$ -receptors on Epac. To determine the mechanisms by which  $\beta_2$ -agonists trigger Akt/mTOR pathway activation, we *A*) investigated the dose-response and the time-course response of Akt/mTOR pathway in rat skeletal muscle after a formoterol treatment and *B*) after studying the 007-AM detection by HPLC/MS/MS, we analysed the effects of 007-AM on C2C12 cells.

*A*) Formoterol was administrated *i.p* [0.02 mg/kg (n=8), 0.2 mg/kg (n=8) and 2 mg/kg (n=10)] in male Wistar rats (224±19g). A 10-day treatment induced a marked hypertrophy of *Tibialis Anterior* muscle in a dose-dependent manner (12%, 15% and 25% for 0.02, 0.2 and 2 mg/kg, respectively). When considering the highest formoterol dose, fiber cross-sectional area was increased by 20% (p<0.05). Surprisingly, analysis of the Akt/mTOR signaling pathway in the 3 groups showed a significant dephosphorylation of Akt (Thr<sup>308</sup> and Ser<sup>473</sup>) and S6 (Ser<sup>235/236</sup>). By contrast, one and 3-day formoterol treatment (2 mg/kg) induced a significant increase in Akt and S6 phosphorylation.

*B*) 007-AM administration [0.1, 1 and 10  $\mu$ M (n=4/group)] for 2 hours in C2C12 cells increased S6 phosphorylation in a dose-response manner. In agreement with this observation, our preliminary analysis of Akt/mTOR pathway suggested an increase in translation initiation.

One and 3-day formoterol treatment stimulates the Akt/mTOR pathway, which may increase protein synthesis. The paradoxical inhibition of the Akt/mTOR pathway in response to the 10-day formoterol treatment may be explained by a desensitization of  $\beta_2$ -adrenoceptors and/or a negative feedback of p70S6k on the Akt/mTOR pathway. The potential anabolic role of 007-AM in stimulating the Akt/mTOR pathway needs to be further investigated.

# **ANNEXES**



$\beta_2$ -adrenergic agonists and the treatment of skeletal  
muscle wasting disorders

Revue acceptée dans

International Journal of Biochemistry & Cell Biology





Contents lists available at ScienceDirect

## The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biociel](http://www.elsevier.com/locate/biociel)

### Review

## $\beta$ 2-Adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders<sup>☆</sup>

Olivier R. Joassard, Anne-Cécile Durieux, Damien G. Freyssenet\*

Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France

### ARTICLE INFO

Article history:  
Available online xxx

Keywords:  
Proteolysis  
Protein synthesis  
G protein  
cAMP  
CREB

### ABSTRACT

$\beta$ 2-Agonists are traditionally used for the treatment of bronchospasm associated with asthma and the treatment of symptomatic patients with COPD. However,  $\beta$ 2-agonists are also powerful anabolic agents that trigger skeletal muscle hypertrophy. Investigating the effects of  $\beta$ 2-agonists in skeletal muscle over the past 30 years in different animal models has led to the identification of potential therapeutic applications in several muscle wasting disorders, including neuromuscular diseases, cancer cachexia, sepsis or thermal injury. In these conditions, numerous studies indicate that  $\beta$ 2-agonists can attenuate and/or reverse the decrease in skeletal muscle mass and associated weakness in animal models of muscle wasting but also in human patients.

The purpose of this review is to present the biological and clinical significance of  $\beta$ 2-agonists for the treatment of skeletal muscle wasting. After the description of the molecular mechanisms involved in the hypertrophy and anti-atrophy effect of  $\beta$ 2-agonists, we will review the anti-atrophy effects of  $\beta$ 2-agonist administration in several animal models and human pathologies associated with or leading to skeletal muscle wasting.

This article is part of a Directed Issue entitled: Molecular basis of muscle wasting.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Contents

1. Introduction.....	00
2. Effects of $\beta$ 2-agonists on skeletal muscle mass, fibre type composition and force.....	00
2.1. Effects of $\beta$ 2-agonists on skeletal muscle mass.....	00
2.2. Effects of $\beta$ 2-agonists on skeletal muscle fibre type.....	00
2.3. Effects of $\beta$ 2-agonists on skeletal muscle force.....	00
3. Molecular mechanisms involved in the hypertrophy and anti-atrophy effects of $\beta$ 2-agonists in skeletal muscle.....	00
3.1. $\beta$ 2-Adrenergic receptor.....	00
3.2. $\text{G}\alpha_s$ -dependent signalling.....	00
3.2.1. cAMP/PKA/CREB pathway.....	00
3.2.2. cAMP/Epac/Rap pathway.....	00
3.3. $\text{G}\alpha_i$ -dependent signalling.....	00
4. $\beta$ 2-Agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders.....	00
4.1. Neuromuscular diseases.....	00
4.1.1. Duchenne muscular dystrophy (DMD).....	00
4.1.2. Fascioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD).....	00
4.1.3. Central core and mini core diseases.....	00
4.1.4. Merosin deficient congenital muscular dystrophy.....	00
4.1.5. Myasthenia gravis.....	00
4.1.6. Spinal muscular atrophy (SMA).....	00

<sup>☆</sup> This article is part of a Directed Issue entitled: Molecular basis of muscle wasting.

\* Corresponding author at: Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Faculté de Médecine, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint Etienne Cedex 2, France.  
Tel.: +33 4 77 42 14 77; fax: +33 4 77 42 14 78.

E-mail address: [damien.freyssenet@univ-st-etienne.fr](mailto:damien.freyssenet@univ-st-etienne.fr) (D.G. Freyssenet).



4.1.7.	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) .....	00
4.1.8.	Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) .....	00
4.1.9.	Spinal cord injury (SCI) .....	00
4.1.10.	Acid $\alpha$ -glucosidase deficiency (Pompe disease or glycogen storage disease type II) .....	00
4.2.	Chronic diseases and diseases associated with long-term impairment in muscle function .....	00
4.2.1.	Cancer cachexia .....	00
4.2.2.	Chronic heart failure .....	00
4.2.3.	Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) .....	00
4.2.4.	Stroke .....	00
4.2.5.	Sepsis .....	00
4.2.6.	Thermal injury (hyperthermia, burn) .....	00
5.	Limitation of the use of $\beta$ 2-agonists for therapeutic purposes in muscle wasting disorders .....	00
6.	Concluding remarks – future directions .....	00
	Acknowledgments .....	00
	References .....	00

## 1. Introduction

Muscle wasting is a serious complication of various clinical conditions including neuromuscular diseases, cancer, chronic heart failure, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), HIV-acquired immunodeficiency syndrome, stroke, and sepsis. Muscle wasting can significantly impair patient recovery and/or worsens the prognosis of the illnesses. For instance, muscle wasting, and the resulting loss of skeletal muscle mass and force, is associated with an increased surgical risk, as well as a significant decrease in the response to chemotherapy and radiotherapy treatments in cancer patients (MacDonald et al., 2003). In COPD patients, muscle wasting is of poor prognostic and increases the mortality of patients (Garcia-Aymerich et al., 2006; Marquis et al., 2002). Although not curative, strategies aimed at limiting skeletal muscle wasting have thus important clinical implications and would ameliorate patient life quality and enhance the effectiveness of curative therapies.

Synthetic  $\beta$ 2-adrenoceptor agonists ( $\beta$ 2-agonists) are derived from the chemical structure of adrenaline, and are traditionally used for the treatment of bronchospasm associated with asthma and the treatment of symptomatic patients with COPD. Based on their bronchodilatory properties, they are generally classified as short-acting  $\beta$ 2-agonists (clenbuterol, fenoterol, salbutamol, also named albuterol) with 3- to 6-h duration of action, long-acting  $\beta$ 2-agonists (formoterol, salmeterol) with 12 h duration of action and ultra long-acting  $\beta$ 2-agonists (indacaterol) with 24 h duration of action (Battram et al., 2006; Ringdal et al., 1998; van Noord et al., 1996).  $\beta$ 2-Agonists are also powerful anabolic agents that trigger skeletal muscle hypertrophy. Investigating the effects of  $\beta$ 2-agonists in skeletal muscle over the past 30 years has clearly demonstrated the rational for the use of  $\beta$ 2-agonists in the treatment of muscle wasting. This review examines the molecular mechanisms triggered by  $\beta$ 2-agonists to attenuate muscle wasting, and the potential interest of  $\beta$ 2-agonist administration for the treatment of muscle wasting in different animal models and human pathologies.

## 2. Effects of $\beta$ 2-agonists on skeletal muscle mass, fibre type composition and force

### 2.1. Effects of $\beta$ 2-agonists on skeletal muscle mass

In 1981, the anabolic effect of isoproterenol, a  $\beta$ -adrenergic receptor agonist, on skeletal muscle was first described (Deshaies et al., 1981). The specific effects of  $\beta$ 2-agonists were then conjointly reported in 1984 in broilers (Dalrymple et al., 1984), lambs (Baker et al., 1984) and rats (Emery et al., 1984), and largely repeated and extended to multiple animal species (see Lynch and Ryall, 2008; Mersmann, 1998 for reviews). Gain in skeletal muscle mass

in mouse and rat ranges from 10% to 30% in *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* and *tibialis anterior* muscles (Bozzo et al., 2003; Bricout et al., 2004; Dodd et al., 1996; Lynch et al., 1996, 1999; MacLennan and Edwards, 1989; Oishi et al., 2002; Reeds et al., 1986; Ricart-Firinga et al., 2000; Ryall et al., 2002, 2007; Soic-Vranic et al., 2005; Stevens et al., 2000; Zeman et al., 1987, 1988) (see also Table 1). Disparities between studies rely on several factors, such as the chemical structure of the  $\beta$ 2-agonist (Harcourt et al., 2007), the dose used (Ryall et al., 2006), the duration of the treatment (Koopman et al., 2010), and the route of administration (Moore et al., 1994).  $\beta$ 2-Agonists have also been successfully used to attenuate or reverse skeletal muscle mass loss induced by different experimental settings, including hind-limb unloading (Babij and Booth, 1988; Bozzo et al., 2003; Delday and Maltin, 1997; Herrera et al., 2001; Kline et al., 2007; Ricart-Firinga et al., 2000; Stevens et al., 2000; Yimlamai et al., 2005) and denervation (Agbenyega and Wareham, 1990; Babij and Booth, 1988; Goncalves et al., 2012; Kline et al., 2007; Sneddon et al., 2000), thus illustrating the therapeutic potential of  $\beta$ 2-agonists to combat muscle wasting in a clinical context.

### 2.2. Effects of $\beta$ 2-agonists on skeletal muscle fibre type

Skeletal muscle hypertrophy induced by  $\beta$ 2-agonists, is associated with changes in the composition of skeletal muscle fibre type. Numerous studies have described a decrease in the proportion of slow-twitch fibres and a concomitant increase in the proportion of fast-twitch fibres in rat skeletal muscle in response to  $\beta$ 2-agonist administration (see Table 1 for a selection of studies regarding the effects of  $\beta$ 2-agonists on skeletal muscle fibre type). This slow-to-fast muscle fibre transition is particularly pronounced in the typical slow-twitch *soleus* muscle (Bricout et al., 2004; Dodd et al., 1996; Oishi et al., 2002; Ryall et al., 2002; Soic-Vranic et al., 2005; Zeman et al., 1988). Although a number of signalling pathways have been involved in activity-dependent changes of skeletal muscle fibre type (see Schiaffino and Reggiani, 2011 for review), the molecular basis of muscle fibre transition in response to  $\beta$ 2-agonist administration remains to be established.

### 2.3. Effects of $\beta$ 2-agonists on skeletal muscle force

In agreement with the increase in skeletal muscle mass, administration of  $\beta$ 2-agonists increases maximal isometric force production of skeletal muscle by about 15–20% (Beitzel et al., 2004; Harcourt et al., 2007; Lynch et al., 1999). Interestingly, this increase in force-producing capacity of skeletal muscle persists several weeks after cessation of the treatment (Ryall et al., 2007). However, normalized force (specific skeletal muscle force) remains unchanged, suggesting that the force-producing capacity

**Table 1**  
A selection of studies that have examined the anabolic effects of  $\beta$ 2-agonists in rat skeletal muscle.

$\beta$ 2-Agonists	Dose	Administration	Duration	Muscle weight	Fibre CSA		Fibre type distribution				References
					Type I	Type II	Type I	Type IIa	Type IIx	Type IIb	
Clenbuterol	0.6 mg/day	Oral (water)	2 weeks	n.s. ( <i>soleus</i> )	n.d.		95 \ 67%	5 / 25%	0 / 4%	0 / 3%	Ricart-Firinga et al. (2000)
Clenbuterol	0.6 mg/day	Oral (water)	2 weeks	+18% ( <i>soleus</i> )	n.d.		95 \ 73%	5 / 22%	0 / 3%	0 / 2%	Bozzo et al. (2003)
Clenbuterol	0.6 mg/day	Oral (water)	2 weeks	+9% ( <i>soleus</i> )	n.d.		95 \ 72%	5 \ 23%	0 / 3%	0 / 2%	Stevens et al. (2000)
				+16% (EDL)	n.d.		n.c. (4%)	n.c. (12%)	n.c. (28%)	n.c. (56%)	
				+20% (GAS)	n.d.		n.c. (16%)	22 \ 13%	n.c. (28%)	n.c. (40%)	
				n.s. ( <i>soleus</i> )	n.s.	+11%	n.c. (68%)		n.c. (32%)		
Clenbuterol	1.6 mg/day	Oral (water)	4 weeks	n.s. ( <i>soleus</i> )	n.d.		n.d.		n.d.		Zeman et al. (1988)
			8 weeks	n.s. ( <i>soleus</i> )	ns	+17%	68 \ 46%		32 / 54%		
			12 weeks	+25 ( <i>soleus</i> )	+9%	+40%	88 \ 63%		12 / 37%		
			2 weeks	+23% (EDL)	+12%	+63%	n.c. (99%)		n.c. (1%)		
			4 weeks	+24% (EDL)	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.		
			8 weeks	n.d. (EDL)	+53%	+56%	n.c. (99%)		n.c. (2%)		
			12 weeks	+18% (EDL)	+36%	+23%	n.c. (98%)		n.c. (2%)		
			4 weeks	+27%	n.s.	+63%	93 \ 79%		7 / 21%		
Clenbuterol	4 mg/kg/day	Oral (water)	4 weeks	+27% ( <i>soleus</i> )	n.s.	+90%	99 \ 68%		1 / 32%	Oishi et al. (2002)	
Clenbuterol	2 mg/kg/day	Oral (gavage)	4 weeks	+17% ( <i>soleus</i> )	n.d.		93 \ 84%	7 / 11%	0 / 2%	0 / 3%	Bricout et al. (2004)
Clenbuterol	2 mg/kg/day	Subcutaneous	2 weeks	+16% ( <i>plantaris</i> )	n.d.		n.c. (3%)	n.c. (16%)	n.c. (40%)	n.c. (42%)	Dodd et al. (1996)
				+18% (GAS)	n.d.		n.c. (8%)	n.c. (11%)	n.c. (32%)	n.c. (48%)	
Clenbuterol	2 mg/kg/day	Intraperitoneal	4 weeks	+20% (EDL)	+12%	+9%	n.c. (3%)	n.c. (15%)	n.c. (39%)	n.c. (43%)	Ryall et al. (2002)
Fenoterol	2.8 mg/kg/day	Intraperitoneal	4 weeks	+27% (EDL)	+34%	+31%	n.c. (3%)	18 \ 14%	n.c. (40%)	n.c. (40%)	Ryall et al. (2002)
				+26% ( <i>soleus</i> )	n.s.	+22%	82 \ 72%	13 / 22%	n.c. (5%)	n.d.	
Formoterol	25 $\mu$ g/kg	Intraperitoneal	4 weeks	+23% (EDL)	+50%	+32%	n.c. (3%)	21 \ 10%	n.c. (40%)	37 / 45%	Ryall et al. (2007)
				n.s. ( <i>soleus</i> )	n.s.	+20%	94 \ 88%	5 / 10%	n.c. (2%)	n.d.	
					+13%	+14%	90 \ 83%		10 / 17%		
Salbutamol	2 $\times$ 0.3 mg/kg/day	Intraperitoneal	3 days		+18%	n.s.	90 \ 85%		10 / 15%		Soic-Vranic et al. (2005)
			6 days	n.d.	+13%	n.s.	90 \ 86%		10 / 14%		
			9 days	( <i>soleus</i> )	n.s.	+9%	90 \ 83%		10 / 17%		
			12 days		n.s.	+8%	90 \ 79%		10 / 21%		

CSA, cross-sectional area; EDL, extensor digitorum longus; GAS, gastrocnemius; n.c., not changed; n.d., not determined; n.s., non significant; /, significantly increased; \, significantly decreased.

in response to  $\beta$ 2-agonist administration is mainly a muscle mass effect (Beitzel et al., 2004; Harcourt et al., 2007; Lynch et al., 1999). Furthermore, an increase in collagen deposition in the perimysium of skeletal muscle has been reported in response to  $\beta$ 2-agonist administration in mouse (Kumar and Sharma, 2006; Patiyal and Katoch, 2006), which could alter the contractile properties of skeletal muscle. It has also been reported a decrease in capillary density (Suzuki et al., 1997) and skeletal muscle blood flow (Beitzel et al., 2004; Rothwell et al., 1987), which may collectively increase the diffusion distance for oxygen, reduce oxygen supply to skeletal muscle, and increase muscle fatigability during prolonged contractile activity. Therefore, and although  $\beta$ 2-agonist administration clearly increases maximal isometric force production of skeletal muscle, some adverse effects could be detrimental for the exercise capacity of skeletal muscle, particularly in a pathological context.

### 3. Molecular mechanisms involved in the hypertrophy and anti-atrophy effects of $\beta$ 2-agonists in skeletal muscle

Administration of  $\beta$ 2-agonists in rat has been shown to increase protein synthesis (Emery et al., 1984; Maltin et al., 1989; Navegantes et al., 2004) and to decrease protein degradation (Busquets et al., 2004; Navegantes et al., 2001), resulting in a net increase in myofibrillar protein content (Choo et al., 1992; Yimlamai et al., 2005). In support of these data, molecular evidences indicate that  $\beta$ 2-agonist administration activates phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway (Kline et al., 2007; Koopman et al., 2010; Sneddon et al., 2001), a crucial signalling pathway involved in the control of skeletal muscle mass via the regulation of translation initiation (Bodine et al., 2001b), and reduces the expression of *muscle atrophy F-box (MAFbx)/atrogin-1* and *Muscle-RING finger protein (MuRF) 1* (Kline et al., 2007; Koopman et al., 2010), two atrophy-related genes (Bodine et al., 2001a; Gomes et al., 2001; Rommel et al., 2001) involved in the control of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis. The question therefore arises about the precise signalling mechanisms triggered by  $\beta$ 2-agonists to regulate protein synthesis and degradation in skeletal muscle.

#### 3.1. $\beta$ 2-Adrenergic receptor

$\beta$ 2-Adrenergic receptor ( $\beta$ 2-adrenoceptor) belongs to the G protein coupled receptor family, characterized by a conserved structure of 7 transmembrane  $\alpha$ -helices (for review, see Lynch and Ryall, 2008). Experiments conducted in mice lacking  $\beta$ 1-adrenoceptor,  $\beta$ 2-adrenoceptor, or both, have clearly shown that  $\beta$ 2-adrenoceptor is responsible for the hypertrophy and anti-atrophy effects of  $\beta$ 2-agonists (Hinkle et al., 2002).  $\beta$ 2-Adrenoceptor represents the vast majority of  $\beta$ -adrenoceptors at the cell surface membrane in skeletal muscle. Slow-twitch *soleus* muscle in rat contains 80–85% of  $\beta$ 2-adrenoceptor and 15–20% of  $\beta$ 1-adrenoceptor, whereas fast-twitch *plantaris* muscle contains an almost pure population of  $\beta$ 2-adrenoceptor (Kim et al., 1991). Slow-twitch skeletal muscles have a higher density of  $\beta$ 2-adrenoceptor than fast-twitch skeletal muscles, as shown by radioligand binding assay (Kim et al., 1991; Ryall et al., 2002, 2006; Williams et al., 1984), even if this has been recently challenged by western blot technic (McCormick et al., 2010). Paradoxically, fast-twitch skeletal muscle appears to be more responsive to  $\beta$ 2-agonist stimulation than slow-twitch skeletal muscles (Kline et al., 2007; Ryall et al., 2002, 2006). Although the reason for the difference in  $\beta$ 2-adrenoceptor sensibility between slow- and fast-twitch skeletal muscles is not yet fully understood, this could be partly explained by rapid dampening of receptor function by phosphorylation in slow-twitch skeletal muscle (McCormick et al., 2010).

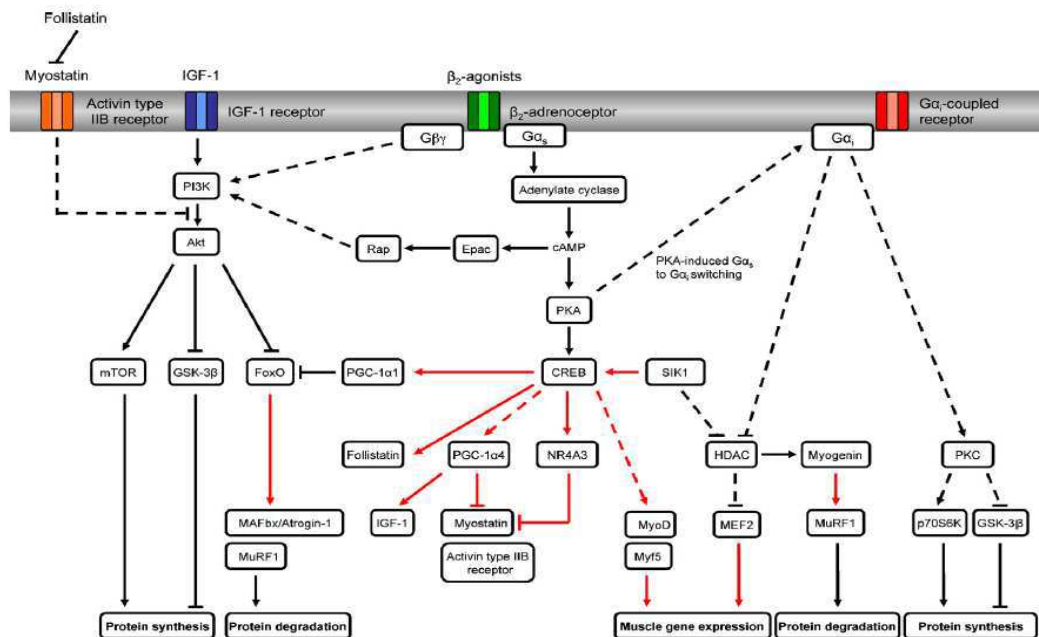
#### 3.2. $G\alpha_s$ -dependent signalling

$\beta$ 2-Agonist stimulation activates the guanine nucleotide exchange factor domain of  $\beta$ 2-adrenoceptor causing the exchange of GDP for GTP at the  $\alpha$  stimulatory subunit of guanine nucleotide-binding regulatory protein ( $G\alpha_s$ ) and the subsequent dissociation of  $G\alpha_s$  from the tightly associated  $\beta$  and  $\gamma$  subunits ( $G\beta\gamma$ ). The importance of  $G\alpha_s$ -mediated signalling in the control of skeletal muscle mass is clearly illustrated by the observation that  $G\alpha_s$ -deficient mice have smaller myofibres than control littermates (Chen et al., 2009).  $G\alpha_s$ -bound GTP activates membrane bound adenylate cyclase, which converts ATP to cAMP (Fig. 1). Studies aimed at modulating cAMP concentration in skeletal muscle cells have clearly shown the relevance of cAMP-dependent signalling in the regulation of skeletal muscle mass (see Berdeaux and Stewart, 2012 for a detailed review of cAMP-dependent signalling in skeletal muscle). Inhibition of phosphodiesterase 4, an enzyme responsible for the hydrolysis (degradation) of cAMP, reduces loss of skeletal muscle mass and force induced by denervation and casting in rats and mice (Hinkle et al., 2005). Similarly, phosphodiesterase inhibitors and dibutyryl-cAMP, a cell permeable cAMP analogue, also induces proteolysis inhibition in rat skeletal muscle (Baviera et al., 2007; Lira et al., 2007; Navegantes et al., 2000). In addition, von Maltzahn et al. (2012) recently provided evidence that  $G\alpha_s$  could directly activate PI3K. Activation of frizzled (Fzd) 7, another member of G protein coupled receptor family, induced hypertrophy of rodent myotubes via the activation of PI3K-Akt-mTOR pathway and inhibition of FoxO transcription factors (von Maltzahn et al., 2012). FoxO transcription factors are critical activators of ubiquitin proteasome and autophagy lysosome pathways (Mammucari et al., 2007; Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004; Zhao et al., 2007). Although this study was conducted on Fzd7 receptor, this opens the possibility that other 7-transmembrane domain receptors, like  $\beta$ 2-adrenoceptor, could also directly activate PI3K via  $G\alpha_s$  to trigger skeletal muscle hypertrophy.

##### 3.2.1. cAMP/PKA/CREB pathway

The major effector of cAMP in skeletal muscle is protein kinase A (PKA) (Fig. 1). Binding of cAMP on PKA regulatory subunits, leads to the release of PKA catalytic subunits, which then drive cAMP response element binding protein (CREB) phosphorylation on Ser133. CREB phosphorylation occurs rapidly in skeletal muscle in response to  $\beta$ 2-adrenoceptor administration (Koopman et al., 2010). Several hundred of genes contain cAMP response elements, and are thus potential targets of CREB (Zhang et al., 2005). However, this has to be minimized as CREB stimulates gene expression with a number of coactivators and that cAMP response elements often cosegregate with sites for other activators (Zhang et al., 2005).

Loss- and gain-of function studies have clearly established a key role for CREB in the regulation of skeletal muscle mass. CREB null mutant mice exhibit strong myogenic defects with reduced expression of myogenic transcription factors MyoD and Myf5 during embryogenesis (Chen et al., 2005) (Fig. 1). CREB also stimulates retinoblastoma protein promoter activity, together with MyoD, to induce the differentiation of myoblasts into myotubes (Magenta et al., 2003). In agreement with these data, Berdeaux et al. showed that mice expressing a dominant-negative CREB transgene exhibited a dystrophic phenotype along with reduced myocyte enhancer factor (MEF) 2 activity (Berdeaux et al., 2007). They further showed that CREB stimulated a myogenic programme by triggering the expression of the Ser/Thr kinase salt induced kinase (SIK) 1 (Berdeaux et al., 2007). SIK1 phosphorylates and inhibits HDAC 5, thus enhancing the promotion of MEF2 target genes (Berdeaux et al., 2007) (Fig. 1). Altogether, these studies point to an important role of CREB in the control of muscle gene expression that is more specifically related to the differentiation of skeletal



**Fig. 1.** A model for  $G\alpha_s$ -,  $G\alpha_i$ -, and  $G\beta\gamma$ -mediated signalling in skeletal muscle. See text for details. Dotted lines describe pathways whose molecular mechanisms and/or role in adult skeletal muscle have yet to be completely defined. Red arrows indicate a transcriptional regulation. CREB: cAMP response element binding protein; Epac: exchange protein activated by cAMP; FoxO: forkhead transcription factor; G: guanine nucleotide-binding regulatory protein;  $G\alpha_i$ :  $\alpha$  inhibitory subunit of G protein;  $G\alpha_s$ :  $\alpha$  stimulatory subunit of G protein;  $G\beta$ :  $\beta$  subunit of G protein;  $G\gamma$ :  $\gamma$  subunit of G protein; GSK: glycogen synthase kinase; HDAC: histone deacetylase; IGF: insulin-like growth factor; MAFbx: muscle atrophy F-box/atrogin; MEF: myocyte enhancer factor; mTOR: mammalian target of rapamycin; MuRF: muscle RING-finger protein; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; NR: nuclear receptor; PGC: peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator; PKA: cAMP-dependent protein kinase A; PKC: protein kinase C; Rap: Ras-related protein; SIK: salt induced kinase.

muscle cells. It remains to determine whether such a mechanism would be relevant to trigger muscle specific gene expression and contribute to the hypertrophy effect of  $\beta_2$ -agonists in adult skeletal muscle.

In differentiated C2C12 myotubes, CREB interacts with MyoD on *folliculin* promoter, thus promoting *folliculin* gene expression (Iezzi et al., 2004) (Fig. 1). *Folliculin* has been shown to induce skeletal muscle hypertrophy, notably by inhibiting myostatin activity (Gilson et al., 2009). Importantly, myostatin overexpression has been shown to decrease muscle gene expression (Durieux et al., 2007) and negatively regulate PI3K-Akt-mTOR pathway (Amirouche et al., 2009; Trendelenburg et al., 2009), whereas deletion of *myostatin* gene in mice blunts the induction of MuRF1, MAFbx/atrogin-1, and FoxO3a expression and limits muscle wasting induced by dexamethasone administration (Gilson et al., 2007). Modulation of myostatin activity by *folliculin* could therefore contribute to the hypertrophy and anti-atrophy effects of  $\beta_2$ -agonists. Furthermore, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator (PGC)-1 $\alpha$ 4, a truncated form of PGC-1 $\alpha$  (now called PGC-1 $\alpha$ 1) whose expression is increased in response to clenbuterol administration (Ruas et al., 2012), was found to repress the expression of myostatin and activin type IIB receptor, a high affinity receptor for myostatin (Lee and McPherron, 2001), in cultured myotubes (Ruas et al., 2012). PGC-1 $\alpha$ 4 also increases the expression of insulin-like growth factor (IGF)-1, a mediator of skeletal muscle hypertrophy through the activation of PI3K-Akt-mTOR pathway (Rommel et al., 2001). *In vivo*, transgenic expression of PGC-1 $\alpha$ 4 in skeletal muscle increases muscle mass and strength, and confers resistance to the muscle wasting of cancer cachexia (Ruas et al., 2012).  $\beta_2$ -Agonist-induced expression of PGC-1 $\alpha$ 4 thus coordinates the expression of key regulators of skeletal muscle mass (Fig. 1). It remains to determine whether PGC-1 $\alpha$ 4 is a CREB target gene.

PGC-1 $\alpha$ 1 is a CREB target gene in C2C12 myotubes (Handschin et al., 2003) and PGC-1 $\alpha$ 1 expression is increased in mouse skeletal muscle in response to formoterol administration (Pearen et al., 2008). Elevated expression of PGC-1 $\alpha$ 1 in skeletal muscle, either in transgenic mice overexpressing PGC-1 $\alpha$ 1 or by PGC-1 $\alpha$ 1 gene transfer, limits muscle wasting in different experimental settings, including ageing (Wenz et al., 2009), chronic heart failure (Geng et al., 2011), denervation (Sandri et al., 2006) and fasting (Sandri et al., 2006). This effect is mediated by PGC-1 $\alpha$ 1 interaction with FoxO3 transcription factor, which reduces the capacity of FoxO3 to transcribe *MAFbx/atrogin-1* and *MuRF1* promoters (Brault et al., 2010; Sandri et al., 2006) and to cause muscle fibre atrophy (Sandri et al., 2006). Accordingly, PGC-1 $\alpha$ 1 overexpression in myotubes inhibits the ubiquitin-proteasome- and autophagy-lysosome-dependent proteolysis (Brault et al., 2010). Therefore,  $\beta_2$ -agonist-induced expression of PGC-1 $\alpha$ 1, together with that of PGC-1 $\alpha$ 4, must largely contribute to explain the hypertrophy and anti-atrophy effects of  $\beta_2$ -agonists (Fig. 1).

Another CREB target gene that can play an important role in mediating the hypertrophy and anti-atrophy effects of  $\beta_2$ -agonists is the orphan nuclear receptor (NR) 4A3 (also called NOR1) (Fass et al., 2003). NR4A3, whose expression is increased in response to  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation (Pearen et al., 2008), decreases myostatin expression (Pearen et al., 2006) and may thus further contribute to reduce myostatin signalling (Fig. 1).

$\beta_2$ -Agonist administration has also been shown to inhibit  $Ca^{2+}$ -activated proteases, calpains (Forsberg et al., 1989; Navegantes et al., 2001). This could occur through CREB-induced expression of the calpain inhibitor calpastatin, as *calpastatin* gene promoter is responsive to cAMP in bovine (Cong and Goll, 1998) and porcine (Sensky et al., 2006).

### 3.2.2. cAMP/Epac/Rap pathway

Exchange protein activated by cAMP (Epac) 1 and 2 are also activated by cAMP (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). Epac proteins function as a guanine exchange factor activated by cAMP for Ras-related protein (Rap) 1 and 2, members of the Ras family of small G proteins that cycle between an inactive GDP-bound state and active GTP-bound state (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). The effects of Epac1, the main isoform in skeletal muscle (Kawasaki et al., 1998), have been recently investigated with the use of 8-(4-chlorophenylthio)-2-O-methyladenosine-3,5-cAMP (also called 007), an Epac-specific cAMP analogue (Enserink et al., 2002). 007 potentiates Akt phosphorylation stimulated by insulin in rat soleus muscle, as adrenaline does (Brennesvik et al., 2005), suggesting that Epac may mediate crosstalk between  $\beta$ 2-adrenoceptor and PI3K-Akt-mTOR pathway. More recently, it was also shown that incubation of rat *extensor digitorum longus* muscle with 007 activated Akt, inhibited its downstream target FoxO3a, and reduced proteolysis (Baviera et al., 2010). Therefore, the anabolic effect of  $\beta$ 2-agonists could also occur through a cAMP/Epac/Rap pathway that could regulate protein synthesis and degradation through the regulation of PI3K-Akt-mTOR pathway. However, genetic loss-of-function studies are now clearly required to further delineate Epac function in skeletal muscle and its physiological relevance in response to  $\beta$ 2-agonist administration.

### 3.3. $G\alpha_i$ -dependent signalling

$\beta$ 2-Adrenoceptors primarily couple to  $G\alpha_s$ , but they can also transduce signals through the  $\alpha$  inhibitory subunit of guanine nucleotide-binding regulatory protein ( $G\alpha_i$ )- $G\beta\gamma$  complex in rat soleus muscle (Gosmanov et al., 2002). Previous studies have shown that  $\beta$ 2-adrenoceptor utilized  $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$  to activate extracellular signal-regulated kinases (ERK) in HEK293 cells (Daaka et al., 1997; Shenoy et al., 2006) and PI3K-Akt-mTOR pathway in cardiomyocytes (Zhu et al., 2001). In agreement with these findings,  $\beta$ 2-agonists promote hypertrophy and anti-atrophy effects with concomitant activation of ERK1/2 signalling pathway (Shi et al., 2007) and PI3K-Akt-mTOR pathway (Kline et al., 2007). It is therefore tempting to speculate that  $\beta$ 2-adrenoceptor coupling to  $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$ , could activate ERK1/2 signalling pathway and PI3K-Akt-mTOR pathway in skeletal muscle in response to  $\beta$ 2-agonist administration. However, additional experiments are required to determine whether ERK1/2 and PI3K-Akt-mTOR pathways are linked to  $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$  coupling with  $\beta$ 2-adrenoceptor in skeletal muscle.

A recent study by Minetti et al. further supports the concept that additional  $G\alpha_i$ -linked pathway could also mediate the hypertrophy effect of  $\beta$ 2-agonists. They showed that a constitutive active  $G\alpha_{i2}$  mutant stimulated myofibre hypertrophy *in vitro* and *in vivo* in a protein kinase C-dependent manner via the activation of p70S6K and inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (Minetti et al., 2011), two downstream effectors of Akt involved in the control of skeletal muscle mass (Bodine et al., 2001b). Furthermore, a constitutive active  $G\alpha_{i2}$  also reversed myotube atrophy induced by TNF- $\alpha$  by inhibiting histone deacetylase (HDAC) activity, and the subsequent repression of genes encoding *MuRF1* and *myogenin* (Minetti et al., 2011), an inducer of atrophy in adult skeletal muscle (Moresi et al., 2010) (Fig. 1). Interestingly, a previous study in HEK293 cells demonstrated that in response to  $\beta$ 2-adrenoceptor stimulation, PKA-mediated phosphorylation of the receptor serves to switch its coupling specificity from  $G\alpha_s$  to  $G\alpha_i$ , and induces the activation of  $G\beta\gamma$  to initiate a new set of signalling events (Daaka et al., 1997). Whether such a dynamic coupling between  $\beta$ 2-adrenoceptor and  $G\alpha_s$  and  $G\alpha_i$  subunits is functional in skeletal muscle is currently unknown, but this provides a simple model to

explain  $\beta$ 2-adrenoceptor-coupling to  $G\alpha_i$  and changes in signalling specificity of the receptor.

## 4. $\beta$ 2-Agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders

In this section, we will review the anti-atrophy effects of  $\beta$ 2-agonist administration in several animal models and human pathologies associated with or leading to skeletal muscle wasting. The effect of  $\beta$ 2-agonist on muscle wasting associated with healthy ageing will not be discussed in this section. The reader can refer to Lynch and Ryall (2008) for a detailed analysis of  $\beta$ 2-agonist administration in this condition.

### 4.1. Neuromuscular diseases

Muscle atrophy and weakness are common features of a number of neuromuscular diseases. Despite differences between molecules,  $\beta$ 2-agonists have shown some effectiveness with significant benefits in skeletal muscle mass and strength. Interestingly,  $\beta$ 2-agonists can also exert therapeutic effects through the expression of genes not directly involved in skeletal muscle anabolism (see Pompe disease and spinal muscular atrophy). Of course the cure for neuromuscular diseases will mainly come from gene therapies, but alternative therapies, such as  $\beta$ 2-agonist administration could be useful to attenuate the severity and progression of muscle wasting and enhance the quality of life for these patients.

#### 4.1.1. Duchenne muscular dystrophy (DMD)

DMD is a recessive severe X-linked progressive myopathy due to mutations in the *dystrophin* gene, which leads to skeletal muscle degeneration (Deconinck and Dan, 2007). Despite some discrepancies (Lynch et al., 1999, 2000), most of studies report that  $\beta$ 2-agonist administration increases skeletal muscle mass and absolute force in *mdx* mouse, the mouse model of DMD (Dupont-Versteegden, 1996; Gehrig et al., 2010; Harcourt et al., 2007; Hayes and Williams, 1998; Lynch et al., 2001a; Rothwell and Stock, 1985). However, skeletal muscle specific force is not increased in response to clenbuterol administration (Dupont-Versteegden et al., 1995; Lynch et al., 2000; Rothwell and Stock, 1985). Similarly, clenbuterol administration failed to demonstrate any benefit for the function of diaphragm muscle, also affected in DMD (Lynch et al., 2001b). Moreover, an increase in muscle fatigability has been reported in lower limb skeletal muscles and diaphragm in response to clenbuterol administration (Dupont-Versteegden et al., 1995). However, more recent molecules, such as formoterol, improve morphological and functional properties of skeletal muscle and diaphragm muscle of *mdx* mice, without any increase in muscle fatigue (Harcourt et al., 2007).

A clenbuterol treatment has also been shown to greatly reduce degeneration of dystrophic *plantaris* muscle of *mdx* mouse, together with a reduction in necrotic fibres and associated fibrosis, thus leading to an overall improvement in muscle histological appearance (Zeman et al., 2000). This suggests that  $\beta$ 2-agonists could antagonize the degenerative process occurring in *mdx* mice through the regulation of myogenic precursor cells. Accordingly, structural and functional recovery of rat skeletal muscles after myotoxic injection is improved in response to  $\beta$ 2-agonist administration (Beitzel et al., 2004, 2007; Bricout et al., 2004), together with increased in  $\beta$ 2-adrenoceptor density (Beitzel et al., 2007). This could be surprising as a number of studies have established that  $\beta$ 2-agonist administration promoted skeletal muscle hypertrophy at a constant DNA amount (Maltin et al., 1989; Nash et al., 1994; O'Connor et al., 1991), i.e. without recruitment and differentiation of myogenic precursor cells. Altogether, these data indicate that  $\beta$ 2-agonists may exert a

beneficial role in dystrophic muscle by regulating the activity of myogenic precursor cells.

In human patients with DMD and Becker muscular dystrophy, clinical trials have been performed with salbutamol (8–12 mg/day for 12 or 28 weeks) (Fowler et al., 2004; Skura et al., 2008). Both studies showed small, but significant gains in skeletal muscle mass and force. Importantly no side effects were reported in these studies. Overall these data indicate that  $\beta$ 2-agonists represent a promising therapy for treating muscle wasting and weakness associated with DMD.

#### 4.1.2. Fascioscapulothoracic muscular dystrophy (FSHD)

FSHD is an autosomal dominant muscular dystrophy associated with the deletion of integral copies of a tandem repeated 3.2 kb unit (D4Z4 repeat) on chromosome 4 (Wijmenga et al., 1992). Clinical symptoms usually appear during the second decade and are characterized by progressive muscle weakness, initially of the facial, scapular and humeral muscles. Salbutamol treatment (16 or 32 mg/day for 23 weeks) of a small cohort of patients increases skeletal muscle mass, whereas muscle strength remains unchanged (Kissel et al., 1998, 2001). Importantly, both studies point to the transient benefit of such a treatment. Indeed, muscle mass returned to baseline when the treatment was stopped. Addition of a strength-training programme did not show any synergistic effects to the administration of  $\beta$ 2-agonist (van der Kooij et al., 2004, 2007).

#### 4.1.3. Central core and mini core diseases

Central core disease is a congenital autosomal dominant myopathy that is non, or slowly, progressive presenting with muscle weakness. The pathology has been associated with mutations in skeletal muscle *ryanodine receptor 1* gene (Quinlivan et al., 2003). Central core and multi mini core arise from unstructured myofibrils that are depleted of mitochondria. Salbutamol treatment (8 mg/day for 3, 6 and 12 months) of patients with central core or multi mini core diseases leads to a significant increase in muscle mass (Messina et al., 2004; Schreuder et al., 2010). No side effect of salbutamol has been detected (Schreuder et al., 2010). Interestingly, motor tasks, speech and writing capacities were also improved, suggesting that  $\beta$ 2-agonists, in addition to the peripheral action in skeletal muscle, may also exert a central action (Messina et al., 2004; Schreuder et al., 2010).

#### 4.1.4. Merosin deficient congenital muscular dystrophy

Merosin deficient congenital muscular dystrophy is a severe form of congenital muscular dystrophy with generalized muscle weakness and delayed motor milestones (Allamand and Guicheney, 2002). Merosin deficient congenital muscular dystrophy is characterized by an absence of laminin  $\alpha$ 2 chain (formerly named merosin) around muscle fibres (Helbling-Leclerc et al., 1995). Clenbuterol treatment of *dy/dy* mice (2 mg/kg/day for 3 weeks), a model of congenital muscular dystrophy, increased mass and force of *soleus* and *plantaris* muscle (Hayes and Williams, 1998). Clenbuterol treatment also reduced the natural death rate of dystrophic mice, an effect that could be attributed to an improvement in diaphragmatic function (Hayes and Williams, 1998).

#### 4.1.5. Myasthenia gravis

Myasthenia gravis is an autoimmune disease associated with muscle weakness, which affects the neuromuscular transmission and is characterized by the binding of autoantibodies to proteins involved in the neuromuscular junction, especially acetylcholine receptor (Conti-Fine et al., 2006). Administration of terbutaline in myasthenia gravis patients (2.5 mg daily for 2 weeks), in adjunction to specific therapy, increases skeletal muscle mass and strength (Soliven et al., 2009). However, this study did not report any change

in anti-acetylcholine receptor antibody level. Terbutaline was also well tolerated by the patients receiving multiple medications for myasthenia (Soliven et al., 2009). Similarly, salbutamol treatment in 2 myasthenia gravis patients (2 mg three times daily) remarkably improved muscle strength and daily activities (Sadeh et al., 2011). Once again, the 2 patients did not report adverse effects over periods of 6 and 12 months.

#### 4.1.6. Spinal muscular atrophy (SMA)

SMA is an autosomal recessive disease caused by a genetic defect in the *survival motor neuron (SMN) 1* gene (Brzustowicz et al., 1990; Lefebvre et al., 1995), although patients retain a copy of the closely related *SMN2* gene. Both genes encode SMN protein, but *SMN2* produces an insufficient level of functional protein due to exclusion of exon 7 in the vast majority *SMN2* transcript (Lorson et al., 1999). Reduced protein expression results in neuronal cell death and subsequent skeletal muscle wasting. Salbutamol treatment (2 mg three times daily for 3, 6 and 12 months) administered to SMA patients increases skeletal muscle mass and strength without obvious side effects (Kinali et al., 2002; Pane et al., 2008). Importantly, two studies recently demonstrated that salbutamol increases SMN protein level due to a rapid and significant increase in *SMN2* full-length transcript in fibroblasts (Angelozzi et al., 2008) and leucocytes (Tiziano et al., 2010) from SMA patients. In fact,  $\beta$ 2-agonist promotes inclusion of exon 7 in *SMN2* transcript, thereby increasing the amount of functional SMN protein. Clearly, these experiments provide a strong rationale to further investigate the clinical efficacy of salbutamol treatment in SMA patients. They also show that  $\beta$ 2-agonists can exert a therapeutic effect independently of the expression of genes directly involved in skeletal muscle anabolism.

#### 4.1.7. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

ALS is a disease characterized by rapidly progressive weakness, muscle atrophy and muscle spasticity. The precise cause of ALS is not clearly defined, but there is a known hereditary factor in the most common form of familial ALS due to mutation in *superoxide dismutase (SOD) 1* gene. Clenbuterol administration (1.5 mg/kg/day for 10 weeks) in the *SOD<sup>G93A</sup>* ALS mouse model induces a delayed onset of hind limbs symptoms, as assessed by rotarod performance, together with an increase in the median survival of *SOD<sup>G93A</sup>* mice (Teng et al., 2006). However, the number of healthy motor neurons in the ventral horn of spinal cord was not increased by the treatment. Similarly, in motor neuron degeneration (*Mnd*) mice, a mouse model considered to represent various neurodegenerative diseases including ALS, clenbuterol treatment (1 mg/kg/day for 12 weeks) limits the decrease in muscle mass and grip strength (Zeman et al., 2004). The treatment also reduced proportion of motor neurons with eccentric nuclei consistent with an improvement in synaptic function (Zeman et al., 2004).

#### 4.1.8. Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)

SBMA is a X-linked motor neuron disease that results from a particular type of mutation in the *androgen receptor* gene (La Spada et al., 1991). SBMA is characterized by muscle weakness and wasting due to degeneration of motor neurons in the brain stem and spinal cord. A recent trial in patients with a diagnosis of SBMA showed that clenbuterol treatment (0.04 mg/day for one year) improved the walking distance covered in 6 min (Querin et al., 2013). However, no increase in muscle strength was observed in this study.

#### 4.1.9. Spinal cord injury (SCI)

SCI refers to any injury of the spinal cord that is caused by trauma instead of disease. SCI is associated with marked skeletal muscle atrophy (Biering-Sorensen et al., 2009). Clenbuterol treatment in paraplegic mice reduces loss in muscle mass and muscle

G Model

BC-4086; No. of Pages 13

## ARTICLE IN PRESS

8 O.R. Joassard et al. / The International Journal of Biochemistry &amp; Cell Biology xxx (2013) xxx–xxx

fibre cross-sectional area (Ung et al., 2010). Clenbuterol treatment (1.6 mg/kg/day for 6 weeks) has also been shown to enhance locomotor recovery and to spare spinal cord tissue after spinal cord contusion injury (Zeman et al., 1999). Importantly, clenbuterol treatment exerts a neurogenic effect by promoting regrowth of supraspinal axons across the transection site after complete spinal cord transection (Bai et al., 2010). Therefore,  $\beta_2$ -agonist treatment in this situation may combine anabolic and neurogenic effects.

A clinical trial realized in 10 patients with spinal cord injury (C5, C6 or C7 levels) also demonstrated that oral intake (80 mg/day) of metaproterenol, a moderately selective  $\beta_2$ -agonist, for 4 weeks induced a significant increase in forearm muscle strength and area (Signorile et al., 1995). Similarly, clenbuterol administration (2  $\mu$ g/kg/day for 3 months) to patients with loss of innervation in the *biceps brachii* resulting from traumatic injury (C5/6, C5/6/7 or C5-T1) had beneficial effect with a reduction in type I and type II muscle fibre cross-sectional atrophy (Jiang et al., 2011).

#### 4.1.10. Acid $\alpha$ -glucosidase deficiency (Pompe disease or glycogen storage disease type II)

Acid  $\alpha$ -glucosidase deficiency is an autosomal recessive metabolic disorder, which progressively cause muscle weakness due to excessive glycogen accumulation in the lysosome (van der Ploeg and Reuser, 2008). Current treatment is based on an enzyme replacement therapy consisting in the administration of recombinant acid  $\alpha$ -glucosidase. In a murine model of Pompe disease (acid  $\alpha$ -glucosidase deficient mice), clenbuterol treatment (6 mg/l and 30 mg/l in drinking water) together with enzyme replacement therapy increases muscle mass and function, and reduces muscle glycogen content when compared to mice receiving enzyme replacement therapy alone (Koeberl et al., 2012; Li et al., 2013). Importantly, combination therapy ( $\beta_2$ -agonist and enzyme replacement therapy) increased expression of *cation-independent mannose-6-phosphate receptor* gene (Koeberl et al., 2012; Li et al., 2013), which mediates receptor-mediated uptake of recombinant acid  $\alpha$ -glucosidase. Therefore, adjunctive  $\beta_2$ -agonist treatment increases *cation-independent mannose-6-phosphate receptor* gene expression and may enhance efficacy of enzyme replacement therapy in Pompe disease patients.

Salbutamol treatment (8–12 mg/day for one year) of Pompe disease patients, receiving enzyme replacement therapy, significantly increases the performance of 4 functional tests (walking, climbing stairs, Gower's manoeuvre and rising from a chair) (Angelini et al., 2004).

#### 4.2. Chronic diseases and diseases associated with long-term impairment in muscle function

Chronic diseases are diseases of long duration and generally slow progression that can be controlled but not cured. Chronic diseases, such as heart disease, stroke, cancer and chronic respiratory diseases, are by far the leading cause of mortality in the world (World Health Organization). In these situations, muscle wasting significantly impairs patient recovery and/or worsens the prognosis of the illnesses. Other pathologies, which cannot be classified as chronic diseases, are also associated with long-term impairment in muscle function, and include sepsis and thermal injury. In most of these conditions,  $\beta_2$ -agonists provide therapeutic potential for attenuating or reversing loss of muscle mass and strength.

##### 4.2.1. Cancer cachexia

Cancer cachexia is a multifactorial paraneoplastic syndrome leading to a significant reduction in body weight, resulting predominantly in a loss of adipose tissue and skeletal muscle (Fearon

et al., 2012). Since the former studies by Chance et al. (1991a) and Stallion et al. (1991), numerous studies have investigated the effects of  $\beta_2$ -agonists in animal models of cancer cachexia. All of these studies have showed that  $\beta_2$ -agonists (cimaterol, clenbuterol, formoterol and salmeterol) attenuate and/or reverse skeletal muscle mass loss (Busquets et al., 2004, 2011; Carbo et al., 1997; Costelli et al., 1995a, 1995b; Fuster et al., 2007; Hyltander et al., 1993; Stallion et al., 1993, 1995), together with an improvement of skeletal muscle function and physical activity (Busquets et al., 2011). However, these effects may vary depending on the drugs, the most marked recovery being associated with clenbuterol compared to salbutamol and salmeterol (Carbo et al., 1997), as well as skeletal muscle phenotype, fast-twitch skeletal muscles being more responsive than slow-twitch skeletal muscles (Carbo et al., 1997). Clenbuterol can also exert a beneficial effect in combination with other anti-cachectic agents (Kenley et al., 2008; Piffar et al., 2003). In agreement with these observations,  $\beta_2$ -agonist administration has been shown to decrease muscle protein degradation (Busquets et al., 2004; Costelli et al., 1995a; Stallion et al., 1991) and increase muscle protein synthesis (Busquets et al., 2004; Stallion et al., 1995) in animal models of cancer cachexia. This anti-atrophy effect is further strengthened by a down-regulation in the expression of myostatin and activin type IIB receptor (Busquets et al., 2012a), and an increase in follistatin expression (Busquets et al., 2012a). Accordingly, strategies aimed at inhibiting myostatin signalling also attenuate muscle mass loss associated with cancer cachexia (Busquets et al., 2012b; Zhou et al., 2010). Finally, a reduction in skeletal muscle apoptosis has also been proposed as a contributing factor for the anti-atrophy effect of  $\beta_2$ -agonists (Busquets et al., 2004). Taken together, these data clearly illustrate the potential beneficial effects of  $\beta_2$ -agonist administration. Although well studied and promising for the treatment of muscle wasting in animal models of cancer cachexia,  $\beta_2$ -agonist treatment has not been considered in human cachectic patients.

##### 4.2.2. Chronic heart failure

Muscle wasting is a frequent co-morbidity factor among patients with chronic heart failure and contributes to reduced exercise capacity, muscle strength, and advanced disease (Fulster et al., 2013).  $\beta_2$ -Agonist treatment (clenbuterol, salbutamol) in patients with chronic heart failure has led to mitigated results. A 3-week salbutamol treatment increases respiratory muscle strength in patients with chronic heart failure (Harrington et al., 2000), but does not minimize quadriceps abnormalities nor improve exercise capacity. By contrast, another study (Kamalakkannan et al., 2008) showed that clenbuterol administration in patients led to a significant increase in lean mass, together with a significant increase in maximal strength. However, endurance and exercise duration decreased after clenbuterol administration in this study (Kamalakkannan et al., 2008). Therefore, the use of  $\beta_2$ -agonists in heart failure should be considered with caution, due to the limited beneficial effects on skeletal muscle and to the adverse effects that have been reported in cardiac muscle (see below).

##### 4.2.3. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

Skeletal muscle dysfunction often occurs in patients with COPD, affecting their quality of life and may even increase patient mortality (Marquis et al., 2002).  $\beta_2$ -Agonists are widely used for the treatment of symptomatic patients with COPD (Decramer et al., 2013). Although the doses generally prescribed are considerably lower than the ones used in clinical trials (see above neuromuscular diseases) and in animal experiments, taking advantage of the therapy to increase skeletal muscle mass would be of real clinical interest. However, data regarding the effects of  $\beta_2$ -agonist

administration on skeletal muscle are scarce. One study reports that that  $\beta_2$ -agonist administration in COPD patients induces a better tolerance to exercise (D'Agostino et al., 2010). Clearly, the effects on skeletal muscle of long-term treatment with  $\beta_2$ -agonists remain to determine in COPD patients.

#### 4.2.4. Stroke

Hemiparesis, the most common chronic disabling sequela after stroke, is associated with atrophy of hemiparetic skeletal muscles (English et al., 2010). Administration of  $\beta_2$ -agonists has been mainly tested as a potential neuroprotective strategy with contradictory results. Clenbuterol administration has a neuroprotective activity against permanent cerebral ischaemia (Culmsee et al., 1999, 2004), whereas inhibition of  $\beta_2$ -adrenoceptor signalling ( $\beta_2$ -adrenoceptor antagonist, mice lacking  $\beta_2$ -adrenoceptor) also reduced post-ischaemic brain injury (Han et al., 2009). To our knowledge, the effect of  $\beta_2$ -agonist administration on hemiparetic skeletal muscle atrophy has never been documented in an animal model of stroke.

#### 4.2.5. Sepsis

Sepsis, a whole-body inflammatory state caused by severe infection, is associated with severe loss of skeletal muscle mass. Muscle wasting during sepsis is efficiently counter-balanced with clenbuterol, with a complete recovery of rat *gastrocnemius* muscle mass 5 days after endotoxin inoculation (Choo et al., 1989). Several attempts have then been made to interfere with  $\beta_2$ -adrenoceptor signalling in this condition. For instance, IBMX, a phosphodiesterase inhibitor that increases the amount of cAMP, reduces protein degradation in skeletal muscle of septic animals, whereas H89, a PKA inhibitor, completely blocks the anti-proteolytic effect of IBMX (Lira et al., 2007), suggesting that the anti-atrophy effect of  $\beta_2$ -agonist administration in this condition could be mediated through a cAMP/PKA axis. Furthermore, clenbuterol treatment also significantly suppresses the release of TNF- $\alpha$ , a pro-cachectic cytokine, in lipopolysaccharide-induced sepsis model *in vitro* and *in vivo* (Izeboud et al., 1999). Sepsis can also cause diaphragmatic dysfunction, which can lead to the development of respiratory failure. Interestingly, terbutaline, attenuates sepsis-induced diaphragmatic dysfunction in rat (Ito et al., 2006). Taken together, these data suggest that possible beneficial effects of  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation could be applicable in clinical practice.

#### 4.2.6. Thermal injury (hyperthermia, burn)

The elevation in body temperature encountered in several pathological conditions (malignant hyperthermia, severe infection and sepsis) increases skeletal muscle proteolysis (Amettler et al., 2011; Hall-Angeras et al., 1990; Luo et al., 2000). Addition of formoterol significantly reduces hyperthermia-induced protein degradation without affecting protein synthesis (Amettler et al., 2011). Accordingly, the anti-atrophy effect of formoterol was also associated with a decreased expression in MuRF1, MAFbx/atrogin-1 and ubiquitin C8 protease subunit (Amettler et al., 2011). However, the clinical relevance of this anti-catabolic effect has to be minimized, as  $\beta_2$ -agonists also exert thermogenic (heat-producing) effect (Cartana and Stock, 1995; Mogilnicka et al., 1985).

Severe burns induce a sustained hypermetabolic response, which causes long-term loss of skeletal muscle mass and strength (Hart et al., 2000). In a rat model of severe burn injury, clenbuterol administration has proven to be an efficient strategy to restore energy expenditure and improve body weight gain, muscle mass, and muscle protein content (Chance et al., 1991b; Hollyoak et al., 1995; Martineau et al., 1993).

### 5. Limitation of the use of $\beta_2$ -agonists for therapeutic purposes in muscle wasting disorders

The use of  $\beta_2$ -agonists is not without a number of adverse effects. These effects currently considerably limit the use of  $\beta_2$ -agonists for the treatment of muscle wasting in human. Administration of  $\beta_2$ -agonists can provoke symptoms such as tremor, muscle cramps, headache and peripheral vasodilatation, but the most prominent adverse effect of a chronic  $\beta_2$ -agonist administration is an alteration of cardiac muscle structure and function. Tachycardia, cardiac hypertrophy, infiltration of collagen in the left ventricular walls and reduction in left ventricular pressure have been frequently associated (Burniston et al., 2002; Busquets et al., 2004; Carbo et al., 1997; Lynch et al., 1999; Ryall et al., 2002, 2004, 2006; Sleeper et al., 2002; Sneddon et al., 2000), but not systematically (Carbo et al., 1997; Ryall et al., 2006; Soppa et al., 2005; Wong et al., 1998), with the use of  $\beta_2$ -agonists in rat and mouse. Differences between studies are essentially related to the  $\beta_2$ -agonist molecule itself, the dose used and the duration of  $\beta_2$ -agonist treatment. However, cardiac hypertrophy is entirely reversible following cessation of  $\beta_2$ -agonist administration (clenbuterol, formoterol) in rat (Cartana et al., 1994; Ryall et al., 2007). One should also note that cardiac hypertrophy associated with  $\beta_2$ -agonist administration may confer some physiological benefits by attenuating cardiomyocyte atrophy associated with left ventricular assist devices (Soppa et al., 2005).

Interesting information on the safety of long-term treatment with  $\beta_2$ -agonists can be obtained from the analysis of  $\beta_2$ -agonist effects in the treatment of stable COPD patients. The analysis of 20 studies, which corresponds to 8774 patients treated with long-acting  $\beta_2$ -agonists, shows that the incidence of adverse events typically associated with  $\beta_2$ -agonist such as skeletal muscle tremors and palpitations was low (less than 1% of patients) and there were no report of increased incidence of cardiac arrhythmias (Decramer et al., 2013). However, these data should be relativized, as the route of administration (inhalation in COPD patients *versus* intraperitoneal injection in most of animal studies) and the dose used (150  $\mu$ g/day in COPD patient *versus* 20–4000  $\mu$ g/kg/day in animal studies) are different. Therefore, the use of  $\beta_2$ -agonists for the treatment of muscle wasting in human should be considered after a detailed analysis of benefit/risk ratio. Anyhow, we still need a detailed analysis of the effects of  $\beta_2$ -agonist administration on skeletal muscle in human. In this context, studies aimed at determining the effects of long-term treatment with  $\beta_2$ -agonists on skeletal muscle in patients with asthma and COPD would be very informative.

### 6. Concluding remarks – future directions

The search for novel pharmacologic strategies that can help to limit skeletal muscle mass under detrimental conditions requires a deep knowledge of the signalling pathways and downstream effectors that regulate protein synthesis and protein degradation. Animal studies clearly demonstrate that  $\beta_2$ -agonists are undoubtedly promising for the treatment of muscle wasting in human patients. Clinical trials in human patients are also very promising. However, undesirable adverse effects on cardiac muscle associated with long-term usage of  $\beta_2$ -agonists must be taken into account and managed before human therapeutic use. It will be therefore important in the future to further study the downstream events triggered by  $\beta_2$ -adrenoceptor stimulation, to pursue the identification of CREB target genes in skeletal muscle, as well as to identify ligands and signalling pathways that induce cAMP production in skeletal muscle. This will be helpful to discover novel



G Model

BC-4086; No. of Pages 13

## ARTICLE IN PRESS

10

O.R. Joassard et al. / The International Journal of Biochemistry &amp; Cell Biology xxx (2013) xxx–xxx

pharmacological targets and define more specific approaches to combat muscle wasting.

### Acknowledgments

We apologize to the many authors whose work we were unable to cite because of space limitations. This work was supported by the Agence Française de Lutte contre le Dopage and the World Anti-Doping Agency. JOR was supported by an Allocation Doctorale de Recherche from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

### References

- Agbenyega ET, Wareham AC. Effect of clenbuterol on normal and denervated muscle growth and contractility. *Muscle and Nerve* 1990;13:199–203.
- Allamand V, Guicheney P. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A, MIM#156225, LAMA2 gene coding for alpha2 chain of laminin). *European Journal of Human Genetics* 2002;10:91–4.
- Amettler E, Busquets S, Fuster G, Figueras MT, De Oliveira CC, Toledo M, et al. Effects of formoterol on protein metabolism in myotubes during hyperthermia. *Muscle and Nerve* 2011;43:268–73.
- Amirouche A, Durieux AC, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, et al. Down-regulation of akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology* 2009;150:286–94.
- Angelini EPC, Marsala SZ, Vergani L, Nascimbeni AC, Fulizio L, Fanin M. Adult acid maltase deficiency: an opiential with albuterol and branched-chain aminoacids. *Basic Applied Myology* 2004;14:71–8.
- Angelozzi C, Borgo F, Tiziano FD, Martella A, Neri G, Brahe C. Salbutamol increases SMN mRNA and protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Journal of Medical Genetics* 2008;45:29–31.
- Babij P, Booth FW. Clenbuterol prevents or inhibits loss of specific mRNAs in atrophying rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 1988;254:C657–60.
- Bai F, Peng H, Etlinger JD, Zeman RJ. Partial functional recovery after complete spinal cord transection by combined chondroitinase and clenbuterol treatment. *Pflügers Archives European Journal of Physiology* 2010;460:657–66.
- Baker PK, Dalrymple RH, Ingle DL, Ricks CA. Use of  $\beta$ -adrenergic agonist to alter muscle and fat deposition in lambs. *Journal of Animal Science* 1984;59:1256–61.
- Batram C, Charlton SJ, Cuenoud B, Dowling MR, Fairhurst RA, Farr D, et al. In vitro and in vivo pharmacological characterization of 5-[(R)-2-(5,6-diethyl-indan-2-ylamino)-1-hydroxy-ethyl]-8-hydroxy-1H-quinolin-2-one (indacaterol), a novel inhaled beta(2) adrenoceptor agonist with a 24-h duration of action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006;317:762–70.
- Baviera AM, Zanon NM, Carvalho Navegantes LC, Migliorini RH, do Carmo Kettelhut I. Pentoxifylline inhibits  $Ca^{2+}$ -dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2007;292:E702–8.
- Baviera AM, Zanon NM, Navegantes LC, Kettelhut IC. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010;315:104–12.
- Beitzel F, Gregorevic P, Ryall JG, Plant DR, Silence MN, Lynch GS. Beta2-adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury. *Journal of Applied Physiology* 2004;96:1385–92.
- Beitzel F, Silence MN, Lynch GS. Beta-adrenoceptor signaling in regenerating skeletal muscle after beta-agonist administration. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2007;293:E932–40.
- Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton GD, et al. SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nature Medicine* 2007;13:597–603.
- Berdeaux R, Stewart R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2012;303:E1–17.
- Biering-Sorensen B, Kristensen IB, Kjaer M, Biering-Sorensen F. Muscle after spinal cord injury. *Muscle and Nerve* 2009;40:499–519.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001a;294:1704–8.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology* 2001b;3:1014–9.
- Bozzo C, Stevens L, Toniolo L, Mounier Y, Reggiani C. Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2003;285:C575–83.
- Braut JJ, Jespersen JG, Goldberg AL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:19460–71.
- Brennesvik EO, Ktori C, Ruzzin J, Jebens E, Shepherd PR, Jensen J. Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: implications for cross talk between insulin and adrenaline. *Cellular Signalling* 2005;17:1551–9.
- Bricout VA, Serrurier BD, Bigard AX. Clenbuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles. *Acta Physiologica Scandinavica* 2004;180:271–80.
- Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmson KC, Daniels R, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2–13.3. *Nature* 1990;344:540–1.
- Burniston JG, Ng Y, Clark WA, Colyer J, Tan LB, Goldspink DF. Myotoxic effects of clenbuterol in the rat heart and soleus muscle. *Journal of Applied Physiology* 2002;93:1824–32.
- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Research* 2004;64:6725–31.
- Busquets S, Toledo M, Marmonti E, Orpi M, Capdevila E, Betancourt A, et al. Formoterol treatment downregulates the myostatin system in skeletal muscle of cachectic tumour-bearing rats. *Oncology Letters* 2012a;3:185–9.
- Busquets S, Toledo M, Orpi M, Massa D, Porta M, Capdevila E, et al. Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2012b;3:37–43.
- Busquets S, Toledo M, Sirisi S, Orpi M, Serpe R, Coutinho J, et al. Formoterol and cancer muscle wasting in rats: effects on muscle force and total physical activity. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2011;2:731–5.
- Carbo N, Lopez-Soriano J, Tarrago T, Gonzalez O, Llovera M, Lopez-Soriano FJ, et al. Comparative effects of beta2-adrenergic agonists on muscle waste associated with tumour growth. *Cancer Letters* 1997;115:113–8.
- Cartana J, Segues T, Yebbras M, Rothwell NJ, Stock MJ. Anabolic effects of clenbuterol after long-term treatment and withdrawal in the rat. *Metabolism: Clinical and Experimental* 1994;43:1086–92.
- Cartana J, Stock MJ. Effects of clenbuterol and salbutamol on tissue rubidium uptake in vivo. *Metabolism: Clinical and Experimental* 1995;44:119–25.
- Chance WT, Cao LQ, Zhang FS, Foley-Nelson T, Fischer JE. Clenbuterol treatment increases muscle mass and protein content of tumor-bearing rats maintained on total parenteral nutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 1991a;15:530–5.
- Chance WT, von Allmen D, Benson D, Zhang FS, Fischer JE. Clenbuterol decreases catabolism and increases hypermetabolism in burned rats. *Journal of Trauma* 1991b;31:365–70.
- Chen AE, Ginty DD, Fan CM. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature* 2005;433:317–22.
- Chen M, Feng HZ, Gupta D, Kelleher J, Dickerson KE, Wang J, et al. Gs(alpha) deficiency in skeletal muscle leads to reduced muscle mass, fiber-type switching, and glucose intolerance without insulin resistance or deficiency. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2009;296:C930–40.
- Choo JJ, Horan MA, Little RA, Rothwell NJ. Muscle wasting associated with endotoxemia in the rat: modification by the beta 2-adrenoceptor agonist clenbuterol. *Bioscience Reports* 1989;9:615–21.
- Choo JJ, Horan MA, Little RA, Rothwell NJ. Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by beta 2-adrenoceptor activation. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 1992;263:E50–6.
- Cong M, Goll DE, Antin PB. cAMP responsiveness of the bovine calpastatin gene promoter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998;1443:186–92.
- Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: past, present, and future. *Journal of Clinical Investigation* 2006;116:2843–54.
- Costelli P, Garcia-Martinez C, Llovera M, Carbo N, Lopez-Soriano FJ, Agell N, et al. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Journal of Clinical Investigation* 1995a;95:2367–72.
- Costelli P, Llovera M, Garcia-Martinez C, Carbo N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Enhanced leucine oxidation in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130) and its reversal by clenbuterol. *Cancer Letters* 1995b;91:73–8.
- Culmsee C, Junker V, Kremers W, Thal S, Plesnila N, Kriegstein J. Combination therapy in ischemic stroke: synergistic neuroprotective effects of memantine and clenbuterol. *Stroke* 2004;35:1197–202.
- Culmsee C, Stumm RK, Schafer MK, Weihe E, Kriegstein J. Clenbuterol induces growth factor mRNA, activates astrocytes, and protects rat brain tissue against ischemic damage. *European Journal of Pharmacology* 1999;379:33–45.
- D'Agostino B, Polverino M, Cirino G, Lombardi A, Grassi B, Sullo N, et al. Exercise capacity and cytochrome oxidase activity in muscle mitochondria of COPD patients. *Respiratory Medicine* 2010;104:83–90.
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997;390:88–91.
- Dalrymple RH, Baker PK, Gingham PE, Ingle DL, Pensack JM, Ricks CA. A repartitioning agent to improve performance and carcass composition of broilers. *Poultry Science* 1984;63:2376–83.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 1998;396:474–7.
- Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatric Neurology* 2007;36:1–7.
- Decramer ML, Hanania NA, Lotvall JO, Yawn BP. The safety of long-acting beta(2)-agonists in the treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Diseases* 2013;8:53–64.

G Model

BC-4086; No. of Pages 13

## ARTICLE IN PRESS

O.R. Joassard et al. / The International Journal of Biochemistry &amp; Cell Biology xxx (2013) xxx–xxx

11

- Delday MI, Maltin CA. Clenbuterol increases the expression of myogenin but not myoD in immobilized rat muscles. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 1997;272:E941–4.
- Deshais Y, Willemot J, Leblanc J. Protein synthesis, amino acid uptake, and pools during isoproterenol-induced hypertrophy of the rat heart and tibialis muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1981;59:113–21.
- Dodd SL, Powers SK, Vrabas IS, Criswell D, Stetson S, Hussain R. Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1996;28:669–76.
- Dupont-Versteegden EE. Exercise and clenbuterol as strategies to decrease the progression of muscular dystrophy in mdx mice. *Journal of Applied Physiology* 1996;80:734–41.
- Dupont-Versteegden EE, Katz MS, McCarter RJ. Beneficial versus adverse effects of long-term use of clenbuterol in mdx mice. *Muscle and Nerve* 1995;18:1447–59.
- Durieux AC, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Pasdeloup M, et al. Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* 2007;148:3140–7.
- Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ, Winter PD. Chronic effects of beta 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Bioscience Reports* 1984;4:83–91.
- English C, McLennan H, Thoirs K, Coates A, Bernhardt J. Loss of skeletal muscle mass after stroke: a systematic review. *International Journal of Stroke* 2010;5:395–402.
- Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, et al. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature Cell Biology* 2002;4:901–6.
- Fass DM, Butler JE, Goodman RH. Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:43014–9.
- Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metabolism* 2012;16:153–66.
- Forsberg NE, Ilian MA, Ali-Bar A, Cheeke PR, Wehr NB. Effects of cimaterol on rabbit growth and myofibrillar protein degradation and on calcium-dependent proteinase and calpastatin activities in skeletal muscle. *Journal of Animal Science* 1989;67:313–21.
- Fowler EG, Graves MC, Wetzel GT, Spencer MJ. Pilot trial of albuterol in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurology* 2004;62:1006–8.
- Fulster S, Tacke M, Sandek A, Ebner N, Tschöpe C, Doehner W, et al. Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF). *European Heart Journal* 2013;34:512–9.
- Fuster G, Busquets S, Ametller E, Oliván M, Almendro V, de Oliveira CC, et al. Are peroxisome proliferator-activated receptors involved in skeletal muscle wasting during experimental cancer cachexia? Role of beta2-adrenergic agonists. *Cancer Research* 2007;67:6512–9.
- García-Aymerich J, Lange P, Benet M, Schnohr P, Anto JM. Regular physical activity reduces hospital admission and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: a population based cohort study. *Thorax* 2006;61:772–8.
- Gehrig SM, Koopman R, Naim T, Tjoakarfa C, Lynch GS. Making fast-twitch dystrophic muscles bigger protects them from contraction injury and attenuates the dystrophic pathology. *American Journal of Pathology* 2010;176:29–33.
- Geng T, Li P, Yin X, Yan Z. PGC-1 $\alpha$  promotes nitric oxide antioxidant defenses and inhibits FOXO signaling against cardiac cachexia in mice. *American Journal of Pathology* 2011;178:1738–48.
- Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, et al. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 2007;148:452–60.
- Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2009;297:E157–64.
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:14440–5.
- Goncalves DA, Silveira WA, Lira EC, Graca FA, Paula-Gomes S, Zanon NM, et al. Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2012;302:E123–33.
- Gosmanov AR, Wong JA, Thomason DB. Duality of G protein-coupled mechanisms for beta-adrenergic activation of NKCC activity in skeletal muscle. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2002;283:C1025–32.
- Hall-Angeras M, Angeras U, Hasselgren PO, Fischer JE. Effects of elevated temperature on protein breakdown in muscles from septic rats. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 1990;258:C589–92.
- Han RQ, Ouyang YB, Xu L, Agrawal R, Patterson AJ, Giffard RG. Posts ischemic brain injury is attenuated in mice lacking the beta2-adrenergic receptor. *Anesthesia and Analgesia* 2009;108:280–7.
- Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$  expression in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:7111–6.
- Harcourt LJ, Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS. Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue. *Neuromuscular Disorders* 2007;17:47–55.
- Harrington D, Chua TP, Coats AJ. The effect of salbutamol on skeletal muscle in chronic heart failure. *International Journal of Cardiology* 2000;73:257–65.
- Hart DW, Wolf SE, Mlcak R, Chinkes DL, Ramzy PI, Obeng MK, et al. Persistence of muscle catabolism after severe burn. *Surgery* 2000;128:312–9.
- Hayes A, Williams DA. Examining potential drug therapies for muscular dystrophy utilizing the dy/dy mouse: I. Clenbuterol. *Journal of the Neurological Sciences* 1998;157:122–8.
- Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, et al. Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nature Genetics* 1995;11:216–8.
- Herrera NM Jr, Zimmerman AN, Dykstra DD, Thompson LV. Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study of hindlimb-unweighted rats. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 2001;82:930–4.
- Hinkle RT, Dolan E, Cody DB, Bauer MB, Isfort RJ. Phosphodiesterase 4 inhibition reduces skeletal muscle atrophy. *Muscle and Nerve* 2005;32:775–81.
- Hinkle RT, Hodge KM, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK, Isfort RJ. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle and Nerve* 2002;25:729–34.
- Hollyoak MA, Muller MJ, Meyers NA, Williams WG, Barrow RE, Herndon DN. Beneficial wound healing and metabolic effects of clenbuterol in burned and nonburned rats. *Journal of Burn Care and Rehabilitation* 1995;16:233–40.
- Hyltander A, Svaninger G, Lundholm K. The effect of clenbuterol on body composition in spontaneously eating tumour-bearing mice. *Bioscience Reports* 1993;13:325–31.
- Iezzi S, Di Padova M, Serra C, Caretti G, Simone C, Maklan E, et al. Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Developmental Cell* 2004;6:673–84.
- Ito T, Fujimura N, Omote K, Namiki A. A selective beta2-adrenergic agonist, terbutaline, improves sepsis-induced diaphragmatic dysfunction in the rat. *Life Science* 2006;79:905–12.
- Izeboud CA, Monshouer M, van Miert AS, Witkamp RF. The beta-adrenoceptor agonist clenbuterol is a potent inhibitor of the LPS-induced production of TNF- $\alpha$  and IL-6 in vitro and in vivo. *Inflammation Research* 1999;48:497–502.
- Jiang GL, Gu YD, Zhang LY, Shen LY, Yu C, Xu JG. Randomized, double-blind, and placebo-controlled trial of clenbuterol in denervated muscle atrophy. *International Scholarly Research Network Pharmaceuticals* 2011;2011:981254.
- Kamalakkannan G, Petrilli CM, George I, LaManca J, McLaughlin BT, Shane E, et al. Clenbuterol increases lean muscle mass but not endurance in patients with chronic heart failure. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2008;27:457–61.
- Kawasaki H, Springgett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 1998;282:2275–9.
- Kenley RA, Denissenko MF, Mullin RJ, Story J, Eklom J. Formoterol fumarate and roxithromycin effects on muscle mass in an animal model of cancer cachexia. *Oncology Reports* 2008;19:1113–21.
- Kim YS, Sainz RD, Molenaar P, Summers RJ. Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochemical Pharmacology* 1991;42:1783–9.
- Kinali M, Mercuri E, Main M, De Biasia F, Karatza A, Higgins R, et al. Pilot trial of albuterol in spinal muscular atrophy. *Neurology* 2002;59:609–10.
- Kissel JT, McDermott MP, Mendell JR, King WM, Pandya S, Griggs RC, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of albuterol in facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology* 2001;57:1434–40.
- Kissel JT, McDermott MP, Natarajan R, Mendell JR, Pandya S, King WM, et al. Pilot trial of albuterol in facioscapulohumeral muscular dystrophy. FSH-DY group. *Neurology* 1998;50:1402–6.
- Kline WO, Panaro FJ, Yang H, Bodine SC. Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *Journal of Applied Physiology* 2007;102:740–7.
- Koeberl DD, Li S, Dai J, Thurberg BL, Bali D, Kishnani PS. beta2 Agonists enhance the efficacy of simultaneous enzyme replacement therapy in murine Pompe disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 2012;105:221–7.
- Koopman R, Gehrig SM, Leger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT, et al. Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic (beta)-adrenoceptor stimulation in mice. *Journal of Physiology* 2010;588:4811–23.
- Kumar R, Sharma S. Remodeling of extracellular matrix protein, collagen by beta-adrenoceptor stimulation and denervation in mouse gastrocnemius muscle. *The Journal of Physiological Sciences* 2006;56:87–94.
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991;352:77–9.
- Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:9306–11.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Bulet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995;80:155–65.
- Li S, Sun B, Nilsson MI, Bird A, Tarnopolsky MA, Thurberg BL, et al. Adjunctive beta2-agonists reverse neuromuscular involvement in murine Pompe disease. *FASEB Journal* 2013;27:34–44.
- Lira EC, Graca FA, Goncalves DA, Zanon NM, Baviera AM, Strindberg L, et al. Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats. *Shock* 2007;27:687–94.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:6307–11.

G Model

BC-4086; No. of Pages 13

## ARTICLE IN PRESS

12

O.R. Joassard et al. / The International Journal of Biochemistry &amp; Cell Biology xxx (2013) xxx–xxx

- Luo GJ, Sun X, Hasselgren PO. Hyperthermia stimulates energy-proteasome-dependent protein degradation in cultured myotubes. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2000;278:R749–56.
- Lynch GS, Hayes A, Campbell SP, Williams DA. Effects of beta 2-agonist administration and exercise on contractile activation of skeletal muscle fibers. *Journal of Applied Physiology* 1996;81:1610–8.
- Lynch GS, Hinkle RT, Chamberlain JS, Brooks SV, Faulkner JA. Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6–28 months old. *Journal of Physiology* 2001a;535:591–600.
- Lynch GS, Hinkle RT, Faulkner JA. Year-long clenbuterol treatment of mice increases mass, but not specific force or normalized power, of skeletal muscles. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1999;26:117–20.
- Lynch GS, Hinkle RT, Faulkner JA. Power output of fast and slow skeletal muscles of mdx (dystrophic) and control mice after clenbuterol treatment. *Experimental Physiology* 2000;85:295–9.
- Lynch GS, Hinkle RT, Faulkner JA. Force and power output of diaphragm muscle strips from mdx and control mice after clenbuterol treatment. *Neuromuscular Disorders* 2001b;11:192–6.
- Lynch GS, Ryall JG. Role of {beta}-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiological Reviews* 2008;88:729–67.
- MacDonald N, Easson AM, Mazurak VC, Dunn GP, Baracos VE. Understanding and managing cancer cachexia. *Journal of the American College of Surgeons* 2003;197:143–61.
- MacLennan PA, Edwards RH. Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass. Evidence that clenbuterol stimulates muscle beta-adrenoceptors to induce hypertrophy. *Biochemical Journal* 1989;264:573–9.
- Magenta A, Cenciarelli C, De Santa F, Fuschi P, Martelli F, Caruso M, et al. MyoD stimulates RB promoter activity via the CREB/p300 nuclear transduction pathway. *Molecular and Cellular Biology* 2003;23:2893–906.
- Maltin CA, Hay SM, Delday MI, Lobley GE, Reeds PJ. The action of the beta-agonist clenbuterol on protein metabolism in innervated and denervated phasic muscles. *Biochemical Journal* 1989;261:965–71.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metabolism* 2007;6:458–71.
- Marquis K, Debigare R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J, Carrier G, et al. Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002;166:809–13.
- Martineau L, Little RA, Rothwell NJ, Fisher MI. Clenbuterol a beta 2-adrenergic agonist, reverses muscle wasting due to scald injury in the rat. *Burns* 1993;19:26–34.
- McCormick C, Alexandre L, Thompson J, Mutungi G. Clenbuterol and formoterol decrease force production in isolated intact mouse skeletal muscle fiber bundles through a beta2-adrenoceptor-independent mechanism. *Journal of Applied Physiology* 2010;109:1716–27.
- Mersmann HJ. Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *Journal of Animal Science* 1998;76:160–72.
- Messina S, Hartley L, Main M, Kinali M, Jungbluth H, Muntoni F, et al. Pilot trial of salbutamol in central core and multi-minicore diseases. *Neuropediatrics* 2004;35:262–6.
- Minetti GC, Feige JN, Rosenstiel A, Bombard F, Meier V, Werner A, et al. Galphai2 signaling promotes skeletal muscle hypertrophy, myoblast differentiation, and muscle regeneration. *Science Signaling* 2011;4:ra80.
- Mogilnicka E, Klimek V, Nowak G, Czyrak A. Clonidine and a beta-agonists induce hyperthermia in rats at high ambient temperature. *Journal of Neural Transmission* 1985;63:223–35.
- Moore NG, Pegg GG, Sillence MN. Anabolic effects of the beta 2-adrenoceptor agonist salmeterol are dependent on route of administration. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 1994;267:E475–84.
- Moresi V, Williams AH, Meadows E, Flynn JM, Potthoff MJ, McAnally J, et al. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell* 2010;143:35–45.
- Nash JE, Rocha HJ, Buchan V, Calder GA, Milne E, Quirke JF, et al. The effect of acute and chronic administration of the beta-agonist, cimaterol, on protein synthesis in ovine skin and muscle. *British Journal of Nutrition* 1994;71:501–13.
- Navegantes LC, Resano NM, Baviera AM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2004;286:E642–7.
- Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2000;279:E663–8.
- Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Catecholamines inhibit Ca(2+)-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through beta(2)-adrenoceptors and cAMP. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2001;281:E449–54.
- O'Connor RM, Butler WR, Hogue DE, Beermann DH. Temporal pattern of skeletal muscle changes in lambs fed cimaterol. *Domestic Animal Endocrinology* 1991;8:549–54.
- Oishi Y, Imoto K, Ogata T, Taniguchi K, Matsumoto H, Roy RR. Clenbuterol induces expression of multiple myosin heavy chain isoforms in rat soleus fibres. *Acta Physiologica Scandinavica* 2002;176:311–8.
- Pane M, Staccioli S, Messina S, D'Amico A, Pelliccioni M, Mazzone ES, et al. Daily salbutamol in young patients with SMA type II. *Neuromuscular Disorders* 2008;18:536–40.
- Patiyal SN, Katoch SS. Tissue specific and variable collagen proliferation in Swiss albino mice treated with clenbuterol. *Physiological Research* 2006;55:97–103.
- Pearen NA, Myers SA, Raichur S, Ryall JG, Lynch GS, Muscat GE. The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of beta-adrenergic signaling, regulates gene expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle. *Endocrinology* 2008;149:2853–65.
- Pearen MA, Ryall JG, Maxwell MA, Ohkura N, Lynch GS, Muscat GE. The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle. *Endocrinology* 2006;147:5217–27.
- Piffar PM, Fernandez R, Tchaikovski O, Hirabara SM, Folador A, Pinto GJ, et al. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. *Cancer Letters* 2003;201:139–48.
- Querin G, D'Ascenzo C, Peterle E, Ermani M, Bello L, Melacini P, et al. Pilot trial of clenbuterol in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology* 2013;80:2095–8.
- Quinlivan RM, Muller CR, Davis M, Laing NG, Evans GA, Dwyer J, et al. Central core disease: clinical, pathological, and genetic features. *Archives of Disease in Childhood* 2003;88:1051–5.
- Reeds PJ, Hay SM, Dorwood PM, Palmer RM. Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effect on muscle protein biosynthesis. *British Journal of Nutrition* 1986;56:249–58.
- Ricart-Firinga C, Stevens L, Canu MH, Nemirovskaya TL, Mounier Y. Effects of beta(2)-agonist clenbuterol on biochemical and contractile properties of unloaded soleus fibers of rat. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2000;278:C582–8.
- Ringdal N, Derom E, Wahlin-Boll E, Pauwels R. Onset and duration of action of single doses of formoterol inhaled via Turbuhaler. *Respiratory Medicine* 1998;92:1017–21.
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature Cell Biology* 2001;3:1009–13.
- Rothwell NJ, Stock MJ. Modification of body composition by clenbuterol in normal and dystrophic (mdx) mice. *Bioscience Reports* 1985;5:755–60.
- Rothwell NJ, Stock MJ, Sudera DK. Changes in tissue blood flow and beta-receptor density of skeletal muscle in rats treated with the beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol. *British Journal of Pharmacology* 1987;90:601–7.
- Ruas JL, White JP, Rao RR, Kleiner S, Brannan KT, Harrison BC, et al. A PGC-1alpha isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* 2012;151:1319–31.
- Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2002;283:R1386–94.
- Ryall JG, Plant DR, Gregorevic P, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. *Journal of Physiology* 2004;555:175–88.
- Ryall JG, Schertzer JD, Lynch GS. Attenuation of age-related muscle wasting and weakness in rats after formoterol treatment: therapeutic implications for sarcopenia. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 2007;62:813–23.
- Ryall JG, Sillence MN, Lynch GS. Systemic administration of beta2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. *British Journal of Pharmacology* 2006;147:587–95.
- Sadeh M, Shen XM, Engel AG. Beneficial effect of albuterol in congenital myasthenic syndrome with epsilon-subunit mutations. *Muscle and Nerve* 2011;44:289–91.
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1(alpha) protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:16260–5.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004;117:399–412.
- Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews* 2011;91:1447–531.
- Schreuder LT, Nijhuis-van der Sanden MW, de Hair A, Peters G, Wortmann S, Bok LA, et al. Successful use of albuterol in a patient with central core disease and mitochondrial dysfunction. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2010.
- Sensky PL, Jewell KK, Ryan KJ, Parr T, Bardsley RC, Buttery PJ. Effect of anabolic agents on calpastatin promoters in porcine skeletal muscle and their responsiveness to cyclic adenosine monophosphate- and calcium-related stimuli. *Journal of Animal Science* 2006;84:2973–82.
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, et al. beta-Arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:1261–73.
- Shi H, Zeng C, Ricome A, Hannon KM, Grant AL, Gerrard DE. Extracellular signal-regulated kinase pathway is differentially involved in beta-agonist-induced hypertrophy in slow and fast muscles. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2007;292:C1681–9.
- Signorile JF, Banovac K, Gomez M, Flipse D, Caruso JF, Lowensteyn I. Increased muscle strength in paralyzed patients after spinal cord injury: effect of beta-2 adrenergic agonist. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 1995;76:55–8.

G Model

BC-4086; No. of Pages 13

## ARTICLE IN PRESS

O.R. Joassard et al. / The International Journal of Biochemistry &amp; Cell Biology xxx (2013) xxx–xxx

13

- Skura CL, Fowler EG, Wetzel GT, Graves M, Spencer MJ. Albuterol increases lean body mass in ambulatory boys with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Neurology* 2008;70:137–43.
- Sleeper MM, Kearns CF, McKeever KH. Chronic clenbuterol administration negatively alters cardiac function. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2002;34:643–50.
- Sneddon AA, Delday MI, Maltin CA. Amelioration of denervation-induced atrophy by clenbuterol is associated with increased PKC- $\alpha$  activity. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2000;279:E188–95.
- Sneddon AA, Delday MI, Steven J, Maltin CA. Elevated IGF-II mRNA and phosphorylation of 4E-BP1 and p70(S6k) in muscle showing clenbuterol-induced anabolism. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2001;281:E676–82.
- Soic-Vranic T, Bobinac D, Bajek S, Jerkovic R, Malnar-Dragojevic D, Nikolic M. Effect of salbutamol on innervated and denervated rat soleus muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2005;38:1799–805.
- Soliven B, Rezanja K, Gundogdu B, Harding-Clay B, Oger J, Arnason BG. Terbutaline in myasthenia gravis: a pilot study. *Journal of the Neurological Sciences* 2009;277:150–4.
- Soppa GK, Smolenski RT, Latif N, Yuen AH, Malik A, Karbowska J, et al. Effects of chronic administration of clenbuterol on function and metabolism of adult rat cardiac muscle. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 2005;288:H1468–76.
- Stallion A, Foley-Nelson T, Chance WT, Fischer JE. Effects of increased beta 2-agonist dose in tumor-bearing animals. *Nutrition and Cancer* 1993;20:251–60.
- Stallion A, Foley-Nelson T, Chance WT, James JH, Fischer JE. Anticatabolic effect of the beta 2-agonist cimaterol in vivo in tumor-bearing animals. *Journal of Surgical Research* 1995;59:387–92.
- Stallion A, Zhang FS, Chance WT, Foley-Nelson T, Fischer JE. Reversal of cancer cachexia in rats by cimaterol and supplemental nutrition. *Surgery* 1991;110:678–84.
- Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, Bastide B, Mounier Y, Pette D. Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2000;279:C1558–63.
- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular Cell* 2004;14:395–403.
- Suzuki J, Gao M, Xie Z, Koyama T. Effects of the beta 2-adrenergic agonist clenbuterol on capillary geometry in cardiac and skeletal muscles in young and middle-aged rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 1997;161:317–26.
- Teng YD, Choi H, Huang W, Onario RC, Frontera WR, Snyder EY, et al. Therapeutic effects of clenbuterol in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* 2006;397:155–8.
- Tiziano FD, Lomastro R, Pinto AM, Messina S, D'Amico A, Fiori S, et al. Salbutamol increases survival motor neuron (SMN) transcript levels in leucocytes of spinal muscular atrophy (SMA) patients: relevance for clinical trial design. *Journal of Medical Genetics* 2010;47:856–8.
- Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2009;296:C1258–70.
- Ung RV, Rouleau P, Guertin PA. Effects of co-administration of clenbuterol and testosterone propionate on skeletal muscle in paraplegic mice. *Journal of Neurotrauma* 2010;27:1129–42.
- van der Kooi EL, Kalkman JS, Lindeman E, Hendriks JC, van Engelen BG, Bleijenberg G, et al. Effects of training and albuterol on pain and fatigue in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Journal of Neurology* 2007;254:931–40.
- van der Kooi EL, Vogels OJ, van Asseldonk RJ, Lindeman E, Hendriks JC, Wohlge-muth M, et al. Strength training and albuterol in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 2004;63:702–8.
- van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet* 2008;372:1342–53.
- van Noord JA, Smeets JJ, Raaijmakers JA, Bommer AM, Maesen FP. Salmeterol versus formoterol in patients with moderately severe asthma: onset and duration of action. *European Respiratory Journal* 1996;9:1684–8.
- von Maltzahn J, Bentzinger CF, Rudnicki MA. Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nature Cell Biology* 2012;14:186–91.
- Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT. Increased muscle PGC-1 $\alpha$  expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:20405–10.
- Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, Clark LN, Wright TJ, Dauwerse HG, et al. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature Genetics* 1992;2:26–30.
- Williams RS, Caron MG, Daniel K. Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 1984;246:E160–7.
- Wong K, Boheler KR, Bishop J, Petrou M, Yacoub MH. Clenbuterol induces cardiac hypertrophy with normal functional, morphological and molecular features. *Cardiovascular Research* 1998;37:115–22.
- Yimlamai T, Dodd SL, Borst SE, Park S. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Applied Physiology* 2005;99:71–80.
- Zeman RJ, Feng Y, Peng H, Etlinger JD. Clenbuterol, a beta(2)-adrenoceptor agonist, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *Experimental Neurology* 1999;159:267–73.
- Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG, Etlinger JD. Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a beta 2-receptor agonist. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 1988;254:E726–32.
- Zeman RJ, Ludemann R, Etlinger JD. Clenbuterol, a beta 2-agonist, retards atrophy in denervated muscles. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 1987;252:E152–5.
- Zeman RJ, Peng H, Danon MJ, Etlinger JD. Clenbuterol reduces degeneration of exercised or aged dystrophic (mdx) muscle. *Muscle and Nerve* 2000;23:521–8.
- Zeman RJ, Peng H, Etlinger JD. Clenbuterol retards loss of motor function in motor neuron degeneration mice. *Experimental Neurology* 2004;187:460–7.
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Konkright MD, Canetti G, Best J, et al. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:4459–64.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism* 2007;6:472–83.
- Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 2010;142:531–43.
- Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:1607–12.



# **BIBLIOGRAPHIE**



- Abo T, Iida RH, Kaneko S, Suga T, Yamada H, Hamada Y & Yamane A. (2012). IGF and myostatin pathways are respectively induced during the earlier and the later stages of skeletal muscle hypertrophy induced by clenbuterol, a beta(2) -adrenergic agonist. *Cell biochemistry and function*.
- Agbenyega ET & Wareham AC. (1990). Effect of clenbuterol on normal and denervated muscle growth and contractility. *Muscle & nerve* **13**, 199-203.
- Agbenyega ET & Wareham AC. (1992). Effect of clenbuterol on skeletal muscle atrophy in mice induced by the glucocorticoid dexamethasone. *Comparative biochemistry and physiology* **102**, 141-145.
- Agence Mondiale Antidopage (2013). Liste des interdictions 2013 - Standard international Code Mondial Antidopage.
- Agrawal S, Thakur P & Katoch SS. (2003). Beta adrenoceptor agonists, clenbuterol, and isoproterenol retard denervation atrophy in rat gastrocnemius muscle: use of 3-methylhistidine as a marker of myofibrillar degeneration. *Jpn J Physiol* **53**, 229-237.
- Ahlquist RP. (1948). A study of the adrenotropic receptors. *The American journal of physiology* **153**, 586-600.
- Allamand V & Guicheney P. (2002). Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A, MIM#156225, LAMA2 gene coding for alpha2 chain of laminin). *Eur J Hum Genet* **10**, 91-94.
- Almahariq M, Tsalkova T, Mei FC, Chen H, Zhou J, Sastry SK, Schwede F & Cheng X. (2013). A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. *Molecular pharmacology* **83**, 122-128.
- Altarejos JY & Montminy M. (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature reviews* **12**, 141-151.
- Ametller E, Busquets S, Fuster G, Figueras MT, De Oliveira CC, Toledo M, Korzeniewska K, Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (2011). Effects of formoterol on protein metabolism in myotubes during hyperthermia. *Muscle & nerve* **43**, 268-273.
- Amirouche A, Durieux AC, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A & Freyssen D. (2009). Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology* **150**, 286-294.
- Anderson G & Wilkins E. (1977). A trial of clenbuterol in bronchial asthma. *Thorax* **32**, 717-719.
- Anderson GP, Linden A & Rabe KF. (1994). Why are long-acting beta-adrenoceptor agonists long-acting? *Eur Respir J* **7**, 569-578.
- Anderson SD, Rodwell LT, Du Toit J & Young IH. (1991). Duration of protection by inhaled salmeterol in exercise-induced asthma. *Chest* **100**, 1254-1260.



- Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Umanskaya A, Shiomi T & Marks AR. (2012). Stress-induced increase in skeletal muscle force requires protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor. *The Journal of physiology* **590**, 6381-6387.
- Andrade-Lopes AL, Pires-Oliveira M, Menezes-Rodrigues FS & Godinho RO. (2011). Functional characterization of heterotrimeric G-proteins in rat diaphragm muscle. *Respiratory physiology & neurobiology* **175**, 212-219.
- Angelini C, Pegoraro E, Marsala SZ, Vergani L, Nascimbeni AC, Fulizio L & M. F. (2004). Adult Acid Maltase Deficiency: an Open Trial with Albuterol and Branched - Chain Aminoacids. *Basic and applied myology* **14**, 71-78.
- Angelozzi C, Borgo F, Tiziano FD, Martella A, Neri G & Brahe C. (2008). Salbutamol increases SMN mRNA and protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Journal of medical genetics* **45**, 29-31.
- Aranguiz-Urroz P, Canales J, Copaja M, Troncoso R, Vicencio JM, Carrillo C, Lara H, Lavandero S & Diaz-Araya G. (2011). Beta(2)-adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast autophagy and collagen degradation. *Biochimica et biophysica acta* **1812**, 23-31.
- Arany Z, Sellers WR, Livingston DM & Eckner R. (1994). E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell* **77**, 799-800.
- Auman JT, Seidler FJ, Tate CA & Slotkin TA. (2001). Beta-adrenoceptor-mediated cell signaling in the neonatal heart and liver: responses to terbutaline. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R1895-1901.
- Averna M, De Tullio R, Capini P, Salamino F, Pontremoli S & Melloni E. (2003). Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca(2+)-dependent proteolysis. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2669-2678.
- Awede BL, Thissen JP & Lebacqz 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.
- Babij P & Booth FW. (1988). Clenbuterol prevents or inhibits loss of specific mRNAs in atrophying rat skeletal muscle. *The American journal of physiology* **254**, C657-660.
- Bacurau AV, Jardim MA, Ferreira JC, Bechara LR, Bueno CR, Jr., Alba-Loureiro TC, Negrao CE, Casarini DE, Curi R, Ramires PR, Moriscot AS & Brum PC. (2009). Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J Appl Physiol* **106**, 1631-1640.
- Bai F, Peng H, Etlinger JD & Zeman RJ. (2010). Partial functional recovery after complete spinal cord transection by combined chondroitinase and clenbuterol treatment. *Pflugers Arch* **460**, 657-666.
- Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ & Houslay MD. (2003). beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-

- adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 940-945.
- Bargmann CI. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science (New York, NY)* **282**, 2028-2033.
- Bates PC & Pell JM. (1991). Action and interaction of growth hormone and the beta-agonist, clenbuterol, on growth, body composition and protein turnover in dwarf mice. *The British journal of nutrition* **65**, 115-129.
- Batram C, Charlton SJ, Cuenoud B, Dowling MR, Fairhurst RA, Farr D, Fozard JR, Leighton-Davies JR, Lewis CA, McEvoy L, Turner RJ & Trifilieff A. (2006). In vitro and in vivo pharmacological characterization of 5-[(R)-2-(5,6-diethyl-indan-2-ylamino)-1-hydroxy-ethyl]-8-hydroxy-1H-quinolin-2-one (indacaterol), a novel inhaled beta(2) adrenoceptor agonist with a 24-h duration of action. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **317**, 762-770.
- Baviera AM, Zanon NM, Navegantes LC & Kettelhut IC. (2010). Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* **315**, 104-112.
- Beeh KM, Derom E, Kannies F, Cameron R, Higgins M & van As A. (2007). Indacaterol, a novel inhaled beta2-agonist, provides sustained 24-h bronchodilation in asthma. *Eur Respir J* **29**, 871-878.
- Beene DL & Scott JD. (2007). A-kinase anchoring proteins take shape. *Current opinion in cell biology* **19**, 192-198.
- Beermann DH, Butler WR, Hogue DE, Fishell VK, Dalrymple RH, Ricks CA & Scanes CG. (1987). Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *Journal of animal science* **65**, 1514-1524.
- Beitzel F, Gregorevic P, Ryall JG, Plant DR, Sillence MN & Lynch GS. (2004). Beta2-adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury. *J Appl Physiol* **96**, 1385-1392.
- Beitzel F, Sillence MN & Lynch GS. (2007). beta-Adrenoceptor signaling in regenerating skeletal muscle after beta-agonist administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E932-940.
- Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Cho K, Weber KT & Clark WA. (1989). Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circulation research* **65**, 657-670.
- Benovic JL & Gomez J. (1993). Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family. *The Journal of biological chemistry* **268**, 19521-19527.
- Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton GD & Montminy M. (2007). SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nature medicine* **13**, 597-603.

- Berglund B, Sundgot-Borgen J & Wide L. (2002). Effect of salbutamol, a beta-2-adrenergic agonist, on erythropoietin concentration in healthy males. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **12**, 31-33.
- Berthouze M, Venkataramanan V, Li Y & Shenoy SK. (2009). The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization. *The EMBO journal* **28**, 1684-1696.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H & Johansen T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology* **171**, 603-614.
- Bloom TJ. (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes expressed in mouse skeletal muscle. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **80**, 1132-1135.
- Bloomfield SA, Girten BE & Weisbrode SE. (1997). Effects of vigorous exercise training and beta-agonist administration on bone response to hindlimb suspension. *J Appl Physiol* **83**, 172-178.
- Bockaert J & Pin JP. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal* **18**, 1723-1729.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2001a). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science (New York, NY)* **294**, 1704-1708.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ & Yancopoulos GD. (2001b). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology* **3**, 1014-1019.
- Bohorov O, Buttery PJ, Correia JH & Soar JB. (1987). The effect of the beta-2-adrenergic agonist clenbuterol or implantation with oestradiol plus trenbolone acetate on protein metabolism in wether lambs. *The British journal of nutrition* **57**, 99-107.
- Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR & Jefferson LS. (2002). AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *The Journal of biological chemistry* **277**, 23977-23980.
- Bonnet N, Benhamou CL, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada MN, Richard O, Vico L, Collomp K & Courteix D. (2005). Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone* **37**, 622-633.
- Borrani F, Candau R, Millet GY, Perrey S, Fuchslocher J & Rouillon JD. (2001). Is the VO2 slow component dependent on progressive recruitment of fast-twitch fibers in trained runners? *Journal of Applied Physiology* **90**, 2212-2220.

- Bos JL. (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nature reviews* **4**, 733-738.
- Bosch F & Rosich L. (2008). The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology* **82**, 171-179.
- Bose A, Cherniack AD, Langille SE, Nicoloso SM, Buxton JM, Park JG, Chawla A & Czech MP. (2001). G(alpha)11 signaling through ARF6 regulates F-actin mobilization and GLUT4 glucose transporter translocation to the plasma membrane. *Molecular and cellular biology* **21**, 5262-5275.
- Bozzo C, Stevens L, Toniolo L, Mounier Y & Reggiani C. (2003). Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C575-583.
- Brambilla G, Loizzo A, Fontana L, Strozzi M, Guarino A & Soprano V. (1997). Food poisoning following consumption of clenbuterol-treated veal in Italy. *Jama* **278**, 635.
- Brand T, Sharma HS & Schaper W. (1993). Expression of nuclear proto-oncogenes in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* **25**, 1325-1337.
- Brennesvik EO, Ktori C, Ruzzin J, Jebens E, Shepherd PR & Jensen J. (2005). Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: implications for cross talk between insulin and adrenaline. *Cellular signalling* **17**, 1551-1559.
- Bricout VA, Serrurier BD & Bigard AX. (2004). Clenbuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles. *Acta physiologica Scandinavica* **180**, 271-280.
- Buchheit M, Laursen PB & Ahmaidi S. (2007). Parasympathetic reactivation after repeated sprint exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H133-141.
- Buckenmeyer PJ, Goldfarb AH, Partilla JS, Pineyro MA & Dax EM. (1990). Endurance training, not acute exercise, differentially alters beta-receptors and cyclase in skeletal fiber types. *The American journal of physiology* **258**, E71-77.
- Burdi R, Didonna MP, Pignol B, Nico B, Mangieri D, Rolland JF, Camerino C, Zallone A, Ferro P, Andreetta F, Confalonieri P & De Luca A. (2006). First evaluation of the potential effectiveness in muscular dystrophy of a novel chimeric compound, BN 82270, acting as calpain-inhibitor and anti-oxidant. *Neuromuscul Disord* **16**, 237-248.
- Burniston JG, Chester N, Clark WA, Tan LB & Goldspink DF. (2005a). Dose-dependent apoptotic and necrotic myocyte death induced by the beta2-adrenergic receptor agonist, clenbuterol. *Muscle & nerve* **32**, 767-774.
- Burniston JG, Ng Y, Clark WA, Colyer J, Tan LB & Goldspink DF. (2002). Myotoxic effects of clenbuterol in the rat heart and soleus muscle. *J Appl Physiol* **93**, 1824-1832.
- Burniston JG, Tan LB & Goldspink DF. (2005b). beta2-Adrenergic receptor stimulation in vivo induces apoptosis in the rat heart and soleus muscle. *J Appl Physiol* **98**, 1379-1386.

- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (2004). Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer research* **64**, 6725-6731.
- Busquets S, Toledo M, Marmonti E, Orpi M, Capdevila E, Betancourt A, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2012). Formoterol treatment downregulates the myostatin system in skeletal muscle of cachectic tumour-bearing rats. *Oncology letters* **3**, 185-189.
- Busquets S, Toledo M, Sirisi S, Orpi M, Serpe R, Coutinho J, Martinez R, Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (2011). Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity. *Experimental and therapeutic medicine* **2**, 731-735.
- Bylund DB. (2007). Alpha- and beta-adrenergic receptors: Ahlquist's landmark hypothesis of a single mediator with two receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E1479-1481.
- Carbo N, Lopez-Soriano J, Tarrago T, Gonzalez O, Llovera M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1997). Comparative effects of beta2-adrenergic agonists on muscle waste associated with tumour growth. *Cancer letters* **115**, 113-118.
- Cardoso LA & Stock MJ. (1998). Effect of clenbuterol on endocrine status and nitrogen and energy balance in food-restricted rats. *Journal of animal science* **76**, 1012-1018.
- Carlsen KH, Hem E, Stensrud T, Held T, Herland K & Mowinckel P. (2001). Can asthma treatment in sports be doping? The effect of the rapid onset, long-acting inhaled beta2-agonist formoterol upon endurance performance in healthy well-trained athletes. *Respiratory medicine* **95**, 571-576.
- Carlsen KH, Ingjer F, Kirkegaard H & Thyness B. (1997). The effect of inhaled salbutamol and salmeterol on lung function and endurance performance in healthy well-trained athletes. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **7**, 160-165.
- Cartana J, Segues T, Yebras M, Rothwell NJ & Stock MJ. (1994). Anabolic effects of clenbuterol after long-term treatment and withdrawal in the rat. *Metabolism: clinical and experimental* **43**, 1086-1092.
- Cartana J & Stock MJ. (1995). Effects of clenbuterol and salbutamol on tissue rubidium uptake in vivo. *Metabolism: clinical and experimental* **44**, 119-125.
- Carter WJ, Dang AQ, Faas FH & Lynch ME. (1991). Effects of clenbuterol on skeletal muscle mass, body composition, and recovery from surgical stress in senescent rats. *Metabolism: clinical and experimental* **40**, 855-860.
- Caruso JF, Hamill JL & De Garmo N. (2005). Oral albuterol dosing during the latter stages of a resistance exercise program. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association* **19**, 102-107.
- Caruso JF, Hamill JL, Yamauchi M, Cook TD, Mercado DR & Wickel EE. (2008). Albuterol and exercise effects on ankle extensor strength during 40 days of unloading. *Aviation, space, and environmental medicine* **79**, 577-584.

- Caruso JF, Signorile JF, Perry AC, Leblanc B, Williams R, Clark M & Bamman MM. (1995). The effects of albuterol and isokinetic exercise on the quadriceps muscle group. *Medicine and science in sports and exercise* **27**, 1471-1476.
- Cavalie H, Lac G, Lebecque P, Chanteranne B, Davicco MJ & Barlet JP. (2002). Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats. *J Appl Physiol* **93**, 2034-2037.
- Cazzola M, Spina D & Matera MG. (1997). The use of bronchodilators in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **10**, 129-144.
- Chance WT, Cao LQ, Zhang FS, Foley-Nelson T & Fischer JE. (1991a). Clenbuterol treatment increases muscle mass and protein content of tumor-bearing rats maintained on total parenteral nutrition. *Jpen* **15**, 530-535.
- Chance WT, von Allmen D, Benson D, Zhang FS & Fischer JE. (1991b). Clenbuterol decreases catabolism and increases hypermetabolism in burned rats. *The Journal of trauma* **31**, 365-370.
- Chao LC, Zhang Z, Pei L, Saito T, Tontonoz P & Pilch PF. (2007). Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **21**, 2152-2163.
- Chen A, Brar B, Choi CS, Rousso D, Vaughan J, Kuperman Y, Kim SN, Donaldson C, Smith SM, Jamieson P, Li C, Nagy TR, Shulman GI, Lee KF & Vale W. (2006). Urocortin 2 modulates glucose utilization and insulin sensitivity in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16580-16585.
- Chen AE, Ginty DD & Fan CM. (2005). Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature* **433**, 317-322.
- Chen H, Tsalkova T, Mei FC, Hu Y, Cheng X & Zhou J. (2012). 5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydropyrimidines as potent antagonists targeting exchange proteins directly activated by cAMP. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **22**, 4038-4043.
- Chen M, Feng HZ, Gupta D, Kelleher J, Dickerson KE, Wang J, Hunt D, Jou W, Gavrilova O, Jin JP & Weinstein LS. (2009). G(s)alpha deficiency in skeletal muscle leads to reduced muscle mass, fiber-type switching, and glucose intolerance without insulin resistance or deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C930-940.
- Cheng SW, Fryer LG, Carling D & Shepherd PR. (2004). Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *The Journal of biological chemistry* **279**, 15719-15722.
- Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW & Chu CT. (2010). Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *The Journal of cell biology* **190**, 533-539.
- Chodorowski Z & Sein Anand J. (1997). Acute poisoning with clenbuterol--a case report. *Przegląd lekarski* **54**, 763-764.

- Choo-Kang YF, Simpson WT & Grant IW. (1969). Controlled comparison of the bronchodilator effects of three beta-adrenergic stimulant drugs administered by inhalation to patients with asthma. *British medical journal* **2**, 287-289.
- Choo JJ, Horan MA, Little RA & Rothwell NJ. (1989). Muscle wasting associated with endotoxemia in the rat: modification by the beta 2-adrenoceptor agonist clenbuterol. *Bioscience reports* **9**, 615-621.
- Choo JJ, Horan MA, Little RA & Rothwell NJ. (1992). Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by beta 2-adrenoceptor activation. *The American journal of physiology* **263**, E50-56.
- Christensen AE, Selheim F, de Rooij J, Dremier S, Schwede F, Dao KK, Martinez A, Maenhaut C, Bos JL, Genieser HG & Doskeland SO. (2003). cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *The Journal of biological chemistry* **278**, 35394-35402.
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR & Goodman RH. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**, 855-859.
- Chung KY, Rasmussen SG, Liu T, Li S, DeVree BT, Chae PS, Calinski D, Kobilka BK, Woods VL, Jr. & Sunahara RK. (2011). Conformational changes in the G protein Gs induced by the beta2 adrenergic receptor. *Nature* **477**, 611-615.
- Claing A, Laporte SA, Caron MG & Lefkowitz RJ. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* **66**, 61-79.
- Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG & Yeaman SJ. (2000). Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **275**, 5011-5015.
- Cockman MD, Jones MB, Prenger MC & Sheldon RJ. (2001). Magnetic resonance imaging of denervation-induced muscle atrophy: effects of clenbuterol in the rat. *Muscle & nerve* **24**, 1647-1658.
- Coleman ME, DeMayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C & Schwartz RJ. (1995). Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* **270**, 12109-12116.
- Coleman RA, Johnson M, Nials AT & Vardey CJ. (1996). Exosites: their current status, and their relevance to the duration of action of long-acting beta 2-adrenoceptor agonists. *Trends in pharmacological sciences* **17**, 324-330.
- Collins S, Bouvier M, Bolanowski MA, Caron MG & Lefkowitz RJ. (1989). cAMP stimulates transcription of the beta 2-adrenergic receptor gene in response to short-term agonist exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 4853-4857.

- Collomp K, Candau R, Collomp R, Carra J, Lasne F, Prefaut C & De Ceaurreiz J. (2000a). Effects of acute ingestion of salbutamol during submaximal exercise. *International journal of sports medicine* **21**, 480-484.
- Collomp K, Candau R, Lasne F, Labsy Z, Prefaut C & De Ceaurreiz J. (2000b). Effects of short-term oral salbutamol administration on exercise endurance and metabolism. *J Appl Physiol* **89**, 430-436.
- Collomp K, Candau R, Millet G, Mucci P, Borrani F, Prefaut C & De Ceaurreiz J. (2002). Effects of salbutamol and caffeine ingestion on exercise metabolism and performance. *International journal of sports medicine* **23**, 549-554.
- Collomp K, Le Panse B, Candau R, Lecoq A-M & De Ceaurreiz J. (2010). Beta-2 agonists and exercise performance in humans. *Science & Sports* **25**, 281-290.
- Collomp K, Le Panse B, Portier H, Lecoq AM, Jaffre C, Beaupied H, Richard O, Benhamou L, Courteix D & De Ceaurreiz J. (2005). Effects of acute salbutamol intake during a Wingate test. *International journal of sports medicine* **26**, 513-517.
- Comité de coordination de toxicovigilance. (2010). Clenbutérol : étude rétrospective des observations notifiées entre 2000 à 2008, pp. 1-30.
- Cong M, Thompson VF, Goll DE & Antin PB. (1998). The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *The Journal of biological chemistry* **273**, 660-666.
- Conti-Fine BM, Milani M & Kaminski HJ. (2006). Myasthenia gravis: past, present, and future. *The Journal of clinical investigation* **116**, 2843-2854.
- Costelli P, Garcia-Martinez C, Llovera M, Carbo N, Lopez-Soriano FJ, Agell N, Tessitore L, Baccino FM & Argiles JM. (1995a). Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *The Journal of clinical investigation* **95**, 2367-2372.
- Costelli P, Llovera M, Garcia-Martinez C, Carbo N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1995b). Enhanced leucine oxidation in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130) and its reversal by clenbuterol. *Cancer letters* **91**, 73-78.
- Criswell DS, Powers SK & Herb RA. (1996). Clenbuterol-induced fiber type transition in the soleus of adult rats. *European journal of applied physiology and occupational physiology* **74**, 391-396.
- Crivelli G, Millet GP, Gremion G & Borrani F. (2011). Effects of salbutamol on the contractile properties of human skeletal muscle before and after fatigue. *Acta physiologica (Oxford, England)* **203**, 311-320.
- Cullum VA, Farmer JB, Jack D & Levy GP. (1969). Salbutamol: a new, selective beta-adrenoceptive receptor stimulant. *British journal of pharmacology* **35**, 141-151.



- Culmsee C, Junker V, Kremers W, Thal S, Plesnila N & Krieglstein J. (2004). Combination therapy in ischemic stroke: synergistic neuroprotective effects of memantine and clenbuterol. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **35**, 1197-1202.
- Culmsee C, Stumm RK, Schafer MK, Weihe E & Krieglstein J. (1999). Clenbuterol induces growth factor mRNA, activates astrocytes, and protects rat brain tissue against ischemic damage. *European journal of pharmacology* **379**, 33-45.
- D'Agostino B, Polverino M, Cirino G, Lombardi A, Grassi B, Sullo N, Santoriello C, Polverino F, Orlozzi D, Matteis M & Rossi F. (2010). Exercise capacity and cytochrome oxidase activity in muscle mitochondria of COPD patients. *Respiratory medicine* **104**, 83-90.
- Daaka Y, Luttrell LM & Lefkowitz RJ. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91.
- Dale HH. (1906). On some physiological actions of ergot. *The Journal of physiology* **34**, 163-206.
- Dalrymple RH, Baker PK, Gingher PE, Ingle DL, Pensack JM & Ricks CA. (1984). A repartitioning agent to improve performance and carcass composition of broilers. *Poultry science* **63**, 2376-2383.
- Daubert GP, Mabasa VH, Leung VW & Aaron C. (2007). Acute clenbuterol overdose resulting in supraventricular tachycardia and atrial fibrillation. *J Med Toxicol* **3**, 56-60.
- Davis JM, Alderson NL & Welsh RS. (2000). Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. *The American journal of clinical nutrition* **72**, 573S-578S.
- de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A & Bos JL. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *The Journal of biological chemistry* **275**, 20829-20836.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A & Bos JL. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.
- Deconinck N & Dan B. (2007). Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatric neurology* **36**, 1-7.
- Decorte N, Bachasson D, Guinot M, Flore P, Levy P, Verges S & Wuyam B. (2013). Impact of Salbutamol on Neuromuscular Function in Endurance Athletes. *Medicine and science in sports and exercise*.
- Deshaies Y, Willemot J & Leblanc J. (1981). Protein synthesis, amino acid uptake, and pools during isoproterenol-induced hypertrophy of the rat heart and tibialis muscle. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **59**, 113-121.
- Dodd SL, Powers SK, Vrabas IS, Criswell D, Stetson S & Hussain R. (1996). Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle. *Medicine and science in sports and exercise* **28**, 669-676.

- Douillard A, Galbes O, Begue G, Rossano B, Levin J, Vernus B, Bonniou A, Candau R & Py G. (2012). Calpastatin overexpression in the skeletal muscle of mice prevents clenbuterol-induced muscle hypertrophy and phenotypic shift. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **39**, 364-372.
- Douillard A, Galbes O, Rossano B, Vernus B, Bonniou A, Candau R & Py G. (2011). Time course in calpain activity and autolysis in slow and fast skeletal muscle during clenbuterol treatment. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **89**, 117-125.
- Drews J. (2000). Drug discovery: a historical perspective. *Science (New York, NY)* **287**, 1960-1964.
- Dror RO, Arlow DH, Maragakis P, Mildorf TJ, Pan AC, Xu H, Borhani DW & Shaw DE. (2011). Activation mechanism of the beta2-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18684-18689.
- Drug Enforcement Administration. (2011). Clenbuterol. *Drug & Chemical Evaluation Section*.
- Duarte T, Menezes-Rodrigues FS & Godinho RO. (2012). Contribution of the extracellular cAMP-adenosine pathway to dual coupling of beta2-adrenoceptors to Gs and Gi proteins in mouse skeletal muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **341**, 820-828.
- Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M & Karsenty G. (1999). A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes & development* **13**, 1025-1036.
- Duncan ND, Williams DA & Lynch GS. (2000). Deleterious effects of chronic clenbuterol treatment on endurance and sprint exercise performance in rats. *Clin Sci (Lond)* **98**, 339-347.
- Dupont-Versteegden EE. (1996). Exercise and clenbuterol as strategies to decrease the progression of muscular dystrophy in mdx mice. *J Appl Physiol* **80**, 734-741.
- Dupont-Versteegden EE, Katz MS & McCarter RJ. (1995). Beneficial versus adverse effects of long-term use of clenbuterol in mdx mice. *Muscle & nerve* **18**, 1447-1459.
- Ehrlich P. (1913). Address in Pathology, ON CHEMIOTHERAPY: Delivered before the Seventeenth International Congress of Medicine. *British medical journal* **2**, 353-359.
- Eisemann JH, Huntington GB & Ferrell CL. (1988). Effects of dietary clenbuterol on metabolism of the hindquarters in steers. *Journal of animal science* **66**, 342-353.
- Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C & Karsenty G. (2005). Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* **434**, 514-520.

- Elers J, Morkeberg J, Jansen T, Belhage B & Backer V. (2012). High-dose inhaled salbutamol has no acute effects on aerobic capacity or oxygen uptake kinetics in healthy trained men. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **22**, 232-239.
- Elfellah MS, Dalling R, Kantola IM & Reid JL. (1989). Beta-adrenoceptors and human skeletal muscle characterisation of receptor subtype and effect of age. *British journal of clinical pharmacology* **27**, 31-38.
- Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ & Winter PD. (1984). Chronic effects of beta 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Bioscience reports* **4**, 83-91.
- English C, McLennan H, Thoirs K, Coates A & Bernhardt J. (2010). Loss of skeletal muscle mass after stroke: a systematic review. *Int J Stroke* **5**, 395-402.
- Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL & Bos JL. (2002). A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature cell biology* **4**, 901-906.
- Estrada-Montoya MC, González-Córdova AF, Torrescano G, Camou JP & Vallejo-Cordoba B. (2008). Screening and confirmatory determination of clenbuterol residues in bovine meat marketed in the Northwest of Mexico *Cienc Tecnol Aliment* **6**, 130-136.
- Evans BA, Papaioannou M, Bonazzi VR & Summers RJ. (1996). Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat tissues. *British journal of pharmacology* **117**, 210-216.
- Fass DM, Butler JE & Goodman RH. (2003). Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes. *The Journal of biological chemistry* **278**, 43014-43019.
- Favier FB, Benoit H & Freyssenet D. (2008). Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch* **456**, 587-600.
- Fearon KC, Glass DJ & Guttridge DC. (2012). Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell metabolism* **16**, 153-166.
- Ferguson SS. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* **53**, 1-24.
- Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E & Blenis J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes & development* **16**, 1472-1487.
- Fitton AR, Berry MS & McGregor AD. (2001). Preservation of denervated muscle form and function by clenbuterol in a rat model of peripheral nerve injury. *Journal of hand surgery (Edinburgh, Scotland)* **26**, 335-346.
- Fowler EG, Graves MC, Wetzel GT & Spencer MJ. (2004). Pilot trial of albuterol in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurology* **62**, 1006-1008.

- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG & Schioth HB. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralagon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* **63**, 1256-1272.
- Fredriksson R & Schioth HB. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Molecular pharmacology* **67**, 1414-1425.
- Frerichs O, Fansa H, Ziems P, Schneider W & Keilhoff G. (2001). Regeneration of peripheral nerves after clenbuterol treatment in a rat model. *Muscle & nerve* **24**, 1687-1691.
- Freyssenet D. (2010). Les mécanismes du contrôle de la masse musculaire. *Les cahiers de myologie* **3**, 11-13.
- Fulster S, Tacke M, Sandek A, Ebner N, Tschöpe C, Doehner W, Anker SD & von Haehling S. (2013). Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF). *European heart journal* **34**, 512-519.
- Fuster G, Busquets S, Ametller E, Oliván M, Almendro V, de Oliveira CC, Figueras M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2007). Are peroxisome proliferator-activated receptors involved in skeletal muscle wasting during experimental cancer cachexia? Role of beta2-adrenergic agonists. *Cancer research* **67**, 6512-6519.
- Garssen GJ, Geesink GH, Hoving-Bolink AH & Verplanke JC. (1995). Effects of dietary clenbuterol and salbutamol on meat quality in veal calves. *Meat science* **40**, 337-350.
- Garton AJ, Campbell DG, Carling D, Hardie DG, Colbran RJ & Yeaman SJ. (1989). Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *European journal of biochemistry / FEBS* **179**, 249-254.
- Geesink GH, Smulders FJ, van Laack HL, van der Kolk JH, Wensing T & Breukink HJ. (1993). Effects on meat quality of the use of clenbuterol in veal calves. *Journal of animal science* **71**, 1161-1170.
- Gehrig SM, Koopman R, Naim T, Tjoakarfa C & Lynch GS. (2010). Making fast-twitch dystrophic muscles bigger protects them from contraction injury and attenuates the dystrophic pathology. *The American journal of pathology* **176**, 29-33.
- Glass DJ. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**, 1974-1984.
- Gleiter CH, Becker T, Schreeb KH, Freudenthaler S & Gundert-Remy U. (1997). Fenoterol but not dobutamine increases erythropoietin production in humans. *Clinical pharmacology and therapeutics* **61**, 669-676.
- Goldspink DF, Burniston JG, Ellison GM, Clark WA & Tan LB. (2004). Catecholamine-induced apoptosis and necrosis in cardiac and skeletal myocytes of the rat in vivo: the same or separate death pathways? *Experimental physiology* **89**, 407-416.

- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A & Goldberg AL. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14440-14445.
- Goncalves DA, Lira EC, Baviera AM, Cao P, Zanon NM, Arany Z, Bedard N, Tanksale P, Wing SS, Lecker SH, Kettelhut IC & Navegantes LC. (2009). Mechanisms involved in 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. *Endocrinology* **150**, 5395-5404.
- Goncalves DA, Silveira WA, Lira EC, Graca FA, Paula-Gomes S, Zanon NM, Kettelhut IC & Navegantes LC. (2012). Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**, E123-133.
- Gosmanov AR, Wong JA & Thomason DB. (2002). Duality of G protein-coupled mechanisms for beta-adrenergic activation of NKCC activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1025-1032.
- Goubault C, Perault MC, Leleu E, Bouquet S, Legros P, Vandell B & Denjean A. (2001). Effects of inhaled salbutamol in exercising non-asthmatic athletes. *Thorax* **56**, 675-679.
- Granneman JG. (2001). The putative beta4-adrenergic receptor is a novel state of the beta1-adrenergic receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E199-202.
- Gratze G, Rudnicki R, Urban W, Mayer H, Schlogl A & Skrabal F. (2005). Hemodynamic and autonomic changes induced by Ironman: prediction of competition time by blood pressure variability. *Journal of Applied Physiology* **99**, 1728-1735.
- Green CP & Price JF. (1992). Prevention of exercise induced asthma by inhaled salmeterol xinafoate. *Archives of disease in childhood* **67**, 1014-1017.
- Gross DM & Fisher JW. (1978). Effects of terbutaline, a synthetic beta adrenoceptor agonist, on in vivo erythropoietin production. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* **236**, 192-201.
- Guddat S, Fussholler G, Geyer H, Thomas A, Braun H, Haenelt N, Schwenke A, Klose C, Thevis M & Schanzer W. (2012). Clenbuterol - regional food contamination a possible source for inadvertent doping in sports. *Drug testing and analysis* **4**, 534-538.
- Guhan AR, Cooper S, Osborne J, Lewis S, Bennett J & Tattersfield AE. (2000). Systemic effects of formoterol and salmeterol: a dose-response comparison in healthy subjects. *Thorax* **55**, 650-656.
- Haddad F & Adams GR. (2004). Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. *J Appl Physiol* **96**, 203-210.
- Haffner CA, Kendall MJ, Maxwell S & Hughes B. (1993). The lipolytic effect of beta 1- and beta 2-adrenoceptor activation in healthy human volunteers. *British journal of clinical pharmacology* **35**, 35-39.

- Hall-Angeras M, Angeras U, Hasselgren PO & Fischer JE. (1990). Effects of elevated temperature on protein breakdown in muscles from septic rats. *The American journal of physiology* **258**, C589-592.
- Hallberg H, Almgren O & Svensson TH. (1981). Increased brain serotonergic and noradrenergic activity after repeated systemic administration of the beta-2 adrenoceptor agonist salbutamol, a putative antidepressant drug. *Psychopharmacology* **73**, 201-204.
- Han RQ, Ouyang YB, Xu L, Agrawal R, Patterson AJ & Giffard RG. (2009). Postischemic brain injury is attenuated in mice lacking the beta2-adrenergic receptor. *Anesthesia and analgesia* **108**, 280-287.
- Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT & Spiegelman BM. (2003). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7111-7116.
- Harcourt LJ, Schertzer JD, Ryall JG & Lynch GS. (2007). Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue. *Neuromuscul Disord* **17**, 47-55.
- Harrington D, Chua TP & Coats AJ. (2000). The effect of salbutamol on skeletal muscle in chronic heart failure. *International journal of cardiology* **73**, 257-265.
- Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR, Gout I, Downes CP & Lamb RF. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *The Journal of cell biology* **166**, 213-223.
- Hart DW, Wolf SE, Mlcak R, Chinkes DL, Ramzy PI, Obeng MK, Ferrando AA, Wolfe RR & Herndon DN. (2000). Persistence of muscle catabolism after severe burn. *Surgery* **128**, 312-319.
- Hayes A & Williams DA. (1998). Examining potential drug therapies for muscular dystrophy utilising the dy/dy mouse: I. Clenbuterol. *Journal of the neurological sciences* **157**, 122-128.
- Hedberg A, Mattsson H, Nerme V & Carlsson E. (1984). Effects of in vivo treatment with isoprenaline or prenalterol on beta-adrenoceptor mechanisms in the heart and soleus muscle of the cat. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **325**, 251-258.
- Heir T & Stemshaug H. (1995). Salbutamol and high-intensity treadmill running in nonasthmatic highly conditioned athletes. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **5**, 231-236.
- Helenius IJ, Rytala P, Metso T, Haahtela T, Venge P & Tikkanen HO. (1998a). Respiratory symptoms, bronchial responsiveness, and cellular characteristics of induced sputum in elite swimmers. *Allergy* **53**, 346-352.

- Helenius IJ, Tikkanen HO & Haahtela T. (1998b). Occurrence of exercise induced bronchospasm in elite runners: dependence on atopy and exposure to cold air and pollen. *British journal of sports medicine* **32**, 125-129.
- Herrera NM, Jr., Zimmerman AN, Dykstra DD & Thompson LV. (2001). Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study of hindlimb-unweighted rats. *Archives of physical medicine and rehabilitation* **82**, 930-934.
- Hesketh JE, Campbell GP, Loblely GE, Maltin CA, Acamovic F & Palmer RM. (1992). Stimulation of actin and myosin synthesis in rat gastrocnemius muscle by clenbuterol; evidence for translational control. *Comp Biochem Physiol C* **102**, 23-27.
- Higgins JA, Lasslett YV, Bardsley RG & Buttery PJ. (1988). The relation between dietary restriction or clenbuterol (a selective beta 2 agonist) treatment on muscle growth and calpain proteinase (EC 3.4.22.17) and calpastatin activities in lambs. *The British journal of nutrition* **60**, 645-652.
- Hinkle RT, Dolan E, Cody DB, Bauer MB & Isfort RJ. (2005). Phosphodiesterase 4 inhibition reduces skeletal muscle atrophy. *Muscle & nerve* **32**, 775-781.
- Hinkle RT, Donnelly E, Cody DB, Samuelsson S, Lange JS, Bauer MB, Tarnopolsky M, Sheldon RJ, Coste SC, Tobar E, Stenzel-Poore MP & Isfort RJ. (2003). Activation of the CRF 2 receptor modulates skeletal muscle mass under physiological and pathological conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E889-898.
- Hinkle RT, Hodge KM, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK & Isfort RJ. (2002). Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle & nerve* **25**, 729-734.
- Hislop JN & von Zastrow M. (2011). Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G-protein-coupled receptors. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **12**, 137-148.
- Hollyoak MA, Muller MJ, Meyers NA, Williams WG, Barrow RE & Herndon DN. (1995). Beneficial wound healing and metabolic effects of clenbuterol in burned and nonburned rats. *The Journal of burn care & rehabilitation* **16**, 233-240.
- Holt RI, Erotokritou-Mulligan I & Sonksen PH. (2009). The history of doping and growth hormone abuse in sport. *Growth Horm IGF Res* **19**, 320-326.
- Holz GG, Kang G, Harbeck M, Roe MW & Chepurny OG. (2006). Cell physiology of cAMP sensor Epac. *The Journal of physiology* **577**, 5-15.
- Hutchinson DS & Bengtsson T. (2006). AMP-activated protein kinase activation by adrenoceptors in L6 skeletal muscle cells: mediation by alpha1-adrenoceptors causing glucose uptake. *Diabetes* **55**, 682-690.
- Hyltander A, Svaninger G & Lundholm K. (1993). The effect of clenbuterol on body composition in spontaneously eating tumour-bearing mice. *Bioscience reports* **13**, 325-331.
- Iezzi S, Di Padova M, Serra C, Caretti G, Simone C, Maklan E, Minetti G, Zhao P, Hoffman EP, Puri PL & Sartorelli V. (2004). Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by

- promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Developmental cell* **6**, 673-684.
- Illera JC, Silvan G, Blass A, Martinez MM & Illera M. (1998). The effect of clenbuterol on adrenal function in rats. *The Analyst* **123**, 2521-2524.
- Inagaki T, Tachibana M, Magoori K, Kudo H, Tanaka T, Okamura M, Naito M, Kodama T, Shinkai Y & Sakai J. (2009). Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice. *Genes Cells* **14**, 991-1001.
- Ingalls CP, Barnes WS & Smith SB. (1996). Interaction between clenbuterol and run training: effects on exercise performance and MLC isoform content. *J Appl Physiol* **80**, 795-801.
- Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ & Lefkowitz RJ. (1993). Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *The Journal of biological chemistry* **268**, 23735-23738.
- Inoki K, Zhu T & Guan KL. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590.
- Ito T, Fujimura N, Omote K & Namiki A. (2006). A selective beta2-adrenergic agonist, terbutaline, improves sepsis-induced diaphragmatic dysfunction in the rat. *Life sciences* **79**, 905-912.
- Izumiya Y, Hopkins T, Morris C, Sato K, Zeng L, Viereck J, Hamilton JA, Ouchi N, LeBrasseur NK & Walsh K. (2008). Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell metabolism* **7**, 159-172.
- Jelkmann W & Bauer C. (1980). beta 2-Adrenergic stimulation of erythropoiesis in busulfan treated mice. *Experimental hematology* **8**, 742-748.
- Jensen J, Brennesvik EO, Bergersen H, Oseland H, Jebens E & Brors O. (2002). Quantitative determination of cell surface beta-adrenoceptors in different rat skeletal muscles. *Pflugers Arch* **444**, 213-219.
- Jiang GL, Gu YD, Zhang LY, Shen LY, Yu C & Xu JG. (2011). Randomized, double-blind, and placebo-controlled trial of clenbuterol in denervated muscle atrophy. *ISRN pharmaceuticals* **2011**, 981254.
- Johnson M. (2001). Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists. *Paediatr Respir Rev* **2**, 57-62.
- Jones SW, Baker DJ & Greenhaff PL. (2003). G protein-coupled receptor kinases 2 and 5 are differentially expressed in rat skeletal muscle and remain unchanged following beta2-agonist administration. *Experimental physiology* **88**, 277-284.
- Jones SW, Parr T, Sensky PL, Scothern GP, Bardsley RG & Buttery PJ. (1999). Fibre type-specific expression of p94, a skeletal muscle-specific calpain. *Journal of muscle research and cell motility* **20**, 417-424.



- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y & Yoshimori T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* **19**, 5720-5728.
- Kamalakkannan G, Petrilli CM, George I, LaManca J, McLaughlin BT, Shane E, Mancini DM & Maybaum S. (2008). Clenbuterol increases lean muscle mass but not endurance in patients with chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant* **27**, 457-461.
- Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I & 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. *The Journal of biological chemistry* **279**, 41114-41123.
- Kato K, Ito H, Kamei K, Iwamoto I & Inaguma Y. (2002). Innervation-dependent phosphorylation and accumulation of alphaB-crystallin and Hsp27 as insoluble complexes in disused muscle. *Faseb J* **16**, 1432-1434.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE & Graybiel AM. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science (New York, NY)* **282**, 2275-2279.
- Kearns CF, McKeever KH, Malinowski K, Struck MB & Abe T. (2001). Chronic administration of therapeutic levels of clenbuterol acts as a repartitioning agent. *J Appl Physiol* **91**, 2064-2070.
- Kellenberger S, Muller K, Richener H & Bilbe G. (1998). Formoterol and isoproterenol induce c-fos gene expression in osteoblast-like cells by activating beta2-adrenergic receptors. *Bone* **22**, 471-478.
- Kenley RA, Denissenko MF, Mullin RJ, Story J & Ekblom J. (2008). Formoterol fumarate and roxithromycin effects on muscle mass in an animal model of cancer cachexia. *Oncology reports* **19**, 1113-1121.
- Kierzkowska B, Stanczyk J & Kasprzak JD. (2005). Myocardial infarction in a 17-year-old body builder using clenbuterol. *Circ J* **69**, 1144-1146.
- Kilarski W & Sjoström M. (1990). Systematic distribution of muscle fibre types in the rat and rabbit diaphragm: a morphometric and ultrastructural analysis. *Journal of anatomy* **168**, 13-30.
- Kim HJ, Lee S & Jung JU. (2010a). When autophagy meets viruses: a double-edged sword with functions in defense and offense. *Seminars in immunopathology* **32**, 323-341.
- Kim HK, Della-Fera MA, Hausman DB & Baile CA. (2010b). Effect of clenbuterol on apoptosis, adipogenesis, and lipolysis in adipocytes. *Journal of physiology and biochemistry* **66**, 197-203.
- Kim KH, Kim YS & Yang J. (2011). The muscle-hypertrophic effect of clenbuterol is additive to the hypertrophic effect of myostatin suppression. *Muscle & nerve* **43**, 700-707.

- Kim YM & Benovic JL. (2002). Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *The Journal of biological chemistry* **277**, 30760-30768.
- Kim YS, Sainz RD, Molenaar P & Summers RJ. (1991). Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochemical pharmacology* **42**, 1783-1789.
- Kinali M, Mercuri E, Main M, De Biasia F, Karatza A, Higgins R, Banks LM, Manzur AY & Muntoni F. (2002). Pilot trial of albuterol in spinal muscular atrophy. *Neurology* **59**, 609-610.
- Kissel JT, McDermott MP, Mendell JR, King WM, Pandya S, Griggs RC & Tawil R. (2001). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of albuterol in facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology* **57**, 1434-1440.
- Kissel JT, McDermott MP, Natarajan R, Mendell JR, Pandya S, King WM, Griggs RC & Tawil R. (1998). Pilot trial of albuterol in facioscapulohumeral muscular dystrophy. FSH-DY Group. *Neurology* **50**, 1402-1406.
- Kitaura T, Tsunekawa N & Kraemer WJ. (2002). Inhibited longitudinal growth of bones in young male rats by clenbuterol. *Medicine and science in sports and exercise* **34**, 267-273.
- Kline WO, Panaro FJ, Yang H & Bodine SC. (2007). Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *J Appl Physiol* **102**, 740-747.
- Koerberl DD, Li S, Dai J, Thurberg BL, Bali D & Kishnani PS. (2012). beta2 Agonists enhance the efficacy of simultaneous enzyme replacement therapy in murine Pompe disease. *Molecular genetics and metabolism* **105**, 221-227.
- Koerberl DD, Luo X, Sun B, McVie-Wylie A, Dai J, Li S, Banugaria SG, Chen YT & Bali DS. (2011). Enhanced efficacy of enzyme replacement therapy in Pompe disease through mannose-6-phosphate receptor expression in skeletal muscle. *Molecular genetics and metabolism* **103**, 107-112.
- Kolb SJ & Kissel JT. (2011). Spinal muscular atrophy: a timely review. *Archives of neurology* **68**, 979-984.
- Koohmaraie M, Shackelford SD, Muggli-Cockett NE & Stone RT. (1991). Effect of the beta-adrenergic agonist L644,969 on muscle growth, endogenous proteinase activities, and postmortem proteolysis in wether lambs. *Journal of animal science* **69**, 4823-4835.
- Koopman R, Gehrig SM, Leger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT & Lynch GS. (2010). Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic {beta}-adrenoceptor stimulation in mice. *The Journal of physiology* **588**, 4811-4823.
- Kortholt A, Bolourani P, Rehmann H, Keizer-Gunnink I, Weeks G, Wittinghofer A & Van Haastert PJ. (2010). A Rap/phosphatidylinositol 3-kinase pathway controls pseudopod formation [corrected]. *Molecular biology of the cell* **21**, 936-945.

- Krief S, Lonnqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D & Emorine LJ. (1993). Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *The Journal of clinical investigation* **91**, 344-349.
- Kumar R & Sharma S. (2006). Remodeling of extracellular matrix protein, collagen by beta-adrenoceptor stimulation and denervation in mouse gastrocnemius muscle. *J Physiol Sci* **56**, 87-94.
- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR & Goodman RH. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**, 223-226.
- Langley JN. (1905). On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *The Journal of physiology* **33**, 374-413.
- Larsson K, Ohlson P, Larsson L, Malmberg P, Rydstrom PO & Ulriksen H. (1993). High prevalence of asthma in cross country skiers. *BMJ (Clinical research ed)* **307**, 1326-1329.
- Lauffer BE, Melero C, Temkin P, Lei C, Hong W, Kortemme T & von Zastrow M. (2010). SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *The Journal of cell biology* **190**, 565-574.
- Le Panse B, Arlettaz A, Portier H, Lecoq AM, De Ceaurriz J & Collomp K. (2006). Short term salbutamol ingestion and supramaximal exercise in healthy women. *British journal of sports medicine* **40**, 627-631.
- Le Panse B, Collomp K, Portier H, Lecoq AM, Jaffre C, Beauplied H, Richard O, Benhamou L, De Ceaurriz J & Courteix D. (2005). Effects of short-term salbutamol ingestion during a Wingate test. *International journal of sports medicine* **26**, 518-523.
- Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE & Goldberg AL. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J* **18**, 39-51.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M & et al. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**, 155-165.
- Lenard NR, Gettys TW & Dunn AJ. (2003). Activation of beta2- and beta3-adrenergic receptors increases brain tryptophan. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **305**, 653-659.
- Lew R & Summers RJ. (1985). Autoradiographic localization of beta-adrenoceptor subtypes in guinea-pig kidney. *British journal of pharmacology* **85**, 341-348.
- Li J & Assmann SM. (2000). Mass spectrometry. An essential tool in proteome analysis. *Plant physiology* **123**, 807-809.

- Li S, Sun B, Nilsson MI, Bird A, Tarnopolsky MA, Thurberg BL, Bali D & Koeberl DD. (2013). Adjunctive beta2-agonists reverse neuromuscular involvement in murine Pompe disease. *Faseb J* **27**, 34-44.
- Li Y, He J, Sui S, Hu X, Zhao Y & Li N. (2012). Clenbuterol upregulates histone demethylase JHDM2a via the beta(2)-adrenoceptor/cAMP/PKA/p-CREB signaling pathway. *Cellular signalling* **24**, 2297-2306.
- Liang W & Mills SE. (2002). Quantitative analysis of beta-adrenergic receptor subtypes in pig tissues. *Journal of animal science* **80**, 963-970.
- Liggett SB, Shah SD & Cryer PE. (1988). Characterization of beta-adrenergic receptors of human skeletal muscle obtained by needle biopsy. *The American journal of physiology* **254**, E795-798.
- Lin FT, Chen W, Shenoy S, Cong M, Exum ST & Lefkowitz RJ. (2002). Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* **41**, 10692-10699.
- Lira EC, Graca FA, Goncalves DA, Zanon NM, Baviera AM, Strindberg L, Lonroth P, Migliorini RH, Kettelhut IC & Navegantes LC. (2007). Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats. *Shock (Augusta, Ga)* **27**, 687-694.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ & Wirth B. (1999). A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6307-6311.
- Luno M, Beltran JA, Jaime I & Roncales P. (1999). Textural assessment of clenbuterol treatment in beef. *Meat science* **51**, 297-303.
- Luo GJ, Sun X & Hasselgren PO. (2000). Hyperthermia stimulates energy-proteasome-dependent protein degradation in cultured myotubes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R749-756.
- Luo J, Sobkiw CL, Hirshman MF, Logsdon MN, Li TQ, Goodyear LJ & Cantley LC. (2006). Loss of class IA PI3K signaling in muscle leads to impaired muscle growth, insulin response, and hyperlipidemia. *Cell metabolism* **3**, 355-366.
- Lynch GS, Hayes A, Campbell SP & Williams DA. (1996). Effects of beta 2-agonist administration and exercise on contractile activation of skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* **81**, 1610-1618.
- Lynch GS, Hinkle RT, Chamberlain JS, Brooks SV & Faulkner JA. (2001a). Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. *The Journal of physiology* **535**, 591-600.
- Lynch GS, Hinkle RT & Faulkner JA. (1999). Year-long clenbuterol treatment of mice increases mass, but not specific force or normalized power, of skeletal muscles. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **26**, 117-120.

- Lynch GS, Hinkle RT & Faulkner JA. (2000). Power output of fast and slow skeletal muscles of mdx (dystrophic) and control mice after clenbuterol treatment. *Experimental physiology* **85**, 295-299.
- Lynch GS, Hinkle RT & Faulkner JA. (2001b). Force and power output of diaphragm muscle strips from mdx and control mice after clenbuterol treatment. *Neuromuscul Disord* **11**, 192-196.
- Lynch GS & Ryall JG. (2008). Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiological reviews* **88**, 729-767.
- Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Pandolfi PP. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**, 179-193.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Bonner P, Bernardi R, Franz DN, Witte D, Cordon-Cardo C & Pandolfi PP. (2007). Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer. *Cancer research* **67**, 7106-7112.
- MacLennan PA & Edwards RH. (1989). Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass. Evidence that clenbuterol stimulates muscle beta-adrenoceptors to induce hypertrophy. *The Biochemical journal* **264**, 573-579.
- Maehle AH, Prull CR & Halliwell RF. (2002). The emergence of the drug receptor theory. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 637-641.
- Malik R & Marchese A. (2012). Role of Beta-Arrestins in Endosomal Sorting of G Protein-Coupled Receptors. In *Chemical Biology*, ed. Ekinici D, pp. 253-266. InTech.
- Maltin CA & Delday MI. (1992). Satellite cells in innervated and denervated muscles treated with clenbuterol. *Muscle & nerve* **15**, 919-925.
- Maltin CA, Delday MI, Campbell GP & Hesketh JE. (1993a). Clenbuterol mimics effects of innervation on myogenic regulatory factor expression. *The American journal of physiology* **265**, E176-178.
- Maltin CA, Delday MI, Hay SM, Innes GM & Williams PE. (1990). Effects of bovine pituitary growth hormone alone or in combination with the beta-agonist clenbuterol on muscle growth and composition in veal calves. *The British journal of nutrition* **63**, 535-545.
- Maltin CA, Delday MI, Watson JS, Heys SD, Nevison IM, Ritchie IK & Gibson PH. (1993b). Clenbuterol, a beta-adrenoceptor agonist, increases relative muscle strength in orthopaedic patients. *Clin Sci (Lond)* **84**, 651-654.
- Maltin CA, Hay SM, Delday MI, Lobleby GE & Reeds PJ. (1989). The action of the beta-agonist clenbuterol on protein metabolism in innervated and denervated phasic muscles. *The Biochemical journal* **261**, 965-971.

- Maltin CA, Hay SM, Delday MI, Smith FG, Lobley GE & Reeds PJ. (1987). Clenbuterol, a beta agonist, induces growth in innervated and denervated rat soleus muscle via apparently different mechanisms. *Bioscience reports* **7**, 525-532.
- Maltin CA, Reeds PJ, Delday MI, Hay SM, Smith FG & Lobley GE. (1986). Inhibition and reversal of denervation-induced atrophy by the beta-agonist growth promoter, clenbuterol. *Bioscience reports* **6**, 811-818.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S & Sandri M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* **6**, 458-471.
- Marquis K, Debigare R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J, Carrier G & Maltais F. (2002). Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* **166**, 809-813.
- Martina JA, Chen Y, Gucek M & Puertollano R. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**, 903-914.
- Martineau L, Horan MA, Rothwell NJ & Little RA. (1992). Salbutamol, a beta 2-adrenoceptor agonist, increases skeletal muscle strength in young men. *Clin Sci (Lond)* **83**, 615-621.
- Martineau L, Little RA, Rothwell NJ & Fisher MI. (1993). Clenbuterol, a beta 2-adrenergic agonist, reverses muscle wasting due to scald injury in the rat. *Burns* **19**, 26-34.
- Martinez-Navarro JF. (1990). Food poisoning related to consumption of illicit beta-agonist in liver. *Lancet* **336**, 1311.
- Maruffo CA. (1967). Fine structural study of myocardial changes induced by isoproterenol in rhesus monkeys. (*Macaca mulatta*). *The American journal of pathology* **50**, 27-37.
- Maxwell MA, Cleasby ME, Harding A, Stark A, Cooney GJ & Muscat GE. (2005). Nur77 regulates lipolysis in skeletal muscle cells. Evidence for cross-talk between the beta-adrenergic and an orphan nuclear hormone receptor pathway. *The Journal of biological chemistry* **280**, 12573-12584.
- McCormick C, Alexandre L, Thompson J & Mutungi G. (2010). Clenbuterol and formoterol decrease force production in isolated intact mouse skeletal muscle fiber bundles through a beta2-adrenoceptor-independent mechanism. *J Appl Physiol* **109**, 1716-1727.
- McDowell SL, Fleck SJ & Storms WW. (1997). The effects of salmeterol on power output in nonasthmatic athletes. *The Journal of allergy and clinical immunology* **99**, 443-449.
- McGee SL, Mustard KJ, Hardie DG & Baar K. (2008). Normal hypertrophy accompanied by phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase alpha1 following overload in LKB1 knockout mice. *The Journal of physiology* **586**, 1731-1741.

- McKenzie DC, Stewart IB & Fitch KD. (2002). The asthmatic athlete, inhaled beta agonists, and performance. *Clin J Sport Med* **12**, 225-228.
- Mei FC, Qiao J, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Quilliam LA & Cheng X. (2002). Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *The Journal of biological chemistry* **277**, 11497-11504.
- Mersmann HJ. (1998). Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *Journal of animal science* **76**, 160-172.
- Messina S, Hartley L, Main M, Kinali M, Jungbluth H, Muntoni F & Mercuri E. (2004). Pilot trial of salbutamol in central core and multi-minicore diseases. *Neuropediatrics* **35**, 262-266.
- Metrich M, Morel E, Berthouze M, Pereira L, Charron P, Gomez AM & Lezoualc'h F. (2009). Functional characterization of the cAMP-binding proteins Epac in cardiac myocytes. *Pharmacol Rep* **61**, 146-153.
- Millet GY, Tomazin K, Verges S, Vincent C, Bonnefoy R, Boisson RC, Gergele L, Feasson L & Martin V. (2011). Neuromuscular consequences of an extreme mountain ultramarathon. *PLoS ONE* **6**, e17059.
- Minetti GC, Feige JN, Rosenstiel A, Bombard F, Meier V, Werner A, Bassilana F, Sailer AW, Kahle P, Lambert C, Glass DJ & Fornaro M. (2011). Galphai2 signaling promotes skeletal muscle hypertrophy, myoblast differentiation, and muscle regeneration. *Science signaling* **4**, ra80.
- Miyazaki M, McCarthy JJ, Fedele MJ & Esser KA. (2011). Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *The Journal of physiology* **589**, 1831-1846.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM & Klionsky DJ. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069-1075.
- Mizushima N & Yoshimori T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542-545.
- Mogilnicka E, Klimek V, Nowak G & Czyrak A. (1985). Clonidine and a beta-agonists induce hyperthermia in rats at high ambient temperature. *Journal of neural transmission* **63**, 223-235.
- Molkou P. (2010). L'histoire de l'adrénaline. *Revue française d'allergologie* **50**, 584-586.
- Moore CA, Milano SK & Benovic JL. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual review of physiology* **69**, 451-482.
- Moore NG, Pegg GG & Sillence MN. (1994). Anabolic effects of the beta 2-adrenoceptor agonist salmeterol are dependent on route of administration. *The American journal of physiology* **267**, E475-484.

- Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompre AM, Vandecasteele G & Lezoualc'h F. (2005). cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research* **97**, 1296-1304.
- Morrison KJ, Moore RH, Carsrud ND, Trial J, Millman EE, Tuvim M, Clark RB, Barber R, Dickey BF & Knoll BJ. (1996). Repetitive endocytosis and recycling of the beta 2-adrenergic receptor during agonist-induced steady state redistribution. *Molecular pharmacology* **50**, 692-699.
- Morton AR, Joyce K, Papalia SM, Carroll NG & Fitch KD. (1996). Is salmeterol ergogenic? *Clin J Sport Med* **6**, 220-225.
- Morton AR, Papalia SM & Fitch KD. (1993). Changes in anaerobic power and strength performance after inhalation of salbutamol in nonasthmatic athletes. *Clin J Sport Med* **3**, 14-19.
- Mounier R, Cavalie H, Lac G & Clottes E. (2007). Molecular impact of clenbuterol and isometric strength training on rat EDL muscles. *Pflugers Arch* **453**, 497-507.
- Mounier R, Lantier L, Leclerc J, Sotiropoulos A, Pende M, Daegelen D, Sakamoto K, Foretz M & Viollet B. (2009). Important role for AMPKalpha1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *Faseb J* **23**, 2264-2273.
- Murphy RJ, Beliveau L, Seburn KL & Gardiner PF. (1996). Clenbuterol has a greater influence on untrained than on previously trained skeletal muscle in rats. *European journal of applied physiology and occupational physiology* **73**, 304-310.
- Murray AJ. (2008). Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Science signaling* **1**, re4.
- Myers SA, Eriksson N, Burow R, Wang SC & Muscat GE. (2009). Beta-adrenergic signaling regulates NR4A nuclear receptor and metabolic gene expression in multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol* **309**, 101-108.
- Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Lee CG, Hurwitz J, Parvin JD & Montminy M. (1997). RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* **90**, 1107-1112.
- Naline E, Trifilieff A, Fairhurst RA, Advenier C & Molimard M. (2007). Effect of indacaterol, a novel long-acting beta2-agonist, on isolated human bronchi. *Eur Respir J* **29**, 575-581.
- Nash JE, Rocha HJ, Buchan V, Calder GA, Milne E, Quirke JF & Lobleby GE. (1994). The effect of acute and chronic administration of the beta-agonist, cimaterol, on protein synthesis in ovine skin and muscle. *The British journal of nutrition* **71**, 501-513.
- Navegantes LC, Resano NM, Baviera AM, Migliorini RH & Kettelhut IC. (2004). Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E642-647.



- Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH & Kettelhut IC. (2000). Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E663-668.
- Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH & Kettelhut IC. (2001). Catecholamines inhibit Ca(2+)-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through beta(2)-adrenoceptors and cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E449-454.
- Nevzorova J, Evans BA, Bengtsson T & Summers RJ. (2006). Multiple signalling pathways involved in beta2-adrenoceptor-mediated glucose uptake in rat skeletal muscle cells. *British journal of pharmacology* **147**, 446-454.
- Nieto JL, Diaz-Laviada I, Malpartida JM, Galve-Roperh I & Haro A. (1997). Adaptations of the beta-adrenoceptor-adenylyl cyclase system in rat skeletal muscle to endurance physical training. *Pflugers Arch* **434**, 809-814.
- Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, Strachan RT, Huang TY, Bressler EA, Hara MR, Shenoy SK, Gygi SP & Lefkowitz RJ. (2011). Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Science signaling* **4**, ra51.
- Norris SR, Petersen SR & Jones RL. (1996). The effect of salbutamol on performance in endurance cyclists. *European journal of applied physiology and occupational physiology* **73**, 364-368.
- O'Connor RM, Butler WR, Hogue DE & Beermann DH. (1991). Temporal pattern of skeletal muscle changes in lambs fed cimaterol. *Domestic animal endocrinology* **8**, 549-554.
- O'Connor RS & Pavlath GK. (2007). Point:Counterpoint: Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* **103**, 1099-1100.
- Oishi Y, Imoto K, Ogata T, Taniguchi K, Matsumoto H & Roy RR. (2002). Clenbuterol induces expression of multiple myosin heavy chain isoforms in rat soleus fibres. *Acta physiologica Scandinavica* **176**, 311-318.
- Okada Y, Tateishi K & Zhang Y. (2010). Histone demethylase JHDM2A is involved in male infertility and obesity. *Journal of andrology* **31**, 75-78.
- Ostadal B, Rychterova V & Poupa O. (1968). Isoproterenol-induced acute experimental cardiac necrosis in the turtle (*Testudo Horsfieldi*). *American heart journal* **76**, 645-649.
- Otani K, Han DH, Ford EL, Garcia-Roves PM, Ye H, Horikawa Y, Bell GI, Holloszy JO & Polonsky KS. (2004). Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover. *The Journal of biological chemistry* **279**, 20915-20920.
- Page KA, Hartzell DL, Li C, Westby AL, Della-Fera MA, Azain MJ, Pringle TD & Baile CA. (2004). beta-Adrenergic receptor agonists increase apoptosis of adipose tissue in mice. *Domestic animal endocrinology* **26**, 23-31.

- Palmqvist M, Persson G, Lazer L, Rosenborg J, Larsson P & Lotvall J. (1997). Inhaled dry-powder formoterol and salmeterol in asthmatic patients: onset of action, duration of effect and potency. *Eur Respir J* **10**, 2484-2489.
- Pane M, Staccioli S, Messina S, D'Amico A, Pelliccioni M, Mazzone ES, Cuttini M, Alfieri P, Battini R, Main M, Muntoni F, Bertini E, Villanova M & Mercuri E. (2008). Daily salbutamol in young patients with SMA type II. *Neuromuscul Disord* **18**, 536-540.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G & Johansen T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry* **282**, 24131-24145.
- Parr T, Bardsley RG, Gilmour RS & Buttery PJ. (1992). Changes in calpain and calpastatin mRNA induced by beta-adrenergic stimulation of bovine skeletal muscle. *European journal of biochemistry / FEBS* **208**, 333-339.
- Pasaoglu G, Gok H, Mungan D, Sonel B, Yalcin P & Misirligil Z. (2006). Does the combination of inhaled steroids with long acting beta2 agonists decrease the risk for osteoporosis? A 1-year prospective follow-up study. *Rheumatology international* **27**, 141-146.
- Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E & Nicholson GC. (2004). Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* **19**, 19-24.
- Patessio A, Podda A, Carone M, Trombetta N & Donner CF. (1991). Protective effect and duration of action of formoterol aerosol on exercise-induced asthma. *Eur Respir J* **4**, 296-300.
- Patiyal SN & Katoch SS. (2006). Tissue specific and variable collagen proliferation in Swiss albino mice treated with clenbuterol. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **55**, 97-103.
- Pearen MA, Myers SA, Raichur S, Ryall JG, Lynch GS & Muscat GE. (2008). The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of beta-adrenergic signaling, regulates gene expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle. *Endocrinology* **149**, 2853-2865.
- Pearen MA, Ryall JG, Lynch GS & Muscat GE. (2009). Expression profiling of skeletal muscle following acute and chronic beta2-adrenergic stimulation: implications for hypertrophy, metabolism and circadian rhythm. *BMC genomics* **10**, 448.
- Pearen MA, Ryall JG, Maxwell MA, Ohkura N, Lynch GS & Muscat GE. (2006). The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle. *Endocrinology* **147**, 5217-5227.
- Pena Betancurt SD, Cordova-Izquierdo A, Uribe A & Michel AM. (2008). Clenbuterol residues in bovine feed and meat. *Res J Biol Sci* **3**, 1444-1445.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45.

- Piffar PM, Fernandez R, Tchaikovski O, Hirabara SM, Folador A, Pinto GJ, Jakobi S, Gobbo-Bordon D, Rohn TV, Fabricio VE, Moretto KD, Tosta E, Curi R & Fernandes LC. (2003). Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. *Cancer letters* **201**, 139-148.
- Pleadin J, Vulic A, Persi N & Vahcic N. (2010). Clenbuterol residues in pig muscle after repeat administration in a growth-promoting dose. *Meat science* **86**, 733-737.
- Plourde G, Rousseau-Migneron S & Nadeau A. (1993). Effect of endurance training on beta-adrenergic system in three different skeletal muscles. *J Appl Physiol* **74**, 1641-1646.
- Pluim BM, de Hon O, Staal JB, Limpens J, Kuipers H, Overbeek SE, Zwinderman AH & Scholten RJ. (2011). beta(2)-Agonists and physical performance: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sports medicine (Auckland, NZ)* **41**, 39-57.
- Polesskaya A, Naguibneva I, Fritsch L, Duquet A, Ait-Si-Ali S, Robin P, Vervisch A, Pritchard LL, Cole P & Harel-Bellan A. (2001). CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle. *The EMBO journal* **20**, 6816-6825.
- Pontremoli S, Viotti PL, Michetti M, Salamino F, Sparatore B & Melloni E. (1992). Modulation of inhibitory efficiency of rat skeletal muscle calpastatin by phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* **187**, 751-759.
- Prather ID, Brown DE, North P & Wilson JR. (1995). Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids? *Medicine and science in sports and exercise* **27**, 1118-1121.
- Przala F, Gross DM, Beckman B & Fisher JW. (1979). Influence of albuterol on erythropoietin production and erythroid progenitor cell activation. *The American journal of physiology* **236**, H422-426.
- Pulce C, Lamaison D, Keck G, Bostvironnois C, Nicolas J & Descotes J. (1991). Collective human food poisonings by clenbuterol residues in veal liver. *Veterinary and human toxicology* **33**, 480-481.
- Quinlivan RM, Muller CR, Davis M, Laing NG, Evans GA, Dwyer J, Dove J, Roberts AP & Sewry CA. (2003). Central core disease: clinical, pathological, and genetic features. *Archives of disease in childhood* **88**, 1051-1055.
- Radley HG, De Luca A, Lynch GS & Grounds MD. (2007). Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 469-477.
- Raffaello A, Milan G, Masiero E, Carnio S, Lee D, Lanfranchi G, Goldberg AL & Sandri M. (2010). JunB transcription factor maintains skeletal muscle mass and promotes hypertrophy. *The Journal of cell biology* **191**, 101-113.
- Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH,

- Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK & Kobilka BK. (2012). Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549-555.
- Reeds PJ, Hay SM, Dorwood PM & Palmer RM. (1986). Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effect on muscle protein biosynthesis. *The British journal of nutrition* **56**, 249-258.
- Rehmann H, Schwede F, Doskeland SO, Wittinghofer A & Bos JL. (2003). Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *The Journal of biological chemistry* **278**, 38548-38556.
- Reid IR, Gamble GD, Grey AB, Black DM, Ensrud KE, Browner WS & Bauer DC. (2005a). beta-Blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* **20**, 613-618.
- Reid IR, Lucas J, Wattie D, Horne A, Bolland M, Gamble GD, Davidson JS & Grey AB. (2005b). Effects of a beta-blocker on bone turnover in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **90**, 5212-5216.
- Rejnmark L, Vestergaard P, Kassem M, Christoffersen BR, Kolthoff N, Brixen K & Mosekilde L. (2004). Fracture risk in perimenopausal women treated with beta-blockers. *Calcified tissue international* **75**, 365-372.
- Ren H, Yin P & Duan C. (2008). IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *The Journal of cell biology* **182**, 979-991.
- Revelli JP, Pescini R, Muzzin P, Seydoux J, Fitzgerald MG, Fraser CM & Giacobino JP. (1991). Changes in beta 1- and beta 2-adrenergic receptor mRNA levels in brown adipose tissue and heart of hypothyroid rats. *The Biochemical journal* **277** ( Pt 3), 625-629.
- Ricart-Firinga C, Stevens L, Canu MH, Nemirovskaya TL & Mounier Y. (2000). Effects of beta(2)-agonist clenbuterol on biochemical and contractile properties of unloaded soleus fibers of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C582-588.
- Ricks C, Dalrymple R, Baker P & Ingle D. (1984). Use of a  $\beta$ -Agonist to Alter Fat and Muscle Deposition in Steers. *Journal of animal science* **59**, 1247-1255.
- Ringdal N, Derom E, Wahlin-Boll E & Pauwels R. (1998). Onset and duration of action of single doses of formoterol inhaled via Turbuhaler. *Respiratory medicine* **92**, 1017-1021.
- Rius J, Martinez-Gonzalez J, Crespo J & Badimon L. (2004). Involvement of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**, 697-702.
- Roberts P & McGeachie JK. (1992). The effects of clenbuterol on satellite cell activation and the regeneration of skeletal muscle: an autoradiographic and morphometric study of whole muscle transplants in mice. *Journal of anatomy* **180** ( Pt 1), 57-65.

- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology* **3**, 1009-1013.
- Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD & Glass DJ. (1999). Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science (New York, NY)* **286**, 1738-1741.
- Rothwell NJ & Stock MJ. (1985). Modification of body composition by clenbuterol in normal and dystrophic (mdx) mice. *Bioscience reports* **5**, 755-760.
- Rothwell NJ & Stock MJ. (1988). Increased body-weight gain and body protein in castrated and adrenalectomized rats treated with clenbuterol. *The British journal of nutrition* **60**, 355-360.
- Rothwell NJ, Stock MJ & Sudera DK. (1987). Changes in tissue blood flow and beta-receptor density of skeletal muscle in rats treated with the beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol. *British journal of pharmacology* **90**, 601-607.
- Ruas JL, White JP, Rao RR, Kleiner S, Brannan KT, Harrison BC, Greene NP, Wu J, Estall JL, Irving BA, Lanza IR, Rasbach KA, Okutsu M, Nair KS, Yan Z, Leinwand LA & Spiegelman BM. (2012). A PGC-1alpha isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* **151**, 1319-1331.
- Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN & Lynch GS. (2002). Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R1386-1394.
- Ryall JG, Plant DR, Gregorevic P, Sillence MN & Lynch GS. (2004). Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. *The Journal of physiology* **555**, 175-188.
- Ryall JG, Schertzer JD & Lynch GS. (2007). Attenuation of age-related muscle wasting and weakness in rats after formoterol treatment: therapeutic implications for sarcopenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**, 813-823.
- Ryall JG, Sillence MN & Lynch GS. (2006). Systemic administration of beta2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. *British journal of pharmacology* **147**, 587-595.
- Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH & Goldberg AL. (2007). Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *Faseb J* **21**, 140-155.
- Sadeh M, Shen XM & Engel AG. (2011). Beneficial effect of albuterol in congenital myasthenic syndrome with epsilon-subunit mutations. *Muscle & nerve* **44**, 289-291.
- Salleras L, Dominguez A, Mata E, Taberner JL, Moro I & Salva P. (1995). Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Rep* **110**, 338-342.

- Sanchez AM, Borrani F, Le Fur MA, Le Mieux A, Lecoultre V, Py G, Gernigon C, Collomp K & Candau R. (2012a). Acute supra-therapeutic oral terbutaline administration has no ergogenic effect in non-asthmatic athletes. *European journal of applied physiology* **113**, 411-418.
- Sanchez AM, Collomp K, Carra J, Borrani F, Coste O, Prefaut C & Candau R. (2012b). Effect of acute and short-term oral salbutamol treatments on maximal power output in non-asthmatic athletes. *European journal of applied physiology* **112**, 3251-3258.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**, 399-412.
- Sato S, Suzuki H, Tsujimoto H, Shirato K, Tachiyashiki K & Imaizumi K. (2011). Casted-immobilization downregulates glucocorticoid receptor expression in rat slow-twitch soleus muscle. *Life sciences* **89**, 962-967.
- Schertzer JD, Plant DR, Ryall JG, Beitzel F, Stupka N & Lynch GS. (2005). Beta2-agonist administration increases sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in aged rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E526-533.
- Schreuder LT, Nijhuis-van der Sanden MW, de Hair A, Peters G, Wortmann S, Bok LA & Morava E. (2010). Successful use of albuterol in a patient with central core disease and mitochondrial dysfunction. *Journal of inherited metabolic disease*.
- Sears MR & Lotvall J. (2005). Past, present and future--beta2-adrenoceptor agonists in asthma management. *Respiratory medicine* **99**, 152-170.
- Seibold A, Williams B, Huang ZF, Friedman J, Moore RH, Knoll BJ & Clark RB. (2000). Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway. *Molecular pharmacology* **58**, 1162-1173.
- Sensky PL, Jewell KK, Ryan KJ, Parr T, Bardsley RG & Buttery PJ. (2006). Effect of anabolic agents on calpastatin promoters in porcine skeletal muscle and their responsiveness to cyclic adenosine monophosphate- and calcium-related stimuli. *Journal of animal science* **84**, 2973-2982.
- Sette C & Conti M. (1996). Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *The Journal of biological chemistry* **271**, 16526-16534.
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC & Ballabio A. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (New York, NY)* **332**, 1429-1433.
- Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA & Lefkowitz RJ. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science (New York, NY)* **294**, 1307-1313.

- Shenoy SK, Modi AS, Shukla AK, Xiao K, Berthouze M, Ahn S, Wilkinson KD, Miller WE & Lefkowitz RJ. (2009). Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6650-6655.
- Shenoy SK, Xiao K, Venkataramanan V, Snyder PM, Freedman NJ & Weissman AM. (2008). Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* **283**, 22166-22176.
- Shi H, Zeng C, Ricome A, Hannon KM, Grant AL & Gerrard DE. (2007). Extracellular signal-regulated kinase pathway is differentially involved in beta-agonist-induced hypertrophy in slow and fast muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1681-1689.
- Shizukuda Y, Buttrick PM, Geenen DL, Borczuk AC, Kitsis RN & Sonnenblick EH. (1998). beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy. *The American journal of physiology* **275**, H961-968.
- Signorile JF, Banovac K, Gomez M, Flipse D, Caruso JF & Lowensteyn I. (1995). Increased muscle strength in paralyzed patients after spinal cord injury: effect of beta-2 adrenergic agonist. *Archives of physical medicine and rehabilitation* **76**, 55-58.
- Signorile JF, Kaplan TA, Applegate B & Perry AC. (1992). Effects of acute inhalation of the bronchodilator, albuterol, on power output. *Medicine and science in sports and exercise* **24**, 638-642.
- Sillence MN, Moore NG, Pegg GG & Lindsay DB. (1993). Ligand binding properties of putative beta 3-adrenoceptors compared in brown adipose tissue and in skeletal muscle membranes. *British journal of pharmacology* **109**, 1157-1163.
- Silvan G, Martinez-Mateos MM, Blass A, Camacho L, Gonzalez-Gil A, Garcia-Partida P & Illera JC. (2007). The effect of long-term exposure to combinations of growth promoters in Long Evans rats: part 1: Endocrine adrenal function. *Analytica chimica acta* **586**, 246-251.
- Skura CL, Fowler EG, Wetzel GT, Graves M & Spencer MJ. (2008). Albuterol increases lean body mass in ambulatory boys with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Neurology* **70**, 137-143.
- Sleeper MM, Kearns CF & McKeever KH. (2002). Chronic clenbuterol administration negatively alters cardiac function. *Medicine and science in sports and exercise* **34**, 643-650.
- Smith WN, Dirks A, Sugiura T, Muller S, Scarpace P & Powers SK. (2002). Alteration of contractile force and mass in the senescent diaphragm with beta(2)-agonist treatment. *J Appl Physiol* **92**, 941-948.
- Snavely MD, Motulsky HJ, Moustafa E, Mahan LC & Insel PA. (1982). beta-Adrenergic receptor subtypes in the rat renal cortex. Selective regulation of beta 1-adrenergic receptors by pheochromocytoma. *Circulation research* **51**, 504-513.

- Sneddon AA, Delday MI & Maltin CA. (2000). Amelioration of denervation-induced atrophy by clenbuterol is associated with increased PKC- $\alpha$  activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E188-195.
- Sneddon AA, Delday MI, Steven J & Maltin CA. (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.
- Snell K & Evans CA. (1988). Characterization of rat liver beta-adrenoceptors during perinatal development as determined by [<sup>125</sup>I]-iodopindolol radioligand binding assays. *British journal of pharmacology* **93**, 817-826.
- Soic-Vranic T, Bobinac D, Bajek S, Jerkovic R, Malnar-Dragojevic D & Nikolic M. (2005). Effect of salbutamol on innervated and denervated rat soleus muscle. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al* **38**, 1799-1805.
- Soliven B, Rezanian K, Gundogdu B, Harding-Clay B, Oger J & Arnason BG. (2009). Terbutaline in myasthenia gravis: a pilot study. *Journal of the neurological sciences* **277**, 150-154.
- Soppa GK, Smolenski RT, Latif N, Yuen AH, Malik A, Karbowska J, Kochan Z, Terracciano CM & Yacoub MH. (2005). Effects of chronic administration of clenbuterol on function and metabolism of adult rat cardiac muscle. *American journal of physiology* **288**, H1468-1476.
- Spencer MJ, Croall DE & Tidball JG. (1995). Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *The Journal of biological chemistry* **270**, 10909-10914.
- Sporano V, Grasso L, Esposito M, Oliviero G, Brambilla G & Loizzo A. (1998). Clenbuterol residues in non-liver containing meat as a cause of collective food poisoning. *Veterinary and human toxicology* **40**, 141-143.
- Spurlock DM, McDanel TG & McIntyre LM. (2006). Changes in skeletal muscle gene expression following clenbuterol administration. *BMC genomics* **7**, 320.
- Stallion A, Foley-Nelson T, Chance WT & Fischer JE. (1993). Effects of increased beta 2-agonist dose in tumor-bearing animals. *Nutrition and cancer* **20**, 251-260.
- Stallion A, Foley-Nelson T, Chance WT, James JH & Fischer JE. (1995). Anticatabolic effect of the beta 2-agonist cimaterol in vivo in tumor-bearing animals. *The Journal of surgical research* **59**, 387-392.
- Stallion A, Zhang FS, Chance WT, Foley-Nelson T & Fischer JE. (1991). Reversal of cancer cachexia in rats by cimaterol and supplemental nutrition. *Surgery* **110**, 678-684.
- Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, Bastide B, Mounier Y & Pette D. (2000). Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C1558-1563.



- Stewart IB, Labreche JM & McKenzie DC. (2002). Acute formoterol administration has no ergogenic effect in nonasthmatic athletes. *Medicine and science in sports and exercise* **34**, 213-217.
- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD & Glass DJ. (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.
- Strathmann M & Simon MI. (1990). G protein diversity: a distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 9113-9117.
- Sue-Chu M, Sandsund M, Helgerud J, Reinertsen RE & Bjermer L. (1999). Salmeterol and physical performance at -15 degrees C in highly trained nonasthmatic cross-country skiers. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **9**, 48-52.
- Suzuki J, Gao M, Xie Z & Koyama T. (1997). Effects of the beta 2-adrenergic agonist clenbuterol on capillary geometry in cardiac and skeletal muscles in young and middle-aged rats. *Acta physiologica Scandinavica* **161**, 317-326.
- Suzuki S, Yokoyama U, Abe T, Kiyonari H, Yamashita N, Kato Y, Kurotani R, Sato M, Okumura S & Ishikawa Y. (2010). Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *The Journal of biological chemistry* **285**, 24248-24259.
- Suzuki Y, Shen T, Poyard M, Best-Belpomme M, Hanoune J & Defer N. (1998). Expression of adenylyl cyclase mRNAs in the denervated and in the developing mouse skeletal muscle. *The American journal of physiology* **274**, C1674-1685.
- Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P & Karsenty G. (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* **111**, 305-317.
- Takeuchi T, Tsuboi T, Arai M & Togari A. (2001). Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochemical pharmacology* **61**, 579-586.
- Tateishi K, Okada Y, Kallin EM & Zhang Y. (2009). Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. *Nature* **458**, 757-761.
- Taylor SS. (1989). cAMP-dependent protein kinase. Model for an enzyme family. *The Journal of biological chemistry* **264**, 8443-8446.
- Teng YD, Choi H, Huang W, Onario RC, Frontera WR, Snyder EY & Sabharwal S. (2006). Therapeutic effects of clenbuterol in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters* **397**, 155-158.
- Thomson DM, Herway ST, Fillmore N, Kim H, Brown JD, Barrow JR & Winder WW. (2008). AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J Appl Physiol* **104**, 429-438.

- Tidball JG & Spencer MJ. (2002). Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *The Journal of physiology* **545**, 819-828.
- Tiziano FD, Lomastro R, Pinto AM, Messina S, D'Amico A, Fiori S, Angelozzi C, Pane M, Mercuri E, Bertini E, Neri G & Brahe C. (2010). Salbutamol increases survival motor neuron (SMN) transcript levels in leucocytes of spinal muscular atrophy (SMA) patients: relevance for clinical trial design. *Journal of medical genetics* **47**, 856-858.
- Tjorhom A, Riiser A & Carlsen KH. (2007). Effects of formoterol on endurance performance in athletes at an ambient temperature of -20 degrees C. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **17**, 628-635.
- Togari A. (2002). Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microscopy research and technique* **58**, 77-84.
- Toledo M, Busquets S, Ametller E, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2011). Sirtuin 1 in skeletal muscle of cachectic tumour-bearing rats: a role in impaired regeneration? *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* **2**, 57-62.
- Torgan CE & Kraus WE. (1996). Regulation of type II adenylyl cyclase mRNA in rabbit skeletal muscle by chronic motor nerve pacing. *The American journal of physiology* **271**, E253-260.
- Trabal P, Adam C-E, Dechef C, Le Noé O & Rodas H. (2010). De l'analyse des forums internet pour saisir des pratiques dopantes pp. 1-245.
- Tribunal Arbitral du Sport. (2012). Communication aux médias cyclisme-dopage.
- Tsivou M, Kioukia-Fougia N, Lyris E, Aggelis Y, Fragkaki A, Kiouisi X, Simitsek P, Dimopoulou H, Leontiou I-P, Stamou M, Spyridaki M-H & Georgakopoulos C. (2006). An overview of the doping control analysis during the Olympic Games of 2004 in Athens, Greece. *Analytica chimica acta* **555**, 1-13.
- Tzatsos A & Kandror KV. (2006). Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **26**, 63-76.
- Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai Y, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotsu S & Ishikawa Y. (2007). Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *American journal of physiology* **293**, H1662-1672.
- Ung RV, Rouleau P & Guertin PA. (2010). Effects of co-administration of clenbuterol and testosterone propionate on skeletal muscle in paraplegic mice. *Journal of neurotrauma* **27**, 1129-1142.
- van Baak MA, de Hon OM, Hartgens F & Kuipers H. (2004). Inhaled salbutamol and endurance cycling performance in non-asthmatic athletes. *International journal of sports medicine* **25**, 533-538.

- van Baak MA, Mayer LH, Kempinski RE & Hartgens F. (2000). Effect of salbutamol on muscle strength and endurance performance in nonasthmatic men. *Medicine and science in sports and exercise* **32**, 1300-1306.
- van der Kooi EL, Kalkman JS, Lindeman E, Hendriks JC, van Engelen BG, Bleijenberg G & Padberg GW. (2007). Effects of training and albuterol on pain and fatigue in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Journal of neurology* **254**, 931-940.
- van der Kooi EL, Vogels OJ, van Asseldonk RJ, Lindeman E, Hendriks JC, Wohlgemuth M, van der Maarel SM & Padberg GW. (2004). Strength training and albuterol in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* **63**, 702-708.
- van der Ploeg AT & Reuser AJ. (2008). Pompe's disease. *Lancet* **372**, 1342-1353.
- van Noord JA, Smeets JJ, Raaijmakers JA, Bommer AM & Maesen FP. (1996). Salmeterol versus formoterol in patients with moderately severe asthma: onset and duration of action. *Eur Respir J* **9**, 1684-1688.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J,

- Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A & Zhu X. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, NY)* **291**, 1304-1351.
- Vliem MJ, Ponsioen B, Schwede F, Pannekoek WJ, Riedl J, Kooistra MR, Jalink K, Genieser HG, Bos JL & Rehmann H. (2008). 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM: an improved Epac-selective cAMP analogue. *Chembiochem* **9**, 2052-2054.
- von Maltzahn J, Bentzinger CF & Rudnicki MA. (2012). Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nature cell biology* **14**, 186-191.
- Waldmeier PC. (1981). Stimulation of central serotonin turnover by beta-adrenoceptor agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **317**, 115-119.
- Wang SY & Beermann DH. (1988). Reduced calcium-dependent proteinase activity in cimaterol-induced muscle hypertrophy in lambs. *Journal of animal science* **66**, 2545-2550.
- Whalen EJ, Foster MW, Matsumoto A, Ozawa K, Violin JD, Que LG, Nelson CD, Benhar M, Keys JR, Rockman HA, Koch WJ, Daaka Y, Lefkowitz RJ & Stamler JS. (2007). Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Cell* **129**, 511-522.
- Whitelaw PF & Hesketh JE. (1992). Expression of c-myc and c-fos in rat skeletal muscle. Evidence for increased levels of c-myc mRNA during hypertrophy. *The Biochemical journal* **281** ( Pt 1), 143-147.
- Williams RS, Caron MG & Daniel K. (1984). Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training. *The American journal of physiology* **246**, E160-167.
- Willoughby D & Cooper DM. (2007). Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiological reviews* **87**, 965-1010.
- Witebsky E. (1954). Ehrlich's side-chain theory in the light of present immunology. *Annals of the New York Academy of Sciences* **59**, 168-181.
- Wolfarth B, Wuestenfeld JC & Kindermann W. (2010). Ergogenic effects of inhaled beta2-agonists in non-asthmatic athletes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* **39**, 75-87, ix.
- Wong K, Boheler KR, Bishop J, Petrou M & Yacoub MH. (1998). Clenbuterol induces cardiac hypertrophy with normal functional, morphological and molecular features. *Cardiovascular research* **37**, 115-122.
- Xiao RP. (2001). Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* **2001**, re15.
- Yamamoto DL, Hutchinson DS & Bengtsson T. (2007). Beta(2)-Adrenergic activation increases glycogen synthesis in L6 skeletal muscle cells through a signalling pathway independent of cyclic AMP. *Diabetologia* **50**, 158-167.

- Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U & Klionsky DJ. (2006). Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Molecular biology of the cell* **17**, 5094-5104.
- Yesalis CE & Bahrke MS. (2002). History of doping in sport. *International Sports Studies* **24**, 42-76.
- Yimlamai T, Dodd SL, Borst SE & Park S. (2005). Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J Appl Physiol* **99**, 71-80.
- Zanoteli E, Maximino JR, Conti Reed U & Chadi G. (2010). Spinal muscular atrophy: from animal model to clinical trial. *Functional neurology* **25**, 73-79.
- Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R & Lass A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of lipid research* **50**, 3-21.
- Zeman RJ, Feng Y, Peng H & Etlinger JD. (1999). Clenbuterol, a beta(2)-adrenoceptor agonist, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *Experimental neurology* **159**, 267-273.
- Zeman RJ, Hirschman A, Hirschman ML, Guo G & Etlinger JD. (1991). Clenbuterol, a beta 2-receptor agonist, reduces net bone loss in denervated hindlimbs. *The American journal of physiology* **261**, E285-289.
- Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG & Etlinger JD. (1988). Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a beta 2-receptor agonist. *The American journal of physiology* **254**, E726-732.
- Zeman RJ, Ludemann R & Etlinger JD. (1987). Clenbuterol, a beta 2-agonist, retards atrophy in denervated muscles. *The American journal of physiology* **252**, E152-155.
- Zeman RJ, Peng H, Danon MJ & Etlinger JD. (2000). Clenbuterol reduces degeneration of exercised or aged dystrophic (mdx) muscle. *Muscle & nerve* **23**, 521-528.
- Zeman RJ, Peng H & Etlinger JD. (2004). Clenbuterol retards loss of motor function in motor neuron degeneration mice. *Experimental neurology* **187**, 460-467.
- Zeman RJ, Peng H, Feng Y, Song H, Liu X & Etlinger JD. (2006). Beta2-adrenoreceptor agonist-enhanced recovery of locomotor function after spinal cord injury is glutathione dependent. *Journal of neurotrauma* **23**, 170-180.
- Zhang J, He Q, Liu QY, Guo W, Deng XM, Zhang WW, Hu XX & Li N. (2007). Differential gene expression profile in pig adipose tissue treated with/without clenbuterol. *BMC genomics* **8**, 433.
- Zhang KM, Hu P, Wang SW, Feher JJ, Wright LD, Wechsler AS, Spratt JA & Briggs FN. (1996). Salbutamol changes the molecular and mechanical properties of canine skeletal muscle. *The Journal of physiology* **496** ( Pt 1), 211-220.

- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA & Montminy M. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4459-4464.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism* **6**, 472-483.
- Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK & Xiao RP. (2001). Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 1607-1612.
- Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Uozumi H, Kadowaki T & Yazaki Y. (1999). Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* **274**, 9760-9770.



## Mécanismes moléculaires du contrôle de la masse musculaire sous l'action du $\beta_2$ -agoniste formotérol

Les  $\beta_2$ -agonistes sont couramment utilisés pour prévenir et réduire les symptômes de l'asthme et de la bronchoconstriction induite par l'exercice. Mais, pris en quantités supérieures aux doses thérapeutiques, les  $\beta_2$ -agonistes ont un effet anabolisant qui a été clairement démontré *in vivo*. Un certain nombre d'acteurs sont mis en jeu dans la réponse biologique du tissu musculaire aux  $\beta_2$ -agonistes. L'un de ces acteurs est la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, voie d'initiation de la traduction, ayant un rôle majeur dans la synthèse protéique. Dans ce contexte, notre première étude avait pour objectif de déterminer la cinétique des événements moléculaires responsables de l'hypertrophie du muscle squelettique de rat après administration de formotérol pendant 1 jour (J1), 3 jours (J3) et 10 jours (J10). Nous avons montré que l'administration de formotérol induisait une hypertrophie musculaire à J3 et J10 associée à l'activation transitoire de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (J1 et J3), et à une diminution de l'expression de l'E3 ubiquitine ligase *MAFbx/Atrogin-1* (J3). La voie autophagie lysosome ne semblait pas être affectée. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR est associée à la voie ubiquitine-protéasome mais pas à la voie autophagie-lysosome. La régulation transitoire de la voie PI3K/Akt/mTOR suggère que d'autres voies de signalisation sont impliquées dans l'hypertrophie musculaire induite par le formotérol.

Le 007-AM, analogue de l'AMPc, a été décrit comme pouvant stimuler la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR *via* l'activation de la protéine Epac, suggérant que le 007-AM puisse constituer une molécule de substitution à l'utilisation des  $\beta_2$ -agonistes. Notre seconde étude avait pour but de déterminer si le 007-AM avait une action anabolisante sur le tissu musculaire, mais également de déterminer si la 007-AM était une molécule stable permettant d'envisager son usage dans un cadre pharmacologique. L'administration de 007-AM pendant 7 jours chez des souris n'engendrait pas d'hypertrophie musculaire. En revanche, *in vitro* sur cellules C2C12, le 007-AM activait la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR comme en témoignait l'augmentation de la phosphorylation des protéines rpS6 et 4E-BP1. Nos résultats montraient également que le 007-AM était instable dans le plasma alors que son produit de dégradation, le 007 était plus stable. Pris ensemble, ces résultats suggèrent qu'un traitement de 7 jours au 007-AM n'est pas suffisant pour induire une hypertrophie musculaire et que l'absence d'hypertrophie musculaire pourrait provenir de l'instabilité du 007-AM dans le plasma. Toutefois, des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

**Mots-clés :**  $\beta_2$ -agonistes, formotérol, muscle squelettique, hypertrophie, voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, ubiquitine-protéasome, autophagie-lysosome, Epac.

## Molecular mechanisms controlling muscle mass under $\beta_2$ -agonist formoterol stimulations

$\beta_2$ -agonists are traditionally used to prevent and reduce asthma symptoms and bronchoconstriction induced by exercise. Nevertheless, when administrated *in vivo*, at relatively high, far away from therapeutic doses,  $\beta_2$ -agonists induce anabolic effects. Numerous actors are involved in biological response of the skeletal muscle, induced by  $\beta_2$ -agonists. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, which initiates translation, is one of these actors. In this context, our first study aimed at determined the kinetic of molecular events responsible for skeletal muscle hypertrophy after 1 day (D1), 3 days (D3) and 10 days (D10) of formoterol administration. We have shown that formoterol administration induced skeletal muscle hypertrophy at D3 and D10 associated with a transient activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway (D1 and D3), and, with a decrease in E3 ubiquitin ligase *MAFbx/atrogin-1* expression (D3). The autophagy-lysosome pathway seems not to be regulated by formoterol administration. Taken together, these results suggest that PI3K/Akt/mTOR activation is temporally associated with the regulation of ubiquitin-proteasome but not the autophagy-lysosome pathway. The transient nature of the regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway also indicates that other unidentified pathways are probably activated to sustain the increase in skeletal muscle mass.

Recently, 007-AM synthetic molecule has been described to stimulate PI3K/Akt/mTOR signaling pathway through Epac protein activation, suggesting that 007-AM could be an alternative to the use of  $\beta_2$ -agonists. The purpose of our second study was to determine whether 007-AM had an anabolic action on skeletal muscle and if 007-AM was stable allowing considering its use in pharmacology. 007-AM administration for 7 days to mice does not lead to muscle hypertrophy. Nonetheless, *in vitro* on C2C12 cells, 007-AM activated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by increasing phosphorylation of rpS6 and 4E-BP1. Our results showed that contrary to 007, 007-AM was instable in plasma. Altogether, these results suggest that a 7-day 007-AM treatment is not sufficient to induce skeletal muscle hypertrophy. This lack of hypertrophy could be due to 007-AM instability in plasma. However, supplemental studies are needed to confirm these results.

**Keywords:**  $\beta_2$ -agonists, formoterol, skeletal muscle, hypertrophy, PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, ubiquitin-proteasome, autophagy-lysosome, Epac.