



HAL
open science

Effet du stress oxydant sur les cavéoles dans les cellules musculaires squelettiques

Alexis Mougeolle

► **To cite this version:**

Alexis Mougeolle. Effet du stress oxydant sur les cavéoles dans les cellules musculaires squelettiques. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0298 . tel-01142454

HAL Id: tel-01142454

<https://theses.hal.science/tel-01142454v1>

Submitted on 15 Apr 2015

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ : BIOCHIMIE

Par Monsieur **Alexis MOUGEOLLE**

**EFFET DU STRESS OXYDANT SUR LES
CAVEOLES DANS LES CELLULES MUSCULAIRES
SQUELETTIQUES**

Sous la direction de : Dr Elise DARGELOS

Soutenue le Jeudi 4 Décembre 2014

Membres du jury :

Pr Isabelle Bourdel-Marchasson	Professeur, Université de Bordeaux	Président
Dr Lydie Combaret	Directeur de recherche, INRA, Clermont Fd	Rapporteur
Dr Anne Bonnieu	Directeur de recherche, INRA, Montpellier	Rapporteur
Dr Christophe Lamaze	Directeur de recherche, Institut Curie, Paris	Examineur
Dr Olivier Lambert	Directeur de recherche, CNRS, Bordeaux	Examineur
Dr Elise Dargelos	Maître de conférences, INP, Bordeaux	Directrice de thèse

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ : BIOCHIMIE

Par Monsieur **Alexis MOUGEOLLE**

**EFFET DU STRESS OXYDANT SUR LES
CAVEOLES DANS LES CELLULES MUSCULAIRES
SQUELETTIQUES**

Sous la direction de : Dr Elise DARGELOS

Soutenue le Jeudi 4 Décembre 2014

Membres du jury :

Pr Isabelle Bourdel-Marchasson	Professeur, Université de Bordeaux	Président
Dr Lydie Combaret	Directeur de recherche, INRA, Clermont Fd	Rapporteur
Dr Anne Bonnieu	Directeur de recherche, INRA, Montpellier	Rapporteur
Dr Christophe Lamaze	Directeur de recherche, Institut Curie, Paris	Examineur
Dr Olivier Lambert	Directeur de recherche, CNRS, Bordeaux	Examineur
Dr Elise Dargelos	Maître de conférences, INP, Bordeaux	Directrice de thèse

Titre : Effet du stress oxydant sur les cavéoles dans les cellules musculaires squelettiques

Résumé : La sarcopénie est une maladie dégénérative liée à l'âge qui se caractérise par une perte progressive et involontaire de la masse et de la force musculaire. Elle s'accompagne d'une atteinte de la régénération musculaire et d'une accumulation des espèces réactives de l'oxygène. Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique. Dans le muscle, elles jouent un rôle dans la différenciation des cellules satellites et dans le maintien de l'unité contractile dans le muscle différencié. Certaines formes de myopathies sont consécutives à l'absence de cavéoles dans le muscle. Elles sont également impliquées dans la médiation de signaux liés à la régulation du stress oxydant. Afin de mieux comprendre les mécanismes régulant la mise en place de la sarcopénie, nous avons étudié ici les relations existant entre le stress oxydant et les cavéoles. Des cellules musculaires de souris ont été traitées par l' H_2O_2 et une diminution du taux des cavéolines-1 et -3 a été mise en évidence dans des myoblastes et les myotubes, respectivement. Il apparaît donc que les protéines constitutives des cavéoles sont effectivement sensibles au stress oxydant dans les cellules musculaires. En présence d' H_2O_2 , la fonction des cavéoles (endocytose et résistance au stress mécanique) était également significativement altérée dans des myoblastes. L'ensemble des résultats obtenus suggère que le stress oxydant aurait un effet sur les cavéoles, ce qui pourrait entraîner des conséquences sur la régénération et le maintien de l'intégrité musculaire au cours du vieillissement.

Mots clés : Cavéoles, Cavéolines, Muscle squelettique, Vieillesse, Stress oxydant, Cellules satellites.

Title : Effect of oxidative stress on caveolae in skeletal muscle cells

Abstract : Sarcopenia is an age-related degenerative disease which is characterized by a progressive and involuntary loss of muscle mass and strength. It is accompanied by an impairment of muscle regeneration and accumulation of reactive oxygen species. Caveolae are invaginations of the plasma membrane. In muscle, they play a role in the differentiation of satellite cells and in maintaining the contractile unit of the differentiated skeletal muscle. Some myopathies are resulting from the absence of caveolae in muscle. Caveolae are also involved in mediating signals related to the regulation of oxidative stress. To better understand the mechanisms involved in the development of sarcopenia, we investigated here the relationship between oxidative stress and caveolae. Mouse muscle cells were treated with H_2O_2 and decreased levels of caveolin-1 and -3 were demonstrated in myoblasts and myotubes, respectively. It therefore appears that caveolae constituent proteins are actually sensitive to oxidative stress in muscle cells. In the presence of H_2O_2 , caveolae functions (endocytosis and resistance to mechanical stress) were also significantly degraded in myoblasts. Altogether, these data suggest that oxidative stress would affect caveolae, which could have consequences on regeneration and maintenance of muscle integrity during aging.

Keywords : Caveolae, Caveolins, Skeletal muscle, Ageing, Oxidative stress, Satellite cells.

Unité de recherche : Chimie et biologie des membranes et des nanoobjets – UMR 5248

Equipe : Architecture des complexes membranaires et processus cellulaires

Allée Geoffroy Saint Hilaire Bâtiment B14

33600 Pessac

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier les Docteurs **Anne Bonnieu** et **Lydie Combaret** pour le temps passé à étudier et évaluer mon manuscrit. Je remercie également le Professeur **Isabelle Bourdel-Marchasson** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et le Docteur **Christophe Lamaze** d'avoir examiné mon travail.

Evidemment, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma directrice de thèse le Docteur **Elise Dargelos**. Elise, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir fait confiance et accompagné au cours de ces trois années. Merci de m'avoir transmis tes connaissances sur les cavéoles/cavéolines et également sur le muscle squelettique. J'ai grâce à toi pu m'épanouir dans ce sujet de recherche passionnant. Je te remercie également pour ta disponibilité, ta patience et pour le temps (important) que tu as su me consacrer. Je garde également un excellent souvenir des TP « dosage et séparation des protéines du lait » que nous avons pus réaliser à l'ENSCBP.

J'adresse mes plus chaleureux remerciements au Docteur **Sylvie Poussard** qui m'a également guidé au quotidien dans mes travaux de recherche et accordé du temps pour répondre à mes nombreuses questions. Sylvie, je me rappellerai de ton fameux « non mais ça c'est une cavéole », effectivement tu es encore plus puissante qu'un anticorps dans la détection des cavéolines/cavéoles !

Je tiens à remercier le Docteur **Olivier Lambert** de m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de l'équipe « architecture des complexes membranaires et processus cellulaires » et ainsi permis de me découvrir un attrait certain pour la microscopie.

Je remercie les collègues de l'équipe de m'avoir réservé un accueil chaleureux lors de mon arrivée. Je remercie notamment le Docteur **Marion Decossas**, le Professeur **Jean-Christophe Taveau**, le Docteur **Pierre Bonnafous**, le Docteur **Marie-Christine Gerbod-Giannone**, le Docteur **Laetitia Doury Joucla**, le Docteur **Annelise Sahin** et enfin le Docteur **François Orange**.

Je remercie également les personnes qui ont énormément compté au cours de mes différents stages et qui ont su me donner un goût pour la recherche.

Je remercie tout d'abord le Docteur **Anne Devin** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon stage de Master 2 dans son équipe et sous sa direction. Je garde un excellent souvenir de mon passage qui m'a donné l'envie de continuer en thèse. Anne, je te remercie également du temps que tu m'as consacré notamment lors du passage du concours de l'école doctorale.

J'exprime également toute ma gratitude au Docteur **Edgar Yoboue**. Edgar, merci pour le temps que tu m'as consacré et je garde un très bon souvenir de cette année à partager ton bureau à l'IBGC. J'espère que le « tic-tac » de ma montre y résonne encore...

Je remercie chaleureusement les Docteurs **Marion Babot, Johann Habersetzer** et également Madame **Corinne Blancard**. Je vous remercie pour cette excellente année passée au laboratoire lors de mon Master 1. Marion, je garde grâce à toi « *the eye of the tiger* ». Merci pour ces soirées à siroter d'excellents mojitos en compagnie de **Widade Ziani**.

Je remercie également mon collègue et maintenant ami (parce qu'il le vaut bien) **Grégoire Naudin**. Greg merci de m'avoir nourrit pendant ces trois années même si je sais que **Laetitia** y est pour beaucoup ! J'ai grâce à toi et **Denis Martinez** passé sans aucun doute le plus bel été de ma vie au laboratoire à rédiger ce manuscrit...

Mes remerciements vont également envers la « *dream team* » du CBMN : **Laurence Dallet, Marie-Lise Jobin, Emilie Duffau, Clémence Neurohr, Tiphaine Bardeau, Antoine Baudin, Marion Lefevre, Juila Devienne, Stephanie Antunes, Sarah Henry, Jade Joubert**. Les amis, merci pour ces excellents moments passés avec vous et ces innombrables soirées... au TYMEN. J'en profite pour remercier **Cyrille** pour ces excellents picon-bières.

Un grand merci à mes proches, grands parents et oncles qui m'ont poussé depuis le début de ma scolarité.

Je remercie mes parents qui m'ont toujours soutenu tout au long de mes études et sans qui rien n'aurait été possible. Vous avez toujours été là et n'avez jamais cessé de croire en moi. Je serai éternellement reconnaissant de tout ce que vous avez fait.

Une grand merci à ma petite sœur **Léa**, sache que ton grand frère est très fier de toi et sera toujours là pour toi.

Enfin, je remercie mes amis qui ont été importants dans les moments de détente : **Kevin, Tiphaine, Adrien, Florian, Aurore, Manu, Ludivine, Mathias, Sophie, Gaétan, Ghadi, Benjamin, William, Nizar, Guillaume, Benjamin, Gwendal, Isabelle, Pierre-Alain**. Merci les copains !

COMMUNICATIONS

Communications orales

- 10^{ème} journée de la Société Française de Myologie – 14 novembre 2012 – Grenoble
Oxidative stress influence on Caveolin in muscle cells : Study related to muscle ageing
- Journée scientifique du CBMN – 13 décembre 2012 – Bordeaux
Oxidative stress influence on Caveolin in muscle cells : A study related to muscle ageing
- Journée scientifique du CBMN – 3 septembre 2013 – Bordeaux
Caveolin 1 down-regulation by oxidative stress: functional and mechanistic aspects on mouse muscle cells.
- 14th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants – 12 juin 2014 – Paris
Oxidative stress induces Caveolin 1 degradation and impairs caveolae functions in skeletal muscle cells.

Communications affichés

- 10^{ème} journée de la Société Française de Myologie – 14 novembre 2012 – Grenoble
Oxidative stress influence on Caveolin in muscle cells : Study related to muscle ageing
- 2^{ème} journée Scientifique de l'Institut Polytechnique de Bordeaux – 30 novembre 2012 – Bordeaux
Oxidative stress influence on Caveolin in muscle cells : Study related to muscle ageing
- 13^{ème} journée scientifique de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé – 10 avril 2013 – Arcachon.
Oxidative stress influence on Caveolin in muscle cells : Study related to muscle ageing
- Journée scientifique du CBMN – 3 septembre 2013 – Bordeaux –
Caveolin 1 down-regulation by oxidative stress: functional and mechanistic aspects on mouse muscle cells.
=> Prix du meilleur poster
- 14^{ème} journée scientifique de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé – 9 avril 2014 – Arcachon.
Oxidative stress induces Caveolin 1 degradation and impairs caveolae functions in skeletal muscle cells.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	21
Partie I. Le muscle strié squelettique	23
I. Anatomie du muscle squelettique	23
I 1 La fibre musculaire et son organisation.....	25
I 2 Les myofilaments	26
I 3 La contraction musculaire	28
I 4 Types de fibres musculaires	30
II. La régénération musculaire.....	31
Partie II. Le vieillissement musculaire.....	33
I. Le vieillissement musculaire : la sarcopenie.....	33
II. La sarcopénie, un processus multifactoriel.....	35
III. Stress oxydant et sarcopénie.....	39
III 1 Théorie radicalaire du vieillissement.....	39
III 2 Les espèces réactives de l'oxygène	39
III 3 Systèmes de défenses.....	42
IV. Conséquences du stress oxydant	46
V. Stress oxydant et pathologies	48
V 1 Pathologies associées au vieillissement.....	48
V 2 Pathologies musculaires.....	48
Partie III. Cavéoles et caveolines	51
I. Qu'est-ce qu'une cavéole ?	51
II. Les cavéolines.....	52
II 1 La cavéoline-1	53
II 2 La cavéoline-2.....	54
II 3 La cavéoline-3.....	54
II 4 Structure des cavéolines.....	55
III. Les cavines	57
IV. Caveolines et Cavines : une expression fortement liée.....	61
V. Les autres acteurs des cavéoles.....	62
VI. Biogenèse des cavéoles	63
VII. Les fonctions des cavéoles/cavéolines.....	65
VII 1 Endocytose	66
VII 2 Homéostasie du cholestérol.....	67
VII 3 Homéostasie calcique	68
VII 4 Transduction du signal	69

VII 5 Stress mécanique	71
VII 6 Réparation membranaire	73
VIII. Pathologies liées aux cavéoles/cavéolines.....	74
VIII 1 Pathologies liées à la cavéoline-1	74
VIII 2 Les cavéolinopathies	75
VIII 3 Cavéoles et sarcopénie	77
Partie IV. Objectifs.....	79
MATERIELS ET METHODES.....	83
I. Techniques de biologie cellulaire.....	85
I 1 Modèle cellulaire	85
I 2 Milieux de culture.....	85
I 3 Prolifération et différenciation cellulaire.....	85
I 4 Traitement des cellules avec l'H ₂ O ₂	86
I 5 Mesure de la viabilité cellulaire	86
I 6 Induction d'un choc hypo-osmotique	87
I 7 siRNA Caveoline-1	87
I 8 Isolation des myotubes à partir d'une culture à 10 jours de différenciation	87
I 9 Endocytose spécifique des cavéoles.....	88
II. Techniques de biochimie	89
II 1 Préparation des extraits protéiques.....	89
II 2 Electrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	89
II 3 Transfert des protéines	90
II 4 Détection immunologique des protéines	90
II 5 Contrôle de charge des Western-blot	91
II 6 Carbonylation des protéines	92
II 7 Immunoprécipitation de la cavéoline 3	92
II 8 Dosage des ERO intracellulaires.....	93
II 9 Gradient de saccharose.....	94
III. Techniques de microscopie	94
III 1 Immunofluorescence.....	94
III 2 Microscopie électronique.....	96
IV. Analyse statistique.....	97
RESULTATS ET DISCUSSION	101
Partie I. Myoblastes en prolifération : Effets de l'H₂O₂ sur la cavéoline-1103	
I. Effet de l'H ₂ O ₂ sur le taux de cavéoline-1 dans les myoblastes	104
II. Effet de l'H ₂ O ₂ sur la viabilité cellulaire	106
III. Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'accumulation intracellulaire des ERO	107
IV. Effet de l'H ₂ O ₂ sur la carbonylation des protéines.....	108

V. Effet préventif d'un antioxydant naturel : l'Oligopin®	109
VI. Effet de l'H ₂ O ₂ sur la phosphorylation de la cavéoline-1	110
VII. Discussion	111
Partie II. Myoblastes en prolifération : Effets de l'H₂O₂ sur les cavéoles .	114
I. Mise en évidence des cavéoles dans les myoblastes	114
II. Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'organisation et la localisation intracellulaire des cavéoles	116
III. Effet de l'H ₂ O ₂ sur les fonctions des cavéoles	118
III 1 -Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'endocytose	119
III 2 Effet de l'H ₂ O ₂ sur la résistance à un stress mécanique	120
IV. Discussion	123
Partie III. Myotubes : Effets de l'H₂O₂ sur la cavéoline-3	127
I. Présentation du modèle cellulaire	127
II. Effet de l'H ₂ O ₂ sur le taux de cavéoline-3 dans les myotubes	129
III. Effet de l'H ₂ O ₂ sur la viabilité cellulaire.....	132
IV. Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'accumulation d'ERO intracellulaires	133
V. Effet de l'H ₂ O ₂ sur la carbonylation des protéines.....	133
VI. Effet préventif d'un anti-oxydant naturel : l'Oligopin®	134
VII. Discussion	136
Partie IV. Myotubes : Effets de l'H₂O₂ sur les cavéoles	138
I. Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'organisation et la localisation des cavéoles.....	138
I 1 Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'organisation des cavéoles	138
I 2 Effet de l'H ₂ O ₂ sur le taux de cavine-4 dans les myotubes	139
I 3 Effet de l'H ₂ O ₂ sur la distribution intracellulaire de la cavéolin-3 dans les myotubes	140
II. Effet de l'H ₂ O ₂ sur les fonctions des cavéoles.....	141
II 1 Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'endocytose caveoles-dépendante	141
II 2 Effet de l'H ₂ O ₂ sur la résistance à un stress mécanique.....	142
II 3 Effet de l'H ₂ O ₂ sur la composition des cavéoles.....	143
III. Discussion.....	145
Partie V. Effet de l'H₂O₂ sur la différenciation.....	147
Partie VI. Conclusion et perspectives.....	151
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXE.....	181

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique des différents niveaux d'organisation du muscle squelettique. D'après Tajbakhsh, 2009	24
Figure 2 : Structure d'un sarcomère : unité fonctionnelle du muscle.	27
Figure 3 : Représentation schématique du couplage excitation-contraction.....	29
Figure 4 : Cellule satellite sur une fibre musculaire isolée.	31
Figure 5 : Schéma représentatif des différentes étapes de la régénération musculaire.	32
Figure 6 : Carte représentant le pourcentage de la population âgée de 60 ans ou plus en 2012 et 2050. (Adapté des nations unies, 2012)	33
Figure 7 : Effet du vieillissement sur le muscle squelettique.....	34
Figure 8 : Voie de synthèse des espèces réactives de l'oxygène à partir de l'oxygène moléculaire (d'après Barouki, 2006).....	41
Figure 9 : Représentation schématique du stress oxydant.....	46
Figure 10 : Cavéoles et cavéolines	51
Figure 11 : Structures des cavéoles.	53
Figure 12 : Structure des cavéolines.	55
Figure 13 : Cavines et régulation de la morphologie des cavéoles.	60
Figure 14 : Le <i>caveolar coat complex</i>	62
Figure 15 : Représentation schématique de la biogénèse des cavéoles.....	65
Figure 16 : Représentation schématique de l'endocytose des cavéoles	67
Figure 17 : Désassemblage et réassemblage des cavéoles en réponse à un stress mécanique aigu.	72
Figure 18 : Maladies associées à une mutation de la cavéoline-3.....	76
Figure 19 : Transformation de la résazurine en résorufine par les cellules métaboliquement actives.....	86
Figure 20 : Observation en microscopie optique de myoblastes en prolifération.	103
Figure 21 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur la quantité de cavéoline-1.....	105
Figure 22 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'accumulation des ERO intracellulaires dans les myoblastes	108
Figure 23 : Effet d'un traitement à l'Oligopin [®] sur le niveau d'expression de la cavéoline-1	110
Figure 24 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur la phosphorylation de la tyrosine 14 de la cavéoline-1	111

Figure 25 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur les cavéoles de myoblastes isolées par gradient de saccharose.	115
Figure 26 : Mise en évidence des cavéoles dans des myoblastes C2C12	116
Figure 27 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur la localisation intracellulaire de la cavéoline-1	118
Figure 28 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'endocytose spécifique des cavéoles	120
Figure 29 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur la résistance membranaire des myoblastes en condition de choc hypo-osmotique.	122
Figure 30 : Différenciation des myoblastes C2C12	127
Figure 31 : Myotubes C2C12 après 8 et 10 jours de différenciation	128
Figure 32 : Localisation de la cavéoline-1 et de la cavéoline-3 dans des cellules après 6 jours de différenciation.....	129
Figure 33 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur le taux de cavéoline-3 dans les myotubes.	131
Figure 34 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'accumulation des ERO intracellulaires à 6 jours de différenciation	133
Figure 35 : Effet d'un traitement à l'Oligopin [®] sur la baisse du niveau d'expression de la cavéoline-3 induite par l'H ₂ O ₂ dans les myotubes.....	135
Figure 36 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur la répartition de la cavéoline-3 après ultracentrifugation sur gradient de saccharose.....	138
Figure 37 : Effet du traitement à l'H ₂ O ₂ sur le taux de cavine-4 dans les myotubes à 6 jours de différenciation	139
Figure 38 : Observation de myotubes en microscopie électronique à transmission	140
Figure 39 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur la localisation intracellulaire de la cavéoline-3.....	141
Figure 40 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur l'internalisation du Bodipy [®] Lactosylcéramide dans les myotubes	142
Figure 41 : Immunoprécipitation de la Cavéoline-3	144
Figure 42 : Effet de l'H ₂ O ₂ sur la différenciation des myoblastes en myotubes.....	147
Figure 43 : Effet d'une addition répétée d'H ₂ O ₂ sur le niveau d'expression des cavéolines à 10 jours de différenciation.....	149

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques fonctionnelles, structurales et métaboliques des différents types de fibres musculaires squelettiques (Schiaffino and Reggiani, 2011).	30
Tableau II : Anticorps utilisés pour les Western-blot et dilutions.....	91
Tableau III : Description des anticorps utilisés pour l'immunofluorescence.....	95
Tableau IV : Effet de l'H ₂ O ₂ sur la viabilité des myoblastes C2C12	106
Tableau V : Effet de l'H ₂ O ₂ sur le taux de carbonyles dans les myoblastes.....	109
Tableau VI : Effet de l'H ₂ O ₂ sur la viabilité cellulaire	132
Tableau VII : Effet de l'H ₂ O ₂ sur le taux de carbonyles dans les myotubes	134

ABREVIATIONS

Ach : Acétylcholine

ADN : Adénosine triphosphate

ADNmt : Acide désoxyribonucléique mitochondrial

ATP : Adénosine triphosphate

CSD : *Caveolin Scaffolding Domain*

DHPR : Récepteur à la dihydropyridine

EHD2 : *Eps homology domain-containing 2*

eNOS : *endothelial nitric oxide synthase*

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

IGF1 : *Insulin-like growth factor-1*

LGMD1C : *Limb-girdle muscular dystrophy type 1C*

nAChR : Récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NOX : NADPH oxydases

Nrf2 : *Nuclear factor-erythroid 2-related factor*

PLA2 : Phospholipase A2

RyR : Récepteur à la ryanodine

SOD : Superoxydes dismutases

TNF- α : *tumor necrosis factor- α*

TPx : Thioredoxines peroxydases

TRPC1 : *Transient receptor potential channel 1*

Trx : Thioredoxine reductase

INTRODUCTION

Partie I. Le muscle strié squelettique

Chez l'homme, le tissu musculaire est un des tissus les plus abondants et représente environ 40% de la masse corporelle totale.

Au sein de l'organisme, les muscles assument plusieurs fonctions essentielles comme la production des mouvements du corps, le maintien de la posture, la production de chaleur au cours de la contraction musculaire (cela a une importance vitale car elle permet de maintenir la température de l'organisme) et la mise en réserve de protéines et acides aminés mobilisables en cas de situation de carence nutritionnelle (Vander, 2013).

L'ensemble de notre organisme est composé de différents types de muscles qui assurent des fonctions particulières. Nous pouvons distinguer trois types de muscles :

- le muscle lisse est composé de cellules mononuclées et assure le maintien des structures et l'élasticité de nombreux organes comme les artères, les veines, les viscères, etc...

- le muscle strié cardiaque est commandé par le système nerveux autonome. Il fonctionne en permanence et assure la circulation du sang ainsi que l'apport continu de l'oxygène et des nutriments aux tissus,

- le muscle strié squelettique dont la contraction est volontaire. Ce type de muscle assure le maintien de la posture et les mouvements du corps en réponse à l'influx nerveux. En se contractant, les muscles tirent sur les os ou la peau ce qui rend possible les mouvements qui animent le corps.

I. Anatomie du muscle squelettique

Le muscle strié squelettique est le plus gros des organes. Il est composé d'un ensemble de faisceaux musculaires qui sont formés à partir de plusieurs dizaines à plusieurs milliers de fibres musculaires (cellules musculaires) qui sont, elles même composées de myofibrilles (Figure 1).

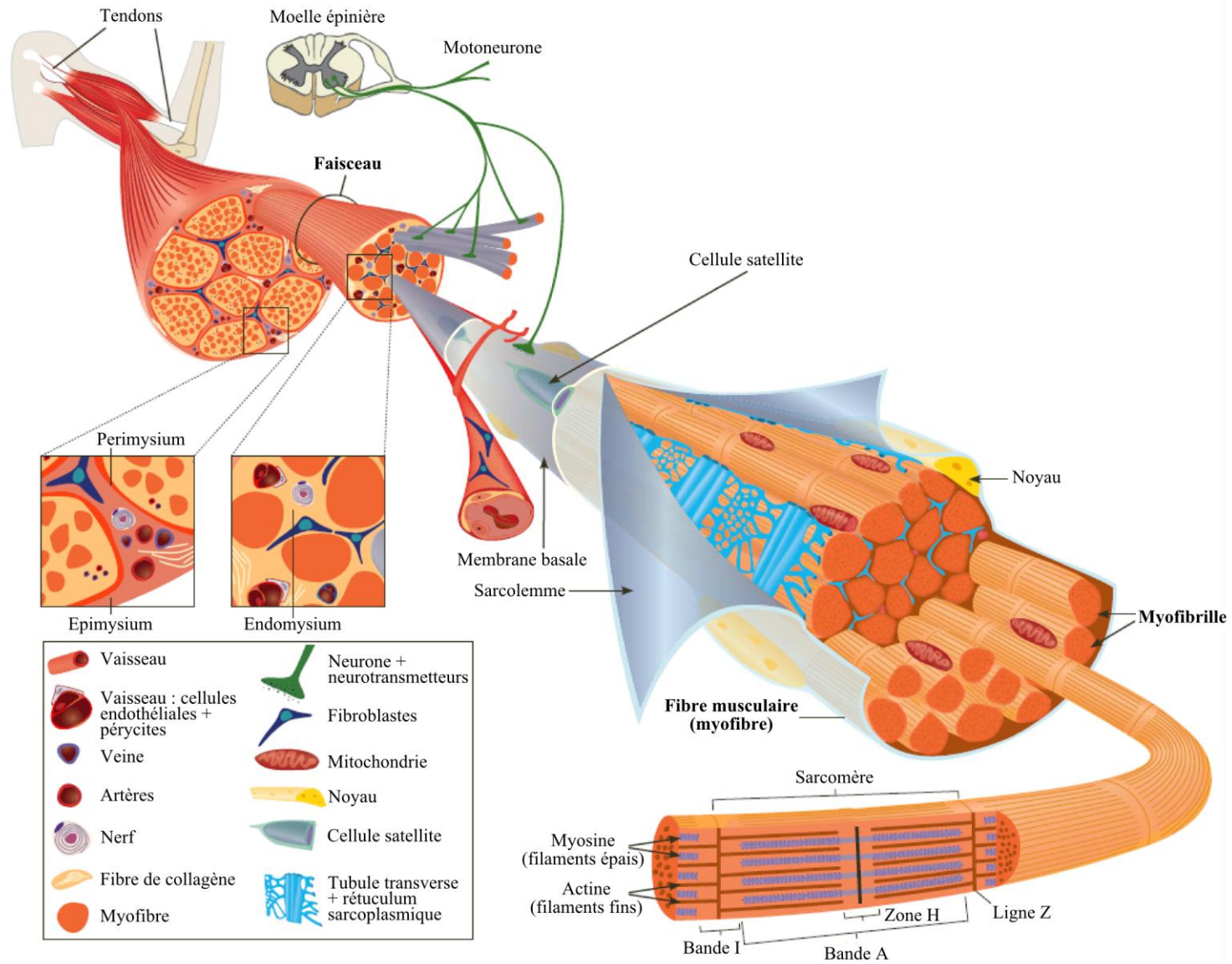


Figure 1 : Représentation schématique des différents niveaux d'organisation du muscle squelettique. D'après Tajbakhsh, 2009

I 1 La fibre musculaire et son organisation

Les fibres musculaires ont une forme allongée, occupent la longueur totale du muscle, ont un diamètre de 10 à 100 μm et peuvent mesurer de quelques centaines de μm jusqu'à 50 cm. Chaque fibre musculaire est entourée du **sarcolemme** (membrane plasmique) qui abrite le sarcoplasme contenant les nombreux noyaux cellulaires (situés en périphérie de ces cellules), des **myofibrilles** (appareil contractile), des mitochondries, le réticulum sarcoplasmique ainsi que d'autres organites plus ou moins spécialisés. Les myofibrilles occupent 80% du volume cellulaire et sont les éléments contractiles des cellules du muscle squelettique (Figure 1) (Vander, 2013).

La myofibrille est constituée de filaments fins d'actine qui chevauchent des filaments épais de myosine qui sont organisés longitudinalement (Figure 1 et Figure 2). En microscopie photonique, la fibre musculaire apparaît sous forme d'une succession de bandes claires et sombres qui lui confère son nom de muscle strié (Figure 2) :

- Les bandes sombres correspondent aux **bandes A** (ou bandes anisotropes : qui polarisent la lumière). Elles sont riches en filaments épais de myosine (de 10 nm à 16 nm de diamètre) et sont séparées en leur centre par une région plus claire, la **zone H**. Au niveau de la zone H, les filaments épais de myosine se font vis-à-vis au niveau de la **ligne M** qui apparaît comme une ligne sombre (Figure 2).

- Les bandes claires quant à elles, correspondent aux **bandes I** (ou bandes isotropes : qui ne polarisent pas la lumière) et sont riches en filaments fins d'actine (de 5 nm à 7 nm de diamètre). Au centre des bandes I se trouve une zone plus foncée qui correspond à la **ligne Z** qui est la zone où les myofilaments fins d'un sarcomère s'accrochent aux myofilaments fins du sarcomère suivant par liaisons covalentes par l'intermédiaire de l' α -actinine. La zone de myofibrille comprise entre deux lignes Z est appelée sarcomère (Figure 2) (Au, 2004).

Le **sarcomère** correspond à la plus petite unité contractile de la fibre musculaire et mesure environ 2,5 μm . La myofibrille est donc constituée d'une succession de sarcomères identiques. Lors de la contraction musculaire, les bandes I se raccourcissent alors que la longueur des bandes A reste identique et cela quelque soit l'intensité de la contraction du muscle.

Les myofibrilles sont attachées au sarcolemme au niveau des lignes Z grâce à un réseau de protéines appelés costamères. Ces structures spécialisées permettent aux

myofibrilles de transmettre la force de chaque contraction dans toute la fibre musculaire (Estrella and Naya, 2014).

Les faisceaux et fibres musculaires ainsi que les myofibrilles sont délimités par une gaine de tissu conjonctif qui les enveloppe individuellement. Dans le muscle, nous retrouvons trois types de tissu conjonctif (Figure 1). L'**endomysium** est une fine gaine qui entoure les fibres musculaires. Ces fibres musculaires et leur endomysium sont regroupées en faisceaux qui sont entourés d'une couche de tissu conjonctif dense et régulier appelée **perimysium**. L'ensemble du muscle est enfin entouré de tissu conjonctif dense et irrégulier appelé **épimysium**. Toutes ces gaines de tissu conjonctif fusionnent entre elles aux extrémités pour former les tendons qui relient le muscle à l'os. Le tissu conjonctif permet d'assurer le maintien du muscle et lui confère une certaine élasticité. Il permet également au cours de la contraction, la transmission de la force aux articulations par l'intermédiaire des tendons permettant le passage du mouvement du muscle au squelette (Purslow, 2010; Turrina *et al.*, 2013).

Le tissu conjonctif contient des neurones, nécessaires à l'excitation électrique permettant la contraction, des adipocytes constituant les réserves en lipides intramusculaires, des réseaux de vaisseaux sanguins et capillaires nécessaires à l'irrigation du muscle et à l'apport en nutriments. Il assure également un rôle dans les réactions inflammatoires et dans les défenses immunitaires.

I 2 Les myofilaments

I 2 a) Les myofilaments épais de myosine.

Les myofilaments épais sont en majorité composés de myosine (48% des protéines myofibrillaires totales) (Figure 2). Cette protéine de masse moléculaire de 470 kDa est un polymère composé de deux chaînes lourdes (MHC pour *Myosin Heavy Chain*) d'environ 220 kDa (Figure 2) associées chacune à deux chaînes légères (MLC pour *Myosin Light Chain*) de masse moléculaire d'environ 20 kDa. L'association des chaînes lourdes et des chaînes légères à l'extrémité N-terminale forme la tête globulaire de la molécule. Au sein du sarcomère, chaque myofilament épais est composé de 300 à 400 molécules de myosine disposées tête-bêche. Les interactions non covalentes entre ces deux sous unités permettent de former une molécule polaire asymétrique en forme de bâtonnet de 20 Å de diamètre et 1450 Å de long.

La tête de cette molécule porte un site de liaison à l'actine et une activité ATPasique contrôlée par les ions calcium qui sont à la base de la contraction musculaire (Clark *et al.*, 2002).

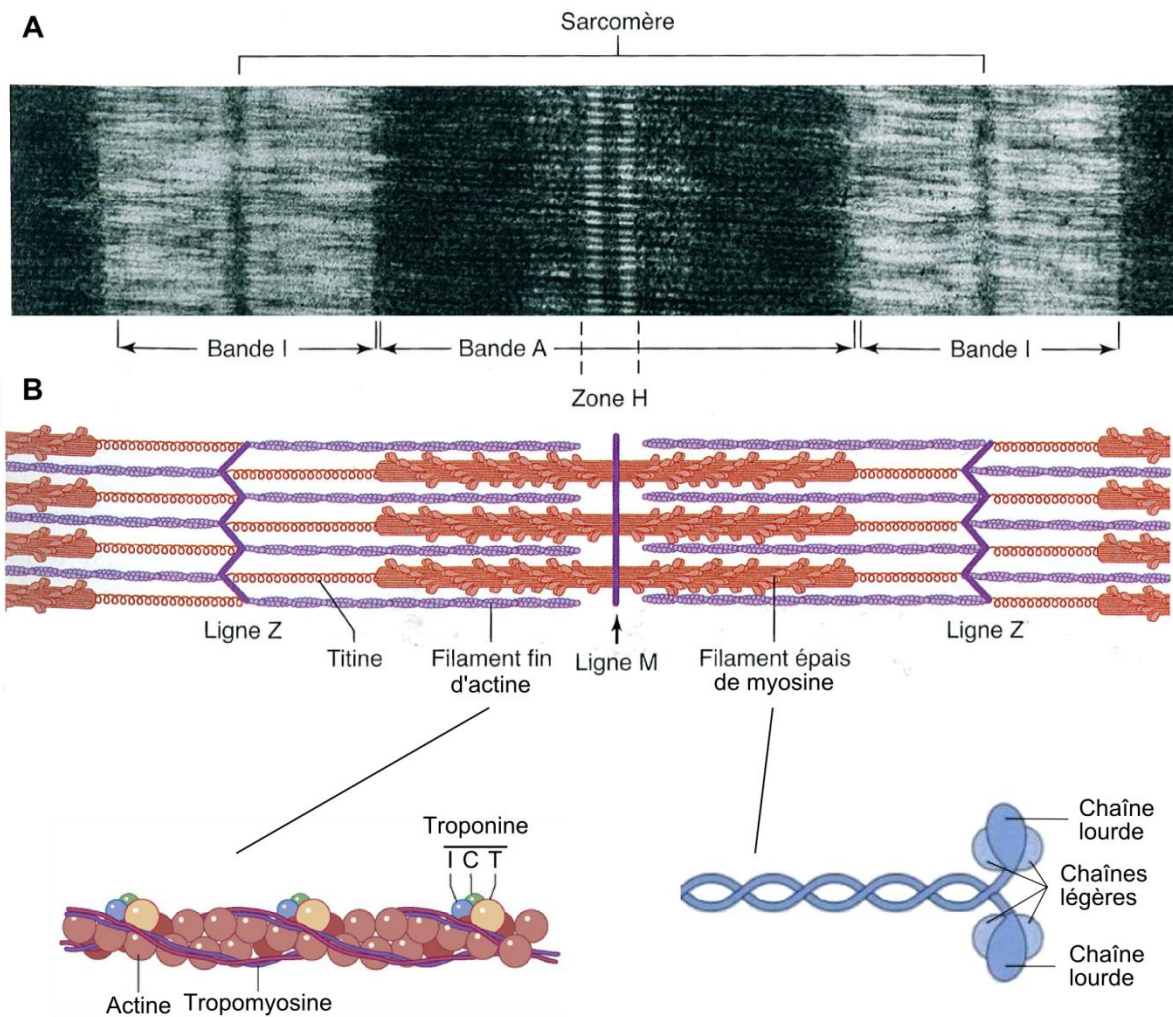


Figure 2 : Structure d'un sarcomère : unité fonctionnelle du muscle.

Observation d'un sarcomère en microscopie photonique (A). Représentation schématique d'un sarcomère et des protéines essentielles à sa structuration (B). (Stevens and Lowe, 1997; Koubassova and Tsaturyan, 2011; Pelley, 2011; Vander, 2013)

I 2 b) Les myofilaments fins d'actine

Les myofilaments fins sont constitués de trois protéines : l'actine, la tropomyosine et la troponine mais la plus abondante est l'**actine** qui représente 20 à 25 % des protéines myofibrillaires totales (Figure 2). Cette protéine globulaire de 42 kDa est appelée actine-G lorsqu'elle est sous sa forme monomérique. L'assemblage de plusieurs monomères d'actine-G permet sa polymérisation sous forme d'actine-F. Elle s'enroule alors en double hélice pour former un filament fin. La **tropomyosine** est une protéine dimérique (sous-unités α et β) qui

entoure le centre de l'actine, la rigidifie et la stabilise. La tropomyosine est placée à l'extrémité et le long des filaments d'actine. Lorsque la fibre est au repos, la tropomyosine bloque les sites de liaison de l'actine à la myosine. Enfin, la **troponine** est une protéine globulaire constituée de trois sous-unités. La troponine T (TnT) se lie à la se lie à la tropomyosine et stabilise le complexe troponine-tropomyosine-actine, la troponine I (TnI) est une sous-unité inhibitrice qui en absence de calcium, se lie à l'actine et masque les sites d'interaction actine-myosine. La troponine C (TnC) se lie au calcium et joue un rôle dans la contraction musculaire (Koubassova and Tsaturyan, 2011).

I 3 La contraction musculaire

Les muscles sont composés d'un nombre important de fibres musculaires organisées en unités motrices. Une unité motrice représente l'ensemble des fibres innervées par un même motoneurone assurant ainsi une contraction synchronisée du muscle (Figure 3 A). La zone de contact entre le motoneurone et le muscle est appelée jonction neuromusculaire. Cette jonction est composée d'une zone pré-synaptique (partie terminale du motoneurone), intra-synaptique et post-synaptique (fibre musculaire et membrane musculaire) (Punga and Ruegg, 2012).

Lors du processus de contraction, un potentiel d'action va se propager le long du motoneurone et arriver dans l'espace pré-synaptique (Figure 3 B). Les canaux calcium voltage dépendant vont alors s'ouvrir permettant au calcium d'entrer dans le neurone et permettre la libération d'acétylcholine (ACh) au niveau de l'espace intra-synaptique. L'acétylcholine va alors cibler les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR) au niveau de la membrane post-synaptique. Cela provoque l'ouverture de canaux sodiques au niveau du sarcolemme provoquant une entrée d'ions sodium. Il en résulte une dépolarisation membranaire et une production d'un potentiel d'action qui va se propager le long du sarcolemme. Le sarcolemme a la particularité de se prolonger vers l'intérieur de la fibre musculaire pour permettre au potentiel d'action d'atteindre le cœur de la fibre musculaire formant ainsi les tubules transverses (tubules T) (Figure 3 B). Au niveau des tubules T, le potentiel d'action va activer le récepteur à la dihydropyridine (DHPR), qui va activer le récepteur à la ryanodine (RyR1) localisé au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique qui fait face aux tubules T (Figure 3 B). Cette activation va permettre un relargage de calcium du réticulum sarcoplasmique dans le sarcoplasme (le calcium sort du réticulum sarcoplasmique en passant par RyR). Cette libération entraîne la fixation du calcium sur la troponine C (Gonzalez-Freire

et al., 2014). Un décrochage du complexe troponine-tropomyosine du filament d'actine a alors lieu, ce qui va permettre aux têtes de myosine de se fixer sur les filaments d'actine. Les têtes de myosine ainsi fixées vont alors pivoter (processus dépendant de l'ATP) ce qui va provoquer un glissement des filaments fins entre les filaments épais. Cela va induire un rapprochement des lignes Z successives de chaque sarcomère conduisant à un raccourcissement général des myofibrilles. La contraction a lieu tant que de l'ATP est présent et que la concentration en calcium dans le sarcoplasme est suffisante pour lever l'inhibition de la liaison entre l'actine et la myosine par la troponine C.

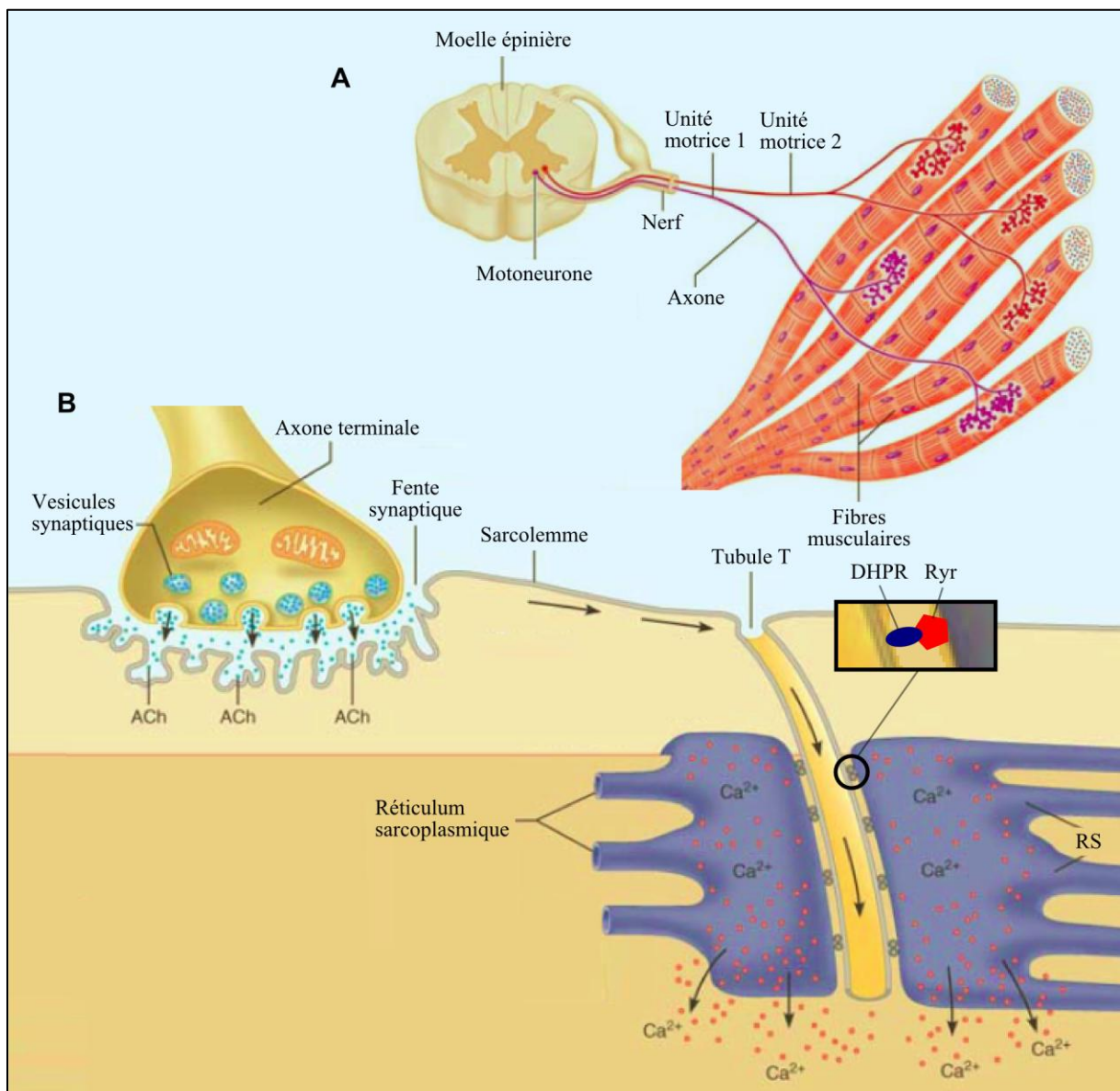


Figure 3 : Représentation schématique du couplage excitation-contraction.

Schéma représentant deux unités motrices (A) et le couplage excitation-contraction à partir du motoneurone jusqu'au relargage du calcium dans le sarcoplasme (B). Adapté de (Marieb and Hoehn, 2013)

I 4 Types de fibres musculaires

Il existe différents types de fibres musculaires qui peuvent être classés en fonction de leurs propriétés métaboliques et/ou fonctionnelles (Tableau I).

Les fibres oxydatives à contraction lente (type I) apparaissent rouges car elles ont une concentration cytoplasmique importante en myoglobine (hémoprotéine qui fixe l'oxygène) et un fort contenu en capillaires, comparé aux fibres de type II. Les muscles contiennent un mélange variable de fibres de type I et II ce qui leur confère une vitesse de contraction ainsi qu'une résistance à la fatigue spécifique.

Tableau I : Caractéristiques fonctionnelles, structurales et métaboliques des différents types de fibres musculaires squelettiques (Schiaffino and Reggiani, 2011).

Caractéristique	Fibres type I	Fibres type IIa	Fibres type IIb
Caractéristiques fonctionnelles			
Vitesse de contraction	Lente (100 à 200 ms)	Rapide	Rapide (40 ms)
Force de contraction	Faible	Elevée	Elevée
Caractéristiques structurales			
Couleur	Rouge	De rose à rouge	Blanche
Diamètre des fibres	Petit	Intermédiaire	Grand
Mitochondrie	Nombreuses	Intermédiaire	Rares
Vascularisation	Elevée	Moyenne	Faible
Caractéristiques Métaboliques			
Métabolisme	Oxydatif	Oxydatif/ Glycolytique	Glycolytique
Voie principale de synthèse de l'ATP	Aérobie	Mixte	Glycolyse anaérobie
Réserves en glycogène	Faible	Moyenne	Elevée
Résistance à la fatigue	Elevée	Intermédiaire	Faible
Activités pour lesquelles chaque fibre est adaptée			
	Activités d'endurance	Mouvements d'intensité et de durée moyenne. (type 400 m)	Mouvements puissants ou intense de courte durée

II. La régénération musculaire

Les cellules de muscle squelettique sont relativement stables et ont un renouvellement de leurs noyaux faible puisque environ 1 à 2% des noyaux sont remplacés chaque semaine (Schmalbruch and Lewis, 2000).

Cependant, dans des conditions particulières comme des traumatismes ou des lésions musculaires, la capacité de renouvellement est augmentée permettant ainsi au muscle de se régénérer de manière rapide et étendue. Les fibres musculaires sont des cellules post-mitotiques, c'est-à-dire qu'elles n'ont plus la capacité de se diviser pour se développer. La capacité de régénération du muscle squelettique est rendue possible par la présence de cellules quiescentes appelées cellules satellites localisées sous la lame basale qui entoure les fibres musculaires (Figure 4). La proportion de cellules satellites dans le muscle squelettique humain est d'environ 15% des noyaux totaux à la naissance, entre 6% et 10% à 2 ans et d'environ 4% chez l'adulte (Renault *et al.*, 2002a). Ces cellules expriment de manière spécifique le facteur de transcription Pax7.

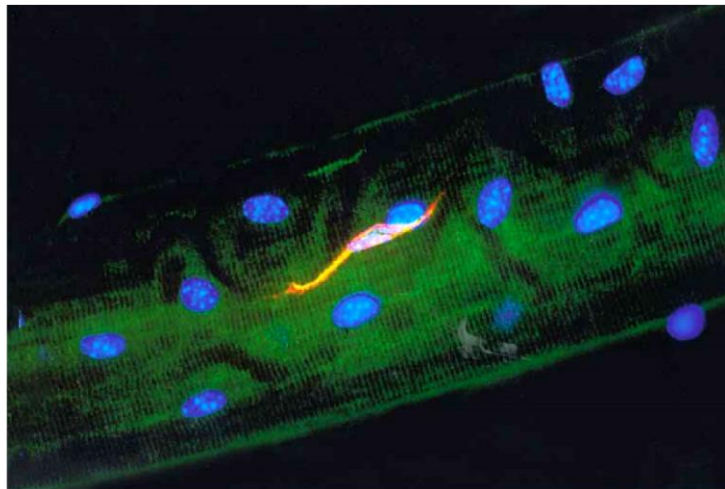


Figure 4 : Cellule satellite sur une fibre musculaire isolée.

La fibre musculaire a été étiquetée avec des anticorps dirigés contre la M-cadhérine (rouge), la desmine (vert) et un marquage des noyaux a été réalisé au DAPI (bleu). La M-cadherine est présente dans les cellules satellites. La Desmine est présente dans les fibres musculaires au niveau de la ligne Z des sarcomères et dans les cellules satellites (Morgan and Partridge, 2003).

Le processus de régénération a lieu en différentes phases qui se suivent dans le temps et qui sont dépendantes les unes des autres. La régénération musculaire est toujours précédée d'une phase dégénérative. Ce processus est initié par une phase de nécrose qui est

généralement déclenchée par une rupture du sarcolemme. Cette phase est suivie d'une inflammation pendant laquelle le site de lésion est envahi par les cellules inflammatoires (neutrophiles et macrophages). Il s'en suit une phase de régénération puis de réorganisation de la fibre pour finir par la réinnervation de la nouvelle fibre.

Comme le montre la Figure 5, suite à une lésion musculaire, les cellules satellites qui expriment Pax7 vont passer d'un état quiescent à un stade activé et exprimer les facteurs myogéniques Myf5 et MyoD afin de produire des précurseurs myogéniques appelés myoblastes. Ces myoblastes vont proliférer et migrer vers la région endommagée du muscle puis fusionner pour former des myotubes qui diminuent l'expression de Pax7. Ces myotubes vont alors atteindre une nouvelle phase de maturation pour devenir des fibres musculaires. Cette dernière phase de maturation est initiée avec l'expression de la Myogénine qui de concert avec MyoD va activer l'expression des gènes spécifiques du muscle différencié. La régénération ne sera complète qu'après la réinnervation de la nouvelle fibre musculaire (Yin *et al.*, 2013).

Pendant la régénération une partie des cellules satellites activées ont la capacité de retourner à l'état quiescent afin de maintenir un nombre suffisant de cellules quiescentes pour assurer de futures régénérations.

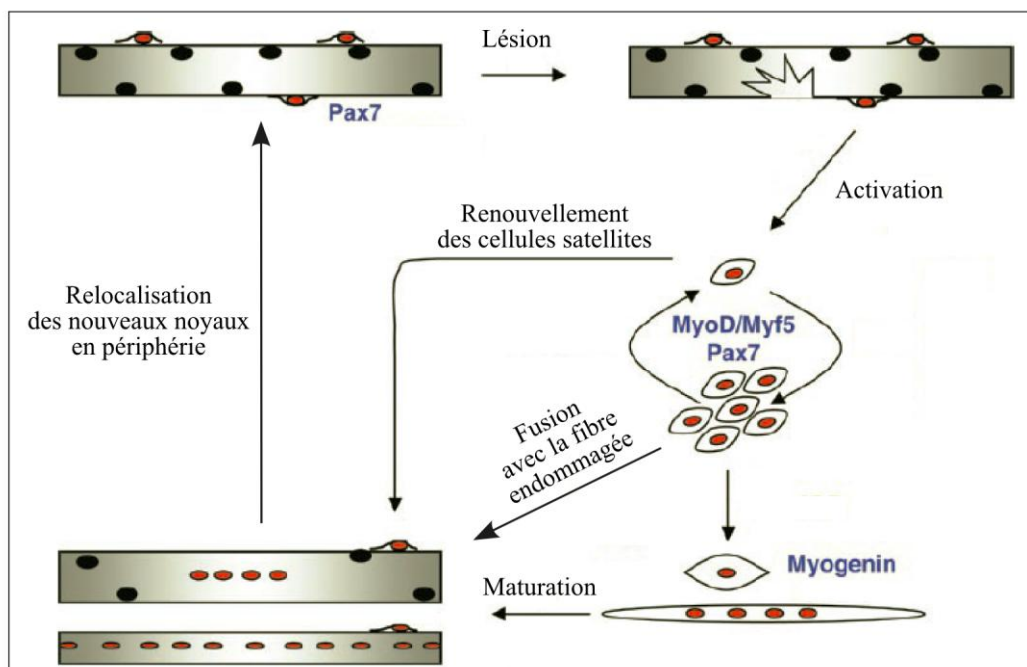


Figure 5 : Schéma représentatif des différentes étapes de la régénération musculaire.

D'après Chargé and Rudnicki, 2004.

Partie II. Le vieillissement musculaire.

I. Le vieillissement musculaire : la sarcopénie

Dans le monde, en 2012, il a été estimé que 810 millions des personnes étaient âgées de 60 ans ou plus (une personne sur neuf) et qu'en 2050, ce nombre passera à 2 milliards (une personne sur cinq) (Figure 6). Nous allons donc assister au cours des prochaines décennies à un doublement de la classe d'âge des 60 ans ou plus ainsi qu'à une augmentation de l'espérance de vie. Le vieillissement s'accompagne de manière inéluctable d'une altération des principales fonctions physiologiques comme l'altération de la vue ou de l'ouïe. Au niveau du muscle, le vieillissement est associé à une perte progressive et involontaire de la masse et de la force appelée sarcopénie.

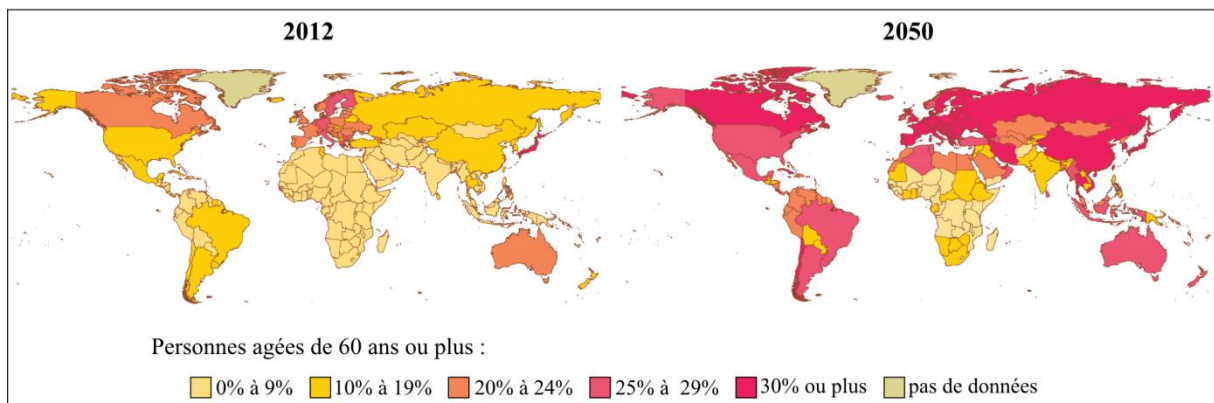


Figure 6 : Carte représentant le pourcentage de la population âgée de 60 ans ou plus en 2012 et 2050. (Adapté des nations unies, 2012)

C'est en 1989 qu'Irwin Rosenberg définit pour la première fois la sarcopénie comme étant une perte de masse musculaire squelettique survenant au cours de l'avancement en âge. Le terme sarcopénie vient du grec : *sarx* pour « chair » et *penia* pour « perte ». En 2010 le groupe de travail européen de réflexion sur la sarcopénie (*European Working Group on Sarcopenia in Older People*), proposa de la définir comme un « syndrome caractérisé par une perte progressive et généralisée de la masse, la force, et la fonction musculaire squelettique augmentant les risques de dépendance physique, d'altération de la qualité de vie et de mort » (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010). Cette nouvelle définition ne limite plus la sarcopénie à une simple diminution de la masse musculaire mais l'élargit à une altération de la force et de la fonction musculaire.

Au niveau du muscle squelettique, la sarcopénie se caractérise par une diminution du nombre et de la taille des fibres musculaires. En effet, des coupes transversales de muscle ont montré que la perte musculaire observée au cours du vieillissement résulte à la fois d'une diminution du nombre des fibres musculaires de type I (oxydatives), type IIa (oxydatives et glycolytiques) et type IIb (glycolytiques), du diamètre des fibres de type IIa et IIb et aussi dans une moindre mesure, des fibres de type I (Lexell *et al.*, 1988; Lexell, 1995; Vandervoort, 2002). Il est alors observé une réduction de la taille du muscle, une infiltration de graisse ainsi qu'une couche plus épaisse de tissus adipeux en périphérie du muscle chez le sujet âgé (Figure 7).

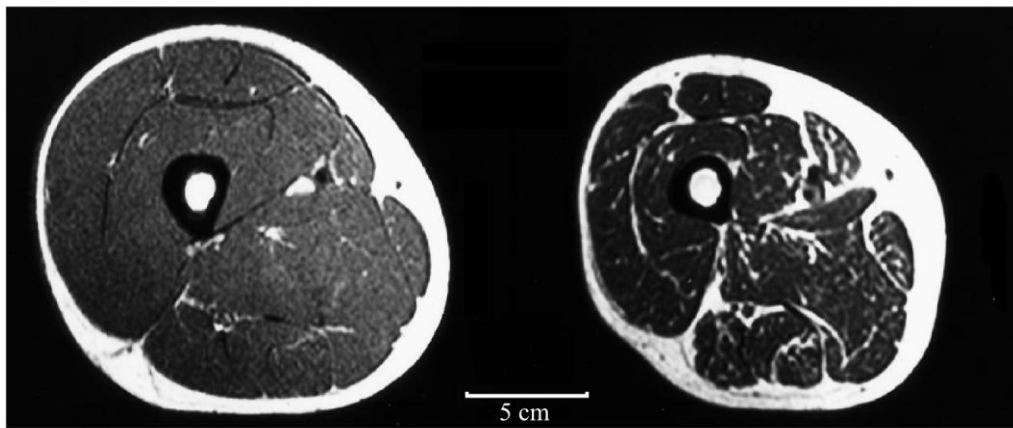


Figure 7 : Effet du vieillissement sur le muscle squelettique.

*Coupe transversale à mi-cuisse obtenue en imagerie par résonance magnétique nucléaire à partir d'un sujet âgé de 24 ans (gauche) et 65 ans (droite). Adapté de Jubrias *et al.*, 1997.*

Ces modifications anatomiques et fonctionnelles du muscle touchent l'homme dès 50 ans, entraînant une diminution de 1 à 2% par an de la masse musculaire (Hiona and Leeuwenburgh, 2008). La sarcopénie est très répandue, il a été estimé que 25% des personnes âgées de moins de 70 ans et 30% des personnes âgées de 80 ans ou plus sont atteints de sarcopénie (Baumgartner *et al.*, 1998).

Le développement de la sarcopénie a des conséquences néfastes importantes car elle est associée à une diminution des capacités physiques et à une augmentation des risques de chutes et/ou de blessures. Dans les cas les plus graves, elle s'accompagne d'une perte d'autonomie empêchant la réalisation des activités de la vie quotidienne et peut conduire à l'hospitalisation ou à l'entrée en institution. En plus des ces conséquences humaines, la sarcopénie a un coût non négligeable pour la société. Il a été estimé que la prise en charge des

conséquences de la sarcopénie a été de 18,5 milliards de dollars pour l'année 2000 aux Etats - Unis (Janssen *et al.*, 2004).

Au vu de l'impact qu'a la sarcopénie sur la santé humaine et ses répercussions financières, cette dégénérescence associée au vieillissement apparaît donc comme un enjeu majeur de santé publique. Il est par conséquent important pour l'avenir de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans l'établissement de ce syndrome afin de mettre au point des stratégies de prévention efficaces. Cela permettrait d'améliorer considérablement la qualité de vie des personnes âgées en empêchant notamment leur perte d'autonomie et d'un point de vue financier cela permettrait de réaliser une économie non négligeable pour la société.

II. La sarcopénie, un processus multifactoriel

Les facteurs conduisant à la sarcopénie ne sont aujourd'hui pas tous identifiés cependant il paraît clair que l'apparition de cette « perte musculaire » ne résulte pas d'un facteur unique mais est un processus multifactoriel extrêmement complexe.

- **L'inactivité**

Le vieillissement s'accompagne d'une diminution de l'activité physique qui peut notamment être due à un mode de vie sédentaire ou à une immobilisation suite à une maladie ou une blessure. Or, il a été montré chez des sujets sains qu'un alitement de dix jours entraînait une diminution de 30% de la synthèse protéique et de 15,6% de la force musculaire, soulignant l'effet extrêmement délétère de la sédentarité (Kortebein *et al.*, 2007). En contrepartie, chez des personnes âgées de plus de 60 ans, un entraînement physique de 60% à 80% de sa force maximale peut augmenter la masse musculaire, si cette entraînement est de 85% de sa forme maximale, cela peut également augmenter la force musculaire (Mayer *et al.*, 2011).

- **Les changements hormonaux**

Afin d'assurer l'homéostasie musculaire, l'équilibre entre la production et la dégradation du muscle doit être assuré et un déséquilibre peut conduire à une atrophie. Les hormones peuvent influencer et réguler ce processus.

Le vieillissement est associé à des changements dans la production et dans la sensibilité de l'organisme à certaines hormones. Ainsi, il est observé une diminution de la

concentration en *insulin-like growth factor-1* (IGF1) et en hormones de croissance qui pourraient participer à l'apparition de la sarcopénie (Perrini *et al.*, 2010). Par exemple, il a été montré que l'IGF-1 permet l'activation de la prolifération des cellules satellites, leur différenciation et augmente la synthèse protéique dans les fibres musculaires (Musarò *et al.*, 1999). Or, les personnes âgées synthétisent moins d'IGF-1 et ont une sensibilité amoindrie à ce facteur de croissance engendrant des problèmes de régénération musculaire ayant pour résultat une atrophie musculaire.

Chez l'homme, il est observé une diminution du taux de testostérone (Surampudi *et al.*, 2012) ce qui se traduit par une diminution de la synthèse protéique dans les fibres musculaires ainsi qu'une diminution de la masse et de la force musculaire. Il a été montré que la testostérone seule augmente la masse et la fonction musculaire mais malgré ces effets bénéfiques sur le muscle, elle provoque de nombreux effets secondaires non désirés (Brotto and Abreu, 2012). De manière générale, il semblerait que le risque de devenir sarcopénique soit plus important chez les hommes que chez les femmes (Lau *et al.*, 2005; Jp *et al.*, 2006).

L'avancée en âge est également associée à des modifications du système immunitaire. En effet, le vieillissement se caractérise par un environnement pro-inflammatoire avec une plus faible activation du système immunitaire primaire qui peut conduire à une augmentation des dommages causés par des infections chez les personnes âgées (Shaw *et al.*, 2010)

- **L'inflammation chronique**

Le vieillissement est associé à une augmentation du taux de cytokines circulantes et de marqueurs pro-inflammatoires. Ces changements du système immunitaire associés à l'âge, connus sous le nom d'immunosénescence, ainsi que l'augmentation de la sécrétion des cytokines par les tissus adipeux sont des causes majeures de l'inflammation chronique observée avec le vieillissement. En effet, le développement de la sarcopénie est associé à une augmentation chronique du taux circulant de médiateurs pro-inflammatoires comme le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), l'interleukine-6 et la protéine C-réactive (Roubenoff, 2007), ce qui contribue à augmenter les risques de morbidité et de mortalité.

Dans le cas du TNF- α , il a par exemple été montré chez l'homme qu'il est associé au catabolisme musculaire (Reid and Li, 2001). De plus, il a été mis en évidence *in vitro* dans des myoblastes que l'exposition au TNF- α conduit à une diminution des protéines des myofilaments. Enfin, le TNF- α peut inhiber la différenciation myogénique *via* la déstabilisation de MyoD (Langen *et al.*, 2004). Ces études mettent en avant que

l'inflammation chronique observée au cours du vieillissement peut contribuer de manière importante au développement d'une atrophie musculaire.

- **La malnutrition**

L'alimentation joue également un rôle important. Il est maintenant clairement établi qu'une carence en nutriments et en acides aminés essentiels altère le métabolisme, la synthèse protéique, et conduit à une perte de masse musculaire qui peut contribuer au développement de la sarcopénie (Muscaritoli *et al.*, 2010). Or chez les personnes âgées, une malnutrition est couramment observée. Par exemple, en Allemagne en 2006, une étude clinique a montré que 56% des personnes âgées hospitalisées étaient malnutries (Pirlich *et al.*, 2006). Ce déséquilibre nutritionnel est généralement dû à des facteurs comme une diminution de l'appétit, des problèmes dentaires, une augmentation de la fréquence et de la gravité des problèmes de santé... De plus le vieillissement s'accompagne de problème d'anabolisme. En effet, avec l'avancée en âge, une résistance anabolique est observée, c'est-à-dire que même si les apports en acides aminés sont suffisants, la réponse du muscle est altérée. Cela s'expliquerait par le fait que le seuil anabolique du sujet âgé est augmenté, il faut donc un apport en acides aminés plus important pour contrecarrer cette résistance (Dardevet *et al.*, 2012). Le sujet âgé se trouve alors dans un système doublement délétère car il présente à la fois des problèmes de malnutrition et le peu de nutriments qu'il apporte à son organisme sont moins bien anabolisés.

Cette mauvaise alimentation chez le sujet âgé conduit à une dénutrition protéino-énergétique qui ralentit le gain de masse et de force musculaire lors de programmes d'entraînement et de résistance. Il a été montré qu'une majoration des apports protéino-énergétique notamment chez les sujets âgés fragiles, ralentit le processus de sarcopénie (Morais *et al.*, 2006). L'apport en nutriments et en acides aminés essentiels est donc indispensable pour lutter contre la sarcopénie. Des approches basées sur la supplémentation en acides aminés essentiels comme la leucine semblent prometteuses (Fujita and Volpi, 2006). La supplémentation en leucine a des effets remarquables sur le remodelage du muscle et serait une thérapie efficace pour réduire les effets atrophiques de conditions cataboliques (Nicastro *et al.*, 2011). Cependant ces résultats sont actuellement débattus car il a également été montré chez le rat âgé qu'un apport en leucine sur le long terme permet d'améliorer l'anabolisme musculaire mais sans changement de la masse musculaire. Il est suggéré que sur le long terme

le métabolisme du muscle s'adapte en augmentant notamment son catabolisme en parallèle de l'augmentation de l'anabolisme (Dardevet *et al.*, 2012).

- **Les modifications neuromusculaires**

Au cours de la vie d'un individu, il peut se produire une perte d'innervation des fibres musculaires par les motoneurones. La fibre musculaire n'est alors plus innervée et ne contribue plus à générer de la force lors de la contraction volontaire. La fibre musculaire va alors produire un signal chimiotactique qui va favoriser la pousse d'un nouveau dendrite à partir d'un motoneurone résiduel. Ce processus conduit à une ré-innervation à partir d'une unité motrice déjà présente. Or, au cours du vieillissement, ce mécanisme de ré-innervation des fibres musculaires est altéré. Il se produit alors une dénervation des fibres musculaires qui deviennent apoptotiques et qui ne sont pas remplacées par de nouvelles fibres ce qui contribue à la perte de masse et de force musculaire (Gonzalez-Freire *et al.*, 2014). De plus, une dénervation préférentielle des fibres de type II est observée. Ces fibres peuvent alors être ré-innervées par des motoneurones de fibres de type I ce qui induit un changement des fibres de type II en fibre de type I (Jang and Van Remmen, 2011). Il en résulte une diminution préférentielle de la force et de la puissance. Le vieillissement s'accompagne aussi d'une diminution du nombre de motoneurones.

- **La régénération musculaire**

La régénération musculaire est un processus important pour le maintien du muscle squelettique. Or, le vieillissement est de manière générale associé à des dysfonctions de ce processus (Hikida, 2011).

La diminution du potentiel de régénération peut s'expliquer par une diminution du nombre de cellules satellites avec l'avancée en âge. Par exemple, il a été montré que le nombre de noyaux par unité de longueur diminue dans les fibres musculaires au cours du vieillissement du muscle squelettique (Brack *et al.*, 2005). De plus, une diminution du potentiel de régénération des cellules satellites, est également observé (Conboy and Rando, 2005). Nous nous trouvons ici en présence d'un processus doublement délétère car le vieillissement s'accompagne à la fois d'une diminution du nombre de cellules satellites et celles qui sont encore présentes ont un potentiel de régénération plus faible.

III. Stress oxydant et sarcopénie

III 1 Théorie radicalaire du vieillissement

La théorie radicalaire du vieillissement a été proposée pour la première fois en 1956 par Denham Harman (Harman, 1956) dans un article intitulé : « Vieillesse : une théorie basée sur la chimie des radicaux libres et des radiations ». Cette théorie repose sur le fait que les espèces réactives de l'oxygène produites par les organismes aérobies induiraient des dommages sur les molécules qui, en s'accumulant au cours du temps seraient responsables du vieillissement. Cette théorie permet notamment d'expliquer des phénomènes observés au cours de l'avancée en âge comme l'altération des fonctions physiologiques ou une plus grande susceptibilité face à différentes maladies. Elle apporte également au niveau cellulaire une explication sur les modifications qui apparaissent au cours de la sénescence telles que l'apparition de mutations au niveau de l'ADN, la carbonylation des protéines, leur dénaturation, l'oxydation des lipides et l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Il est maintenant identifié que le vieillissement s'accompagne d'une augmentation du niveau de carbonylation des protéines et d'oxydation des lipides (Lass *et al.*, 1998; Spiteller, 2001; Inglés *et al.*, 2014), d'une répression des gènes codants pour les enzymes de la chaîne respiratoire (Kayo *et al.*, 2001), d'un ralentissement de la fonctionnalité des mitochondries (Lass *et al.*, 1998), mais aussi d'une induction des gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes. Ces données montrent de manière claire que le vieillissement s'accompagne de nombreuses modifications indiquant que la cellule se trouve dans un état pro-oxydant.

Par ailleurs, il est important de noter que les ERO sont aussi impliquées dans de nombreuses maladies chroniques comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, autant de pathologies liées au vieillissement.

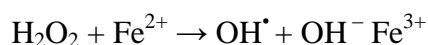
III 2 Les espèces réactives de l'oxygène

III 2 a) Production des ERO

Le muscle est un organe particulièrement soumis aux ERO. Pendant une contraction le niveau de production de certains type d'ERO comme les superoxydes peut être augmenté de

50 à 100 fois (Barbieri and Sestili, 2011). Les ERO sont pour la plupart des radicaux chimiques, comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) mais peuvent aussi être présents sous forme d'espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Les espèces réactives de l'oxygène sont produites par le métabolisme cellulaire, majoritairement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Finkel, 2011). Dans la matrice mitochondriale, les électrons du NADH vont être transmis au complexe I puis vont circuler à travers les complexes II et III jusqu'au complexe IV où l' O_2 sera l'accepteur final de ces électrons. Cependant au cours de ce processus, une « fuite » d'électrons peut avoir lieu au niveau des complexes I et III et conduire à la production d'anion superoxyde. L'ensemble de ces ERO est issu de la réduction partielle de l'oxygène (Figure 8). La molécule de dioxygène possède deux électrons non appariés sur sa couche externe et va être capable dans certaines conditions d'accepter un électron et former ainsi l'anion superoxyde, un radical modérément réactif. Ce radical est produit en majorité au niveau de la mitochondrie, dans la matrice ou dans l'espace inter-membranaire. Au niveau de ces mêmes compartiments, l'anion superoxyde peut subir une réaction de dismutation car il est le substrat des superoxydes dismutases (SOD) qui provoquent sa transformation en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 peut alors être dégradé en H_2O dans le cytosol en présence d'enzymes comme les catalases, les glutathion peroxydases ou les peroxyrédoxines (aussi présentes dans la matrice mitochondriale). Dans les mitochondries ou le cytosol, le peroxyde d'hydrogène peut être transformé en radical hydroxyl (HO^{\bullet}) en présence de métaux comme le Fer par la réaction de Fenton :



Le radical hydroxyle est extrêmement délétère pour la cellule et va rapidement oxyder des molécules voisines et entraîner des dommages au niveau de l'ADN, des protéines ou des lipides.

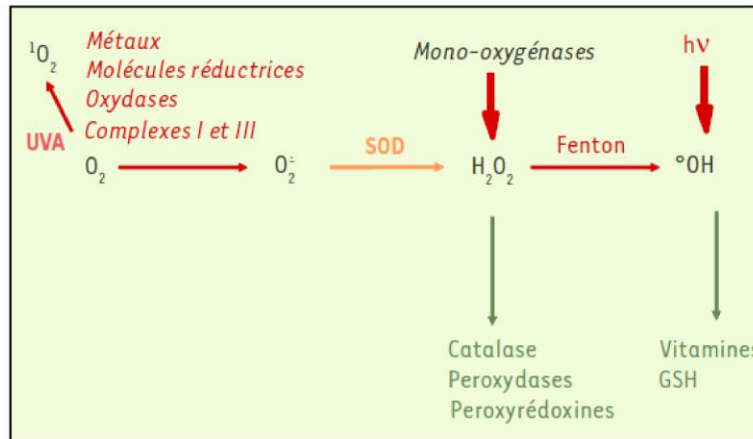


Figure 8 : Voie de synthèse des espèces réactives de l'oxygène à partir de l'oxygène moléculaire (d'après Barouki, 2006).

Au sein de la cellule, la mitochondrie est un site important de production de radicaux libres puisqu'il est estimé qu'au niveau de la chaîne respiratoire, environ 2% de l'oxygène est transformé en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Inoue *et al.*, 2003) et qu'environ 90% de la production des ERO cellulaires sont issus de la mitochondrie (Balaban *et al.*, 2005). La mitochondrie n'est pas la seule source de production d'ERO dans le muscle. Par exemple, les NADPH oxydases (NOX) localisées dans le réticulum sarcoplasmique, les tubules T ou le sarcolemme produisent aussi l'anion superoxyde dans les fibres musculaires (Powers and Jackson, 2008). La phospholipase A2 (PLA2) est une autre source d'ERO dans le muscle. L'acide arachidonique libéré de la membrane plasmique par la PLA2 est le substrat d'enzymes qui génèrent des ERO comme la lipooxygénase (Zuo *et al.*, 2004). L'activation de la PLA2 peut aussi stimuler les NOX et l'augmentation de l'activité des PLA2 peut favoriser la production d'ERO au niveau du muscle dans les mitochondries, le cytosol et libérer des ERO dans l'espace extra-cellulaire (Nethery *et al.*, 2000; Zuo *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2006). Il existe une forme dépendante et une autre indépendante du calcium de la PLA2 et les deux contribuent à former des ERO dans le muscle. L'isoforme indépendante du calcium semble impliquée dans la production d'ERO au niveau du cytosol des cellules musculaires (Gong *et al.*, 2006) alors que la forme dépendante du calcium est localisée dans la mitochondrie et est connue pour contribuer à la production d'ERO pendant la contraction musculaire (Nethery *et al.*, 1999). De plus, l'anion superoxyde peut également être généré par les xanthine oxydases (XO) dans le cytosol des cellules musculaires de rat en contraction (Gomez-Cabrera *et al.*, 2005).

III 2 b) Rôles physiologiques

Les espèces réactives de l'oxygène, sont généralement considérées comme délétères pour les cellules, cependant, il est important de ne pas oublier que dans des conditions physiologiques, un niveau basal d'ERO doit être conservé car elles assurent un rôle comparable à des « second-messagers ». La production contrôlée des ERO est un processus indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire (Dröge, 2002).

Dans le muscle, les ERO jouent un rôle de signalisation, notamment lors de la contraction. Il a été montré dans le muscle de rat que l'augmentation des ERO lors d'un exercice permettait l'activation de la voie MAP kinase qui active la voie NF- κ B, ce qui permet l'expression d'enzymes anti-oxydantes comme la SOD. Cette adaptation est perdue lorsque la production d'ERO est abolie (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008).

Les ERO sont également impliquées dans la régulation de l'expression de gènes. Dans la lignée cellulaire de muscle C2C12, il a été montré que l' H_2O_2 induit l'activation de NF- κ B, un facteur de transcription impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme l'inflammation, la croissance cellulaire, la réponse au stress et l'apoptose (Zhou *et al.*, 2001). AP-1 un autre facteur de transcription important dans la régulation de nombreux gènes et peut également être activé par des ERO et plus particulièrement par l' H_2O_2 (Allen and Tresini, 2000). Ces données montrent le rôle des ERO dans la régulation de processus physiologiques.

III 3 Systèmes de défenses

Afin de se prémunir d'une production en excès d'espèces réactives de l'oxygène et des conséquences qu'une situation de stress oxydant pourrait avoir, la cellule a développé des systèmes de défense. Parmi ces différents systèmes, nous trouvons des systèmes endogènes produits par la cellule ou exogènes qui proviennent de l'alimentation.

III 3 a) Systèmes de défense enzymatiques

- **Les superoxydes dismutases**

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métallo-enzymes retrouvées dans toutes les cellules animales et végétales. Les SOD ont une fonction anti-oxydante car elles catalysent la réaction de dismutation de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) en H_2O et H_2O_2 . Il existe trois types de SOD (Chandel and Budinger, 2007) :

- la Cu/ZnSOD de masse moléculaire de 32 kDa qui est localisée dans le cytosol et codée par le gène SOD1,

- la MnSOD est un homotetramère avec des sous unités de masse moléculaire d'environ 23 kDa localisée au niveau de la matrice mitochondriale et codée par le gène SOD2,

- la Cu/ZnSOD extracellulaire, synthétisée exclusivement par certains types cellulaires comme les cellules endothéliales et les fibroblastes, est un homotetramère de 135 kDa codé par le gène SOD3.

Ces enzymes nécessitent la présence d'un ion métallique pour être fonctionnelles.

→ Dans le muscle, l'activité de la MnSOD localisée dans la matrice mitochondriale est doublée au cours du vieillissement (Pansarasa *et al.*, 2000) alors que celle de la SOD cytoplasmique n'est pas modifiée. Cela renforce l'hypothèse qu'au cours du vieillissement on assiste à une augmentation de la production d'ERO de la chaîne respiratoire et donc d'anion superoxyde au niveau de la mitochondrie.

- **Les catalases**

Le peroxyde d'hydrogène produit par les SOD va devoir être dégradé afin de ne pas provoquer de dommages cellulaires. C'est à ce niveau qu'interviennent les catalases qui vont alors dégrader l' H_2O_2 en eau et en dioxygène. Ces hémoprotéines localisées dans les mitochondries et dans le cytosol sont formées de quatre sous-unités. Elles ont une masse moléculaire de 244 kDa (Ko *et al.*, 2000).

→ Les études concernant l'évolution de l'activité des catalases au cours du vieillissement sont contradictoires, certaines ne montrent pas de changement (Pansarasa *et al.*, 2002), alors que d'autres montrent une augmentation (Marzani *et al.*, 2004) ou une diminution (Fanò *et al.*, 2001) de leur activité. Il semble que l'évolution de l'activité des catalases au cours de l'âge se fasse en deux temps. Il y aurait un première phase de diminution d'activité chez l'animal adulte puis une augmentation significative chez l'animal âgé (Ji *et al.*, 1990).

- **Les peroxydases**

Les peroxydases sont des enzymes impliquées dans la réduction des peroxydes comme l' H_2O_2 , et sont localisées dans la mitochondrie et dans le cytosol. Elles se divisent en deux groupes : les glutathion peroxydases (GPx), qui utilisent le glutathion comme réducteur et les

thioredoxines peroxydases (TPx) qui utilisent le système thioredoxine/thioredoxine réductase comme réducteur lors de leur cycle catalytique.

Les glutathion peroxydases sont formées de quatre sous-unités d'environ 22 kDa. Chaque sous unité contient un atome de sélénium sous sa forme sélénocystéine qui forme le site actif de l'enzyme (Arthur, 2000). Elles sont localisées au niveau du cytosol et des mitochondries des cellules (Brigelius-Flohé and Maiorino, 2013).

Les thiorédoxines sont quant à elles des thiol-oxydoreductases qui contiennent deux résidus cystéine dans leur site catalytique et participent à la réduction des résidus thiol. Au cours de son processus catalytique, la protéine passe sous sa forme oxydée et c'est grâce aux thiorédoxines réductases qu'elle va pouvoir revenir à sa forme réduite (Collet and Messens, 2010).

→ Au cours du vieillissement, l'activité des peroxydases ne semble pas être modifiée (Leeuwenburgh *et al.*, 1994).

III 3 b) Systèmes de défense non enzymatique

- **Le glutathion**

Le glutathion est un tripeptide constitué de cystéine, d'acide glutamique et de glycine. Localisé au niveau du cytosol et des mitochondries, il est présent à de fortes concentrations (1 à 10 mM). Il est le co-facteur de plusieurs enzymes antioxydantes, joue un rôle dans la réparation des protéines oxydées et peut aussi interagir de manière spontanée avec les ERO. L'ensemble de ces réactions transforment la forme réduite du glutathion (GSH) en sa forme oxydée (GSSG). Il est donc essentiel pour la cellule de maintenir un rapport GSH/GSSG stable ainsi qu'un niveau élevé de GSH pour prévenir d'éventuels dommages oxydatifs (Zhang and Forman, 2012).

→ Il semble que dans le muscle squelettique humain, le taux de GSH reste constant avec le temps alors que le taux de GSSG est augmenté de manière significative (Marzani *et al.*, 2004). Le rapport GSH/GSSG serait alors diminué ce qui signifie que les défenses antioxydantes seraient amoindries.

- **La Vitamine E**

La vitamine E ou α -tocopherol est une molécule liposoluble qui est un composant important des membranes biologiques. Cet antioxydant est dit exogène car il n'est pas

synthétisé par la cellule. La vitamine E interagit directement avec les ERO. Lors de la peroxydation lipidique, la vitamine E va permettre l'inhibition de l'étape de propagation, et ainsi assurer un rôle de protection des membranes contre l'oxydation lipidique (Herrera and Barbas, 2001).

→ Dans des cellules musculaires, il a été montré que la vitamine E joue un rôle important dans la réparation membranaire. En effet Howard *et al.*, ont montré que des cellules musculaires incubées avec de la vitamine E puis soumises à un stress oxydant ont une meilleure réparation membranaire que des cellules qui n'ont pas été prétraitées avec cet antioxydant (Howard *et al.*, 2011).

- **La vitamine C**

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble qui est synthétisée par beaucoup de mammifères mais est exogène chez l'homme. C'est une molécule antioxydante car elle est à la fois capable de réagir de manière directe avec les ERO ou indirectement en recyclant des composés qui ont réagi avec les ERO comme les caroténoïdes ou la vitamine E (Padayatty *et al.*, 2003).

→ De la même manière que la vitamine E, il a été montré dans le muscle de rat qu'une supplémentation en vitamine C permet la réduction des marqueurs de stress oxydant à la suite d'un exercice musculaire répété (Ryan *et al.*, 2010).

- **Les caroténoïdes (β -Carotène)**

Les caroténoïdes sont eux aussi des molécules exogènes qui peuvent être acquises par l'alimentation. Ils sont capables de régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C. Les caroténoïdes sont plutôt des réparateurs permettant le maintien des défenses antioxydantes et sont donc peu impliqués dans les réponses précoces au stress oxydant (Hermes-Lima, 2004).

→ Dans le muscle d'animal âgé, il a été montré qu'une supplémentation en polyphénols et caroténoïdes pendant 10 mois permettait d'améliorer l'activité du glutathion (Rebrin *et al.*, 2005)

IV. Conséquences du stress oxydant

Comme nous venons de le voir dans la partie III 2 b), les ERO sont indispensables au bon fonctionnement des cellules lorsque leur production est contrôlée et qu'il existe un équilibre entre la production des ERO et leur dégradation assurée par des systèmes de défenses antioxydants. Cependant, dans des conditions particulières cet équilibre peut être rompu provoquant une augmentation de la quantité d'ERO intracellulaires (Figure 9). La cellule va alors tenter de contenir cette augmentation en sur-activant des systèmes antioxydants (synthèse d'enzymes antioxydantes). Si cette adaptation n'est pas suffisante et que cela conduit à une accumulation d'ERO, la cellule se trouve dans un état de **stress oxydant**.

D'une manière générale, une accumulation d'ERO est extrêmement délétère pour la cellule et peut entraîner des dommages irréversibles sur les biomolécules comme l'ADN, les lipides et les protéines (Cadet *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 1995).

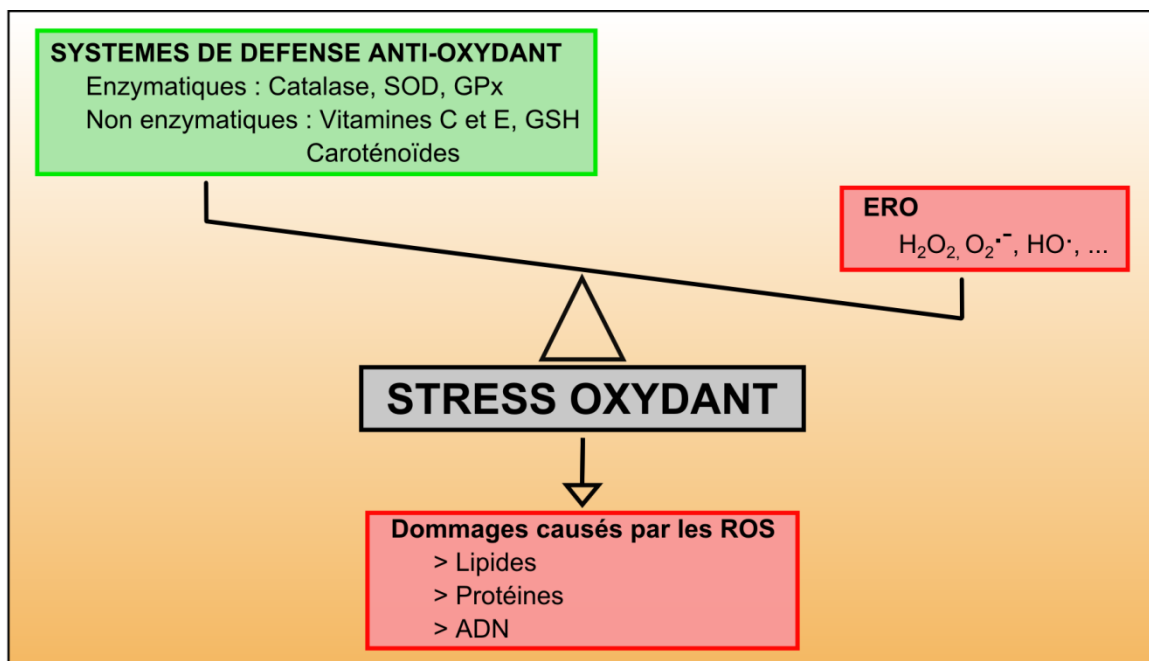


Figure 9 : Représentation schématique du stress oxydant.

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et leur élimination par les systèmes de défense antioxydants. Les ERO s'accumulent dans la cellule. Cela conduit alors à une oxydation des constituants cellulaires comme les lipides, les protéines et l'ADN.

- **L'ADN mitochondrial**

Dans le muscle, l'ADN mitochondrial (ADNmt) de par sa proximité avec la chaîne respiratoire et la faible protection que lui confère l'absence d'histones est particulièrement exposé aux radicaux libres (Beckman and Ames, 1999). Or, l'ADNmt code pour différentes sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire. Les dommages oxydatifs que subit le génome mitochondrial entraînent donc une dysfonction des protéines impliquées dans le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire. Ces modifications sur les complexes des oxydations phosphorylantes ont, à la fois pour conséquence une diminution des capacités de la mitochondrie à produire de l'ATP et également une augmentation de la production d'ERO due au ralentissement de la chaîne respiratoire. Les mitochondries se trouvent alors dans un état fortement délétère puisque les ERO conduisent à la synthèse de protéines mitochondriales non fonctionnelles ce qui va entraîner une surproduction d'ERO et ainsi de suite. Plusieurs études ont montré que le degré d'anomalies de l'ADNmt est corrélé avec l'avancée en âge (Pesce *et al.*, 2001; Gianni *et al.*, 2004).

- **Carbonylation des protéines**

Les protéines sont également les cibles des ERO et le stress oxydant induit leur oxydation qui est également observée au cours du vieillissement. L'oxydation des protéines entraîne des modifications des acides aminés aboutissant à une perte de fonction des protéines. De manière générale ces protéines oxydées ne sont pas réparées mais sont dégradées par le protéasome (Rossi *et al.*, 2008). La carbonylation des protéines est utilisée comme marqueur d'oxydation. Elle a lieu au niveau des résidus lysine, arginine, proline et thréonine. La carbonylation peut être directe ou une conséquence de la peroxydation des lipides (Grune *et al.*, 2001). Dans le muscle au cours du vieillissement, une augmentation du taux de protéines carbonylées est observé (Gianni *et al.*, 2004).

- **Peroxydation des lipides**

Un des principaux indicateurs de dommage radicalaire au cours du vieillissement est la peroxydation des lipides. Les chaînes polyinsaturées des acides gras des membranes sont la cible des radicaux libres en présence d'oxygène, ce qui conduit à la peroxydation lipidique. Cela a pour conséquence une diminution de la fluidité membranaire, une augmentation de la perméabilité et enfin cela peut entraîner des dommages au niveau des protéines membranaires (Richter, 1987). Dans le muscle squelettique humain, le taux de lipides peroxydés est significativement supérieur chez les sujets âgés que chez les sujets sains (Marzani *et al.*,

2004). De plus, il a été montré que des cellules musculaires soumises à un stress oxydant ne sont plus capables d'assurer leur réparation membranaire et seule une supplémentation en antioxydants comme la vitamine E est capable de protéger les membranes. Ces résultats montrent que la peroxydation lipidique des membranes biologiques entraîne des problèmes dans la réparation membranaire (Howard *et al.*, 2011).

V. Stress oxydant et pathologies

V 1 Pathologies associées au vieillissement

Le stress oxydant serait responsable de l'apparition de nombreuses pathologies au cours du vieillissement (Brieger *et al.*, 2012). Les ERO sont généralement impliqués dans des maladies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires, le diabète, les troubles neurologiques, la maladie de Parkinson, etc... L'augmentation d'ERO au cours du vieillissement place l'organisme dans un état d'inflammation chronique qui serait un mécanisme déclencheur du vieillissement. Il est par exemple observé dans la plupart des pathologies associées au vieillissement une inflammation chronique forte associée à une augmentation de l'interleukine-6 (Maggio *et al.*, 2006) qui est maintenant utilisée comme marqueur d'un état inflammatoire.

V 2 Pathologies musculaires

- **Les dystrophies musculaires**

Les dystrophies musculaires sont un groupe de maladies génétiques qui s'accompagnent d'une dégénérescence progressive des fibres musculaires squelettiques provoquant des douleurs importantes, l'invalidité et éventuellement la mort (Emery, 2002). A ce jour, plusieurs études ont montré une production anormale d'ERO ainsi que le rôle important du stress oxydant dans les dystrophies musculaires (Williams and Allen, 2007; Lawler, 2011). Par exemple, dans le cas de souris *mdx* (animaux modèles de la myopathie de Duchenne), l'accumulation d'ERO est décrite comme une cause de la dégénération musculaire (Disatnik *et al.*, 1998). Il a été montré dans ce modèle d'étude, que le stress oxydant apparaît trois semaines après la naissance et qu'il précède la mort cellulaire. Le rôle important des ERO dans les souris *mdx* et chez des patients atteints de myopathie de

Duchenne a été étendu à d'autres types de myopathies comme la dystrophie de Becker (Haycock *et al.*, 1998).

Les dysferlinopathies sont des myopathies causées par la mutation du gène de la dysferline qui est une protéine impliquée dans la réparation membranaire du muscle squelettique (Han and Campbell, 2007). Cette déficience cause trois types de dystrophies musculaires qui se caractérisent par une atrophie du muscle : la *Limb-girdle muscular dystrophy type 2B* (LGMD2B), la *Miyoshi muscular dystrophy* et la *distal myopathy with anterior tibialis onset* (DMAT). Il a été montré que les dysferlinopathies sont également fortement associées au stress oxydant et à une augmentation de l'inflammation (Terrill *et al.*, 2013).

Certaines myopathies sont donc associées à une augmentation du stress oxydant qui de manière générale n'est pas une conséquence mais participe à l'établissement de la maladie. Il a même été montré que l'utilisation d'antioxydants comme la N-acetylcystéine permet d'améliorer la fonction du muscle chez la souris *mdx* (Dorchies *et al.*, 2006).

- **Les atrophies musculaires**

Il est établi que dans le muscle une production importante d'ERO a lieu à la fois lors d'un exercice de contraction mais aussi lors d'inactivité/immobilisation musculaire (Reid *et al.*, 1992; Kondo *et al.*, 1993). Des études menées sur l'animal et sur l'homme ont montré que l'immobilisation provoque des dommages oxydatifs dans les fibres musculaires et que cela conduit à une atrophie musculaire (Kondo *et al.*, 1993; Dalla Libera *et al.*, 2009).

Le stress oxydant peut conduire à une atrophie musculaire en agissant à différents niveaux comme :

- l'inhibition la synthèse protéique. Il est suggéré que le stress oxydant diminue la synthèse protéique en diminuant la phosphorylation de la protéine 4E-BP1. Cette baisse de phosphorylation freine alors la traduction des ARN messagers. En effet, quand 4E-BP1 n'est pas phosphorylée, elle bloque l'association du complexe eIF4F qui ne peut plus initier la traduction (Pham *et al.*, 2000),

- l'induction de la protéolyse. Le stress oxydant induit pendant l'inactivité du muscle squelettique peut activer l'expression des gènes codant pour les protéases neutres calcium-dépendantes. Des études menées dans des myotubes C2C12 ont montré que l'induction d'un stress oxydant induisait une augmentation de l'activité des calpaïnes qui conduisait à une

atrophie des myotubes (McClung *et al.*, 2009). Cette augmentation de l'activité des calpaïnes en réponse au stress oxydant a également été montrée dans des myoblastes humains (Dargelos *et al.*, 2010).

- **La sarcopénie**

Au cours du vieillissement, l'augmentation des dommages oxydatifs sont les contributeurs majeurs du déclin du muscle squelettique (Pansarasa *et al.*, 2000; Fanò *et al.*, 2001). De manière générale, les ERO sont fortement impliquées dans de nombreux facteurs évoqués précédemment comme les problèmes de ré-innervation du muscle, dans l'état d'inflammation chronique mais aussi dans les problèmes mitochondriaux.

L'augmentation des ERO est de manière générale associée à une diminution de la capacité de contraction du muscle. Il a par exemple été montré chez la souris que la protéine Ryr1, indispensable au processus d'excitation-contraction, est une cible des ERO au cours du vieillissement. L'oxydation de cette protéine conduit à son remodelage ainsi qu'à une fuite de calcium du réticulum sarcoplasmique dans le sarcoplasme (Andersson *et al.*, 2011). Ce processus a pour conséquence des dysfonctions dans le processus de contraction musculaire ainsi que l'apparition d'une faiblesse musculaire.

Le vieillissement est également associé à une diminution du potentiel de régénération du muscle squelettique et une diminution du nombre de cellules satellites (Kadi *et al.*, 2004). Les ERO seraient en partie responsables de ces observations. Il a été par exemple montré que l'induction d'un stress oxydant par utilisation d' H_2O_2 diminue de manière significative les capacités de prolifération des cellules satellites (Renault *et al.*, 2002b).

L'atrophie des fibres musculaires observée dans le cas de la sarcopénie peut être également expliquée par une activation de facteurs pro-apoptotiques comme le TNF α . Cette activation de l'apoptose est liée à une accumulation d'ERO dans des cellules musculaires en culture (Dargelos *et al.*, 2010), mais également au cours du vieillissement (Meng and Yu, 2010).

L'augmentation des ERO observée au cours du vieillissement a donc des effets sur des processus essentiels au muscle squelettique comme la contraction ou le maintien de l'homéostasie musculaire (régénération et apoptose). Leur altération dans le cas de la sarcopénie est inéluctable et a pour conséquence une diminution de la force ainsi que de la masse musculaire.

Partie III. Cavéoles et caveolines

I. Qu'est-ce qu'une cavéole ?

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique d'une taille allant de 50 à 100 nm de diamètre (Figure 10 A). Elles ont été observées pour la première fois dans les années 1950 par microscopie électronique. Elles ont d'abord été appelées vésicules plasmiques par Palade en 1953 (Palade, 1953) puis deux ans plus tard en 1955, Yamada, proposa le terme de cavéoles (faisant référence à leur forme en petite « grotte » (*cave* en anglais) (Yamada, 1955). Elles ont une composition lipidique particulière, enrichie en cholestérol et en sphingolipides, et sont à ce titre définies comme des radeaux lipidiques (*rafts* en anglais). Leur forme caractéristique d'oméga inversé est rendue possible par la présence des cavéolines, protéines majoritaires des cavéoles, et de cavines (Figure 10 B). Ces deux protéines sont indispensables à la formation des cavéoles.

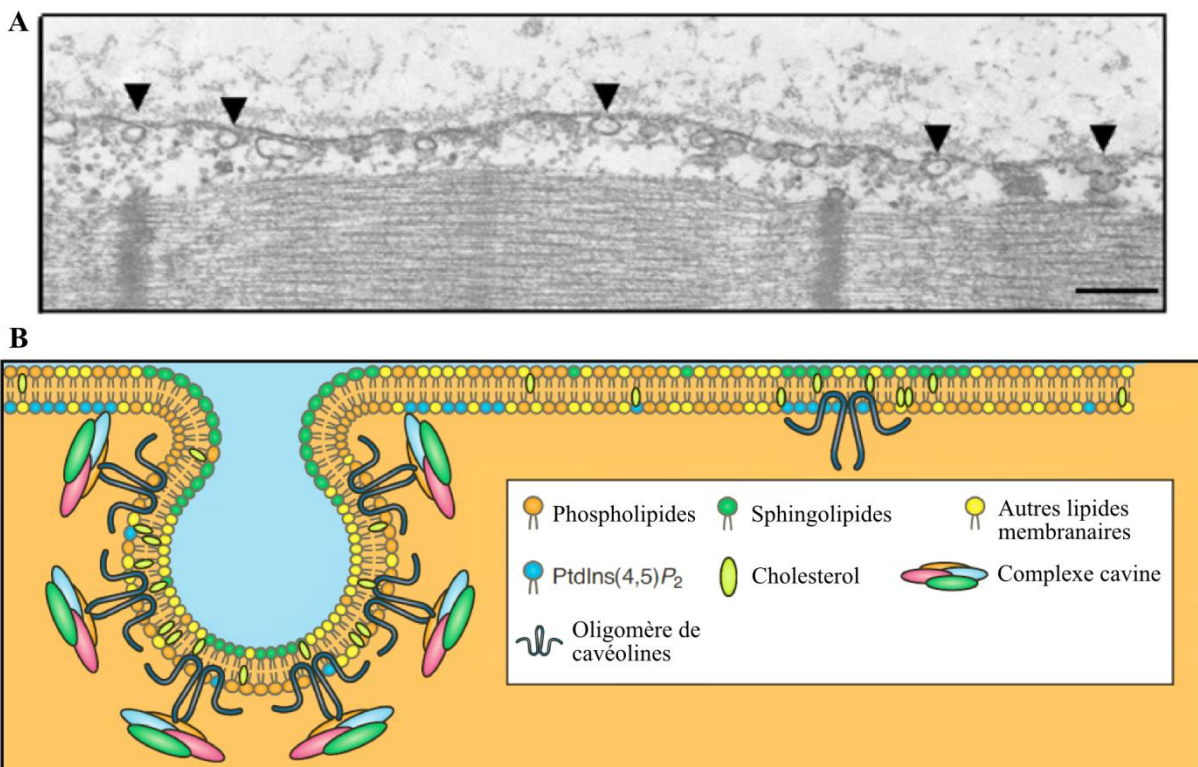


Figure 10 : Cavéoles et cavéolines

A : Cavéoles observées par microscopie électronique à transmission dans du muscle squelettique. Echelle 200 nm. **B :** Représentation schématique d'une cavéole structurée par ses protéines majoritaires les cavéolines et enrichies en cholestérol et sphingolipides. PtdIns(4,5)P₂ = phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate D'après (Hayashi et al., 2009; Bastiani and Parton, 2010)

Les cavéoles sont de véritables organelles et sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires comme par exemple : l'endocytose, la transcytose, l'homéostasie du cholestérol et des lipides, la transduction du signal, ou encore dans la réponse au stress mécanique. Elles sont aujourd'hui décrites comme nécessaires dans de plus en plus de processus et leur rôle physiologique peut être très différent en fonction du type cellulaire. Les cavéoles peuvent être très abondantes dans certains types cellulaires comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, les adipocytes ou encore, les cellules de muscle lisse mais sont absentes des lymphocytes et des neurones.

Le plus souvent, les cavéoles ont une forme d'invagination de la membrane plasmique (Figure 11, A et B). Elles peuvent aussi prendre des formes moins traditionnelles comme des vésicules détachées de la membrane plasmique (Figure 11 C), elles peuvent s'associer en groupe et prendre la forme de « grappes » ou de « rosettes » (Figure 11 D et E) mais aussi sous forme de tubes allongés (Figure 11 F). Ces structures de cavéoles moins conventionnelles sont le plus souvent dépendantes du type cellulaire. Par exemple, les structures en grappe sont préférentiellement retrouvées dans le muscle en développement et les adipocytes qui ont en plus des structures en rosette. Les vésicules détachées ainsi que les tubules sont quant à eux généralement retrouvés dans les cellules endothéliales (Razani *et al.*, 2002).

II. Les cavéolines

Les cavéolines sont les protéines « signature » des cavéoles et ont une séquence conservée composée des acides aminés « FEDVIAEP » (situé sur la partie hydrophile de la protéine du côté N-terminal) qui est définie comme la séquence caractéristique des cavéolines (Williams and Lisanti, 2004). Au niveau de la membrane plasmique, les cavéolines forment des oligomères de haut poids moléculaire. Il existe trois isoformes de cavéolines qui sont exprimées en fonction du type cellulaire (Figure 12, A).

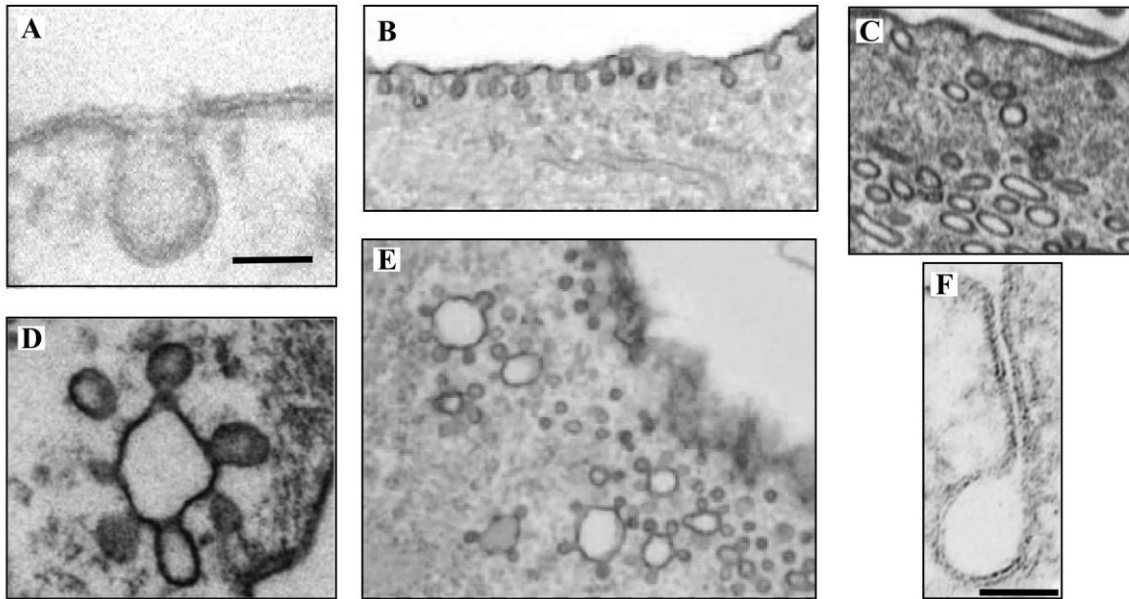


Figure 11 : Structures des cavéoles.

Les cavéoles sont généralement décrites comme des invaginations de la membrane plasmique en forme d'oméga inversé (A et B). Cependant, elles peuvent être présentes sous forme vésiculaire appelées « cavéosomes » (C) ou se « clustériser » et adopter une forme en rosette (D et E). Les cavéoles peuvent également adopter une forme tubulaire (F). Ces cavéoles ont été observées dans des adipocytes (A, B et E), dans du muscle lisse d'artère pulmonaire (C et D) et dans des cellules endothéliales (F). Echelle = 50 nm. D'après (Predescu et al., 2003; Parton and Simons, 2007; Patel and Insel, 2009).

II 1 La cavéoline-1

La cavéoline-1 est une protéine membranaire ayant une masse moléculaire de 21 kDa. Elle est abondamment exprimée dans les cellules endothéliales, les adipocytes et les cellules de muscle lisse et est indispensable à la formation des cavéoles. Une suppression de la cavéoline-1 induit une perte de cavéoles (Drab et al., 2001) et son expression dans des cellules qui ne l'expriment pas de manière endogène induit la formation de cavéoles (Fra et al., 1995; Walser et al., 2012).

Il existe deux isoformes de la cavéoline-1 :

- l'isoforme α de 24 kDa composée de 178 acides aminés,
- l'isoforme β de 21 kDa composée de 147 acides aminés.

Cette différence entre les isoformes α et β réside dans le fait que dans un cas la protéine commence à la méthionine 1 et dans le deuxième, à la méthionine 32. L'isoforme β est donc plus courte de 31 acides aminés du côté N-terminal de la protéine (Figure 12 A).

II 2 La cavéoline-2

La cavéoline-2 est aussi présente sous différentes isoformes (Figure 12 A). Sur la séquence de l'ARN messager codant la cavéoline-2, deux initiations de traduction sont possibles. Cela conduit à la formation de l'isoforme α de 162 résidus et l'isoforme β de 149 résidus. Une troisième isoforme plus courte de cette protéine a également été décrite : l'isoforme γ qui est moins abondante (Scherer *et al.*, 1996). Cavéoline-1 et cavéoline-2 sont généralement exprimées dans les mêmes tissus, ont la même distribution, sont colocalisées et forment des hétéro-oligomères (Scherer *et al.*, 1997). La formation de ces hétéro-oligomères est due à une région de la protéine située du côté N-terminal et appelée domaine d'oligomérisation (Monier *et al.*, 1995; Sargiacomo *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1997).

La cavéoline-2 présente 38% d'identité et 58% de similarité avec la cavéoline-1 et est de loin la plus divergente des cavéolines, elle ne peut d'ailleurs pas former à elle seule des cavéoles. Les souris n'exprimant pas cette protéine ne présentent pas de changement dans le trafic de la cavéoline-1 et n'ont pas de défaut dans la formation des cavéoles. En absence de la cavéoline-1, cette protéine n'est pas capable de s'homo-oligomériser et former des structures de haut poids moléculaire. On peut alors la retrouver sous des formes monomériques ou dimériques qui sont retenues au niveau de l'appareil de Golgi (Parolini *et al.*, 1999).

II 3 La cavéoline-3

La cavéoline-3 (comme la cavéoline-1) est indispensable et suffisante à la formation des cavéoles (Galbiati *et al.*, 2001) et est essentielle au maintien de l'homéostasie du muscle (Woodman *et al.*, 2002). Lorsqu'elle fut identifiée pour la première fois par Way et Parton (Way and Parton, 1995) elle fut baptisée M-Cavéoline car son expression est spécifique du muscle (muscle lisse, muscle squelettique et muscle cardiaque).

La cavéoline-3 possède 151 acides aminés, elle est donc plus courte de 27 acides aminés que la cavéoline-1 (Figure 12 A). Ces deux protéines sont très proches en séquence puisque qu'elles présentent 65% d'identité et 85% de similarité (Way and Parton, 1995; Tang *et al.*, 1996). La cavéoline-3 est capable de s'oligomériser aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* formant ainsi des homo-oligomères de haute masse moléculaire composés de 14 à 16 monomères (Tang *et al.*, 1996).

II 4 Structure des cavéolines

Au sein des cavéoles, la cavéoline adopte une structure en épingle à cheveux avec ses domaines N- et C-terminaux orientés du côté cytosolique (Figure 12 B). Ainsi, la protéine pénètre et ressort de la membrane plasmique du côté du cytoplasme et reste localisée du côté du feuillet interne de la membrane cellulaire. La protéine est composée de trois domaines (Figure 12, C) :

- le côté N-terminal, hydrophile,

- la région centrale hydrophobe, regroupe des acides aminés essentiellement hydrophobes qui forment le domaine transmembranaire (*Trans Membrane Domain* ou TMD). C'est au niveau de cette région que la protéine forme une structure en épingle à cheveux à travers le feuillet interne de la membrane plasmique,

- le côté C-terminal, hydrophile.

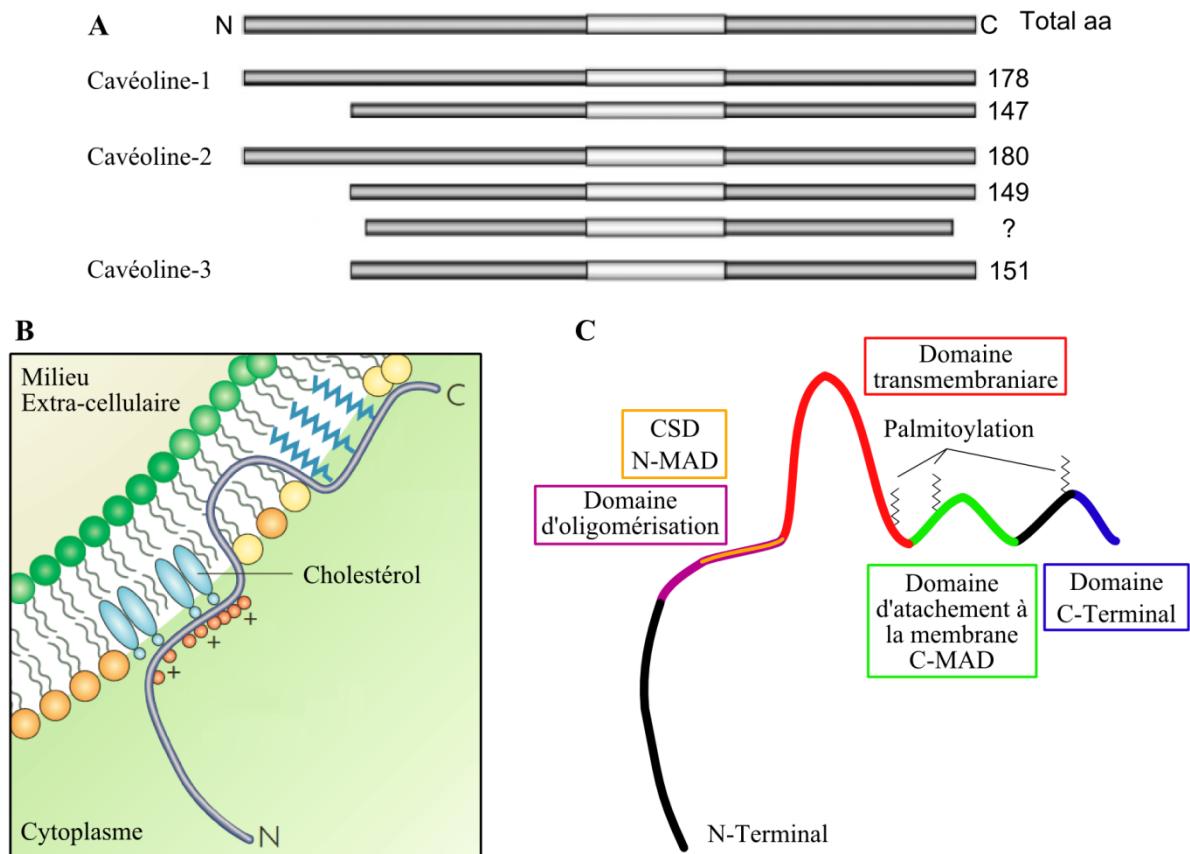


Figure 12 : Structure des cavéolines.

A Représentation schématique des différentes isoformes des cavéolines. **B** Représentation schématique de l'insertion d'une cavéoline dans la membrane, avec les côtés N- et C-terminaux du côté du cytosol et le domaine intra-membranaire structuré en épingle à cheveux. **C** Représentation schématique des différents domaines d'une cavéoline, qui lui permettent notamment son insertion dans la membrane, son oligomérisation et son interaction avec d'autres protéines. Adapté de (Couet et al., 2001; Parton and Simons, 2007).

II 4 a) Modifications post-traductionnelles

Les cavéolines comportent trois domaines de **palmitoylation** du côté C-terminal de la protéine (Figure 12 C). Cette modification a lieu sur les résidus cystéine 133, 143 et 156 pour la cavéoline-1 et les résidus 106, 116 et 129 pour la cavéoline-3 (Dietzen *et al.*, 1995; Parat and Fox, 2001; Kim *et al.*, 2014). Le rôle de la palmitoylation reste encore aujourd'hui controversé. Des études suggèrent que cette modification post-traductionnelle n'est pas nécessaire à la localisation de la cavéoline-1 à la membrane ni à sa localisation dans les cavéoles mais permet de stabiliser la structure oligomérique de la protéine à la membrane plasmique (Monier *et al.*, 1996). D'autres ont montré un rôle fonctionnel de la palmitoylation dans son interaction avec des molécules impliquées dans la signalisation (Galbiati *et al.*, 1999a; Lee *et al.*, 2001). Des études plus récentes ont montré que la palmitoylation de la cavéoline-3 n'exerçait qu'un effet modeste sur la structure de la protéine (Kim *et al.*, 2014).

En réponse à divers stimuli, comme des facteurs de croissance, des radiations UV et aussi à un stress oxydant ou mécanique, la cavéoline-1 peut être **phosphorylée** par des kinases de la famille des Src (Li *et al.*, 1996a; Sanguinetti *et al.*, 2003). Cette modification post-traductionnelle a lieu au niveau de la tyrosine en position 14 et peut activer des voies liées à la mort ou à la survie de la cellule (Quest *et al.*, 2013). Dans certains cancers, la phosphorylation de la cavéoline-1 est associée à un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire (Quest *et al.*, 2008). Il a également été montré dans le muscle squelettique que la phosphorylation de la cavéoline-1 peut être impliquée dans la croissance tumorale (Faggi *et al.*, 2014).

II 4 b) Domaines d'interaction des Cavéolines.

- **Le Caveolin Scaffolding Domain**

La région N-terminale de la cavéoline héberge le *Caveolin Scaffolding Domain* (CSD) (Figure 12 C). Cette région de 20 acides aminés s'étend des résidus 82 à 101 dans la séquence de la cavéoline-1. Elle est essentielle à l'oligomérisation des cavéolines entre elles et aussi à l'interaction avec d'autres protéines (protéines G, récepteurs associés aux protéines G, protéine kinase A, tyrosines kinases de la famille des Src,...) (Razani and Lisanti, 2001). Cette interaction peut conduire dans certains cas à la régulation d'activités enzymatiques. Par exemple, la cavéoline-1 est capable via son CSD d'interagir avec l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS pour *endothelial nitric oxide synthase*) et d'inhiber son activité (Trane *et*

al., 2014). Le CSD permet aussi l'interaction avec des protéines telles que des kinases de la famille des src ou encore des protéines G (Li *et al.*, 1996b). Il est également impliqué dans l'attachement de la cavéoline à la membrane.

- **Les domaines d'attachement à la membrane**

Des analyses de délétions ont montré que les résidus 82 à 101 du côté N-terminal et 135 à 150 côté C-terminal de la cavéoline-1 sont les domaines minimum d'attachement à la membrane (Schlegel and Lisanti, 2000). Ces domaines sont appelés *Membrane Attachment Domain*, N-MAD et C-MAD pour les côtés N-terminal et C-terminal respectivement (Figure 12 C). Le C-MAD permet une localisation de la cavéoline-1 au trans-golgi et le N-MAD adresse la cavéoline-1 aux cavéoles membranaires.

- **Le domaine WW**

Le domaine WW (acides aminés 70 à 105 dans la séquence de la cavéoline-3) est le plus petit domaine d'interaction protéine-protéine car il est composé de seulement 35 acides aminés et est largement réparti dans les systèmes biologiques. La caractéristique de ce domaine est qu'il est composé de deux tryptophanes (W dans leur code à une lettre) séparés de 29 acides aminés et est très conservé entre différentes espèces dans le cas de la cavéoline-1 et la cavéoline-3. Le deuxième tryptophane est suivi par un résidu proline hautement conservé. La cavéoline-2 quant à elle, n'a pas de domaine WW car il lui manque certains résidus critiques pour la formation de ce domaine (Sotgia *et al.*, 2000; Ilsley *et al.*, 2002). Ce domaine serait impliqué dans l'association de la cavéoline-3 avec des protéines du cytosquelette comme la dystrophine (Huang *et al.*, 2013).

III. Les cavines

Pendant plusieurs années, les cavéolines ont été considérées comme les protéines essentielles et suffisantes à la formation des cavéoles mais la caractérisation des cavines, famille de protéines impliquées dans la formation, la stabilisation, et la morphologie des cavéoles a ajouté un degré de complexité supplémentaire dans l'organisation de ces invaginations de la membrane plasmique.

Actuellement, quatre isoformes de cavines ont été mises en évidence : la cavine-1, -2, -3 et -4. Elles sont toutes les quatre cytoplasmiques et comportent deux domaines conservés :

- un domaine *coiled-coil* (domaine d'interaction protéine-protéine) prédit du côté N-terminal. Il permet la formation d'un large complexe hétéromérique recruté aux cavéoles dans les cellules exprimant les cavéolines,

- une région basique impliquée dans l'attachement à la membrane (Figure 13 A) (Parton and del Pozo, 2013). Actuellement, il n'est pas bien défini comment ce complexe s'associe aux cavéoles et comment les cavines s'organisent autour de la membrane des cavéoles.

Les cavines semblent se lier de manière spécifique à l'environnement particulier qui est généré par les cavéoles et plus particulièrement aux phosphatidylsérines. Ce phospholipide enrichi au niveau de la face cytoplasmique de la membrane plasmique dans les cavéoles semble être un bon candidat pour établir le lien entre les cavines et les cavéolines qui sont toutes les deux décrites comme des protéines qui se lient aux phosphatidylsérines (Hill *et al.*, 2008).

Dans les années 2000, la **cavine-1** (ou PTRF pour *Polymerase I and transcript release factor*) fut montrée comme enrichie dans les cavéoles (Vinten *et al.*, 2001, 2005). Ce n'est qu'en 2008 que son rôle essentiel dans la formation de ces domaines membranaires a été mis en évidence (Hill *et al.*, 2008; Liu and Pilch, 2008). La cavine-1 s'associe uniquement avec les cavéoles matures (à la membrane plasmique) et non avec les cavéolines non cavéolaires (dans l'appareil de Golgi). La cavine-1 est recrutée aux cavéoles de la membrane plasmique et sa présence est nécessaire pour la formation des cavéoles (Hill *et al.*, 2008; Liu and Pilch, 2008). La diminution d'expression de la cavine-1 s'accompagne d'une perte des cavéoles. Dans les cellules PC3, qui expriment la cavéoline-1 mais pas la cavine-1 et qui n'ont pas de cavéoles, l'expression de la cavine-1 permet la formation de cavéoles (Hill *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle important de la cavine-1 dans la stabilisation des cavéoles (Figure 13 B).

Par la suite, trois autres protéines de la famille des cavines ont été mises en évidence et sont toutes localisées au niveau des cavéoles:

- la **cavine-2** (ou SDPR pour *serum deprivation protein response*). Une diminution de l'expression de la cavine-2 conduit à une perte de l'expression de la cavine-1 et de la cavéoline-1. Elle limite ainsi la formation des cavéoles montrant que la fonction de la cavine-1, la cavine-2 et la cavéoline-1 sont interdépendantes. Par ailleurs, la cavine-2 semble avoir un rôle dans la déformation des cavéoles. Sa sur-expression n'augmente pas le nombre de cavéoles mais induit un changement de leur

morphologie, entraîne une élongation de membrane et une formation de tubules à la membrane plasmique (Hansen *et al.*, 2009) (Figure 13 B),

- la **cavine-3** (ou SRBC pour *sdr-related gene product that bind to c-kinase*) régule la fonction d'endocytose des cavéoles et une diminution de l'expression de la cavine-3 induit une diminution du bourgeonnement des cavéoles ainsi que du trafic intracellulaire des vésicules cavéoline-1 positives (McMahon *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que la cavine-3 est impliquée dans la régulation de la mobilité des cavéoles (Figure 13 B).

- la **cavine-4** (ou MURC pour *muscle restricted coiled-coiled protein*) est l'isoforme des cavines spécifique du muscle et a un profil d'expression très similaire à celui de la cavéoline-3 (Ogata *et al.*, 2008). L'expression de la cavine-4 est fortement augmentée au cours de la myogénèse et semble impliquée dans ce processus. En effet, des expériences ont montré qu'une diminution de l'expression de la cavine-4 par ARN interférence, diminue la différenciation des cellules musculaires C2C12. De manière complémentaire, une sur-expression de cette protéine augmente la différenciation des cellules musculaires C2C12 (Tagawa *et al.*, 2008; Bastiani *et al.*, 2009).

Les cavines subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles, et par conséquent, leur masse moléculaire n'est pas déterminée de manière précise (Williams and Palmer, 2014). Par Western-blot, les cavines apparaissent avec des bandes multiples et on estime leur masse moléculaire à 55 kDa pour la cavine-1, 72 kDa pour la cavine-2 et 43 kDa pour les cavine-3 et -4.

Il a été montré que ces différentes protéines sont co-exprimées dans les cellules de mammifères et forment un complexe multi-protéique appelé complexe cavine. Ce complexe serait formé de 60 à 80 molécules de cavines (Hayer *et al.*, 2010) qui s'associeraient de manière constitutive dans le cytosol puis, dans les cellules exprimant les cavéolines le complexe serait recruté par les cavéolines pour donner naissance aux cavéoles (Bastiani *et al.*, 2009). Le complexe cavine se forme même en absence de cavéoline.

De récentes études ont montré que les cavéolines-1 et -2, et les cavines-1, -2 et -3 s'assemblent en un complexe appelé « *caveolar coat complex* » (Ludwig *et al.*, 2013). Ce complexe serait localisé de manière préférentielle au niveau du « bulbe » des cavéoles et non au niveau du « cou » (Figure 14 A). Sa stœchiométrie serait de 12 cavéolines : 3 cavine-1 : 1 cavine-2 ou-3 (Figure 14 C).

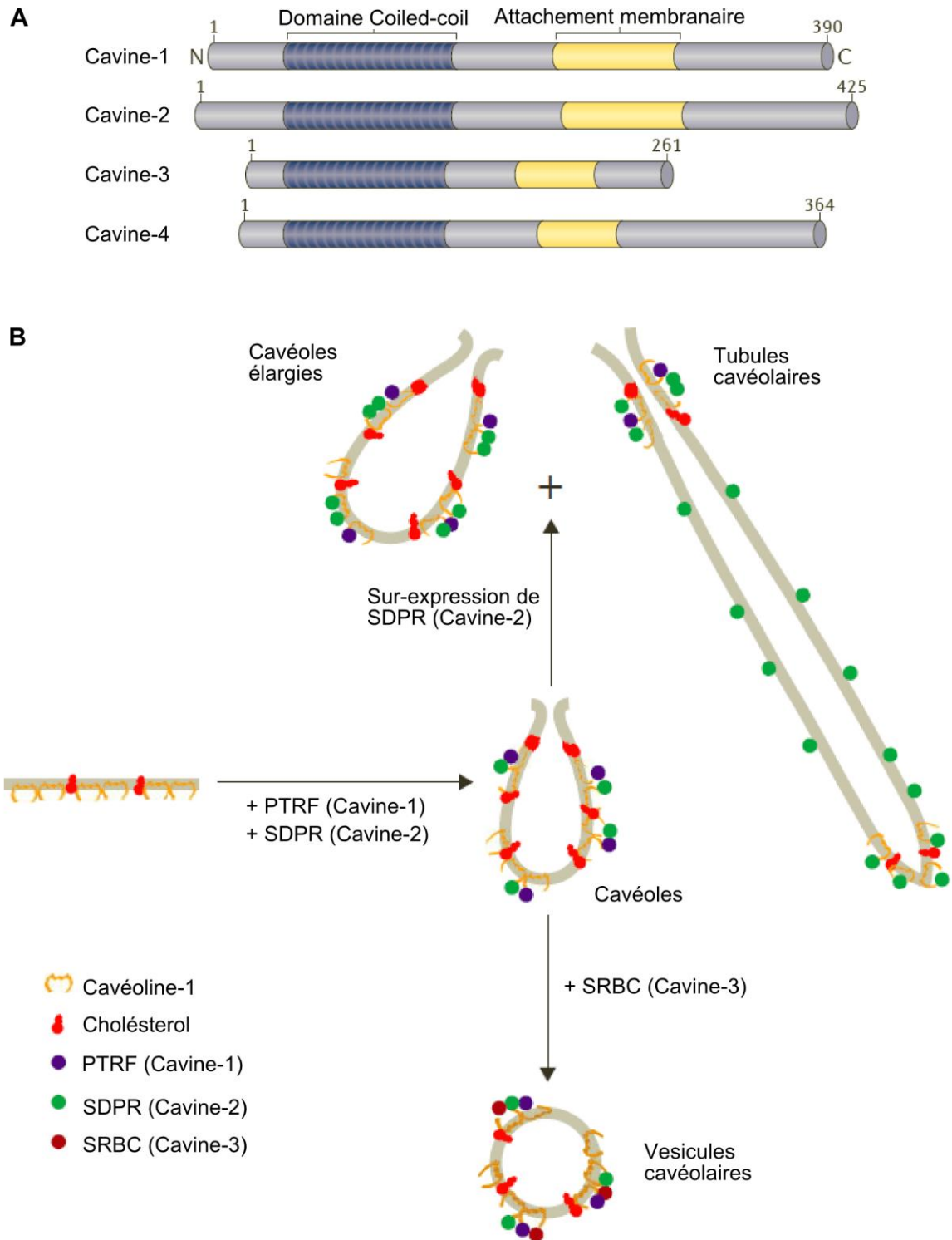


Figure 13 : Cavines et régulation de la morphologie des cavéoles.

A Représentation schématique des domaines des cavines de mammifères. *B* Les cavines s'associent aux cavéoles au niveau de la membrane plasmique et joue un rôle dans leur morphologie et leur dynamique. PTRF (cavine-1) et SDPR (cavine-2) sont nécessaires pour l'invagination des cavéoles. SDPR (cavine-2) a aussi un rôle dans la déformation et SRBC (cavine-3) modifie la mobilité des cavéoles. D'après (Nabi, 2009; Parton and del Pozo, 2013).

Des études fonctionnelles dans plusieurs types cellulaires semblent accorder un rôle essentiel à la cavine-1 dans la formation des cavéoles et dans l'adressage du complexe cavine à la membrane plasmique (Hill *et al.*, 2008; Bastiani *et al.*, 2009). Par exemple, dans des adipocytes, la cavine-1 et la cavéoline-1 sont exprimées en même temps suivies par la cavine-2, ceci suggérant que la cavine-2 est recrutée au niveau des cavéoles après leur formation à la membrane. Toutefois, l'expression des différentes cavines est très fortement liée au tissu, suggérant que chaque membre de la famille des cavines régule les fonctions des cavéoles de manière tissu-spécifique.

IV. Caveolines et Cavines : une expression fortement liée.

Nous venons de voir que les cavéolines et plus récemment les cavines sont décrites comme des protéines essentielles à la stabilisation des cavéoles et que leur absence entraîne une forte diminution voire une disparition de ces dernières. En réalité, l'absence d'une des deux protéines a des conséquences sur l'expression de la deuxième montrant une interdépendance forte de ces deux protéines sur leur stabilité respective.

Il a été mis en évidence par des expériences de shRNA de la cavine-1, qu'une diminution d'expression de 80% à 95% de cette protéine induisait une diminution de 10% à 50% de la cavéoline-1 et cela dans différents types cellulaires (Hill *et al.*, 2008). La cavine-1 est donc nécessaire pour stabiliser la cavéoline-1 à la membrane plasmique. La perte de cavine-1 induit une diffusion libre de la cavéoline-1 à la membrane plasmique et conduit à son internalisation dans le système endosomal où elle est dégradée. Ces résultats montrent que la cavine-1 permet une localisation stable des cavéolines dans les cavéoles et les protègent de la dégradation (Hill *et al.*, 2008; Liu and Pilch, 2008; Liu *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a été montré sur des lignées cellulaires de souris déficientes en cavine-1, que le niveau d'expression de la cavine-2 et de la cavine-3 est également diminué (Bastiani *et al.*, 2009). De la même manière, chez des souris déficientes en cavine-1, le niveau d'expression des cavéolines-1, -2 et -3 est réduit de manière importante (Liu *et al.*, 2008).

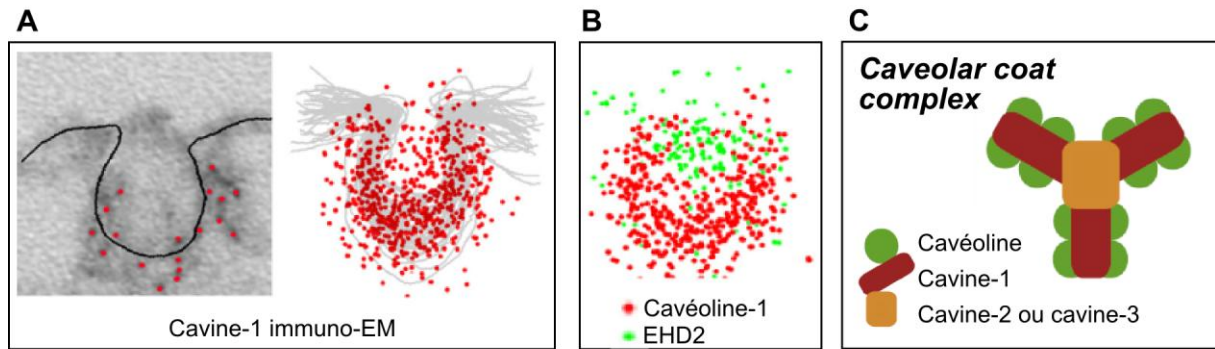


Figure 14 : Le caveolar coat complex.

A Image d'immuno-électromicroscopie réalisée avec des anticorps anti-cavin-1 dans des cellules Hela. Image de composition faite à partir de 50 cavéoles (gauche). Localisation des particules d'or et profil de membrane correspondant (droite). **B** Localisation de la cavéoline-1 et d'EHD2 déterminée par immuno-marquage et observée par microscopie électronique. **C** Représentation schématique du « caveolar coat complex ». Adapté de Shvets *et al.*, 2014

V. Les autres acteurs des cavéoles

Les composants essentiels des cavéoles ne s'arrêtent pas aux cavéolines et aux cavines. En effet, d'autres acteurs impliqués dans la régulation des cavéoles ont été identifiés comme EHD2 (Morén *et al.*, 2012a; Stoeber *et al.*, 2012) et la pacsine-2 (Hansen *et al.*, 2011). Des études suggèrent que ces protéines sont impliquées dans la régulation de la fonction et de la dynamique des cavéoles.

- **EHD2**

EHD2 (*Eps homology domain-containing 2*) appartient à la famille des protéines ATPases comme la dynamine impliquées dans le remodelage membranaire du système endosomal. Cette protéine s'associe aux cavéoles grâce à une séquence particulière en acides aminés (Lys-Pro-Asn-X-X-X-Asn-Pro-Phe où X correspond à n'importe quel acide aminé) localisée au niveau de la boucle de leur domaine GTPase localisé du côté N-terminal de la protéine (Morén *et al.*, 2012a). EHD2 peut aussi se lier préférentiellement à certains lipides comme le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (Daumke *et al.*, 2007), qui serait enrichi au niveau du « cou » des cavéoles (Fujita *et al.*, 2009). Il a été montré que la protéine EHD2 serait en effet préférentiellement localisée au niveau du « cou » des cavéoles (Ludwig *et al.*, 2013) (Figure 14 B). De manière surprenante, EHD2 n'est pas nécessaire à la formation des cavéoles mais agit comme régulateur négatif de l'endocytose des cavéoles (Morén *et al.*,

2012a). Des études décrivent que EHD2 permet de confiner les cavéoles à la membrane plasmique en les liant à l'actine (Stoeber *et al.*, 2012). De plus, la déplétion d'EHD2 induit une augmentation de la mobilité et du bourgeonnement des cavéoles renforçant le rôle d'EHD2 dans l'endocytose cavéolaire. EHD2 forme des dimères qui interagissent avec la pacsine-2. Cette interaction se fait via le domaine EH de EHD2 localisé du côté C-terminal et le motif NPF (Asn-Pro-Phe) de la pacsine-2.

- **La pacsine-2**

Les pacsines sont une famille de phospho-protéines cytoplasmiques qui jouent un rôle dans la formation et le transport de vésicules (Modregger *et al.*, 2000). Ces protéines existent sous trois isoformes et il a été montré que la pacsine-2 interagit avec la partie N-terminale de la cavéoline-1 (Senju *et al.*, 2011). La pacsine-2 n'a qu'une colocalisation partielle avec la cavéoline-1, cependant sa suppression induit une perte de la morphologie normale des cavéoles et une diminution du taux de cavéoline-1 et de cavine-1 (Hansen *et al.*, 2011).

Une meilleure compréhension de la fonction et de la localisation d'EHD2 et de la pacsine-2 au cours de la biogenèse des cavéoles permettra d'avoir une vision plus juste des mécanismes moléculaires permettant la dynamique des cavéoles.

VI. Biogenèse des cavéoles

Les cavéolines nouvellement synthétisées s'insèrent dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) où elles vont s'organiser en homo-oligomères de faible masse moléculaire de 150 à 200 kDa composés de 7 à 14 molécules de cavéolines, résistants au SDS (Figure 15) (Hayer *et al.*, 2010). Ce complexe est appelé complexe 8S. Cette homo-oligomérisation est rendue possible grâce à une séquence recouvrant les acides aminés 61 à 101 de la cavéoline-1. Dans les types cellulaires où la cavéoline-2 est exprimée, elle est intégrée comme composant minoritaire de ces oligomères (Scheiffele *et al.*, 1998). Par la suite, ces oligomères vont être transportés vers l'appareil de Golgi. Dans ce compartiment, les homo-oligomères interagissent avec d'autres homo-oligomères pour permettre aux cavéolines d'atteindre un nouveau stade d'oligomérisation composé de 14 à 16 molécules avec une masse moléculaire d'environ 350 kDa (Parton *et al.*, 2006; Hayer *et al.*, 2010) appelé complexe 70S. Les cavéolines vont être palmitoylées au niveau de l'appareil de Golgi puis elle vont être transportées vers la membrane plasmique (Tagawa *et al.*, 2005; Parton and

Simons, 2007). Dans ce processus d'adressage des cavéoles de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique, le cholestérol et les glycosphingolipides jouent un rôle important (Pol *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que le cholestérol a un rôle limitant dans ce trafic car des cellules privées de cholestérol suite à l'utilisation d'agents comme la nystatine, la filipine ou la cyclodextrine, présentent une forte diminution voire une disparition des cavéoles membranaires (Rothberg *et al.*, 1990; Parpal *et al.*, 2001). Il a également été montré qu'une concentration seuil en cholestérol intracellulaire est nécessaire pour permettre la formation des cavéoles (Hailstones *et al.*, 1998). L'adressage de la cavéoline de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique se fait grâce à des vésicules d'exocytose (*exocytic carrier vesicles*) assemblées au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 15) (Tagawa *et al.*, 2005). Il est estimé qu'une cavéole est composée de 140 à 180 molécules de cavéolines (Pelkmans and Zerial, 2005). C'est une fois les cavéoles à la membrane que le complexe cavéolaire va être recruté pour former le « *caveolar coat complex* » comme décrit précédemment.

Au niveau cellulaire, il est parfois difficile de distinguer le rôle des cavéoles de celui des cavéolines. En effet, bien que les cavéoles ne puissent pas exister sans la présence des cavéolines, la réciproque n'est pas vraie. En effet, des travaux ont notamment montré que les cavéolines peuvent agir indépendamment des cavéoles. Par exemple, les neurones qui n'ont pas de cavéoles (Shyng *et al.*, 1994; Lang *et al.*, 1998), expriment les trois isoformes de cavéolines (Gaudreault *et al.*, 2005). De manière complémentaire il existe dans les cellules ayant des cavéoles, des régions non cavéolaires où la présence de cavéolines est détectée (Head and Insel, 2007). Cela signifie que lorsqu'une fonction décrite est attribuée aux cavéolines, l'extrapolation aux cavéoles doit être vérifiée expérimentalement.

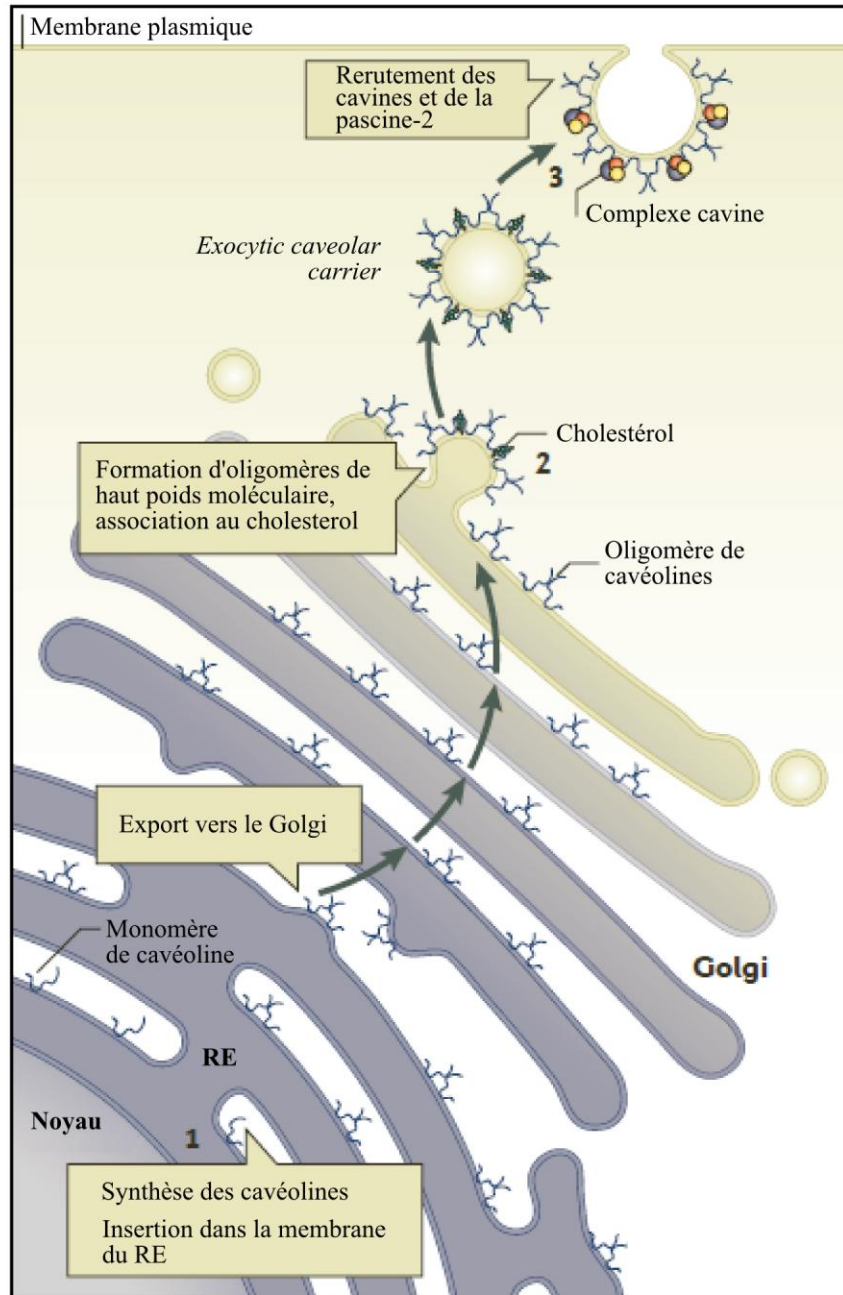


Figure 15 : Représentation schématique de la biogénèse des cavéoles

D'après Parton and del Pozo, 2013

VII. Les fonctions des cavéoles/cavéolines

La présence de cavéoles dans les cellules est maintenant clairement identifiée et cela depuis plusieurs dizaines d'années. Elles sont notamment décrites pour avoir un rôle important dans différents processus cellulaires cependant, à ce jour, la totalité de leur fonction n'est pas encore élucidée.

VII 1 Endocytose

Bien que l'**endocytose** via les cavéoles fasse débat, la translocation de la cavéoline-1 de la membrane plasmique vers des compartiments cellulaires internes a clairement été identifiée. Il a également été montré que les cavéoles pouvaient internaliser des molécules spécifiques (Montesano *et al.*, 1982). Aujourd'hui, plusieurs protéines « cargo » empruntant la voie des cavéoles ont été identifiées sans que cette dernière soit exclusive. Parmi ces protéines identifiées comme internalisées via les cavéoles, nous trouvons la sous-unité B de la toxine cholérique (CTxB) ou encore le virus simien 40 (SV40). La translocation des cavéoles de la membrane plasmique vers différents compartiments intracellulaires requiert plusieurs protéines comme la dynamine la kinase src et la protéine kinase C α (PKC α) (Mayor and Pagano, 2007). La dynamine localisée au niveau du « cou » des cavéoles est impliquée dans le mécanisme de fission des vésicules. La kinase src permet notamment la phosphorylation de la cavéoline-1 sur la tyrosine 14 et induit l'internalisation des cavéoles enfin la PKC α permet l'internalisation des cavéoles via la phosphorylation de la filamine A. De plus, Cette internalisation nécessite une réorganisation locale du cytosquelette d'actine.

De manière générale, après le piégeage de la molécule cargo dans les cavéoles, une cascade de signalisation est activée. Cela conduit à une augmentation locale de la phosphorylation et à une dépolymérisation du cytosquelette d'actine. Les monomères d'actine sont alors recrutés au niveau des cavéoles où un « patch » d'actine se forme. De manière concomitante, la dynamine est recrutée au niveau du « cou » des cavéoles et une polymérisation importante d'actine a lieu au niveau du « patch » d'actine qui conduit à l'internalisation de la cavéoline. Suite à l'internalisation, le cytosquelette d'actine est reformé (Hansen and Nichols, 2010). Les cavéoles sont alors soit adressées à l'endosome précoce ou recyclées au niveau de la membrane plasmique. Lors de ce processus, EHD2 semble jouer un rôle important et certains auteurs proposent que la présence de cette protéine au niveau des cavéoles serait un facteur limitant de l'endocytose (Morén *et al.*, 2012b).

Les cavéoles ont également été décrites comme impliquées dans la **transcytose** de molécules. Ce transport permet dans les cellules polarisées le passage de molécules d'une face à l'autre de la cellule. Par exemple, des études menées *in vivo* ont montré l'importance de la cavéoline-1/cavéoles dans la régulation de la transcytose de l'albumine à travers les cellules endothéliales (Pascariu *et al.*, 2004).

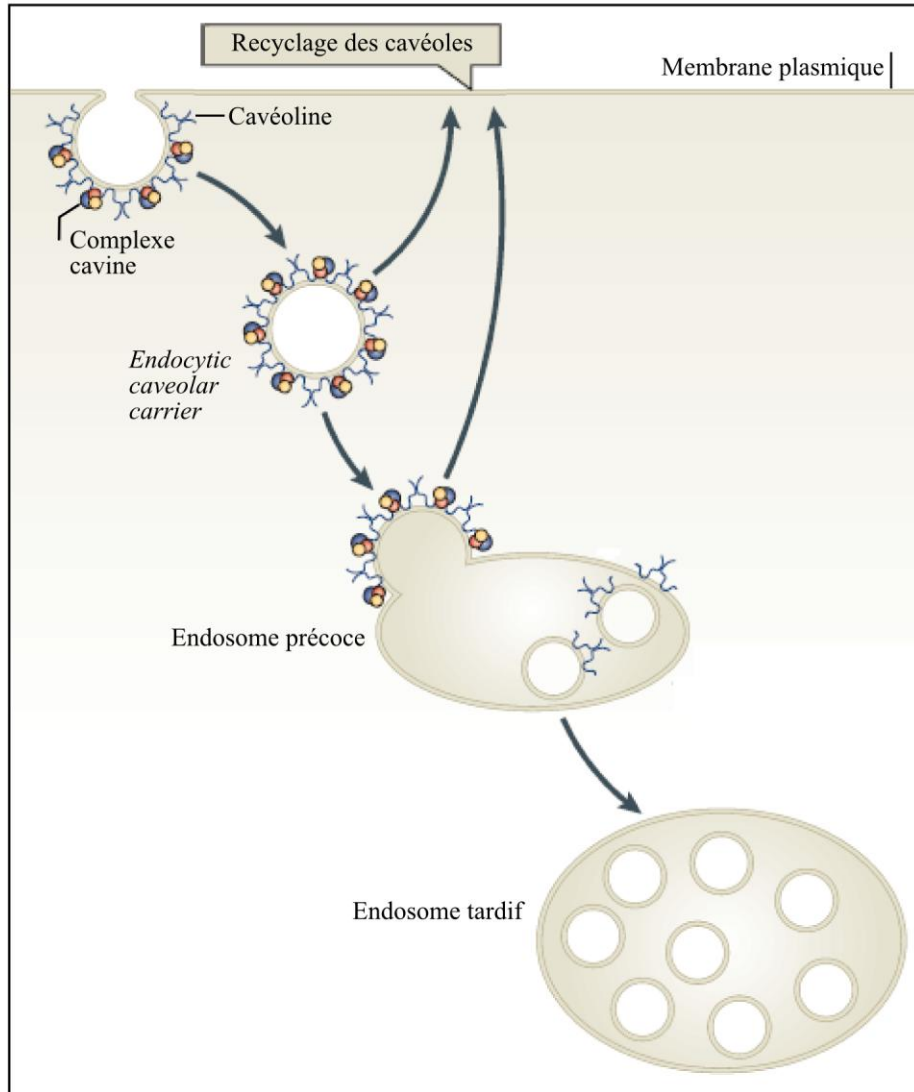


Figure 16 : Représentation schématique de l'endocytose des cavéoles

D'après Parton and del Pozo, 2013

VII 2 Homéostasie du cholestérol

Les cavéoles sont particulièrement abondantes dans les adipocytes et il existe un lien fort entre cholestérol, cavéoles et cavéolines.

Le cholestérol est un élément clé des cavéoles et est nécessaire à l'adressage des cavéoles à la membrane plasmique (Pol *et al.*, 2005). Il a été montré que cavéoline-1 et cholestérol peuvent se lier *in vivo* (Thiele *et al.*, 2000) à raison d'une molécule de cholestérol pour une molécule de cavéoline-1 (Murata *et al.*, 1995). Le rôle des cavéolines dans l'homéostasie et le trafic du cholestérol a largement été étudié. Des auteurs ont par exemple montré que des délétions dans la séquence de la cavéoline induit un défaut dans le trafic du

cholestérol qui conduit à une accumulation du cholestérol libre au niveau de l'endosome tardif ainsi qu'une réduction du cholestérol à la membrane plasmique (Pol *et al.*, 2001). De manière complémentaire, l'expression de la cavéoline-1 dans des cellules embryonnaires humaines de rein (HEK-293) qui ne l'expriment pas, augmente la quantité cellulaire de cholestérol libre ainsi que son export (Fielding and Fielding, 1995; Meshulam *et al.*, 2006). Par ailleurs, des cellules privées de cholestérol sont dépourvues de cavéoles et lors de l'oxydation du cholestérol, la cavéoline-1 se retrouve localisée dans l'appareil de Golgi (Smart *et al.*, 1994).

Les cavéolines jouent donc un rôle dans l'homéostasie du cholestérol, plaçant ainsi les cavéoles comme de véritables plateformes de régulation du cholestérol cellulaire.

VII 3 Homéostasie calcique

Les premières publications montrant un rôle des cavéoles dans la régulation de l'homéostasie du calcium remontent à 1970 (Gabella, 1971). L'hypothèse était que les cavéoles séquestraient le Ca^{2+} et avaient un rôle dans la translocation de celui-ci du milieu extra-cellulaire vers le cytosol au cours du cycle de contraction-relaxation du muscle lisse. Ces hypothèses ont été confirmées en mettant en évidence que les cavéoles pouvaient augmenter la concentration calcique intracellulaire et ainsi activer la contraction pour induire une vasoconstriction (Pani and Singh, 2009). Par la suite, les cavéoles ont été clairement identifiées comme impliquées dans la régulation calcique (Brazer *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2007). Par exemple, il a été montré que la cavéoline-1 permet l'assemblage de canaux membranaires en permettant notamment la localisation de TRPC1 (canal calcique transmembranaire) à la membrane plasmique et il est suggéré qu'elle en régule son activité (Brazer *et al.*, 2003; Remillard and Yuan, 2006). De plus un deuxième régulateur clé du Ca^{2+} , le récepteur IP_3 , a été identifié dans les cavéoles des cellules endothéliales. Il a notamment été montré dans ce type cellulaires que le CSD de la cavéoline-1 interagit avec TRCP1 et IP_3 et régule l'entrée du calcium dans les cellules (Sundivakkam *et al.*, 2009). Ces résultats montrent que les cavéoles seraient impliquées dans la régulation de l'entrée du calcium dans le cytoplasme.

Dans le muscle squelettique, les tubules T sont des structures essentielles au phénomène de contraction. Des études menées dans le muscle squelettique ont pu mettre en évidence que la cavéoline-3 était associée aux tubules T dans le muscle en développement (Parton *et al.*, 1997), suggérant un rôle de cette protéine dans l'établissement de ces structures. Ce lien a par la suite été montré par Galbiati *et al.*, qui ont utilisé des souris qui

n'expriment pas la cavéoline-3 (*cav3 -/-*). Ils ont alors mis en évidence dans ces animaux qu'un défaut d'expression de la cavéoline-3 avait pour conséquence une organisation anormale du réseau des tubules T (Galbiati *et al.*, 2001). En effet, au cours du développement du muscle ce réseau est préférentiellement organisé longitudinalement avant d'avoir une orientation transversale dans les fibres matures. Dans les souris mutées pour la cavéoline-3, le réseau des tubules T garde une orientation longitudinale.

De plus, une interaction directe a été montrée entre la cavéoline-3 et le DHPR (localisé au niveau des tubules T) et Ryr1 (localisé au niveau du réticulum sarcoplasmique) (Couchoux *et al.*, 2011; Whiteley *et al.*, 2012). Le DHPR permet de capter le potentiel de membrane au niveau du tubule T du muscle squelettique et ainsi activer Ryr au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ce processus induit un relargage du calcium du réticulum dans le sarcoplasme et permet la contraction musculaire. Or, il a été mis en évidence dans des myotubes qui expriment une forme mutée de la cavéoline-3 (mutant P104L), que la perte d'expression de la cavéoline-3 s'accompagne d'une réduction de la quantité de $Ca_v1.1$ (sous unité du canal calcique voltage dépendant localisé au niveau du DHPR qui permet l'entrée du calcium depuis le milieu extérieur) modifiant ainsi l'homéostasie calcique du muscle squelettique (Couchoux *et al.*, 2011).

VII 4 Transduction du signal

De nombreuses molécules et protéines impliquées dans la transduction du signal sont localisées dans les cavéoles leur permettant ainsi d'assurer cette fonction. Cette transduction a notamment lieu à travers la régulation de l'activité de certaines protéines via le CSD des cavéolines. De manière générale, l'interaction avec ce domaine conduit à l'inhibition d'activités enzymatiques (Collins *et al.*, 2012). Cependant toutes les interactions avec les cavéolines ne conduisent pas à une inhibition (Czarny *et al.*, 1999).

Parmi les protéines dont l'activité est inhibée suite à l'interaction avec le CSD de la cavéoline, nous trouvons des récepteurs tyrosines kinases comme l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) ou le *platelet-derived growth factor receptor* (PDGF) mais aussi les protéines G ou encore les *Nitric Oxydes Syntases* (NOS). Le CSD a également été montré comme interagissant avec les conformations inactives des tyrosines kinases Src et des GTPase H-Ras (Li *et al.*, 1996b; Burgermeister *et al.*, 2011). Dans ce dernier cas, il a été montré qu'une organisation spatiale des protéines H-Ras à la membrane plasmique est nécessaire pour permettre la transduction du signal. Si l'expression de la cavéoline-1 ou le nombre de

cavéoles sont diminués, une perturbation de l'organisation de Ras est observée à la membrane empêchant ainsi la transduction du signal (Ariotti *et al.*, 2014). Ces résultats montrent que les cavéoles et cavéolines permettent une organisation de la membrane plasmique indispensable à la transduction du signal. C'est d'ailleurs pour cela que les cavéolines sont décrites comme des protéines échafaudage (*scaffold* en anglais) car elles permettent de générer un environnement particulier à la membrane plasmique nécessaire à de nombreux processus cellulaires (Bastiani and Parton, 2010)

Il a récemment été montré que la cavéoline-1 peut aussi interagir avec des facteurs de transcription comme le *nuclear factor-erythroid 2-related factor* (Nrf2) (Volonte *et al.*, 2013). Ce facteur de transcription est un régulateur important des systèmes de défenses anti-oxydantes. Il agit dans les cellules comme senseur de stress oxydant et protège les cellules des préjudices causés par des stress endogènes ou exogènes. Il a été montré que la cavéoline-1 est un inhibiteur de Nrf2 grâce à une interaction directe entre ces deux protéines via le CSD de la cavéoline-1 (Li *et al.*, 2012).

Les cavéoles peuvent également interagir avec certaines enzymes impliquées dans la synthèse ou la dégradation d'espèces réactives de l'oxygène et ainsi réguler leur activité. Parmi ces enzymes localisées dans les cavéoles, nous trouvons :

- Les **Nitric Oxide Synthase endothéliales** (eNOS) qui sont des enzymes membranaires qui catalysent la réaction d'oxydation de l'arginine en citrulline en produisant de l'oxyde nitrique (NO) qui va avoir un rôle important dans la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse. Il a été montré que la liaison de la eNOS avec le CSD de la cavéoline-1 conduit à une inhibition de son activité (Ju *et al.*, 1997; Ghosh *et al.*, 1998). De la même manière pour la cavéoline-3, où une interaction de l'eNOS avec la région correspondante au CSD entraîne une inhibition de son activité (García-Cardena *et al.*, 1997). Dans des souris présentant une déficience pour le gène codant pour la cavéoline-1 (Cav-1 *-/-*) il est observé une augmentation de l'activité de eNOS (Razani *et al.*, 2001). Ces différents résultats montrent de manière spécifique l'importance de la cavéoline dans la régulation de l'activité de eNOS.

- La **NADPH Oxydase** (NOX) est un complexe enzymatique membranaire qui conduit à la production d'anion superoxyde à partir de NADPH.

Au sein des cavéoles, le complexe NOX est inactif, jusqu'à ce que des composants cytoplasmiques de ce complexe soient recrutés aux cavéoles, induisant alors son activation

(Ushio-Fukai, 2006; Vilhardt and van Deurs, 2004). Le complexe NOX peut aussi être assemblé et fonctionnel dans les cavéoles et le recrutement de composants additionnels comme p47^{phox} (sous unité régulatrice de la NOX) augmente l'activité du complexe (Yang and Rizzo, 2007). Dans le cas de la NADPH oxydase, les cavéoles permettent de concentrer au même endroit les partenaires nécessaires à son fonctionnement. Enfin, de récentes études suggèrent que la cavéoline-1 régule négativement les NOX de manière aigue par interaction directe et également de manière chronique par une altération de son niveau d'expression (Chen *et al.*, 2014).

- La **thioredoxine reductase 1** (Trx R1) est une enzyme anti-oxydante importante qui est exprimée dans de nombreux types cellulaires. Il a été montré que cette enzyme interagit directement avec le CSD de la cavéoline-1 et qu'une surexpression de la cavéoline-1 inhibe l'activité de la Trx R1 alors qu'un défaut de cavéoline-1 augmente l'activité de Trx R1. La cavéoline-1 interagit donc avec le Trx R1 en inhibant son activité (Volonte and Galbiati, 2009).

VII 5 Stress mécanique

Les premières observations impliquant les cavéoles dans la régulation d'un stress mécanique ont été faites en 1975 (Dulhunty and Franzini-Armstrong, 1975). Il a été montré dans des fibres de muscle squelettique de grenouille que les cavéoles pouvaient s'aplanir pour faire face à une élongation mécanique. Par la suite, une étude biophysique confirma que des domaines membranaires comme les cavéoles pouvaient jouer le rôle de senseur et de régulateur de la tension membranaire (Sens and Turner, 2006). Plus récemment, il a été montré dans des cellules endothéliales et dans des cellules musculaires que lorsque ces cellules sont soumises à une tension mécanique ou à un choc osmotique, les cavéoles sont capables de s'aplatir à la membrane afin de limiter la tension membranaire. (Sinha *et al.*, 2011). Cet aplatissement des cavéoles se fait par dissociation des oligomères de cavéoline-1 augmentant ainsi le taux de cavéoline-1 diffusant librement sur la face interne de la membrane plasmique (Figure 17). Il a été montré dans des cellules endothéliales déficientes en cavéoline-1 (cav-1 *-/-*) qu'en cas de choc hypo-osmotique, ces cellules voient leur tension membranaire fortement augmenter. Des expériences similaires ont été réalisées dans des fibres isolées de muscle squelettique humain de patients exprimant une forme mutée de la cavéoline-3 (mutant P28L qui ne permet pas l'expression de la cavéoline-3 à la membrane

plasmique). Il a alors été montré en condition de choc hypo-osmotique, une augmentation de la tension membranaire dans le mutant P28L (Sinha *et al.*, 2011).

L'aplatissement des cavéoles est un processus rapide (observé dès les premières minutes du stress mécanique) et réversible. En effet, lorsque le stress mécanique est levé, une densité similaire de cavéoles est retrouvée à la membrane plasmique. Ce processus d'aplanissement des cavéoles suite à un stress mécanique est un phénomène passif mais leur reformation est dépendante de l'ATP.

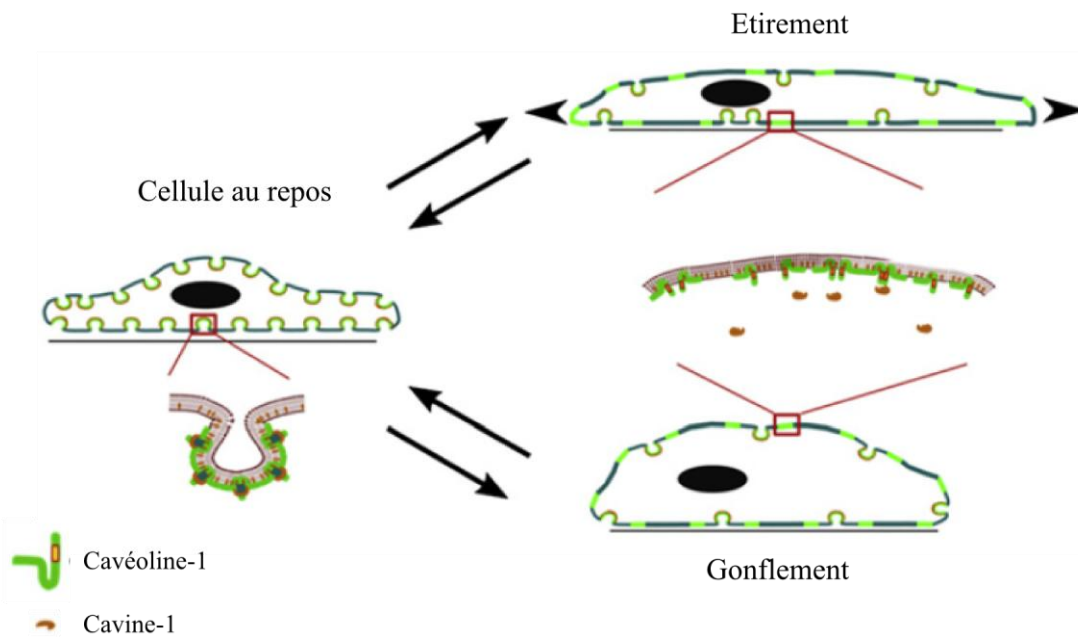


Figure 17 : Désassemblage et réassemblage des cavéoles en réponse à un stress mécanique aigu.

Lors d'un stress mécanique (un choc hypo-osmotique ou un étirement des cellules), il est observé un aplatissement des cavéoles qui permet de compenser l'augmentation de tension membranaire. Lors de ce phénomène, une diffusion latérale de la cavéoline-1 est observée à la membrane plasmique ainsi qu'un désassemblage de la cavine-1 (Sinha *et al.*, 2011).

Au sein des cavéoles, de nombreux types de canaux connus pour interagir avec la cavéoline-3 sont sensibles à la tension membranaire (*mechanosensitive channels*). Par exemple, TRCP1 connu pour interagir avec la cavéoline-3 est activé par un étirement membranaire (Maroto *et al.*, 2005). La localisation de ce type de canal dans les cavéoles font d'elles des candidates sérieuses dans le contrôle des fonctions des canaux sensibles au stress mécanique et notamment dans les myotubes (Huang *et al.*, 2013)

L'ensemble de ces expériences montre le rôle essentiel des cavéoles dans la réponse cellulaire au stress mécanique. C'est sans doute pour cette raison qu'elles sont fortement représentées dans les cellules soumises à des contraintes mécaniques importantes, comme les cellules endothéliales et les cellules musculaires.

VII 6 Réparation membranaire

La réparation de la membrane plasmique a une importance primordiale dans une cellule et particulièrement dans le muscle où le sarcolemme est constamment soumis à des tensions membranaires importantes. Les fibres musculaires sont régulièrement blessées *in vivo* et des dysfonctions de réparation peuvent causer des dystrophies musculaires (Bansal and Campbell, 2004). Il semblerait que les cavéoles jouent un rôle dans ce processus de réparation membranaire. En effet, lors de blessures musculaires, une internalisation des cavéoles a été observée et il semblerait que ce processus soit essentiel à la réparation de la membrane plasmique (Predescu *et al.*, 2003). Une absence de réparation membranaire a par exemple été montrée dans des cellules musculaires dont l'expression de la cavéoline-3 est diminuée (Cai *et al.*, 2009). Dans le muscle squelettique, des études ont montré que MG53 peut interagir avec la cavéoline-3. MG53 est une protéine essentielle dans le mécanisme de réparation membranaire qui va permettre le recrutement de vésicules intracellulaires au site de lésion. L'altération de son interaction avec la cavéoline-3, observée dans certaines dystrophies musculaires, entraîne des défauts de réparation membranaire (Cai *et al.*, 2009). De manière complémentaire, des auteurs ont mis en évidence dans le muscle squelettique qu'une diminution de l'expression de la cavine-1 par shRNA entraînait une diminution des capacités de réparation membranaire, associant ainsi les cavines à ce processus médiée par MG53 (Zhu *et al.*, 2011). L'ensemble de ces résultats montrent l'importance des cavines, des cavéolines et des cavéoles dans les processus de réparation membranaire suite à une blessure.

VIII. Pathologies liées aux cavéoles/cavéolines

VIII 1 Pathologies liées à la cavéoline-1

VIII 1 a) Les cancers

Les cavéolines ont un rôle paradoxal dans le développement des cancers. En effet elles peuvent être décrites à la fois comme des suppresseurs de tumeur ou des oncogènes. Par exemple, la sur-expression de la cavéoline-1 dans les fibroblastes NIH-3T3 transformés avec différents oncogènes comme v-abl et H-ras (G12V) conduit à une abolition de la croissance des cellules en suspension. De plus, si le niveau d'expression de la cavéoline-1 est diminué dans des fibroblastes transformés par des oncogènes, la ré-expression de la protéine est suffisante pour transformer le phénotype (Engelman *et al.*, 1997). De manière contradictoire, dans le cancer de la prostate, la présence de la cavéoline-1 est associée à l'angiogenèse, à la récurrence des cancers et à un taux élevé de métastases (Karam *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007).

Dans les cancers, la cavéoline-1 peut donc avoir à la fois un rôle pro- et anti-tumoral. Son rôle apparait donc ici comme complexe et fortement dépendant du type cellulaire (Gupta *et al.*, 2014).

VIII 1 b) Les lipodystrophies

La plupart des lipodystrophies sont congénitales et sont regroupées sous le nom de lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip. Elles sont généralement associées à des mutations géniques. Ces lipodystrophies se caractérisent par une perte de graisse dès la naissance ou très rapidement après, associée à une hypertrophie musculaire.

Il a été montré par séquençage du gène codant pour la cavéoline-1 qu'une patiente Brésilienne lipodystrophique portait une mutation du gène codant pour la cavéoline-1 (Kim *et al.*, 2008). D'autres mutations de la cavéoline-1 ont également été observées dans des patients présentant une lipodystrophie atypique (Cao *et al.*, 2008). Des mutations dans la séquence du gène codant pour la cavéoline-1 ont également été identifiées en 2009 dans des patients présentant un phénotype mixte avec une lipodystrophie ainsi qu'une dystrophie musculaire (Hayashi *et al.*, 2009). L'ensemble de ces observations permettent d'associer fortement les mutations du gène codant pour la cavéoline-1 aux lipodystrophies. De plus, il a été montré

dans des fibroblastes embryonnaires de souris (Cohen *et al.*, 2004) et dans les hépatocytes (Fernández *et al.*, 2006), qu'un défaut en cavéoline-1 conduit à une diminution du taux de gouttelettes lipidiques. Certains auteurs suggèrent que les lipodystrophies observées dans les patients avec une mutation du gène codant pour la cavéoline-1 pouvaient être dues à une perturbation ou à une absence de la formation des gouttelettes lipidiques (Kim *et al.*, 2008).

VIII 2 Les cavéolinopathies

Aujourd'hui il existe des pathologies musculaires liées à des mutations du gène codant pour la cavéoline-3 qui sont regroupées sous le terme de cavéolinopathies. Les déficiences en cavéoline-3 sont associées à des altérations de la membrane du sarcolemme, une désorganisation du réseau des tubules T ainsi qu'à une altération de voies de signalisation cellulaire. Les défauts en cavéoline-3 se traduisent par quatre pathologies musculaires : la dystrophie des ceintures de type 1C (*limb Girdle Muscular Dystrophy-1C* ou LGMD-1C), la maladie du muscle ondulant (*Rippling Muscle Disease* ou RMD), les myopathies distales ainsi qu'une élévation du taux de créatine kinase (HyerCKémie) (Gazzerro *et al.*, 2009). Comme le montre la Figure 18, il n'y a pas de corrélation entre le génotype et le phénotype de ces maladies, car une même mutation peut conduire à des pathologies différentes. La LGMD1C se caractérise par une atrophie musculaire des muscles proximaux, associée à des crampes musculaires. En 2008, une étude a montré sur un grand nombre de patients présentant un phénotype de LGMD, que dans 1,3% des cas, cette pathologie est associée à une mutation de la cavéoline-3 (LGMD1C) (Guglieri *et al.*, 2008). De manière générale, les cavéolinopathies sont associées à une diminution de l'expression de la cavéoline-3, une diminution de sa localisation à la membrane plasmique ainsi qu'à son accumulation au niveau de l'appareil de Golgi. Dans le cas de la LGMD1C, cette diminution d'expression de la cavéoline-3 peut être de 95% (Volonte *et al.*, 2003). Une mutation fréquemment impliquée dans la LGMD1C est la mutation P104L (Minetti *et al.*, 1998). Des cellules musculaires de souris portant cette mutation présentent une diminution du taux de différenciation des myoblastes en myotubes (Stoppani *et al.*, 2011a). De plus, des auteurs ont montré dans des cellules musculaires de souris (C2C12), que la diminution de l'expression de la cavéoline-3 est suffisante pour inhiber la formation des myotubes (Galbiati *et al.*, 1999b) soulignant ainsi l'importance de la cavéoline-3 dans les processus de myogenèse et de différenciation des cellules musculaires.

Par ailleurs, la cavéoline-3 est exprimée au niveau des jonctions neuromusculaires et joue un rôle important dans le processus d'assemblage du récepteur nicotinique à

l'acétylcholine (nAChR). Un défaut en cavéoline-3 inhibe l'assemblage de ce récepteur dans les myotubes affectant ainsi l'activité de la jonction neuromusculaire. Certains auteurs proposent que ce défaut en cavéoline-3 affectant la signalisation au niveau des jonctions neuromusculaires pourrait contribuer en partie aux défauts observés dans les cavéolinopathies (Hezel *et al.*, 2010).

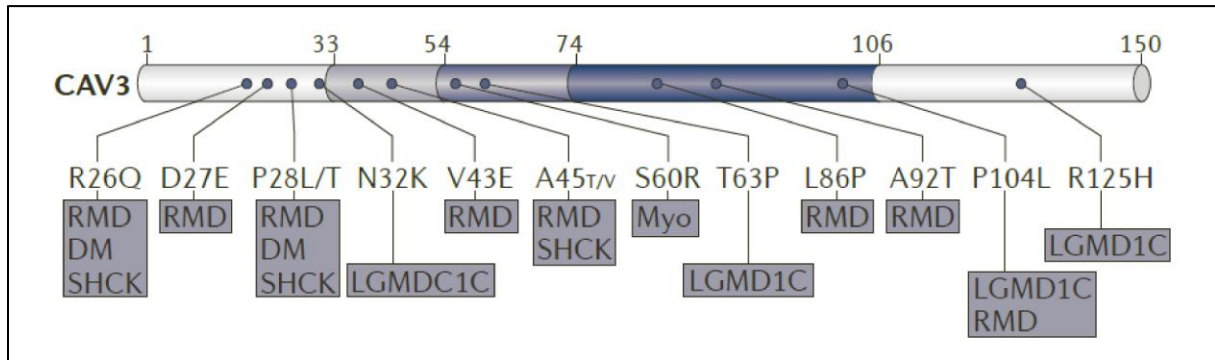


Figure 18 : Maladies associées à une mutation de la cavéoline-3

Représentation schématique des mutations dans la séquence protéique de la cavéoline-3 associées à des maladies. DM, myopathies distales ; LGMD1C, dystrophie des ceintures de type 1C ; Myo, myopathies ; RMD, maladie du muscle ondulant ; SHCK ; HyerCKémie spontanée. D'après (Parton and del Pozo, 2013)

Une augmentation de l'expression de la cavéoline-3 est également associée à des pathologies.

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est l'un des troubles musculaires les plus sévères causée par une déficience en dystrophine. La dystrophine est une protéine impliquée dans les interactions entre le cytosquelette, la membrane plasmique et la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'un complexe protéique appelé complexe associé à la dystrophine (*dystrophin-associated complex*, DAC). Il a été montré récemment que cette protéine interagit avec la cavéoline-3 via son domaine WW (Huang *et al.*, 2013). Chez des patients atteints de DMD, une augmentation du nombre cavéoles à la membrane plasmique du muscle squelettique a été observée. Cette augmentation est également présente chez des souris *mdx* (animal modèle de la DMD avec une déficience en dystrophine). L'analyse des muscles de tibias antérieurs de ces souris a révélé qu'elles avaient un taux de cavéoline-3 deux à trois fois supérieurs à des souris sauvages (Vaghy *et al.*, 1998). Suite à cela, il a été montré chez des patients atteints de DMD que l'augmentation du nombre de cavéoles était due à une sur-expression de la cavéoline-3. Il a également été montré qu'une sur-expression de la cavéoline-3 dans des souris induit un phénotype de myopathie de Duchenne à savoir, une augmentation

du nombre de cavéoles ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines associées au complexe de la dystrophine (dystrophine et β -dystroglycane) (Galbiati *et al.*, 2000).

De plus, dans le cas de la DMD, une diminution de l'expression de l'ensemble des protéines du complexe associé à la dystrophine est observée sauf pour la cavéoline-3 et TRPC1 (canal calcique) qui sont surexprimés. La surexpression combinée de ces deux protéines permet l'adressage de TRPC1 à la membrane. Exposé aux ERO générées pendant la contraction musculaire, TRPC1 déclenche une entrée anarchique de calcium dans la cellule. Cette voie semble être une cause importante de lésions musculaires dans le cas de la DMD (Allen *et al.*, 2010).

L'ensemble de ces résultats montrent qu'une augmentation ou une diminution de l'expression en cavéoline-3 peut avoir des conséquences dramatiques sur la physiologie du muscle.

VIII 3 Cavéoles et sarcopénie

Comme nous venons de le voir, de nombreuses études ont montré le rôle des cavéoles/cavéolines dans le développement de pathologies. Elles peuvent également se trouver associées au processus de vieillissement. En effet, des études ont pu établir un lien entre les cavéoles et la sénescence.

En 2003, l'équipe de Lisanti a généré des souris n'exprimant pas la cavéoline-1 (cav1^{-/-}) et leur survie à long terme a été étudiée pendant une période de deux ans. Il a alors été mis en évidence que ces souris avaient une durée de vie diminuée de moitié par rapport à des souris sauvages (Park *et al.*, 2003). D'autres études ont également montré l'implication de la cavéoline-1 dans le processus de sénescence prématurée. Il a été établi que la cavéoline-1 interagit directement avec Nrf2 permettant ainsi sa séquestration au niveau des cavéoles. Cette interaction serait primordiale notamment en cas de sénescence prématurée induite par le stress oxydant. En effet lors de la phase précoce de la sénescence, la cavéoline-1 empêcherait la translocation de Nrf2 dans le noyau et ainsi l'activation des défenses anti-oxydantes. Ce processus permettrait de favoriser la sénescence prématurée (Volonte *et al.*, 2013).

L'influence des cavéoles/cavéolines dans le vieillissement du muscle squelettique est peu connu. Cependant, une étude menée *in vivo* dans du muscle lisse de vessie de rat s'est intéressée à caractériser le niveau d'expression de la cavéoline-3 et la quantité de cavéoles au cours du vieillissement. Il a été montré que les rats âgés présentaient une diminution

d'environ 50% du taux de cavéoles ainsi qu'une diminution du niveau d'expression de la cavéoline-3 (Lowalekar *et al.*, 2012).

Enfin, une étude menée en 2014 sur la population Taïwanaise a caractérisé l'influence du génotype de CAV1 (codant pour la cavéoline-1) sur la sarcopénie. Cette équipe s'est intéressée à six polymorphismes associés à un nucléotide et a déterminé dans une population de personnes pré-sarcopéniques, sarcopéniques ou fortement sarcopéniques s'il existait une relation entre leur génotype de CAV1 et la sarcopénie. Leurs résultats suggèrent que le gène codant pour la cavéoline-1 pourrait jouer un rôle dans l'étiologie de la sarcopénie et qu'un allèle de la cavéoline-1 pourrait servir de marqueur précoce de la sarcopénie (Lin *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces études montrent à la fois le rôle que peuvent jouer les cavéoles et les cavéolines dans la sénescence mais également l'effet du vieillissement sur ces structures.

Partie IV. Objectifs

La sarcopénie (ou vieillissement musculaire) est une maladie dégénérative liée à l'âge qui se caractérise par une perte progressive et généralisée de la masse, la force et la fonction musculaire squelettique. Elle augmente les risques de dépendance physique et altère la qualité de vie entraînant des coûts de santé publique non négligeables. Cette fonte musculaire est due à une diminution du nombre et de la taille des fibres musculaires. L'apparition de la sarcopénie est un processus complexe qui a une origine multifactorielle puisqu'elle peut être à la fois due à des facteurs extrinsèques comme la malnutrition ou le manque d'exercice physique, mais aussi à des facteurs intrinsèques comme une diminution de l'innervation ou des changements hormonaux. Cependant au niveau cellulaire, il est communément admis qu'une accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est la principale cause du vieillissement.

Le phénotype caractéristique de la sarcopénie est, en de nombreux points, comparable à l'atrophie musculaire observée dans les myopathies. C'est notamment le cas de la LGMD1C, des myopathies distales ou encore l'hyperCKémie. De manière générale une augmentation du stress oxydant est observée au cours du développement de ces myopathies. Les patients présentant ce type de pathologies ont un défaut d'expression de la cavéoline-3 (protéine essentielle à la formation des cavéoles). Ces maladies du muscle squelettique sont d'ailleurs regroupées sous le nom de cavéolinopathies.

Les cavéoles sont de petites invaginations de la membrane plasmique d'une taille de 50 à 100 nm de diamètre. Au niveau cellulaire, les cavéoles ont un rôle dans l'endocytose, dans la régulation de l'homéostasie calcique et du cholestérol et aussi dans la régulation de signaux de transduction notamment ceux impliqués dans la régulation du stress oxydant. Par exemple, elles interagissent avec des facteurs de transcription impliqués dans la régulation des défenses anti-oxydantes comme Nrf2. La structuration des cavéoles est possible grâce à la présence de protéines essentielles : les cavéolines et les cavines. Les cavéolines sont les protéines majoritaires des cavéoles et existent sous trois isoformes : cavéoline-1,-2 et -3. Parmi ces différentes isoformes, seules les cavéolines-1 et -3 sont suffisantes à la formation des cavéoles. Dans le muscle squelettique, la cavéoline-1 est exprimée dans les cellules satellites alors que la cavéoline-3 est spécifique du muscle différencié (myotubes) et joue un rôle important dans l'établissement d'un tissu sain. Bien que le lien entre vieillissement et cavéoline-1 ait été largement étudié dans la littérature, peu d'études ont été menées dans le

muscle squelettique. Cependant, une étude clinique récente indique qu'un allèle particulier de CAV1 pourrait être un marqueur précoce de la sarcopénie.

C'est dans ce contexte, qu'il a été décidé d'étudier l'effet de la principale cause du vieillissement cellulaire (les ERO) sur les cavéoles et les cavéolines. Pour cela, un modèle cellulaire de vieillissement musculaire déjà validé au laboratoire a été utilisé. Il a été montré en effet que des cellules musculaires en culture exposées à l' H_2O_2 présentent des similarités phénotypiques avec des muscles de rats âgés (augmentation du taux d'oxydation des protéines, de la concentration en calcium et du taux de noyaux apoptotiques). Notre étude a donc été réalisée dans une lignée de cellules musculaires modèle de souris (lignée C₂C₁₂) que nous avons exposée à différentes doses d' H_2O_2 .

Nous nous sommes alors intéressé à caractériser l'impact de l' H_2O_2 sur la cavéoline-1 et la fonction des cavéoles dans des myoblastes en prolifération puis sur la cavéoline-3 dans les myotubes. Dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'effet de l' H_2O_2 sur les cavéolines au cours du processus de différenciation des myoblastes en myotubes.

L'ensemble de ces expériences ont été réalisées dans le but de mieux comprendre le rôle des cavéoles/cavéolines dans la médiation du stress oxydant. A terme, cette étude pourrait nous aider à mieux appréhender les mécanismes impliqués dans l'établissement de la sarcopénie.

MATERIELS ET METHODES

I. Techniques de biologie cellulaire

I 1 Modèle cellulaire

La lignée C2C12 a été utilisée comme modèle cellulaire. Ces cellules sont des sous clones de la lignée de myoblastes de souris établie par Yaffe et Saxel en 1977 (Yaffe and Saxel, 1977) et ont été produites par Blau *et al* (Blau *et al.*, 1983) à partir de muscles de pattes arrières de souris C3H qui ont subi une lésion par écrasement.

Ces myoblastes présentent l'avantage de se différencier rapidement et d'exprimer les protéines caractéristiques du muscle. Les myotubes ainsi formés ont la capacité de se contracter spontanément.

I 2 Milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour la lignée C2C12 est du DMEM riche en glucose (4,5 g/L), L-glutamine (580 mg/L) et pyruvate (110 mg/L) (Gibco[®]). Afin de prévenir des contaminations bactériennes, 0,6% (v/v) d'un mélange d'antibiotiques composé de pénicilline (60 U/mL) et de streptomycine (60 µg/mL) (Gibco[®]) sont ajoutés au milieu.

I 3 Prolifération et différenciation cellulaire

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Pétri à une densité de 5000 cellules par cm². Le milieu de prolifération est composé de DMEM/antibiotiques 90% (v/v) et sérum de veau fœtal (SVF) 10% (v/v) Les cellules ensemencées sont placées dans une atmosphère à 37°C saturée en humidité et enrichie en CO₂ (5%) Le milieu de culture est changé tous les trois jours.

Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence, elles sont mises en différenciation, décollées pour une conservation par congélation ou pour réensemencement.

Pour le décollement, les cellules sont d'abord rincées deux fois avec du PBS (KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 137,9 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, CaCl₂ 0,9 mM, MgCl₂ 0,5 mM) (Gibco[®]) avant ajout de trypsine 0,25% (p/v), EDTA 0,038% (p/v) pendant 5 min à 37°C. L'action de la trypsine est inhibée par addition d'un même volume de milieu de prolifération. Les cellules sont alors centrifugées à 600 x g pendant 10 min. Le culot cellulaire ainsi obtenu est alors mis en suspension dans du milieu de congélation (SVF 90% et DMSO 10%) pour

obtenir une concentration de $1,5 \times 10^6$ cellules/mL. Les cellules sont alors conservées dans des vapeurs d'azote. Le culot cellulaire peut être mis en suspension dans du milieu de prolifération pour un réencorement. Quand les cellules atteignent 80 % de confluence, la différenciation cellulaire est induite en remplaçant le milieu de prolifération par du milieu de différenciation composé de DMEM/antibiotiques 98% (v/v) et sérum de cheval (HS) 2% (v/v), Les myoblastes vont alors progressivement fusionner pour former des myotubes.

Le milieu de culture est changé tous les trois jours.

I 4 Traitement des cellules avec l' H_2O_2

Afin de réaliser les traitements H_2O_2 , une solution à 30% de peroxyde d'hydrogène (Sigma) a été diluée et ajoutée directement dans le milieu de culture des cellules à la concentration souhaitée.

I 5 Mesure de la viabilité cellulaire

Pour mesurer la toxicité potentielle de l' H_2O_2 dans les cellules, un test de viabilité a été réalisé en utilisant le réactif PrestoBlue® (Invitrogen™). Cette solution perméable aux membranes cellulaires est réduite par les cellules métaboliquement actives. La résazurine, de coloration bleue est alors réduite en résorufine, molécule rouge fluorescente, donnant ainsi une mesure quantitative de la viabilité cellulaire et de la cytotoxicité d'un traitement (Figure 19).

Après traitement des cellules avec l' H_2O_2 , celles-ci sont rincées avec du PBS puis incubées pendant 1 h à $37^\circ C$ dans du réactif PrestoBlue® dilué au $1/10^{\text{ème}}$ dans le milieu de culture. L'intensité de fluorescence est mesurée avec un lecteur de plaques (TRIAD LT détecteur, Dynes) à une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et d'émission de 590 nm.

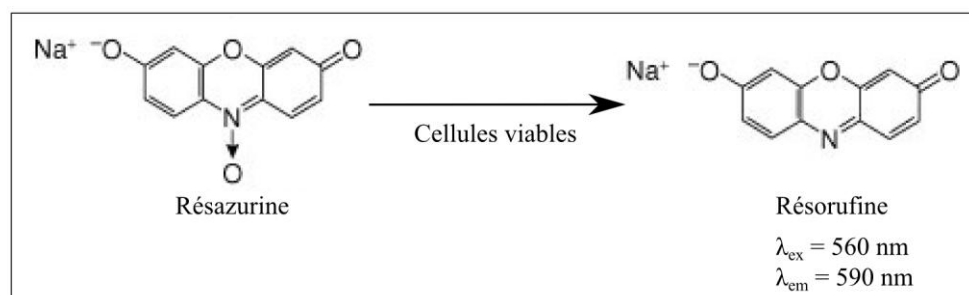


Figure 19 : Transformation de la résazurine en résorufine par les cellules métaboliquement actives

I 6 Induction d'un choc hypo-osmotique

Pour placer les cellules en conditions hypo-osmotiques, le milieu de culture a été dilué avec de l'eau dé-ionisée. Dans ces conditions, l'eau traverse rapidement les membranes biologiques et diffuse du compartiment où son activité est la plus forte (milieu extracellulaire) vers le compartiment où son activité est la plus faible (milieu intracellulaire). Il en résulte une entrée d'eau dans la cellule qui provoque son gonflement et une tension au niveau de la membrane plasmique.

Le choc hypo-osmotique est appliqué sur les cellules préalablement traitées par l' H_2O_2 , la méthyl- β -cyclodextrin ou les siRNA. Les cellules sont rincées avec du PBS puis incubées pendant 30 min dans du milieu complet (DMEM + sérum) dilué avec de l'eau dé-ionisée. Un milieu hypo-osmotique de 30 mOsm est obtenu par une dilution au 1/10^{ème} tandis qu'une osmolarité de 150 mOsm est obtenue grâce à une dilution au demi. Les cellules sont de nouveau rincées avec du PBS puis décollées de leur support et centrifugées. Après deux rinçages avec du PBS, le culot est remis en suspension dans 50 μL de PBS et 50 μl de bleu Trypan 0,4 %. Après 5 min d'incubation, les cellules totales et les cellules bleues sont dénombrées avec un hématocytomètre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules bleues par rapport aux cellules totales.

I 7 siRNA Caveoline-1

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 12 puits à raison de 2600 cellules par cm^2 . Le jour suivant, les cellules ont été transfectées avec 25 nM de siRNA grâce à l'utilisation de Lipofectamine RNAiMAX dans du milieu opti-MEM en suivant le protocole conseillé par Invitrogen. Un siRNA contrôle négatif (Stealth RNAi negative control duplexes, Invitrogen) a été utilisé dans les mêmes conditions.

I 8 Isolation des myotubes à partir d'une culture à 10 jours de différenciation

Au bout de 10 jours de différenciation, les cultures cellulaires sont séparées en myoblastes et myotubes (Stuelzatz *et al.* 2010). Cette séparation est rendue possible car, en présence de trypsine, les myotubes se décollent du support de culture avant les myoblastes. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS à 37°C. La trypsine diluée 10 fois (0,025%) a été incubée pendant 3 min à 37°C. Le décollement des myotubes est suivi sous microscope.

L'action de la trypsine a été inhibée par addition de 3 ml de milieu de prolifération et la suspension est centrifugée 10 min à 1000 x g. Le culot de myotubes est alors conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure. Afin de décoller les myoblastes de leur support, 3 ml de trypsine à 0,25 % ont été incubés pendant 5 min à 37°C. La réaction de la trypsine est stoppée par ajout de 3 ml de milieu de prolifération puis la suspension est centrifugée 10 min à 1000 x g. Afin d'éliminer les éventuels myotubes, le culot cellulaire est réensemencé pendant 30 min. Dans ces conditions, seul les myoblastes ré-adhèrent au support alors que les myotubes restent en suspension. Les myoblastes réensemencés sont alors rincés puis grattés dans du PBS et récupérés par centrifugation. Le culot de myoblastes est lui aussi placé à -20°C pour une utilisation ultérieure.

I 9 Endocytose spécifique des cavéoles.

I 9 a) Mesure par cytométrie en flux

Les cellules sontensemencées a une densité de 15 000 cellules / cm² dans du milieu de prolifération dans des boites 12 puits et mises à adhérer pendant 24 h. Une heure après le traitement à l'H₂O₂, les cellules sont rincées une fois avec du milieu DMEM sans rouge de phénol, incubées avec 0,25 µM de Bodipy-Lactosylceramide-BSA (Bodipy-Laccer) pendant 30 min à 10°C, rincées trois fois à 10°C sur de la glace avec du DMEM et incubées 10 min à 37°C pour induire l'endocytose. Afin de mesurer l'endocytose passive, les cellules ont été pré-incubées pendant 30 min dans du DMEM sans glucose et additionné de 10 mM de sodium azide et de 20 mM de 2-deoxy D-glucose avant l'incubation du Bodipy-Laccer. Pour inhiber de manière sélective les différentes voies d'endocytose, les cellules ont été pré-incubées 30 min avec 15 µM de chlorpromazine (inhibiteur des voies d'endocytose dépendantes des clathrines), 200 µM de génistéine (inhibiteur des voies d'endocytose dépendantes des cavéoles) ou 5 µM de cytochalazine D (inhibiteur de la macropinocytose, endocytose dépendante de l'actine) avant l'ajout du Bodipy-Laccer. Le Bodipy-Laccer potentiellement présent à la surface des cellules est éliminé par trois rinçages de 10 min à 10°C avec de la BSA délipidée dans du DMEM sans glucose additionné de 10 mM de sodium azide et de 20 mM de 2-deoxy D-glucose. Les cellules sont alors immédiatement décrochées du support de culture par action de la trypsine et collectées pour une analyse par cytométrie en flux.

Les échantillons ont été analysés avec un cytomètre BD Biosciences CANTO grâce au logiciel DIVA. Le Bodipy-laccer a été excité par un laser à 488 nm. Les débris cellulaires ont

été exclus de l'analyse grâce à un critère de taille caractéristique de la population cellulaire. Les résultats ont été exprimés en intensité moyenne de fluorescence après analyse de 10 000 cellules.

I 9 b) Mesure par microscopie de fluorescence

Les myotubes ont été incubés avec l' H_2O_2 (500 μM), 3 h puis rincés une fois avec du milieu DMEM sans rouge de phénol, incubées avec 0,25 μM de Bodipy-Lactosylceramide-BSA (Bodipy-Laccer) pendant 30 min à 10°C, rincées trois fois à 10°C sur de la glace avec du DMEM et incubées 10 min à 37°C puis induire l'endocytose. Le Bodipy-Laccer potentiellement présents à la surface des cellules est éliminé par trois rinçages de 10 min à 10°C avec de la BSA délipidée. Les cellules sont alors observées par microscopie de fluorescence.

II. Techniques de biochimie

II 1 Préparation des extraits protéiques

Les cellules sont rincées au PBS (KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, NaCl 137,9 mM, Na_2HPO_4 8 mM, CaCl_2 0,9 mM, MgCl_2 0,5 mM) à 4°C puis grattées dans du PBS. La suspension cellulaire est centrifugée à 600 x g pendant 5 min à 4°C.

Le culot cellulaire est repris dans 150 μL de PBS additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (ROCHE) puis soniqué 5 fois 10 secondes à puissance 7 (Sonicateur MISONIX, Microson).

Les protéines sont dosées grâce au réactif de Bradford (Sigma®). Pour cela, 50 μL d'échantillon sont ajoutés à 1,5 mL de réactif de Bradford. Le mélange est incubé 10 min à l'abri de la lumière avant de mesurer l'absorbance à 595 nm. La concentration en protéines est déterminée grâce à une gamme étalon faite à partir de sérum albumine bovine (2 mg/ml) comme protéine de référence.

II 2 Electrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La séparation électrophorétique des protéines a été réalisée en conditions dénaturantes selon la technique de Laemmli (Laemmli, 1970) sur des gels de polyacrylamide de 10%. Les

échantillons sont préparés dans du tampon de charge composé de 0.05 M Tris-HCl, pH 6.8 ; 1% SDS ; 0.01% Bromophénol blue ; 30% Glycérol et 2% β -mercaptoéthanol, puis chauffés à 90°C pendant 5 min. La migration des échantillons est réalisée à 20 mA dans du tampon de migration (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glycine 192 mM, SDS 0.1%) pendant 1 h 30 min.

Des marqueurs de masse moléculaire (Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards, Biorad®) sont ajoutés pour définir la masse moléculaire des différentes protéines présentes dans les échantillons.

II 3 Transfert des protéines

Les protéines séparées par électrophorèse sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinyldène (PVDF) (Immobilon-P, MILLIPORE). La membrane est préalablement activée dans du méthanol puis rincée à l'eau distillée. La membrane et le gel sont ensuite équilibrés 5 min dans du tampon de transfert (Tris-HCl 20 mM pH 8.3, glycine 154 mM, SDS 0.08% et méthanol 20%). Le transfert des protéines est réalisé en milieu semi-sec (Electro-Blotter AMERSHAM) à une intensité de 0.8 mA/cm² pendant 35 min.

II 4 Détection immunologique des protéines

Suite à l'électrophorèse et au transfert des protéines, la membrane est saturée pendant 2 h en présence de lait écrémé 5% (p/v) dans du TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM et Tween 20 0,1% (v/v)). L'anticorps primaire est ensuite incubé 2 h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C aux dilutions indiquées dans le Tableau II et réalisées dans du TBS-T contenant 1% de lait écrémé. La membrane est rincée trois fois 10 min au TBS-T avant incubation de l'anticorps secondaire 1 h aux dilutions indiquées dans le Tableau II et réalisées dans du TBS-T additionné de lait écrémé 1%. Trois nouveaux rinçages au TBS-T sont alors effectués avant révélation. L'anticorps secondaire, couplé à une peroxydase (Horse Radish Peroxidase), permet de révéler le complexe antigène-anticorps grâce au kit de détection « Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent » (GE Healthcare). Le signal est détecté grâce à une camera CCD (GeneGnome, Syngene®).

Tableau II : Anticorps utilisés pour les Western-blot et dilutions

Cible	Antigène	Type/ Espèce	Dilution	N° de produit / Fournisseur
Anticorps primaires				
Cavéoline-3	Acides aminés 3-40 côté N-ter de la Cavéoline-3 de souris.	Monoclonal/ Souris	1/500	Sc-5310 / Santa Cruz Biotechnology
MURC/Cavine-4	Peptide proche du N-ter de MURC d'origine humaine	Polyclonal/ Chèvre	1/200	Sc-163020 / Santa Cruz Biotechnology
p38 α	Peptide proche du C-ter de la p38 α de souris	Polyclonal/L apin	1/500	Sc-353 / Santa Cruz Biotechnology
Cavéoline-1	Acides aminés 1-17 de la cavéoline-1 humaine	Polyclonal/ Lapin	1/250000	Ab2910 / Abcam
Golgine		Monoclonal/ Souris	1/1000	Molecular probes
Calnexine	Peptide proche du C-ter de la calnexine de souris	Polyclonal/ Chèvre	1/250	Sc-6465 / Santa Cruz Biotechnology
Anticorps secondaires				
Anti immunoglobuline de lapin	Immunoglobuline	Chèvre	1/50000	A0545 / Sigma
Anti immunoglobuline de souris	Immunoglobuline	Chèvre	1/50000	A4416 / Sigma
Anti immunoglobuline de chèvre	Immunoglobuline	Lapin	1/50000	A5420 / Sigma

II 5 Contrôle de charge des Western-blot

Afin de contrôler que nous déposons la même quantité de protéines totales lors de nos dépôts d'échantillons dans les gels d'acrylamide pour la réalisation de Western-blot, nous utilisons la p38 α comme contrôle de charge. Cette protéine est couramment utilisée en condition de stress oxydant car elle présente l'avantage de ne pas avoir sa quantité modifiée dans ces conditions (Clavel *et al.*, 2010; Siebel *et al.*, 2013). Toutes nos quantifications de Western-blot sont exprimées par rapport cette protéine.

II 6 Carbonylation des protéines

La carbonylation des protéines a été déterminée en mesurant la réactivité des dérivés carbonylés avec le 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) grâce à l'utilisation du kit « Protein Carbonyl Assay » (Cayman Chemical Company).

Les cellules sont grattées dans du PBS à 4°C puis soniquées 5 x 10 secondes. Les lysats cellulaires sont alors centrifugés 15 min à 10000 x g. Les surnageants sont incubés avec le DNPH (ou une solution d'HCl à 2,5 M comme contrôle négatif) pendant 1 h à l'abri de la lumière. Les protéines sont ensuite précipitées avec de l'acide trichloroacétique (TCA) et lavées dans un mélange éthanol/ éthyl-acetate (1 :1). Le culot rincé est remis en suspension dans 500 µl de guanidine hydrochloride. Après une centrifugation à 10000 x g, les surnageants sont déposés dans une plaque 96 puits et l'absorbance du DNPH est mesuré à 370 nm.

II 7 Immunoprécipitation de la cavéoline 3

- **Préparation des extraits protéiques**

Les myotubes ont été rincés deux fois dans du PBS à 4°C puis récupérés pour être centrifugés à 1000 x g pendant 5 min à 4°C. Le culot est repris dans 500 µl de tampon RIPA (Tris HCl 20 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM ; NP40 0,5% ; inhibiteurs de protéases) et laissé incubé 15 min dans la glace. La suspension est ensuite pottérisé 100 fois puis de nouveaux incubée 15 min dans la glace. La suspension est de nouveau centrifugée à 600 x g, 5 min à 4°C.

- ***Pré-clearing***

Afin de limiter au maximum les interactions non spécifiques entre l'échantillon et les billes lors de l'immunoprécipitation, une étape de *pré-clearing* est réalisée.

Pour cela le surnageant de l'étape précédente est incubé dans 100 µl de PBS/Tween 0,01% en présence de 100 µl de billes Dynabeads® Protein G, Life Technologie, pendant 20 min à 4°C avec agitation rotative. Ces billes étant aimantées, la suspension est soumise à un champ magnétique (aimant) afin de récupérer l'échantillon pour l'incuber à nouveau dans 150 µl de PBS/Tween 0,01% en présence de 50 µl de billes Dynabeads® Protein G, Life Technologie, pendant 20 min à 4°C avec rotation. Le surnageant est alors récupéré sur aimant.

- **Préparation des billes pour l'immuno-précipitation**

50 µl de billes sont utilisés par immunoprécipitation et sont préalablement lavés deux fois avec du PBS/Tween 0,01%. Les billes sont alors incubées avec 5 µg d'anticorps dans du PBS/Tween 0,01% pendant 20 min sous agitation. Les anticorps sont alors liés aux billes de manière covalente par *cross-linking*.

- ***Cross-linking***

Pour cette étape, nous avons utilisé le *cross-linker* BS³ (life Technology). La préparation précédente a été lavée avec un tampon de conjugaison (Na₃PO₄ 20 mM ; NaCl 0,15 mM pH 7-9) à deux reprises puis incubée dans 250 µl de BS³ à 5 mM pendant 30 min sous agitation. La réaction est inhibée par ajout de 12,5 µl de solution de *quenching* (Tris HCl 1 mM pH 7,5) pendant 15 min sous agitation. Les billes sont alors lavées à trois reprises avec 200 µl de PBS/Tween 0,01%.

- **Immunoprécipitation**

500 µg de protéines d'échantillon ayant subi le pré-clearing sont mis en présence des billes puis mis sous agitation à 4°C sur la nuit.

L'échantillon est lavé trois fois avec une solution de lavage (Tris HCl 20 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM) puis déposés dans un tube neuf. Les échantillons sont repris dans du tampon de charge et chauffés 5 min à 90°C. Les protéines immunoprécipitées sont alors séparées par électrophorèse pour analyse par Western-blot.

II 8 Dosage des ERO intracellulaires

La quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) intracellulaires a été mesurée avec le réactif 2',3'-dichlorofluoresceine diacetate (DCFDA) grâce à l'utilisation du kit « *Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay* » (Abcam) . Les myoblastes ont été ensemencés à une densité de 25000 cellules par puit dans des plaques de 96 puits dans du DMEM sans rouge de phénol. Le jour suivant, les cellules sont incubées avec la sonde DCFDA (25 µM) pendant 45 min à 37 °C puis traitées avec l'H₂O₂ pendant le temps souhaité. L'intensité de fluorescence a été mesurée avec un lecteur de plaques (TRIAD LT détecteur, Dynes) à une longueur d'onde d'excitation de 535 nm et d'émission de 585 nm.

II 9 Gradient de saccharose

Les cavéoles ont été isolées par ultracentrifugation sur gradient discontinu de saccharose (Goudenege *et al.*) Six boîtes de culture de 100 mm de diamètre ont été utilisées pour chaque échantillon. Les cellules ont été rincées deux fois et grattées dans du PBS à 4°C puis collectées par centrifugation 1000 x g à 4°C. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans 300 µl de tampon A (10 mM HEPES pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 mM NaN₃ et une tablette de cocktail d'inhibiteurs de protéases) à 4°C supplémenté avec 250 mM de saccharose et 1% de Triton X-100. Les cellules ont été lysées en réalisant 20 « aller-retour » avec une aiguille 22 Gauge. Le lysat a ensuite été ajusté à 45% de saccharose par addition d'une solution concentrée à 2,16 M préparée dans le tampon A. L'échantillon (890 µl) a ensuite été transféré dans le fond d'un tube de 5 ml contenant déjà deux couches à 30% et 5% de saccharose (3,48 ml et 625 µl, respectivement). Après centrifugation 17 h à 200000 x g dans un rotor Beckman MLS-50 à 4°C, dix fractions de 0,5 ml ont été collectées du haut du gradient vers le bas puis analysées par Western Blot.

La fraction 2 du gradient de saccharose a été diluée trois fois dans le tampon A et centrifugé à 100000 x g pendant 1h à 4°C. Les cavéoles isolées du culot ont été observées en microscopie électronique.

III. Techniques de microscopie

III 1 Immunofluorescence

Afin d'observer la localisation des protéines dans les cellules, des immunomarquages ont été réalisés. Les cellules ont été cultivées sur lamelle de verre et quand la confluence souhaitée a été atteinte, elles ont été rincées 3 fois 10 min au PBS à 4°C avant d'être fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 20 min. Les cellules ont de nouveaux été rincées 3 fois au PBS puis perméabilisées au Triton X-100 1% pendant 5 min. Afin de saturer les sites de fixation non spécifiques des anticorps, les échantillons ont été saturés avec une solution de BSA 3% (p/v) dans du PBS pendant 1 h. L'anticorps primaire a ensuite été incubé pendant 3 h dans une solution de BSA 1% / PBS (p/v) à la concentration indiquée dans le Tableau III. Les échantillons ont ensuite été rincés 3 fois pendant 10 min avec du PBS avant l'incubation de l'anticorps secondaire dans une solution de BSA 1% / PBS (p/v) à la concentration indiquée dans le Tableau III. Après 3 rinçages de 10 min, les cellules ont incubées 5 min dans une

solution de Hoechst (dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS). Les lamelles ont ensuite été montées sur lames de verre dans du milieu de montage spécifique pour la fluorescence (Dako). Les cellules ont été observées avec un microscope à fluorescence Leica DM16000B équipé d'une camera CCD Leica (la taille d'un pixel est de 6,45 μm , 1392 pixels x 1040 pixels). La microscopie TIRF a été réalisée avec un microscope Nikon Ti-Eclipse équipé d'une caméra EM CCD (la taille d'un pixel est de 16 μm , 512 pixels x 512 pixels).

Tableau III : Description des anticorps utilisés pour l'immunofluorescence

Cible	Antigène	Type / Espèce	Dilution	N° de produit / Fournisseur
Anticorps primaires				
Cavéoline-3	Acides aminés 3-40 coté N-ter de la Cavéoline-3 de souris.	Monoclonal / Souris	1/300	Sc-5310 / Santa Cruz Biotechnology
MURC/Cavine-4	Peptide proche du N-ter de MURC d'origine humaine	Polyclonal / Chèvre	1/200	Sc-163020 / Santa Cruz Biotechnology
Cavéoline-1	Acides aminés 1-17 de la cavéoline-1 humaine	Polyclonal / Lapin	1/500	Ab2910 / Abcam
α -actinine	Peptide proche du N-ter de l' α -actinine d'origine humaine	Polyclonal / Chèvre /	1/300	Sc-7453 / Santa Cruz Biotechnology
Anticorps secondaires				
Anti immunoglobuline de lapin	Immunoglobuline	Ane	1/1000	Alexa Fluor [®] 546 A10040 / Life Technoligies
Anti immunoglobuline de souris	Immunoglobuline	Chèvre	1/1000	Alexa Fluor [®] 488 A117049 / Life Technoligies
Anti immunoglobuline de chèvre	Immunoglobuline	Ane	1/1000	Alexa Fluor [®] 488 A11055 / Life Technoligies

III 2 Microscopie électronique

III 2 a) Observation morphologique des myoblastes

L'observation des myoblastes a été réalisée par une méthode conventionnelle d'inclusion en résine. Les cellules ont été fixées avec une solution à 1,6% (v/v) de glutaraldéhyde puis post-fixées avec une solution à 1% (v/v) de tétraoxyde d'osmium. Elles ont ensuite été déshydratées par des concentrations croissantes d'éthanol à 50%, 70%, 95% et 100% (incubations entre 10 et 20 min puis par de l'oxyde de propylène (2 x 10 min). Les cellules ont été imprégnées puis incluses en résine Epon : 1 h oxyde de propylène : Epon en ratio 2 : 1, 1 h oxyde de propylène : Epon en ratio 1 : 2 puis 1 h suivie de 12 h et 4 h en Epon pur. La résine a ensuite été mise à polymériser 48 h à 62°C. Des coupes ultra fines (70 nm) ont été réalisées sur un ultramicrotome (RMC, powertome PC) et récoltées sur des grilles à simple trou, recouvertes d'un film de butvar. Les coupes ont été contrastées avec de l'acétate d'uranyle à 2% (v/v) 20 min et du citrate de plomb 2 min.

III 2 b) Détection de la cavéoline-1 dans les myoblastes

L'immuno-marquage des échantillons a été réalisé pour la cavéoline-1 par la technique de marquage en pré-inclusion (Decossas *et al.*, 2003). Les cellules ont été fixées avec une solution à 4% de formaldéhyde pendant 1 h, incubées avec de la glycine 50 mM et perméabilisées avec de la saponine à 0,1% pendant 3 min. Les sites de fixation non spécifiques ont été bloqués par une solution de BSA à 1% puis un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la cavéoline-1 (20 µg/ml) a été utilisé suivi d'un anticorps secondaire conjugué à une particule d'or dite « ultra small » (0,8 nm de diamètre ; Aurion ; The Netherlands, 1/1000^{ème} dans du PBS + BSA). Les cellules ont été post-fixées par une solution à 1% de glutaraldéhyde puis les billes d'or ont été amplifiées en utilisant le kit d'amplification à l'argent HQ silver de Nanoprobes. Après une post-fixation dans 1% de tétra oxyde d'osmium de 10 min, les cellules sont incluses dans de la résine Epon comme décrit précédemment.

III 2 c) Détection de la cavéoline-1 dans les cavéoles isolées

L'immuno-détection de la cavéoline-1 sur les cavéoles isolées par gradient de saccharose a été réalisée à partir de vésicules déposées sur des grilles de nickel recouvertes de film de carbone traitées par *glow discharge* (Elmo, Cordouan). Un anticorps polyclonal anti-

cavéoline-1 (20 µg/ml, Abcam) a été utilisé puis révélé par la protéine-A couplée à de l'or colloïdal de 10 nm de diamètre (CMC Utrecht). Les grilles ont finalement été colorées avec 4% d'acétate d'uranyle.

Les observations ont été réalisées avec un microscope électronique à transmission CM120 (FEI) muni d'une camera CCD USC 1000 de 2000 pixels x 2000 pixels (Gatan, CA, USA).

III 2 d) Détection de la cavéoline-3 dans les myotubes

L'immunomarquage de la cavéoline-3 a été réalisé par la technique dite de « Tokuyasu » par l'utilisation de cryo-coupes. Les cellules ont été fixées par une solution de formaldéhyde à 4% contenant 0,2% de glutaraldéhyde pendant 1 h à température ambiante. Après décollement de leur support dans de la gélatine alimentaire à 10%, les cellules ont été centrifugées 5 min à 800 g puis le culot a été découpé en cube d'environ 1 mm de côté. Après cryoprotection 24 h sous agitation dans une solution de sucrose 2,3 M dans du PBS, les cubes de cellules ont été congelés sur plot dans de l'azote liquide. Les blocs ont été coupés à l'aide d'un cryo-ultramicrotome (50 nm d'épaisseur à une température de - 110°C ; Leica UC6) et prélevées à l'aide d'une goutte de méthylcellulose 2% : sucrose 2,3 M dans un ratio 1:1. Les coupes ont été déposées sur des grilles en Nickel recouvertes d'un film de butvar et carbonées puis stockées à 4°C avant immuno-marquage. Afin de bloquer les sites aldéhydes libres, les coupes ont été incubées dans une solution de glycine à 20 mM 2 fois 5 min puis elles ont été saturées par une solution de BSA 1% pendant 5 min. L'anticorps anti-cavéoline-3 (santa Cruz) a été utilisé dilué au 50^{ème} et complété de 1% de BSA pendant 15 h. Après rinçage, les coupes ont été incubées dans la solution d'anticorps secondaire dilué au 30^{ème} (IgG de chèvre anti-souris) couplé à des billes d'or colloïdal de 10 nm de diamètre (Aurion). Après rinçage au PBS puis à l'H₂O et post-fixation dans 1% de glutaraldéhyde 5 min, les coupes ont été contrastées et consolidées à l'aide d'une solution de méthylcellulose 2% et d'acétate d'uranyle 3% dans un ratio 9 :1. Les grilles sont ensuite séchées avant observation.

IV. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées au moins trois fois sur des cultures cellulaires différentes. Pour chaque série expérimentale et pour chaque paramètre mesuré, la moyenne arithmétique des valeurs obtenues a été calculée. Chaque moyenne est accompagnée de son

erreur standard (ESM). La comparaison des moyennes des valeurs obtenues dans les différents groupes expérimentaux a été effectuée par un test “t” de Student non apparié et/ou un test de Mann-Withney grâce au logiciel XLSTAT. Une différence entre deux moyennes est considérée comme significative lorsqu’elle est associée à une probabilité $p < 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie I. Myoblastes en prolifération : Effets de l'H₂O₂ sur la cavéoline-1

Dans le muscle squelettique, les cellules satellites sont nécessaires à la régénération des fibres musculaires endommagées. En cas de lésion ou de dommage, les cellules satellites vont être activées pour donner des myoblastes capables de proliférer puis se différencier en myotubes et ainsi réparer ou remplacer la fibre endommagée. Le vieillissement est associé à des problèmes de régénération du muscle. En effet, au cours de l'avancée en âge, une diminution du nombre de cellules satellites ainsi qu'une altération de leurs propriétés de régénération sont observées (Hikida, 2011). C'est dans ce contexte, qu'il a été décidé d'étudier l'effet de la principale cause du vieillissement au niveau cellulaire (les ERO) sur les cavéoles et les cavéolines dans les cellules satellites.

Dans une première partie, nous nous focaliserons sur la cavéoline-1, isoforme spécifiquement exprimée dans les cellules satellites. D'une manière intéressante, cette protéine est fortement impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire et certains auteurs proposent que la cavéoline-1 permettrait l'activation des cellules satellites lors du processus de régénération musculaire (Volonte *et al.*, 2005).

Il a précédemment été montré au laboratoire que des cellules musculaires en culture traitées avec de l'H₂O₂ présentent des similarités phénotypiques avec des muscles « âgés » (augmentation du taux d'oxydation des protéines, de la concentration en calcium et du taux de noyaux apoptotiques) (Dargelos *et al.*, 2010). Dans cette première partie, nous étudierons donc l'impact de l'H₂O₂ sur la cavéoline-1 et les cavéoles dans les myoblastes de la lignée C2C12 issus de cellules satellites de souris (Blau *et al.*, 1983; Figure 20 A).

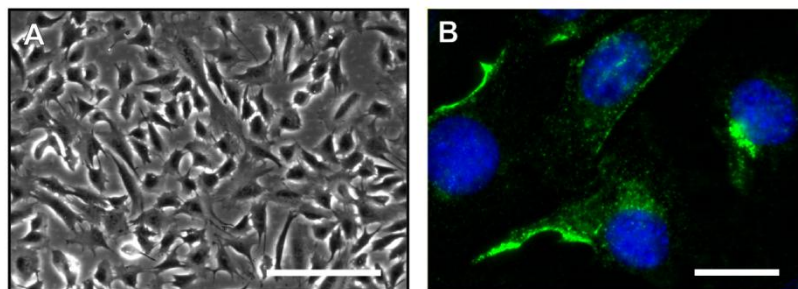


Figure 20 : Observation en microscopie optique de myoblastes en prolifération.

A Image de microscopie à contraste de phase. Echelle = 200 µm. **B** Immuno-marquage de la cavéoline-1 (vert). Après fixation et perméabilisation des cellules, l'anticorps anti-cavéoline-1 a été appliqué comme décrit dans « matériels et méthodes » et les noyaux des cellules ont été colorés au Hoechst (bleu). Echelle = 20 µm

I. Effet de l'H₂O₂ sur le taux de cavéoline-1 dans les myoblastes

Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de l'H₂O₂ sur le niveau d'expression de la cavéoline-1. Pour cela, des Western-blots ont été réalisés à partir de myoblastes C2C12 traités avec 100, 250, 500 ou 1000 µM d'H₂O₂. Comme le montre la Figure 21 A, seules les concentrations les plus fortes ont un effet significatif sur la cavéoline-1. En effet, l'ajout de 500 ou 1000 µM d'H₂O₂ dans le milieu extracellulaire induit une diminution significative de la cavéoline-1. Le taux de la protéine atteint $64 \pm 14\%$ par rapport au témoin non traité après 1 h d'incubation avec 500 µM d'H₂O₂. L'addition de 1000 µM induit une diminution de la quantité de cavéoline-1 plus importante. En effet, comme le montre la Figure 21 A, la quantité de protéine passe de $52 \pm 17\%$ à $24 \pm 15\%$ du témoin entre 1 h et 6 h, respectivement. Nous avons souhaité déterminer, pour les concentrations où nous observions un effet sur la cavéoline-1 (500 et 1000 µM d'H₂O₂), si cette diminution était un processus rapide. Pour cela, nous avons quantifié la cavéoline-1 dans les myoblastes après les avoir incubés pendant 10 min avec 500 ou 1000 µM d'H₂O₂. Comme le montre la Figure 21 B, la diminution de cavéoline-1 est effective dès 10 min de traitement et le taux de cavéoline-1 dans les myoblastes atteint $62 \pm 14\%$ et $72\% \pm 21\%$ de la valeur témoin pour un traitement de 500 et 1000 µM, respectivement.

Ces résultats montrent que des concentrations élevées d'H₂O₂ (500 et 1000 µM) induisent une diminution très rapide de la quantité de cavéoline-1 dans les myoblastes C2C12.

Cette diminution peut être due soit à une baisse de la synthèse et/ou une augmentation de sa dégradation. Or, le turn-over de la cavéoline-1 a été estimé à plus de 36 h (Hayer *et al.*, 2010) ; un arrêt de sa synthèse ne peut donc pas expliquer une telle baisse dès 10 min. Cette diminution rapide de la cavéoline-1 suggère donc une dégradation de la protéine. Afin de tester cette hypothèse, nous avons décidé d'inhiber un processus cellulaire de dégradation rapide des protéines endommagées (oxydation comprise) : le protéasome (Shang and Taylor, 2011). Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique du protéasome (MG132) et mesuré son effet sur le niveau d'expression de la cavéoline-1 avec et sans traitement à l'H₂O₂. Nous avons dans un premier temps vérifié que le traitement avec le MG132 seul n'avait pas d'effet sur la quantité de cavéoline-1 (Figure 21 C). Puis les cellules ont été incubées avec 50 µM de MG132 pendant 3 h avant l'ajout de 500 µM d'H₂O₂ pendant 10 min. Comme le montre la Figure 21 C, la quantité de cavéoline-1 dans ces conditions, est identique à celle des cellules témoins non traitées. L'inhibition du protéasome prévient donc la dégradation de la cavéoline-1 dans les myoblastes en réponse à l'ajout d'H₂O₂.

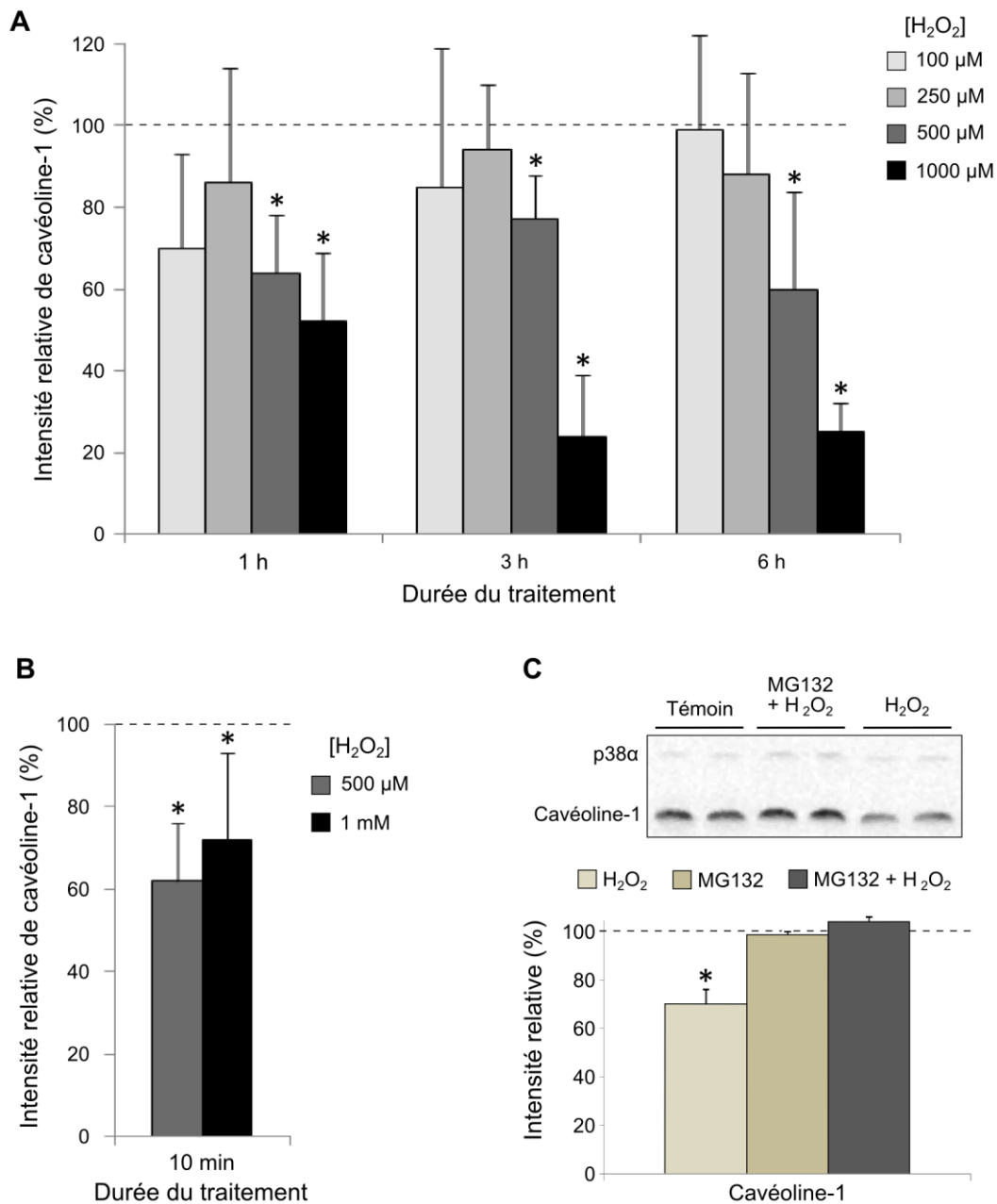


Figure 21 : Effet de l'H₂O₂ sur la quantité de cavéoline-1

A et B Des myoblastes ont été traités avec 100, 250, 500 ou 1000 µM d'H₂O₂ pendant 10 min, 1 h, 3 h ou 6 h. Les extraits cellulaires (15 µg de protéines) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane Immobilon[®]. La détection immunologique a été réalisée grâce à des anticorps dirigés contre la cavéoline-1 (1/1000^{ème}) et la p38α (1/500^{ème}). Le taux de cavéoline-1 est quantifié et exprimé en pourcentage par rapport aux cellules témoins sans traitement (---). **C** Les cellules ont été incubées pendant 3 h avec 50 µM de MG132 puis traitées 10 min avec 500 µM d'H₂O₂. Un Western-blot a été réalisé dans les mêmes conditions que A et B. * Significativement différent de l'échantillon témoin sans traitement (P<0,05).

L'ensemble de ces résultats montre que l'H₂O₂ induit une dégradation rapide de la cavéoline-1. De plus, cette dégradation semble passer par la voie du protéasome.

II. Effet de l'H₂O₂ sur la viabilité cellulaire

D'après les résultats précédents, la cavéoline-1 est sensible à un traitement par l'H₂O₂ à des doses relativement importantes (500 et 1000 µM). Par conséquent, il était important de savoir si ces concentrations ne provoquaient pas une mort cellulaire excessive.

Des myoblastes ont été cultivés jusqu'à 80% de confluence puis 100, 250, 500 ou 1000 µM d'H₂O₂ ont été ajoutés au milieu extracellulaire pendant des temps allant de 10 min à 6 h. Nous avons dans ces conditions quantifié l'effet du traitement sur la viabilité cellulaire grâce à l'utilisation du réactif PrestoBlue® (voir Matériels et Méthodes et Tableau IV).

Tableau IV : Effet de l'H₂O₂ sur la viabilité des myoblastes C2C12

H ₂ O ₂ (µM)	100				250			
Temps	10 min	1 h	3 h	6 h	10 min	1 h	3 h	6 h
Viabilité (%total)	100	88	79	92	105	105	97	86*
SEM	4,5	16,5	16,4	7,5	4	12,9	13	8
H ₂ O ₂ (µM)	500				1000			
Temps	10 min	1 h	3 h	6 h	10 min	1 h	3 h	6 h
Viabilité (%total)	101	99,4	90,8	77,2*	93,2	81,7*	56*	8,1*
SEM	2,25	10,7	11,1	12,7	4,75	6,75	8	0,57

Des myoblastes ont été traités avec 100, 250, 500 ou 1000 µM d'H₂O₂ pendant 10 min, 1 h, 3 h ou 6 h. Les cellules ont été incubées avec le réactif PrestoBlue® puis la fluorescence de la molécule a été mesurée ($\lambda_{ex}=560$ nm, $\lambda_{em}=590$ nm) afin d'avoir une valeur quantitative de la viabilité cellulaire. Significativement différent de l'échantillon témoin sans traitement ($P<0,05$).*

Les différentes doses d'H₂O₂ utilisées permettent d'observer deux types de réponse sur la viabilité. Avec des concentrations de 100, 250 ou 500 µM, l'impact sur la viabilité cellulaire en fonction des temps d'incubation est faible voire inexistant. Il faut en effet

attendre 6 h pour observer un effet toxique avec 250 ou 500 μM d' H_2O_2 . En revanche, avec 1000 μM d' H_2O_2 , l'impact sur la viabilité est plus important et une toxicité significative est observée dès 1 h de traitement.

Par conséquent, la dégradation de la cavéoline-1 apparaît dans des conditions de traitement n'induisant pas forcément la mort des cellules. Après 10 minutes d'incubation avec l' H_2O_2 par exemple, la viabilité cellulaire n'est pas affectée alors que le taux de cavéoline-1 est significativement réduit (comparer Tableau IV et Figure 21 B). En d'autres termes, la cavéoline-1 semble affectée par des doses d' H_2O_2 non nécessairement toxiques pour les myoblastes. Nous avons alors souhaité déterminer si ces conditions de traitement étaient capables d'induire un stress oxydant dans les myoblastes.

III. Effet de l' H_2O_2 sur l'accumulation intracellulaire des ERO

Le taux d'ERO intracellulaires a été mesuré à l'aide de la sonde fluorométrique 2',7'-dichlorofluoresceine diacétate (DCFDA) comme couramment utilisé dans la littérature (Yu *et al.*, 2014). Cette sonde pénètre librement dans les cellules où elle est déacétylée par les estérases cellulaires en une molécule non fluorescente qui ne traverse pas les membranes biologiques. Une fois oxydée par les ERO intracellulaires en 2',3'-dichlorofluoresceine (DCF), elle va être détectée par fluorescence (voir matériels et méthodes).

Comme le montre la Figure 22, après un traitement des cellules avec 500 ou 1000 μM d' H_2O_2 , la concentration d'ERO intracellulaires augmente d'un facteur 4 à 6 par rapport au témoin sans traitement, respectivement.

L'accumulation des ERO intracellulaires est quantifiable et significativement différente des conditions témoins dès 10 minutes de traitement et ce, quelque soit la concentration d' H_2O_2 utilisée. Cette accumulation s'accroît avec le temps même si l'augmentation observée entre 10 et 60 minutes n'est pas statistiquement différente.

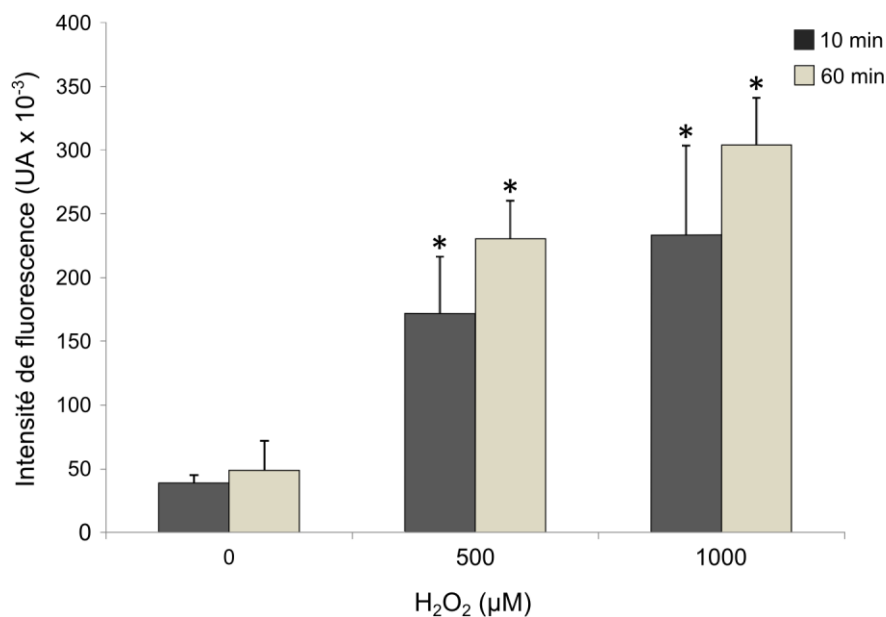


Figure 22 : Effet de l'H₂O₂ sur l'accumulation des ERO intracellulaires dans les myoblastes

*Les cellules ont été traitées avec 500 ou 1000 µM d'H₂O₂ pendant 10 min ou 60 min puis la production d'ERO a été mesurée à l'aide de la sonde fluorescente DCFDA comme décrit dans « matériels et méthodes ». * Significativement différent de l'échantillon témoin non traité (P < 0,05).*

De plus, l'accumulation des ERO ne se fait pas non plus de manière dose-dépendante puisque lorsque la concentration en H₂O₂ est doublée, l'augmentation observée n'est pas significative. Au vu de ces résultats, il semblerait qu'il y ait une valeur seuil d'accumulation des ERO dans les myoblastes C2C12.

Ainsi, le traitement par l'H₂O₂ induit bien l'apparition d'un stress oxydant dans les myoblastes de façon quasi-instantanée. Par la suite, nous avons souhaité savoir si cette accumulation d'ERO était suffisante pour générer des dommages au niveau des protéines dans les myoblastes.

IV. Effet de l'H₂O₂ sur la carbonylation des protéines

L'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules peut avoir des effets délétères et engendrer au niveau des protéines, des modifications irréversibles comme leur carbonylation (Stadtman and Oliver, 1991). La carbonylation est un processus qui conduit à l'apparition de groupements carbonyles (aldéhydes ou cétones) sur les chaînes latérales des résidus lysine, arginine, proline, et thréonine. Afin de quantifier une éventuelle augmentation

de carbonyles dans les protéines des myoblastes, nous avons utilisé le 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) qui réagit avec les groupements carbonyles. Comme décrit dans « matériel et méthodes » les cellules ont été incubées avec 500 μM ou 1000 μM d' H_2O_2 pendant 3 h. Les protéines extraites des myoblastes ont été incubées avec le DNPH dont l'absorbance a été mesurée à 370 nm. La densité optique est proportionnelle à la quantité de groupements carbonyles dans l'échantillon.

Comme le montre le Tableau V, suite à l'incubation de 500 μM ou 1000 μM d' H_2O_2 , le taux de carbonyles dans les myoblastes augmente significativement. En effet, après 3 h d'incubation la quantité de carbonyles passe de 0,98 nmol/mg dans le témoin à 3,74 nmol/mg et 4,36 nmol/mg dans les échantillons ayant subi un traitement avec 500 ou 1000 μM d' H_2O_2 , respectivement.

Tableau V : Effet de l' H_2O_2 sur le taux de carbonyles dans les myoblastes

H_2O_2 (μM)	0	500	1000
Taux de carbonyles (nmol/mg)	0,98	3,74*	4,36*
SEM	0,68	0,85	0,53

Les cellules ont été traitées avec 500 ou 1000 μM d' H_2O_2 pendant 3 h puis le taux de protéines carbonylées a été mesuré grâce au DNPH comme décrit dans « matériels et méthodes ». * Significativement différent de l'échantillon témoin non traité ($P < 0,05$).

Ces résultats montrent que dans nos conditions, l'ajout d' H_2O_2 dans les myoblastes induit l'apparition d'un stress oxydant qui a des conséquences délétères au niveau des protéines.

V. Effet préventif d'un antioxydant naturel : l'Oligopin®

Afin de s'assurer que la dégradation de la cavéoline-1 est bien due à l'augmentation du stress oxydant, nous avons utilisé un traitement préventif à base d'un antioxydant naturel : l'Oligopin®. Cet extrait d'écorce de pin maritime commercialisé par l'entreprise DRT (Dérivés Résiniques et Terpéniques, Dax, France) est composé à plus de 96% de polyphénols, ce qui lui confère des propriétés anti-oxydantes. Couramment utilisé dans les compléments alimentaires en prévention cardiovasculaire, l'Oligopin® a une activité antioxydante avérée dans des cellules musculaires traitée à l' H_2O_2 (Dargelos *et al.*, 2010; Poussard *et al.*, 2013).

Les myoblastes ont donc été pré-incubés pendant 1 h avec 50 µg/ml d'Oligopin[®] puis traités avec 500 µM d'H₂O₂ pendant 10 min. Comme le montre la Figure 23, ce traitement préventif a un effet significatif sur la baisse du niveau d'expression de la cavéoline-1. Nous avons également vérifié que l'ajout d'Oligopin[®] seul n'avait pas d'effet significatif sur le niveau d'expression de la cavéoline-1 (Figure 23).

Ce résultat confirme que la dégradation de la cavéoline-1 est bien due au stress oxydant induit par l'ajout d'H₂O₂.

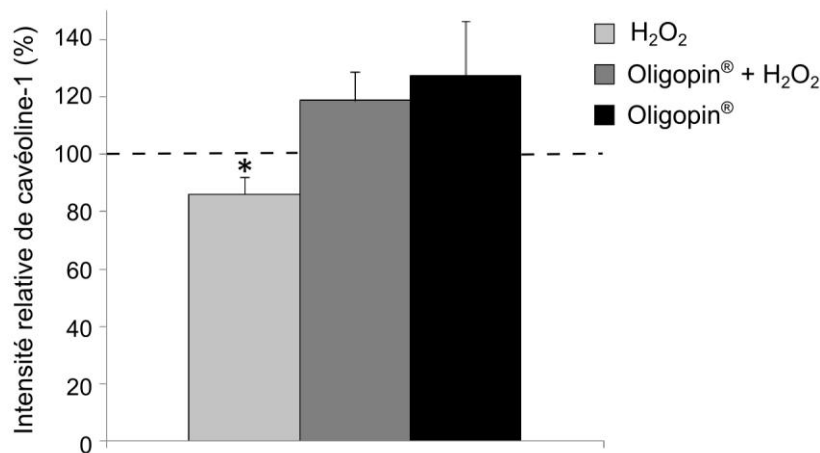


Figure 23 : Effet d'un traitement à l'Oligopin[®] sur le niveau d'expression de la cavéoline-1

*Des myoblastes ont été pré-incubés pendant 1 h avec 50 µg/ml d'Oligopin[®] puis traités avec 500 µM d'H₂O₂ pendant 10 min. Des extraits cellulaires (15 µg de protéines) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane Immobilon[®]. La détection immunologique a été réalisée grâce à des anticorps dirigés contre la cavéoline-1 (1/1000^{ème}) et la p38α (1/500^{ème}). Le taux de cavéoline-1 est quantifié et exprimé en pourcentage relatif des cellules témoins sans traitement (---). * Significativement différent de l'échantillon témoin sans traitement H₂O₂ (P<0,05).*

VI. Effet de l'H₂O₂ sur la phosphorylation de la cavéoline-1

Comme évoqué en introduction, la cavéoline-1 peut être phosphorylée sur sa tyrosine 14, notamment suite à un stress oxydant. Cette modification post-traductionnelle peut engendrer des changements de sa conformation et ainsi modifier ses capacités d'oligomérisation et/ou ses fonctions (Faggi *et al.*, 2014). Nous avons voulu déterminer si, dans nos conditions, le traitement à l'H₂O₂ induisait la phosphorylation de la cavéoline-1. Pour cela, des myoblastes ont été incubés avec 500 µM d'H₂O₂ sur des périodes de 10 min à 3

h. Comme le montre la Figure 24, la cavéoline-1 est phosphorylée 10 min après ajout d' H_2O_2 . Cette phosphorylation rapide est transitoire car après 1 h ou 3 h d'incubation, la bande correspondant à la cavéoline-1 phosphorylée n'est plus détectée par Western blot.

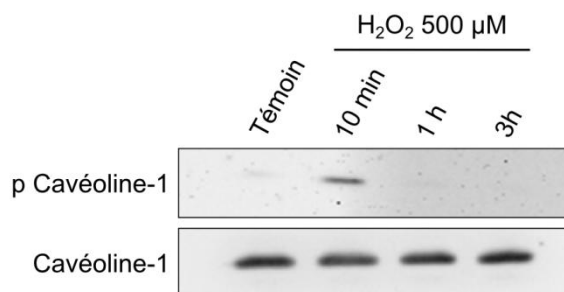


Figure 24 : Effet de l' H_2O_2 sur la phosphorylation de la tyrosine 14 de la cavéoline-1

Des myoblastes ont été traités avec $500 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 pendant 10 min, 1 h ou 3 h. Des extraits cellulaires ($15 \mu\text{g}$ de protéines) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane Immobilon[®]. La détection immunologique a été réalisée grâce à des anticorps dirigés contre la cavéoline-1 ($1/1000^{\text{ème}}$) et la forme phosphorylée de la cavéoline-1 ($1/1000^{\text{ème}}$).

VII. Discussion

Les dommages oxydatifs sont aujourd'hui les principaux facteurs responsables du vieillissement cellulaire. Quand ils touchent les cellules satellites, ils peuvent induire des problèmes au niveau de la régénération du muscle comme c'est le cas au cours du vieillissement (Jang *et al.*, 2011). La cavéoline-1 est vraisemblablement impliquée dans les voies de régulation du stress oxydant car elle interagit et inhibe l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans la production d'ERO (eNOS, NOX...) (Patel and Insel, 2009). Récemment, plusieurs auteurs ont suggéré que la cavéoline-1 pouvait être responsable d'une régulation négative des défenses anti-oxydantes dans les fibroblastes grâce à son interaction avec le facteur de transcription Nrf2 (Li *et al.*, 2012; Volonte *et al.*, 2013). Cependant l'effet du stress oxydant sur le niveau d'expression de la cavéoline-1 est controversé et apparaît comme fortement dépendant du type cellulaire. Bien que Hsieh *et al.*, aient montré que l' H_2O_2 pouvait entraîner une diminution de l'expression de la cavéoline-1 dans les cardiomyocytes, Dasari *et al.*, ont observé l'effet inverse avec des doses comparables d' H_2O_2 dans les cellules endothéliales (Dasari *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2013).

Au cours de notre étude, nous avons directement ajouté au milieu de culture 100, 250, 500 ou $1000 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 , doses comparables à celles utilisées dans la littérature dans des myoblastes C2C12 (Fan *et al.*, 2010; Won *et al.*, 2012). L' H_2O_2 présente l'avantage d'être le

plus stable des ERO et diffuse librement à travers les membranes cellulaires (Giniatullin and Giniatullin, 2003). L'accumulation des ERO et leurs conséquences sur la carbonylation des protéines ont été mesurées dans notre modèle expérimental. Dans les myoblastes, les ERO s'accumulent rapidement des 10 min après ajout d' H_2O_2 dans le milieu de culture (Figure 22). De plus, le niveau de carbonylation des protéines, une des conséquences les plus courantes du stress oxydant dans les cellules (Stadtman and Oliver, 1991), augmente d'un facteur 3 à 4 après l'addition d' H_2O_2 (Tableau V). Dans de précédentes études menées au laboratoire dans le muscle squelettique de rat, une augmentation similaire du taux de carbonyls avait été observée au cours du vieillissement (Brulé *et al.*, 2010). Nos conditions de traitement représentent donc un bon modèle cellulaire pour l'étude des mécanismes impliqués dans le vieillissement musculaire. De manière intéressante, nous sommes capables dans les myoblastes en prolifération, d'induire un stress oxydant significatif sans nécessairement affecter la viabilité cellulaire (500 μM d' H_2O_2 pendant 10 min à 3 h et 1000 μM pendant 10 min).

Dans ces conditions, le taux de cavéoline-1 est rapidement modifié par l' H_2O_2 (Figure 21 B). La quantité de la protéine est diminuée d'environ 30%, comme dans les études récentes de Hsieh *et al.*, réalisées dans des cardiomyocytes (Hsieh *et al.*, 2013). De plus, l'utilisation d'un antioxydant naturel (Oligopin[®]) permet de prévenir la baisse de cavéoline-1. Ces résultats suggèrent que la protéine est directement et rapidement ciblée par le stress oxydant dans les myoblastes en prolifération. En accord avec plusieurs auteurs, une dégradation si rapide des protéines peut être attribuée au protéasome (Shang and Taylor, 2011; Pickering and Davies, 2012). En effet, lorsque les cellules sont incubées avec un inhibiteur du protéasome (MG132), l' H_2O_2 n'a plus d'effet sur la quantité de cavéoline-1 (Figure 21 C). Ces résultats confirment que la protéine est dégradée par cette voie suite au traitement H_2O_2 . Comme évoqué précédemment, la cavéoline-1 peut agir comme un régulateur négatif des défenses antioxydantes. La dégradation rapide de la protéine après l'induction du stress oxydant pourrait alors déclencher les défenses anti-oxydantes.

Nous avons également pu mettre en évidence que l' H_2O_2 induit une phosphorylation rapide et transitoire de la cavéoline-1 (Figure 24). Cette modification post-traductionnelle en réponse à l' H_2O_2 a déjà été observée dans des cellules endothéliales (Chen *et al.*, 2005). Certains auteurs proposent que la phosphorylation de la cavéoline-1 pourrait être associée à une déstabilisation de ses oligomères et à une accumulation de sa forme monomérique (Bakhshi *et al.*, 2013a). Par ailleurs, la forme phosphorylée de la cavéoline-1 jouerait un rôle

important dans la régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire (Nethe and Hordijk, 2011). Dans les rhabdomyosarcomes, par exemple, la phosphorylation de la cavéoline-1 serait corrélée à la croissance tumorale (Faggi *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces études suggèrent que la phosphorylation de la cavéoline-1 en réponse au stress oxydant pourrait être associée à des problèmes de migration des cellules satellites, étape importante de la régénération musculaire.

Ce qu'il faut retenir

- L'H₂O₂ induit l'apparition d'un stress oxydant intracellulaire dès 10 min.
- Le stress oxydant dans les myoblastes s'accompagne d'une dégradation de la cavéoline-1.
- La dégradation de la cavéoline-1 passe par la voie du protéasome.
- La dégradation de la cavéoline-1 a lieu dans des cellules viables.
- L'utilisation d'un antioxydant naturel prévient l'effet de l'H₂O₂ sur la dégradation de la cavéoline-1.
- L'H₂O₂ induit une phosphorylation rapide et transitoire de la cavéoline-1.

Partie II. Myoblastes en prolifération : Effets de l'H₂O₂ sur les cavéoles

I. Mise en évidence des cavéoles dans les myoblastes

Bien que la cavéoline-1 soit exprimée dans les cellules satellites, la présence de cavéoles n'y est actuellement toujours pas clairement établie (Gervásio *et al.*, 2011; Bonor *et al.*, 2012). Nous avons donc souhaité, dans un premier temps, montrer la présence de cavéoles dans les myoblastes C2C12. Pour cela, deux approches ont été réalisées, une première a consisté à isoler des cavéoles issues de myoblastes C2C12 par ultracentrifugation sur gradient de saccharose. La deuxième approche nous a permis d'observer des cavéoles par microscope électronique à transmission (MET).

Afin d'isoler les cavéoles, nous les avons séparées des autres constituants cellulaires sur un gradient de saccharose en présence de triton. La répartition de la cavéoline-1 à travers ce gradient a ensuite été observée par Western-blot. Comme le montre la Figure 25, la cavéoline-1 est présente dans les fractions 7 et 8 ainsi que dans le culot du gradient (fraction 9/10). Nous pouvons également la localiser dans les fractions de faible densité (fractions 2 et 3) correspondant aux membranes enrichies en cholestérol et en sphingolipides, résistantes au détergent et connues pour contenir les cavéoles (Smythe *et al.*, 2003; Goudenege *et al.*, 2005).

Ces fractions membranaires de faible densité contiennent la cavine-1 et la cavéoline-1, deux protéines essentielles au maintien des cavéoles à la membrane plasmique (Figure 25). Des protéines comme la golgine ou la calnexine, marqueurs de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique ne sont pas présentes dans ces fractions de faible densité, attestant de la bonne séparation des cavéoles des autres types de membrane cellulaire. La cavéoline-1 peut « naviguer » entre le RE, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, comme le confirme sa présence dans les différentes fractions du gradient (Smart *et al.*, 1994). Un aliquot de la fraction 2 a ensuite été étudié en MET (Figure 25 B). Des vésicules lipidiques d'une taille de 80 à 150 nm de diamètre ont été observées. Parmi ces vésicules, nous avons pu mettre en évidence par immuno-marquage à l'or colloïdal la présence de cavéoline-1 (Figure 25B).

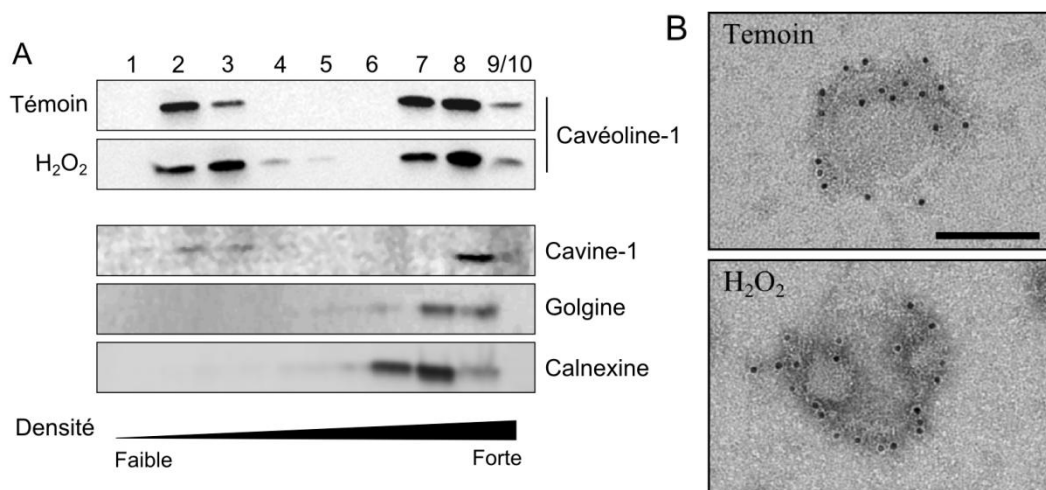


Figure 25 : Effet de l'H₂O₂ sur les cavéoles de myoblastes isolées par gradient de saccharose.

Les myoblastes ont été incubés pendant 1 h avec 500 μ M d'H₂O₂. Les extraits cellulaires ont été fractionnés grâce à une ultracentrifugation sur gradient discontinu de saccharose. Un Western-blot des fractions 1 à 10 a été réalisé avec des anticorps anti-cavéoline-1 (1/250000^{ème}), anti-cavine-1 (1/1000^{ème}), anti-golgine (1/1000^{ème}) et anti-calnexine (1/250^{ème}) (A). Une observation de la fraction 2 a été réalisée par microscopie électronique à transmission et la cavéoline-1 a été immunomarquée grâce à un anticorps anti-cavéoline-1 révélé par la protéine A couplée à de l'or colloïdal de 10 nm (B). Echelle = 100 nm.

Ces résultats indiquent qu'il est possible, à partir de myoblastes, d'isoler des fractions membranaires de faible densité qui ont une forme vésiculaire de taille correspondante à celle des cavéoles et enrichies en caveoline-1 et cavine-1. L'ensemble de ces résultats nous permet d'affirmer que nous isolons bien des cavéoles à partir de myoblastes.

Nous avons dans un deuxième temps, souhaité observer leur présence directement dans les myoblastes par MET. Comme le montre la Figure 26, des invaginations de la membrane plasmique ainsi que des vésicules intracellulaires avec un diamètre moyen de 60 nm sont clairement observées. Afin de confirmer leur nature, nous avons réalisé des immuno-marquages de la cavéoline-1. Nous pouvons alors clairement observer la présence de billes d'or sur ces structures, qu'elles soient associées à la membrane plasmique ou cytoplasmiques, montrant la présence de cavéoline-1 dans ces vésicules.

L'ensemble de ces résultats montrent pour la première fois que dans les myoblastes C2C12, la cavéoline-1 est capable de s'oligomériser et de former des cavéoles directement observables en MET et facilement isolables par gradient de saccharose.

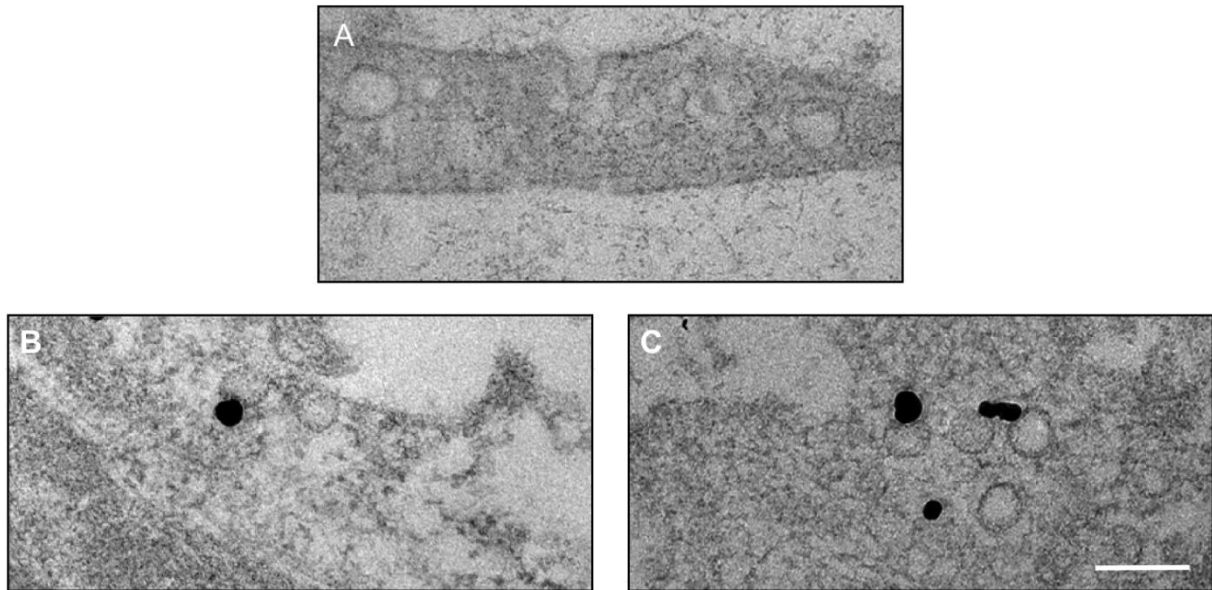


Figure 26 : Mise en évidence des cavéoles dans des myoblastes C2C12

Des myoblastes ont été observés par microscopie électronique à transmission (A). Un immuno-marquage de la cavéoline-1 a été réalisé par la technique de pré-inclusion utilisant une amplification à l'argent de l'or dit « ultra small » (B, C). Ces observations montrent la présence de vésicules membranaires ouvertes sur l'extérieur (B) ou cytosoliques (C) positives pour la cavéoline-1. Echelle = 100 nm

II. Effet de l'H₂O₂ sur l'organisation et la localisation intracellulaire des cavéoles

Comme évoqué précédemment, la cavéoline-1 est affectée par le traitement à l'H₂O₂ (Figure 21 et Figure 24). Cette protéine étant indispensable à la formation des cavéoles, nous avons souhaité déterminer si sa dégradation et/ou sa phosphorylation suite au traitement avait des conséquences sur la formation des cavéoles. Pour cela, des myoblastes ont été traités avec 500 µM d'H₂O₂ pendant une heure, les cavéoles ont été isolées par gradient de saccharose puis le taux de cavéoline-1 a été quantifié par Western blot dans les différentes fractions du gradient. Comme le montre la Figure 25 A, nous n'observons pas de différence significative dans la répartition de la cavéoline-1 au sein du gradient par rapport au témoin. En effet, il semble que la proportion de cavéoline-1 dans les fractions de faible densité soit la même entre les myoblastes témoins et traités. Ce résultat est identique pour les fractions de forte densité. Des aliquots de la fraction 2 du gradient ont été observés en MET et aucune différence notable de structure ou de marquage n'a pu être mise en évidence entre les cavéoles issues des myoblastes témoins et celles des myoblastes traités avec l'H₂O₂ (Figure 25 B).

En parallèle, des observations en microscopie à épifluorescence de la cavéoline-1 ont été réalisées et nous n'observons là non plus pas de différence notable de la localisation ou de l'intensité du marquage entre les myoblastes témoins et les myoblastes ayant subi un traitement H_2O_2 (Figure 27 A). Afin d'observer de manière spécifique l'effet de l' H_2O_2 sur les cavéoles localisées à la membrane plasmique, nous avons quantifié le taux relatif de cavéoline-1 localisée à la membrane plasmique à partir d'images de myoblastes réalisées en microscopie de fluorescence par TIRF (*Total Internal Reflexion Fluorescence*) (Figure 27 B). Brièvement, quand un faisceau d'excitation passe d'un milieu d'indice de réfraction n_1 (par exemple, une lamelle de verre) à un milieu d'indice de réfraction n_2 (par exemple des cellules), il existe un angle incident critique avec lequel il lui est impossible de se propager dans le second milieu et est totalement réfléchi dans le premier. Une onde évanescente est alors créée (dont l'intensité décroît de manière exponentielle avec la distance) et va exciter le fluorophore sur une distance qui est inférieure à 200 nm. Il est alors possible d'observer le fluorophore dans ce faible volume d'excitation proche de la lamelle de culture et contenant principalement la membrane plasmique. Des myoblastes ont été traités pendant 1 h avec 1 mM d' H_2O_2 puis nous avons réalisé un immuno-marquage de la cavéoline-1 par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Les myoblastes ont été observés par microscopie TIRF (Figure 27 B) puis nous avons quantifié le signal observé afin de déterminer la surface cellulaire présentant un marquage cavéoline-1 par rapport à la surface cellulaire totale (Figure 27 C). Nous pouvons alors constater que nous n'observons pas d'effet du traitement H_2O_2 sur la distribution de la cavéoline-1 à la membrane plasmique des myoblastes.

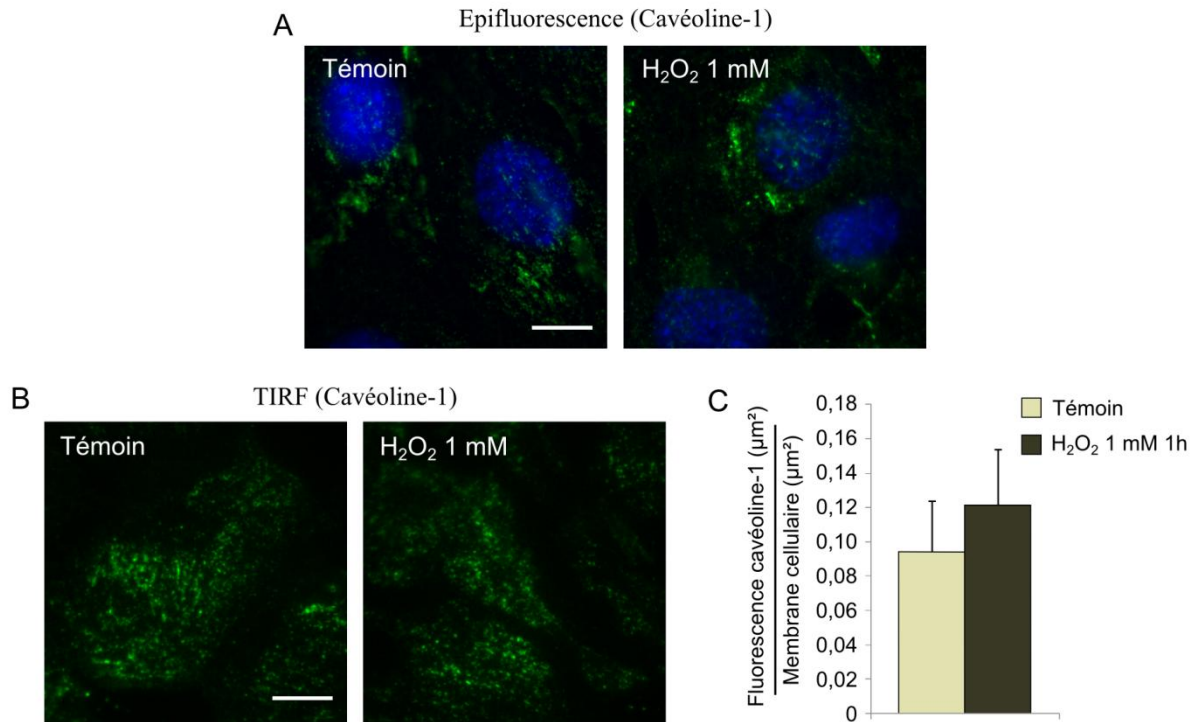


Figure 27 : Effet de l'H₂O₂ sur la localisation intracellulaire de la cavéoline-1

Les cellules ont été traitées pendant 1 h avec 1 mM d'H₂O₂. La localisation de la cavéoline-1 a été déterminée par immunofluorescence en microscopie à épifluorescence (A) ou en TIRF (B). Le ratio entre l'aire de la membrane marquée par la cavéoline-1 et la membrane cellulaire totale a été réalisé après analyse des images de TIRF (C). Echelle = 10 µm.

Ces résultats montrent que, bien que l'H₂O₂ induise une phosphorylation et une dégradation de la cavéoline-1, il ne semble pas avoir d'effet sur l'assemblage, la formation et la distribution des cavéoles à la membrane plasmique des myoblastes. Cependant, ce n'est pas parce que le processus de formation des cavéoles ne semble pas être affecté par le traitement que la fonction des cavéoles est toujours assurée. Nous avons donc par la suite étudié l'impact du traitement par l'H₂O₂ sur certaines fonctions connues des cavéoles.

III. Effet de l'H₂O₂ sur les fonctions des cavéoles

Parmi les différentes fonctions connues des cavéoles, nous avons décidé de nous intéresser à l'effet du stress oxydant sur deux d'entre elles : l'endocytose et la résistance au stress mécanique.

III 1 -Effet de l'H₂O₂ sur l'endocytose

Pour étudier l'effet du traitement H₂O₂ sur l'endocytose spécifique des cavéoles dans les cellules C2C12, l'internalisation du Bodipy[®] Lactosylcéramide a été quantifiée par cytométrie en flux (Figure 28 A). Nous avons utilisé cet analogue fluorescent des sphingolipides car il est spécifiquement endocyté par les cavéoles (Puri *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2005). Cependant, afin de nous assurer que c'était également le cas dans les myoblastes C2C12, l'inhibition sélective des différentes voies d'endocytose a été étudiée dans ce modèle.

Comme le montre la Figure 28 C, nous confirmons que :

- la génistéine, qui inhibe spécifiquement la voie des cavéoles (Wu *et al.*, 2012), réduit de manière significative l'endocytose du Bodipy[®] Lactosylcéramide ($37 \pm 0,8\%$ d'endocytose) ;
- la chlorpromazine, un inhibiteur de l'endocytose dépendante de la voie clathrine, n'a pas d'effet significatif sur l'internalisation du céramide ;
- la cytochalasine D, connue pour dépolymériser le réseau d'actine inhibe partiellement l'endocytose du Lactosylcéramide (63% du contrôle) ;
- si tous les mécanismes énergie-dépendants sont diminués par réduction de l'ATP disponible (en présence d'azide de sodium et de déoxyglucose), l'internalisation du Lactosylcéramide est très faible comparé aux cellules témoins montrant ainsi que son endocytose est un processus actif.

Afin de déterminer l'effet du stress oxydant sur l'endocytose par les cavéoles les myoblastes ont été traités à l'H₂O₂ puis l'internalisation du Bodipy[®] Lactosylcéramide a été quantifiée. Comme le montre la Figure 28 B, une diminution dose-dépendante de l'endocytose a pu être observée : 75 et 43% des cellules contrôles après addition de 500 et 1000 μ M d'H₂O₂, respectivement. Ces résultats indiquent clairement que l'endocytose par la voie cavéolaire est fortement altérée par le stress oxydant dans les myoblastes.

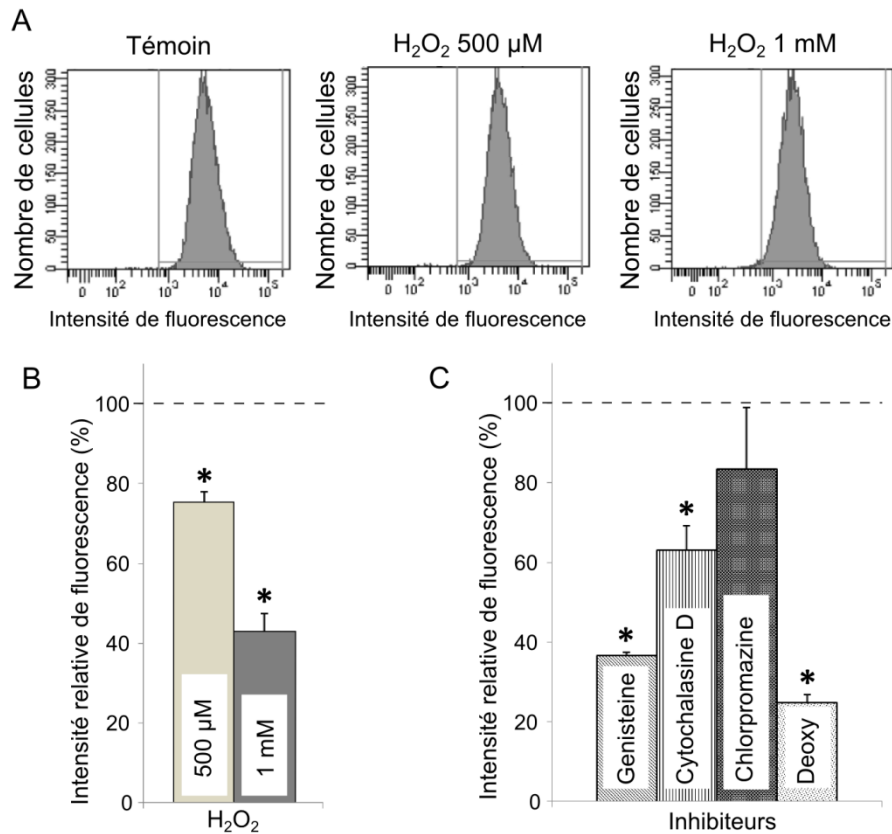


Figure 28 : Effet de l'H₂O₂ sur l'endocytose spécifique des cavéoles.

Les cellules ont été incubées en présence de 0,25 µM de Bodipy[®] Lactosylceramide après un traitement avec de l'H₂O₂ ou des inhibiteurs spécifiques des différentes voies d'endocytose. L'endocytose du Bodipy[®] Lactosylceramide a été quantifiée par cytométrie en flux ($\lambda_{ex}=488$ nm, $\lambda_{em}=530$ nm) (A). L'intensité de fluorescence moyenne est exprimée en pourcentage de fluorescence mesurée par rapport au témoin sans traitement (---) (B et C). * Significativement différent de l'échantillon témoin non traité ($P < 0,05$).

III 2 Effet de l'H₂O₂ sur la résistance à un stress mécanique

Comme l'ont montré Sinha *et al.*, les cavéoles peuvent jouer un rôle dans la régulation de la tension membranaire dans des conditions de choc osmotique (Sinha *et al.*, 2011). Des myoblastes soumis à un choc hypo-osmotique (30 mOsm) pendant 5 minutes sont en effet sujet à un gonflement cellulaire clairement observable en microscopie optique (Figure 29 A). Si les cellules sont conservées dans ce milieu hypo-osmotique, l'augmentation de la tension membranaire peut conduire à la rupture de la membrane des myoblastes. Ce phénomène a été quantifié au bout de 30 min par la technique de coloration des cellules au bleu Trypan (Figure 29 B). Dans des conditions d'osmolarité intermédiaire (150 mOsm), le gonflement cellulaire, suivi en microscopie, ne cause pas de dégât à la membrane des myoblastes après 30 minutes.

Afin d'étudier l'effet du stress oxydant sur cette fonction des cavéoles, les myoblastes ont été prétraités avec 500 μM d' H_2O_2 pendant 10 min avant d'être soumis au choc hypo-osmotique. La rupture membranaire (mesurée par la pénétration du colorant) augmente de 46% par rapport aux cellules non traitées avec l' H_2O_2 (Figure 29 B). Ce résultat suggère que les cavéoles n'assurent plus leur fonction de réserve de membrane dans les myoblastes soumis à un stress oxydant.

Afin de confirmer cela, les cellules ont été traitées avec 5 mM de méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) pendant 30 min avant de procéder au choc osmotique. Cette molécule couramment utilisée pour réduire le cholestérol membranaire a pour effet de structurer les cavéoles (Parpal *et al.*, 2001). Comme le montre la Figure 29 B, le traitement diminue fortement la résistance des membranes lors du choc hypo-osmotique, et dans des proportions similaires au traitement par l' H_2O_2 . Bien que la M β CD diminue le nombre de cavéoles, elle peut également avoir des effets sur des radeaux lipidiques autres que les cavéoles.

C'est pourquoi, la résistance membranaire au choc osmotique a été mesurée dans des myoblastes dont l'expression de la cavéoline-1 a été significativement réduite par ARN interférence (siRNA). Comme représenté Figure 29 C, le traitement par le siRNA spécifique de la cavéoline-1 diminue l'expression de la protéine de 80% environ. Dans ces conditions, et comme déjà montré dans la littérature, la stabilité des cavéoles est fortement endommagée (Patel *et al.*, 2007). Ces cellules ont été par la suite soumises au même choc hypo-osmotique : 30 mOsm pendant 30 min. Comme le montre la Figure 29 D, les cellules déficientes en cavéoline-1 sont significativement moins résistantes au gonflement (3,5 fois plus de cellules colorées au bleu Trypan). Un traitement avec 500 μM d' H_2O_2 de ces cellules n'a pas d'effet supplémentaire sur leur résistance membranaire lors du choc hypo-osmotique. Il est intéressant de noter que la résistance membranaire des cellules traitées avec un siRNA contrôle reste inchangée (Figure 29 B et D). En effet, comme dans les conditions témoins, l' H_2O_2 induit dans les cellules traitées avec un siRNA contrôle une augmentation du pourcentage de cellules colorées au bleu Trypan d'un facteur 1,4. La transfection des cellules n'affecte donc pas leur capacité à résister au stress mécanique.

L'ensemble de ces résultats confirme l'implication des cavéoles dans les fonctions de réserve de membrane pour résister à un stress mécanique sur notre modèle d'étude.

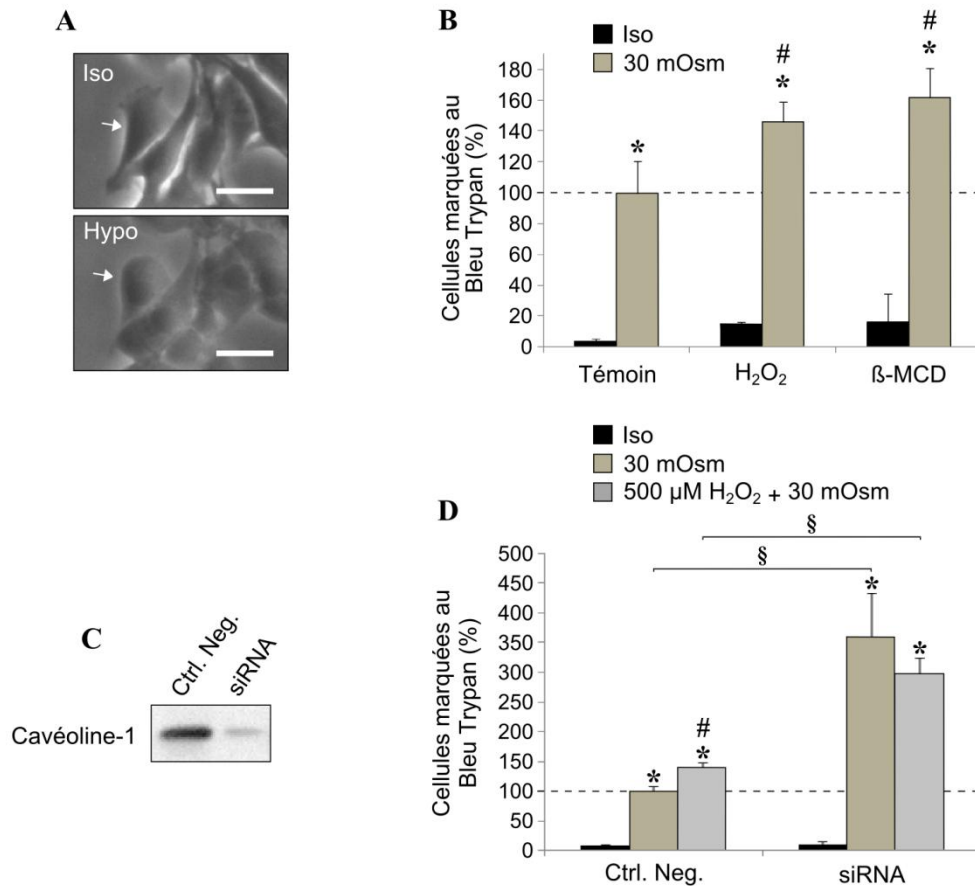


Figure 29 : Effet de l'H₂O₂ sur la résistance membranaire des myoblastes en condition de choc hypo-osmotique.

Les myoblastes sont placés dans des conditions iso- (300 mOsm) ou hypo-osmotiques (30 mOsm). Le gonflement cellulaire est observé dès 5 min par microscopie optique (A). Les cellules sont pré-incubées avec de l'H₂O₂ (500 μM) pendant 10 min ou de la MβCD dans des conditions iso- ou hypo-osmotiques pendant 30 min puis colorées au bleu Trypan (B). Les cellules ont été traitées avec un siRNA dirigé contre la cavéoline-1 ou un contrôle négatif. La diminution d'expression de la cavéoline-1 est confirmée par Western-blot (C). Les cellules exprimant moins de cavéoline-1 ont été pré-incubées avec 500 μM d'H₂O₂ pendant 10 min puis soumises à un choc hypo-osmotique (30 mOsm pendant 10 min) (D). Un minimum de 100 cellules a été compté par expérience et les cellules positives au bleu Trypan ont été exprimées par rapport aux cellules totales ayant subi le choc hypo-osmotique (--- dans B et D). * Significativement différent de l'échantillon iso-osmotique relatif (P < 0,05). # Significativement différent des cellules non traitées relatives (P < 0,05). § Significativement différent du contrôle négatif (P < 0,05). Echelle = 30 μm.

IV. Discussion

Dans la partie précédente, nous avons pu mettre en évidence une baisse significative de cavéoline-1 dans les myoblastes après induction d'un stress oxydant. D'autre part, l' H_2O_2 induit une phosphorylation rapide de la protéine. Nous nous sommes alors demandé si ces modifications de la cavéoline-1 pouvaient conduire à une diminution du nombre de cavéoles.

Malheureusement, nous n'avons pas été capables d'observer directement l'effet de l' H_2O_2 sur la densité membranaire des cavéoles par MET, comme cela a déjà été réalisé dans des cardiomyocytes (Kozera *et al.*, 2009). Les cavéoles étaient beaucoup trop dispersées à la membrane dans notre modèle pour obtenir des résultats représentatifs. Cependant, pour répondre à la question posée, une approche biochimique a été combinée à une observation par microscopie TIRF.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la capacité des cavéoles à s'organiser dans des cellules soumises à un stress oxydant. Les fractions contenant la cavéoline-1 ont été isolées par gradient de saccharose à partir de myoblastes traités avec l' H_2O_2 . La cavéoline-1 est présente dans les fractions de faible densité (fractions 2 et 3) du gradient et la co-localisation de la cavéoline-1 confirme qu'il s'agit bien de cavéoles (Figure 25). La présence d' H_2O_2 n'a pas d'effet sur la répartition de la cavéoline-1 dans le gradient de densité. Bien que ce résultat ne nous permette pas d'exclure que le taux relatif de cavéoles n'est pas modifié par l' H_2O_2 , il suggère que les cavéoles sont capables de s'assembler même en présence d' H_2O_2 . Des aliquots de la fraction 2 ont ensuite été observés par MET après un marquage de la cavéoline-1. L' H_2O_2 n'a pas d'effet sur la taille des vésicules et ne semble pas changer non plus le taux relatif de cavéoline-1 par cavéole (Figure 25 B). D'une façon surprenante, la taille des cavéoles observées en MET dans la fraction issue du gradient de saccharose est légèrement supérieure à celle attendue (environ 120 nm). Cette différence peut s'expliquer par le mode de préparation des membranes. En effet, les vésicules membranaires sont détachées grâce au Triton X100. Cependant, le détergent ne coupe pas nécessairement juste au niveau du cou des cavéoles, et emporte sans doute également une partie des membranes qui sont autour. De plus, dans les cellules, si deux cavéoles sont relativement proches comme observé sur la Figure 26, lorsque nous réalisons le gradient, ces cavéoles peuvent rester solidaires et ainsi former des vésicules de plus grande taille. D'autres auteurs ont déjà obtenu des résultats similaires dans des cellules 3T3 ou de l'endothélium de poumon de rat avec des diamètres de cavéoles allant jusqu'à 100 nm ou plus (Schnitzer *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 2009). Dans un second temps, nous avons réalisé des images de microscopie TIRF

afin de déterminer l'effet de l' H_2O_2 sur l'abondance relative de la cavéoline-1 à la membrane plasmique. La fluorescence spécifique de la protéine reste inchangée que les cellules soient traitées avec 1000 μM d' H_2O_2 pendant 1 h ou non (Figure 27 B et C). Il est intéressant de noter que le signal observé par microscopie TIRF est relativement intense, alors qu'un faible nombre de cavéoles avaient été observées par MET. Cette différence pourrait s'expliquer par la configuration des cavéoles elles-mêmes. En effet, selon certains auteurs, la cavéoline pourrait être présente à la membrane plasmique, associée avec des sphingolipides et du cholestérol, caractéristiques des cavéoles sans pour autant adopter leur forme caractéristique en omega (Lajoie *et al.*, 2009). Ces « flat » cavéoles nécessiteraient un signal d'activation pour acquérir cette configuration classique qui permet de les identifier facilement en microscopie électronique (Echarri *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces résultats indique que ni la dégradation de la cavéoline-1 ni sa phosphorylation induite par l' H_2O_2 n'ont de conséquences significatives sur l'assemblage et la localisation des cavéoles à la membrane plasmique contrairement à ce qui a pu être rapporté dans la littérature (Galbiati *et al.*, 1998; Miyawaki-Shimizu *et al.*, 2006). Cependant, le niveau d'expression de la cavéoline était fortement réduit dans ces études. Par conséquent, il est possible que la baisse que nous observons ici ne soit pas suffisante pour induire une diminution du nombre de cavéoles à la membrane. Nous nous sommes ensuite focalisés sur l'effet du stress oxydant sur deux fonctions des cavéoles : l'endocytose et la résistance à la tension membranaire.

Les lactosyl-céramides sont spécifiquement endocytés par les cavéoles (Puri *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2005). L'endocytose du Bodipy[®] couplé à un lactosyl-céramide a donc été mesurée par cytométrie en flux après un traitement à l' H_2O_2 . Les résultats montrent une diminution de la fluorescence intracellulaire associée à l'augmentation de la concentration en H_2O_2 (Figure 28). Comme le montre la Figure 28 C, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'endocytose via les cavéoles (génistéine) induit une diminution significative du signal de fluorescence dans les cellules. L'inhibition de la polymérisation de l'actine avec de la cytochalasine D entraîne une diminution partielle de l'endocytose du céramide (Figure 28 C). Ces résultats sont en accord avec le rôle important du réseau d'actine dans la régulation de l'endocytose médiée par les cavéoles (Simone *et al.*, 2014). D'après ces résultats, l'induction d'un stress oxydant altère l'endocytose via les cavéoles.

Une autre fonction des cavéoles décrite dans la littérature est celle de « réserve de membrane ». Cette fonction permettrait à la cellule de limiter la tension membranaire en

condition de stress mécanique (Kozera *et al.*, 2009; Sinha *et al.*, 2011). Dans nos expériences, nous avons testé l'effet du stress oxydant sur la résistance membranaire en conditions de choc hypo-osmotique. Des myoblastes ont été soumis à un choc hypo-osmotique et la rupture membranaire a été mesurée par pénétration du colorant bleu Trypan dans les cellules. Comme évoqué précédemment, les cavéoles sont capables « d'apporter » de la membrane aux cellules lorsque cela est nécessaire. Dans des myoblastes soumis à un choc osmotique limité (150 mOsm) par exemple, un gonflement des cellules est observé au microscope indiquant une résistance des cellules à la tension de la membrane plasmique. En revanche, une diminution de l'osmolarité du milieu de culture de 300 à 30 mOsm provoque une rupture des membranes plasmiques des myoblastes au bout de 30 min (Figure 29 C). Dans ces conditions, il est vraisemblable que le stress mécanique soit trop important pour que les cavéoles maintiennent l'intégrité membranaire des cellules. Quand les cellules sont pré-incubées pendant 10 min avec l' H_2O_2 , la rupture membranaire est significativement augmentée après 30 min de choc hypo-osmotique à 30 mOsm. Ce résultat suggère que l'intégrité des cavéoles et/ou leur nombre est affectée et qu'elles ne peuvent alors plus assurer une résistance mécanique suffisante. Des résultats similaires ont été obtenus avec la méthyl-beta-cyclodextrine, une molécule utilisée pour diminuer le nombre de cavéoles dans les cellules (Parpal *et al.*, 2001; Kozera *et al.*, 2009), ce qui confirme le rôle des cavéoles dans la résistance à la tension membranaire. Afin de valider l'effet observé avec la méthyl-beta-cyclodextrine, un contrôle plus spécifique a été réalisé. Nous avons inhibé l'expression de la cavéoline-1 en utilisant un siRNA dirigé contre la protéine. Comme le montre la Figure 29 C, l'expression de la cavéoline-1 est réduite de 80%. Dans ces conditions, les myoblastes sont trois fois plus sensibles au choc hypo-osmotique (Figure 29 D). De plus quand les cellules sont incubées avec de l' H_2O_2 avant le choc hypo-osmotique, le taux de cellules positives au bleu Trypan reste inchangé, suggérant que la rupture membranaire observée suite au choc hypo-osmotique peut être attribué en totalité à un défaut des cavéoles. Le stress oxydant altère donc de façon significative la capacité des cavéoles à maintenir l'intégrité membranaire en conditions de stress mécanique. (Figure 29 D).

L'ensemble de ces résultats indiquent que le stress oxydant aurait un effet délétère sur la fonction des cavéoles, alors qu'il ne semble pas modifier leur organisation ni leur densité cellulaire. En d'autres termes, les cavéoles seraient toujours présentes à la membrane des myoblastes soumis à un stress oxydant, mais la régulation de leur dynamique serait affectée par l' H_2O_2 .

Ce qu'il faut retenir

- Des cavéoles sont présentes à la membrane plasmique des myoblastes.
- L' H_2O_2 ne semble pas affecter le nombre de cavéoles/cavéoline-1 au niveau de la membrane plasmique des myoblastes.
- L' H_2O_2 diminue l'endocytose via les cavéoles et la capacité des cavéoles à maintenir l'intégrité de la membrane plasmique en cas de stress mécanique.

Partie III. Myotubes : Effets de l'H₂O₂ sur la cavéoline-3

La cavéoline-3 est exclusivement exprimée dans le muscle différencié, où elle participe au maintien de l'intégrité du sarcolemme ainsi qu'à la régulation de différentes voies de signalisation importantes pour la physiologie musculaire (Volonte *et al.*, 2003). La présence de la cavéoline-3 est absolument indispensable au bon développement du muscle squelettique. Comme décrit dans l'introduction, une déficience en cavéoline-3 entraîne l'apparition de nombreuses pathologies musculaires. Il a par exemple été montré que la mutation P104L diminue la différenciation des myoblastes en myotubes (Stoppani *et al.*, 2011b), soulignant ainsi l'importance de la cavéoline-3 dans les processus de formation du muscle squelettique. La sarcopénie s'accompagne d'une baisse importante de la masse et de la force musculaire. De nombreux facteurs (présentés dans l'introduction) sont incriminés. Par exemple, le défaut de couplage excitation-contraction, responsable de la baisse de force, serait causé par une dégénérescence de la jonction neuromusculaire et une dérégulation des flux calciques (Hezel *et al.*, 2010). D'une façon intéressante, les cavéoles sont intimement liées à ces mécanismes et pourraient par conséquent participer à l'apparition de la sarcopénie.

C'est dans ce contexte, qu'il a été décidé d'étudier l'effet de la principale cause du vieillissement au niveau cellulaire (les ERO) sur les cavéoles et la cavéoline-3 dans les cellules musculaires différenciées.

I. Présentation du modèle cellulaire

Les cellules musculaires de la lignée C2C12 sont des myoblastes issus de cellules satellites capables de se différencier *in vitro*. Au cours de ce processus, les myoblastes (cellules mononuclées) vont fusionner pour former des myotubes (cellules plurinuclées) (Figure 30).

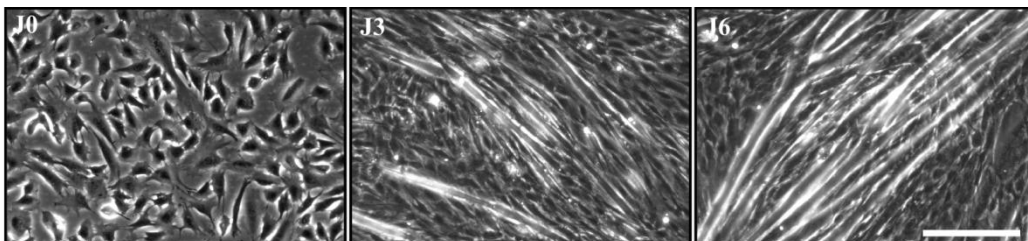


Figure 30 : Différenciation des myoblastes C2C12

La différenciation des myoblastes en myotubes est induite en appauvrissant le milieu de culture en sérum comme indiqué dans le matériel et méthodes (J0). La fusion va alors induire l'apparition de myotubes observés en microscopie optique à contraste de phase, 3 et 6 jours après l'induction de la différenciation (J3 et J6). Echelle : 200 μ m

Les myotubes obtenus possèdent toutes les caractéristiques du muscle squelettique différencié. En effet, 8 jours après l'induction de la différenciation, les myotubes présentent une organisation caractéristique des fibres musculaires en sarcomères, visualisée par un marquage de l' α -actinine (Figure 31 A). En microscopie électronique à transmission, l'organisation des filaments d'actine et de myosine est visible en coupe longitudinale après 10 jours de différenciation (Figure 31 B).

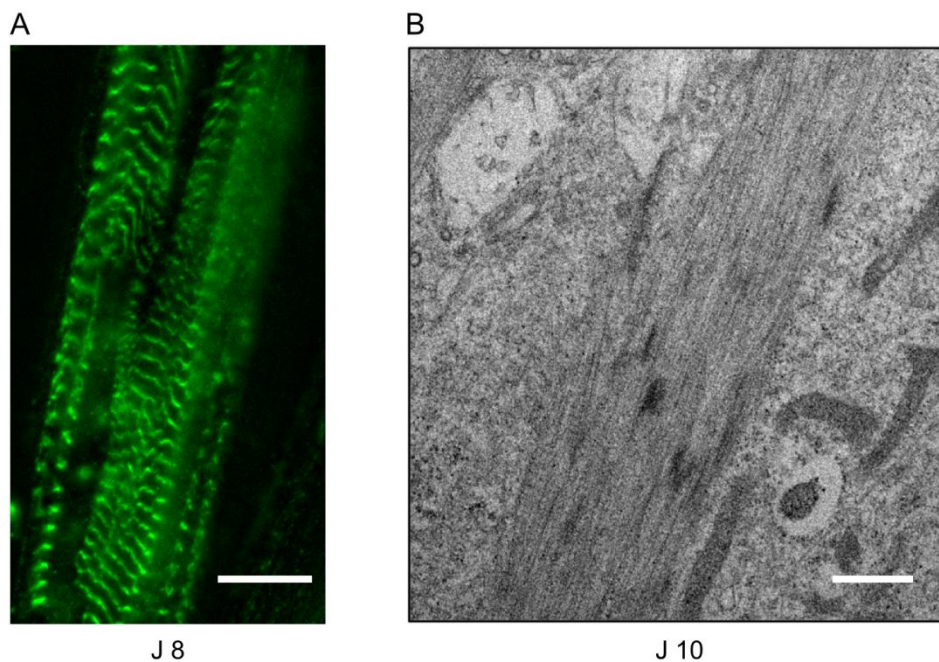


Figure 31 : Myotubes C2C12 après 8 et 10 jours de différenciation

A Immunomarquage de l' α -actinine réalisée sur des myotubes après 8 jours de différenciation. Après fixation et perméabilisation des cellules, l'anticorps anti- α actinine ($1/500^{\text{ème}}$) est appliqué comme indiqué dans le matériel et méthodes. Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$
B Image de microscopie électronique à transmission d'une coupe longitudinale d'un myotube après 10 jours de différenciation. Barre d'échelle = $0,5 \mu\text{m}$

Comme dans les fibres musculaires *in vivo*, la totalité des myoblastes C2C12 ne se différencie pas en myotubes et une partie de la population reste à l'état quiescent durant le processus (Stuelsatz *et al.*, 2010). L'ensemble des expériences présentées dans ce chapitre a été réalisé après 6 jours de différenciation. A ce stade, nous pouvons clairement observer par microscopie à épifluorescence que la cavéoline-1 est exclusivement exprimée dans les myoblastes et la cavéoline-3 dans les myotubes (Figure 32). Par conséquent, même si cette partie s'intéresse aux cavéoles dans les cellules différenciées, il est important de souligner

qu'il a été souvent difficile de s'affranchir des cavéoles présentes dans les cellules satellites qui sont soit des cellules quiescentes soit des cellules non encore fusionnées.

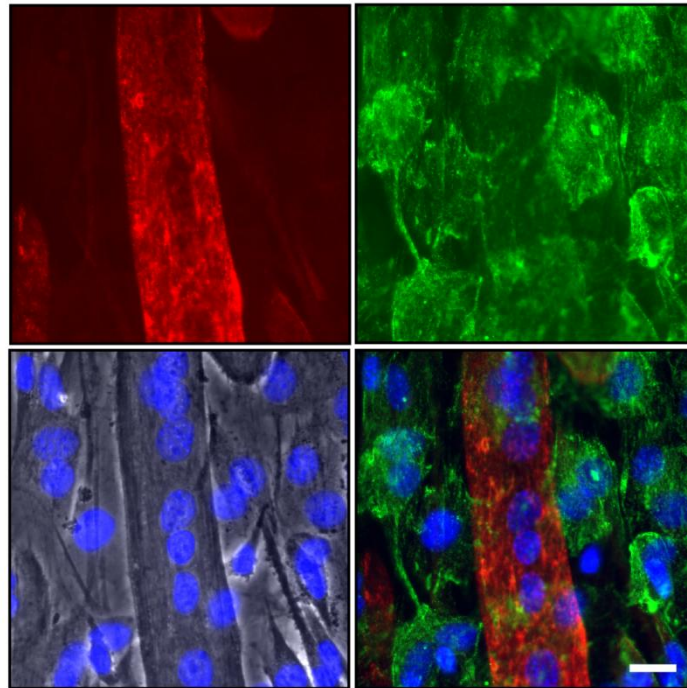


Figure 32 : Localisation de la cavéoline-1 et de la cavéoline-3 dans des cellules après 6 jours de différenciation

Après 6 jours de différenciation des cellules, un immuno-marquage de la caveoline-1 (1/300^{ème}, vert) et de la cavéoline-3 (1/300^{ème}, rouge) ont été réalisés et les noyaux cellulaires ont été colorés au Hoechst (1/1000^{ème}, bleu) comme décrit dans « matériels et méthodes ». Barre d'échelle = 20 μ m.

II. Effet de l' H_2O_2 sur le taux de cavéoline-3 dans les myotubes

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si un traitement des myotubes avec de l' H_2O_2 avait un effet sur la quantité de cavéoline-3. Pour cela, les cellules ont été incubées pendant différents temps (1 h à 6 h) avec l' H_2O_2 à des concentrations de 100, 250 ou 500 μM et le taux de cavéoline-3 a été quantifié par Western-blot. Dans ces conditions, l' H_2O_2 entraîne une diminution significative du taux de cavéoline-3 pour les doses les plus fortes utilisées (250 et 500 μM) (Figure 33 A).

Nous avons par la suite, souhaité caractériser si l'effet observé sur la cavéoline-3 pour des concentrations en H_2O_2 de 250 ou 500 μM était un processus rapide et observable dès 10 min comme dans le cas de la cavéoline-1. Comme le montre la Figure 33 B, au bout de 10 minutes, l' H_2O_2 n'a pas d'effet sur la quantité de cavéoline-3 dans les myotubes.

Par conséquent, la cavéoline-3 est sensible à un traitement à l' H_2O_2 tout comme la cavéoline-1 dans les myoblastes, mais de façon moins rapide. Comme démontré dans la première partie du manuscrit, la baisse de cavéoline-1 n'est plus observée en présence d'un inhibiteur du protéasome. Des myotubes à 6 jours de différenciation ont donc été incubés pendant 3 h avec 50 μM de MG132 puis pendant 1 h avec 500 μM d' H_2O_2 . Comme le montre la Figure 33 C, l'inhibiteur du protéasome prévient la diminution de la cavéoline-3 dans les cellules traitées.

Ces résultats montrent que la diminution de la cavéoline-3 observée après 1 h d'incubation avec l' H_2O_2 est vraisemblablement due à sa dégradation par la voie du protéasome.

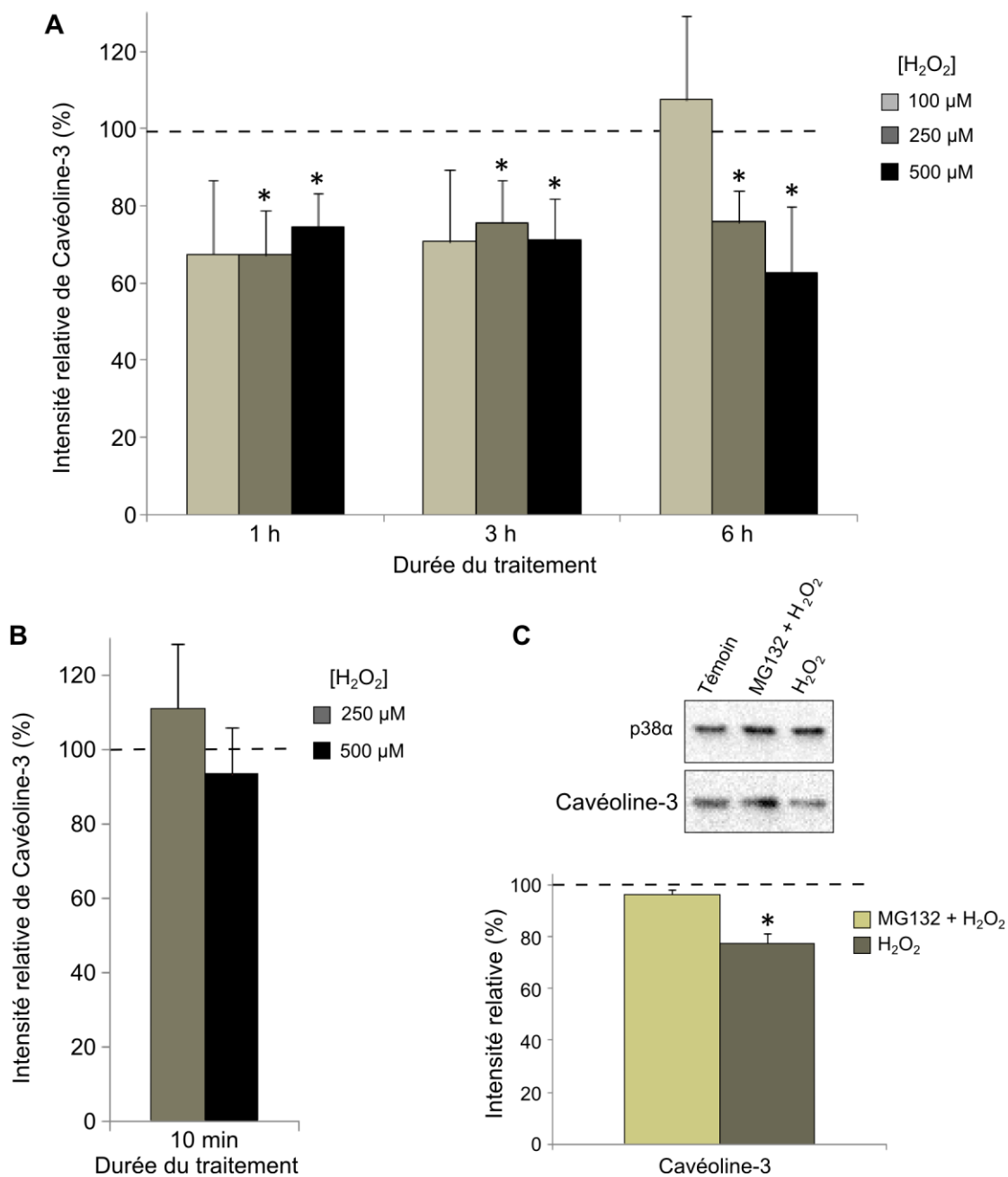


Figure 33 : Effet de l'H₂O₂ sur le taux de cavéoline-3 dans les myotubes.

A et B Des myotubes ont été traités avec 100, 250 ou 500 µM d'H₂O₂ pendant différents temps. Des extraits cellulaires (15 µg de protéines) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane Immobilon[®]. La détection immunologique a été réalisée grâce à des anticorps dirigés contre la cavéoline-3 (1/500^{ème}) et la p38α (1/500^{ème}). Le taux de cavéoline-3 est quantifié et exprimé en pourcentage relatif des cellules témoins sans traitement (---). *C* Les cellules ont été incubées pendant 3 h avec 50 µM de MG132 puis traitées 1 h avec 500 µM d'H₂O₂. Un Western-blot a été réalisé dans les mêmes conditions que *A* et *B*. * Significativement différent de l'échantillon témoin sans traitement ($P < 0,05$).

III. Effet de l'H₂O₂ sur la viabilité cellulaire

La toxicité de l'H₂O₂ sur les myotubes à 6 jours de différenciation a été mesurée grâce au réactif PrestoBlue[®] (voir Matériels et Méthodes). Les cellules ont été traitées pendant 3 ou 6 h avec 250 et 500 µM d'H₂O₂, doses entraînant une diminution significative de la cavéoline-3.

Le traitement a un effet significatif sur la viabilité quand les myotubes sont incubés pendant 6 h avec l'H₂O₂. Pour ce temps d'incubation, la toxicité est d'autant plus importante que la concentration en H₂O₂ est élevée (Tableau VI). Au bout de 3 h en revanche, l'effet de l'H₂O₂ sur la viabilité est beaucoup moins important (84,4 ± 3,1% de cellules viables avec 500 µM d'H₂O₂). Un traitement avec 1000 µM d'H₂O₂ a également été réalisé, mais il entraînait un décollement des myotubes du support de culture.

Tableau VI : Effet de l'H₂O₂ sur la viabilité cellulaire

H ₂ O ₂ (µM)	250		500	
	3 h	6 h	3 h	6 h
Viabilité (% total)	82,7	84,7*	84,4*	62,7*
SEM	8,6	7,6	3,1	4,8

*Des myotubes ont été traités avec 250 ou 500 µM d'H₂O₂ pendant 3 h ou 6 h. Les cellules ont été incubées avec le réactif PrestoBlue[®] puis la fluorescence de la molécule a été détectée ($\lambda_{ex}=560$ nm, $\lambda_{em}=590$ nm) afin d'avoir une valeur quantitative de la viabilité cellulaire. * Significativement différent de l'échantillon témoin sans traitement ($P<0,05$).*

L'H₂O₂ induit donc une dégradation de la cavéoline-3 dans les myotubes, dans des conditions où la viabilité cellulaire n'est pas (ou très peu) affectée (plus de 84,4% de cellules viables). Au bout de 3 h d'incubation avec 250 µM d'H₂O₂ par exemple, le niveau de cavéoline-3 atteint 76 ± 10% de celui observé pour les témoins alors que la viabilité cellulaire n'est absolument pas affectée (Figure 33 et Tableau VI). Il était donc important de savoir si dans ces conditions, un stress oxydant avait été généré dans les cellules.

IV. Effet de l' H_2O_2 sur l'accumulation d'ERO intracellulaires

Afin de mesurer l'accumulation d'ERO dans les cellules, nous avons utilisé la sonde fluorescente DCFDA (comme décrit dans le matériel et méthodes et Partie I). Des myotubes ont été traités avec $500 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 pendant 3 h et 6 h puis la fluorescence de la sonde a été quantifiée (Figure 34). Un temps d'incubation de 3 h n'entraîne pas d'accumulation d'ERO dans la cellule. En revanche, après 6 h avec l' H_2O_2 , nous observons une augmentation significative de l'intensité du signal d'un facteur 2,5 ($180 \times 10^3 \text{ UA}$ à $459 \times 10^3 \text{ UA}$). Avec une dose plus faible d' H_2O_2 ($250 \mu\text{M}$), des résultats similaires ont été obtenus au bout de 6 h. Cette augmentation de la fluorescence reflète une accumulation des ERO intracellulaires et donc l'apparition d'un stress oxydant.

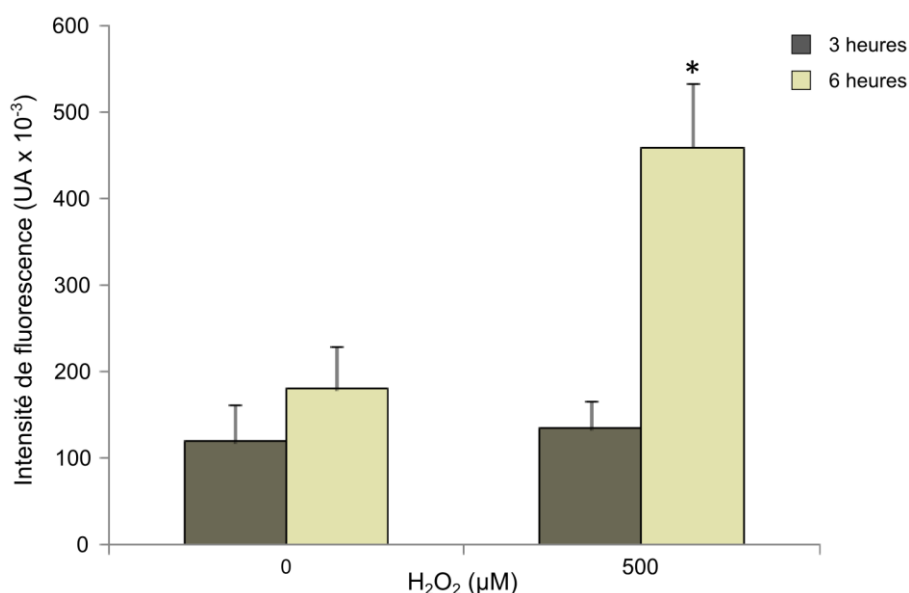


Figure 34 : Effet de l' H_2O_2 sur l'accumulation des ERO intracellulaires à 6 jours de différenciation

*Les cellules ont été traitées avec $500 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 pendant 3 ou 6 h puis l'accumulation d'ERO a été mesurée à l'aide de la sonde fluorescente DCFDA comme décrit dans « matériels et méthodes ». * Significativement différent de l'échantillon témoin non traité ($P < 0,05$).*

V. Effet de l' H_2O_2 sur la carbonylation des protéines

Les espèces réactives de l'oxygène dans les cellules peuvent avoir des effets délétères et engendrer au niveau des protéines, des modifications irréversibles comme leur carbonylation.

Nous avons donc vérifié si dans nos conditions, l'H₂O₂ avait un effet sur le taux de carbonylation des protéines. Les cellules à 6 jours de différenciation ont été incubées 3 h ou 6 h en présence de 250 µM ou 500 µM d'H₂O₂. Étonnamment, la concentration des protéines carbonylées reste inchangée et ce, quelles que soient la concentration en H₂O₂ utilisée ou le temps d'incubation (Tableau VII).

Par conséquent, alors que l'H₂O₂ induit l'apparition d'un stress oxydant, il ne semble pas avoir d'effet sur la carbonylation des protéines (dans les mêmes conditions).

Tableau VII : Effet de l'H₂O₂ sur le taux de carbonyls dans les myotubes

H ₂ O ₂ (µM)	0		250		500	
Temps	3 h	6 h	3 h	6 h	3 h	6 h
Taux de carbonyls (nmol/mg)	2,46	2,35	2,28	2,35	2,41	2,92
SEM	0,19	0,23	0,33	0,38	0,09	0,32

*Les cellules ont été traitées avec 250 ou 500 µM d'H₂O₂ pendant 3 ou 6 h puis le taux de protéines carbonylées a été mesuré à l'aide du DNPH comme décrit dans matériels et méthodes. * Significativement différent de l'échantillon témoin non traité (P < 0,05).*

VI. Effet préventif d'un anti-oxydant naturel : l'Oligopin[®]

Comme nous venons de le voir, l'H₂O₂ induit une dégradation de la cavéoline-3 sans engendrer d'augmentation de la carbonylation des protéines. Par conséquent, afin de s'assurer que l'effet observé est bien dû au stress oxydant, l'action préventive d'un antioxydant naturel (Oligopin[®]) a été étudiée.

Après 6 jours de différenciation, les cellules ont été incubées pendant 24 h avec 50 µg/ml d'Oligopin[®] puis l'H₂O₂ a été ajouté au milieu de culture. La viabilité cellulaire et le niveau d'expression de la cavéoline-3 ont alors été mesurés.

Après avoir vérifié qu'une incubation de 50 µg/ml d'Oligopin[®] seul n'induisait pas de mort cellulaire, la viabilité cellulaire a été mesurée en présence de 500 µM d'H₂O₂ pendant 3 h. Lorsque les cellules sont pré-incubées avec l'antioxydant, la viabilité observée après 3 h avec 500 µM d'H₂O₂ n'est plus significativement différente des conditions témoins (87,1 ±

10,7%). L'Oligopin® a donc un effet protecteur vis à vis de l'H₂O₂ dans les cellules musculaires différenciées.

Par la suite, l'effet d'un traitement préventif à l'Oligopin® a été étudié sur la dégradation de la cavéoline-3. Les mêmes conditions que précédemment ont été utilisées et la quantité de cavéoline-3 a été dosée par Western-blot. Comme le montre la Figure 35, lorsque les myotubes sont incubés pendant 24 h avec 50 µg/ml d'Oligopin® avant d'être traités pendant 3 h avec 500 µM d'H₂O₂, la quantité de cavéoline-3 passe de 62 ± 10% à 89 ± 13%. L'Oligopin® seul n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de la cavéoline-3 (Figure 35).

Ces résultats montrent qu'un traitement à l'Oligopin® prévient la dégradation de la cavéoline-3

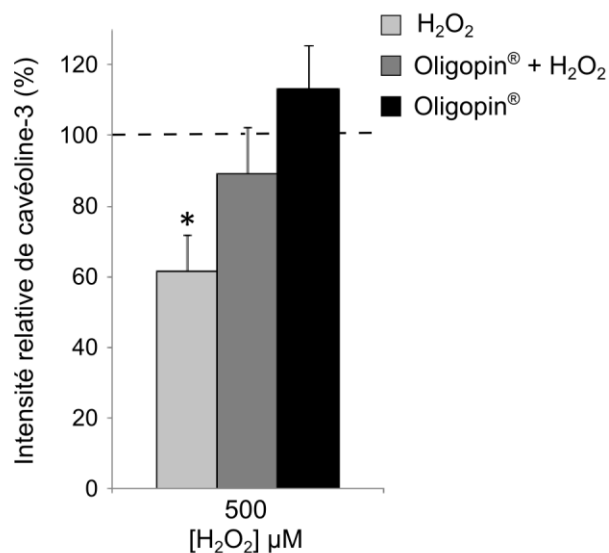


Figure 35 : Effet d'un traitement à l'Oligopin® sur la baisse du niveau d'expression de la cavéoline-3 induite par l'H₂O₂ dans les myotubes

*Des myotubes ont été incubés pendant 24 h avec 50 µg/ml d'Oligopin®. Les cellules ont ensuite été traitées avec 500 µM d'H₂O₂ pendant 3 h. Des extraits cellulaires (15 µg de protéines) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane Immobilon®. La détection immunologique a été réalisée grâce à des anticorps dirigés contre la cavéoline-3 (1/500^{ème}) et la p38α (1/500^{ème}). Le taux de cavéoline-3 est quantifié et exprimé en pourcentage par rapport aux des cellules témoins sans traitement (---). * Significativement différent de l'échantillon témoin sans traitement (P<0,05).*

VII. Discussion

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence que la cavéoline-3 est sensible à un traitement H_2O_2 . La protéine est en effet dégradée en réponse à l'ajout d' H_2O_2 dans les myotubes. Comme pour la cavéoline-1 dans les myoblastes, la dégradation de la cavéoline-3 dans les myotubes serait due au protéasome car l'utilisation d'un inhibiteur de cette voie protéolytique (MG132) prévient la diminution de la protéine observée en présence d' H_2O_2 . Actuellement dans la littérature, peu d'articles s'intéressent à l'effet de l' H_2O_2 sur la cavéoline-3. En revanche, des études menées dans le muscle lisse de vessie de rat ont montré une diminution de la quantité de cavéoline-3 au cours du vieillissement (Lowalekar *et al.*, 2012). L'ensemble de ces données renforcent notre hypothèse selon laquelle le stress oxydant pourrait moduler la voie des cavéoles au cours du vieillissement musculaire.

D'après les résultats de viabilité cellulaire, la cavéoline-3 est sensible à des doses d' H_2O_2 qui ne sont pas (ou peu) cytotoxiques (Tableau VI). D'une façon surprenante, les cellules différenciées semblent plus sensibles à l' H_2O_2 que les myoblastes en prolifération. Par exemple, un traitement de 3 h avec 500 μM entraîne une mortalité de 15% environ à 6 jours de différenciation, alors que les cellules en prolifération ne sont pas affectées.

Par la suite l'effet de l' H_2O_2 sur le taux d'ERO intracellulaires a été quantifié. Dans les myotubes, l'ajout d' H_2O_2 induit une augmentation d'ERO relativement modeste par rapport à celle observée dans les myoblastes (2,5x contre 6x). D'autre part, la dose d' H_2O_2 utilisée n'a pas d'effet sur l'accumulation d'ERO puisque les valeurs obtenues sont identiques après un traitement avec 250 ou 500 μM . Les myotubes sont des cellules différenciées contenant un nombre de mitochondries élevé (Remels *et al.*, 2010). Ils sont en conséquence largement exposés à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et possèdent vraisemblablement un équipement anti-oxydant très développé (Won *et al.*, 2012). En parallèle, la mesure du taux de carbonyl a été réalisée et le traitement des myotubes à l' H_2O_2 ne semble pas induire de modification au niveau des protéines. Ce résultat confirme que l' H_2O_2 a un effet limité sur les myotubes. Cependant, le protocole utilisé dans cette étude nous donne accès à un niveau global de carbonylation dans la cellule. D'après certains auteurs, les protéines myofibrillaires, protéines majoritaires des myotubes, seraient peu sensibles à l'oxydation (Valls *et al.*, 2014). Par conséquent ces résultats doivent être analysés avec précaution. Ceci étant, il apparaît que la cavéoline-3 est dégradée suite à l'ajout d' H_2O_2 dans les myotubes dans des conditions où le stress oxydant est relativement limité Afin de confirmer que l' H_2O_2 est bien responsable de la dégradation de la cavéoline-3, nous avons utilisé un antioxydant naturel : l'Oligopin[®]. Son

utilisation en traitement préventif, permet de prévenir la dégradation de la cavéoline-3 en réponse à l'ajout de l' H_2O_2 . Ces résultats suggèrent que la cavéoline-3 pourrait être une cible privilégiée de l'oxydation dans les myotubes.

Ce qu'il faut retenir

- L' H_2O_2 induit la dégradation de la cavéoline-3 dans les myotubes par la voie du protéasome.
- La dégradation de la cavéoline-3 est observée dans des cellules viables.
- L' H_2O_2 induit une accumulation limitée des ERO dans les myotubes.
- L' H_2O_2 n'induit pas d'augmentation du taux de carbonylation des protéines dans les myotubes.
- L'utilisation d'un antioxydant naturel prévient la dégradation de la cavéoline-3 observée en présence d' H_2O_2 .

Partie IV. Myotubes : Effets de l'H₂O₂ sur les cavéoles

I. Effet de l'H₂O₂ sur l'organisation et la localisation des cavéoles

I 1 Effet de l'H₂O₂ sur l'organisation des cavéoles

Comme décrit précédemment, la cavéoline-3 est sensible à l'H₂O₂. La capacité de la cavéoline-3 à former des cavéoles en présence d'H₂O₂ a donc été testée. Pour cela, les cavéoles ont été isolées sur gradient de saccharose en présence de triton à partir de cellules à 6 jours de différenciation incubées 1 h avec 500 µM d'H₂O₂. La répartition de la cavéoline-3 dans ce gradient a été visualisée par Western-blot.

Dans les cellules témoins, la majorité de la cavéoline-3 se trouve dans les fractions de faible densité (fractions 1 à 4) (Figure 36). Après une incubation d'1 h avec 500 µM d'H₂O₂, une relocalisation de la cavéoline-3 dans les fractions les plus denses est observée (Figure 36). Ce changement de répartition dans le gradient suggère une moindre association de la cavéoline-3 avec le cholestérol et les sphingolipides comparativement aux témoins. En d'autres termes, ce résultat évoque une diminution de la capacité de la cavéoline-3 à former des cavéoles. Dans les myotubes, l'H₂O₂ induirait donc une diminution du nombre de cavéoles.

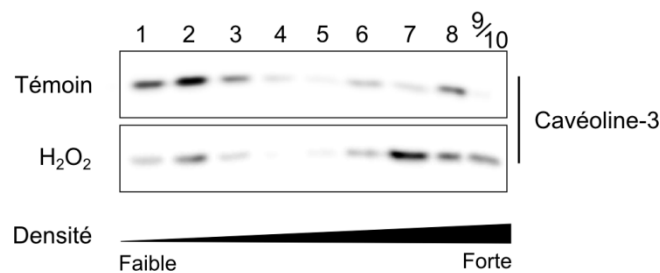


Figure 36 : Effet de l'H₂O₂ sur la répartition de la cavéoline-3 après ultracentrifugation sur gradient de saccharose

Les myotubes ont été incubés pendant 1 h avec 500 µM d'H₂O₂. Les extraits cellulaires ont été fractionnés grâce à un gradient discontinu de saccharose. Un Western-blot des fractions 1 à 10 a été réalisé avec des anticorps anti-cavéoline-3 (1/500^{ème}).

I 2 Effet de l'H₂O₂ sur le taux de cavine-4 dans les myotubes

Les cavines sont impliquées dans la stabilisation des cavéoles à la membrane plasmique, nous nous sommes alors intéressés à l'isoforme des cavines spécifique du muscle : la cavine-4 (Tagawa *et al.*, 2008; Bastiani *et al.*, 2009).

Après 6 jours de différenciation, les cellules ont été traitées pendant 1 h ou 3 h avec 250 ou 500 µM d'H₂O₂. Des Western-blot ont alors été réalisés pour quantifier le niveau d'expression de la cavine-4. Après un traitement avec 250 µM d'H₂O₂ pendant 1 h, la quantité de cavine-4 dans les myotubes n'est pas différente de celle des cellules témoins. L'effet devient significatif pour un temps de traitement plus long. En effet, après 3 h d'incubation avec 250 µM d'H₂O₂, le taux de cavine-4 atteint 80 ± 5% des témoins (Figure 37). Après un traitement avec 500 µM d'H₂O₂, la quantité de cavine-4 diminue dès 1 h avec un taux de cavine-4 qui n'est plus que de 77,1 ± 7% par rapport aux témoins. Cette diminution s'accroît avec le temps puisque au bout de 3 h ce taux passe à 67 ± 8% (Figure 37).

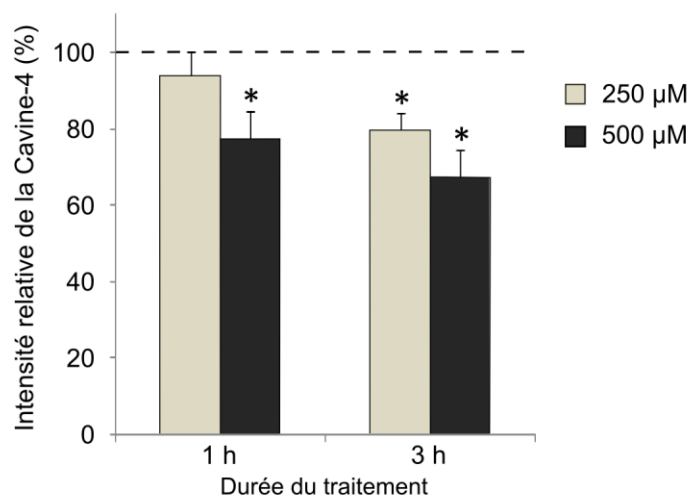


Figure 37 : Effet du traitement à l'H₂O₂ sur le taux de cavine-4 dans les myotubes à 6 jours de différenciation

*Des myotubes ont été traités avec 250 ou 500 µM d'H₂O₂ pendant 1 h ou 3 h. Des extraits cellulaires (15 µg de protéines) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane Immobilon[®]. La détection immunologique a été réalisée grâce à des anticorps dirigés contre la cavine-4 (1/200^{ème}) et la p38α (1/500^{ème}). Le taux de cavine-4 est quantifié et exprimé en pourcentage par rapport aux cellules témoins sans traitement (---). * Significativement différent de l'échantillon témoin sans traitement (P < 0,05).*

Le complexe cavine étant indispensable à la stabilisation des cavéoles à la membrane plasmique, ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l' H_2O_2 induirait une diminution du nombre de cavéoles dans les myotubes.

I 3 Effet de l' H_2O_2 sur la distribution intracellulaire de la cavéolin-3 dans les myotubes

D'après les résultats ci-dessus, l' H_2O_2 pourrait diminuer le nombre de cavéoles à la membrane des myotubes. Afin de confirmer cette hypothèse, un comptage des cavéoles par MET dans les myotubes avant et après traitement avec l' H_2O_2 a été envisagé. Des expériences similaires ont en effet déjà été menées avec succès dans d'autres types cellulaires où les auteurs ont montré une diminution des cavéoles après un choc hypo-osmotique ou un traitement par la méthyl- β -cyclodextrine (Kozera *et al.*, 2009; Sinha *et al.*, 2011). Cependant, bien que les cavéoles aient pu être mises en évidence dans des myotubes après 6 jours de différenciation (Figure 38), aucune différence notable n'a été observée après incubation avec l' H_2O_2 dans l'état actuel de nos travaux.

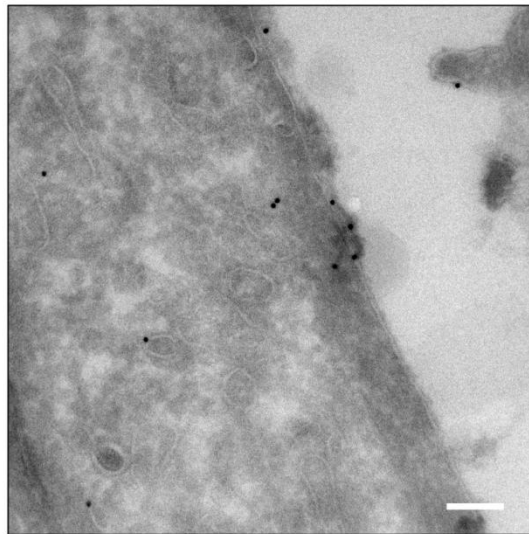


Figure 38 : Observation de myotubes en microscopie électronique à transmission

Des myotubes ont été observés par microscopie électronique à transmission. Un immunomarquage de la cavéoline-3 a été réalisé par la technique de Tokuyasu comme décrit dans le matériel et méthodes. Echelle = 100 nm

La localisation intracellulaire de la cavéoline-3 a également été déterminée par microscopie confocale. Pour cela, des myotubes à 6 jours de différenciation ont été immunomarqués avec des anticorps contre la cavéoline-3. Comme le montre la Figure 39, la présence

d'H₂O₂ ne modifie pas de façon significative le signal spécifique de la protéine. Des co-marquages avec la golgine (protéine marqueur de l'appareil de Golgi) et la calnexine (protéine marqueur du réticulum endoplasmique) ont aussi été réalisés dans le but de déterminer si le traitement à l'H₂O₂ pouvait induire des changements de localisation de la cavéoline-3 au sein des myotubes. Aucun résultat significatif n'a pu être mis en évidence.

Ces résultats ne nous permettent donc pas de conclure quant à l'effet de l'H₂O₂ sur une diminution potentielle des cavéoles membranaires ou un éventuel changement de localisation de la cavéoline-3 au sein des myotubes en réponse à l'ajout d'H₂O₂.

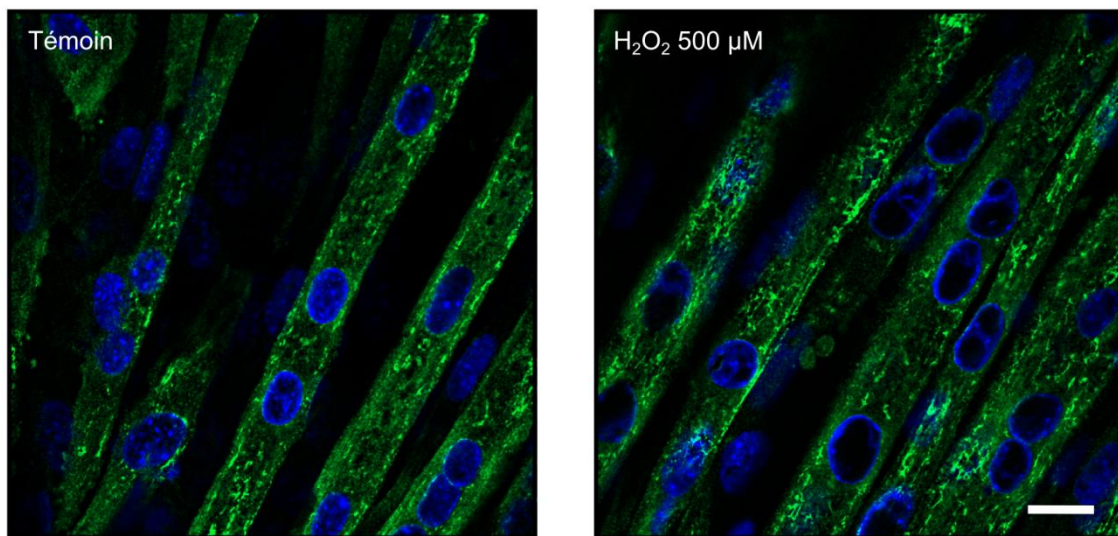


Figure 39 : Effet de l'H₂O₂ sur la localisation intracellulaire de la cavéoline-3

Des myotubes à 6 jours de différenciation traités avec 500 µM d'H₂O₂ pendant 3 h ont été observés en microscopie confocale. Après fixation et perméabilisation des cellules, l'immunomarquage a été réalisé comme indiqué dans le matériel et méthodes. Une coloration des noyaux cellulaires a été réalisée au Hoechst. Barre d'échelle = 20 µm.

II. Effet de l'H₂O₂ sur les fonctions des cavéoles

De la même façon que dans les myoblastes, des tests de fonctionnalité des cavéoles ont été entrepris dans les cellules à 6 jours de différenciation. Cependant, nous avons été confrontés à des limites techniques exposées ci-dessous.

II 1 Effet de l'H₂O₂ sur l'endocytose caveoles-dépendante

Tout d'abord, l'impact de l'H₂O₂ sur l'endocytose via les cavéoles a été étudié. Dans les myoblastes, l'internalisation du Bodipy[®]Lactosylceramide, spécifiquement endocyté par la voie des cavéoles, avait été mesurée par cytométrie en flux. Or, les myotubes après 6 jours de

différenciation ont une traîle trop importante pour être analysés par le cytomètre que nous utilisons. L'endocytose du Bodipy[®] Lactosylceramide a donc été quantifiée par microscopie de fluorescence. Les myotubes ont été incubés avec l'H₂O₂ (500 μM, 3 h) puis 0,25 μM de Bodipy-Lactosylceramide ont été ajoutés. Les cellules ont été observées par microscopie à épifluorescence à un grossissement x 100 (Figure 40). L'intensité de fluorescence au sein des myotubes a été quantifiée grâce au logiciel ImageJ. Sur les images obtenues, les zones correspondantes à des myotubes ont été sélectionnées. La fluorescence de ces objets a alors été quantifiée puis ramenée à une unité de surface. Le marquage entre les myotubes n'étant pas homogène, nous obtenions des incertitudes importantes sur nos mesures. Il est par conséquent très difficile de conclure quant à l'effet de l'H₂O₂ sur l'endocytose dans ces conditions.

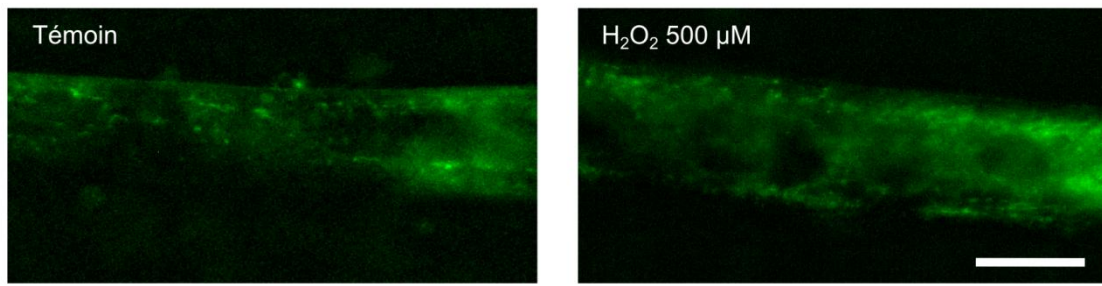


Figure 40 : Effet de l'H₂O₂ sur l'internalisation du Bodipy[®] Lactosylcéramide dans les myotubes

L'H₂O₂ a été incubé pendant 3 h puis l'internalisation du Bodipy[®] Lactosylcéramide a été visualisée et quantifiée par microscopie de fluorescence sur cellules vivantes à 4°C. Echelle = 20 μm

Certains auteurs ont utilisé la cytométrie en flux pour quantifier la nécrose et l'apoptose dans les myotubes (Munoz *et al.*, 2010), par conséquent il serait intéressant de se placer dans leurs conditions expérimentales afin de mesurer l'endocytose du Bodipy[®] Lactosylcéramide.

II 2 Effet de l'H₂O₂ sur la résistance à un stress mécanique

L'effet de l'H₂O₂ sur la fonction de « réserve de membrane » des cavéoles a été étudié dans les myotubes. Des myotubes à 6 jours de différenciation ont été traités avec 500 μM d'H₂O₂ pendant 3 h puis un milieu hypo-osmotique à 30 mOsm a été ajouté pendant 10 min. Les cellules ont ensuite été décollées à l'aide de la trypsine et incubées avec le bleu Trypan.

Malheureusement, la trypsine affecte l'intégrité des myotubes, il n'était donc plus possible de les compter.

Une deuxième approche, inspirée de Sinha *et al.*, a été développée sur cellules vivantes. Pour cela, les myotubes ont été traités avec 500 μM d' H_2O_2 pendant 3 h puis 1 μM de calcéine-AM a été incubé pendant 20 min. La calcéine-AM traverse les membranes cellulaires et son groupement acetoxymethyle ester (AM) subit une hydrolyse par les estérases cellulaires. La molécule devient alors fluorescente, marquant ainsi les cellules. L'objectif de cette technique était de mesurer la « fuite » de fluorescence dans les cellules en condition de choc hypo-osmotique due à la rupture de leur membrane plasmique. Pour cela, les myotubes ont été placés dans une chambre d'incubation (atmosphère à 5% de CO_2 et à 37°C) sous l'objectif du microscope et la variation de fluorescence de la calcéine a été enregistrée toutes les 20 secondes pendant les 10 min du choc hypo-osmotique (30 mOsm). Contrairement à nos attentes, l'intensité du signal de fluorescence ne présentait aucune variation au cours du temps lorsque les myotubes étaient incubés avec de l' H_2O_2 . La principale difficulté de cette approche est que, contrairement au myoblastes, lorsque les myotubes sont soumis au choc hypo-osmotique, nous n'observons pas d'augmentation de leur volume mais l'apparition de « bulles » en périphérie. Ce phénomène ayant lieu sur toute la surface des myotubes, le signal que nous observons ne correspond pas à la diminution de la calcéine due à sa « fuite » mais à l'apparition de ces « bulles » qui augmentent le volume intracellulaire et dilue l'intensité de fluorescence. Par conséquent, ce protocole expérimental ne semblait pas le mieux adapté pour mesurer de façon précise la résistance des membranes au stress osmotique.

II 3 Effet de l' H_2O_2 sur la composition des cavéoles

II 3 a) Composition protéique

Comme mentionné dans l'introduction, les cavéoles (cavéolines) sont impliquées dans la régulation de nombreuses voies de signalisation. L'interaction des cavéolines avec des protéines régulatrices (récepteurs, protéines kinases...) joue un rôle primordial dans ces processus. L'identification de variations d'interaction de la cavéoline-3 avec certaines de ces protéines lors d'un stress oxydant pourrait donc nous orienter vers les voies de signalisation modulées par les cavéoles en réponse au stress.

Pour cela, un protocole d'immuno-précipitation de la cavéoline-3 à partir de myotubes a été développé. Les résultats obtenus à ce jour montrent que la cavéoline-3 est correctement

immuno-précipitée. En effet, comme le montre la Figure 41, la cavéoline-3 n'est pas détectée lorsque nous réalisons l'immuno-précipitation avec un anti-corps anti isotype (IgG1). Cependant les conditions permettant de co-précipiter les partenaires de la protéine sont encore à mettre au point. Une approche consistant à cross-linker les protéines *in situ* afin de stabiliser les interactions entre la cavéoline-3 et ses partenaires est actuellement développée.

A terme, ces expériences devraient nous permettre de déterminer l'évolution des « interactants » de la cavéoline-3 en réponse à l' H_2O_2 .

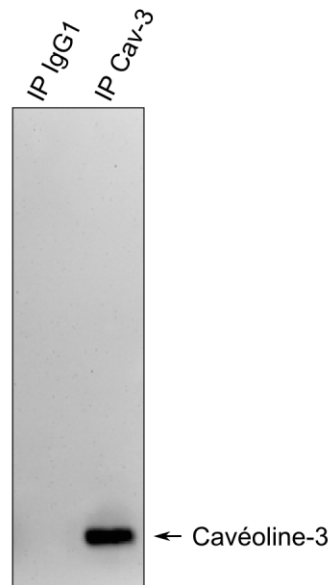


Figure 41 : Immunoprécipitation de la Cavéoline-3

Après 6 jours de différenciation, la cavéoline-3 a été immuno-précipitée comme décrit dans le matériel et méthodes. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférés sur membrane Immobilon[®]. La détection immunologique a été réalisée grâce à des anticorps dirigés contre la cavéoline-3.

II 3 b) Composition lipidique

Dans la littérature récente est soulignée l'importance de l'organisation lipidique des cavéoles dans la régulation de la signalisation intracellulaire et même dans la résistance au stress mécanique. Selon certains auteurs, les cavéoles pourraient se comporter comme des régulateurs de la structure et de la fonction des membranes plasmiques. Ariotti *et al.* ont récemment montré par exemple qu'une diminution de cavéoline-1 altère le profil lipidique cellulaire avec des conséquences importantes sur la voie de signalisation de H-Ras. Dans les cellules endothéliales, l'application d'un stress mécanique entraîne un changement rapide de l'état « ordonné » à l'état « désordonné » des domaines membranaires cavéolaires. Ce

changement du degré d'organisation des lipides dans la membrane des cavéoles serait impliqué dans la régulation de la méchanotransduction (Yamamoto et Ando, 2012).

Afin d'étudier l'effet potentiel du stress oxydant sur la composition lipidique des cavéoles, une étude par spectrométrie de masse sur des fractions cavéolaires obtenues par gradient de saccharose est en cours au laboratoire.

III. Discussion

Dans les myotubes, l'extraction des cavéoles sur gradient de saccharose semble indiquer que l' H_2O_2 a un effet sur l'association de la cavéoline-3 avec les cavéoles (Figure 36). La protéine semble en effet moins apte à former des vésicules de faible densité (cavéoles). Afin de compléter cette information, nous avons quantifié l'effet de l' H_2O_2 sur le taux de cavine-4. Associée aux cavéoles à la membrane, elle est fortement exprimée dans le muscle squelettique (Bastiani *et al.*, 2009). Comme le montre la Figure 37, l'ajout d' H_2O_2 aux myotubes induit une diminution de la quantité de cavine-4 ce qui laisse suggérer un effet sur le nombre de cavéoles membranaires. Dans le cas de cavéolinopathies, comme la maladie des muscles ondulants, il a été montré que les patients ont des fibres présentant un défaut d'expression de la cavéoline-3 à la membrane, une absence de cavéoles ainsi qu'un profil d'expression de la cavine-4 identique à celui de la cavéoline-3 (Kubisch *et al.*, 2003 ; Bastiani *et al.*, 2009). Dans notre modèle, une baisse de cavéoline-3 et de cavine-4 est observée, ce qui pourrait signifier une réduction de la densité des cavéoles à la membrane plasmique.

Afin de confirmer cette hypothèse, la localisation intracellulaire de la cavéoline-3 a été observée en microscopie confocale. L'immunomarquage de la protéine que nous avons obtenu est semblable à celui observé par Parton *et al.* dans des myotubes C2C12 (Parton *et al.*, 1997). Malheureusement, aucune variation qualitative et/ou quantitative de la distribution de la cavéoline-3 n'a pu être mise en évidence en condition de stress, contrairement à ce qui avait pu être montré par Touzet et Philips dans des cultures primaires de myotubes humains (Touzet and Philips, 2010). Les résultats concernant l'effet de l' H_2O_2 sur les fonctions des cavéoles n'ont pas donné de résultats concluants à ce jour et nécessitent d'être approfondis.

Ce qu'il faut retenir

- L' H_2O_2 semble affecter l'association de la cavéoline-3 aux cavéoles.
- L' H_2O_2 induit une diminution de la quantité de cavine-4 dans les myotubes.

Partie V. Effet de l' H_2O_2 sur la différenciation

L'ensemble des résultats précédents ont été obtenus dans des conditions de stress oxydant aigu où l' H_2O_2 a été ajouté dans le milieu de culture à des doses relativement élevées et l'effet sur les cavéoles et cavéolines étudié quelques minutes/heures après le traitement. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'effet que pourrait avoir l' H_2O_2 au cours du processus de différenciation des myoblastes en myotubes.

Pour cela, des myoblastes ont été mis à différencier (J0) et 100 μM d' H_2O_2 ont été ajoutés quotidiennement au milieu de culture. Après 6 jours de traitement (J6), l'observation des cellules par microscopie révèle une diminution de la taille et du nombre de myotubes par rapport à la culture témoin (Figure 42). Ce résultat indique que de la même manière qu'au cours du vieillissement, le stress oxydant induit une importante diminution du taux de fusion des myoblastes et/ou un ralentissement de la croissance des myotubes.

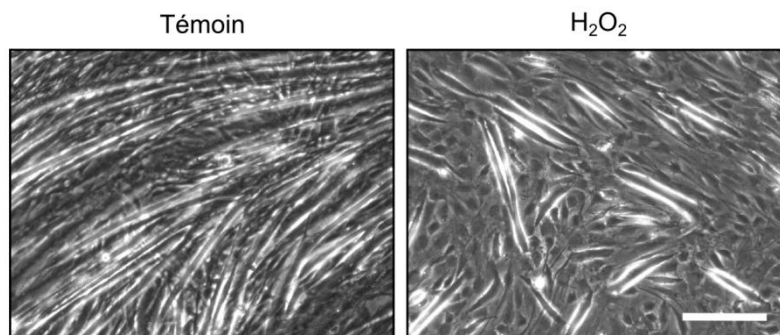


Figure 42 : Effet de l' H_2O_2 sur la différenciation des myoblastes en myotubes.

La différenciation des myoblastes en myotubes est induite en appauvrissant le milieu de culture en sérum comme indiqué dans le matériel et méthodes. Une dose de 100 μM d' H_2O_2 a été ajoutée quotidiennement au milieu de culture jusqu'à 6 jours de différenciation. Les myotubes ont été observés en microscopie optique à contraste de phase. Echelle : 200 μm

Ce retard de différenciation posait un problème majeur pour comparer le taux de cavéoline-3 dans les cellules témoins et traitées à l' H_2O_2 car pour un même temps de différenciation nous n'avions pas le même nombre de myotubes. Par conséquent, afin de quantifier l'effet de l' H_2O_2 sur le taux de chaque isoforme de cavéoline, les myotubes à 10 jours de différenciation ont été séparés des myoblastes par action de la trypsine à faible concentration (matériel et méthodes). Afin de s'assurer que les deux populations cellulaires ont été bien séparées, des Western-blot ont été réalisés pour chaque isoforme de cavéoline à partir d'extraits protéiques de myoblastes et de myotubes. Comme le montre la Figure 43 A,

les préparations ainsi séparées ont un degré de pureté satisfaisant. La cavéoline-1 est à peine détectable dans les myotubes et la cavéoline-3 est absente des myoblastes. L'effet du traitement H_2O_2 sur le taux des cavéolines a alors été quantifié dans chaque population. Comme le montre la Figure 43 B, le niveau d'expression de la cavéoline-1 n'est plus que de 77% dans les myoblastes et celui de la cavéoline-3 est de 45% dans les myotubes comparé à des conditions témoins sans traitement.

Il apparaît donc qu'un traitement chronique produit le même effet sur les cavéolines-1 et -3 que celui observé en conditions de traitement aigu, à savoir une diminution de la quantité de cavéolines.

La présence continue d'une faible concentration d' H_2O_2 dans le milieu se rapproche vraisemblablement plus des conditions physiologiques de stress oxydant observées au cours du vieillissement cellulaire. Cependant, il était très compliqué techniquement de réaliser toutes nos études dans ces conditions. Malgré tout, le fait d'observer des résultats similaires (baisse du taux des cavéolines) dans ces conditions valide notre modèle de stress aigu.

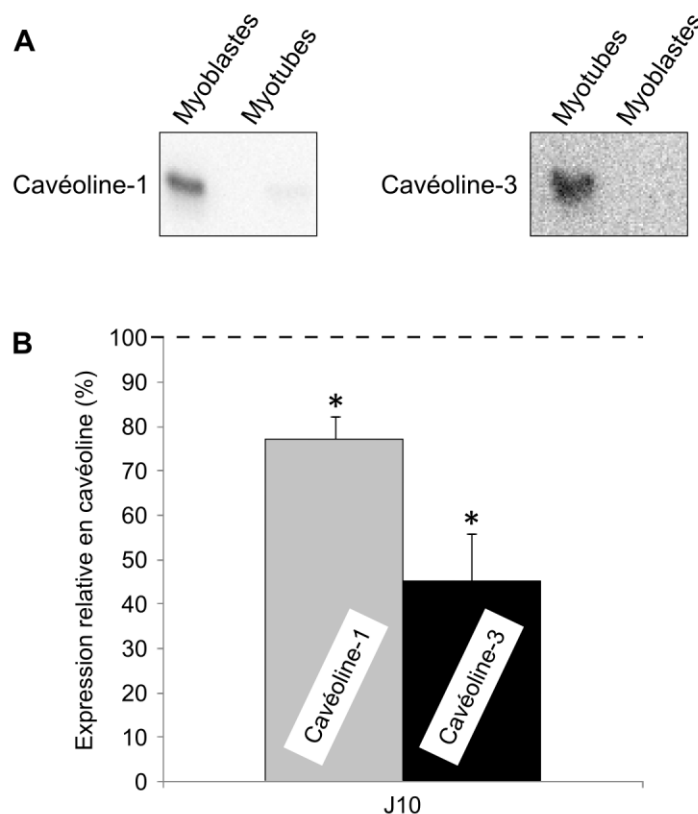


Figure 43 : Effet d'une addition répétée d'H₂O₂ sur le niveau d'expression des cavéolines à 10 jours de différenciation

Des myoblastes à 80% de confluence ont été mis à différencier et 100 μ M d'H₂O₂ ont été ajoutés quotidiennement au milieu de culture. Après 10 jours de différenciation, les myoblastes et les myotubes ont été séparés. Des extraits cellulaires (15 μ g de protéines) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane Immobilon[®]. La détection immunologique a été réalisée dans les myoblastes grâce à des anticorps dirigés contre la cavéoline-1 (1/1000^{ème}) et la p38 α (1/1000^{ème}). Dans les myotubes des anticorps dirigés contre la cavéoline-3 (1/500^{ème}) et la p38 α (1/500^{ème}) ont été utilisés. * Significativement différent de l'échantillon témoin sans traitement ($P < 0,05$).

Discussion

Nous avons, dans cette partie, étudié l'impact d'une addition répétée d'H₂O₂ à faible dose (100 μ M) sur le processus de différenciation musculaire. Nous avons pu mettre en évidence que ce traitement avait un effet similaire à celui observé dans le contexte de la sarcopénie car il induit la diminution de la taille et du nombre de myotubes (Figure 42) (Carosio *et al.*, 2011), renforçant une nouvelle fois la validité de notre modèle d'étude.

Nous nous sommes ensuite intéressés à caractériser l'effet de ce traitement chronique sur le niveau d'expression de la cavéoline-1 dans les myoblastes et celui de la cavéoline-3

dans les myotubes. Les résultats obtenus sont comparables à ceux présentés dans les parties précédentes puisque nous observons une diminution de leur niveau d'expression. Cependant, les processus cellulaires pouvant expliquer cette diminution ne sont sans doute pas les mêmes ici. En plus des processus de dégradation, la régulation de la synthèse des cavéolines pourrait en effet également intervenir et expliquer la baisse de leur niveau d'expression.

Il est intéressant de noter que la diminution du taux de cavéoline-3 est nettement supérieure à celle observée pour la cavéoline-1. En effet, alors que le niveau d'expression de la cavéoline-1 atteint $77 \pm 5\%$ des témoins dans les myoblastes, le niveau de la cavéoline-3 est seulement de $45 \pm 11\%$ dans les myotubes après traitement (Figure 43 B). Par ailleurs, alors que la baisse de cavéoline-1 est observée dans des proportions comparables que l' H_2O_2 soit ajouté de façon chronique ou aigue (Figure 21 et Figure 43) ; un traitement répété a un effet nettement supérieur sur la cavéoline-3 que l'addition ponctuelle d'une forte dose d' H_2O_2 (Figure 33 et Figure 43). Ces résultats pourraient signifier que la cavéoline-3 serait sensible à un stress oxydant modéré, comme nous l'avions supposé précédemment (partie III).

Cependant, les résultats obtenus ici n'ont pas été corrélés à la mesure du stress oxydant (ERO intracellulaires) ni à la toxicité cellulaire. Il convient par conséquent de rester prudent dans nos affirmations.

Partie VI. Conclusion et perspectives.

Les travaux réalisés au cours de ce travail de thèse se sont intéressés à caractériser l'effet du stress oxydant sur les cavéoles et cavéolines. Cette étude a été réalisée avec pour modèle d'étude des cellules musculaires squelettiques indifférenciées (myoblastes) ou différenciées (myotubes).

Nous avons pu mettre en évidence que les cavéolines sont sensibles au stress oxydant dans les cellules musculaires, dans des conditions où la viabilité cellulaire n'est pas affectée. Les deux isoformes sont en effet dégradées par le protéasome en présence de 500 μM d' H_2O_2 , la cavéoline-1 après 10 min d'incubation dans les myoblastes, et la cavéoline-3 après 1 h dans les myotubes. Si nous nous sommes focalisés sur la dégradation des protéines c'est que le « *turn-over* » de la cavéoline-1 avait été estimé à 36 h par Hayer *et al.* en 2010. Il serait cependant intéressant de regarder si la synthèse des protéines est affectée par le traitement H_2O_2 , en particulier pour les temps de traitement les plus longs (6 h). Une régulation transcriptionnelle des cavéolines par le stress oxydant a déjà été mise en évidence dans différents types cellulaires (Dasari *et al.*, 2006).

Les protéines dégradées par la voie protéasome-dépendante sont généralement marquées par l'ubiquitine et/ou oxydées. Il serait donc important pour la compréhension des mécanismes moléculaires de vérifier si les cavéolines sont ubiquitinées et / ou oxydées en présence d' H_2O_2 . Le taux de carbonylation des protéines a été mesuré mais il reflète une valeur globale pour l'ensemble du protéome cellulaire.

Comme indiqué en introduction, la cavéoline-1 peut être phosphorylée sur la tyrosine 14 en conditions de stress. Nous avons mis en effet en évidence une phosphorylation rapide et transitoire de la protéine après 10 min d'incubation des myoblastes avec 500 μM d' H_2O_2 . Ce résultat indique que les cellules sont effectivement en condition de stress oxydant, ce que nous avons vérifié par ailleurs grâce à la mesure de l'accumulation des ERO intracellulaires. Selon certains auteurs, la phosphorylation de la cavéoline-1 serait un signal de dégradation (Bakhshi *et al.*, 2013b). Afin de répondre à cette question, la dégradation de la cavéoline-1 pourrait être observée en présence d'inhibiteurs de la voie Src kinase, responsable de la phosphorylation. La modification post-transcriptionnelle de la cavéoline-1 a été également associée avec une relocalisation intracellulaire de la protéine. Une observation par microscopie confocale de la forme phosphorylée de la protéine pourrait aussi être envisagée.

Comme vu en introduction, la cavéoline-1 interagit avec de nombreuses enzymes impliquées dans la régulation du stress oxydant. Elle pourrait notamment avoir un effet sur le contrôle des défenses anti-oxydantes via Nrf2. La dégradation de la cavéoline-1 en présence d' H_2O_2 pourrait entraîner la libération de Nrf2 des cavéoles et son adressage au noyau afin d'induire une activation des défenses anti-oxydantes. Il serait par conséquent intéressant d'observer la distribution intracellulaire de Nrf2 par microscopie confocale et son éventuelle co-localisation avec la cavéoline-1 après traitement.

Dans une deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'effet de l' H_2O_2 sur l'organisation et la fonction des cavéoles dans les myoblastes et les myotubes. Les cavéolines-1 et -3 sont nécessaires à la formation des cavéoles. Par conséquent, une dégradation de ces protéines pourrait logiquement entraîner une diminution du nombre de cavéoles. Comme cela a déjà été réalisé par différents auteurs, un comptage des cavéoles par microscopie électronique à transmission a été envisagé afin de dénombrer les cavéoles en présence d' H_2O_2 . Dans notre modèle cellulaire, bien que nous ayons pu mettre en évidence la présence des cavéoles en MET, leur nombre était trop faible pour donner des résultats statistiquement fiables. Une approche par microscopie corrélative (fluorescence et électronique) pourrait être envisagée pour mieux visualiser les cavéoles. Leur nombre pourrait aussi être augmenté par l'utilisation de *stimuli* connus pour augmenter leur formation comme la sphingomyelinase (Corrotte *et al.*, 2013).

Une approche alternative au dénombrement des cavéoles a été mise en place. Nous avons pour cela isolé les cavéoles par ultracentrifugation en gradient de saccharose et observé la répartition des cavéolines dans les différentes fractions. D'après les résultats obtenus, le stress oxydant ne semble pas affecter la capacité de la cavéoline-1 à former des cavéoles dans les myoblastes. Ce résultat a été confirmé par une observation en microscopie TIRF de la cavéoline-1 dans les myoblastes traités avec l' H_2O_2 . En revanche, la répartition de la cavéoline-3 dans les fractions du gradient est modifiée par l' H_2O_2 dans les myotubes. La protéine semble en effet moins représentée dans les fractions de faible densité, généralement reconnues pour être enrichies en cavéoles. Ce résultat tend à montrer que le stress oxydant pourrait diminuer le nombre de cavéoles à la membrane des myotubes. Des expériences de microscopie TIRF pourront être réalisées afin de confirmer cette hypothèse.

De façon surprenante, alors que la baisse de cavéoline-1 dans les myoblastes soumis à un stress oxydant n'entraîne pas de modification des cavéoles, leur fonction est altérée par l' H_2O_2 . Nous avons pu montrer en effet une diminution dose-dépendante de l'endocytose,

ainsi qu'une moindre résistance des myoblastes à la tension membranaire en condition hypo-osmotique. Par conséquent, le stress oxydant ne semble pas modifier le nombre de cavéoles mais modifie leurs fonctionnalités.

Le degré d'organisation des lipides au niveau de la membrane des cavéoles joue un rôle primordial dans la régulation de leurs fonctions (signalisation cellulaire, résistance au stress mécanique). Par conséquent, une oxydation des lipides, en modifiant cette organisation, pourrait expliquer les résultats que nous observons. C'est pourquoi des expériences ont été entreprises récemment au laboratoire, visant à analyser les lipides des cavéoles après traitement des cellules (myoblastes ou myotubes) avec l' H_2O_2 .

Une autre hypothèse serait que le stress oxydant induit des modifications des protéines impliquées dans la régulation de la dynamique des cavéoles (EHD2, pacsin-2, cavine...). Pour étudier cette question, des expériences de co-immunoprécipitation des cavéolines sont en cours dans les myoblastes et les myotubes. D'une façon plus globale, nous pourrions envisager d'analyser le protéome des cavéoles.

Dans notre étude, il se pourrait que la diminution de cavéoline-1 et l'altération des fonctions des cavéoles soient deux effets distincts du stress oxydant dans les myoblastes. Un rôle de la cavéoline en dehors des cavéoles est maintenant clairement admis. La dégradation et / ou la phosphorylation de la protéine pourraient avoir des effets dans la régulation des voies de signalisation liées au stress oxydant. D'un autre côté, un défaut de la fonction des cavéoles, pourrait avoir des conséquences importantes sur la régulation des dégâts membranaires couramment occasionnés dans les cellules musculaires.

L'effet du stress oxydant sur la fonction des cavéoles a également été étudié dans les myotubes. Les difficultés techniques rencontrées dans ce type cellulaire ne nous ont pas permis de conclure à ce jour. Cependant, des stratégies expérimentales alternatives sont envisagées, notamment pour mesurer la résistance au stress mécanique en présence d' H_2O_2 . Pour cela, nous allons utiliser le « DEAD Green™ Viability Stain » (Molecular Probe). Cette sonde fluorescente pénètre les cellules dont l'intégrité membranaire a été affectée et marque les noyaux. Après une étape de fixation, les cellules seront immuno-marquées avec des anticorps dirigés contre la myosine, spécifique des myotubes. Ainsi, le comptage des cellules doublement colorées (noyaux + myosine) devrait nous donner une indication du nombre de myotubes affectés par le choc hypo-osmotique. La comparaison de cellules témoins et traitées par l' H_2O_2 nous indiquera si le stress oxydant altère la capacité des cavéoles à résister à la tension membranaire dans les myotubes.

L'ensemble de cette étude apporte des résultats nouveaux quant à l'effet de l'H₂O₂ sur les cavéolines et les cavéoles dans les cellules musculaires squelettiques. En effet, nous avons mis en évidence que l'H₂O₂ avait un impact significatif sur le niveau d'expression des cavéolines. Or, il est clairement établi qu'une altération de leur niveau d'expression est associée à des pathologies musculaires graves comme les myopathies. Dans la perspective de la sarcopénie, nos résultats pourraient indiquer que l'accumulation d'ERO au cours de l'avancée en âge aurait un effet sur les cavéoles / cavéolines entraînant des conséquences sur l'intégrité musculaire. Les effets étant observés à la fois dans les myoblastes et les myotubes, la voie des cavéoles pourrait jouer un rôle à la fois dans les problèmes liés à la régénération musculaire (cavéoline-1) mais aussi dans les dysfonctions des fibres musculaires (cavéoline-3 ; réparation membranaire, couplage excitation-contraction...).

Les résultats des parties I et II sur les myoblastes ont fait l'objet d'un article intitulé « Oxidative stress induces caveolin 1 degradation and impairs caveolae functions in skeletal muscle cells » qui a été soumis à PlosOne (présenté en annexe).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Allen, R.G., and Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 463–499.
- Allen, D.G., Gervasio, O.L., Yeung, E.W., and Whitehead, N.P. (2010). Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88, 83–91.
- Andersson, D.C., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Meli, A.C., Umanskaya, A., Xie, W., Shiomi, T., Zalk, R., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2011). Ryanodine Receptor Oxidation Causes Intracellular Calcium Leak and Muscle Weakness in Aging. *Cell Metab.* 14, 196–207.
- Ariotti, N., Fernández-Rojo, M.A., Zhou, Y., Hill, M.M., Rodkey, T.L., Inder, K.L., Tanner, L.B., Wenk, M.R., Hancock, J.F., and Parton, R.G. (2014). Caveolae regulate the nanoscale organization of the plasma membrane to remotely control Ras signaling. *J. Cell Biol.* 204, 777–792.
- Arthur, J.R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 1825–1835.
- Au, Y. (2004). The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 61, 3016–3033.
- Bakhshi, F.R., Mao, M., Shajahan, A.N., Piegeler, T., Chen, Z., Chernaya, O., Sharma, T., Elliott, W.M., Szulcek, R., Bogaard, H.J., et al. (2013a). Nitrosation-dependent caveolin 1 phosphorylation, ubiquitination, and degradation and its association with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* 3, 816–830.
- Bakhshi, F.R., Mao, M., Shajahan, A.N., Piegeler, T., Chen, Z., Chernaya, O., Sharma, T., Elliott, W.M., Szulcek, R., Bogaard, H.J., et al. (2013b). Nitrosation-dependent caveolin 1 phosphorylation, ubiquitination, and degradation and its association with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* 3, 816–830.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–495.
- Bansal, D., and Campbell, K.P. (2004). Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol.* 14, 206–213.
- Barbieri, E., and Sestili, P. (2011). Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling. *J. Signal Transduct.* 2012, e982794.
- Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences* 22, 266–272.
- Bastiani, M., and Parton, R.G. (2010). Caveolae at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 3831–3836.
- Bastiani, M., Liu, L., Hill, M.M., Jedrychowski, M.P., Nixon, S.J., Lo, H.P., Abankwa, D., Luetterforst, R., Fernandez-Rojo, M., Breen, M.R., et al. (2009). MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J. Cell Biol.* 185, 1259–1273.
- Baumgartner, R.N., Koehler, K.M., Gallagher, D., Romero, L., Heymsfield, S.B., Ross, R.R., Garry, P.J., and Lindeman, R.D. (1998). Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am. J. Epidemiol.* 147, 755–763.

- Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1999). Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutat. Res.* 424, 51–58.
- Blau, H.M., Chiu, C.P., and Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* 32, 1171–1180.
- Bonor, J., Adams, E.L., Bragdon, B., Moseychuk, O., Czymmek, K.J., and Nohe, A. (2012). Initiation of BMP2 signaling in domains on the plasma membrane. *J. Cell. Physiol.* 227, 2880–2888.
- Brack, A.S., Bildsoe, H., and Hughes, S.M. (2005). Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J. Cell Sci.* 118, 4813–4821.
- Brazer, S.-C.W., Singh, B.B., Liu, X., Swaim, W., and Ambudkar, I.S. (2003). Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca²⁺ influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *J. Biol. Chem.* 278, 27208–27215.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, J., and Krause, K. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.*
- Brigelius-Flohé, R., and Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3289–3303.
- Brotto, M., and Abreu, E.L. (2012). Sarcopenia: Pharmacology of Today and Tomorrow. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 540–546.
- Brulé, C., Dargelos, E., Diallo, R., Listrat, A., Béchet, D., Cottin, P., and Poussard, S. (2010). Proteomic study of calpain interacting proteins during skeletal muscle aging. *Biochimie* 92, 1923–1933.
- Burgermeister, E., Friedrich, T., Hitkova, I., Regel, I., Einwächter, H., Zimmermann, W., Röcken, C., Perren, A., Wright, M.B., Schmid, R.M., *et al.* (2011). The Ras inhibitors caveolin-1 and docking protein 1 activate peroxisome proliferator-activated receptor γ through spatial relocalization at helix 7 of its ligand-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3497–3510.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., and Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* 424, 9–21.
- Cai, C., Weisleder, N., Ko, J.-K., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., Takeshima, H., and Ma, J. (2009). Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *J. Biol. Chem.* 284, 15894–15902.
- Cao, H., Alston, L., Ruschman, J., and Hegele, R.A. (2008). Heterozygous CAV1 frameshift mutations (MIM 601047) in patients with atypical partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis.* 7, 3.
- Carosio, S., Berardinelli, M.G., Aucello, M., and Musarò, A. (2011). Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res. Rev.* 10, 35–42.

- Chandel, N.S., and Budinger, G.R.S. (2007). The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* *42*, 165–174.
- Chargé, S.B.P., and Rudnicki, M.A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* *84*, 209–238.
- Chen, D., Li, S., Qian, X., Moon, C., and Zheng, J. (2005). Tyrosine phosphorylation of caveolin 1 by oxidative stress is reversible and dependent on the c-src tyrosine kinase but not mitogen-activated protein kinase pathways in placental artery endothelial cells. *Biol. Reprod.* *73*, 761–772.
- Chen, F., Barman, S., Yu, Y., Haigh, S., Wang, Y., Dou, H., Bagi, Z., Han, W., Su, Y., and Fulton, D.J.R. (2014). Caveolin-1 is a negative regulator of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* *73*, 201–213.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., and Gregorio, C.C. (2002). STRIATED MUSCLE CYTOARCHITECTURE: An Intricate Web of Form and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *18*, 637–706.
- Clavel, S., Siffroi-Fernandez, S., Coldefy, A.S., Boulukos, K., Pisani, D.F., and Dérijard, B. (2010). Regulation of the intracellular localization of Foxo3a by stress-activated protein kinase signaling pathways in skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 470–480.
- Cohen, A.W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T.M., Wang, X.B., Iyengar, P., Brasaemle, D.L., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (2004). Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* *53*, 1261–1270.
- Collet, J.-F., and Messens, J. (2010). Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. *Antioxid. Redox Signal.* *13*, 1205–1216.
- Collins, B.M., Davis, M.J., Hancock, J.F., and Parton, R.G. (2012). Structure-Based Reassessment of the Caveolin Signaling Model: Do Caveolae Regulate Signaling through Caveolin-Protein Interactions? *Dev. Cell* *23*, 11–20.
- Conboy, I.M., and Rando, T.A. (2005). Aging, Stem Cells and Tissue Regeneration: Lessons from Muscle. *Cell Cycle* *4*, 407–410.
- Corrotte, M., Almeida, P.E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M.C., Millis, B.A., Cortez, M., Miller, H., Song, W., Mangel, T.K., *et al.* (2013). Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *eLife* *2*, e00926.
- Couchoux, H., Bichraoui, H., Chouabe, C., Altafaj, X., Bonvallet, R., Allard, B., Ronjat, M., and Berthier, C. (2011). Caveolin-3 is a direct molecular partner of the Cav1.1 subunit of the skeletal muscle L-type calcium channel. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 713–720.
- Couet, J., Belanger, M.M., Roussel, E., and Drolet, M.-C. (2001). Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *49*, 223–235.
- Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J.P., Bauer, J.M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F.C., Michel, J.-P., Rolland, Y., Schneider, S.M., *et al.* (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* *39*, 412–423.

- Czarny, M., Lavie, Y., Fiucci, G., and Liscovitch, M. (1999). Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-182-101. *J. Biol. Chem.* *274*, 2717–2724.
- Dalla Libera, L., Ravara, B., Gobbo, V., Tarricone, E., Vitadello, M., Biolo, G., Vescovo, G., and Gorza, L. (2009). A transient antioxidant stress response accompanies the onset of disuse atrophy in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *107*, 549–557.
- Dardevet, D., Rémond, D., Peyron, M.-A., Papet, I., Savary-Auzeloux, I., and Mosoni, L. (2012). Muscle wasting and resistance of muscle anabolism: the “anabolic threshold concept” for adapted nutritional strategies during sarcopenia. *ScientificWorldJournal* *2012*, 269531.
- Dargelos, E., Brulé, C., Stuelsatz, P., Mouly, V., Veschambre, P., Cottin, P., and Poussard, S. (2010). Up-regulation of calcium-dependent proteolysis in human myoblasts under acute oxidative stress. *Exp. Cell Res.* *316*, 115–125.
- Dasari, A., Bartholomew, J.N., Volonte, D., and Galbiati, F. (2006). Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Res.* *66*, 10805–10814.
- Daumke, O., Lundmark, R., Vallis, Y., Martens, S., Butler, P.J.G., and McMahon, H.T. (2007). Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase involved in membrane remodelling. *Nature* *449*, 923–927.
- Decossas, M., Bloch, B., and Bernard, V. (2003). Trafficking of the muscarinic m2 autoreceptor in cholinergic basalocortical neurons in vivo: differential regulation of plasma membrane receptor availability and intraneuronal localization in acetylcholinesterase-deficient and -inhibited mice. *J. Comp. Neurol.* *462*, 302–314.
- Dietzen, D.J., Hastings, W.R., and Lublin, D.M. (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* *270*, 6838–6842.
- Disatnik, M.H., Dhawan, J., Yu, Y., Beal, M.F., Whirl, M.M., Franco, A.A., and Rando, T.A. (1998). Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J. Neurol. Sci.* *161*, 77–84.
- Dorchies, O.M., Wagner, S., Vuadens, O., Waldhauser, K., Buetler, T.M., Kucera, P., and Ruegg, U.T. (2006). Green tea extract and its major polyphenol (-)-epigallocatechin gallate improve muscle function in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *290*, C616–C625.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., *et al.* (2001). Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice. *Science* *293*, 2449–2452.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* *82*, 47–95.

- Dulhunty, A.F., and Franzini-Armstrong, C. (1975). The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. *J. Physiol.* *250*, 513–539.
- Echarri, A., Muriel, O., Pavón, D.M., Azegrouz, H., Escolar, F., Terrón, M.C., Sanchez-Cabo, F., Martínez, F., Montoya, M.C., Llorca, O., *et al.* (2012). Caveolar domain organization and trafficking is regulated by Abl kinases and mDia1. *J. Cell Sci.* *125*, 3097–3113.
- Emery, A.E.H. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* *359*, 687–695.
- Engelman, J.A., Wykoff, C.C., Yasuhara, S., Song, K.S., Okamoto, T., and Lisanti, M.P. (1997). Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J. Biol. Chem.* *272*, 16374–16381.
- Estrella, N.L., and Naya, F.J. (2014). Transcriptional networks regulating the costamere, sarcomere, and other cytoskeletal structures in striated muscle. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *71*, 1641–1656.
- Faggi, F., Mitola, S., Sorci, G., Riuzzi, F., Donato, R., Codenotti, S., Poliani, P.L., Cominelli, M., Vescovi, R., Rossi, S., *et al.* (2014). Phosphocaveolin-1 enforces tumor growth and chemoresistance in rhabdomyosarcoma. *PLoS One* *9*, e84618.
- Fan, X., Hussien, R., and Brooks, G.A. (2010). H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* *49*, 1646–1654.
- Fanò, G., Mecocci, P., Vecchiet, J., Belia, S., Fulle, S., Polidori, M.C., Felzani, G., Senin, U., Vecchiet, L., and Beal, M.F. (2001). Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *22*, 345–351.
- Fernández, M.A., Albor, C., Ingelmo-Torres, M., Nixon, S.J., Ferguson, C., Kurzchalia, T., Tebar, F., Enrich, C., Parton, R.G., and Pol, A. (2006). Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* *313*, 1628–1632.
- Fielding, P.E., and Fielding, C.J. (1995). Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 14288–14292.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* *194*, 7–15.
- Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K., and Parton, R.G. (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8655–8659.
- Fu, S., Gebicki, S., Jessup, W., Gebicki, J.M., and Dean, R.T. (1995). Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides. *Biochem. J.* *311*, 821–827.
- Fujita, S., and Volpi, E. (2006). Amino acids and muscle loss with aging. *J. Nutr.* *136*, 277S – 80S.
- Fujita, A., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Takenawa, T., and Fujimoto, T. (2009). A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 9256–9261.

- Gabella, G. (1971). Caveolae intracellulares and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *J. Cell Sci.* 8, 601–609.
- Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J.A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R.G., and Lisanti, M.P. (1998). Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J.* 17, 6633–6648.
- Galbiati, F., Volonte, D., Meani, D., Milligan, G., Lublin, D.M., Lisanti, M.P., and Parenti, M. (1999a). The dually acylated NH₂-terminal domain of g α is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the recognition of dually acylated g-protein α subunits in vivo. *J. Biol. Chem.* 274, 5843–5850.
- Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J.A., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (1999b). Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *J. Biol. Chem.* 274, 30315–30321.
- Galbiati, F., Volonte, D., Chu, J.B., Li, M., Fine, S.W., Fu, M., Bermudez, J., Pedemonte, M., Weidenheim, K.M., Pestell, R.G., *et al.* (2000). Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9689–9694.
- Galbiati, F., Engelman, J.A., Volonte, D., Zhang, X.L., Minetti, C., Li, M., Hou, H., Kneitz, B., Edelmann, W., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-3 Null Mice Show a Loss of Caveolae, Changes in the Microdomain Distribution of the Dystrophin-Glycoprotein Complex, and T-tubule Abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276, 21425–21433.
- García-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B.S., Skidd, P.M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M.P., and Sessa, W.C. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 25437–25440.
- Gaudreault, S.B., Blain, J.-F., Gratton, J.-P., and Poirier, J. (2005). A role for caveolin-1 in post-injury reactive neuronal plasticity. *J. Neurochem.* 92, 831–839.
- Gazzerro, E., Sotgia, F., Bruno, C., Lisanti, M.P., and Minetti, C. (2009). Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 137–145.
- Gervásio, O.L., Phillips, W.D., Cole, L., and Allen, D.G. (2011). Caveolae respond to cell stretch and contribute to stretch-induced signaling. *J. Cell Sci.* 124, 3581–3590.
- Ghosh, S., Gachhui, R., Crooks, C., Wu, C., Lisanti, M.P., and Stuehr, D.J. (1998). Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J. Biol. Chem.* 273, 22267–22271.
- Gianni, P., Jan, K.J., Douglas, M.J., Stuart, P.M., and Tarnopolsky, M.A. (2004). Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp. Gerontol.* 39, 1391–1400.

- Giniatullin, A.R., and Giniatullin, R.A. (2003). Dual action of hydrogen peroxide on synaptic transmission at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 552, 283–293.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Borrás, C., Pallardo, F.V., Sastre, J., Ji, L.L., and Vina, J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J. Physiol.* 567, 113–120.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E., and Viña, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 126–131.
- Gong, M.C., Arbogast, S., Guo, Z., Mathenia, J., Su, W., and Reid, M.B. (2006). Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* 100, 399–405.
- Gonzalez-Freire, M., de Cabo, R., Studenski, S.A., and Ferrucci, L. (2014). The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle. *Front. Aging Neurosci.* 6.
- Goudenege, S., Poussard, S., Dulong, S., and Cottin, P. (2005). Biologically active millicalpain associated with caveolae is involved in a spatially compartmentalised signalling involving protein kinase C alpha and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1900–1910.
- Grune, T., Shringarpure, R., Sitte, N., and Davies, K. (2001). Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 56, B459–B467.
- Guglieri, M., Magri, F., D'Angelo, M.G., Prella, A., Morandi, L., Rodolico, C., Cagliani, R., Mora, M., Fortunato, F., Bordonni, A., *et al.* (2008). Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum. Mutat.* 29, 258–266.
- Gupta, R., Toufaily, C., and Annabi, B. (2014). Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer. *Biochimie.*
- Hailstones, D., Sleer, L.S., Parton, R.G., and Stanley, K.K. (1998). Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J. Lipid Res.* 39, 369–379.
- Han, R., and Campbell, K.P. (2007). Dysferlin and Muscle Membrane Repair. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 409–416.
- Hansen, C.G., and Nichols, B.J. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.* 20, 177–186.
- Hansen, C.G., Bright, N.A., Howard, G., and Nichols, B.J. (2009). SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nat. Cell Biol.* 11, 807–814.
- Hansen, C.G., Howard, G., and Nichols, B.J. (2011). Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *J. Cell Sci.* 124, 2777–2785.

- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* *11*, 298–300.
- Hayashi, Y.K., Matsuda, C., Ogawa, M., Goto, K., Tominaga, K., Mitsunashi, S., Park, Y.-E., Nonaka, I., Hino-Fukuyo, N., Haginoya, K., *et al.* (2009). Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* *119*, 2623–2633.
- Haycock, J.W., Mac Neil, S., and Mantle, D. (1998). Differential protein oxidation in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuroreport* *9*, 2201–2207.
- Hayer, A., Stoeber, M., Bissig, C., and Helenius, A. (2010). Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic Cph. Den.* *11*, 361–382.
- Head, B.P., and Insel, P.A. (2007). Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae? *Trends Cell Biol.* *17*, 51–57.
- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In *Functional Metabolism*, K.B.S. Ph.D, ed. (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 319–368.
- Herrera, E., and Barbas, C. (2001). Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.* *57*, 43–56.
- Hezel, M., Groat, W.C. de, and Galbiati, F. (2010). Caveolin-3 Promotes Nicotinic Acetylcholine Receptor Clustering and Regulates Neuromuscular Junction Activity. *Mol. Biol. Cell* *21*, 302–310.
- Hikida, R.S. (2011). Aging changes in satellite cells and their functions. *Curr. Aging Sci.* *4*, 279–297.
- Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V.M.J., Martin, S., *et al.* (2008). PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* *132*, 113–124.
- Hiona, A., and Leeuwenburgh, C. (2008). The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Exp. Gerontol.* *43*, 24–33.
- Howard, A.C., McNeil, A.K., and McNeil, P.L. (2011). Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. *Nat. Commun.* *2*, 597.
- Hsieh, S.-R., Hsu, C.-S., Lu, C.-H., Chen, W.-C., Chiu, C.-H., and Liou, Y.-M. (2013). Epigallocatechin-3-gallate-mediated cardioprotection by Akt/GSK-3 β /caveolin signalling in H9c2 rat cardiomyoblasts. *J. Biomed. Sci.* *20*, 86.
- Huang, H., Bae, C., Sachs, F., and Suchyna, T.M. (2013). Caveolae regulation of mechanosensitive channel function in myotubes. *PLoS One* *8*, e72894.
- Ilsley, J.L., Sudol, M., and Winder, S.J. (2002). The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cell. Signal.* *14*, 183–189.

- Inglés, M., Gambini, J., Carnicero, J.A., García-García, F.J., Rodríguez-Mañas, L., Olaso-González, G., Dromant, M., Borrás, C., and Viña, J. (2014). Oxidative stress is related to frailty, not to age or sex, in a geriatric population: lipid and protein oxidation as biomarkers of frailty. *J. Am. Geriatr. Soc.* *62*, 1324–1328.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I., and Utsumi, K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.* *10*, 2495–2505.
- Jang, Y.C., and Van Remmen, H. (2011). Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp. Gerontol.* *46*, 193–198.
- Jang, Y.C., Sinha, M., Cerletti, M., Dall’Osso, C., and Wagers, A.J. (2011). Skeletal muscle stem cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *76*, 101–111.
- Janssen, I., Shepard, D.S., Katzmarzyk, P.T., and Roubenoff, R. (2004). The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J. Am. Geriatr. Soc.* *52*, 80–85.
- Ji, L.L., Dillon, D., and Wu, E. (1990). Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* *258*, R918–R923.
- Jp, C., C, Lord, M, C., M, A.L., Ed, G., S, R., A, K., and Ij, D. (2006). Relationship between antioxidant intakes and class I sarcopenia in elderly men and women. *J. Nutr. Health Aging* *11*, 363–369.
- Ju, H., Zou, R., Venema, V.J., and Venema, R.C. (1997). Direct Interaction of Endothelial Nitric-oxide Synthase and Caveolin-1 Inhibits Synthase Activity. *J. Biol. Chem.* *272*, 18522–18525.
- Jubrias, S.A., Odderson, I.R., Esselman, P.C., and Conley, K.E. (1997). Decline in isokinetic force with age: muscle cross-sectional area and specific force. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* *434*, 246–253.
- Kadi, F., Charifi, N., Denis, C., and Lexell, J. (2004). Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve* *29*, 120–127.
- Karam, J.A., Lotan, Y., Roehrborn, C.G., Ashfaq, R., Karakiewicz, P.I., and Shariat, S.F. (2007). Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. *The Prostate* *67*, 614–622.
- Kayo, T., Allison, D.B., Weindruch, R., and Prolla, T.A. (2001). Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 5093–5098.
- Kim, C.A., Delépine, M., Boutet, E., El Mourabit, H., Le Lay, S., Meier, M., Nemani, M., Bridel, E., Leite, C.C., Bertola, D.R., *et al.* (2008). Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *93*, 1129–1134.

- Kim, J.-H., Peng, D., Schleich, J.P., Hadziselimovic, A., and Sanders, C.R. (2014). Modest effects of lipid modifications on the structure of caveolin-3. *Biochemistry (Mosc.)* 53, 4320–4322.
- Ko, T.P., Safo, M.K., Musayev, F.N., Di Salvo, M.L., Wang, C., Wu, S.H., and Abraham, D.J. (2000). Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56, 241–245.
- Kondo, H., Nakagaki, I., Sasaki, S., Hori, S., and Itokawa, Y. (1993). Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am. J. Physiol.* 265, E839–E844.
- Kortebein, P., Ferrando, A., Lombeida, J., Wolfe, R., and Evans, W.J. (2007). Effect of 10 days of bed rest on skeletal muscle in healthy older adults. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 297, 1772–1774.
- Koubassova, N.A., and Tsaturyan, A.K. (2011). Molecular mechanism of actin-myosin motor in muscle. *Biochem. Biokhimiia* 76, 1484–1506.
- Kozera, L., White, E., and Calaghan, S. (2009). Caveolae Act as Membrane Reserves Which Limit Mechanosensitive ICl_{swell} Channel Activation during Swelling in the Rat Ventricular Myocyte. *PLoS ONE* 4, e8312.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lajoie, P., Goetz, J.G., Dennis, J.W., and Nabi, I.R. (2009). Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 185, 381–385.
- Lang, D.M., Lommel, S., Jung, M., Ankerhold, R., Petrausch, B., Laessing, U., Wiechers, M.F., Plattner, H., and Stuermer, C.A. (1998). Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J. Neurobiol.* 37, 502–523.
- Langen, R.C.J., Velden, J.L.J.V.D., Schols, A.M.W.J., Kelders, M.C.J.M., Wouters, E.F.M., and Janssen-Heininger, Y.M.W. (2004). Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J.* 18, 227–237.
- Lass, A., Sohal, B.H., Weindruch, R., Forster, M.J., and Sohal, R.S. (1998). Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 1089–1097.
- Lau, E.M.C., Lynn, H.S.H., Woo, J.W., Kwok, T.C.Y., and Melton, L.J. (2005). Prevalence of and risk factors for sarcopenia in elderly Chinese men and women. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 60, 213–216.
- Lawler, J.M. (2011). Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J. Physiol.* 589, 2161–2170.
- Lee, H., Woodman, S.E., Engelman, J.A., Volonté, D., Galbiati, F., Kaufman, H.L., Lublin, D.M., and Lisanti, M.P. (2001). Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-

linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14). *J. Biol. Chem.* 276, 35150–35158.

Leeuwenburgh, C., Fiebig, R., Chandwaney, R., and Ji, L.L. (1994). Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 267, R439–R445.

Lexell, J. (1995). Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 50 *Spec No*, 11–16.

Lexell, J., Taylor, C.C., and Sjöström, M. (1988). What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J. Neurol. Sci.* 84, 275–294.

Li, S., Seitz, R., and Lisanti, M.P. (1996a). Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J. Biol. Chem.* 271, 3863–3868.

Li, S., Couet, J., and Lisanti, M.P. (1996b). Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271, 29182–29190.

Li, W., Liu, H., Zhou, J.-S., Cao, J.-F., Zhou, X.-B., Choi, A.M.K., Chen, Z.-H., and Shen, H.-H. (2012). Caveolin-1 inhibits expression of antioxidant enzymes through direct interaction with nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (Nrf2). *J. Biol. Chem.* 287, 20922–20930.

Lin, C.-H., Lin, C.-C., Tsai, C.-W., Chang, W.-S., Yang, M.-D., and Bau, D.-T. (2014). A novel caveolin-1 biomarker for clinical outcome of sarcopenia. *Vivo Athens Greece* 28, 383–389.

Liu, L., and Pilch, P.F. (2008). A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *J. Biol. Chem.* 283, 4314–4322.

Liu, L., Brown, D., McKee, M., LeBrasseur, N.K., Yang, D., Albrecht, K.H., Ravid, K., and Pilch, P.F. (2008). Deletion of Cavin/PTRF Causes Global Loss of Caveolae, Dyslipidemia, and Glucose Intolerance. *Cell Metab.* 8, 310–317.

Lowalekar, S.K., Cristofaro, V., Radisavljevic, Z.M., Yalla, S.V., and Sullivan, M.P. (2012). Loss of bladder smooth muscle caveolae in the aging bladder. *Neurourol. Urodyn.* 31, 586–592.

Ludwig, A., Howard, G., Mendoza-Topaz, C., Deerinck, T., Mackey, M., Sandin, S., Ellisman, M.H., and Nichols, B.J. (2013). Molecular Composition and Ultrastructure of the Caveolar Coat Complex. *PLoS Biol* 11, e1001640.

Maggio, M., Guralnik, J.M., Longo, D.L., and Ferrucci, L. (2006). Interleukin-6 in Aging and Chronic Disease: A Magnificent Pathway. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 61, 575–584.

Marieb, E.N., and Hoehn, K. (2013). *Human anatomy & physiology* (Boston: Pearson).

- Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B., and Hamill, O.P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat. Cell Biol.* 7, 179–185.
- Marzani, B., Pansarasa, O., and Marzatico, F. (2004). Oxidative stress and muscle aging: influence of age, sex, fiber composition and function. *Basic Appl. Myol.* 37–44.
- Mayer, F., Scharhag-Rosenberger, F., Carlsohn, A., Cassel, M., Muller, S., and Scharhag, J. (2011). The Intensity and Effects of Strength Training in the Elderly. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 108, 359–364.
- Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 603–612.
- McClung, J.M., Judge, A.R., Talbert, E.E., and Powers, S.K. (2009). Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C363–C371.
- McMahon, K.-A., Zajicek, H., Li, W.-P., Peyton, M.J., Minna, J.D., Hernandez, V.J., Luby-Phelps, K., and Anderson, R.G.W. (2009). SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J.* 28, 1001–1015.
- Meng, S.-J., and Yu, L.-J. (2010). Oxidative Stress, Molecular Inflammation and Sarcopenia. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 1509–1526.
- Meshulam, T., Simard, J.R., Wharton, J., Hamilton, J.A., and Pilch, P.F. (2006). Role of caveolin-1 and cholesterol in transmembrane fatty acid movement. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 2882–2893.
- Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M.A., *et al.* (1998). Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 18, 365–368.
- Miyawaki-Shimizu, K., Predescu, D., Shimizu, J., Broman, M., Predescu, S., and Malik, A.B. (2006). siRNA-induced caveolin-1 knockdown in mice increases lung vascular permeability via the junctional pathway. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 290, L405–L413.
- Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M., and Plomann, M. (2000). All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J. Cell Sci.* 113 Pt 24, 4511–4521.
- Monier, S., Parton, R.G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., and Kurzchalia, T.V. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* 6, 911–927.
- Monier, S., Dietzen, D.J., Hastings, W.R., Lublin, D.M., and Kurzchalia, T.V. (1996). Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett.* 388, 143–149.
- Montesano, R., Roth, J., Robert, A., and Orci, L. (1982). Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* 296, 651–653.

- Morais, J.A., Chevalier, S., and Gougeon, R. (2006). Protein turnover and requirements in the healthy and frail elderly. *J. Nutr. Health Aging* 10, 272–283.
- Morén, B., Shah, C., Howes, M.T., Schieber, N.L., McMahon, H.T., Parton, R.G., Daumke, O., and Lundmark, R. (2012a). EHD2 regulates caveolar dynamics via ATP-driven targeting and oligomerization. *Mol. Biol. Cell* 23, 1316–1329.
- Morén, B., Shah, C., Howes, M.T., Schieber, N.L., McMahon, H.T., Parton, R.G., Daumke, O., and Lundmark, R. (2012b). EHD2 regulates caveolar dynamics via ATP-driven targeting and oligomerization. *Mol. Biol. Cell* 23, 1316–1329.
- Morgan, J.E., and Partridge, T.A. (2003). Muscle satellite cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 1151–1156.
- Munoz, J., Zhou, Y., and Jarrett, H.W. (2010). LG4-5 domains of laminin-2 binds β -dystroglycan to allow myotube attachment and prevent anoikis. *J. Cell. Physiol.* 222, 111.
- Murata, M., Peränen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., and Simons, K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10339–10343.
- Murata, T., Lin, M.I., Stan, R.V., Bauer, P.M., Yu, J., and Sessa, W.C. (2007). Genetic Evidence Supporting Caveolae Microdomain Regulation of Calcium Entry in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 282, 16631–16643.
- Musarò, A., McCullagh, K.J.A., Naya, F.J., Olson, E.N., and Rosenthal, N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400, 581–585.
- Muscaritoli, M., Anker, S.D., Argilés, J., Aversa, Z., Bauer, J.M., Biolo, G., Boirie, Y., Bosaeus, I., Cederholm, T., Costelli, P., *et al.* (2010). Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics.” *Clin. Nutr.* 29, 154–159.
- Nabi, I.R. (2009). Cavin fever: regulating caveolae. *Nat. Cell Biol.* 11, 789–791.
- Nethe, M., and Hordijk, P.L. (2011). A model for phospho-caveolin-1-driven turnover of focal adhesions. *Cell Adhes. Migr.* 5, 59–64.
- Nethery, D., Stofan, D., Callahan, L., DiMarco, A., and Supinski, G. (1999). Formation of reactive oxygen species by the contracting diaphragm is PLA2dependent. *J. Appl. Physiol.* 87, 792–800.
- Nethery, D., Callahan, L.A., Stofan, D., Mattera, R., DiMarco, A., and Supinski, G. (2000). PLA2 dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Appl. Physiol.* 89, 72–80.
- Nicastro, H., Artioli, G.G., Costa, A. dos S., Solis, M.Y., da Luz, C.R., Blachier, F., and Lancha, A.H. (2011). An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions. *Amino Acids* 40, 287–300.

- Ogata, T., Ueyama, T., Isodono, K., Tagawa, M., Takehara, N., Kawashima, T., Harada, K., Takahashi, T., Shioi, T., Matsubara, H., *et al.* (2008). MURC, a Muscle-Restricted Coiled-Coil Protein That Modulates the Rho/ROCK Pathway, Induces Cardiac Dysfunction and Conduction Disturbance. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3424–3436.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., *et al.* (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* 22, 18–35.
- Palade, G.E. (1953). Fine Structure of Blood Capillaries.
- Pani, B., and Singh, B.B. (2009). Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium* 45, 625–633.
- Pansarasa, O., Castagna, L., Colombi, B., Vecchiet, J., Felzani, G., and Marzatico, F. (2000). Age and sex differences in human skeletal muscle: role of reactive oxygen species. *Free Radic. Res.* 33, 287–293.
- Pansarasa, O., Felzani, G., Vecchiet, J., and Marzatico, F. (2002). Antioxidant pathways in human aged skeletal muscle: relationship with the distribution of type II fibers. *Exp. Gerontol.* 37, 1069–1075.
- Parat, M.O., and Fox, P.L. (2001). Palmitoylation of caveolin-1 in endothelial cells is post-translational but irreversible. *J. Biol. Chem.* 276, 15776–15782.
- Park, D.S., Cohen, A.W., Frank, P.G., Razani, B., Lee, H., Williams, T.M., Chandra, M., Shirani, J., De Souza, A.P., Tang, B., *et al.* (2003). Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 15124–15131.
- Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J.A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P.E., Mora, R., *et al.* (1999). Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J. Biol. Chem.* 274, 25718–25725.
- Parpal, S., Karlsson, M., Thorn, H., and Strålfors, P. (2001). Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol. Chem.* 276, 9670–9678.
- Parton, R.G., and del Pozo, M.A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 98–112.
- Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185–194.
- Parton, R.G., Way, M., Zorzi, N., and Stang, E. (1997). Caveolin-3 Associates with Developing T-tubules during Muscle Differentiation. *J. Cell Biol.* 136, 137–154.
- Parton, R.G., Hanzal-Bayer, M., and Hancock, J.F. (2006). Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J. Cell Sci.* 119, 787–796.

- Pascariu, M., Bendayan, M., and Ghitescu, L. (2004). Correlated endothelial caveolin overexpression and increased transcytosis in experimental diabetes. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *52*, 65–76.
- Patel, H.H., and Insel, P.A. (2009). Lipid Rafts and Caveolae and Their Role in Compartmentation of Redox Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 1357–1372.
- Patel, H.H., Zhang, S., Murray, F., Suda, R.Y.S., Head, B.P., Yokoyama, U., Swaney, J.S., Niesman, I.R., Schermuly, R.T., Pullamsetti, S.S., *et al.* (2007). Increased smooth muscle cell expression of caveolin-1 and caveolae contribute to the pathophysiology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *21*, 2970–2979.
- Pelkmans, L., and Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* *436*, 128–133.
- Pelley, J.W. (2011). Elsevier's Integrated Review Biochemistry: with STUDENT CONSULT Online Access (Elsevier Health Sciences).
- Perrini, S., Laviola, L., Carreira, M.C., Cignarelli, A., Natalicchio, A., and Giorgino, F. (2010). The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J. Endocrinol.* *205*, 201–210.
- Pesce, V., Cormio, A., Fracasso, F., Vecchiet, J., Felzani, G., Lezza, A.M., Cantatore, P., and Gadaleta, M.N. (2001). Age-related mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* *30*, 1223–1233.
- Pham, F.H., Sugden, P.H., and Clerk, A. (2000). Regulation of Protein Kinase B and 4E-BP1 by Oxidative Stress in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* *86*, 1252–1258.
- Pickering, A.M., and Davies, K.J.A. (2012). Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *109*, 227–248.
- Pirlich, M., Schütz, T., Norman, K., Gastell, S., Lübke, H.J., Bischoff, S.C., Bolder, U., Frieling, T., Gülden-zoph, H., Hahn, K., *et al.* (2006). The German hospital malnutrition study. *Clin. Nutr.* *25*, 563–572.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E., and Parton, R.G. (2001). A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell Biol.* *152*, 1057–1070.
- Pol, A., Martin, S., Fernandez, M.A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C., and Parton, R.G. (2005). Cholesterol and Fatty Acids Regulate Dynamic Caveolin Trafficking through the Golgi Complex and between the Cell Surface and Lipid Bodies. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2091–2105.
- Poussard, S., Pires-Alves, A., Diallo, R., Dupuy, J.-W., and Dargelos, E. (2013). A natural antioxidant pine bark extract, Oligopin®, regulates the stress chaperone HSPB1 in human skeletal muscle cells: a proteomics approach. *Phytother. Res. PTR* *27*, 1529–1535.
- Powers, S.K., and Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* *88*, 1243–1276.

- Predescu, S.A., Predescu, D.N., Timblin, B.K., Stan, R.V., and Malik, A.B. (2003). Intersectin Regulates Fission and Internalization of Caveolae in Endothelial Cells. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4997–5010.
- Punga, A.R., and Ruegg, M.A. (2012). Signaling and aging at the neuromuscular synapse: lessons learnt from neuromuscular diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* *12*, 340–346.
- Puri, V., Watanabe, R., Singh, R.D., Dominguez, M., Brown, J.C., Wheatley, C.L., Marks, D.L., and Pagano, R.E. (2001). Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J. Cell Biol.* *154*, 535–547.
- Purslow, P.P. (2010). Muscle fascia and force transmission. *J. Bodyw. Mov. Ther.* *14*, 411–417.
- Quest, A.F.G., Gutierrez-Pajares, J.L., and Torres, V.A. (2008). Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J. Cell. Mol. Med.* *12*, 1130–1150.
- Quest, A.F.G., Lobos-González, L., Nuñez, S., Sanhueza, C., Fernández, J.-G., Aguirre, A., Rodríguez, D., Leyton, L., and Torres, V. (2013). The caveolin-1 connection to cell death and survival. *Curr. Mol. Med.* *13*, 266–281.
- Razani, B., and Lisanti, M.P. (2001). Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *281*, C1241–C1250.
- Razani, B., Engelman, J.A., Wang, X.B., Schubert, W., Zhang, X.L., Marks, C.B., Macaluso, F., Russell, R.G., Li, M., Pestell, R.G., *et al.* (2001). Caveolin-1 Null Mice Are Viable but Show Evidence of Hyperproliferative and Vascular Abnormalities. *J. Biol. Chem.* *276*, 38121–38138.
- Razani, B., Woodman, S.E., and Lisanti, M.P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* *54*, 431–467.
- Rebrin, I., Zicker, S., Wedekind, K.J., Paetau-Robinson, I., Packer, L., and Sohal, R.S. (2005). Effect of antioxidant-enriched diets on glutathione redox status in tissue homogenates and mitochondria of the senescence-accelerated mouse. *Free Radic. Biol. Med.* *39*, 549–557.
- Reid, M.B., and Li, Y.-P. (2001). Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir. Res.* *2*, 269–272.
- Reid, M.B., Shoji, T., Moody, M.R., and Entman, M.L. (1992). Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *73*, 1805–1809.
- Remels, A.H.V., Langen, R.C.J., Schrauwen, P., Schaart, G., Schols, A.M.W.J., and Gosker, H.R. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* *315*, 113–120.
- Remillard, C.V., and Yuan, J.X.-J. (2006). Transient Receptor Potential Channels and Caveolin-1: Good Friends in Tight Spaces. *Mol. Pharmacol.* *70*, 1151–1154.

- Renault, V., Thornell, L.-E., Eriksson, P.-O., Butler-Browne, G., Mouly, V., and Thorne, L.-E. (2002a). Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging Cell* *1*, 132–139.
- Renault, V., Thornell, L.-E., Butler-Browne, G., and Mouly, V. (2002b). Human skeletal muscle satellite cells: aging, oxidative stress and the mitotic clock. *Exp. Gerontol.* *37*, 1229–1236.
- Richter, C. (1987). Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids* *44*, 175–189.
- Rossi, P., Marzani, B., Giardina, S., Negro, M., and Marzatico, F. (2008). Human Skeletal Muscle Aging and the Oxidative System: Cellular Events. *Curr. Aging Sci.* *1*, 182–191.
- Rothberg, K.G., Ying, Y.S., Kamen, B.A., and Anderson, R.G. (1990). Cholesterol controls the clustering of the glycosphospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell Biol.* *111*, 2931–2938.
- Roubenoff, R. (2007). Physical activity, inflammation, and muscle loss. *Nutr. Rev.* *65*, S208–S212.
- Ryan, M.J., Dudash, H.J., Docherty, M., Geronilla, K.B., Baker, B.A., Haff, G.G., Cutlip, R.G., and Alway, S.E. (2010). Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Exp. Gerontol.* *45*, 882–895.
- Sanguinetti, A.R., Cao, H., and Corley Mastick, C. (2003). Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *Biochem. J.* *376*, 159–168.
- Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Tang, Z., Kübler, E., Song, K.S., Sanders, M.C., and Lisanti, M.P. (1995). Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 9407–9411.
- Scheiffele, P., Verkade, P., Fra, A.M., Virta, H., Simons, K., and Ikonen, E. (1998). Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J. Cell Biol.* *140*, 795–806.
- Scherer, P.E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H.F., and Lisanti, M.P. (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 131–135.
- Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D.S., van Donselaar, E., Peters, P., and Lisanti, M.P. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* *272*, 29337–29346.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* *91*, 1447–1531.
- Schlegel, A., and Lisanti, M.P. (2000). A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain

mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *J. Biol. Chem.* 275, 21605–21617.

Schmalbruch, H., and Lewis, D.M. (2000). Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 23, 617–626.

Schnitzer, J.E., Oh, P., Jacobson, B.S., and Dvorak, A.M. (1995). Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1759–1763.

Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S., and Suetsugu, S. (2011). Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *J. Cell Sci.* 124, 2032–2040.

Sens, P., and Turner, M.S. (2006). Budded membrane microdomains as tension regulators. *Phys. Rev. E* 73, 031918.

Shang, F., and Taylor, A. (2011). Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 5–16.

Sharma, D.K., Brown, J.C., Cheng, Z., Holicky, E.L., Marks, D.L., and Pagano, R.E. (2005). The glycosphingolipid, lactosylceramide, regulates beta1-integrin clustering and endocytosis. *Cancer Res.* 65, 8233–8241.

Shaw, A.C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A., and Lord, J.M. (2010). Aging of the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 507–513.

Shvets, E., Ludwig, A., and Nichols, B.J. (2014). News from the caves: update on the structure and function of caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* 29C, 99–106.

Shyng, S.L., Heuser, J.E., and Harris, D.A. (1994). A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* 125, 1239–1250.

Siebel, A., Cubillos-Rojas, M., Santos, R.C., Schneider, T., Bonan, C.D., Bartrons, R., Ventura, F., Rodrigues de Oliveira, J., and Rosa, J.L. (2013). Contribution of S6K1/MAPK signaling pathways in the response to oxidative stress: activation of RSK and MSK by hydrogen peroxide. *PloS One* 8, e75523.

Simone, L.C., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2014). Scratching the surface: actin' and other roles for the C-terminal Eps15 homology domain protein, EHD2. *Histol. Histopathol.* 29, 285–292.

Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R.V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., *et al.* (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 144, 402–413.

Smart, E.J., Ying, Y.S., Conrad, P.A., and Anderson, R.G. (1994). Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell Biol.* 127, 1185–1197.

Smythe, G.M., Eby, J.C., Disatnik, M.-H., and Rando, T.A. (2003). A caveolin-3 mutant that causes limb girdle muscular dystrophy type 1C disrupts Src localization and activity and induces apoptosis in skeletal myotubes. *J. Cell Sci.* 116, 4739–4749.

- Song, K.S., Tang, Z., Li, S., and Lisanti, M.P. (1997). Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin interactions. *J. Biol. Chem.* 272, 4398–4403.
- Sotgia, F., Lee, J.K., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T.C., Macioce, P., Sargiacomo, M., Bricarelli, F.D., Minetti, C., Sudol, M., *et al.* (2000). Caveolin-3 Directly Interacts with the C-terminal Tail of β -Dystroglycan IDENTIFICATION OF A CENTRAL WW-LIKE DOMAIN WITHIN CAVEOLIN FAMILY MEMBERS. *J. Biol. Chem.* 275, 38048–38058.
- Spiteller, G. (2001). Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp. Gerontol.* 36, 1425–1457.
- Stadtman, E.R., and Oliver, C.N. (1991). Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 266, 2005–2008.
- Stevens, A., and Lowe, J. (1997). *Histologie humaine (De Boeck Supérieur)*.
- Stoeber, M., Stoeck, I.K., Hänni, C., Bleck, C.K.E., Balistreri, G., and Helenius, A. (2012). Oligomers of the ATPase EHD2 confine caveolae to the plasma membrane through association with actin. *EMBO J.* 31, 2350–2364.
- Stoppani, E., Rossi, S., Meacci, E., Penna, F., Costelli, P., Bellucci, A., Faggi, F., Maiolo, D., Monti, E., and Fanzani, A. (2011a). Point mutated caveolin-3 form (P104L) impairs myoblast differentiation via Akt and p38 signalling reduction, leading to an immature cell signature. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1812, 468–479.
- Stoppani, E., Rossi, S., Meacci, E., Penna, F., Costelli, P., Bellucci, A., Faggi, F., Maiolo, D., Monti, E., and Fanzani, A. (2011b). Point mutated caveolin-3 form (P104L) impairs myoblast differentiation via Akt and p38 signalling reduction, leading to an immature cell signature. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 468–479.
- Stuelsatz, P., Pouzoulet, F., Lamarre, Y., Dargelos, E., Poussard, S., Leibovitch, S., Cottin, P., and Veschambre, P. (2010). Down-regulation of MyoD by calpain 3 promotes generation of reserve cells in C2C12 myoblasts. *J. Biol. Chem.* 285, 12670–12683.
- Sundivakkam, P.C., Kwiatek, A.M., Sharma, T.T., Minshall, R.D., Malik, A.B., and Tiruppathi, C. (2009). Caveolin-1 scaffold domain interacts with TRPC1 and IP3R3 to regulate Ca²⁺ store release-induced Ca²⁺ entry in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C403–C413.
- Surampudi, P.N., Wang, C., and Swerdloff, R. (2012). Hypogonadism in the Aging Male Diagnosis, Potential Benefits, and Risks of Testosterone Replacement Therapy. *Int. J. Endocrinol.* 2012, e625434.
- Tagawa, A., Mezzacasa, A., Hayer, A., Longatti, A., Pelkmans, L., and Helenius, A. (2005). Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J. Cell Biol.* 170, 769–779.
- Tagawa, M., Ueyama, T., Ogata, T., Takehara, N., Nakajima, N., Isodono, K., Asada, S., Takahashi, T., Matsubara, H., and Oh, H. (2008). MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C490–C498.

- Tajbakhsh, S. (2009). Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J. Intern. Med.* 266, 372–389.
- Tang, Z., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D.S., Nishimoto, I., Lodish, H.F., and Lisanti, M.P. (1996). Molecular Cloning of Caveolin-3, a Novel Member of the Caveolin Gene Family Expressed Predominantly in Muscle. *J. Biol. Chem.* 271, 2255–2261.
- Terrill, J.R., Radley-Crabb, H.G., Iwasaki, T., Lemckert, F.A., Arthur, P.G., and Grounds, M.D. (2013). Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J.* 280, 4149–4164.
- Thiele, C., Hannah, M.J., Fahrenholz, F., and Huttner, W.B. (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.* 2, 42–49.
- Touzet, O., and Philips, A. (2010). Resveratrol protects against protease inhibitor-induced reactive oxygen species production, reticulum stress and lipid raft perturbation. *AIDS Lond. Engl.* 24, 1437–1447.
- Trane, A.E., Pavlov, D., Sharma, A., Saqib, U., Lau, K., van Petegem, F., Minshall, R.D., Roman, L.J., and Bernatchez, P.N. (2014). Deciphering the binding of caveolin-1 to client protein endothelial nitric-oxide synthase (eNOS): scaffolding subdomain identification, interaction modeling, and biological significance. *J. Biol. Chem.* 289, 13273–13283.
- Turrina, A., Martínez-González, M.A., and Stecco, C. (2013). The muscular force transmission system: role of the intramuscular connective tissue. *J. Bodyw. Mov. Ther.* 17, 95–102.
- Ushio-Fukai, M. (2006). Localizing NADPH Oxidase-Derived ROS. *Sci. Signal.* 2006, re8–re8.
- Vaghy, P.L., Fang, J., Wu, W.R., and Vaghy, L.P. (1998). Increased caveolin-3 levels in mdx mouse muscles. *Febs Lett.* 431, 125–127.
- Valls, M.R.B., Wilkinson, D.J., Narici, M.V., Smith, K., Phillips, B.E., Caporossi, D., and Atherton, P.J. (2014). Protein Carbonylation and Heat Shock Proteins in Human Skeletal Muscle: Relationships to Age and Sarcopenia. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* glu007.
- Vander, A.J. (2013). *Physiologie humaine : les mécanismes du fonctionnement de l'organisme* (Chenelière éducation).
- Vandervoort, A.A. (2002). Aging of the human neuromuscular system. *Muscle Nerve* 25, 17–25.
- Vilhardt, F., and van Deurs, B. (2004). The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *EMBO J.* 23, 739–748.
- Vinten, J., Voldstedlund, M., Clausen, H., Christiansen, K., Carlsen, J., and Tranum-Jensen, J. (2001). A 60-kDa protein abundant in adipocyte caveolae. *Cell Tissue Res.* 305, 99–106.
- Vinten, J., Johnsen, A.H., Roepstorff, P., Harpøth, J., and Tranum-Jensen, J. (2005). Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1717, 34–40.

- Volonte, D., and Galbiati, F. (2009). Inhibition of thioredoxin reductase 1 by caveolin 1 promotes stress-induced premature senescence. *EMBO Rep.* *10*, 1334–1340.
- Volonte, D., Peoples, A.J., and Galbiati, F. (2003). Modulation of Myoblast Fusion by Caveolin-3 in Dystrophic Skeletal Muscle Cells: Implications for Duchenne Muscular Dystrophy and Limb-Girdle Muscular Dystrophy-1C. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4075–4088.
- Volonte, D., Liu, Y., and Galbiati, F. (2005). The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 237–239.
- Volonte, D., Liu, Z., Musille, P.M., Stoppani, E., Wakabayashi, N., Di, Y.-P., Lisanti, M.P., Kensler, T.W., and Galbiati, F. (2013). Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence. *Mol. Biol. Cell* *24*, 1852–1862.
- Walser, P.J., Ariotti, N., Howes, M., Ferguson, C., Webb, R., Schwudke, D., Leneva, N., Cho, K.-J., Cooper, L., Rae, J., *et al.* (2012). Constitutive Formation of Caveolae in a Bacterium. *Cell* *150*, 752–763.
- Way, M., and Parton, R.G. (1995). M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* *376*, 108–112.
- Whiteley, G., Collins, R.F., and Kitmitto, A. (2012). Characterization of the molecular architecture of human caveolin-3 and interaction with the skeletal muscle ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* *287*, 40302–40316.
- Williams, I.A., and Allen, D.G. (2007). The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *293*, H1969–H1977.
- Williams, J.J.L., and Palmer, T.M. (2014). Cavin-1: caveolae-dependent signalling and cardiovascular disease. *Biochem. Soc. Trans.* *42*, 284–288.
- Williams, T.M., and Lisanti, M.P. (2004). The caveolin proteins. *Genome Biol.* *5*, 214.
- Won, H., Lim, S., Jang, M., Kim, Y., Rashid, M.A., Jyothi, K.R., Dashdorj, A., Kang, I., Ha, J., and Kim, S.S. (2012). Peroxiredoxin-2 upregulated by NF- κ B attenuates oxidative stress during the differentiation of muscle-derived C2C12 cells. *Antioxid. Redox Signal.* *16*, 245–261.
- Woodman, S.E., Park, D.S., Cohen, A.W., Cheung, M.W.-C., Chandra, M., Shirani, J., Tang, B., Jelicks, L.A., Kitsis, R.N., Christ, G.J., *et al.* (2002). Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J. Biol. Chem.* *277*, 38988–38997.
- Wu, Y., Sadatmousavi, P., Wang, R., Lu, S., Yuan, Y., and Chen, P. (2012). Self-assembling peptide-based nanoparticles enhance anticancer effect of ellipticine in vitro and in vivo. *Int. J. Nanomedicine* *7*, 3221–3233.
- Yaffe, D., and Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* *270*, 725–727.

- Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *1*, 445–458.
- Yang, B., and Rizzo, V. (2007). TNF-alpha potentiates protein-tyrosine nitration through activation of NADPH oxidase and eNOS localized in membrane rafts and caveolae of bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *292*, H954–H962.
- Yang, G., Addai, J., Wheeler, T.M., Frolov, A., Miles, B.J., Kadmon, D., and Thompson, T.C. (2007). Correlative evidence that prostate cancer cell-derived caveolin-1 mediates angiogenesis. *Hum. Pathol.* *38*, 1688–1695.
- Yao, Y., Hong, S., Zhou, H., Yuan, T., Zeng, R., and Liao, K. (2009). The differential protein and lipid compositions of noncaveolar lipid microdomains and caveolae. *Cell Res.* *19*, 497–506.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* *93*, 23–67.
- Yu, J., Xiao, Y., Liu, J., Ji, Y., Liu, H., Xu, J., Jin, X., Liu, L., Guan, M.-X., and Jiang, P. (2014). Loss of MED1 triggers mitochondrial biogenesis in C2C12 cells. *Mitochondrion* *14*, 18–25.
- Zhang, H., and Forman, H.J. (2012). Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 722–728.
- Zhou, L.Z.-H., Johnson, A.P., and Rando, T.A. (2001). NFκB and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* *31*, 1405–1416.
- Zhu, H., Lin, P., De, G., Choi, K., Takeshima, H., Weisleder, N., and Ma, J. (2011). Polymerase transcriptase release factor (PTRF) anchors MG53 protein to cell injury site for initiation of membrane repair. *J. Biol. Chem.* *286*, 12820–12824.
- Zuo, L., Christofi, F.L., Wright, V.P., Bao, S., and Clanton, T.L. (2004). Lipoxygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *97*, 661–668.
- (1989). Epidemiologic and methodologic problems in determining nutritional status of older persons. Proceedings of a conference. Albuquerque, New Mexico, October 19-21, 1988. *Am. J. Clin. Nutr.* *50*, 1121–1235.

ANNEXE

1 **Oxidative stress induces caveolin 1 degradation and impairs caveolae functions in**
2 **skeletal muscle cells.**

3

4 Alexis Mougeolle^a, Sylvie Poussard^a, Marion Decossas^a, Christophe Lamaze^b, Olivier
5 Lambert^{a, #}, Elise Dargelos^{a, #, *}

6

7 ^a Univ Bordeaux, CBMN, UMR 5248, F-33600 Pessac, France

8 CNRS, CBMN, UMR 5248, F-33600 Pessac, France

9 Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, F-33600 Pessac, France

10 ^b Institut Curie - Centre de Recherche, Membrane Dynamics and Mechanics of Intracellular
11 Signaling Team, INSERM U1143, CNRS UMR 3666, Paris, France

12

13 * corresponding author: dargelos@enscbp.fr

14 [#] both authors contributed equally to this work

15

16

17 Abstract

18 Increased level of oxidative stress, a major actor of cellular aging, impairs the regenerative
19 capacity of skeletal muscle and leads to the reduction in the number and size of muscle fibers
20 causing sarcopenia. Caveolin 1 (Cav1) is the major component of caveolae, small membrane
21 invaginations involved in signaling and endocytic trafficking. Their role has recently
22 expanded to mechanosensing and to the regulation of oxidative stress-induced pathways.
23 Here, we increased the amount of reactive oxidative species in myoblasts by addition of
24 hydrogen peroxide (H₂O₂) at non-toxic concentrations. The expression level of Cav 1 was
25 significantly decreased as early as 10 min after 500 μM H₂O₂ treatment. This reduction was
26 not observed in the presence of a proteasome inhibitor, suggesting that caveolin 1 was rapidly
27 degraded by the proteasome. In spite of caveolin 1 decrease, caveolae were still able to
28 assemble at the plasma membrane. Their functions however were significantly perturbed by
29 oxidative stress. Endocytosis of a ceramide analog monitored by flow cytometry was
30 significantly diminished after H₂O₂ treatment, indicating that oxidative stress impaired its
31 selective internalization via caveolae. The contribution of caveolae to the plasma membrane
32 reservoir has been monitored after osmotic cell swelling. H₂O₂ treatment increased membrane
33 fragility revealing that treated cells were more sensitive to an acute mechanical stress.
34 Altogether, our results indicate that H₂O₂ decreased Cav 1 expression and impaired caveolae
35 functions. These data give news insights on age-related deficiencies in skeletal muscle.

36

37 Introduction

38

39 Aging is characterized by the deterioration of many physiological functions leading to the
40 development of multiple diseases (cardiovascular and neurodegenerative diseases, diabetes,
41 cancer...). Aging of the skeletal muscle (i.e. sarcopenia) comes with an involuntary and
42 physiological loss of muscle mass and strength [1, 2]. It affects all elderly after the age of
43 about 50, regardless of their overall health condition. Sarcopenia can deprive people of their
44 functional independence, and increase their risk of falls and fractures [3]. With the constant
45 extension of lifespan in the western civilizations, sarcopenia will dramatically impact on
46 quality of life and place ever-increasing demands on public health care [4].

47 Sarcopenia is a multifactorial syndrome probably resulting from a nutritional and hormonal
48 imbalance and a lack of physical exercise occurring with age [5, 6, 7]. At the cellular level,
49 the reduction in the number and size of muscle fibers could be explained by the impairment of
50 muscle regeneration, i.e. alteration of myogenic regenerative cells or satellite cells and
51 deregulation of the differentiation process [8].

52 Oxidative damage has been proposed as one of the major contributors to the skeletal muscle
53 aging, this organ being the most oxygenized of the body [9]. Recently, increased reactive
54 oxygen species (ROS) accumulation has been clearly shown in skeletal muscle of old mice
55 [10]. Among the pleiotropic effects of ROS intracellular accumulation, a failure of myogenic
56 regenerative process has been clearly indicated [11].

57

58 Caveolae are 50-100 nm invaginations of the plasma membrane with a lipid composition rich
59 in cholesterol and sphingolipids strongly related to lipid rafts [12]. Caveolin (21 to 23 kDa),
60 the main constituent of caveolae has three isoforms. The caveolin 1 and 2 are co-expressed in
61 many tissues and in particular in differentiated cells such as endothelial cells, adipocytes,

62 fibroblasts and type I pneumocytes, while caveolin 3 is a muscle-specific protein. Caveolins 1
63 and 3 as well as a specific lipid environment (cholesterol, glycosphingolipids) are required for
64 the formation of caveolae. More recently, another family of cytoplasmic proteins has been
65 identified as key regulators of caveolae formation. Cavins would stabilize caveolin oligomers
66 at the plasma membrane [13]. Recently, it was shown that caveolin assembles with cavins to
67 organize a distinct coat around the caveolar bulb [14].

68 Caveolae have been linked to multiple functions including vesicular transport, cholesterol and
69 calcium homeostasis...More recently caveolae have been shown to constitute a plasma
70 membrane “reservoir” that is mobilized under mechanical stress conditions [15]. Through
71 their Caveolin Scaffolding Domain (CSD) caveolins would allow specific interactions with
72 signaling effectors localized in caveolae and would activate or inhibit their signaling activity.
73 This would allow caveolae to act as “cell signaling platforms” [16].

74 In skeletal muscle, caveolae play a specific role related to the differentiation of myogenic
75 regenerative cells and maintain the contractile unit of differentiated muscle. High numbers of
76 caveolae have been identified in muscle fibers from Duchenne muscular dystrophy, whereas
77 mutations in the caveolin 3 gene cause multiple forms of muscle pathologies [17, 18].
78 Although caveolae have been largely linked to muscle physiology, little is known about the
79 potential role of the caveolins / caveolae in the etiology of sarcopenia. However, caveolae
80 internalization has been recently shown to trigger plasma membrane repair in muscle fibers
81 [19] and caveolin 1 interaction with Nrf2 transcription factor would be involved in the
82 regulation of cell antioxidant defenses [20]. Caveolae / caveolins could therefore be
83 implicated in the regulation of cellular processes associated with skeletal muscle aging.

84 In this paper, we showed that oxidative stress induction by addition of hydrogen peroxide
85 (H₂O₂) results in Cav 1 rapid degradation in proliferative mouse myoblasts. Surprisingly, the
86 decrease in caveolin 1 did not result in decreased caveolae assembly at the plasma membrane.

87 However, the induction of oxidative stress severely impaired two classical caveolae-specific
88 functions: endocytosis and adaptation to mechanical stress. Altogether, these data indicate
89 that Cav 1 and caveolae-dependent functions are involved in the mediation of oxidative
90 stress-induced signaling pathways in muscle during ageing.

91

92 **Materials and Methods**

93 **Materials**

94 DMEM, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, trypsin / EDTA, PrestoBlue Cell
95 Viability Assay[®] and Bodipy-Lactosylceramide-BSA were purchased from Life Technology.
96 DCFDA cellular reactive oxygen species detection assay kit was purchased from Abcam. The
97 Protein Carbonyl Assay kit was from Cayman Chemical Company. ECL Prime Western Blot
98 detection kit was from GE Healthcare. Rabbit anti-caveolin 1 and anti-cavin 1 were purchased
99 from Abcam. Anti-p38 α and anti-calnexin antibodies were from Santacruz Biotechnology.
100 Anti-golgin antibodies were from Molecular probes. Endocytosis specific inhibitors were
101 purchased from Merck. The caveolin 1 specific siRNA, the negative control, lipofectamine
102 and Opti-MEM were purchased from Invitrogen. Alexa-fluor conjugated secondary antibodies
103 were from Invitrogen also. All other chemicals were from Sigma.

104 **Cell culture**

105 The C₂C₁₂ mouse myoblast cells were obtained from the American Type Culture Collection
106 (Rockville, MD, USA). They were seeded at a density of 6000 cells per cm² in Dulbecco
107 modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) supplemented with fetal calf serum
108 (10%) and penicillin / streptomycin (50 U/mL, 50 μ g/mL) at 37°C in a humidified incubator
109 (5% CO₂). Cells were allowed to reach 80% confluence before being treated as described
110 below.

111 **Western blotting**

112 Cells were collected in PBS Buffer (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM
113 KH₂PO₄ pH 7.4 and a protease inhibitor tablet cocktail) and disrupted by brief sonication.
114 Protein content was quantified with Bradford assay.

115 The samples (15 μ g of protein) were applied onto 10% SDS-PAGE according to the Laemmli
116 procedure [21]. Fractionated proteins were then transferred onto an Immobilon membrane.
117 The membranes were blocked for 2 h at room temperature with 5% (w/v) skimmed milk in
118 Tris-Buffered Saline / 0.1% Tween 20 (TBS: 50 mM Tris buffer, pH 8, 138 mM NaCl, and
119 2.7 mM KCl). After washing in TBS-T, the membranes were incubated for 2 h at room
120 temperature in TBS-T containing the primary antibody at appropriate concentrations and 1%
121 skimmed milk. Antibody dilutions were used as follows: 1:250000 for caveolin 1, 1:1000 for
122 p38 α , 1:1000 for cavin 1, 1:1000 for golgin and 1:250 for calnexin. The membranes were
123 next washed three times in TBS-T and the peroxidase conjugated anti-rabbit secondary
124 antibodies were applied (1:50000). Antibody binding was visualized by the addition of ECL
125 Prime detection kit as described by the manufacturer. The level of p38 α was used as a loading
126 control as usually done in other studies related to oxidative stress [22, 23].

127

128 Cell survival analysis

129 Myoblasts were seeded in 96 well plates (25000 cells / well). The following day, cells were
130 incubated with H₂O₂ (500 or 1000 μ M) during 10 min to 6 h. To determine cell survival,
131 PrestoBlue Cell Viability Assay[®] was carried out following the manufacturer's protocol. Cells
132 were rinsed with PBS and incubated 1 h at 37°C in the reagent diluted in DMEM (1/10).
133 Fluorescence intensity was measured with a fluorescence plate reader (TRIAD LT detector
134 from Dynex ; λ_{exc} = 560 nm ; λ_{em} = 590 nm). Each condition was done in triplicate.

135

136 Intracellular ROS accumulation

137 Intracellular reactive oxygen species were measured with the cell-permeant fluorogenic dye
138 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) as recommended by the manufacturer.
139 Myoblasts were plated at a density of 25000 cells per well in 96 well plates in DMEM

140 without phenol red. The following day cells were labeled with DCFDA (25 μ M) 45 min at
141 37°C and treated with 0, 500 or 1000 μ M H₂O₂ for 10 min to 1 h. Fluorescence intensity was
142 measured with a fluorescence plate reader (TRIAD LT detector from Dynex; λ_{exc} = 485 nm ;
143 λ_{em} = 535 nm). Each condition was done in triplicate.

144

145 Carbonyl protein assay

146 Protein carbonyls were determined by measuring the reactivity of carbonyl derivatives with 2,
147 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) with the Protein Carbonyl Assay kit as described by the
148 manufacturer. After 3 h treatment with H₂O₂, cells were scraped out, briefly sonicated and
149 centrifuged 15 min at 10000g. Supernatants were incubated with DNPH for 1h in the dark.
150 Proteins were precipitated with TCA, washed with ethanol-ethyl acetate (1: 1) and suspended
151 in guanidine hydrochloride. After a 10000g centrifugation, supernatants were disposed in 96
152 well plates and absorbance was measured at 370 nm. Each condition was done in duplicate.

153

154 Sucrose density fractionation

155 Caveolae were isolated as described previously [24] with minor modifications. Six 100 mm
156 culture dishes were used for each sucrose gradient. Cells were washed twice with ice-cold
157 PBS and scraped. They were collected by centrifugation (1000g), dispersed in 300 μ l cold
158 buffer A (10 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 mM NaN₃ and protease
159 inhibitor cocktail) supplemented with 250 mM sucrose and containing 1% Triton X-100.
160 Cells were disrupted with a 22 G needle (20 strokes). The homogenate was then adjusted to
161 45% sucrose by addition of 2.16 M sucrose prepared in buffer A. The sample (890 μ L) was
162 transferred to the bottom of a 5 ml centrifuge tube that contained two layers of 5 and 30 %
163 sucrose (625 μ L and 3,48 mL respectively). After centrifugation (17 h, 200000g, in a

164 Beckman MLS-50 rotor at 4°C), ten fractions of 0.5 mL were collected from the top of the
165 gradient to the bottom and used for further analyses.

166 Fraction 2 of the sucrose gradient was diluted three times in buffer A and centrifuged at
167 100000g for one hour. The caveolae fraction was isolated from the resulting pellet and used
168 for immune electron microscopy as indicated below.

169

170 Electron microscopy

171 Immune electron microscopy (IEM) was performed on vesicles deposited on carbon coated
172 nickel grids submitted to a glow discharge (Elmo, Cordouan). Briefly, grids were labelled
173 with a polyclonal anti-caveolin 1 antibody (20 µg/ml, Santa Cruz) followed by the protein-A
174 coupled to 10 nm colloidal gold particles (CMC Utrecht). They were finally negative stained
175 using 4% uranyl acetate.

176 For myoblast observations, cells were embedded by conventional method in resin. Briefly,
177 they were fixed using 1.6% (v/v) glutaraldehyde, post-fixed using 1% (v/v) osmium tetroxide,
178 dehydrated in ascending series of ethanol dilutions and in propylene oxide and embedded in
179 Epon (Inland Europe). Ultra-thin sections (70 nm) (RMC, power tome PC) were collected on
180 butvar-coated single-slot copper grids and stained with 2% (v/v) uranyl acetate and with lead
181 citrate. IEM was performed for caveolin 1 detection using the preembedding immunogold
182 technique according to Decossas et al. [25]. Cells were fixed using 4% formaldehyde during 1
183 h, incubated in glycine 50 mM and permeabilized using saponin 0.1% for 3 min. Cells were
184 blocked using 1% BSA, incubated in a polyclonal anti-caveolin 1 antibody 20 µg/ml, Santa
185 Cruz and then in goat anti-rabbit IgGs conjugated to ultra-small gold particles (0.8 nm in
186 diameter; Aurion; The Netherlands, 1:100 in PBS / bovine serum albumin [BSA]-C). Cells
187 were then post-fixed in 1% glutaraldehyde and finally the diameter of the gold
188 immunoparticles was increased by using a silver enhancement kit (HQ silver; Nanoprobes).

189 After post-fixation in 1% osmium tetroxide for 10 min, cells were embedded in Epon as
190 described previously. Observations were done with a CM120 TEM microscope (FEI) using
191 2k x 2k USC1000 slow-scan CCD camera (Gatan, CA, USA).

192

193 Epifluorescence and TIRF microscopy

194 C2C12 cells grown on glass coverslips were washed three times with PBS and fixed for 15
195 min with paraformaldehyde (4% w/v in PBS). Cells were then permeabilized for 5 min with
196 PBS containing Triton X-100 (1%) and blocked in PBS containing 3% BSA for 1 h. Caveolin
197 1 antibody (dilution 1:300) was incubated during 3h in PBS with 1% BSA. Cells were rinsed
198 three times before addition of Alexa-conjugated anti-rabbit antibodies (dilution 1:1000). After
199 being washed, cells were incubated for 5 min with Hoechst (diluted 1:1000 in PBS) washed
200 and placed in mounting medium (Dako). Cells were observed on epifluorescence microscope
201 using Leica DMI6000B with CCD camera (6.45 μm pixel dimension, 1392 x 1040 pixels,
202 Leica) or using a Nikon Ti-Eclipse with EM CCD camera (16 μm pixel dimension, 512 x 512
203 pixels, Photometrics Evolve) for TIRF images.

204

205 Caveolae-mediated endocytosis

206 Cells were seeded at a density of 15 000 cells / cm^2 in 12 wells plates and allowed to adhere
207 for 24 h in growth medium before analysis. One hour after H_2O_2 treatment, cells were rinsed
208 once with DMEM without phenol red, incubated with 0.25 μM Bodipy-Lactosylceramide-
209 BSA during 30 min at 10°C, rinsed twice with DMEM on ice and incubated 10 min at 37°C to
210 induce endocytosis. To measure the energy-independent uptake, cells were pre-incubated for
211 30 min in DMEM without glucose supplemented with 10 mM sodium azide and 20 mM 2-
212 deoxy D-glucose prior to Bodipy LacCer exposure. To selectively inhibit endocytosis routes,
213 cells were pre-incubated 30 min with 15 μM chlorpromazine (clathrin-mediated endocytosis),

214 200 μ M genistein (caveolae-dependent endocytosis) or 5 μ M cytochalasin D (actin-dependent
215 macropinocytosis) before Bodipy LacCer addition. Fluorescent lipids potentially present on
216 the cell surface were removed by three washes of 10 min with delipidated BSA at 10°C. Cells
217 were immediately trypsinized and collected for flow cytometry analysis.

218 Samples were analyzed on a BD Biosciences CANTO flow cytometer with a DIVA software
219 and bodipy LacCer was excited by a 488 nm laser. Cell debris were excluded, based on the
220 forward and side scatter characteristics of the cell population. The results are expressed as the
221 mean of cell fluorescence intensity by analyzing 10 000 cells in the gate. Experiments were
222 carried out on cell samples from three independent cultures.

223 Osmotic swelling

224 When cells reached 70 % confluence, H₂O₂ (500 μ M) or methyl-beta-cyclodextrin (5 mM)
225 was incubated during 10 or 30 min respectively in growth medium. After being rinsed three
226 times with PBS, the cells were left in hypo-osmotic medium. In order to obtain 30 mOsm,
227 sterile water was added to the culture medium (9/1 (v/v)). After 5 min incubation, cells were
228 observed under a light microscope to assess the swelling of the cells. After 30 min, cells were
229 detached from the plates by trypsin treatment and collected by a brief centrifugation. Cell
230 suspensions were mixed with an equal volume of 0.4% trypan blue. The number of
231 unstained/stained cells was counted with a Hematocytometer. Experiments were done in
232 triplicate.

233 RNAi

234 The siRNA oligomers targeting caveolin 1 (Stealth RNAi Cav1MSS273502) were purchased
235 from Invitrogen and transfected into C2C12 mouse myoblasts at 25 nM using Lipofectamine
236 RNAiMAX in Opti-MEM medium (Invitrogen) according to the manufacturer's

237 recommendations. Non-targeting siRNA (Stealth RNAi negative control duplexes, Invitrogen)
238 was used as control siRNA. Experiments were carried out 72h after transfection.

239

240 Statistical analysis

241 All data are expressed as means \pm SEM and are representative of an average of at least three
242 separate experiments. Each single experiment was conducted on separate cultures. The
243 statistical significance of the difference between groups was determined using an unpaired
244 Student's t test and a Mann-Whitney test using XLSTAT software. A value of $P < 0.05$ was
245 considered significant.

246

247

248

249 **Results**

250 **Effect of H₂O₂ on caveolin 1 expression level**

251 Caveolin 1 has been shown to interact with numerous oxidative enzymes [26, 27] and could
252 therefore be involved in the regulation of oxidative stress-induced pathways. To answer that
253 question, we first decided to determine if caveolin 1 expression level was somehow modified
254 by H₂O₂ treatment. Western blots were carried out using protein extracts from C2C12 cells
255 submitted (or not) to various concentrations of H₂O₂. As shown in figure 1, addition of 500
256 and 1000 μM H₂O₂ to the culture medium of the cells markedly decreased the expression
257 level of caveolin 1. The protein amount was about 65% of the untreated sample as soon as 10
258 min after addition of 500 μM H₂O₂. This reduced level stayed roughly unchanged for longer
259 time exposures. A more drastic decrease of caveolin 1 concentration was observed after 1000
260 μM H₂O₂ treatment, from 72 to 25% of the control between 10 min and 6 h, respectively (Fig.
261 1). Lower doses (100 and 250 μM) of hydrogen peroxide were tested under the same
262 conditions and showed no significant effect on caveolin 1 level (data not shown). These
263 results suggest that caveolin 1 is a target of oxidative damages in proliferating mouse
264 myoblasts.

265 **Effect of H₂O₂ on cell viability**

266 To determine the effect of H₂O₂ on cell viability, the PrestoBlue Cell Viability Assay[®] was
267 used as described in Materials and Methods. As shown in table 1, 500 and 1000 μM H₂O₂
268 were tested and 1000 μM H₂O₂ had the most significant effect on cell death: 82% viability
269 after 1 h, 56% after 3 h, reaching only 8% after a 6 h treatment. On the other side, after 500
270 μM H₂O₂ addition, 6 h incubation was necessary to observe a significant reduction of cell
271 viability. These results indicate that the caveolin 1 decrease induced by 500 μM H₂O₂ was

272 measured in viable cells (see table 1 and figure 1), meaning that oxidative stress does not need
273 to strongly affect the myoblast cell cycle to trigger measurable effects on caveolin 1 protein
274 level.

275 **Oxidative stress induction after H₂O₂ treatment**

276 Although H₂O₂ has already been used to induce oxidative stress in skeletal muscle cells [28,
277 29], we assessed that our experimental conditions promoted significant intracellular oxidation.
278 Reactive oxygen species (ROS) were measured with the cell-permeant fluorogenic dye 2', 7'-
279 dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). After cells were incubated with 500 or 1000 μM
280 H₂O₂, intracellular ROS content increased 4 or 6 times, respectively, as compared to the
281 untreated controls (Fig. 2). The reactive oxygen species accumulated as soon as 10 min after
282 H₂O₂ addition. After 1 h incubation with H₂O₂, an increase of ROS intracellular level was
283 observed, without being statistically relevant (Fig. 2).

284 In the meantime one of the multiple consequences of intracellular ROS accumulation was
285 evaluated by the quantification of the carbonyl content, an indicator of protein oxidation [30].
286 As shown in table 2 the amount of carbonyl groups was 0.98 nmol/mg of protein in control
287 cells, and reached 3.74 and 4.36 nmol/mg of protein after 500 or 1000 μM H₂O₂ addition,
288 respectively.

289 Both of these experiments indicated that a non-toxic H₂O₂ treatment (500 μM) of myoblasts
290 was sufficient to induce a significant intracellular oxidative stress.

291 **H₂O₂-induced degradation of caveolin 1 via the proteasome pathway**

292 Caveolin 1 expression level decreased very promptly (10 min) after H₂O₂ addition to the cells
293 (Fig. 1). This quick disappearance rather favors a degradation of the protein than a

294 transcriptional down-regulation. The proteasome degradation pathway has been shown to be
295 responsible for damaged proteins rapid elimination including oxidized proteins [31].
296 Therefore, we used a specific proteasome inhibitor (MG132) and measured its effect on
297 caveolin 1 level with and without H₂O₂ treatment. As shown in figure 3, when cells were
298 incubated with 50 μM MG132 3 h before adding 500 μM H₂O₂, caveolin 1 level was not
299 different from the untreated control cells. Thus, pre-incubation with a specific proteasome
300 inhibitor prevented H₂O₂-induced caveolin 1 degradation. In addition treatment with MG132
301 alone did not affect the protein amount. These data indicate that caveolin 1 is likely rapidly
302 degraded by the proteasome-dependent pathway after H₂O₂ treatment of the cells.

303 **Influence of H₂O₂ treatment on caveolae**

304 We aimed to morphologically identify caveolae in proliferating myoblasts. Although cav1 1 is
305 expressed in undifferentiated muscle cells, its oligomerization into caveolae still remains
306 unclear [32, 33]. In a first set of experiments, we isolated caveolae and characterized them by
307 transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 4). The distribution of caveolin 1 was
308 determined by western-blotting within low- and high-density membrane fractions obtained by
309 sucrose density fractionation. As shown in figure 4A, caveolin 1 was present in fractions 8
310 and 9, and in the cell pellet (lane 10). The protein was also localized in the low density
311 fractions (2 and 3) corresponding to detergent-resistant membranes (DRMs) known to contain
312 caveolae as confirmed by the co-localization with cavin 1 [34, 24]. An aliquot of fraction 2
313 was observed by TEM as described in Materials and Methods. Round-shaped vesicles with an
314 average size of 80 / 100 nm and clearly delimited by lipid membranes were observed in this
315 low-density fraction of the gradient. Among these, some clearly exhibited a dense
316 immunogold labelling for caveolin 1 (figure 4B). In a second set of experiments, myoblasts
317 were directly observed by TEM. As shown in figure 5, membrane invaginations and

318 intracellular vesicles in the range of ~ 60 nm were clearly visible. Some of them were
319 decorated with gold-labelled anti-caveolin 1 antibodies. Altogether these experiments indicate
320 that Cav 1 can assemble into caveolae in C2C12 myoblasts.

321 As previously demonstrated caveolin 1 is affected by oxidative stress induction (Fig. 1). Since
322 the protein is required for caveolae assembly, we wondered whether a decrease in Cav 1 could
323 impair the formation of caveolar vesicles after H₂O₂ treatment. Myoblasts were incubated
324 with 500 μM H₂O₂ for one hour, and caveolin 1 was quantified by western blot in the
325 different fractions isolated by sucrose density gradient. As shown in figure 4A, the low
326 density caveolae-enriched fractions (2 and 3) contained similar caveolin 1-specific signal with
327 or without H₂O₂. Aliquots of fraction 2 (control and H₂O₂-treated) were characterized by
328 TEM and no obvious difference of labelling could be detected either. In parallel,
329 epifluorescence microscopy experiments were carried out as described in Material and
330 Methods. Caveolin 1 specific fluorescence did not significantly change after H₂O₂ addition to
331 the cells (Fig. 6A). To specifically address the effect of H₂O₂ on membrane caveolae, we
332 quantified the relative abundance of caveolin 1 by TIRF microscopy. As shown in figure 6B
333 and C, oxidative stress had no significant effect on Cav 1 distribution at the plasma membrane
334 of myoblasts.

335 According to these data, although H₂O₂ treatment decreased Cav 1 level, it had no significant
336 effect on caveolae assembly and membrane relative distribution in C2C12 myoblasts.

337 **Influence of H₂O₂ treatment on caveolae functions**

338 We next asked whether H₂O₂ could have consequences on two classical caveolae-mediated
339 functions: endocytosis and mechanosensing [12, 35].

340 To study the effect of H₂O₂ treatment on caveolae-specific endocytosis in C2C12 myoblasts,
341 the cellular uptake of fluorescent Bodipy Lactosylceramide was quantified by flow cytometry
342 analysis. Lactosylceramides have been shown to be specifically internalized in cells by
343 caveolae [36, 37]. As shown in figure 7C, we confirmed that genistein, which inhibits
344 caveolae-dependent endocytosis [38], significantly reduced Bodipy Laccer internalization.
345 Chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis, had no effect on intracellular
346 fluorescence intensity. Cytochalasin D however, known to impair actin dynamics and thereby
347 caveolae endocytosis, partially inhibited lactosylceramide uptake (Fig. 7C, 63% of the
348 control). As expected, when all energy-dependent mechanisms were switched-down by ATP
349 depletion (see “Deoxy” condition Fig. 7C), lactosylceramide uptake was very low as
350 compared to untreated cells (100%). After H₂O₂ addition, the intracellular relative
351 fluorescence intensity was significantly lowered (75 and 43% of the controls after addition of
352 500 and 1000 μM H₂O₂, respectively, Fig. 7). These data indicate a net decrease of caveolae-
353 dependent endocytosis of the fluorescent sphingolipid.

354 According to Sinha and co-workers, caveolae would be responsible for membrane tension
355 buffering under hypo-osmotic conditions [15]. We thus submitted myoblasts to hypo-osmotic
356 shock (30 mOsm) and measured membrane rupture 30 min later by Trypan blue staining. As
357 soon as 5 min after changing the osmolarity in the culture medium, cell swelling could be
358 easily observed by light microscopy (compare Iso and Hypo, Fig. 8A). The resulting increase
359 in membrane tension led to the rupture of myoblast membranes in 30 minutes (Fig. 8B).
360 Under milder condition (150 mOsm), cell swelling could be followed under the light
361 microscope without causing any significant damage on myoblast membranes (data not
362 shown). When oxidative stress was applied to the cells 10 min beforehand, membrane rupture
363 was significantly increased after 30 min. in 30 mOsm medium (Fig. 8B). As a positive control
364 cells were treated with β-methylcyclodextrin (β-MCD), a drug widely used to deplete

365 cholesterol and disrupt caveolae structures [39]. As shown in figure 8, β -MCD treatment
366 significantly impaired cell resistance to osmotic shock in a similar way than H_2O_2 treatment.
367 Although β -MCD can impair caveolae formation, the drug might have a more pleiotropic
368 effect in the cells. Therefore we used a specific siRNA and significantly reduced Cav 1
369 expression (80% inhibition, Fig. 8C). As shown in figure 8D, in these conditions, the cells
370 were less resistant to membrane tension increase.

371 Both of the abovementioned experiments indicated that oxidative stress induction impairs two
372 caveolae-dependent cell processes: endocytosis and membrane resistance to cell swelling.

373

374 **Discussion**

375 In this paper, we show for the first time that caveolin 1 is degraded by the proteasome after
376 oxidative stress induction in mouse myoblasts. Oxidative damage has been proposed as one of
377 the major contributors to skeletal muscle aging. When localized in satellite cells, it could be
378 responsible for the failure of myogenic regenerative process observed during muscle ageing
379 [40]. Caveolin 1 has been linked to oxidative-regulating pathways. The protein interaction
380 with several oxidative enzymes (eNOS, NOX...) is known to inhibit their specific activities
381 [41]. More recently, several authors suggested that caveolin 1 could be responsible for
382 negatively regulating antioxidant defenses in fibroblasts through its interaction with Nrf2
383 transcription factor [20, 42]. However, the effect of oxidative stress on the protein expression
384 level itself still remained controversial and clearly dependent on the cell type. While Hsieh et
385 *al.* showed that H₂O₂ treatment decreased caveolin 1 expression in cardiomyocytes, Dasari et
386 *al.* demonstrated the opposite effect of comparable doses of oxidant in epithelial cells [43,
387 44]. Here, we added 500 μM or 1000 μM H₂O₂ directly to the culture medium of myoblasts as
388 currently done [29, 45]. H₂O₂ is known to freely diffuse across cellular membranes and give
389 rise to intracellular reactive oxygen species especially in skeletal muscle [46]. Nonetheless we
390 controlled the induction of oxidative stress inside our cells by measuring ROS accumulation
391 and their consequences on proteins. ROS significantly accumulated inside the cells as soon as
392 10 min after H₂O₂ addition to the culture medium (Fig. 2). Moreover, protein carbonyls, one
393 of the most current cellular consequences of oxidative stress [30], increased 3 to 4 times after
394 H₂O₂ addition (Table 2). In a previous study carried out in rat skeletal muscle, we described
395 similar increases in carbonyl content during aging [47]. Our conditions of treatment thus
396 represent a good cellular model for studying the mechanisms involved in skeletal muscle
397 aging. Interestingly, we were able to induce a significant oxidative stress in proliferating

398 myoblasts without affecting the viability of the cells (see table 1, 500 μ M 10 min to 3h, and
399 1000 μ M 10 min).

400 Most importantly, caveolin 1 expression level was very rapidly affected after H₂O₂ addition to
401 the culture medium (10 min, Fig.1). The protein level decreased by almost 30%, similarly to
402 what Hsieh et *al.* recently described in cardiomyocytes [43]. These results suggest that the
403 protein is directly, but most remarkably, very quickly targeted by oxidative stress in
404 proliferating mouse myoblasts. According to several authors, such a rapid elimination of a
405 protein could be imputable to the proteasome, especially after oxidative injuries [31, 48]. Here
406 we showed that H₂O₂ had no longer effect on caveolin 1 expression level when cells were pre-
407 incubated with a specific proteasome inhibitor (MG132) (Fig. 3). These data confirm that
408 caveolin 1 is rapidly degraded by the proteasome-dependent pathway after H₂O₂ treatment of
409 the cells. As aforementioned, caveolin 1 would behave as a negative regulator of cellular
410 antioxidant defenses. In the light of the present data, the early degradation of the protein after
411 stress induction could then trigger the cellular antioxidant defenses.

412 During skeletal muscle differentiation and/or regeneration, caveolin 1 and 3 are sequentially
413 expressed [49]. Caveolin 1 is highly expressed in proliferating myoblasts and *cav-1* gene
414 becomes switched-off as the cells begin to fuse into multinucleated myotubes. In parallel,
415 caveolin 3 expression is up-regulated as differentiation of the myogenic cells occurs. Both
416 proteins are however absolutely necessary for caveolae biogenesis and structuration [50, 51].
417 Mutations in the *cav-3* gene or alterations of caveolin 3 expression level have been closely
418 associated with major skeletal muscle dysfunctions and pathologies (LGMD1C, DMD, ...) [17, 18].
419 On the opposite, the consequences of caveolin 1 deregulation has never been clearly
420 studied in muscle, although the protein has been largely linked to several major diseases in
421 other tissues: breast cancer, atherosclerosis...[52, 53]. Here we observed a significant loss of

422 caveolin 1 in proliferating myoblasts after intracellular stress induction. We next asked
423 whether the decrease in Cav 1 would lead to a loss of caveolae. Surprisingly, we were not
424 able to evidence any effect of H₂O₂ treatment on caveolae membrane density by TEM (Fig.
425 5), as shown before in cardiac myocytes for instance [54]. Caveolae were however too sparse
426 at the membrane in our cell type compared to cardiac tissue. We therefore combined
427 biochemical and microscopic approaches to access the information.

428 First, we looked at the ability of caveolae to assemble normally in cells submitted to oxidative
429 stress. Caveolin-containing fractions were isolated by sucrose density fractionation from
430 myoblasts treated with H₂O₂. As shown in figure 4A, Cav1 was enriched in low-density
431 fractions (2 and 3) of the gradient, as confirmed by the co-localization of Cav 1 and cavin 1.
432 Remarkably, H₂O₂ addition to the cells did not significantly affect the fractionation of Cav 1
433 between low- and high-density fractions. Whereas these data cannot rule out that the caveolae
434 relative amount was unaffected by H₂O₂, they suggest however that caveolae were still able to
435 assemble normally regardless of H₂O₂ addition. Cellular material obtained in fraction 2 was
436 also observed by TEM after Cav 1 specific labelling. As clearly seen on the pictures, H₂O₂ did
437 not affect the size of the vesicles, neither changed the relative abundance of Cav 1 per
438 caveolae (Fig. 4B).

439 Second, TIRF microscopy was carried out to follow the effect of oxidative stress on Cav 1
440 relative abundance at the plasma membrane. The specific fluorescence of the protein detected
441 at the membrane of the myoblasts stayed unchanged whether the cells were treated with 1
442 mM H₂O₂ or not (Fig. 6). The discrepancy between the strong signal monitored by TIRF
443 microscopy and the few caveolae observed in C2C12 myoblasts by TEM could be explained
444 by the conformation of the caveolae itself. Although caveolae can be present at the plasma
445 membrane, they might require an activation step to harbor the omega shape classically
446 detected by TEM [55].

447 Altogether these data indicate that H₂O₂-induced Cav 1 degradation had no significant
448 consequence on caveolae assembly and localization at the plasma membrane.

449

450 We next focused on the consequences of H₂O₂ treatment on caveolae-mediated functions. We
451 studied two caveolae-dependent cell functions: endocytosis and mechanosensing [12, 35].
452 Lactosyl-ceramides have been shown to be internalized by caveolae [36, 37]. We therefore
453 monitored caveolae endocytosis with this specific probe in an assay where internalization of
454 the fluorescent Bodipy[®] coupled lactosyl-ceramide was measured by flow cytometry analysis
455 after H₂O₂ treatment. The data nicely showed a net decrease of the intracellular fluorescence
456 as H₂O₂ increased (Fig. 7). As shown in figure 7C, when caveolae-specific endocytosis was
457 inhibited (genistein), the fluorescence intensity significantly decreased in the cells, confirming
458 the specificity of the assay. We also blocked actin dynamics with cytochalasin D, and we
459 observed a partial inhibition of the ceramide uptake (Fig. 7C) in agreement with published
460 data on cytochalasin D impairing caveolae internalization through actin depolymerization [56,
461 57]. According to our data, oxidative stress induction is likely to negatively impact caveolar
462 endocytosis.

463 Another function of caveolae has recently emerged in the literature: the maintenance of
464 plasma membrane through the constitution of a caveolae “membrane reservoir” buffering
465 membrane tension variations [15, 54]. In our experiments, we studied the effect of oxidative
466 stress on membrane tension buffering under hypo-osmotic conditions. Proliferating myoblasts
467 were submitted to hypo-osmotic shock and membrane rupture was measured by the
468 penetration of Trypan blue dye. As shown in figure 8, reducing the osmolarity in the culture
469 medium from 300 to 30 mOsm caused the rupture of myoblast membranes in 30 min. In
470 another experiment, we incubated the cells in a 150 mOsm medium and had no effect on
471 plasma membranes, although the cell swelling could be microscopically observed (data not

472 shown). As mentioned above, caveolae are able to supply the cells with “new” membranes
473 when necessary, we could therefore imagine that 30 mOsm would overcome the ability of
474 caveolae to maintain cell membrane integrity. When H₂O₂ was applied to the cells 10 min
475 beforehand, membrane rupture was significantly increased after 30 min. in 30 mOsm medium
476 suggesting that caveolae integrity and/or number were affected and could not guarantee
477 mechanical resistance anymore (Fig. 8B). Similar result was obtained with methyl-beta-
478 cyclodextrin, a cholesterol-complexing drug currently employed to disrupt caveolae inside the
479 cells [39, 54], corroborating the role of caveolae in buffering membrane tension. To further
480 confirm the effect observed with methyl-beta-cyclodextrin, we directly inhibited caveolin 1
481 expression with siRNA to have a more specific control. As shown in figure 8C, we reduced
482 Cav 1 expression by 80%. In this condition, myoblasts were three times more sensitive to the
483 hypo-osmotic shock (Fig. 8D). Remarkably, when H₂O₂ was added during the osmotic stress,
484 the amount of Trypan blue positive cells stayed unchanged indicating that osmotic swelling-
485 induced membrane rupture was only imputable to a breach in caveolae. Therefore, we
486 unequivocally showed that oxidative stress specifically impaired caveolae contribution to
487 plasma membrane tension buffering (Fig. 8D).

488 In conclusion, our results showed that Cav 1 is degraded by the proteasome-dependent
489 pathway soon after oxidative stress induction in myoblasts. However, and despite the decrease
490 in caveolin 1 level, the assembly and distribution of caveolae at the plasma membrane were
491 not significantly affected by oxidative stress. Endocytosis and membrane resistance to hypo-
492 osmotic challenge, two caveolae-specific cellular functions, were significantly impaired.
493 Taken together, these data would suggest that the caveolae-dependent pathway could take part
494 to the regulation of oxidative stress in skeletal muscle. Caveolin 1 level could be involved for
495 instance in the activation of the cellular defenses or regulate regenerative process, several
496 important mechanisms impaired during muscle aging. We also clearly showed that H₂O₂

497 treatment deeply affected caveolae functions (endocytosis and membrane tension buffering).
498 Further experiments need to be carried out to understand the exact mechanisms linking the
499 caveolae-dependent pathway and oxidative stress during muscle aging.

500

501

502 **Acknowledgments**

503 This work was financially supported by several grants. A PhD fellowship was awarded to
504 Alexis Mougeolle by the region Aquitaine and the Institut Polytechnique Bordeaux (IPB) for
505 three years (grant n°20111301001). The Association Française contre les Myopathies (AFM)
506 also supported this work during the last two years (grant n°15485, name “CAVEOX”). C.
507 Lamaze work on caveolae is supported by an AFM grant n° 15717 (“CAV-DYS-STRESS”).
508 The authors acknowledge the cytometry platform of University Bordeaux Segalen, Bordeaux
509 Imaging Center for TIRF microscopy experiments and Cordouan Technologies, Pessac,
510 France.

511

512

513 **References**

- 514 1. Evans WJ (1995) What is sarcopenia? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 50: 5-8.
- 515 2. von Haehling S, Morley JE, Anker SD (2010) An overview of sarcopenia: facts and
516 numbers on prevalence and clinical impact. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 1: 129-133.
- 517 3. Szulc P, Beck TJ, Marchand F, Delmas PD (2005) Low skeletal muscle mass is associated
518 with poor structural parameters of bone and impaired balance in elderly men-the MINOS
519 study. *J Bone Miner Res.* 20: 721-9.
- 520 4. Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R (2004) The healthcare costs of
521 sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc.* 52: 80-5.
- 522 5. Martone AM, Onder G, Vetrano DL, Ortolani E, Tosato M, Marzetti E, Landi F (2013)
523 Anorexia of aging: a modifiable risk factor for frailty. *Nutrients.* 5: 4126-33.
- 524 6. Lamberts SW, van den Beld AW, van der Lely AJ (1997) The endocrinology of aging.
525 *Science.* 278: 419-24.
- 526 7. Evans WJ (2010) Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin*
527 *Nutr.* 91: 1123S-1127S.
- 528 8. Barani AE, Durieux AC, Sabido O, Freyssenet D (2003) Age-related changes in the mitotic
529 and metabolic characteristics of muscle-derived cells. *J Appl Physiol.* 95: 2089-98.
- 530 9. Capel F, Rimbert V, Lioger D, Diot A, Rousset P, Mirand PP, Boirie Y, Morio B, Mosoni
531 L (2005) Due to reverse electron transfer, mitochondrial H₂O₂ release increases with age in
532 human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved. *Mech. Ageing Dev.*
533 126: 505-511.

- 534 10. Palomero J, Vasilaki A, Pye D, McArdle A, Jackson MJ (2013) Aging increases the
535 oxidation of dichlorohydrofluorescein in single isolated skeletal muscle fibers at rest, but not
536 during contractions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 305: R351-8.
- 537 11. Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Van Der Velden JL, Wouters EF, Janssen-
538 Heininger YM (2002) Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenesis through redox-
539 dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C714-21.
- 540 12. Parton RG and Del Pozo MA (2013) Caveolae as plasma membrane sensors, protectors
541 and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14: 98-112.
- 542 13. Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A, Nixon SJ, Walser P,
543 Abankwa D, Oorschot VM, Martin S, Hancock JF, Parton RG (2008) PTRF-Cavin, a
544 conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132:
545 113-24.
- 546 14. Ludwig AG, Howard C, Mendoza-Topaz T, Deerinck M, Mackey S, Sandin MH,
547 Ellisman and Nichols BJ (2013) Molecular composition and ultrastructure of the
548 caveolar coat complex. *PLoS Biol.* 11:e1001640.
- 549 15. Sinha B, Köster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, Stan RV, Butler-Browne
550 G, Védie B, Johannes L, Morone N, Parton RG, Raposo G, Sens P, Lamaze C, Nassoy P
551 (2011) Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 144: 402-13.
- 552 16. Patel HH, Murray F, Insel PA (2008) Caveolae as organizers of pharmacologically
553 relevant signal transduction molecules. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 359–391.
- 554 17. Repetto S, Bado M, Broda P, Lucania G, Masetti E, Sotgia F, Carbone I, Pavan A,
555 Bonilla E, Cordone G, Lisanti MP, Minetti C (1999) Increased number of caveolae and

556 caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Biophys Res*
557 *Commun.* 261: 547-50.

558 18. Gazzo E, Sotgia F, Bruno C, Lisanti MP, Minetti C (2010) Caveolinopathies: from
559 the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur J Hum Genet.* 18: 137-45.

560 19. Corrotte M, Almeida PE, Tam C, Castro-Gomes T, Fernandes MC, Millis BA,
561 Cortez M, Miller H, Song W, Mangel TK, Andrews NW (2013) Caveolae internalization
562 repairs wounded cells and muscle fibers. *Elife.* 2: e00926.

563 20. Volonte D, Liu Z, Musille PM, Stoppani E, Wakabayashi N, Di YP, Lisanti MP, Kensler
564 TW, Galbiati F (2013) Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by
565 caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence. *Mol Biol Cell.* 24: 1852-62.

566 21. Laemmli, U.K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
567 bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

568 22. Clavel S, Siffroi-Fernandez S, Coldefy AS, Boulukos K, Pisani DF, Dérillard B (2010)
569 Regulation of the intracellular localization of Foxo3a by stress-activated protein kinase
570 signaling pathways in skeletal muscle cells. *Mol Cell Biol.* 30:470-80.

571 23. Siebel A, Cubillos-Rojas M, Santos RC, Schneider T, Bonan CD, Bartrons R, Ventura F,
572 Rodrigues de Oliveira J, Rosa JL (2013) Contribution of S6K1/MAPK signaling pathways in
573 the response to oxidative stress: activation of RSK and MSK by hydrogen peroxide. *PLoS*
574 *One.* 8:e75523.

575 24. Goudenege S, Poussard S, Dulong S, Cottin P (2005) Biologically active milli-calpain
576 associated with caveolae is involved in a spatially compartmentalised signalling involving

577 protein kinase C alpha and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS). *Int J*
578 *Biochem Cell Biol.* 37: 1900-10.

579 25. Decossas M, Bloch B, Bernard V (2003) Trafficking of the muscarinic m2 autoreceptor in
580 cholinergic basalocortical neurons in vivo: differential regulation of plasma membrane
581 receptor availability and intraneuronal localization in acetylcholinesterase-deficient and -
582 inhibited mice. *J Comp Neurol.* 462: 302-14.

583 26. Bernatchez P, Sharma A, Bauer PM, Marin E and Sessa WC (2011) A noninhibitory
584 mutant of the caveolin-1 scaffolding domain enhances eNOS-derived NO synthesis and
585 vasodilation in mice. *J. Clin. Invest.* 121: 3747-3755.

586 27. Ushio-Fukai M (2009) Compartmentalization of redox signaling through NADPH
587 oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal.* 11: 1289-99.

588 28. Dargelos E, Brulé C, Stuelsatz P, Mouly V, Veschambre P, Cottin P, Poussard S. (2010)
589 Up-regulation of calcium-dependent proteolysis in human myoblasts under acute oxidative
590 stress. *Exp Cell Res.* 316: 115-25.

591 29. Fan X, Hussien R, Brooks GA (2010) H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation in
592 C2C12 myocytes. *Free Radic Biol Med.* 49: 1646-54.

593 30. Stadtman ER, Oliver CN (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological
594 consequences. *J Biol Chem.* 266: 2005-8.

595 31. Shang F, Taylor A (2011) Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to
596 oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 51: 5-16.

- 597 32. Gervásio OL, Phillips WD, Cole L, Allen DG (2011) Caveolae respond to cell stretch and
598 contribute to stretch-induced signaling. *J Cell Sci.* 124: 3581-90.
- 599 33. Bonor J, Adams EL, Bragdon B, Moseychuk O, Czymmek KJ, Nohe A (2012) Initiation
600 of BMP2 signaling in domains on the plasma membrane. *J Cell Physiol.* 227: 2880-8.
- 601 34. Smythe GM, Eby JC, Disatnik MH, Rando TA (2003) A caveolin-3 mutant that causes
602 limb girdle muscular dystrophy type 1C disrupts Src localization and activity and induces
603 apoptosis in skeletal myotubes. *J Cell Sci.* 116: 4739-49.
- 604 35. Nassoy P, Lamaze C (2012) Stressing caveolae new role in cell mechanics. *Trends Cell*
605 *Biol.* 22: 381-9.
- 606 36. Puri V, Watanabe R, Singh RD, Dominguez M, Brown JC, Wheatley CL, Marks DL,
607 Pagano RE (2001) Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane
608 sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *J Cell Biol.* 154: 535-47.
- 609 37. Sharma DK, Brown JC, Cheng Z, Holicky EL, Marks DL, Pagano RE (2005) The
610 glycosphingolipid, lactosylceramide, regulates beta1-integrin clustering and endocytosis.
611 *Cancer Res.* 65: 8233-41.
- 612 38. Bawa R, Fung SY, Shiozaki A, Yang H, Zheng G, Keshavjee S, Liu M (2012) Self-
613 assembling peptide-based nanoparticles enhance cellular delivery of the hydrophobic
614 anticancer drug ellipticine through caveolae-dependent endocytosis. *Nanomedicine.* 8: 647-
615 54.
- 616 39. Parpal S, Karlsson M, Thorn H, Strålfors P (2001) Cholesterol depletion disrupts caveolae
617 and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not
618 for mitogen-activated protein kinase control. *J Biol Chem.* 276: 9670-8.

- 619 40. Jang YC, Sinha M, Cerletti M, Dall'Osso C, Wagers AJ (2011) Skeletal muscle stem
620 cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function. Cold Spring Harb.
621 Symp. Quant. Biol. 76: 101–111.
- 622 41. Patel HH and Insel PA (2009) Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation
623 of redox signalling. Antioxidants and redox signalling. 11: 1357-1372.
624
- 625 42. Li W, Liu H, Zhou JS, Cao JF, Zhou XB, Choi AM, Chen ZH, Shen HH (2012) Caveolin-
626 1 inhibits expression of antioxidant enzymes through direct interaction with nuclear erythroid
627 2 p45-related factor-2 (Nrf2). J Biol Chem. 287: 20922-30.
- 628 43. Hsieh SR, Hsu CS, Lu CH, Chen WC, Chiu CH, Liou YM (2013) Epigallocatechin-3-
629 gallate-mediated cardioprotection by Akt/GSK-3beta/caveolin signalling in H9c2 rat
630 cardiomyoblasts. J Biomed Sci. 20: 86.
- 631 44. Dasari A, Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F (2006) Oxidative stress induces
632 premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-
633 activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. Cancer
634 Res. 66: 10805-14.
635
- 636 45. Won H, Lim S, Jang M, Kim Y, Rashid MA, Jyothi KR, Dashdorj A, Kang I, Ha J, Kim
637 SS (2012) Peroxiredoxin-2 upregulated by NF-κB attenuates oxidative stress during the
638 differentiation of muscle-derived C2C12 cells. Antioxid Redox Signal. 16: 245-61.
639
- 640 46. Barbieri E, Sestili P (2012) Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. J Signal
641 Transduct. 2012: 982794.

- 642 47. Brulé C, Dargelos E, Diallo R, Listrat A, Béchet D, Cottin P, Poussard S (2010)
643 Proteomic study of calpain interacting proteins during skeletal muscle aging. *Biochimie*. 92:
644 1923-33.
- 645 48. Pickering AM, Davies KJ (2012) Degradation of damaged proteins: the main function of
646 the 20S proteasome. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 109: 227-48.
647
- 648 49. Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E (1997) Caveolin-3 associates with developing T-
649 tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol*. 136: 137-54.
650
- 651 50. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De novo formation of caveolae in
652 lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8655–8659.
653
- 654 51. Capozza F, Cohen AW, Cheung MW, Sotgia F, Schubert W, Battista M, Lee H, Frank
655 PG, Lisanti MP (2005) Muscle-specific interaction of caveolin isoforms: differential complex
656 formation between caveolins in fibroblastic vs. muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:
657 C677–C691.
- 658 52. Mercier I and Lisanti MP (2012) Caveolin-1 and breast cancer: a new clinical perspective.
659 *Adv Exp Med Biol*. 729: 83-94.
- 660 53. Pavlides S, Gutierrez-Pajares JL, Danilo C, Lisanti MP, Frank PG (2012) Atherosclerosis,
661 caveolae and caveolin-1. *Adv Exp Med Biol*. 729: 127-44.
662
- 663 54. Kozera L, White E, Calaghan S (2009) Caveolae act as membrane reserves which limit
664 mechanosensitive I(Cl,swell) channel activation during swelling in the rat ventricular
665 myocyte. *PLoS One*. 4: e8312.

666 55. Echarri A, Muriel O, Pavón DM, Azegrouz H, Escolar F, Terrón MC, Sanchez-Cabo F,
667 Martínez F, Montoya MC, Llorca O, Del Pozo MA. (2012) Caveolar domain organization and
668 trafficking is regulated by Abl kinases and mDia1. *J Cell Sci.* 125: 3097-113.

669

670

671 **Tables**

672

H ₂ O ₂ (μM)	500				1000			
Time	10 min	1 h	3 h	6 h	10 min	1 h	3 h	6 h
Cell viability (% total)	101	99.4	90.8	77.2*	93.2	81.7*	56*	8.1*
<i>SEM</i>	2.25	10.7	11.1	12.7	4.75	6.75	8	0.57

673 *Significantly different from the untreated control sample ($P < 0.05$).674 **Table 1. Effect of H₂O₂ on cell viability.**

675

676

677

H ₂ O ₂ (μM)	0	500	1000
Carbonyl content (nmol/mg)	0.98	3.74*	4.36*
<i>SEM</i>	0.68	0.85	0.53

678 *Significantly different from the untreated control sample ($P < 0.05$).679 **Table 2. Effect of H₂O₂ on carbonyl content.**

680

681

682

683 **Figure legends**

684 **Figure 1. Effect of H₂O₂ on caveolin 1 expression level.** Cells were treated with 500 or 1000
685 μM H₂O₂ for different time. Proteins were extracted and 15 μg was subjected to SDS-PAGE.
686 Immunodetection was carried out using specific antibodies for caveolin 1 and p38α, which
687 was used as a loading control (A). The level of caveolin 1 was quantified and expressed as a
688 percentage of the level obtained in the untreated control cells (---). Bars on the graph represent
689 the SEM (B). *Significantly different from the control ($P < 0.05$), **significantly different
690 from the control ($P < 0.01$).

691 **Figure 2. Effect of H₂O₂ on intracellular ROS accumulation.** Cells were incubated with
692 H₂O₂ during 10 min or 1 h and the production of ROS was measured with the fluorogenic dye
693 DCFDA as described in material and methods. The fluorescence emission (arbitrary units)
694 was plotted against growing concentrations of H₂O₂ used in the assay. Bars on the graph
695 represent the SEM. *Significantly different from the control sample ($P < 0.05$) **significantly
696 different from the control ($P < 0.01$).

697 **Figure 3. Effect of MG132 on H₂O₂-induced caveolin 1 decrease.** Cells were pre-incubated
698 for 3 h with MG132 (50 μM) before addition of 500 μM H₂O₂. After 10 minutes, cells were
699 collected and protein extracts (15 μg) were loaded onto SDS-PAGE. Immunodetection was
700 carried out using specific antibodies for caveolin 1 and p38α, which was used as a loading
701 control (A). The level of caveolin 1 was quantified and expressed as a percentage of the level
702 obtained in the untreated control cells (---) (B). C: control. Bars on the graph represent the
703 SEM. *Significantly different from the control ($P < 0.05$).

704 **Figure 4. Effect of H₂O₂ on caveolae isolated through flotation gradient.** Myoblasts were
705 incubated one hour with 500 μM H₂O₂. Cell extracts were fractionated by flotation trough a
706 discontinuous sucrose gradient as described in materials and methods. Western blotting of

707 fractions 1 to 10 was carried out with anti-caveolin 1 antibody. Cavin 1, Golgin and Calnexin
708 were immunoblotted to identify caveolae, golgi and RE specific fractions (A). Fraction 2
709 isolated from the flotation gradient was processed for immune electron microscopy using anti-
710 caveolin 1 primary antibody and 10 nm gold-conjugated protein A (B). Scale bar = 100 nm.

711 **Figure 5. Identification of caveolae in proliferating C2C12 mouse myoblasts.** C2C12
712 proliferating mouse myoblasts were processed for (immune) electron microscopy as described
713 in materials and methods. Representative electron micrographs show the morphology of
714 caveolae (A) and caveolin 1 enriched “open” vesicular structures at the plasma membrane (B)
715 or “closed” in the cytosol (C). Scale bar = 100 nm.

716 **Figure 6. Effect of H₂O₂ on caveolin 1 localization.** Cells were treated with 1 mM H₂O₂
717 during 1h. Caveolin 1 localization in C2C12 cells was determined by immunofluorescence
718 labelling (A) or TIRF imaging (B). The ratio between membrane area with caveolin 1 labeling
719 and total membrane area was expressed after TIRF images analysis (C). Bars on the graph
720 represent the SEM. Scale bar = 10 μm.

721 **Figure 7. Effect of H₂O₂ on caveolae-dependent endocytosis.** Cells were incubated with
722 0.25 μM of Bodipy-lactosylceramide after treatments with H₂O₂ or specific inhibitors of
723 endocytic pathways. Cells were analyzed by flow cytometry ($\lambda_{exc} = 488$ nm) including at least
724 10 000 cells by condition (A). The mean cellular fluorescence intensity was expressed as a
725 percentage of the fluorescence measured in the untreated control cells (---) (B and C). Bars on
726 the graph represent the SEM. *Significantly different from the control sample ($P < 0.01$).

727 **Figure 8. Effect of H₂O₂ on cell membrane rupture in hypo-osmotic conditions.**
728 Myoblasts were grown in iso- (300 mOsm) or hypo-osmotic medium (30 mOsm). Cell
729 swelling was observed by light microscopy after 5 min (A). Cells were pre-incubated (or not)
730 with H₂O₂ or β-methyl-cyclodextrin (β-MCD), left in iso- or hypo-osmotic medium for 30

731 min and stained with Trypan Blue (B). The cells were treated with a caveolin 1 siRNA or a
732 negative control as described in material and methods. The reduction of caveolin 1 expression
733 was confirmed by western blot (Fig. 8C) and the above swelling protocol was applied to the
734 cells pre-incubated (or not) with 500 μ M H₂O₂ (Fig 8D). A minimum of 100 cells were
735 counted by experiment, and the Trypan blue positive cells were expressed as a percentage of
736 the cells submitted to hypo-osmotic stress (--- in B and D). Bars on the graph represent the
737 SEM. *Significantly different from the relative iso-osmotic sample ($P < 0.05$). #Significantly
738 different from the untreated related control (without H₂O₂, $P < 0.05$). § Significantly different
739 from the negative control ($P < 0.05$). Scale bar = 30 μ m.

740

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

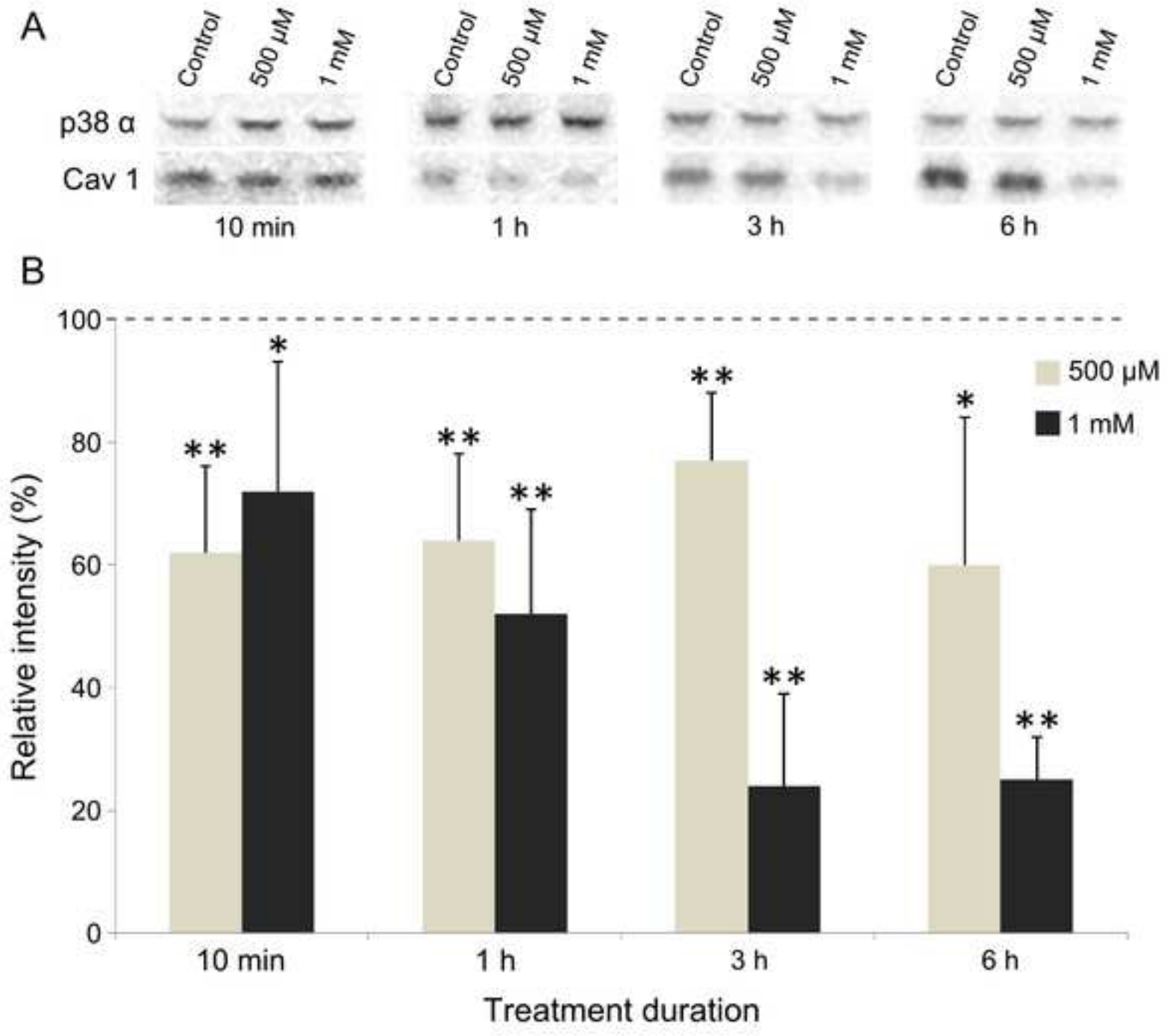


Figure2

[Click here to download high resolution image](#)

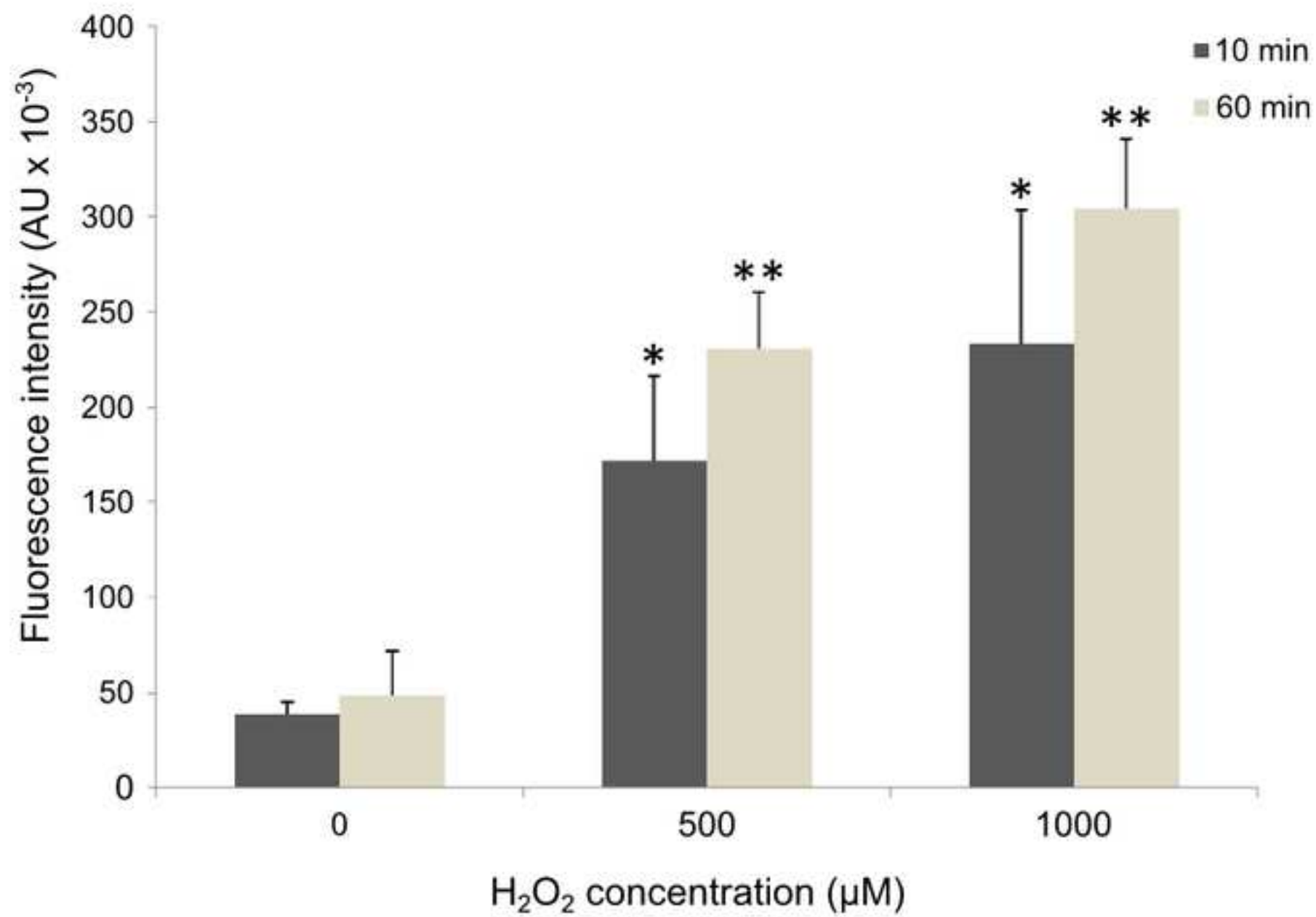


Figure 3

[Click here to download high resolution image](#)

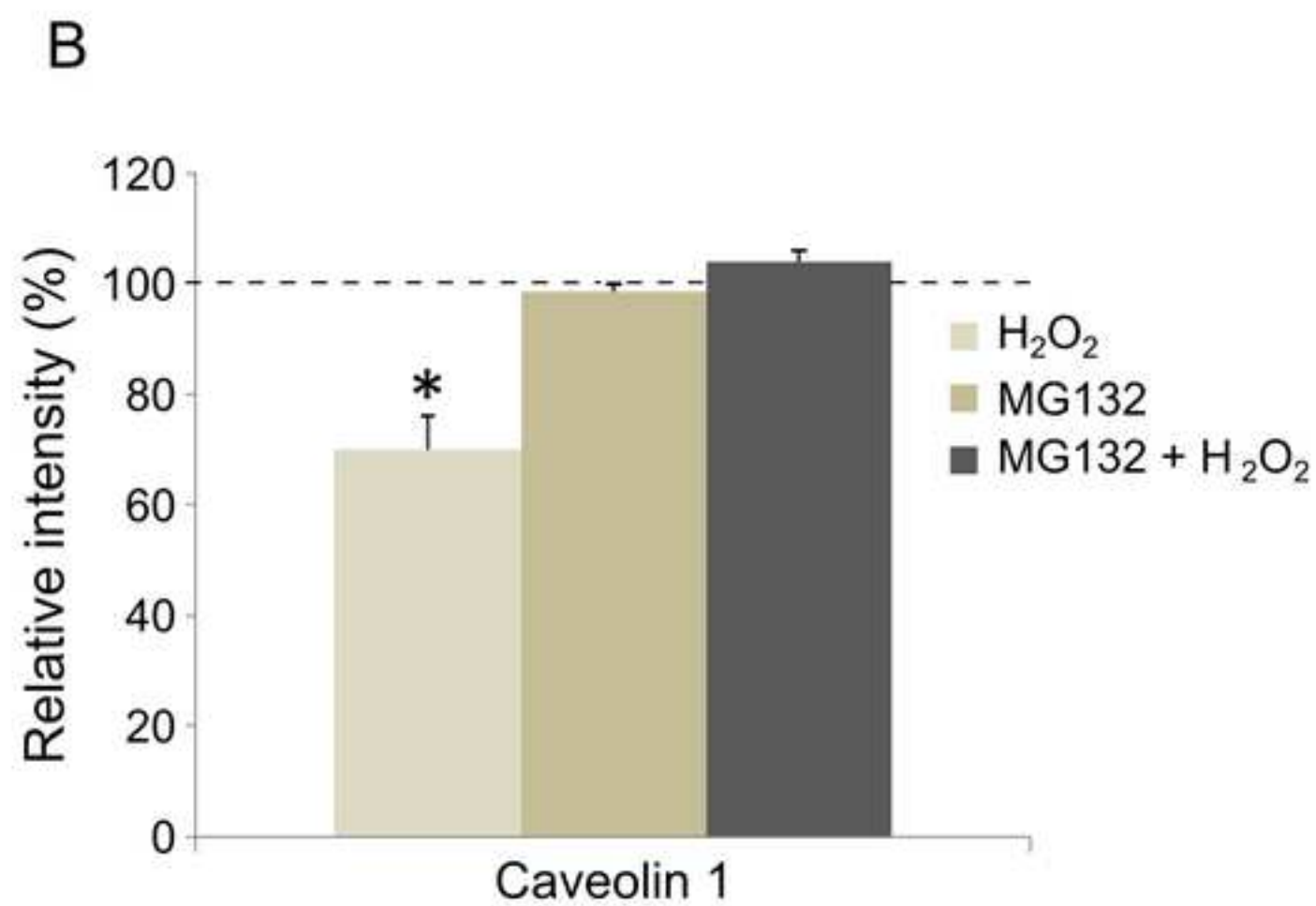
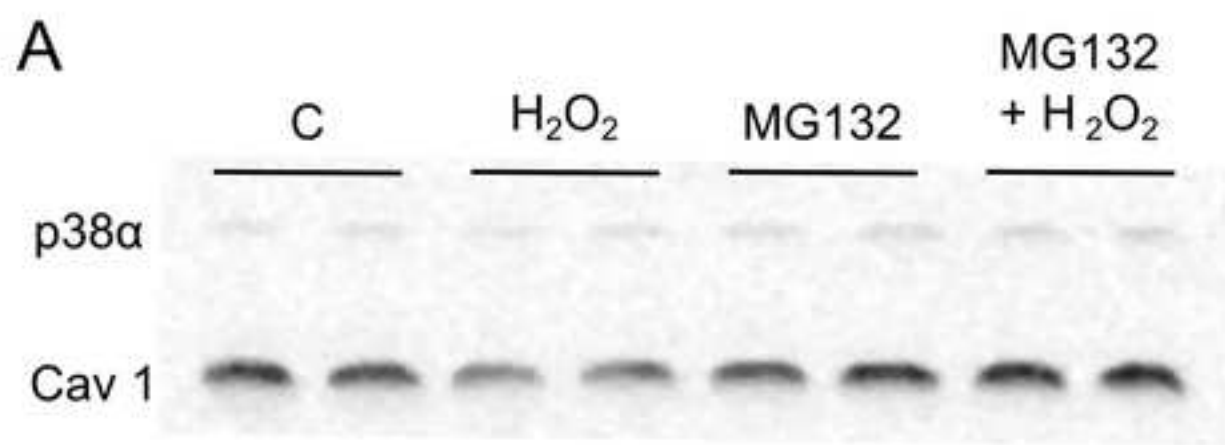
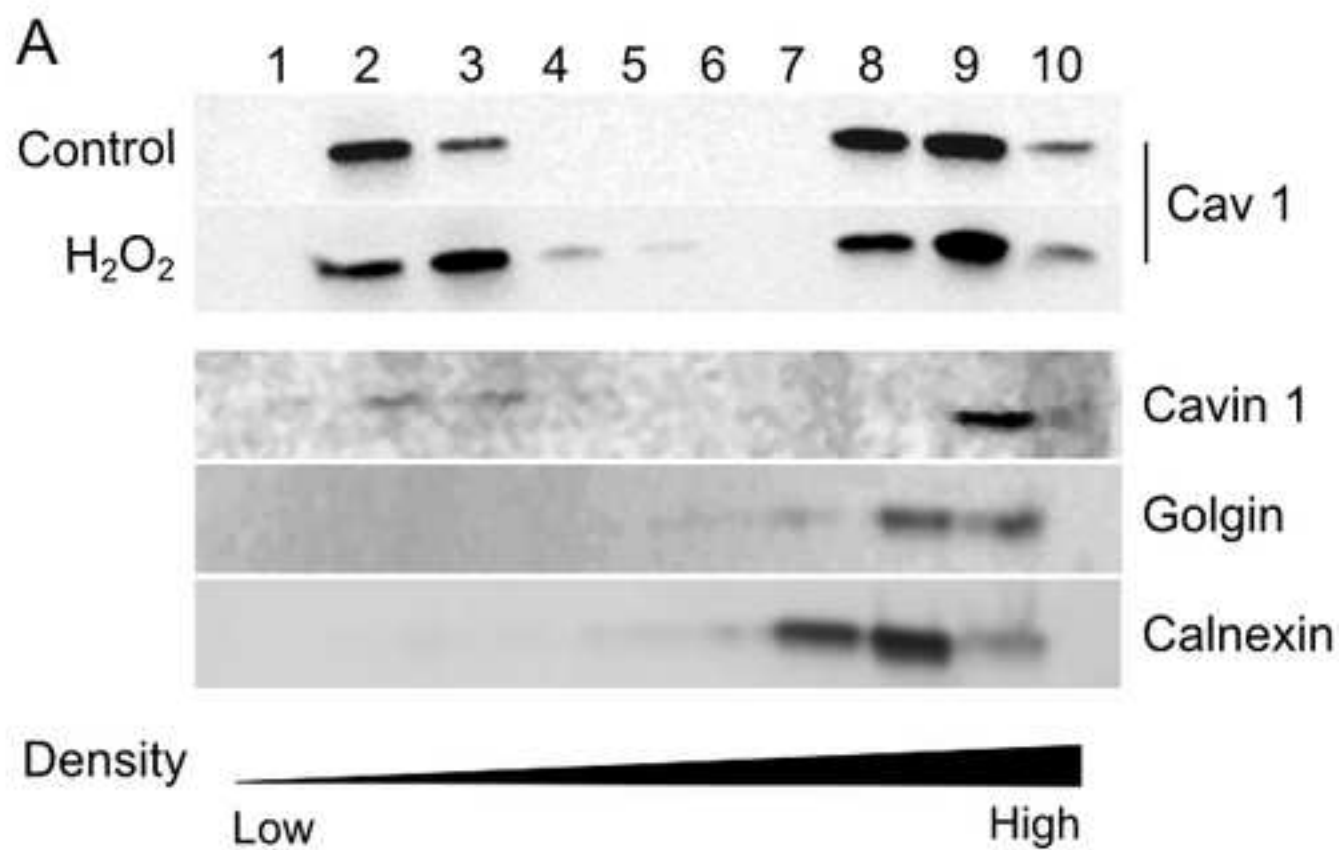


Figure 4

[Click here to download high resolution image](#)



B

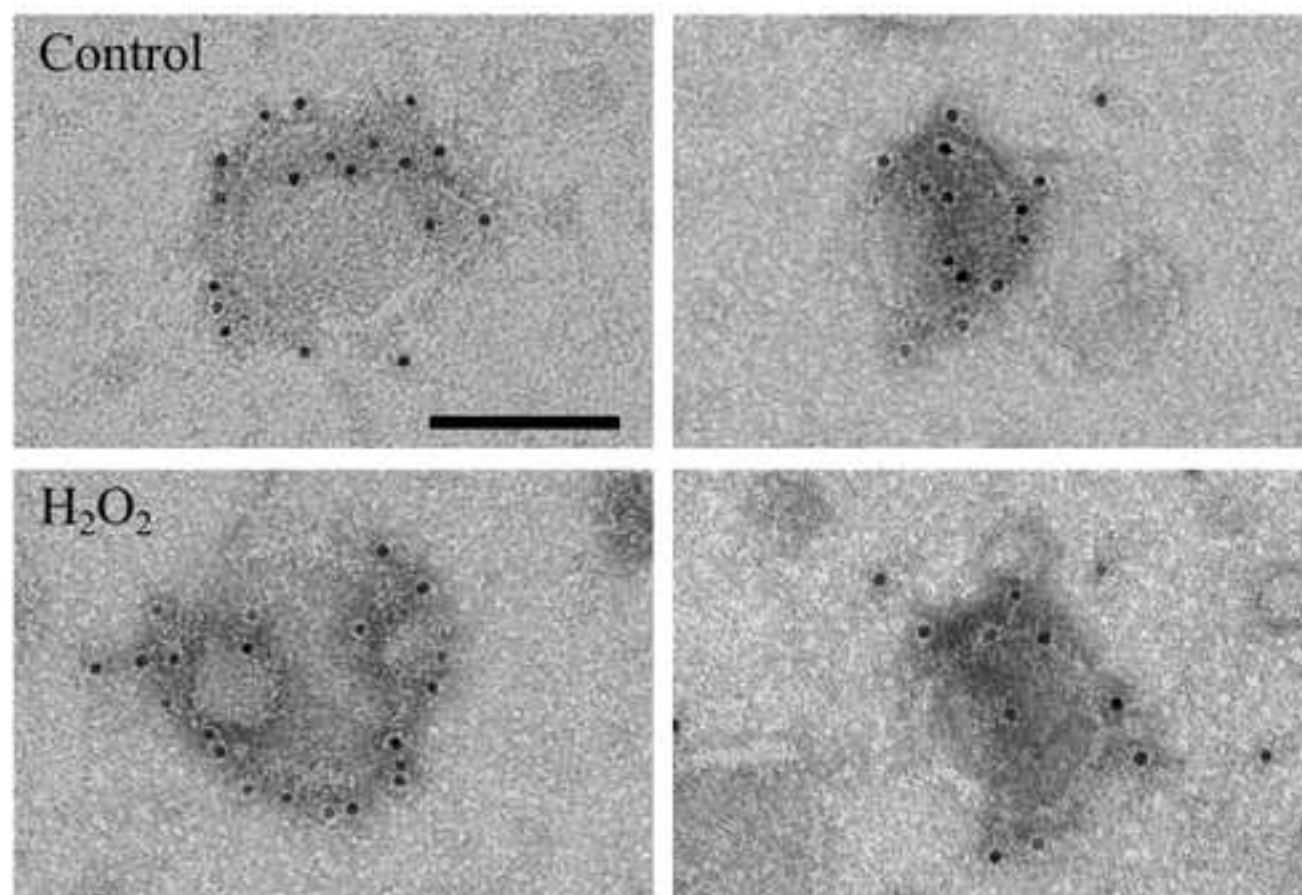
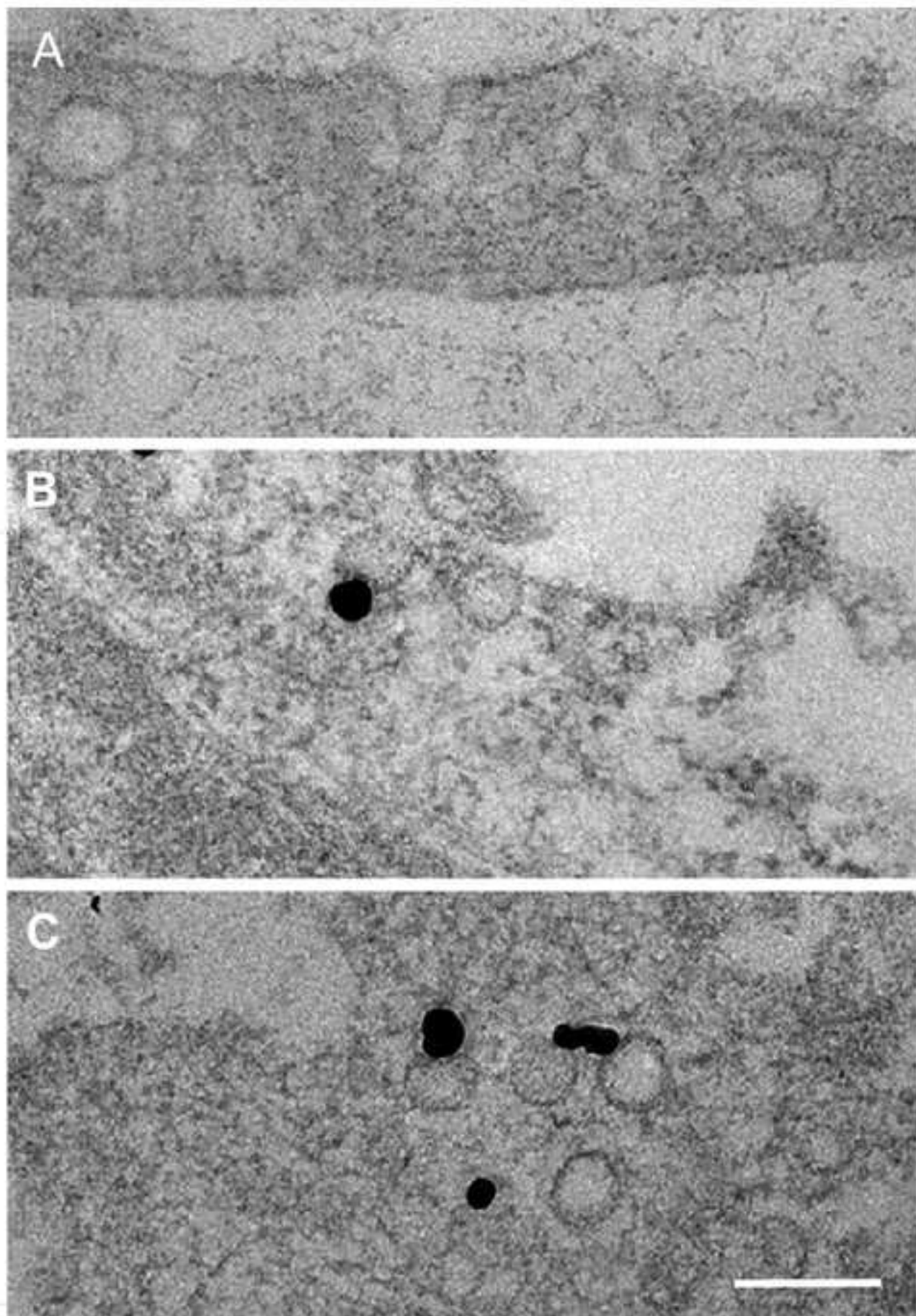


Figure5
[Click here to download high resolution image](#)



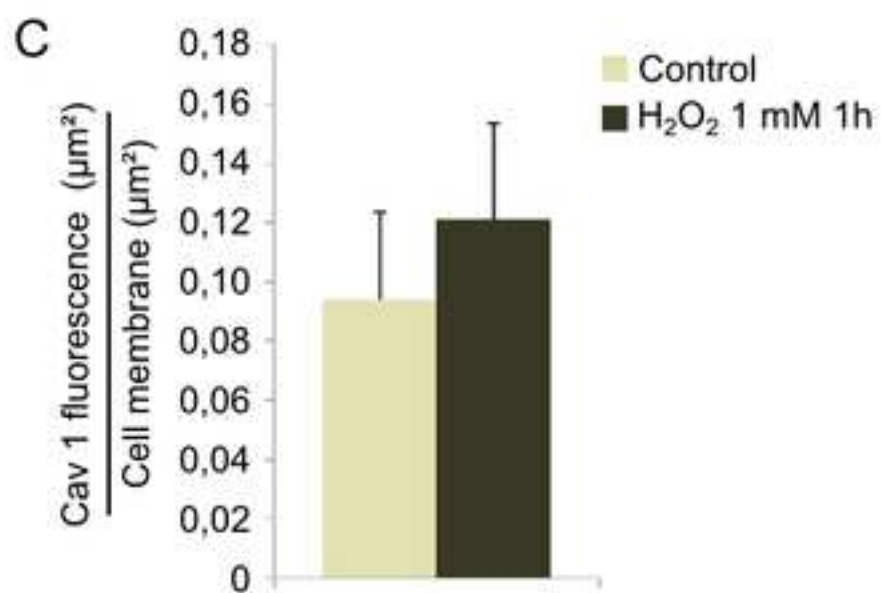
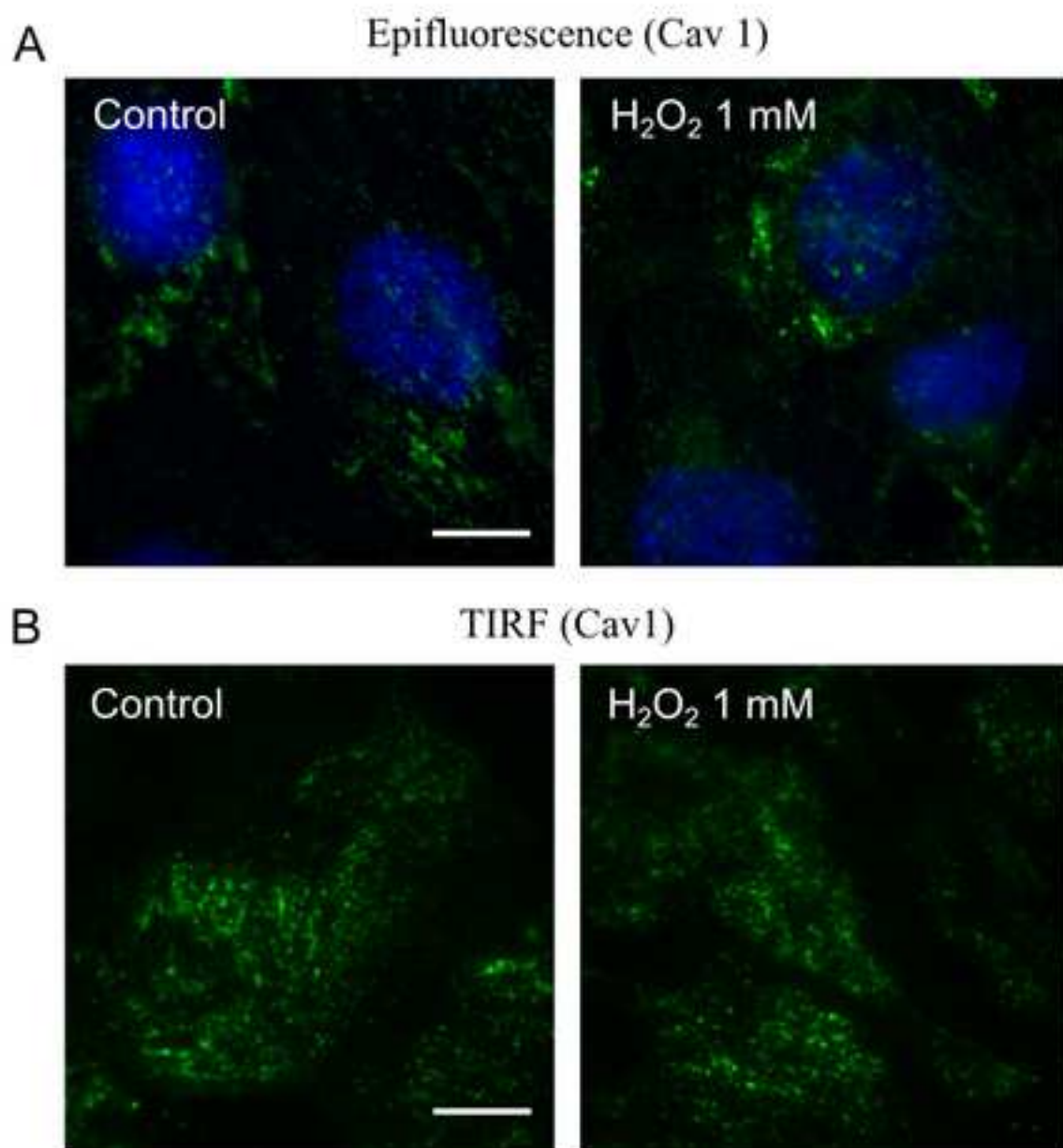


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)

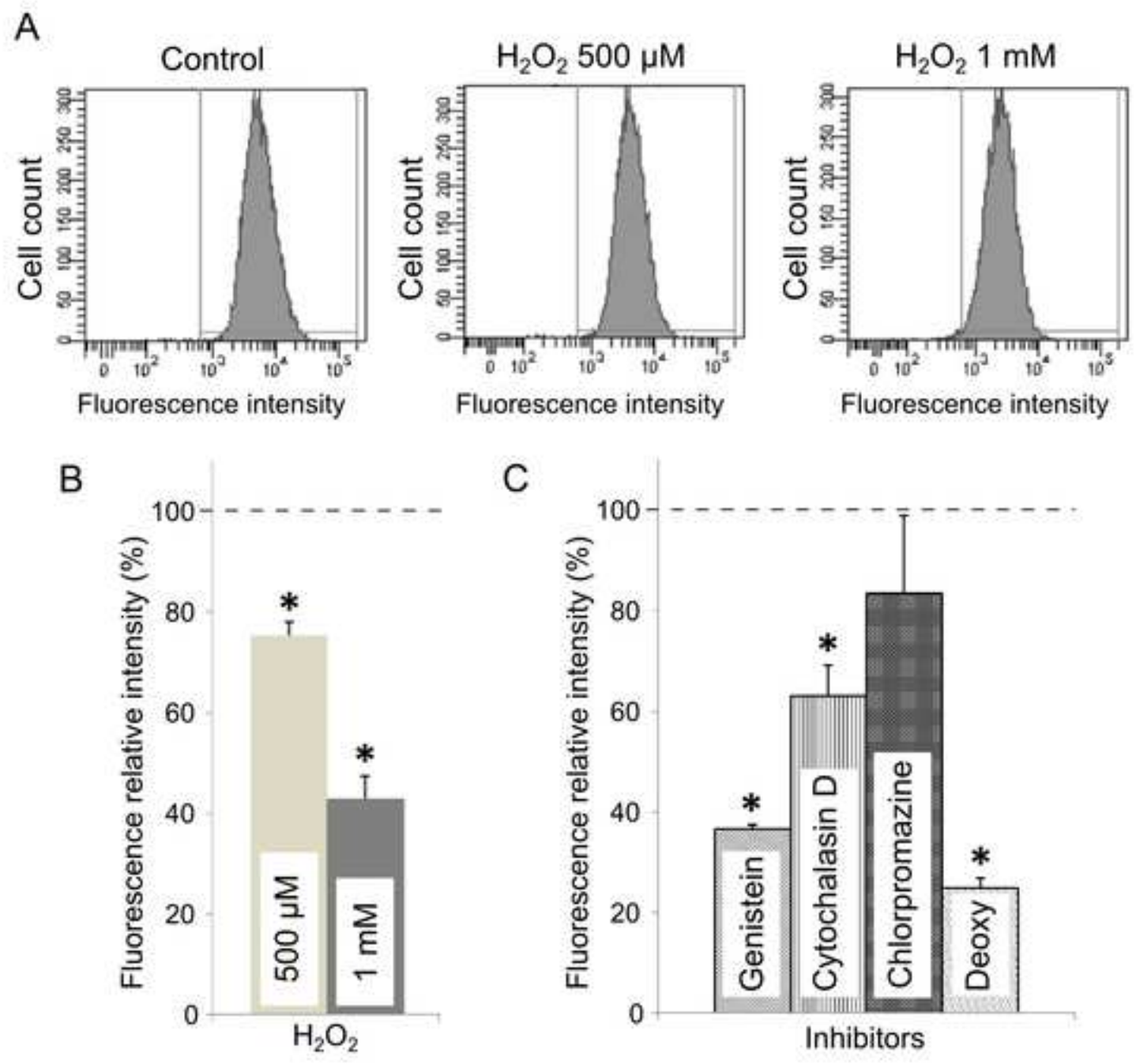
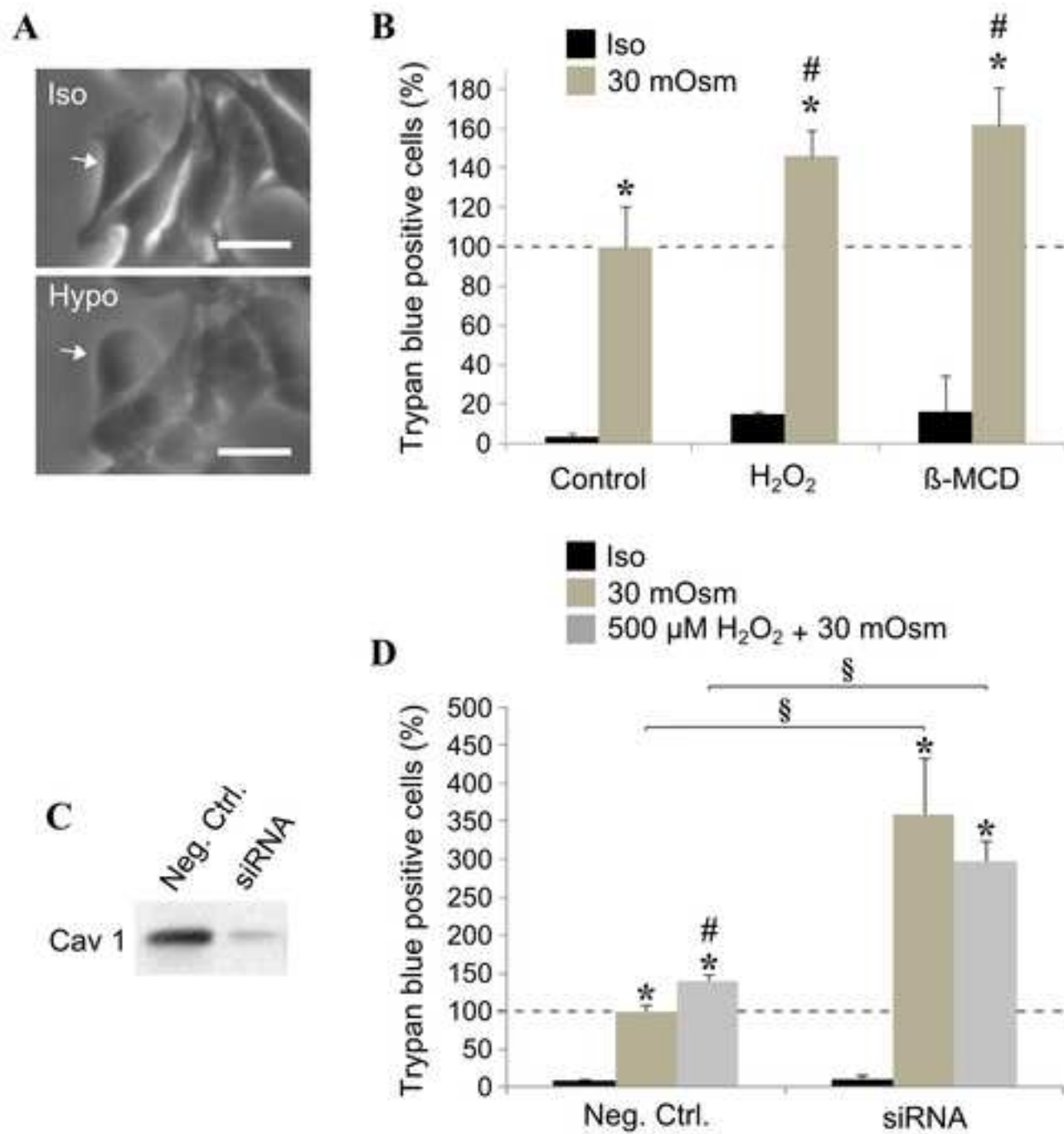


Figure 8

[Click here to download high resolution image](#)



Titre : Effet du stress oxydant sur les cavéoles dans les cellules musculaires squelettiques

Résumé : La sarcopénie est une maladie dégénérative liée à l'âge qui se caractérise par une perte progressive et involontaire de la masse et de la force musculaire. Elle s'accompagne d'une atteinte de la régénération musculaire et d'une accumulation des espèces réactives de l'oxygène. Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique. Dans le muscle, elles jouent un rôle dans la différenciation des cellules satellites et dans le maintien de l'unité contractile dans le muscle différencié. Certaines formes de myopathies sont consécutives à l'absence de cavéoles dans le muscle. Elles sont également impliquées dans la médiation de signaux liés à la régulation du stress oxydant. Afin de mieux comprendre les mécanismes régulant la mise en place de la sarcopénie, nous avons étudié ici les relations existant entre le stress oxydant et les cavéoles. Des cellules musculaires de souris ont été traitées par l' H_2O_2 et une diminution du taux des cavéolines-1 et -3 a été mise en évidence dans des myoblastes et les myotubes, respectivement. Il apparaît donc que les protéines constitutives des cavéoles sont effectivement sensibles au stress oxydant dans les cellules musculaires. En présence d' H_2O_2 , la fonction des cavéoles (endocytose et résistance au stress mécanique) était également significativement altérée dans des myoblastes. L'ensemble des résultats obtenus suggère que le stress oxydant aurait un effet sur les cavéoles, ce qui pourrait entraîner des conséquences sur la régénération et le maintien de l'intégrité musculaire au cours du vieillissement.

Mots clés : Cavéoles, Cavéolines, Muscle squelettique, Vieillesse, Stress oxydant, Cellules satellites.

Title : Effect of oxidative stress on caveolae in skeletal muscle cells

Abstract : Sarcopenia is an age-related degenerative disease which is characterized by a progressive and involuntary loss of muscle mass and strength. It is accompanied by an impairment of muscle regeneration and accumulation of reactive oxygen species. Caveolae are invaginations of the plasma membrane. In muscle, they play a role in the differentiation of satellite cells and in maintaining the contractile unit of the differentiated skeletal muscle. Some myopathies are resulting from the absence of caveolae in muscle. Caveolae are also involved in mediating signals related to the regulation of oxidative stress. To better understand the mechanisms involved in the development of sarcopenia, we investigated here the relationship between oxidative stress and caveolae. Mouse muscle cells were treated with H_2O_2 and decreased levels of caveolin-1 and -3 were demonstrated in myoblasts and myotubes, respectively. It therefore appears that caveolae constituent proteins are actually sensitive to oxidative stress in muscle cells. In the presence of H_2O_2 , caveolae functions (endocytosis and resistance to mechanical stress) were also significantly degraded in myoblasts. Altogether, these data suggest that oxidative stress would affect caveolae, which could have consequences on regeneration and maintenance of muscle integrity during aging.

Keywords : Caveolae, Caveolins, Skeletal muscle, Ageing, Oxidative stress, Satellite cells.

Unité de recherche : Chimie et biologie des membranes et des nanoobjets – UMR 5248

Equipe : Architecture des complexes membranaires et processus cellulaires

Allée Geoffroy Saint Hilaire Bâtiment B14

33600 Pessac