



Caractérisation des voies de signalisation contrôlées par les androgènes dans le muscle strié chez la souris

Mélanie Schuh

► To cite this version:

Mélanie Schuh. Caractérisation des voies de signalisation contrôlées par les androgènes dans le muscle strié chez la souris. Biologie cellulaire. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ106 . tel-01236155

HAL Id: tel-01236155

<https://theses.hal.science/tel-01236155>

Submitted on 1 Dec 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.

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Mélanie SCHUH

Soutenue le : **11 septembre 2014**

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences de la Vie

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Caractérisation des voies de signalisation contrôlées par les androgènes dans le muscle strié chez la souris.

Thèse dirigée par : Dr. Daniel Metzger, IGBMC, Illkirch, France

Thèse co-dirigée par : Pr. Pierre Chambon, IGBMC, Illkirch, France

Rapporteur externe: Dr. Pascal Maire, Institut Cochin, Paris, France

Rapporteur externe : Pr. Laurent Schaeffer, ENS de Lyon, Lyon, France

Examineur interne : Pr. Bernard Geny, Institut de Physiologie, Strasbourg, France

« *Qui ne doute pas, acquiert peu* »

Léonard de Vinci

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier les membres de mon jury, le Professeur Bernard Geny, le Docteur Pascal Maire et le Professeur Laurent Schaeffer d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie l'Association Française contre les Myopathies d'avoir financé mes travaux grâce au programme stratégique AFM 15352 ainsi que le projet MNM2 2010 14877.

Je remercie le Dr Daniel Metzger et le Professeur Pierre Chambon de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans leur laboratoire. Un merci particulier à Daniel, dont la porte a toujours été grande ouverte aussi bien pour parler des problèmes de fond que de forme. Vous avez toujours su vous rendre disponible pour moi et cela a été très appréciable. Merci aussi pour votre patience, même après la N^{ème} correction ! Vous m'avez appris qu'un travail peut toujours être repris tant qu'il n'est pas parfait ! Merci !

Merci également à notre collaborateur, le Pr Arnaud Ferry, avec qui ça a été un plaisir de travailler.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe, présents ou déjà partis. Un merci particulier à Laetitia et Jean-Marc (Oncle Jean-Marc) pour leur soutien technique ! Merci pour les longues conversations que nous avons eu (très souvent à côté de mon bureau) aussi bien technique et pratique que personnel. J'en sais maintenant un peu plus, sur le triathlon, la mosaïque et que trouver une bonne nounou, ce n'est pas si facile... Merci à Rocco et Thanuja, c'est avec vous que j'ai commencé tout ça. Il était bien vide ce box à l'époque... Rocco, Pietro et Salva, ça a été sympa d'avoir un bout d'Italie dans le labo ! Rocco : quel plaisir de t'avoir rencontré !!! Merci de m'avoir permis de découvrir ton pays avec ta bonne humeur et ta grande sympathie qui te caractérise !

Gilles et Maxime, une sacrée bande de post-doc. Maxime, merci d'avoir apporté un bout de Canada dans ce labo (Et oui... j'ai mis du temps à comprendre que tu étais français !), mais j'attends toujours notre pot québécois !! Merci pour tes conseils scientifiques et techniques. En tout cas, tes petits surnoms, tes carbo-bombes, tes éternuements à l'éthanol et tes lancers de glaçons ne me manqueront pas. Même si je dois avouer que cela a aussi contribué à l'ambiance du labo !

Gilles, même si ça n'a pas toujours été facile entre nous, Merci ! J'ai énormément appris en travaillant à tes côtés ! J'ai apprécié ce que nous avons pu faire ensemble et nos longues, très longues discussions à propos de mon projet ! Et comme on dit... Qui aime bien, châtie bien !!

Esther, nous n'étions pas collègues très longtemps mais ça a vraiment été super ! Merci pour ta bonne humeur et pour tous les petits moments et les grandes discussions que nous avons partagé ensemble, avec nos rêves, nos doutes et nos grandes questions d'avenir.

Julie, ta franchise, ton p'tit caractère et tes mots rassurants font que j'ai vraiment apprécié de te rencontrer ! Merci pour les moments passés ensemble ! Je suis sûre qu'on sera amenée à nous revoir, en médecine ou ailleurs et ce sera avec Grand Plaisir !

Un merci particulier aux filles du labo ! Les discussions de filles faisaient du bien entre les manips ou au café (même si les garçons ne doivent pas forcément être d'accord avec ça) ! Mariages, bébés, PACS et shopping ! Il y avait toujours quelque chose à raconter !

Merci à l'ensemble du Box Metzger, d'avoir supporté ma mémoire de poisson rouge ! Vous n'avez jamais refusé de reprendre avec moi une conversation que nous avons déjà eue mais dont je ne me souvenais plus ! Et même parfois de me rappeler mes propres résultats !!! Doris n'est jamais très loin !

Et Merci à tous les autres, les personnes des plateformes évidemment (Pascal, Marc, Nadia, Cindy, Natacha, Agouna, Martine, Fatima...). Un merci particulier à Maïté pour sa bonne humeur, sa gentillesse et sa disponibilité.

Merci à Muriel. Durant ces 5 dernières années tu n'as jamais été très loin. Cela a toujours été un plaisir ! Souriante, enthousiaste et dynamique mais avec ton franc parlé, j'ai débuté la recherche en laboratoire avec toi et ça a été une très belle expérience, enrichissante aussi bien au niveau scientifique qu'humainement.

Et les amis... un MERCI particulier à Vanessa !! Qu'est ce que ça aurait été sans toi ??? Pas la même thèse ! Tu as vraiment toujours été là, n'importe quand et pour n'importe quoi ! J'ai adoré bosser avec toi et très vite on est devenue plus que des collègues ! Vive les IPIST, les IPGTT, les injections des souris, la force sur muscle isolé et les gros transferts, les soirées télé (pas assez nombreuses...), le sport (Hahahaa), et le co-voiturage, et toutes, toutes, toutes tes petites histoires et anecdotes Il s'en est passé des choses durant ces années ! Pas toujours été facile, mais tu as vu, on a survécu ! On est des Warriors ! Et surtout n'oublie jamais : Don't Worry, Be Happy !!!

Mais aussi aux amis que j'aime appeler : les amis du RU ! Etienne, Olivier, Rémi, Aurélie, Charlène, Bénédicte, mais aussi Cécile, Nathalie et Jean....Même s'ils savent qu'ils sont bien plus que « des amis du RU » !! Eux qui m'ont entendue me plaindre, râler, m'extasier sur un résultat ou m'énervé sur un collègue chaque jour de ma thèse sans jamais me le reprocher ! Merci pour votre soutien, vos conseils très précieux et vive l'horoscope ! Ça a toujours été sympa de passer cette heure avec vous chaque jour !

Bien sûr il y a aussi les amies de longues dates Claire, Caro, MERCI d'avoir toujours été présentes depuis ces longues années !! Quelle aventure ! C'est toujours un bonheur de partager avec vous tous ces moments !

Et puis il y a Yara, Christine et Floriane ! Elle est loin la L1 ? ! Que de chemin parcouru, que de gens rencontrés, de déception, de joie, de décisions difficiles ! On a commencé ensemble et ça y est... On l'a fait !!!! Toutes les bonnes choses ont une fin ! Je n'oublierai jamais tous ces beaux moments ! Merci à toi aussi, Sylvia ! Un moment qu'on se connaît, mais j'ai appris à mieux te connaître durant la rédaction de cette thèse (Ça crée des liens la bibliothèque !). Ca a

été un plaisir ! Merci pour toutes les pages imprimées, les sommaires arrangés et bien sûr, merci de m'avoir nourrie au Milka !!

Et la famille... Sans eux, pas sûr que j'en serais là ! Merci à mes parents de m'avoir soutenue tout au long de mes études et de m'avoir accompagnée dans ce long parcours ! Vous avez toujours soutenu mes projets, aussi fous soient-ils ! MERCI. Ces moments de détente en famille, shopping, restau, piscine, sorties, soirées et fêtes en tout genre m'ont beaucoup aidée ! Merci pour votre soutien, votre écoute et vos conseils ! Merci pour tout ! Je vous aime fort !

Merci à ma sœur, Aurélie. Merci d'avoir toujours été là durant ce parcours. Durant la thèse et même avant ! Je suis sûre que les chambres adjacentes nous ont aidées dans nos études longues ! Révisions communes, récitation (in English, j'espère que tu te souviens au moins de touuuuut ce vocabulaire !!!). Même si les plages de révisions communes n'auront pas toujours été efficaces elles auront au moins eu le mérite de détendre les hyper-stressées de la vie ! Merci d'avoir été là pour moi et d'avoir toujours été disponible ! Tu as su m'écouter, me reconforter et m'encourager !!

Merci à toi Dr Rached, tu es un « bof » super ! Merci de m'avoir conseillée et de m'avoir expliquée tous les aléas d'une thèse ! Tu vois finalement, ça y est, moi aussi je l'ai fait !!

Et merci à mon Partenaire Particulier, Mr Ping... Xavier... (Et oui, tu en as eu des surnoms au labo... Merci Vanessa !!!) Ton optimisme est contagieux ! J'ai l'impression que tout est possible ! Merci pour ton soutien pendant ces dernières semaines où la bonne humeur n'a pas toujours été l'humeur qui me caractérisait le mieux... Tu as été compréhensif et courageux. Merci !

Merci aux souris, AR, Pax, HSA. Sans vous, rien n'aurait été possible !

Résumé

Chez les mammifères, les muscles squelettiques représentent environ 40% de la masse corporelle. Grâce à leurs propriétés d'excitabilité, de contractilité et d'élasticité, ils permettent de générer force et mouvements. Ils possèdent également une fonction métabolique essentielle. Mon travail de thèse consiste à caractériser le rôle d'un récepteur nucléaire, le récepteur des androgènes (RA) dans les myofibres et les cellules satellites, sur la force, la masse musculaire et le métabolisme. Pour ce faire, nous avons invalidé sélectivement le RA dans les myofibres ou les cellules satellites adultes du muscle squelettique de souris, à l'aide du système Cre-LoxP. Dans la première partie de ce travail, j'ai démontré que les androgènes via leur récepteur dans les cellules satellites ne contrôlent ni la masse des muscles des membres ni celle des muscles du périnée à l'âge adulte. Cependant, l'expression des gènes codant pour l'IGF1 et la myostatine sont induits par le RA dans les myofibres. De plus, lors d'une surcharge mécanique, le RA dans les myofibres est indispensable à la croissance musculaire. Nous avons montré que le RA dans les myofibres est nécessaire à la fonte musculaire induite par les glucocorticoïdes. Nos résultats montrent que le RA est nécessaire à la structuration des sarcomères afin de générer une force musculaire optimale. Ce mécanisme peut se faire par une régulation de l'autophagie via le RA dans les myofibres ou une régulation des dérivés d'acides aminés. Nous avons mis en évidence la contribution du RA dans les myofibres dans le contrôle de la balance énergétique au niveau du muscle squelettique. En effet, le RA est requis pour la réabsorption du glucose lorsque le corps est en excès de glucose.

Ainsi, l'étude détaillée des voies de signalisation du RA a permis de mieux comprendre le rôle des androgènes dans le muscle squelettique

Abstract

In mammals, skeletal muscles account for up to 55% of total body mass. Thanks to their excitability, contractility and elasticity properties, they generate strength and movements. They also have important role in metabolic functions. The aim of my work was to characterize the role the androgen receptor (AR), a nuclear receptor, in skeletal muscle contractility, mass and metabolic functions. To this end, we selectively invalidated the AR either in myofibres or in satellites cells, using the Cre-LoxP system. In the first part of this work, we demonstrate that satellite cells AR doesn't mediate androgen-induced limb muscle fiber hypertrophy. But we demonstrate that expression of IGF1 and myostatine is induced by myofibres AR. AR is also necessary the mechanical overload-induced hypertrophy. Furthermore, we demonstrated that AR in myofibres is required for glucocorticoids induced muscles atrophy. Moreover, AR is required for sarcomere structuration in order to generate a maximal strength. Autophagy or amino acids derivated form regulation can be implicated in this mechanism. We also show that AR contributes to the energetic balance in myofibres as AR is important to glucose transport when the body is in excess of glucose. In conclusion, our work provides a better understanding of muscle functions and will allow the development of new therapies against muscle wasting and metabolic disorders.

Table des matières

INTRODUCTION	19
1 STRUCTURE ET FONCTION DU MUSCLE SQUELETTIQUE.....	20
1.1 Formation du muscle squelettique.	20
1.2 Régénération du muscle squelettique : Régulation cellulaire et moléculaire.	21
1.2.1 Les cellules souches.	21
1.2.2 La régénération musculaire	26
1.2.3 Rôles des facteurs sécrétés dans la régénération musculaire.....	29
1.3 Structure du muscle squelettique	34
1.3.1 Organisation anatomique du muscle squelettique.	34
1.3.2 Organisation cellulaire du muscle squelettique.	35
1.3.3 Contrôle du processus contractile.....	39
1.3.4 Propriétés des fibres musculaires.....	41
1.4 Propriété mécanique du muscle : production de la force.....	42
1.4.1 Contraction musculaire.	42
1.4.2 Réponse musculaire et tétenos.	43
1.4.3 Les relations caractéristiques de la mécanique musculaire.	43
1.4.4 Cinétique des ponts d'unions : Modèle d'Huxley	45
1.4.5 Cycles des ponts d'union : biochimie de la production de force.	45
1.5 Production d'énergie par le muscle squelettique.....	46
1.5.1 Métabolisme anaérobie.	46
1.5.2 Métabolisme aérobie.	48
1.6 Contribution du muscle squelettique au développement du diabète de type II.....	51
2 LES RECEPTEURS NUCLEAIRES.	53
2.1 Structure et organisation fonctionnelle des récepteurs nucléaires.	55
2.2 La régulation de la transcription des gènes cibles par les RNs.....	56
2.2.1 Mécanisme d'action.	56
2.2.2 Les co-régulateurs	56
2.2.3 Les modifications post-transcriptionnelles des RNs.	58
3 LES ANDROGENES ET LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	60
3.1 Les androgènes.....	60
3.1.1 La biosynthèse et sa régulation.	60
3.1.2 Le transport des androgènes.....	61
3.1.3 Métabolisme de la testostérone	62
3.1.4 Catabolisme de la testostérone.....	62

3.1.5	Fonctions des androgènes.	62
3.2	Le récepteur des androgènes (RA).	64
3.2.1	Le domaine N-terminal : NTD.	64
3.2.2	Le domaine de liaison à l'ADN : DBD.	65
3.2.3	La région charnière.	67
3.2.4	Le domaine de liaison au ligand : LBD.	67
3.2.5	Les modifications post-traductionnelles du récepteur des androgènes.	68
3.3	Activités génomiques et non génomiques du récepteur des androgènes.	68
3.3.1	Actions des androgènes médiées par un RA classique.	68
3.3.2	Actions des androgènes sur les concentrations intracellulaires en ions et la fluidité membranaire. .	70
3.4	Maladies induites par les mutations du RA.	71
3.4.1	Syndrome d'insensibilité aux androgènes.	71
3.4.2	Le cancer de la prostate.	71
3.4.3	La maladie de Kennedy.	72
3.5	Actions des androgènes dans le muscle squelettique.	72
3.5.1	Effets des androgènes chez l'homme.	72
3.5.2	Effets des androgènes chez les animaux.	75
3.5.3	Mécanisme d'action potentiel des androgènes dans le muscle squelettique.	77
4	LES POLYAMINES.	80
4.1	Structure des polyamines	80
4.2	Métabolisme des polyamines.	80
4.2.1	Synthèse.	81
4.2.2	Interconversion et catabolisme	81
4.2.3	Transport des polyamines.	83
4.3	Régulation du métabolisme des polyamines.	83
4.3.1	Ornithine décarboxylase : ODC.	83
4.3.2	Acétyl-CoA: spermidine/spermine N ¹ -acetyl-transferase (SSAT).	84
4.3.3	S-adenosyl-S-methyl décarboxylase (SAMdc ou AMD).	84
4.3.4	Autres mécanismes de régulation.	84
4.4	Propriétés des polyamines.	84
4.4.1	Les fonctions des polyamines.	84
4.4.2	Autre fonction des polyamines : l'autophagie.	86
4.5	Polyamine et maladies.	94
4.5.1	Cancer.	94
4.5.2	Infections parasitaires.	94
4.5.3	Diabète.	95
4.6	Récepteur des androgènes et polyamines	95

5	ROLE DU RECEPTEUR DES ANDROGENES DANS LE METABOLISME DU GLUCOSE.	96
5.1	Le syndrome métabolique : description et physiopathologie	96
5.1.1	Physiopathologie de la résistance à l'insuline.	96
5.1.2	Conséquences métaboliques de la résistance à l'insuline.	97
5.2	Androgènes et métabolisme du glucose	98
6	SYSTEME DE MUTATIONS SOMATIQUES CIBLEES CHEZ LA SOURIS.	100
7	OBJECTIF DE LA THESE.	101
	MATERIEL ET METHODES.	102
	RÉSULTATS	110
1	MISE EN EVIDENCE D'ANOMALIES MUSCULAIRES DE LA LIGNEE TRANSGENIQUE HSA-CRE.	112
2	CONFIRMATION DU PHENOTYPE DES SOURIS AR^{SKM-/Y}	114
2.1	Etude de la force musculaire des souris AR ^{skm-/y}	115
2.2	Etude du rôle du RA dans le maintien de la structure sarcomérique.	117
2.3	Validation chez les souris AR ^{(i)skm-/y}	118
3	MECANISME DE REGULATION DE LA FORCE MUSCULAIRE.	119
3.1	Etude de l'expression des gènes codant pour les principales protéines de structure des sarcomères.	119
3.2	Etude de la régulation calcique.	121
4	ETUDE DES TRAITEMENTS ANDROGENIQUES SUR LE CONTROLE DE LA FORCE ET DE LA MASSE MUSCULAIRE.	122
4.1	Etude d'un traitement androgénique aigu sur le contrôle de la force musculaire.	122
4.2	Analyses des souris AR ^{skm-/y}	124
4.2.1	Efficacité de la nandrolone sur des souris de type sauvage.	124
4.2.2	Traitement à la nandrolone des souris AR ^{L2/y} et AR ^{skm-/y}	125
4.2.3	Analyse moléculaire après un mois de traitement à la nandrolone des souris AR ^{L2/y} et AR ^{skm-/y}	127
4.3	Effet d'une castration sur la force et sur la masse musculaire.	128

4.4	Effet d'une castration avec supplémentation androgénique.....	129
5	EFFET D'UNE SURCHARGE MECANIQUE SUR LE CONTROLE DE LA MASSE MUSCULAIRE.	131
6	ETUDE DU ROLE DU RA DANS LES CELLULES SATELLITES : LA LIGNEE PAX-CREER^{T2}/AR.	134
6.1	La lignée Pax-CreER ^{T2} / AR ^{L2/y}	134
6.2	Etude de la force et de la masse musculaire en absence du RA dans les cellules satellites.....	135
6.3	Effet d'une surcharge mécanique sur la force et la masse musculaire en l'absence du RA dans les cellules satellites.	136
6.4	Etude de la régénération musculaire après une lésion induite par un traitement à la cardiotoxine.	137
6.5	Effet d'un traitement androgénique sur la régulation de la force et de la masse musculaire des souris AR ^{L2/y} et AR ^{(i)sat-/y}	139
6.6	Analyse moléculaire après un mois de traitement à la nandrolone des souris AR ^{L2/y} et AR ^{(i)sat-/y}	140
7	ANALYSE DU TRANSCRIPTOME DES SOURIS AR^{SKM-/Y} COMPAREES AUX SOURIS AR^{L2/Y}.....	142
7.1	En condition basale.....	142
7.2	Effet d'un traitement androgénique à court terme sur la régulation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines.....	143
7.3	Effet d'un traitement androgénique à long terme sur la régulation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines.....	144
7.4	Effet d'un traitement androgénique long après une castration sur la régulation des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines.	145
7.5	Etude métabolomique.	146
7.6	Rôle du RA dans la régulation de l'autophagie.....	147
7.7	En condition de stress induit par une mise à jeun.	150
8	ROLE DES ANDROGENES DANS LE METABOLISME GLUCIDIQUE.....	152
8.1	A l'état basal.....	152
8.2	Tolérance au glucose (IPGTT) et résistance à l'insuline (IPIST) chez les souris AR ^{skm-/y}	152
8.3	Effet d'un traitement androgénique prolongé sur l'homéostasie du glucose.	154

8.4	Effet d'une castration sur l'homéostasie du glucose.	154
8.5	Effet d'un traitement androgénique long après une castration sur l'homéostasie du glucose.	155
9	EFFET DES ANDROGENES VIA LEUR RECEPTEUR DANS LES MYOFIBRES SUR LA FONTE MUSCULAIRE INDUITE PAR LA DEXAMETHASONE.	155
9.1	Effet des GC sur la masse musculaire.	156
9.2	Analyse moléculaire de l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes chez les souris AR ^{L2/y} et AR ^{skm-/y}	157
	DISCUSSION.....	158
	Effets de l'invalidation du RA sur la masse musculaire.	160
	Effets de l'invalidation du RA sur la force musculaire.	164
	Effets de l'invalidation du RA dans les myofibres sur le métabolisme glucidique.	168
	CONCLUSION GÉNÉRALE	170
	ANNEXES	173
	PUBLICATION N°1.....	174
	PUBLICATION N°2.....	175
	RÉFÉRENCES.....	176

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de la somitogénèse. D'après (Buckingham et al., 2003).....	20
Figure 2.Représentation schématique de la formation des muscles du membre.	21
Figure 3. Division cellulaire asymétrique au cours de la différenciation des cellules satellites (CS). ...	22
Figure 4. Sources possibles de noyaux musculaires pendant la régénération du muscle squelettique.	25
Figure 5. Le rôle des facteurs sécrétés et de la matrice extracellulaire dans la régénération musculaire.	30
Figure 6. Anatomie du muscle squelettique strié.	35
Figure 7. Représentation schématique de la molécule de myosine.	36
Figure 8. Disposition des filaments fins et épais dans un sarcomère.	37
Figure 9. Schéma représentant la structure de la ligne Z.....	38
Figure 10. L'organisation de la triade.	39
Figure 11.Naissance d'un potentiel d'action.....	40
Figure 12. Agencement des récepteurs à la ryanodine et à la dihydropyridine au niveau de la triade. Adaptée de (Jones, 2005).	41
Figure 13. Sommation des secousses et développement de la force.	43
Figure 14. Force isométrique en fonction de la longueur du sarcomère.....	44
Figure 15. Relation force-vitesse (trait plein) et puissance-vitesse (pointillé).....	45
Figure 16. Modèle de la tête pivotante.....	45
Figure 17. Etapes du cycle des ponts.	46
Figure 18. Schéma de la glycolyse.	48
Figure 19. Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons.	49
Figure 20. Vue générale du cycle de Krebs.....	50
Figure 21. Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires.....	55
Figure 22. Actions des récepteurs nucléaires.....	58
Figure 23. La biosynthèse des androgènes.	61
Figure 24. Contrôle de la sécrétion de la testostérone par l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	61
Figure 25. Domaine N-terminale du RA.	65
Figure 26. Schéma du DBD du récepteur des androgènes.....	65
Figure 27. Les différents éléments de réponse des RNs. D'après (Aranda and Pascual, 2001).	66
Figure 28. Configuration du récepteur des androgènes après reconnaissance de son élément de réponse. D'après (Shaffer et al., 2004).	66
Figure 29. LBD du RA humain. D'après (Tan et al., 2014).....	67
Figure 30. Schéma représentant les modifications post-traductionnelles du RA.....	68
Figure 31. Actions des androgènes médiées par un RA classique (intracellulaire).....	69
Figure 32. Modifications des concentrations intracellulaires en ions et de la fluidité membranaire par les androgènes.	70
Figure 33. Les modifications de la molécule de testostérone.....	73
Figure 34. Mécanismes d'actions possibles des androgènes sur les cellules satellites. D'après (Chen et al., 2005).....	78
Figure 35. Structure des polyamines. D'après (Kim et al., 2007).	80
Figure 36. Synthèse et interconversion des polyamines.....	82
Figure 37. Mécanisme de l'autophagie. D'après (Melendez and Levine, 2009).	86

Figure 38. Mécanisme de l'autophagie. D'après (Berridge, 2012).....	88
Figure 39. Autophagie induite par l'adhésion cellulaire.	93
Figure 40. Physiopathologie du syndrome métabolique.	98
Figure 41. Expression de la dystrophine et de la cavéoline chez les souris AR ^{skm-/y} , HSA-Cre et AR ^{L2/y}	113
Figure 42. Force et masse musculaire des mâles AR ^{L2/y} , HSA-Cre et AR ^{skm-/y}	116
Figure 43. Comparaison de l'ultrastructure du muscle squelettique des souris AR ^{skm-/y} , HSA-Cre et contrôles à 15 semaines.....	117
Figure 44. Force d'agrippement des souris AR ^{L2/y} et AR ^{(i)skm-/y}	118
Figure 45. Force musculaire et ultrastructure du muscle gastrocnémien chez les souris AR ^{(i)skm-/y}	119
Figure 46. Expression des principaux gènes codant pour les protéines de structure des sarcomères du muscle gastrocnémien des souris AR ^{L2/y} , HSA-Cre et AR ^{skm-/y}	120
Figure 47. Régulation des flux calciques	121
Figure 48. Effet d'un traitement androgénique aigu <i>in vivo</i> sur le tibialis antérieur de souris AR ^{L2/y} (WT) et AR ^{skm-/y} sur la force maximale absolue (P0), la puissance maximale absolue (Pmax) et la résistance à la fatigue.....	123
Figure 49. Effet d'un traitement androgénique <i>in vitro</i> aigu sur le tibialis antérieur de souris AR ^{L2/y} (WT) et AR ^{skm-/y} sur la force maximale absolue (P0), la puissance maximale absolue (Pmax) et la résistance à la fatigue.....	124
Figure 50. Efficacité d'un traitement androgénique.	125
Figure 51. Effet d'un traitement d'un mois à la nandrolone sur le contrôle de la force et de la masse musculaire chez des souris AR ^{L2/y} et AR ^{skm-/y}	126
Figure 52. Niveau d'expression des gènes impliqués dans la régulation de la masse musculaire après un traitement androgénique.....	127
Figure 53. Effet d'une castration d'un mois sur la force et la masse musculaire.....	128
Figure 54. Effet d'un traitement d'un mois à la nandrolone sur des souris castrées.	129
Figure 55. Effet d'un traitement de trois jours à la nandrolone (100mg/kg) sur des souris castrées un mois auparavant.....	130
Figure 56. Effet d'une surcharge mécanique sur le contrôle de la masse et de la force musculaire.	132
Figure 57. Effet d'une surcharge mécanique sur le type de fibre.	133
Figure 58. Excision du récepteur des androgènes spécifiquement dans les cellules satellites.	135
Figure 59. Etude de la force et de la masse musculaire.....	136
Figure 60. Effet d'une surcharge musculaire sur le contrôle de la force et de la masse musculaire en absence du RA dans les myofibres.	136
Figure 61. Effet d'un traitement à la cardiotoxine sur la régénération musculaire.....	139
Figure 62. Rôle du RA dans les cellules satellites sur le contrôle de la masse et de la force musculaire après un traitement androgénique.	140
Figure 63. Niveau d'expression des gènes impliqués dans la régulation de la masse musculaire après un traitement androgénique.....	141
Figure 64. Voie de synthèse des polyamines et niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans leur synthèse en conditions basales.	142
Figure 65. Niveau d'expression des transcrits du RA et des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines après un traitement androgénique court.....	143
Figure 66. Niveau d'expression des transcrits du RA et des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines après un traitement d'un mois à la nandrolone.....	144

Figure 67. Niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes responsable de la synthèse des PA après une castration suivie d'un traitement androgénique.	145
Figure 68. Analyse métabolomique du muscle gastrocnémien chez les souris $AR^{L2/y}$, HSA-Cre et $AR^{skm- /y}$ âgées de 15 semaines.	146
Figure 69. Etude de l'autophagie.	148
Figure 70. Analyse des voies impliquées dans la régulation de l'autophagie.	149
Figure 71. Niveau d'expression du RA après un stress induit par une mise à jeun.	150
Figure 72. Niveau d'expression des polyamines et des gènes codant pour les enzymes impliquées dans leur synthèse en condition de stress induit par une mise à jeun.	151
Figure 73. Niveau de glucose sanguin dans différentes conditions.	153
Figure 74. IPGTT et IPIST après un traitement d'un mois à la nandrolone.	154
Figure 75. Effet d'une castration sur l'homéostasie du glucose.	154
Figure 76. IPGTT et IPIST après un traitement d'un mois à la nandrolone sur des souris castrées.	155
Figure 77. Effet d'un traitement de deux jours à la dexaméthasone sur la fonte musculaire en absence du RA dans les myofibres.	156
Figure 78. Analyse moléculaire de l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes dans le muscle gastrocnémien de souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm- /y}$	157

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques biochimiques, métaboliques et contractiles des différents types de fibres.	42
Tableau 2. Classification des récepteurs nucléaires chez l'homme.	55
Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour le génotypage et la PCR semi-quantitative	104

Liste des abréviations

Ach:	Acétyl choline
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AF-1:	Activation function 1
AF-2:	Activation function 2
AG:	Acide Gras
AGL:	Acide Gras Libre
AMD:	SAM-décarboxylase
AMP:	Adénosil monophosphate
AMPK:	Protéine Kinase activée par l'AMP
ARE:	Androgen Response Element
ARNm:	Acide Ribonucléique Messenger
BC:	Bulbocaverneux
CDTX:	Cardiotoxine
CTD:	C-Terminal Domain
DAG:	Dystrophine Associated Glycoprotein
DAO:	Diamine Oxydase
DBD :	Domaine de fixation à l'ADN
DFMO:	Difluorométhylornithine
DHEA:	Déhydroépiandrostérone
DHPR:	Récepteur à la Dihydropyridine
DHT:	DiHydroTestostérone
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FFA:	Free Fatty Acid
FGF:	Fibroblast Growth Factor
FSH:	Homone Folliculo-Stimulante
GC:	Glucocorticoïde
GH:	Hormone de Croissance
GLUT4:	Insulin Responsive Glucose Transporter 4
GnRH :	Gonadotropin-Releasing Hormone
HGF:	Facteur de Croissance Hépatocytaire
HMM	Méromyosine Lourde
HSA:	Human Skeletal Actin
HSP:	Heat Shock Protein
IGF:	Insuline Growth Factor
IL-6:	Interleukine-6
LA:	Levator Ani
LBD:	Domaine de fixation du ligand
LH:	Hormone Lutéinisante
LMM	Méromyosine Légère
MDSC:	Muscle-Derived Stem Cell
MHC:	Myosin Heavy Chain

MNF:	Facteur Nucléaire Myocyte
Mst:	Myostatine
mTOR:	mammalian Target Of Rapamycin
Murf1:	Muscle Ring Finger 1
NF-κB:	Facteur Nucléaire κB
NLS:	Signal de Localisation Nucléaire
NTD:	N-Terminal Domain
ODC:	Onithine Décarboxylase
PAO:	Polyamine Oxydase
Pax:	Paired box
PCR:	Réaction de Polymérisation en Chaîne
PDGF:	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PPARα :	Peroxisome Proliferator activated Receptor alpha
RA:	Récepteur des Androgènes
RAR:	Récepteur de l'Acide Rétinoïque
RE:	Récepteur des Oestrogènes
RG:	Récepteurs des Glucocorticoïdes
RM:	Récepteur aux Minéralocorticoïdes
RN:	Récepteur Nucléaire
RP:	Récepteur de la Progestérone
RS:	Réticulum Sarcoplasmique
RXR:	Récepteur X des Rétinoïdes
RyR:	Récepteur à la Ryanodine
SAM:	S-adenosyl-methionine
SARM:	Selective Androgen Receptor Modulator
Sca:	Stem cell antigen
SEM:	Erreur Standard de la moyenne
SERCA:	Sarcolasmique Reticulum Ca ²⁺ ATPase
SHGB :	Sex Hormone-Binding Globulin
Sirt:	Sirtuin
SMOX:	Spermine Oxydase
SSAT:	spermidine/spermine N ¹ -acétyl-transférase
StAR:	Steroidogenic Acute regulatory Protein
STAT3:	Signal Transducer and Activator Transcription 3
SUMO :	Small Ubiquitin-like Modifier
TNFα:	Facteur de nécrose tumorale α
U.A	Unité Arbitraire
UCP:	Protéine Découplante

INTRODUCTION

1 Structure et fonction du muscle squelettique.

Le muscle squelettique est le tissu le plus abondant des vertébrés. Il représente 40 à 50% de la masse corporelle d'un adulte. Il joue un rôle fondamental dans l'organisme pour le déplacement, le maintien de la posture, et exerce un rôle métabolique essentiel. Sa fonction principale est la production de force et de mouvement par un mécanisme spécifique, la contraction musculaire. Dans ce chapitre sera résumé les connaissances actuelles sur le muscle squelettique.

1.1 Formation du muscle squelettique.

Chez les vertébrés supérieurs, pendant l'embryogénèse, les muscles squelettiques sont formés à partir de cellules progénitrices originaires des somites. Les somites sont issues de la segmentation du mésoderme paraxial. Les somites se divisent pour donner une partie ventrale appelée sclérotome et une partie dorsale, le dermomyotome qui va donner le derme et le muscle squelettique. La musculature paraxiale (ou epaxiale) à l'origine des muscles intercostaux et paraspinaux associés à la colonne vertébrale se forme à partir de la différenciation de la région dorso-médiane du dermomyotome. La région ventro-latérale va former la musculature hypaxiale qui va donner les muscles des membres et de la ceinture [(Buckingham et al., 2003), Figure 1].

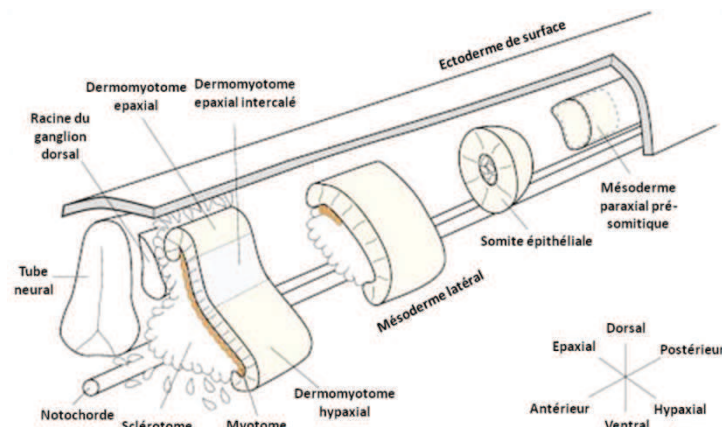


Figure 1. Représentation schématique de la somitogénèse. D'après (Buckingham et al., 2003).

A l'opposé du bourgeon de membre, les prémyoblastes, qui sont les progéniteurs des cellules musculaires, subissent une délamination de l'épithélium du dermomyotome hypaxial et migrent au niveau du futur membre. Les cellules migrantes sont caractérisées par l'expression de Pax3 et Pax7 (Le Grand and Rudnicki, 2007).

Les pré-myoblastes prolifèrent au cours de leur migration, et ce n'est qu'une fois arrivés au niveau du membre qu'ils quittent irréversiblement le cycle cellulaire et expriment les gènes de détermination myogénique *MyoD* et *Myf5* (Tajbakhsh and Buckingham, 1994) pour se transformer en myoblastes. Les myoblastes vont fusionner et se différencier en myotubes, cellules allongées plurinucléées. Le programme de différenciation dépend de la

présence de la myogenine, ainsi que d'autres facteurs de différenciation comme Mef2 (figure 2).

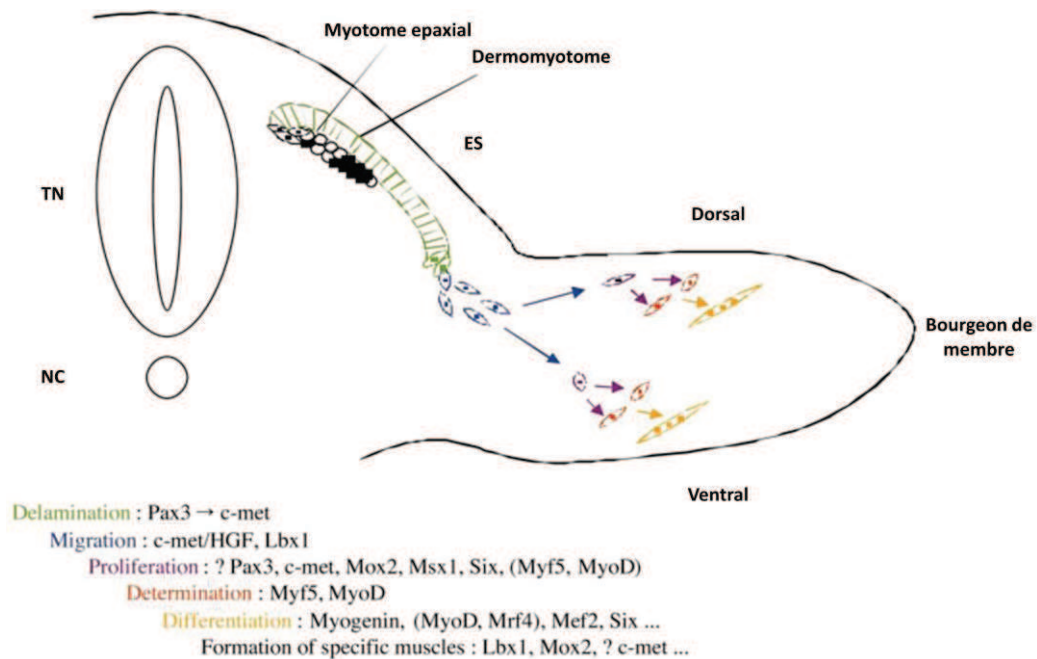


Figure 2. Représentation schématique de la formation des muscles du membre.

NC : notochorde, TN : tube neural, ES : ectoderme de surface. D'après (Buckingham et al., 2003).

5 à 10% des myoblastes restent indifférenciés sous forme de cellules satellites, présentes entre la membrane plasmique et la lame basale des fibres musculaires. Les cellules satellites interviennent dans la croissance pré et post-natale du muscle ainsi que dans sa régénération. En effet, elles sont activées en réponse à des stimuli externes tels que des facteurs de croissance suite à une blessure par exemple (Seale et al., 2000).

1.2 Régénération du muscle squelettique : Régulation cellulaire et moléculaire.

1.2.1 Les cellules souches.

1.2.1.1 Les cellules satellites.

Les cellules satellites sont considérées comme des éléments majeurs dans la régénération musculaire. Les cellules satellites contribuent également à la croissance des fibres musculaires postnatales.

1.2.1.1.1 Identification et caractérisation des cellules satellites.

Les cellules satellites sont situées sous la lame basale juxtaposées à la membrane plasmique (Mauro, 1961). Elles dérivent des somites (Sambasivan and Tajbakhsh, 2007; Shi and Garry, 2006). Les cellules satellites, quiescentes, représentent 2.5 à 6% des noyaux présents dans une fibre musculaire donnée. Cependant, quand elles sont activées par une blessure musculaire, elles peuvent générer un grand nombre de nouvelles myofibres en seulement quelques jours (Whalen et al., 1990). Les cellules satellites quiescentes expriment des marqueurs

caractéristiques. Le plus utilisé, chez la souris, est le facteur de transcription Pax7 (Paired box 7) (Zammit et al., 2006), essentiel pour la spécification des cellules satellites et leur survie (Kuang et al., 2006). Pax3 est quant à lui exprimé dans les cellules satellites quiescentes de muscles comme le diaphragme (Relaix et al., 2006). Le gène de régulation myogénique (Myf5) est exprimé dans une large majorité de cellules satellites quiescentes (Tajbakhsh et al., 1996). D'autres marqueurs ont été identifiés mais ils ne sont souvent pas spécifiques des cellules satellites (Bosnakovski et al., 2008; Montarras et al., 2005). Chez l'humain, les marqueurs de cellules satellites quiescentes ou activées, ne correspondent pas à ceux de la souris. Par exemple, CD34 est un marqueur des cellules satellites chez la souris, mais il ne marque pas les cellules satellites humaines (Peault et al., 2007). M-cadherin n'est pas un marqueur de cellules satellites aussi fiable chez l'homme que chez la souris. Un marqueur des cellules satellites chez l'homme est CD56, bien qu'il soit également un marqueur des cellules lymphocytaire Natural Killer (Illa et al., 1992).

1.2.1.1.2 Activation des cellules satellites.

En réponse à une blessure, les cellules satellites sont activées et commencent à proliférer. A ce stade elles sont appelées cellules précurseurs myogéniques ou myoblastes (Dhawan and Rando, 2005; Price et al., 2007). Des signaux provenant des fibres endommagées ou des cellules infiltrantes sont impliqués dans l'activation des cellules satellites. La progression des cellules satellites dans la différenciation myogénique est principalement contrôlée par Myf5 et MyoD (Tajbakhsh et al., 1996) et est suivi par une fusion en fibres régénérantes. Le processus dure environ 7 jours chez la souris (Zammit et al., 2002) pendant lesquels les cellules satellites vont subir des destins différents, donnant naissances à quelques cellules Pax7⁺MyoD⁻, qui retournent à la quiescence, et de nombreuses cellules Pax7⁺MyoD⁺, qui vont entrer en différenciation (Zammit et al., 2004) (figure 3).

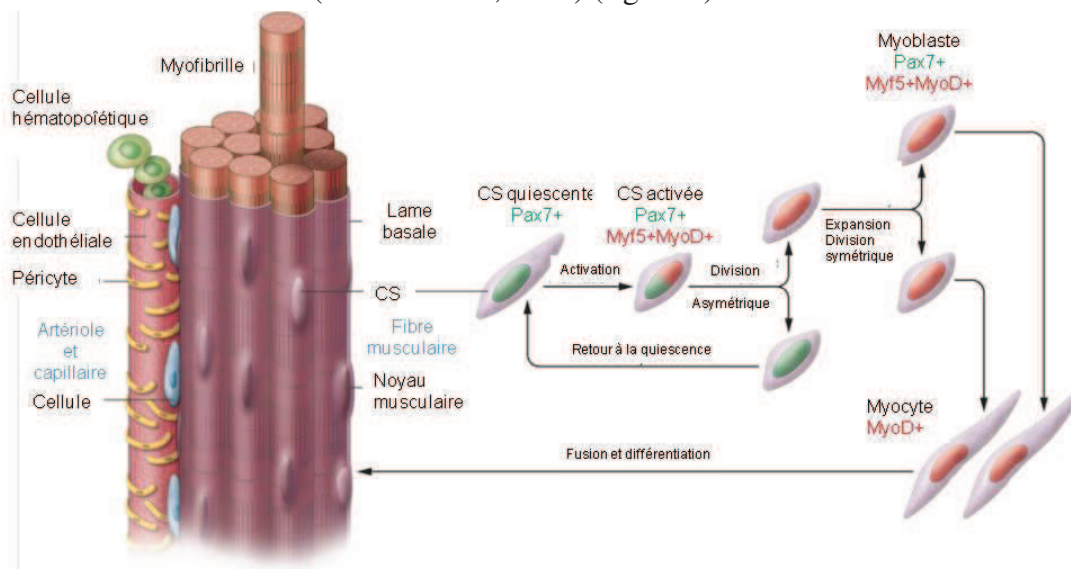


Figure 3. Division cellulaire asymétrique au cours de la différenciation des cellules satellites (CS).

L'activation des cellules satellites *in vivo* est suivie par une division asymétrique, avec l'expression de Pax7, MyoD et Myf5 dans les cellules qui se différencient et l'expression de Pax7 dans les cellules retournant en quiescence pour maintenir le stock de progéniteurs (Kuang et al., 2007; Zammit et al., 2004). Modifié de (Tedesco et al., 2010).

1.2.1.1.3 Fusion.

Pendant la régénération musculaire, proche du développement musculaire, les cellules souches myogéniques sont requises pour fusionner spécifiquement les uns aux autres et former une fibre musculaire syncytiale. Les jonctions inter-cellulaires semi-stables qui permettent l'adhésion cellule-cellule et régulent l'architecture intra-cellulaire du cytosquelette sont importantes dans ces organisations tissulaires complexes. Les cadhérines, protéines transmembranaires permettant l'interaction cellule-cellule de manière calcium-dépendante, jouent un rôle important dans ce processus [pour revue (Geiger and Ayalon, 1992; Kaufmann et al., 1999)]. M-cadhérine, en particulier, est une molécule essentielle pour la fusion spécifique des myoblastes les uns avec les autres pendant la myogénèse embryonnaire et la régénération musculaire (Kaufmann et al., 1999; Moore and Walsh, 1993; Zeschnigk et al., 1995).

Le rôle de la m-calpaine a également été suggéré dans la réorganisation du cytosquelette pendant la fusion des myoblastes (Cottin et al., 1994; Dedieu et al., 2002; Kwak et al., 1993). Une cible potentielle de la m-cadhérine est le filament intermédiaire desmine (Dourdin et al., 1999). De façon intéressante les protéines des filaments intermédiaires du cytosquelette comme la vimentine, la desmine ou la nestine sont impliqués dans la fusion des myoblastes pendant la régénération musculaire (Smythe et al., 2001; Vaittinen et al., 2001).

1.2.1.1.4 Auto-renouvellement des cellules satellites.

L'auto-renouvellement des cellules satellites est un processus nécessaire sans lequel le processus récurrent de régénération musculaire conduirait rapidement à la perte du stock de cellules satellites. Une petite portion (environ 20%) des cellules satellites se divisent plus lentement pour remplir à nouveau le stock de cellules satellites (Baroffio et al., 1995; Baroffio et al., 1996; Schultz, 1996). Deux hypothèses sont avancées pour la mise en place de l'auto-renouvellement : (1) L'auto-renouvellement des cellules satellites résulte d'une division asymétrique générant deux cellules sœurs distinguables, une commise à la différenciation myogénique, et une cellule souche ; (2) alternativement, les cellules satellites peuvent subir une division symétrique avec une cellule fille capable de se retirer du programme de différenciation et revenir à la quiescence. Aucune de ces deux hypothèses n'a pu être contredites. En faveur de l'hypothèse de la division asymétrique, Conboy et Rando ont montré que Numb, une protéine cytoplasmique accrochée à la membrane plasmique, est ségrégée de manière asymétrique dans les cellules satellites en cours de division *in vitro* (Conboy and Rando, 2002). Numb doit influencer le destin des cellules en réprimant la signalisation de Notch, une voie de signalisation connue pour réguler la différenciation cellulaire dans différents systèmes et organismes (Delfini et al., 2000). Dans les cellules en culture, l'activation de Notch-1 semble activer la prolifération des cellules satellites « primitives » (Numb-/Pax3+/Desmine-/Myf5-/MyoD-), tandis que son inhibition conduit à l'engagement des cellules souches en myoblastes (Numb+/Pax3-/Desmine+/Myf5+) et leur différenciation myogénique (Conboy and Rando, 2002). Donc, la division cellulaire asymétrique des cellules satellites, marquée par une répartition asymétrique de Numb, conduirait à l'auto-renouvellement des cellules satellites à cause de l'expression génique différente.

Un des rôles suggérés pour Myf5 serait de faciliter l'auto-renouvellement des cellules satellites. L'augmentation de la prolifération et la diminution de la différenciation chez les cellules MyoD^{-/-} est consistant avec le fait que les cellules déficientes pour MyoD représentent un stade intermédiaire entre les cellules satellites quiescentes et les cellules précurseurs myogéniques (Cornelison et al., 2000; Sabourin et al., 1999; Yablonka-Reuveni et al., 1999). Une fois activées, les cellules satellites expriment soit Myf5 ou MyoD seul, plutôt que de co-exprimer les deux MRFs et initier la différenciation terminale, a conduit à l'hypothèse que les cellules Myf5⁺/MyoD⁻ représentent un stade développemental durant lequel les cellules satellites s'auto-renouvellent (Baroffio et al., 1996). Certaines données suggèrent que le retour à la quiescence des cellules satellites nécessite la dérégulation de Myf5 (Beauchamp et al., 2000).

De plus, le renouvellement du stock de cellules satellites n'est pas exclusif au compartiment des cellules satellites. Les cellules souches adultes, autres que les cellules satellites, sont capables de différenciation myogénique. En absence de Pax7, le nombre de cellules hématopoïétiques précurseurs dans les cellules souches dérivées du muscle augmente. Cela suggère que, Pax7 promeut la détermination des cellules satellites et restreint les voies de signalisation alternative des cellules souches multipotentes (Seale et al., 2000).

De plus, il a été montré récemment que les cellules satellites sont absolument nécessaires à la régénération (Murphy et al., 2011).

1.2.1.1.5 Multipotentialité.

Les cellules satellites ont des propriétés pluripotentes (Asakura et al., 2001; Wada et al., 2002). Elles sont considérées comme des cellules souches de la lignée myogénique. Il a été montré que les protéines morphogénétiques de l'os induisent la conversion ostéogénique et adipogénique des cellules satellites isolées de souris adultes (Asakura et al., 2001; Wada et al., 2002). La différenciation ostéogénique des myoblastes primaires est caractérisée par une co-expression transitoire des marqueurs myogéniques (MyoD, Myf5 et Pax7) et ostéogéniques (alcaline phosphatase), suggérant une transdifférenciation directe de la lignée myogénique à la lignée ostéogénique, plutôt que le passage par un « ancêtre » commun. Il existe également des conversions spontanées des cellules satellites vers les lignages ostéogéniques et adipogéniques mais ce sont des phénomènes rares. Les cellules satellites fraîchement isolées de fibres musculaires n'expriment pas les facteurs myogéniques Myf5 et MyoD, ce qui suggèrent que les cellules satellites quiescentes sont plus plastiques et peuvent entrer facilement dans un lignage non myogénique (Cornelison and Wold, 1997; Maley et al., 1994; Smith et al., 1994; Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994). *In vitro* les cellules satellites sont capables de se différencier en cellules ostéogéniques ou adipogéniques. Cependant, le potentiel de différenciation des cellules satellites semble être limité aux lignées cellulaires mésenchymateuses comme le démontre leur aptitude à subir une conversion hématopoïétique (Asakura et al., 2002). On retrouve une accumulation de tissus adipeux dans des muscles qui dégénèrent chez des patients souffrant de la myopathie de Duchenne, ou chez le modèle de souris *mdx* ou dans d'autre modèle de régénération musculaire (Dulor et al., 1998; Pastoret and Sebillé, 1995).

1.2.1.2 Contribution des autres cellules souches dans le processus de réparation musculaire.

De récentes études ont montré la présence de cellules souches pluripotentes dans différents tissus adultes et contestent l'idée que les cellules souches spécifiques d'un tissu sont prédéterminés à un lignage tissulaire spécifique. Les cellules souches adultes se différencient *in vitro* et *in vivo* en différents types cellulaires dépendants de son environnement. La moelle osseuse et les cellules musculaires adultes peuvent se différencier en cellule musculaire *in vitro* et contribue à la régénération musculaire *in vivo* (figure 4) (Goldring et al., 2002; Grounds et al., 2002; Seale and Rudnicki, 2000).

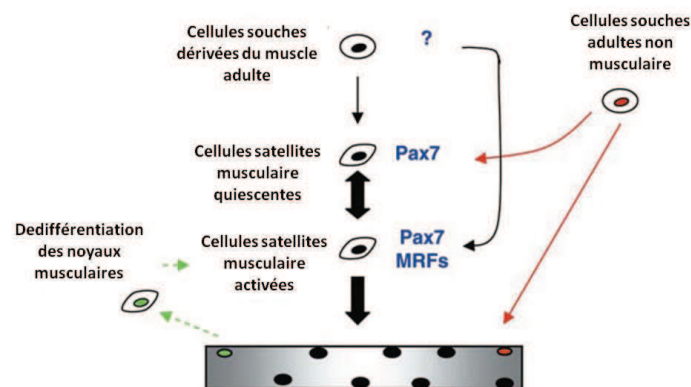


Figure 4. Sources possibles de noyaux musculaires pendant la régénération du muscle squelettique.

La régénération du muscle squelettique implique l'activation et la prolifération des cellules satellites quiescentes, ainsi que leur différenciation et leur fusion pour donner de nouveaux noyaux musculaires pour la réparation musculaire (flèches noires épaisses). Le facteur de transcription Pax7 est requis pour la spécification et la survie des cellules satellites, alors que les facteurs MRFs sont essentiels pour la prolifération et la différenciation des cellules satellites. Il existe des cellules souches musculaires adultes pluripotentes (cellules souches dérivées du muscle adulte) capables d'engagement myogéniques. Ces cellules contribuent au stock de cellules satellites et de noyaux musculaires mais avec une faible fréquence (flèches noires fines). Les cellules souches capables d'engagement myogénique peuvent être isolées d'autres tissus adultes (cellules souches de moelle osseuse, cellules souches neuronales et mésenchymateuses) (flèches rouges). Une hypothèse est que les myo-noyaux ré-entre dans le cycle cellulaire durant la réparation musculaire (flèches vertes pointillées). Modifié de (Chargé and Rudnicki, 2004).

1.2.1.2.1 Cellules souches non musculaire.

Il existe une activité myogénique chez une population de cellules dérivées des cellules souches de la moelle osseuse. Cette population de cellules est Sca-1 (stem cell antigen-1) +, cKit+, CD43+, CD45+, CD4-, CD5-, CD8-, CD34- (Gussoni et al., 1999). Il a également été montré que cette population de cellules contribue à la régénération des myofibres, mais également au stock de cellules satellites (LaBarge and Blau, 2002).

1.2.1.2.2 Cellules souches présentes dans le muscle squelettique.

Il existe une population de cellules souches musculaires capables de reconstruire le répertoire hématopoïétique après une injection intraveineuse dans des souris irradiées. Ces cellules musculaires peuvent réaliser une conversion myogénique *in vivo* (Gussoni et al., 1999). La présence de ces cellules dans une musculature Pax7^{-/-}, c'est-à-dire dépourvue de cellules satellites, suggère que ces cellules musculaires et les cellules satellites représentent deux sous populations musculaires différentes (Seale et al., 2000). Une sous population de cellule musculaire n'exprime pas les marqueurs des cellules satellites comme Myf5, Pax7 ou Desmine (Asakura et al., 2002). Ces cellules musculaires seraient les cellules progénitrices des cellules satellites (Asakura et al., 2002; Gussoni et al., 1999; Seale et al., 2000). Il y a donc de fortes évidences de la présence de cellules progénitrices avec un potentiel myogénique autres que les cellules satellites dans le muscle squelettique. Après une régénération incluant des dommages vasculaires, les cellules Sca-1⁺/CD34⁺ migrent des vaisseaux sanguins dans les myoblastes régénérants (Torrente et al., 2001). Ces résultats suggèrent que les cellules souches présentes dans le système vasculaire peuvent être activées pour entrer dans le lignage myogénique si les dommages sont suffisamment importants.

Il existe une autre population de cellules Sca-1⁺/CD34⁺ appelée MDSC (Muscle-Derived Stem Cell). Elles ont des caractéristiques retrouvées classiquement chez des progéniteurs non engagés comme une forte capacité d'auto-renouvellement, une forte prolifération, et sont pluripotentes (Qu-Petersen et al., 2002). Cependant les cellules MDSC n'ont pas d'origine hématopoïétique. De plus plusieurs observations montrent qu'elles sont des progénitrices des cellules satellites : elles ont un fort potentiel de conversion myogénique ; elles peuvent exprimer spontanément des marqueurs myogéniques comme MyoD ou desmine ; elles ont des caractéristiques phénotypiques similaires (Sca-1⁺/m-cadhérine⁻) que la sous population de cellules identifiées comme des cellules satellites *in situ* (Qu-Petersen et al., 2002). Il apparait donc que CD34 joue un rôle important dans l'identification des progéniteurs myogéniques. Cependant, l'identification de sous population de cellules satellites exprimant CD34 suggèrent que CD34 est également exprimé dans les cellules myogéniques et montre bien la nécessité de marqueurs multiples pour l'identification des cellules souches dérivées du muscle autres que les cellules satellites (Beauchamp et al., 2000; Lee et al., 2000).

1.2.2 La régénération musculaire

Les blessures du muscle squelettique peuvent provenir d'une exposition à des agents myotoxiques, d'un traumatisme tranchant ou contondant comme une ponction ou une contusion, d'une ischémie, d'une exposition à des températures chaudes ou froides, à sa propre contraction musculaire et de maladies comme les dystrophies.

Le muscle squelettique a une capacité de se régénérer qui se fait quotidiennement aussi bien qu'en réponse à une blessure (Doyonnas et al., 2004). La réparation du muscle squelettique est un processus qui fait intervenir une réponse cellulaire et moléculaire, où la coordination entre l'inflammation et la régénération est cruciale (Charge and Rudnicki, 2004; Mourkioti and Rosenthal, 2005). Le processus de réparation suivant un dommage musculaire est un processus composé de deux phases: la dégénérescence et la régénération. Bien que le processus de réparation soit similaire après différents dommages, la cinétique et l'amplitude

de chaque phase dépend de la particularité du dommage, l'étendue des dommages, ou le modèle de dommage utilisé (Carlson and Faulkner, 1983; Charge and Rudnicki, 2004; Irintchev and Wernig, 1987; Papadimitriou et al., 1990).

1.2.2.1 *Dégénérescence.*

Initialement on observe une nécrose rapide des myofibres qui se caractérise par la dysruption du sarcolemme des fibres musculaires et donc une augmentation de la perméabilité. Il en résulte, une augmentation de la concentration plasmatique de protéines musculaires comme la créatine kinase, qui sont normalement retenues dans le cytosol. Cette augmentation du niveau de créatine kinase peut être observée après un stress mécanique, aussi bien que dans les maladies dégénératives comme les dystrophies musculaires (Sorichter et al., 2001; Zatz et al., 1991). De plus, comme les protéines cytosoliques ne reflètent pas forcément le niveau de dommages structuraux, des protéines comme les MHCs et la troponine sont utilisées comme marqueurs de dommages de l'appareil contractile (Sorichter et al., 1997; Sorichter et al., 1999).

Les phases précoces de blessures musculaires s'accompagnent d'infiltration du muscle endommagé par des cellules inflammatoires. Les cellules infiltrantes sont également importantes pour l'activation des processus de réparation nécessaires à la récupération des dommages. Le muscle endommagé sécrète des facteurs qui vont réguler l'activation des cellules inflammatoires et myogéniques (McClung et al., 2007). Une à six heures après le dommage musculaire le nombre de neutrophiles augmentent et ils envahissent le muscle endommagé (McClung et al., 2007). 48 h après la blessure, les cellules majoritaires sont les macrophages qui migrent vers la zone de blessure via le sang. Dans le cas de dommages importants de l'approvisionnement en sang à la zone blessée, la régénération ne peut avoir lieu que lorsque de nouveaux vaisseaux sanguins pénètrent dans la zone (Carlson and Faulkner, 1983). Après l'infiltration, les macrophages phagocytent les débris cellulaires et enlèvent les myofilaments disruptés, d'autres structures cytosoliques et les sarcolemmes endommagés. De plus, les macrophages activent également les cellules myogéniques (Lescaudron et al., 1999; Saclier et al., 2013). Les caractéristiques histologiques principales pendant les premières phases après une blessure sont la nécrose des fibres musculaires et une augmentation des cellules non-musculaires mononuclées dans la zone de blessure.

1.2.2.2 *Régénération*

Pendant la dégénérescence, le processus de réparation est activé. Un des événements nécessaire à la régénération est la prolifération cellulaire. Les nouvelles fibres musculaires sont formées à la suite de la phase de prolifération myogénique. Les cellules myogéniques se différencient et fusionnent avec les fibres endommagées à réparer ou avec les fibres existantes pour en former de nouvelles (Snow, 1977).

Les caractéristiques de la régénération musculaires sont (a) que les nouvelles fibres formées ont une forte synthèse protéique et expriment la forme embryonnaire de MHC, ce qui signifie que les fibres sont formées *de novo* (Whalen et al., 1990); (b) pendant la régénération les cellules fusionnent localement au site de la blessure (Blaveri et al., 1999); et (c) les fibres sont séparées, ce qui est dû à la fusion incomplète des fibres qui régénèrent au sein de la

même lame basale (Blaveri et al., 1999; Bourke and Ontell, 1984). Quand la fusion des cellules myogéniques est incomplète, la taille des myofibres nouvellement formées augmente et les noyaux, préalablement placés en position centrale, migrent à la périphérie de la fibre. Finalement, le nouveau tissu musculaire est similaire au muscle non blessé, aussi bien morphologiquement que fonctionnellement.

1.2.2.3 Facteurs contribuant à la régénération.

Après un dommage des fibres musculaires, les cellules quiescentes sont activées pour entrer dans le cycle cellulaire et proliférer pour permettre l'expansion de la population de cellules myogéniques. Le processus de régénération et de différenciation des cellules satellites pendant la régénération est régulé par une famille de facteurs de transcription MRFs incluant MRF4, myogénine, MyoD et Myf5. Après une blessure, Myf5 et MyoD sont les premiers MRFs à être exprimés dans les cellules régénérantes, suivis de la myogénine et de MRF4 (Pavlat et al., 2003; Suelves et al., 2004). En réponse au signal envoyé par les myofibres endommagés, les cellules satellites quiescentes sont activées et commencent à proliférer (Charge and Rudnicki, 2004). Les cellules satellites activées se caractérisent par un niveau d'expression de MyoD et de Myf5 élevé. La différenciation s'accompagne d'une expression de MRF et de la sortie irréversible du cycle cellulaire (Cooper et al., 1999; Pavlat et al., 2003; Smith et al., 1994). Dans les cellules satellites quiescentes, ni MyoD ni Myf5 ne sont exprimés, suggérant que l'expression des MRFs est incompatible avec l'arrêt réversible (Sachidanandan et al., 2002; Yablonka-Reuveni and Rivera, 1994). Il a été montré que les cellules satellites entrent dans le compartiment MRF-positif, si elles expriment Myf5 ou MyoD. Ceci est suivi par la co-expression des deux (Cornelison and Wold, 1997). Cependant, MyoD et Myf5 jouent des rôles différents pendant la régénération : MyoD favorise la différenciation terminale des cellules satellites et Myf5 favorise l'auto-renouvellement des cellules satellites (Kablar and Rudnicki, 2000; Yoshida et al., 1998). Le rôle de MyoD dans les cellules satellites activées est de stimuler directement ou indirectement, l'augmentation du niveau de MRF4 dans les stades tardifs de régénération (Pavlat et al., 2003). MyoD se fixe sur la région promotrice du facteur de transcription Slug (Snai2) dans les myofibres et l'active pendant la différenciation. L'expression de Slug est augmentée pendant les phases tardives de régénération musculaire (Zhao et al., 2002).

L'augmentation de la régulation de myogénine et MRF4 caractérise la différenciation terminale des myoblastes. Dans le muscle adulte en cours de régénération et dans les cellules satellites activées, MRF4 apparaît après la myogénine, suggérant que la myogénine est nécessaire pour l'activation de l'expression de MRF4, bien que d'autres facteurs soient également impliqués. MRF4 stimule la différenciation précoce et la formation des myotubes. MRF4 agit également dans une boucle de rétrocontrôle positif pour réguler son expression au cours de la régénération (Cornelison and Wold, 1997; Pavlat et al., 2003).

Le facteur nucléaire myocyte (MNF) est un facteur de transcription exprimé sélectivement dans les cellules satellites et agit dans la régulation des gènes qui coordonnent la prolifération et la différenciation des cellules satellites après une blessure musculaire (Garry et al., 2000). Il existe deux isoformes de MNF, MNF α qui est plus abondant lorsque les cellules satellites sont activées après une blessure ; et MNF β qui est moins exprimé. Puis,

cette balance est inversée lors de la régénération et lorsque la population de cellules satellites quiescentes est ré-établie.

Dans les stades précoces de la régénération, l'activation de STAT3 (Signal Transducer and Activator Transcription 3) se fait dans les noyaux des cellules précurseurs myogéniques activées, puis se poursuit dans les cellules satellites proliférantes exprimant MyoD. STAT3 activé est important pour la protection des cellules satellites activées, des myoblastes qui prolifèrent et des myofibres survivantes de l'apoptose et l'inhibition de la prolifération des myoblastes à des stades précoces de la régénération des myoblastes (Kami and Senba, 2002; Sun et al., 2007).

Galectin-1, une protéine de liaison aux carbohydrates, est exprimée fortement dans le muscle squelettique. Elle est un facteur impliqué non seulement dans le développement du muscle squelettique, mais également dans la régénération du muscle adulte. Après une blessure, l'immunoréactivité de la galectin-1 est augmentée dans le cytoplasme des cellules satellites activées. Puis, les myoblastes différenciés perdent l'immunoréactivité de la galectin-1 (Kami and Senba, 2005). Il a été proposé que cette protéine est un nouveau facteur permettant à la fois la fusion des myoblastes et la croissance axonale suivant la blessure musculaire, et régule la croissance des myotubes durant la régénération du muscle squelettique (Georgiadis et al., 2007; Kami and Senba, 2005).

1.2.3 Rôles des facteurs sécrétés dans la régénération musculaire.

La réparation du muscle squelettique est un mécanisme impliquant l'activation des cellules satellites quiescentes pour qu'elles prolifèrent et se différencient. Cette activation nécessite le contrôle de la régulation de facteurs de transcription musculaires et de gènes spécifiques du muscle. Différents facteurs de croissance sécrétés sont importants pendant ce processus (figure 5). Les blessures musculaires entraînent la libération de molécules actives dans l'espace extra-cellulaire. Ces molécules doivent être endogènes aux tissus blessés ou être synthétisées et sécrétées par d'autres types cellulaires au niveau du site de la plaie, comme les neutrophiles ou les macrophages. Tous ces facteurs jouent un rôle dans les différentes étapes de la régénération musculaire.

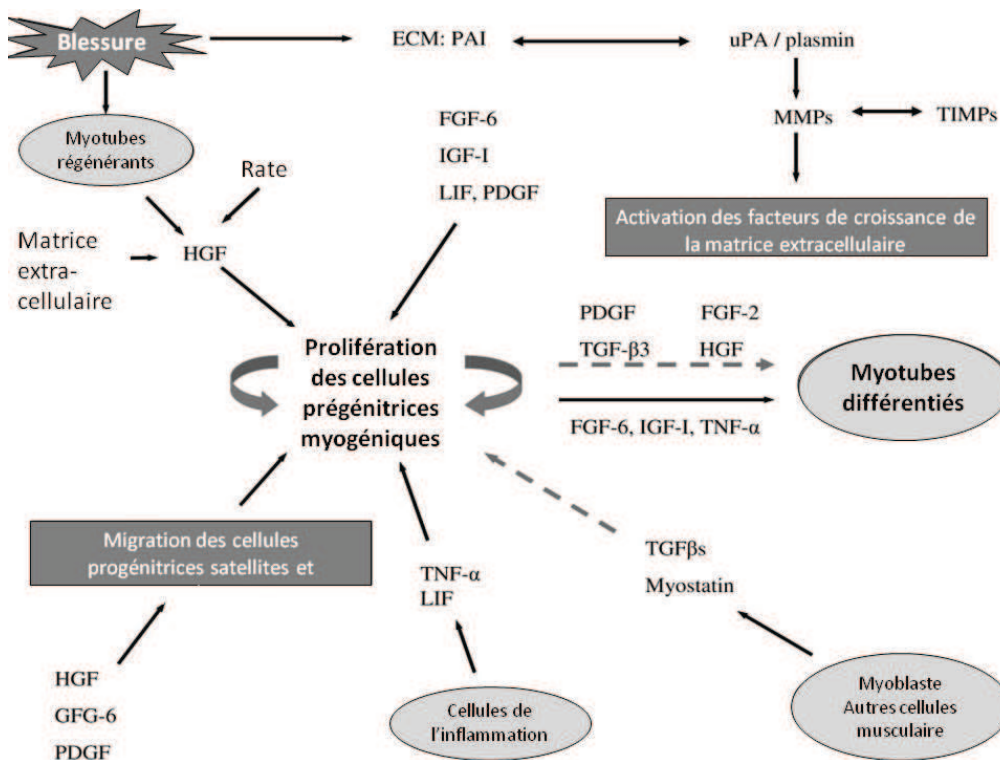


Figure 5. Le rôle des facteurs sécrétés et de la matrice extracellulaire dans la régénération musculaire.

1.2.3.1 Facteur de croissance hépatocytaire (HGF)

HGF est un facteur protéique lié à la matrice extracellulaire dans le muscle et libéré en réponse à une blessure. Son activité mitogénique (prolifération cellulaire), motogénique (migration cellulaire) et morphogénique (différenciation cellulaire) sont essentiels pour la régénération musculaire (Miller et al., 2000). HGF permet aux cellules satellites quiescentes d'entrer dans le cycle cellulaire (Leshem et al., 2000). Il y a deux théories à propos de son action : (1) HGF activerait la protéine kinase p38 activée par un mitogène (MAPK) et la kinase 3-phosphatidylinositol (PI3K) (Shi and Garry, 2006); (2) HGF dérégulerait l'expression de la cavéoline-1 qui conduirait à l'augmentation de l'expression de la voie de signalisation ERK qui est nécessaire pour l'activation des cellules satellites (Volonte et al., 2005). Il a également été proposé que HGF inhibe la différenciation des cellules progénitrices myogéniques (Miller et al., 2000), en régulant les protéines Twist et p27. Quand les cellules satellites prolifèrent, le niveau de p27 augmente jusqu'à un seuil. Les cellules sortent alors du cycle cellulaire, dérégulent l'expression de Twist et se dédifférencient. HGF induit Twist et réduit l'expression de p27 et ces régulations sont nécessaires pour l'inhibition de la différenciation par HGF (Leshem et al., 2000). In vitro, il a été montré que la liaison de HGF à son récepteur, c-met, entraîne une diminution de l'expression de MyoD et myogénine et inhibe la synthèse de protéines de structure spécifiques du muscle (MHCs) et la formation de myotubes (Anastasi et al., 1997). HGF peut stimuler la migration de cellules satellites ou des cellules progénitrices myogéniques vers le site de la blessure grâce à l'activation de la voie de signalisation Ras-Ral ou ERK (Chargé and Rudnicki, 2004). HGF est produit et libéré pendant la régénération des myotubes (Sheehan et al., 2000). Au cours d'une blessure, il est

également libéré de la matrice extracellulaire par un mécanisme NO-dépendant (Shi and Garry, 2006). C-met est un récepteur tyrosine-kinase exprimé sur les cellules satellites quiescentes du muscle squelettique. Sa présence est importante au cours de la formation du muscle pendant l'embryogénèse mais également pendant sa réparation après une blessure (Anastasi et al., 1997).

1.2.3.2 Facteurs de croissance des fibroblastes (FGF)

FGF-6 appartient à la famille des cytokines qui contrôlent la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et les événements morphogéniques. Plusieurs membres de la famille FGF sont exprimés dans le muscle squelettique en développement mais seul FGF-6 participe à la réparation musculaire (Floss et al., 1997; Kastner et al., 2000). Le haut niveau de FGFs libéré pendant l'inflammation après une désorganisation du tissu, induit la prolifération des cellules satellites et est responsable du chimiotactisme des cellules progénitrices musculaires (Husmann et al., 1996). FGF-6, dont l'expression est stimulée après une blessure (Shi and Garry, 2006), induit des changements morphologiques, modifie l'adhésion des cellules satellites et compromet leur habilité à se différencier en myotubes (Dusterhoft and Pette, 1999). Comme les autres FGFs, FGF-6 possède une activité angiogénique. FGF-6 stimule la prolifération des cellules satellites et induit l'expression de gènes nécessaires pour leur différenciation terminale, comme MyoD et myogénine (Floss et al., 1997; Kastner et al., 2000). FGF-1 exerce un rôle paracrine de ce facteur dans les phases précoces de la régénération musculaire (Husmann et al., 1996). FGF-2 régule l'activité des cellules satellites pendant la régénération musculaire, en induisant leur entrée dans le cycle cellulaire, mais son rôle mitogénique est limité aux premiers jours après la blessure. Les FGFs transmettent leur signal via leur récepteur tyrosine-kinase transmembranaire FGFR. FGFR1 semble réguler la prolifération des cellules satellites, alors que FGFR4 est impliqué dans leur différenciation (Kastner et al., 2000). FGF-2 peut interagir avec d'autres facteurs de croissance pour stimuler la synthèse et la sécrétion du facteur de croissance nerveux. FGF-5 est un facteur de survie dérivé du muscle pour les cultures de motoneurones spinaux, important pour la ré-innervation pendant la régénération du muscle. FGF-6 est exprimé dans le muscle adulte et pendant l'embryogénèse. FGF-7 régule la division et la différenciation des myoblastes dans le développement des myotubes, et est actif pendant le développement précoce de la musculature des membres (Husmann et al., 1996). FGF-6 agit en stimulant l'entrée des cellules satellites dans le cycle cellulaire, plutôt qu'en augmentant l'expression de MyoD.

1.2.3.3 IGF

L'hormone de croissance (GH) agit directement sur le muscle squelettique pendant la régénération. Son récepteur est présent, mais il est plus difficile de montrer une fixation directe de GH aux cellules musculaires (Florini et al., 1996). A l'inverse, le rôle d'IGF dans la réparation musculaire est évident. IGF-I est connu pour induire l'hypertrophie musculaire en augmentant la taille des myotubes et la synthèse protéique (Bark et al., 1998; Pelosi et al., 2007). Il cause également des changements biochimiques comme l'activation d'enzyme et augmente la glycolyse anaérobie (Bark et al., 1998). De plus IGF-I permet la croissance musculaire en inhibant la dégradation protéique et en supprimant l'expression de deux ligases

relatives à l'atrophie du muscle, Murf1 (Muscle Ring Finger 1) et atrogine-1 (Bodine et al., 2001a; Satchek et al., 2004). Donc IGF-I prévient la perte de masse musculaire et contribue à l'augmentation de la force musculaire (Adams and McCue, 1998; Pelosi et al., 2007). Pendant la régénération, IGF-I stimule la prolifération et la différenciation des cellules musculaires (Engert et al., 1996; Florini et al., 1996; Hirata et al., 2003). IGF augmente le potentiel de différenciation des cellules satellites (Chakravarthy et al., 2000), en augmentant l'expression de médiateur intracellulaire comme la cycline-D (Chakravarthy et al., 2000; Philippou et al., 2007). Il stimule également la différenciation terminale en induisant l'expression de la myogénine (Florini et al., 1996). IGF-I augmente la prolifération, puis induit la différenciation des cellules satellites (Engert et al., 1996). Il existe différentes isoformes d'IGF-I. IGF-IEc est rapidement activé et ensuite diminué dans le muscle endommagé. Cette isoforme est responsable de l'activation des cellules satellites, de leur prolifération et diminue leur différenciation terminale en myotubes. IGF-IEa augmente l'index mitotique, augmente la différenciation terminale et permet la fusion des cellules myogéniques. Ces deux isoformes permettent l'augmentation de la synthèse protéique (Hill and Goldspink, 2003; Yang and Goldspink, 2002). Il a été montré qu'IGF-I permet de réduire la fibrose et de moduler la réponse inflammatoire suite à une blessure en dérégulant les cytokines pro-inflammatoires (Pelosi et al., 2007). Le rôle d'IGF-II dans la réparation musculaire est peu étudié. IGF-I et IGF-II sont exprimés à des stades différents de la régénération, IGF-I étant exprimé avant IGF-II (Hayashi et al., 2004). Il semble donc qu'IGF-I et IGF-II ont des effets différents sur l'expression des gènes, et IGF-II semble être lié à la formation des myotubes (Levinovitz et al., 1992).

1.2.3.4 *TGFβ (Transforming Growth Factor)*

TGFβ₁, TGFβ₂ et TGFβ₃ font partis de la famille des TGFβs, une petite famille de facteurs de croissance multifonctionnels. Leur caractéristique commune est leur capacité à se lier aux protéines extracellulaires et d'être stockées dans la matrice extracellulaire jusqu'à leur activation par un processus physiologique comme la cicatrisation des plaies (Casar et al., 2004). Après une blessure, TGFβ est libéré par la dégranulation des plaquettes au niveau du site de la blessure et auto-induit sa propre production par les cellules résidentes. TGFβ₃ est synthétisé par les myoblastes et inhibe la différenciation myogénique. Après la dénervation et l'ischémie du muscle squelettique, TGFβ₂₁ et TGFβ₃ sont exprimés par le muscle en cours de régénération durant les premiers jours après le traumatisme (Husmann et al., 1996).

In vitro, TGFβ peut ralentir la prolifération des cellules satellites et leur différenciation de façon dose-dépendante (Allen and Boxhorn, 1987). TGFβ est également connu pour réguler la réponse immunitaire et la survie des motoneurons après une blessure (McLennan and Koishi, 2002). Il stimule la synthèse de fibronectine, de collagène, de protéoglycane, de nouvelles protéines de la matrice et il induit l'angiogénèse. TGFβ₂ régule le lieu et le moment où les myoblastes fusionnent et TGFβ₁ permet la différenciation des fibroblastes et permet l'inhibition du développement myogénique, régulant ainsi la formation de l'épimysium et du pérимysium (McLennan and Koishi, 2002). Les TGFβs influencent la réorganisation de la matrice extracellulaire tout au long de la régénération musculaire. Ils sont responsables de la

reconstruction de la membrane basale et de la matrice extracellulaire qui entourent les myofibres endommagées et les cellules satellites activées (Husmann et al., 1996).

1.2.3.5 *Myostatine (Mstn)*

La Mstn, un membre de la famille TGF β , joue un rôle important dans la régulation de la croissance du muscle squelettique. Les souris mutantes Mstn^{-/-} ont une large augmentation de la masse musculaire (Lee and McPherron, 2001), avec une augmentation de la taille et du nombre de fibres. Mstn est donc un régulateur négatif du développement musculaire et de la régénération (Zhu et al., 2004). Il est exprimé durant l'embryogénèse et dans le muscle squelettique adulte. La Mstn est exprimée dans les fibres nécrotiques et les tissus conjonctifs pendant la phase de dégénérescence durant la réparation musculaire. Les myotubes qui régénèrent ne contiennent pas de Mstn pendant leur élargissement et la fusion (Kirk et al., 2000). Ainsi, la Mstn agit comme un inhibiteur de la croissance musculaire probablement en réprimant la prolifération des cellules satellites pendant la régénération musculaire. *In vitro*, il a été montré que la Mstn inhibe la prolifération cellulaire et la synthèse protéique des cellules C2C12 (Taylor et al., 2001), aussi bien que l'expression de MyoD et Pax3 (Langley et al., 2002), tandis qu'il stimule l'expression de gènes prenant part dans la protéolyse médiée par l'ubiquitine.

1.2.3.6 *Facteur de nécrose tumorale α : TNF α*

L'inflammation est une réponse clé à la blessure musculaire, et elle est essentielle à la régénération musculaire. TNF α , produit par les leucocytes activés, joue plusieurs rôles dans l'inflammation, comme l'activation et le chimiotactisme des leucocytes, l'expression des molécules d'adhésion et la régulation de la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires (Collins and Grounds, 2001; Warren et al., 2002). TNF α semble contribuer à la perte des protéines musculaires pendant la phase de dégénération du processus de régénération musculaire. TNF α permet l'activation du facteur nucléaire κ B (NF- κ B), un facteur de transcription qui, une fois activé, altère l'expression des gènes et cause la protéolyse dans les cellules du muscle squelettique. TNF α permet l'expression d'atrogin-1, conduisant au catabolisme des protéines musculaires qui est le résultat de l'activation de la voie ubiquitine/protéasome dans les fibres musculaires, et qui est médié par la voie de signalisation p38 MAPK (Bodine et al., 2001a; Li, 2003). Après la blessure musculaire, TNF α est libéré par les macrophages infiltrants mais aussi par les fibres musculaires blessées (Collins and Grounds, 2001). Son expression est élevée pendant la réparation et retourne à la normale quelques jours après la blessure. Donc TNF α a un double rôle pendant la régénération musculaire : c'est un facteur de compétence (activant les cellules satellites pour qu'elles entrent dans le cycle cellulaire) et un facteur de progression (permettant aux cellules satellites de proliférer) (Li, 2003).

1.2.3.7 *Interleukine-6 (IL-6)*

IL-6 est la cytokine majeure impliquée dans la régulation du processus inflammatoire après une blessure musculaire (Gadient and Patterson, 1999). L'évolution de l'expression d'IL-6 pendant une blessure est la même que TNF α *in vitro* (Warren et al., 2002). *In vivo*, IL-6 peut

avoir des effets multiples sur la régénération musculaire : il peut être un facteur qui induit la protéolyse des myofibres endommagées et un signal de prolifération pour les cellules satellites, pour remplacer le tissu musculaire détruit. Le muscle squelettique peut produire l'IL-6 en réponse à un exercice, aussi bien qu'à l'inflammation ou à une blessure (Gallucci et al., 1998; Kurek et al., 1996). Il-1 β est un possible régulateur de la production d'IL-6 dans les myotubes, certainement en activant la voie de signalisation MAPK et NF κ B (Luo et al., 2003). L'épinephrine et TNF α contribue également à sa régulation (Frost et al., 2004; Gallucci et al., 1998).

1.2.3.8 Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)

Il existe trois isoformes : PDGF-AA, -AB et -BB. Dans la régénération musculaire, seul l'isoforme BB a un effet significatif. Les myoblastes se lient sélectivement à l'isoforme BB provoquant une réponse mitogénique. Après que PDGF soit relargué des vaisseaux lésés, des plaquettes et des macrophages, il stimule l'angiogénèse. Il entraîne également la migration cellulaire, incluant celle des cellules progénitrices du muscle adulte. PDGF est d'abord relargué des plaquettes en dégranulation, puis il est relargué en infiltrant des macrophages activés. C'est pourquoi le produit de la destruction des plaquettes stimule la régénération musculaire (Husmann et al., 1996). PDGF ne stimule pas seulement la prolifération des cellules satellites, il inhibe également leur différenciation, tandis qu'il est également chimioattractant pour eux (Chargé and Rudnicki, 2004; Husmann et al., 1996; Shi and Garry, 2006).

Le muscle squelettique se forme au cours de l'embryogénèse. Les mécanismes régulant sa formation sont similaires à ceux nécessaires à la régénération musculaire après une blessure. Différents facteurs entre en jeu, aussi bien myogénique que non myogénique, faisant intervenir les cellules souches du muscle.

Après nous être intéressé au développement et au maintien du muscle squelettique, voyons maintenant la structure du muscle squelettique.

1.3 Structure du muscle squelettique

1.3.1 Organisation anatomique du muscle squelettique.

Le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés d'un ensemble de fibres musculaires. Les muscles sont insérés sur l'os par des fibres de collagène appelées tendons constitués essentiellement de tissu fibreux, élastique et solide. Le muscle squelettique est entouré de plusieurs couches de tissus conjonctifs, l'endomysium entoure chaque fibre musculaire, le périmysium assemble les fibres musculaires en faisceau de fibres et l'épimysium qui recouvre l'ensemble du muscle. Après avoir traversé l'épimysium, les vaisseaux sanguins donnent naissance à un fin réseau de capillaires qui rejoint le périmysium, puis l'endomysium pour vasculariser chaque fibre musculaire. Les prolongements des nerfs gagnent également le périmysium. Ils se finissent en arborisation dont les ramifications se

terminent dans la jonction neuromusculaire pour innervier les différentes fibres musculaires (figure 6).

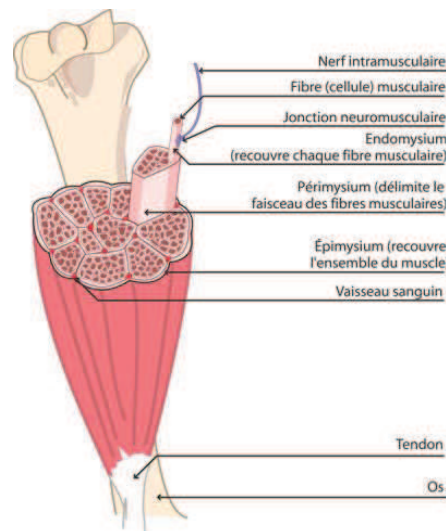


Figure 6. Anatomie du muscle squelettique strié.

D'après la bibliothèque AFM.

1.3.2 Organisation cellulaire du muscle squelettique.

Chaque faisceau musculaire est formé d'un ensemble de fibres musculaires, appelé myofibre. La fibre musculaire est une longue cellule cylindrique de diamètre variant entre 10 et 100 μm et sa longueur peut aller de plusieurs centaines de micromètre à plusieurs dizaines de millimètres. Les myofibres sont entourées d'une membrane plasmique appelée sarcolemme. Une myofibre est un syncytium qui résulte de la fusion de plusieurs cellules au cours du développement embryonnaire. Elle contient donc de nombreux noyaux périphériques, juste en-dessous du sarcolemme. Le centre de la fibre est occupé par les myofibrilles.

1.3.2.1 Les myofibrilles : l'appareil contractile.

Les myofibrilles sont les éléments contractiles de la fibre musculaire. Plusieurs centaines de myofibrilles composent une fibre musculaire. En microscopie photonique, à fort grossissement, elles apparaissent parallèles, orientées selon l'axe longitudinal de la fibre qu'elles parcourent sur toute sa longueur. Elles mesurent entre 1 et 3 μm de diamètre et occupent environ 80% du volume de la cellule. Les myofibrilles sont constituées de faisceaux de myofilaments fins et épais qui sont les protéines contractiles du muscle squelettique.

1.3.2.1.1 Les filaments fins.

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

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

1.3.2.1.2 Filaments épais.

La molécule de myosine compose majoritairement les filaments épais et est constituée de deux chaînes lourdes, d'un poids moléculaire de 200 kDa (MHC : Myosin Heavy Chain) et de deux paires de chaînes légères ayant un poids moléculaire de 20 kDa (MLC : Myosin Light Chain) (figure 5). La partie c-terminale de la chaîne lourde est une hélice α formée de méromyosine légère (LMM) et de méromyosine lourde (HMM). Cette dernière est subdivisée en deux fragments : la tête globulaire (ou partie S1) qui porte l'activité ATPasique et qui se lie à l'actine, et la queue (ou partie S2), une région flexible, et permet de lier des molécules de myosine ensemble pour former les filaments épais (figure 7) (Craig and Woodhead, 2006).

Les chaînes légères contiennent deux chaînes phosphorylables (chaînes régulatrices), et deux autres chaînes non phosphorylables (chaînes essentielles). Une chaîne régulatrice et une chaîne essentielle sont associées à chaque tête de myosine (figure 7). Les domaines de chaînes légères régulent l'activité contractile soit par la phosphorylation des chaînes légères régulatrices, soit en liant le calcium. Les molécules de myosines sont assemblées de façon à ce que les têtes de myosine soient dans des directions opposées. Les filaments fins et épais sont placés côte à côte dans un sarcomère afin de pouvoir interagir, ce qui résultera en une contraction musculaire.

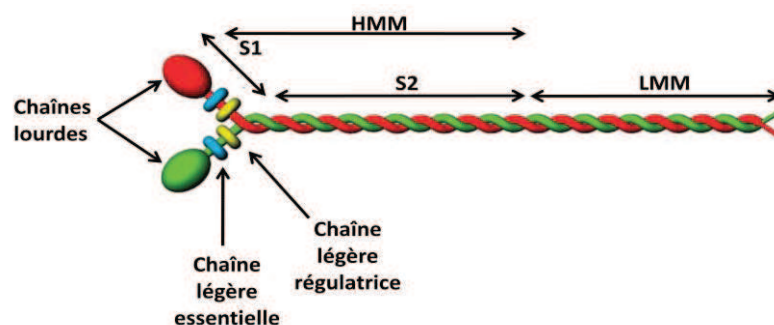


Figure 7. Représentation schématique de la molécule de myosine.

Les chaînes lourdes sont représentées en vert et rouge, les légères en jaune et bleu. HMM : méromyosine lourde, LMM : méromyosine légère. Modifiée de (Craig and Woodhead, 2006).

1.3.2.1.3 Le sarcomère.

L'aspect strié du muscle squelettique résulte de la disposition des filaments fins et épais entre eux. La ligne Z est l'extrémité où se rejoignent les filaments fins d'actine. Un sarcomère est la partie comprise entre deux lignes Z voisines. La figure 8 montre la nomenclature des différentes bandes d'un sarcomère. Les bandes A et I doivent leur nom à leur propriété biréfringente en microscopie électronique, la bande I étant isotrope et la bande A anisotrope. La zone H, est une partie de la bande A où les filaments épais et fins ne se superposent pas. Au centre cette zone, la ligne M est la région des filaments épais dénuée de projection de tête de myosine (Craig and Woodhead, 2006).

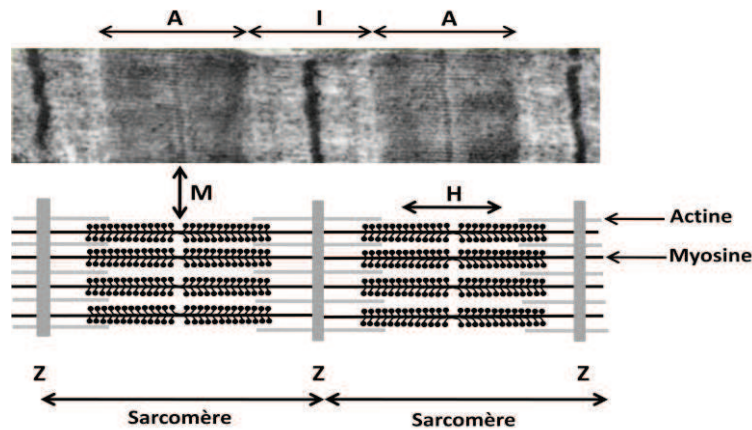


Figure 8. Disposition des filaments fins et épais dans un sarcomère.

D'après (Jones, 2005).

1.3.2.2 Le cytosquelette non contractile.

Les cytosquelettes péri-sarcomérique, inter-myofibrillaire et sous-sarcolemmal composent le cytosquelette non contractile. Les cytosquelettes endo et exo sarcomériques permettent le maintien de l'architecture des myofibrilles et de relier les myofibrilles adjacentes entre elles. Le cytosquelette sous-sarcolemmal connecte l'appareil contractile au sarcolemme et de façon indirecte à la matrice extracellulaire (Berthier and Blaineau, 1997). Le cytosquelette non contractile coordonne la contraction dans l'ensemble de l'appareil contractile en assurant la liaison entre les myofibrilles. Il renforce également la résistance de la structure cellulaire à la contraction en liant les myofibrilles à la matrice extracellulaire.

1.3.2.2.1 Le cytosquelette endosarcomérique.

A l'intérieur des sarcomères, on retrouve la titine et la nébuline. La titine, protéine géante d'environ 1 μm , court de la ligne Z à la ligne M. La phosphorylation de la téléthionine par la titine, lui confère un rôle dans la réorganisation du cytosquelette pendant la myofibrillogénèse (Mayans et al., 1998). La titine procure également une stabilité longitudinale au sarcomère en opposant une résistance en cas d'étirement excessif. La myomésine permet de relier la titine aux filaments épais (Schoenauer et al., 2005). Au niveau de la ligne Z on retrouve également la myotiline, qui lie les filaments d'actine et contribue ainsi à la stabilité des sarcomères (Salmikangas et al., 2003). La nébuline est liée à l'actine près de la ligne Z. Elle régule l'interaction actine-myosine en inhibant l'activité ATPase d'une manière calcium-calmoduline sensible (Root and Wang, 1994) (figure 9).

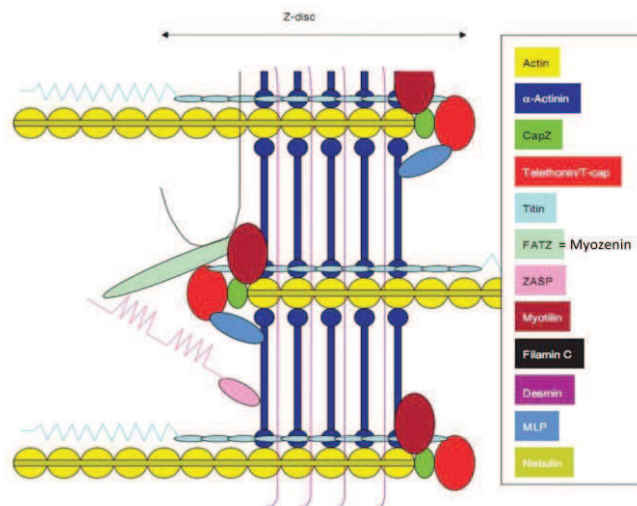


Figure 9. Schéma représentant la structure de la ligne Z.

D'après (Ochala et al., 2009)

1.3.2.2.2 Le cytosquelette exosarcomérique.

Il est composé d'actine γ non contractile et de filaments intermédiaires de desmine (Clark et al., 2002). La desmine est concentrée autour de la ligne Z dans l'espace myofibrillaire et établie ainsi un lien entre les myofibrilles adjacentes. Elle permet de coordonner la contraction des différentes myofibrilles. La vimentine, la nestine, la synémine et la paranémine interviennent également dans la composition des filaments intermédiaires, mais leur rôle est moins bien établi.

1.3.2.2.3 Le cytosquelette sous-sarcolemmal.

Les protéines du cytosquelette sous sarcolemmal sont concentrées au niveau des jonctions neuromusculaires, des jonctions myotendineuses et des costamères, domaines sous membranaires spécifiques, discontinus et à répartition régulière. La fonction des protéines du cytosquelette sous-sarcolemmal est l'ancrage de l'appareil contractile au sarcolemme et à la lame basale, ce qui va permettre la transmission de force à la matrice extracellulaire et le maintien de l'intégrité du sarcolemme lors de la contraction (Pardo et al., 1983; Porter et al., 1992).

Ces protéines peuvent être classées en trois groupes en fonction des interactions physiques qu'elles établissent entre elles : les intégrines, les spectrines et le groupe dystrophine/DAG [Dystrophine Associated Glycoprotein (Berthier and Blaineau, 1997)]. Des défauts de ces protéines sont à l'origine de myopathies chez l'homme. L'absence de la dystrophine, par exemple, est la cause de la myopathie de Duchenne (Wang et al., 2009b).

1.3.2.3 Le réticulum sarcoplasmique et les tubules T.

Le réticulum sarcoplasmique (RS) est le sac membraneux, dont l'intérieur est séparé du cytoplasme de la fibre, qui enveloppe chaque myofibrille. Ce système membraneux a pour fonction la régulation intracellulaire du calcium et participe au contrôle de la contraction musculaire. Les portions proches des tubules T sont appelées citernes internes. Les tubules T

sont des portions de membrane plasmique de la fibre, appelé sarcolemme, qui s'invaginent et qui courent transversalement le long de la fibre, formant un réseau complexe de branches qui entrent en contact et entourent généralement chaque myofibrille.

La zone de rencontre entre le tubule T et le réticulum sarcoplasmique, où les membranes sont proches l'une de l'autre, est appelée triade (figure 10).

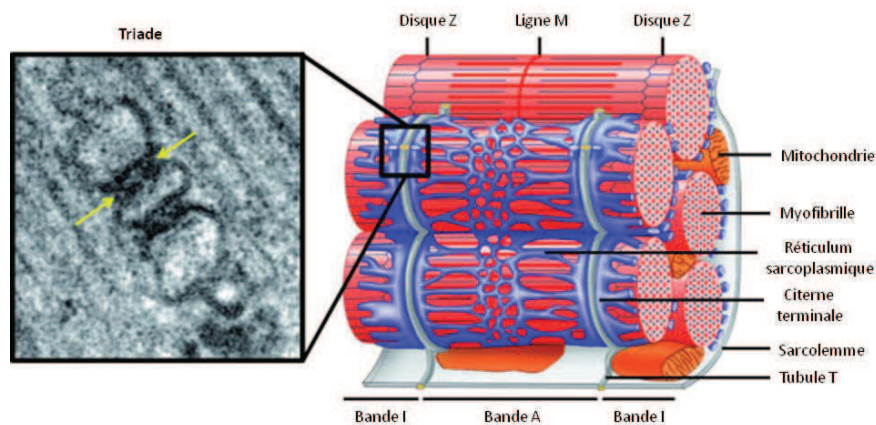


Figure 10. L'organisation de la triade.

Adapté de (Al-Qusairi and Laporte, 2011).

1.3.3 Contrôle du processus contractile.

Le contrôle de la force est précis. La machinerie contractile est activée et désactivée rapidement afin de permettre des mouvements coordonnés complexes.

1.3.3.1 Unité motrice et jonction neuromusculaire.

Chaque fibre musculaire mature est innervée par un seul axone. Le motoneurone α innerve plusieurs fibres musculaires via des branches axonales et toutes les fibres musculaires innervées par un même motoneurone forment une unité motrice (figure 11).

1.3.3.2 Le potentiel d'action.

Les potentiels d'action qui arrivent au niveau de la terminaison axonale entraînent l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants. L'afflux de calcium entraîne la fusion des vésicules synaptiques contenant l'acétylcholine (ACh), puis la libération de leur contenu dans la fente synaptique. La quantité d'ACh libérée d'une seule vésicule est appelée *quantum*. Les récepteurs à l'ACh se trouvent à la surface de la membrane post-synaptique. La liaison de l'ACh à son récepteur entraîne la dépolarisation de la membrane de la fibre musculaire et la propagation de cette dépolarisation est dépendante de la quantité d'ACh libérée dans la fente synaptique. Un seul *quantum* d'ACh produit une dépolarisation de la membrane appelée potentiel de plaque motrice miniature. Si la dépolarisation est importante, c'est-à-dire si la quantité d'ACh libérée atteint un certain seuil, il y aura naissance d'un potentiel d'action. C'est l'entrée massive d'ions Na^+ à l'intérieur de la cellule qui entraîne la dépolarisation de la

membrane (Stephenson, 2006). La cholinestérase, enzyme responsable de l'hydrolyse de l'ACh en choline, est présente dans la fente synaptique. La choline libre sera captée au niveau de la terminaison axonale puis re convertie en ACh par la choline acétyltransférase (figure 11). Les potentiels d'action qui naissent à la jonction neuromusculaire se propagent le long de la fibre et, à l'intérieur de celle-ci, le long des tubules T. La membrane du tubule T se dépolairise et la membrane de surface se repolarise lorsque le potentiel d'action traverse l'intérieur de la fibre.

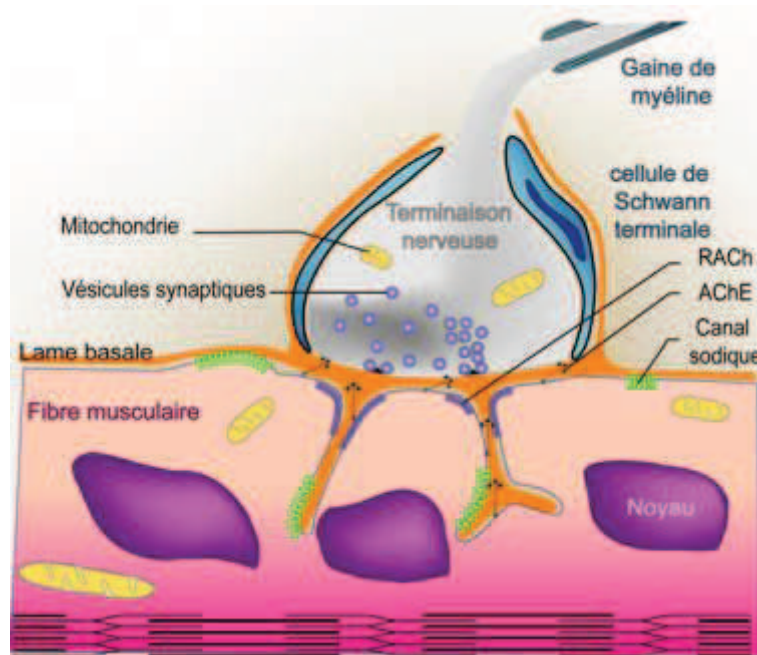


Figure 11. Naissance d'un potentiel d'action.

Les vésicules synaptiques fusionnent pour libérer l'ACh dans la fente synaptique où il se fixe alors sur ses récepteurs (RACH) sur la membrane de la fibre musculaire. Cette liaison entraîne l'ouverture des canaux Na⁺ et l'entrée du Na⁺ dans la cellule provoque une dépolairisation de la membrane musculaire. D'après la bibliothèque AFM.

1.3.3.3 Le couplage excitation-contraction.

Le potentiel d'action dans les tubules T active des récepteurs sensibles au voltage qui vont entraîner la libération de calcium par la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique dans le cytosol. Ce mécanisme est appelé le couplage excitation-contraction.

1.3.3.3.1 Structure de la triade.

La triade est une structure membranaire composée d'un tubule T central entouré de deux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. Le tubule T contient des canaux calciques voltage dépendant de type L aussi appelés récepteur à la dihydropyridine (DHPR) dont l'action est bloquée par le bloqueur de canaux calcique, la dihydropyridine (Miller, 1992).

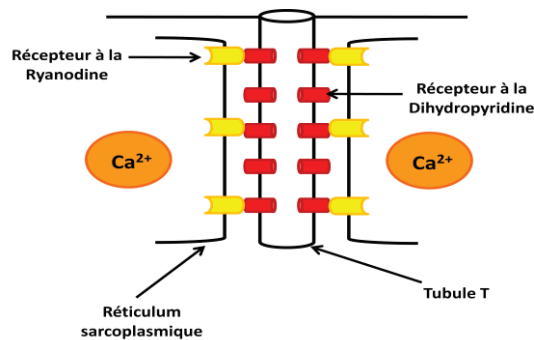


Figure 12. Agencement des récepteurs à la ryanodine et à la dihydropyridine au niveau de la triade. Adaptée de (Jones, 2005).

La membrane du réticulum sarcoplasmique possède des récepteurs à la ryanodine (RyR), appelé ainsi à cause de leur sensibilité à la ryanodine, un alcaloïde d'origine végétale. Deux DHPRs sur le tubule T font face à un RyR sur le réticulum sarcoplasmique [(Flucher et al., 1993), figure 12]. La calsequestrine, la triadine et la jonctine sont trois autres protéines présentes dans le réticulum sarcoplasmique jouant un rôle important dans le couplage excitation-contraction. La calsequestrine, présente dans le lumen du réticulum sarcoplasmique, lie le calcium (Rossi and Dirksen, 2006). La triadine et la jonctine sont deux glycoprotéines structurellement similaires. Le récepteur à la ryanodine, la triadine, la jonctine et la calsequestrine forment un complexe quaternaire par lequel la calsequestrine permet de localiser une forte concentration de Ca^{2+} près de la face luminale du canal RyR grâce à un pont protéique formé par la jonctine et la triadine (Sorrentino, 2004).

1.3.3.3.2 Libération du calcium et contraction du muscle.

La sous-unité $\alpha 1$ du DHPR détecte les changements dans le potentiel de membrane et répond à la dépolarisation par un changement de conformation entraînant l'ouverture du RyR (Miller, 1992). Le calcium relargué par le réticulum sarcoplasmique se fixe à la troponine C, provoquant un changement de conformation qui déplace la tropomyosine de sorte que les sites de liaison à l'actine par la myosine soient découverts. Les ponts de liaison actine-myosine se forment et la force est initiée.

Une fois la contraction terminée, le calcium se dissocie de la troponine et est repompé dans le réticulum sarcoplasmique par un processus ATP dépendant. C'est la protéine appelée Sarco (Endo) plasmique reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA), présente au niveau du réticulum sarcoplasmique, qui permet la récupération du calcium. Cette protéine appartient à la famille des ATPases de type P. Trois isoformes de la protéine existent : SERCA1 exprimée dans les muscles squelettiques rapides ; SERCA2 exprimée dans le cœur et les muscles squelettiques lents et SERCA3 dans les cellules lymphoïdes et les cellules endothéliales (Rossi and Dirksen, 2006). Deux ions Ca^{2+} sont pompés par le réticulum sarcoplasmique en échange de deux ou trois ions H^+ lorsqu'une molécule d'ATP est hydrolysée (Yu et al., 1993).

1.3.4 Propriétés des fibres musculaires.

Plusieurs types de muscles composent la musculature du corps. Certains, comme le muscle soléaire, ont une apparence rouge, alors que d'autres, comme le quadriceps, ont une apparence

blanche. Chaque muscle squelettique est caractérisé par les fibres musculaires qui le composent et qui diffèrent dans leurs propriétés contractiles et métaboliques. Il existe plusieurs classifications pour les répertorier. La première utilisée se base sur l'activité ATPasique des fibres et proposent un classement selon leur vitesse de contraction. L'incubation des fibres à différents pH selon la méthode de Brooke et Kaiser a permis de les classer en trois catégories : les fibres de type I à contraction lente et le fibre de type IIA et IIB à contraction rapide (Brooke and Kaiser, 1970). Peter et collaborateurs ont, quant à eux, combiné la révélation du type contractile par l'activité ATPasique, avec le type métabolique par l'analyse de l'activité de la succinate déshydrogénase ou de la NADH déshydrogénase (Peter et al., 1972). Les fibres de types I sont des fibres lentes à métabolisme oxydatif, les fibres IIA sont intermédiaires à tendance rapide avec un métabolisme oxydo-glycolytique et les fibres IIB sont rapides avec un métabolisme glycolytique. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les MHCs a permis de déterminer une quatrième variété de fibres de type intermédiaire appelé IID et IIX (Termin et al., 1989). Les types de fibres sont résumés dans le tableau 1.

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

Tableau 1. Caractéristiques biochimiques, métaboliques et contractiles des différents types de fibres.

Ces quatre types de fibres sont dites pures mais il existe également des fibres hybrides mises en évidence par l'utilisation d'anticorps anti-MHCs. Ces fibres peuvent exprimer simultanément deux à quatre isoformes de MHCs différentes (Termin et al., 1989). Ces fibres hybrides proviennent de la transition de l'expression des MHCs, qui se fait selon la séquence : I, Ila, IId et Iib. Ces transitions ont lieu avec l'âge, sous l'influence de facteurs tels que le régime alimentaire ou l'exercice (Pette, 1984; Peuker et al., 1999).

1.4 Propriété mécanique du muscle : production de la force.

1.4.1 Contraction musculaire.

La force de contraction musculaire dépend des conditions mécaniques dans lesquelles le muscle est placé. On distingue trois types de contraction.

- contraction isotonique : le muscle se raccourcit ou s'allonge et développe une force constante.
- contraction isométrique : à longueur constante le muscle développe une force. Cette contraction est très importante car c'est l'état des muscles qui stabilisent les articulations pendant que d'autres sont en mouvement.
- contraction auxotonique : la contraction s'effectue à charge et à longueur variable.

1.4.2 Réponse musculaire et tétanos.

L'analyse de la réponse musculaire permet de comprendre le développement temporel d'une force par le muscle. La réponse musculaire à un seul stimulus se traduit par un phénomène électrique correspondant au potentiel d'action et par un phénomène mécanique correspondant à la secousse musculaire avec une latence plus ou moins longue. Lors d'une secousse musculaire, le potentiel d'action se propage après l'application du stimulus en quelques millisecondes, puis il y a une période de latence entre le potentiel d'action et l'apparition de la réponse mécanique due au mécanisme de contraction. Puis il y a la période de contraction au cours de laquelle apparaît la réponse mécanique qui, après avoir atteint un maximum de tension, se prolonge par une période de relaxation où la force diminue et finit par disparaître (Jones, 2005). Les réponses impulsionnelles sont une succession de réponses mécaniques induites en réponse à un train d'impulsion. Tant que la fréquence des impulsions reste basse, les réponses impulsionnelles restent identiques et discernables. Mais lorsque les stimulations sont suffisamment proches, c'est-à-dire que la fréquence est augmentée, on obtient une fusion des secousses appelée tétanos qui est dit incomplet tant que la fusion est partielle (figure 13).

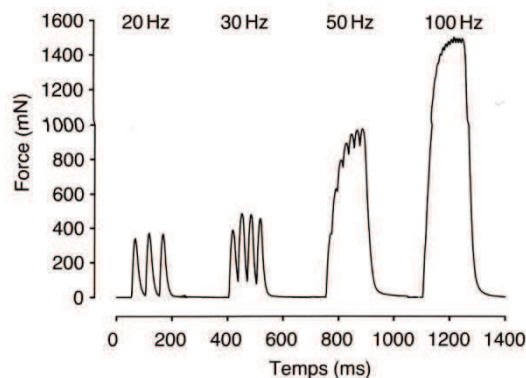


Figure 13. Sommation des secousses et développement de la force.

Muscle gastrocnémien de souris, stimulation à 20, 30, 50 et 100 Hz.

D'après (Jones, 2005)

1.4.3 Les relations caractéristiques de la mécanique musculaire.

Le muscle est un système mécanique avec des composantes élastiques et contractiles. Au cours de son activité, la force développée par un muscle varie en fonction de sa longueur. Lorsque le muscle est à sa longueur d'équilibre, sa force est optimale et elle diminue s'il est raccourci ou étiré. Cette caractéristique fonctionnelle est due à l'organisation structurale des myofilaments des fibres musculaires. Les relations force-longueur et force-vitesse décrivent les relations entre les grandeurs mécaniques et la force générée.

1.4.3.1 Relation force-longueur.

La force est développée par l'interaction des filaments d'actine et de myosine quand ils se superposent. Ceci est la théorie des filaments glissants. Gordon et collaborateurs ont réalisé des mesures chez la grenouille qui ont permis de comprendre la relation entre force et

longueur du muscle. Aux courtes longueurs du muscle, la force est faible. Elle passe par un maximum et diminue lorsque le muscle est étiré davantage (Gordon et al., 1966).

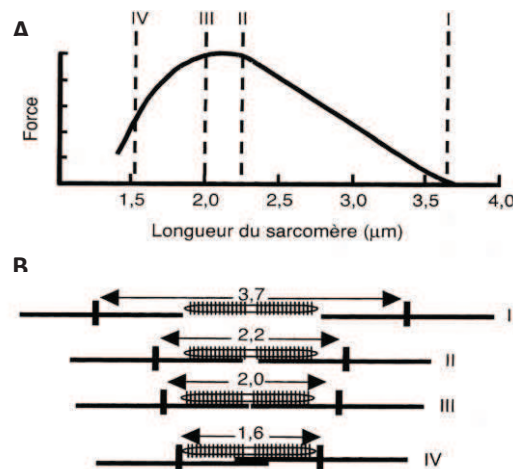


Figure 14. Force isométrique en fonction de la longueur du sarcomère.

(A) Force produite par le muscle ; (B) Longueur des sarcomères. D'après (Jones, 2005).

Si on extrapole cette courbe à des longueurs supérieures, il est possible de prédire une valeur pour laquelle aucune force n'est développée. Ceci correspond à la position où les filaments d'actine et de myosine ne se superposent plus, représenté sur la situation I de la figure 11. Du côté droit de la courbe, la diminution linéaire de la force est proportionnelle au degré de superposition des filaments fins et épais, tandis que du côté gauche, la force développée décroît rapidement. Ceci est dû au fait que les filaments fins se superposent les uns aux autres au centre du sarcomère, alors que les filaments épais viennent au contact de la ligne Z (situation IV sur la figure 14) (Gordon et al., 1966).

Le mécanisme des filaments glissants permet d'expliquer pourquoi la force développée est proportionnelle à l'étendu de la superposition de filaments. En effet, plus cette dernière est grande, plus le nombre de têtes de myosine susceptibles d'interagir avec l'actine est grand.

1.4.3.2 Relation force-vitesse.

La force dépend de la longueur des sarcomères, mais également de la vitesse avec laquelle le muscle se raccourcit. Quand la vitesse de raccourcissement d'un muscle augmente, la force développée diminue rapidement et atteint une vitesse pour laquelle aucune force n'est développée : c'est la force maximale de raccourcissement V_{max} (figure 15). La force isométrique correspond à la force pour un raccourcissement de vitesse nulle.

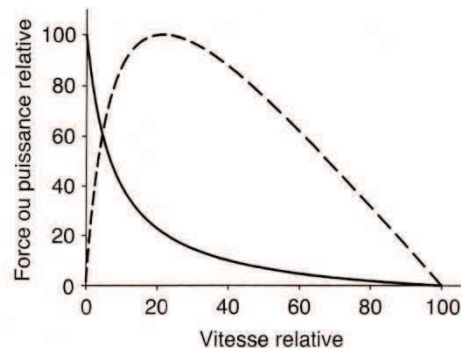


Figure 15. Relation force-vitesse (trait plein) et puissance-vitesse (pointillé).

D'après (Jones, 2005).

La puissance est le produit de la force et de la vitesse. La force est proportionnelle à la surface de section transversale d'un muscle et la vitesse à la longueur. Donc la puissance est proportionnelle au produit des deux, c'est le volume. Un muscle court et trapu aura une force élevée mais une vitesse maximale de raccourcissement faible. Un muscle fin produit moins de force mais se raccourcit rapidement. Si ces muscles ont le même volume, ils auront la même puissance maximale. Cette dernière est obtenue à un tiers de la V_{max} , donc si deux muscles ont une puissance maximale identique, la vitesse pour laquelle elle est obtenue est différente.

1.4.4 Cinétique des ponts d'unions : Modèle d'Huxley.

Le modèle d'Huxley est fondé sur l'idée d'une tête de myosine flexible (Huxley and Simmons, 1971). L'extension de la queue de myosine est déterminée par le déplacement du site de liaison de l'actine depuis la position d'équilibre x et par la rotation de la tête z (figure 16).

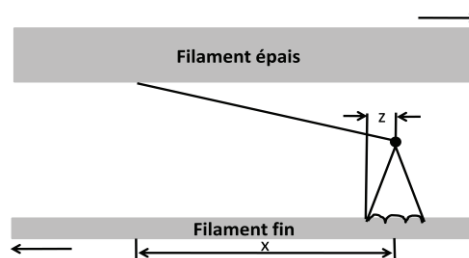


Figure 16. Modèle de la tête pivotante.

La tête de myosine se lie à l'actine à des angles (z) différents. La force dépend de la longueur x . Les flèches indiquent les directions des mouvements relatifs des filaments fins et épais.

Modifié de (Huxley and Simmons, 1971).

La tête de myosine se lie à l'actine. C'est la rotation de la tête qui étend la portion S2 de la myosine et produit la force. La transitions entre les points limites sont rapides, donc le modèle peut être réduit à deux états : points attachés ou détachés (Huxley and Simmons, 1971).

1.4.5 Cycles des ponts d'union : biochimie de la production de force.

L'interaction entre l'actine, la myosine et l'ATP se fait par étapes et les stades intermédiaires sont mis en correspondance avec les différentes étapes mécaniques du cycle des ponts.

Gordon et collaborateurs ont démontré un grand nombre d'étapes intermédiaires possibles (Gordon et al., 2000). La figure 17 illustre les principales étapes de ce cycle.

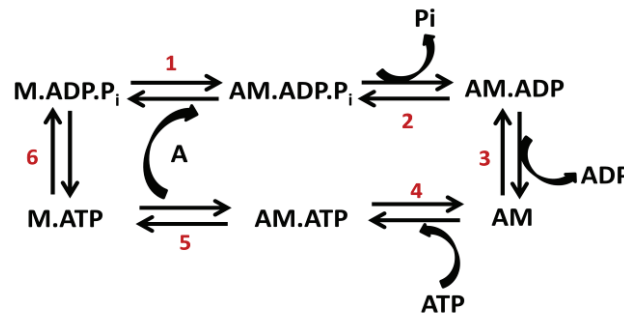


Figure 17. Etapes du cycle des ponts.

A. Actine, M. Myosine, AM. Acto-myosine. D'après (Gordon et al., 2000).

La liaison de la myosine à l'actine est réversible (1) et donne la rigidité au muscle, mais ne donne pas de force. L'initiation probable des changements qui résultent à la production de force, la rotation de la tête S1 de la molécule de myosine, est le relargage de calcium à partir du complexe acto-myosine (2). L'ADP est relargué à la fin de la phase de rotation (3) et le complexe acto-myosine peut fixer l'ATP (4). La myosine, fixée à l'ATP, se détache de l'actine (5). Enfin, l'ATP est hydrolysée en ADP+P_i par la tête de myosine (6) ce qui permet une nouvelle association avec une molécule d'actine (Gordon et al., 2000).

1.5 Production d'énergie par le muscle squelettique.

Pour le muscle squelettique, l'unité énergétique de base est l'ATP. Cependant, l'ATP intramusculaire est faiblement concentré (environ 5-6 mmol/Kg de muscle). Au cours de l'exercice, il doit donc être synthétisé rapidement. L'ATP est fourni par la dégradation de substrat de manière anaérobie ou aérobie. Le métabolisme aérobie est privilégié au cours d'un exercice d'endurance mais l'utilisation de ces deux métabolismes dépend du type d'énergie.

1.5.1 Métabolisme anaérobie.

Pendant un exercice intense de courte durée, l'hydrolyse de la phosphocréatine et la dégradation du glycogène en lactate sont les sources principales de production d'énergie.

1.5.1.1 Hydrolyse de la phosphocréatine.

La créatine peut être obtenue par l'alimentation ou synthétisée à partir d'acides aminés dans le foie. La créatine circulante est absorbée par le muscle, où elle sera phosphorylée par la créatine kinase en présence d'ATP. Comme la concentration en phosphocréatine augmente dans le muscle, l'interconversion de la phosphocréatine en ATP se fait rapidement. Au repos, 80% de la créatine est présente dans le muscle sous forme de phosphocréatine avec une concentration cinq fois supérieure à la concentration d'ATP. La quantité d'énergie qui peut être obtenue à partir de la phosphocréatine est de courte durée. 15-20% de phosphocréatines supplémentaires sont contenus dans les fibres rapides comparées aux fibres lentes (Soderlund and Hultman, 1991).

1.5.1.2 Utilisation du glycogène intramusculaire.

Chez les mammifères, le muscle squelettique est le site de stockage principal du glucose sous forme de glycogène. Les fibres musculaires possèdent différentes capacités de stockage. En effet, les fibres glycolytique de type II ont un niveau de glycogène supérieur à celui des fibres oxydatives de type I.

Au repos, le stockage de glucose sous forme de glycogène est stimulé par la signalisation insulinique qui contrôle la captation du glucose sanguin par le muscle médié par la translocation du transporteur GLUT4 (Insulin Responsive Glucose Transporter 4) à la membrane plasmique (Tremblay et al., 2003). Le glucose est phosphorylé en glucose 6-phosphate par l'hexokinase II et est converti en glucose 1-phosphate par la phosphoglucomutase qui sera ensuite métabolisé pour la synthèse de glycogène (Greenberg et al., 2006).

Au cours d'un exercice, la captation du glucose sanguin par le muscle est favorisée par l'AMPK (Protéine kinase activée par l'AMP), une sérine/thréonine kinase, activée par la déplétion en ATP. Cette dernière va stimuler la translocation de GLUT4 à la membrane et par conséquent la captation de glucose (Jorgensen et al., 2006). Puis le glucose et le glycogène subissent une série de réactions conduisant à la formation de pyruvate (figure 18). Le métabolisme anaérobie produit deux molécules d'ATP pour une molécule de glucose.

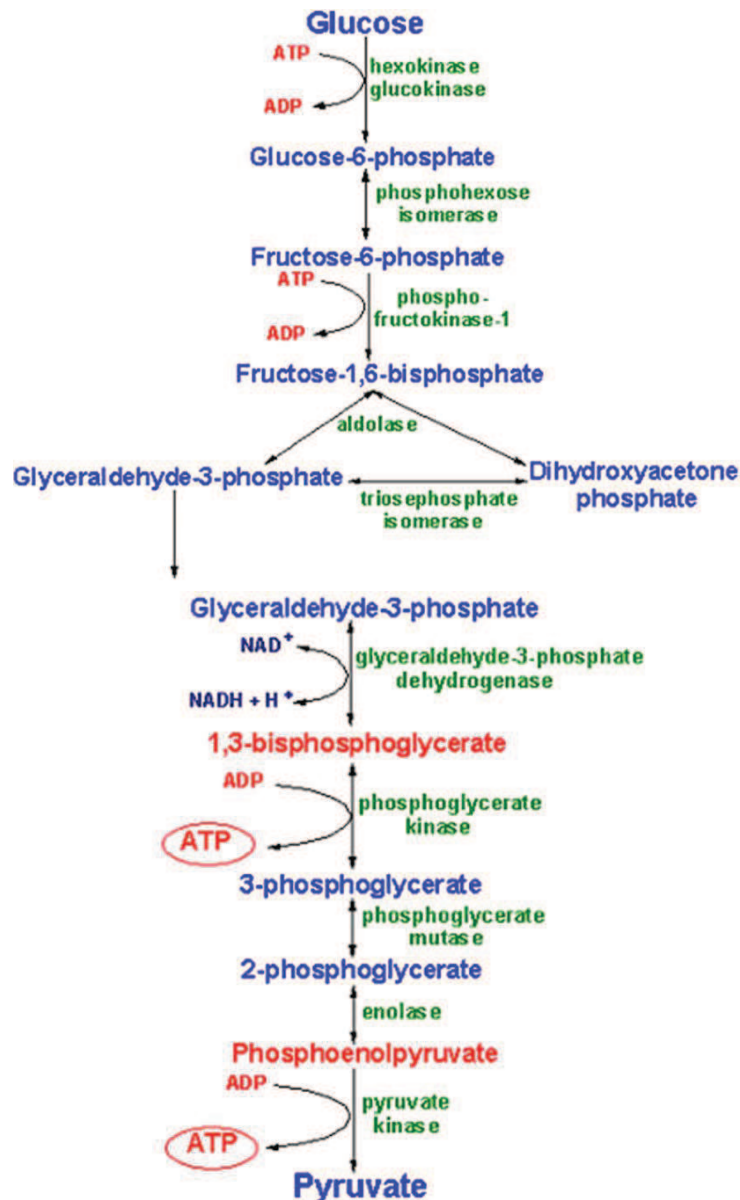


Figure 18. Schéma de la glycolyse.

En conditions anaérobiques, la glycolyse génère un niveau d'énergie significatif et le pyruvate produit est converti en lactate. La glycolyse anaérobie est un moyen efficace de produire de l'énergie durant un exercice court et intense. Sous conditions aérobiques, le pyruvate va subir une oxydation métabolique dans la mitochondrie.

1.5.2 Métabolisme aérobie.

1.5.2.1 La mitochondrie.

Bactérie originellement indépendante, la mitochondrie est riche en composants biochimiques. Son objectif majeur est la production d'énergie. Elle comporte plusieurs exemplaires de son propre ADN (ADNmt) différents de l'ADN nucléaire (Wiesner et al., 1992). Les mitochondries assurent l'approvisionnement cellulaire en énergie en plus d'autres rôles vitaux

pour la cellule. Elles participent notamment à l'homéostasie calcique, la régulation du pH intracellulaire, à la synthèse d'hormones stéroïdes et des hèmes, ainsi qu'à la régulation de la thermogénèse. Elles sont un des principaux sites de production des radicaux libres.

1.5.2.1.1 Structure.

La mitochondrie contient une membrane externe, rigide et contenant un nombre important de protéines qui vont permettre les échanges entre le cytosol et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie en formant des pores. Ces pores autorisent la translocation des protéines et permettent les échanges de métabolites de petit poids moléculaire, via des porines.

La membrane interne, barrière entre le cytosol et la matrice mitochondriale, présente une perméabilité réduite et sélective. Ceci va permettre de maintenir un gradient de concentration pour les protéines, les ions et les métabolites. Les protéines constituant la chaîne respiratoire et les protéines découplantes (UCPs) sont ancrées dans la membrane interne. Les UCPs permettent le passage de protons dans la matrice mitochondriale sans qu'ils contribuent à la synthèse d'ATP. La respiration mitochondriale découplée est un phénomène de fuite induisant un découplage incomplet entre les phosphorylations et les oxydations. Une partie de l'énergie est ainsi perdue sous forme de chaleur (Lowell and Spiegelman, 2000).

1.5.2.1.2 Fonctionnement de la mitochondrie : la chaîne respiratoire.

Différents complexes enzymatiques et des cytochromes constituent la chaîne de transport des électrons (figure 19).

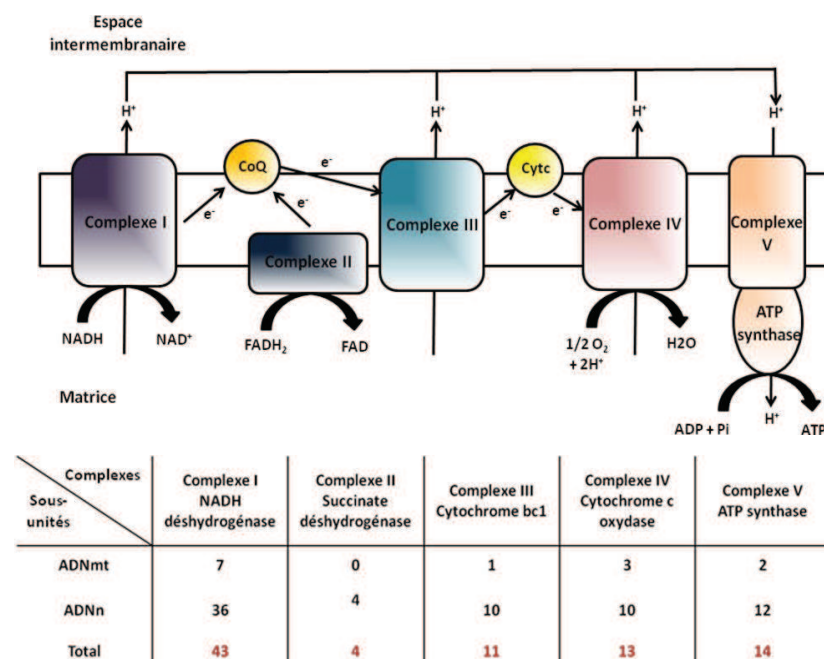


Figure 19. Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons.

Le NADH et le FADH₂ apportent les électrons dans la chaîne respiratoire. Les électrons passent par le complexe III pour être utilisés au niveau du complexe IV pour former de l'eau. Le passage des électrons au travers de la chaîne respiratoire va permettre le passage des protons (H⁺) dans l'espace intermembranaire. Il va se créer un gradient protonique permettant

la synthèse d'ATP au niveau du complexe V. Chaque complexe est constitué de plusieurs sous-unités codées par le génome mitochondrial (ADNmt) ou par le génome nucléaire (ADNn) (Smeitink et al., 2001).

La chaîne de transport des électrons est composée de cinq complexes : Le complexe I (NADH déshydrogénase), le complexe II (succinate déshydrogénase), le complexe III (ubiquinol cytochrome c réductase), le complexe IV (cytochrome c oxydase) et le complexe V (ATP synthase). Chaque complexe est composé de sous-unités protéiques (Smeitink et al., 2001). Lorsque les électrons passent contre le gradient électrochimique, de l'énergie est produite. Cette énergie obtenue est utilisée pour transporter les protons contre le gradient de concentration depuis la face interne vers la face externe de la membrane mitochondriale. Les protons sont transportés de l'intérieur de la mitochondrie vers les complexes I, III et IV. Les protons vont repasser à l'intérieur de la mitochondrie au travers d'un pore dans le complexe V. La synthèse d'ATP à partir de l'ADP et du P_i va se faire grâce à l'énergie libérée. L'oxygène doit être présent en tant qu'accepteur terminal d'électrons pour que le flux d'électrons au travers de la chaîne de transport se poursuive. Les atomes d'oxygène réagissent avec les protons pour former de l'eau.

1.5.2.2 Métabolisme des hydrates de carbone.

Le pyruvate issu de la glycose entre dans la mitochondrie. Il sera décarboxylé en oxaloacétate, un intermédiaire du cycle de Krebs, ou subit la décarboxylation oxydative par la pyruvate déshydrogénase (PDH) pour aboutir à la formation d'acétyl Co-A. L'acétyl co-A est le point d'entrée des acides gras et des acides aminés dans le cycle de Krebs dont les réactions sont résumées figure 20.

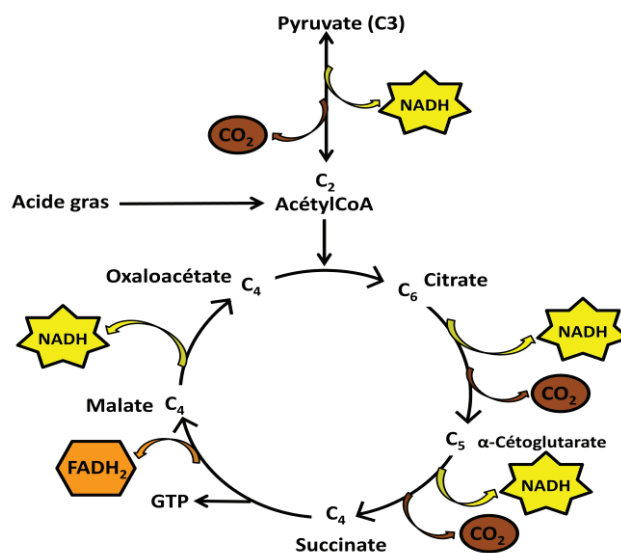


Figure 20. Vue générale du cycle de Krebs.

D'après (Jones, 2005).

Les fibres oxydatives ont une capacité plus élevée à oxyder le pyruvate que les fibres glycolytiques (Jackman and Willis, 1996; Ponsot et al., 2005).

Une petite quantité d'énergie est produite par la phosphorylation des substrats dans le cycle de Krebs. Néanmoins, la fonction la plus importante dans ces réactions est de générer des intermédiaires (NADH, FADH₂) qui fourniront des électrons à la chaîne respiratoire.

1.5.2.3 Utilisation des acides gras.

Le muscle squelettique est le site principal de l'oxydation des acides gras (AGs). Au repos ou après une mise à jeun, les AGs sont la source d'énergie utilisée de manière prédominante. L'oxydation des AGs est augmentée lors d'un exercice de faible intensité et réduite lors d'exercices de forte intensité. Les acides gras libres sont stockés dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides. Si les besoins énergétiques augmentent, les triglycérides sont hydrolysés par la triglycéride lipase dans un processus appelé lipolyse. Ils sont ensuite transportés par voie sanguine jusqu'au muscle squelettique par l'albumine. La lipolyse est contrôlée hormonalement. L'épinéphrine la stimule, alors que l'insuline l'inhibe.

Le transport des AGs au travers du sarcolemme se fait grâce à des transporteurs. Les acides gras sont activés par l'enzyme Acétyl Co-A synthétase (ou thiokinase) afin de former un complexe acyl Co-A dans le sarcoplasme qui sera utilisé pour la synthèse de triglycérides intramusculaires. Sous l'influence de la carnithine palmitoyl-transférase I, localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, il peut se lier à la carnitine. Cette liaison permet de former l'acyl-carnitine qui est la première étape de transport des AGs dans la mitochondrie. L'acyl-carnitine est transporté dans la matrice mitochondriale par la carnitine/acylcarnitine translocase localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Elle est à nouveau convertie en acyl-CoA par la carnitine palmitoyl transférase II dans la matrice mitochondriale (Jeukendrup, 2002). L'acyl-CoA entre dans la β -oxydation et la carnitine libérée retourne dans le cytoplasme et redevient disponible pour le transport des AGs.

La β -oxydation entraîne la formation de l'acyl-CoA en acétyl-CoA par une suite de quatre réactions.

- La déshydrogénation de l'acyl-CoA
- L'action de la crotonase conduit au β -hydroxyacylCoA.
- β -hydroxyacylCoA sera déshydrogéné en présence de NAD.
- La coupure de la chaîne carbonnée conduit à la libération d'acétyl-CoA qui peut entrer dans le cycle de Krebs.

Le cycle de Krebs et la β -oxydation conduisent à l'oxydation des substrats qui entraîne la réduction de NAD⁺ en NADH et du FAD⁺ en FADH₂. Ces intermédiaires fournissent les électrons à la chaîne respiratoire.

1.6 Contribution du muscle squelettique au développement du diabète de type II.

La signalisation insulinique stimule la captation de glucose dans le muscle squelettique. Le récepteur à l'insuline est activé, ce qui va aboutir au recrutement de GLUT4 à la membrane plasmique. Lorsque le muscle perd sa sensibilité à l'insuline, cela contribue au développement du diabète de type II. En effet, des perturbations de la voie de signalisation de l'insuline

(Krook et al., 2000) et des défauts de recrutement de GLUT4 à la membrane dans le muscle (Ryder et al., 2000) sont associés à une résistance à l'insuline. Hickey et collaborateurs ont montré qu'il y a une corrélation entre la stimulation de la captation du glucose par l'insuline et le pourcentage de fibres lentes. Donc la diminution du nombre de fibres oxydatives est un processus conduisant à une résistance à l'insuline (Hickey et al., 1995). Song et collaborateurs ont montré que les fibres lentes oxydatives sont plus sensibles à l'insuline que les fibres rapides glycolytiques (Song et al., 1999). La surexpression de la forme activée de la calcineurine dans le muscle squelettique va induire une augmentation du nombre de fibres de type I ce qui va entraîner une augmentation des niveaux du récepteur à l'insuline, d'AKT et de GLUT4, conduisant à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. De plus, lors d'un régime alimentaire riche en graisse, ces souris sont protégées du développement d'une intolérance au glucose (Ryder et al., 2003). Une voie non insulino-dépendante et impliquant l'AMPK, régule le transport du glucose et le recrutement de GLUT4 à la membrane (Holmes et al., 2004).

Chez des individus obèses, les muscles squelettiques présentent des capacités oxydatives réduites avec une diminution du nombre de fibres de type I et une augmentation des capacités glycolytiques (Hickey et al., 1995; Tanner et al., 2002).

Dans l'organisme, le muscle squelettique exerce deux rôles. Le premier est un rôle mécanique. Si cette fonction est atteinte cela conduit à des pathologies graves telles que des myopathies. Le second est un rôle métabolique, qui une fois dérégulé peut conduire à des désordres métaboliques comme le diabète de type II ou l'obésité. Les récepteurs nucléaires, membres de la famille des facteurs de transcriptions, sont des régulateurs majeurs du muscle squelettique. Il est donc important d'étudier la fonction des récepteurs nucléaires dans le muscle squelettique afin de pouvoir développer, à long terme, des composés pour le traitement des différentes pathologies.

2 Les récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires (RN) forment une famille multigénique de facteurs de transcription présents chez tous les métazoaires. Dans le génome humain, 48 gènes ont été identifiés (tableau 2), 49 chez la souris, 21 dans celui de *Drosophila melanogaster* et 270 chez *Caenorhabditis elegans* (Robinson-Rechavi et al., 2005). Les RNs sont impliqués dans de nombreux événements physiologiques comme l'embryogénèse, la différenciation, l'apoptose et le métabolisme, en régulant la transcription d'une multitude de gènes cibles (Gronemeyer et al., 2004).

Les RNs se fixent à l'ADN et la plupart d'entre eux ont la capacité de lier spécifiquement de petites molécules hydrophobes qui pénètrent ou sont synthétisées dans la cellule cible. Les ligands, comme les hormones stéroïdes, les dérivés de la vitamine A, les hormones thyroïdiennes ou la vitamine D, agissent comme des signaux régulateurs qui modifient l'activité transcriptionnelle des RNs. Pour la plupart de ces récepteurs, une interaction avec un ligand est nécessaire à son activation. Cependant, il existe des récepteurs, appelés orphelins, pour lesquels aucun ligand n'a été identifié. Grâce à l'étude de la phylogénie et de la structure des RNs, il a été montré que la capacité de liaison d'un ligand a été acquise par certains récepteurs au cours de l'évolution (Escriva et al., 2000).

La propriété des RNs à fixer des ligands affectant leur activité transcriptionnelle fait d'eux des cibles pharmacologiques importantes pour le traitement de pathologies majeures comme le cancer, le diabète, l'obésité ou le syndrome de résistance hormonale.

	Abréviati on du récepteur	Sous- type	Nom complet du récepteur	Ligand
Classe I	TR	α, β	Thyroid hormone Receptor	Hormones thyroïdes
	RAR	α, β, γ	Retinoic Acid Receptor	Acide rétinoïque
	PPAR	α, β, γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor	Acide gras, prostaglandines, thiazolidinediones
	Rev-erb	α, β	Rev-erb	Orphelin
	ROR	α, β, γ	Retinoid related Orphan Receptor	Cholesterol, sulfate de cholesterol; acide rétinoïque; orphelin
	LXR	α, β	Liver X Receptor	Oxystérols
	FXR	α, β	Farnesoid X Receptor	acide biliaire, fexaramine; lanostérol
	VDR		Vitamin D Receptor	Vitamine D, 1,25-dihydroxyvitamine D3
	PXR		Pregnane X Receptor	Xénobiotiques, 16 α -cyanopregnone
	CAR		Constitutive Androstane receptor	Xénobiotiques, phénobarbital
	HNF4	α, γ	Hepatocyte Nuclear Factor-4	Orphelin
	RXR	α, β, γ	Retinoid X Receptor	Acide rétinoïque
	TR2		Testicular Receptor 2	Orphelin
	TR4		Testicular Receptor 4	Orphelin
	TLL		Teloid Like	Orphelin
Classe II	PNR		Photoreceptor Specific Nuclear receptor	Orphelin
	COUP-TFI		Chicken Ovalbumine Upstream Promoter Transcription Factor 1	Orphelin
	COUP-TFII		Chicken Ovalbumine Upstream Promoter Transcription Factor 2	Orphelin
	EAR2		Eosinophil-Associated Ribonuclease 2	Orphelin
	ER	α, β	Estrogen Receptor	Eoestradiol 17 β , Tamoxifène
Classe III	ERR	α, β, γ	Estrogen Related Receptor	Orphelin; DES, 4-OH Tamoxifène
	GR		Glucocorticoid Receptor	Cortisol,

				dexamethasone, RU486
	MR		Mineralocorticoid Receptor	Aldostérone, spiro lactone
	PR		Progesterone Receptor	Progestérone, medroxyprogestérone acétate RU486
	AR		Androgen receptor	Testostérone, DHT, flutamide
Classe IV	NGFI-B		Nerve growth Factor 1B	Orphelin
	NURR-1		Nuclear Receptor Related 1	Orphelin
	NOR1		Neuron Derived Orphan Receptor I	Orphelin
Classe V	SF1		Steroidogenic Factor 1	Orphelin
	LRH-1		Liver Receptor Homolog 1	Orphelin
Classe VI	GCNF		Germ Cell Nuclear Factor	Orphelin
Classe 0	DAX-1		DSS-AHC critical region on the X gene 1	Orphelin
	SHP		Short heterodimer partner	Orphelin

Tableau 2. Classification des récepteurs nucléaires chez l'homme.

D'après (Germain et al., 2006).

2.1 Structure et organisation fonctionnelle des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires sont organisés en 6 domaines désignés de A à F de la partie N-terminale à la partie C-terminale (figure 22) (Germain et al., 2006; Giguere et al., 1986). Ces régions seront détaillées dans la partie consacrée aux androgènes.

Les RN humains sont classés en 6 groupes basés sur des analyses phylogéniques et des alignements de séquence (Tableau 2) (Escriva et al., 2000; Thornton and DeSalle, 2000).

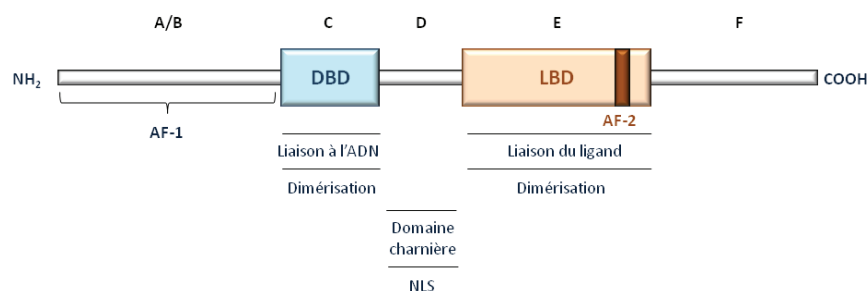


Figure 21. Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires.

Les régions les plus conservées parmi les membres de la famille multigénique des récepteurs nucléaires sont les régions C (DBD) et E (LBD), impliquées dans la liaison à l'ADN et au ligand,

respectivement. La séquence et la taille des régions A/B, D et F sont variables. La plupart des RNs ont deux fonctions de transactivation : AF-1 (N-terminale, ligand indépendante) et AF-2 (C-terminale du domaine E, ligand dépendante). Tous les récepteurs nucléaires possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS) situé au niveau du domaine charnière.

2.2 La régulation de la transcription des gènes cibles par les RNs.

2.2.1 Mécanisme d'action.

En absence de ligand, les RNs sont localisés dans le cytoplasme ou dans le noyau. Dans le cytoplasme, les RNs stéroïdiens sont associés à un large complexe multiprotéique de chaperonne, incluant Hsp90 et Hsp56 (Pratt and Toft, 1997). La liaison du ligand va induire la dissociation du complexe, l'homodimérisation du RN et sa translocation dans le noyau, où il va activer la transcription de gènes cibles. La plupart des autres RNs sont localisés dans le noyau et liés à l'ADN en absence de ligands. En absence de ligands ou pour répondre à des ligands antagonistes ou agonistes, ces RNs vont réprimer ou activer la transcription en recrutant des complexes multiprotéiques au niveau du promoteur de leurs gènes cibles.

Les RNs peuvent avoir des effets non génomiques, grâce à des kinases qui vont activer des cascades de signalisation à partir du cytoplasme. Ces effets non génomiques apparaissent dans les minutes qui suivent l'activation du RNs. De plus, l'inhibition de la transcription (actinomycine D) ou de la traduction (cycloheximide), n'affectent pas ces voies de signalisation, ce qui montre que ces activités sont indépendantes de l'activité de facteur de transcription des RNs. Ces activités sont décrites pour les récepteurs stéroïdiens comme le récepteur des glucocorticoïdes (RG), de la progestérone (RP), des œstrogènes (RE) et des androgènes (RA) (Kousteni et al., 2001; Levin, 2008, 2014). Certains récepteurs nucléaires peuvent également interagir avec d'autres facteurs de transcription comme AP-1 ou NF-κB. C'est le cas par exemple de RG. Les glucocorticoïdes exercent leur effet anti-inflammatoire grâce à l'inhibition de la voie NF-κB par leur récepteur RG (Reeves et al., 2012).

2.2.2 Les co-régulateurs

Les co-régulateurs sont des protéines qui interagissent avec les RNs et autres facteurs de transcription dans la région régulatrice des gènes cibles pour activer ou réprimer la transcription (Glass and Rosenfeld, 2000; McKenna et al., 1999a; McKenna et al., 1999b). Les co-régulateurs peuvent être classés en deux groupes : les co-activateurs (famille p160, CBP/p300) et les co-represseurs (comme SMRT) qui activent et répriment la transcription des gènes cibles, respectivement. Il existe également les co-intégrateurs qui facilitent l'interaction des RNs avec la machinerie transcriptionnelle. La décondensation de la chromatine par les co-activateurs permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle basale. Les RNs recrutent, via leur interaction avec les membres du complexe médiateur, TRAP/DRIP (Thyroid Hormone Receptor-Associated protein / Vitamin D Receptor Interacting Protein). Ce complexe permet l'assemblage du complexe de pré-initiation et sert de pont moléculaire qui

connectent les activateurs transcriptionnels ou d'autres éléments régulateurs à l'ARN polymérase II (Lariviere et al., 2012).

La figure 22 schématise le recrutement des co-facteurs.

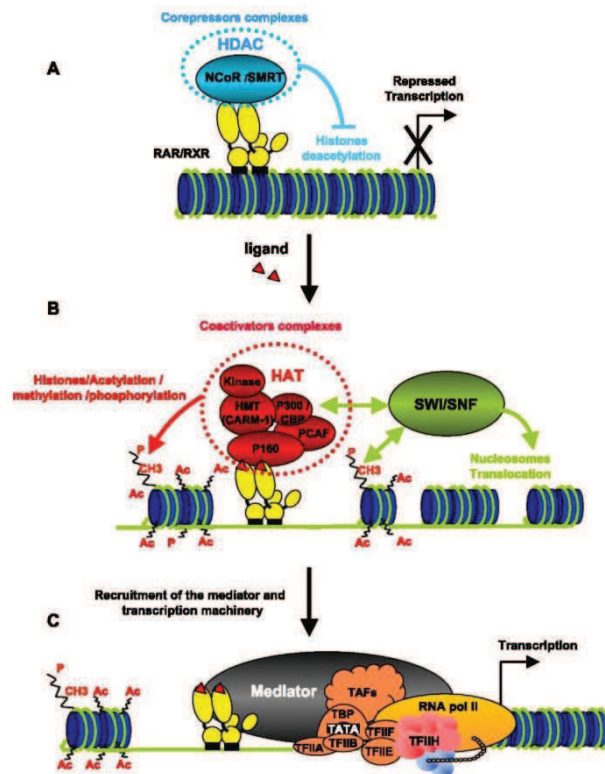


Figure 22. Actions des récepteurs nucléaires.

- Lorsque le ligand est absent, le récepteur est lié à son élément de réponse sur les gènes cibles et associé aux complexes répresseurs possédant une activité HDAC. La transcription des gènes cibles est réprimée.
- La liaison du ligand entraîne la dissociation des complexes répresseurs et le recrutement de complexes activateurs ayant une activité HAT, HMT ou ATPase, ce qui va entraîner la décondensation de la chromatine.
- Le complexe activateur se dissocie après avoir été acétylé, diminuant sa capacité d'interaction au RNs ou après sa dégradation par le protéasome. Les composants de la machinerie transcriptionnelle sont recrutés et la transcription est activée.

D'après (Bastien and Rochette-Egly, 2004).

2.2.3 Les modifications post-transcriptionnelles des RNs.

L'activité post-transcriptionnelle peut être modulée par différentes modifications post-transcriptionnelles, comme la phosphorylation, l'acétylation, la sumoylation ou l'ubiquitination.

Certains récepteurs sont phosphorylés par des kinases sur un résidu localisé dans les domaines A/B, C et E. En générale, la phosphorylation stimule l'activité transcriptionnelle des RNs en favorisant le recrutement des co-activateurs. Cependant, il a été montré qu'elle peut également avoir un impact négatif sur l'activité des RNs en induisant leur dissociation de l'ADN, en diminuant leur affinité de liaison pour le ligand ou en induisant la dégradation des RNs (Rochette-Egly, 2003).

L'acétylation sur les résidus lysines des RNs affectent négativement ou positivement leur activité transcriptionnelle (Popov et al., 2007) et a été largement décrite pour les récepteurs stéroïdiens [revue (Faus and Haendler, 2006)].

La sumoylation, qui nécessite la liaison covalente de petits polypeptides appelés SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) à un résidu lysine spécifique de la protéine cible, affecte le potentiel de transactivation et l'habilité de liaison à l'ADN des RNs (Berrabah et al., 2011). Ce mécanisme a également été largement décrit pour les récepteurs stéroïdiens (Faus and Haendler, 2006).

L'ubiquitination est la conjugaison de l'ubiquitine, polypeptide de 76 acides aminés, à un substrat. La mono-ubiquitination est impliquée dans la régulation transcriptionnelle, tandis que la poly-ubiquitination entraîne la dégradation protéique par la voie de signalisation ubiquitine-protéasome. Plusieurs récepteurs nucléaires comme RE, RA, PPAR α (Peroxisome Proliferator activated Receptor alpha), RG, RAR γ , RXR α et TR sont régulés par le système ubiquitine-protéasome (Baek and Rosenfeld, 2004).

En réponse à la liaison à l'hormone, les RNs régulent l'expression des gènes cibles par divers moyens impliquant le changement de compartiment cellulaire, l'interaction avec l'ADN et les co-facteurs, les modifications post-transcriptionnelles ou la communication avec d'autres facteurs transcriptionnelles.

3 Les androgènes et le muscle squelettique

3.1 Les androgènes.

Les androgènes sont des hormones stéroïdes, et la testostérone est l'androgène circulant majeur chez l'homme. Les cellules de Leydig du testicule synthétisent 95% de la testostérone totale produite, ce qui représente environ 6 à 7 mg de testostérone par jour chez l'homme. Une partie de la testostérone est également synthétisée par la zone réticulée de la cortico-surrénale (Nieschlag E, 2004). Chez la femme, les androgènes sont synthétisés dans les ovaires.

3.1.1 La biosynthèse et sa régulation.

Les androgènes sont formés à partir du cholestérol, synthétisé *de novo* à partir de l'acétate ou extrait des lipoprotéines plasmatiques et des membranes cellulaires. Le cholestérol est transporté vers la membrane des mitochondries par un mécanisme dépendant de l'hormone lutéinisante (LH) qui est régulé par une protéine de transfert, appelé protéine activatrice de la stéroïdogénèse StAR (Steroidogenic Acute regulatory Protein) (Stocco and Clark, 1997). L'étape limitante de la stéroïdogénèse est le transfert intra-mitochondrial du cholestérol. Une fois dans la mitochondrie, le cholestérol est clivé en prégnénolone par le cytochrome p450_{scc} (side chain clivage - codé par le gène CYP11A) qui est la deuxième étape limitante de la stéroïdogénèse (figure 23). La prégnénolone inactivée, relarguée dans le réticulum endoplasmique, est convertie en progestérone ou en 17 α -hydroxyprégnénolone par la P450_{c17} codée par le gène CYP17. La chaîne latérale de cette dernière sera clivée en déhydroépiandrostérone ou en DHEA par la P450_{c17}. La DHEA est transformée en 5-androstenediol par l'action de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD). Puis la 5-androsténédol est convertie en testostérone sous l'action de la 3 β -HSD. La pregnénolone convertie par la 3 β -HSD en progestérone qui est ensuite hydroxylée par la P450_{c17} en 17 α -hydroxyprogestérone. Son clivage par la P450_{c17} aboutit à l'androsténédione. Enfin, la testostérone est formée par l'action de la 17 β -HSD. Elle peut être convertie en oestradiol par la P450 aromatase et en dihydrotestostérone (DHT) par la 5 α -réductase au niveau des tissus cibles.

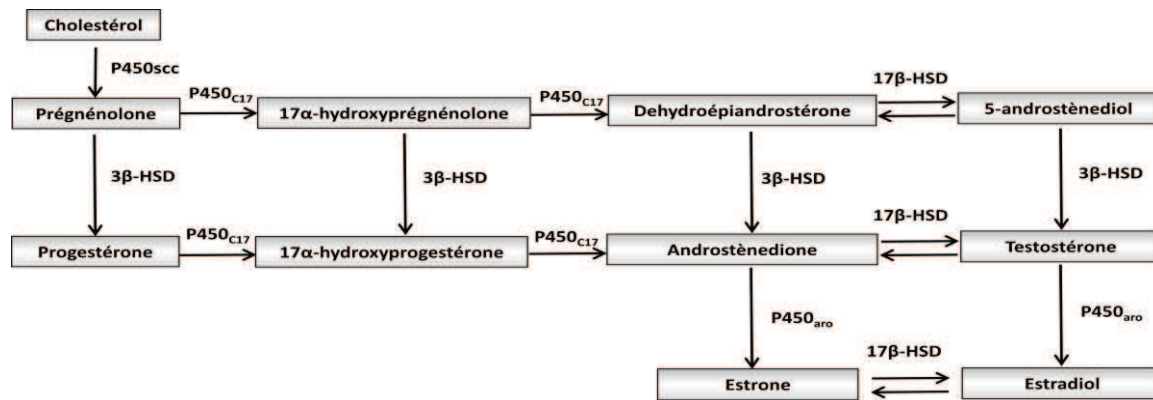


Figure 23. La biosynthèse des androgènes.

La sécrétion de LH stimule la production d'androgènes par les cellules de Leydig. La LH est une hormone produite par l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus est responsable de la sécrétion pulsatile de GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) qui atteint l'hypophyse via le système porte hypophysaire. L'adénohypophyse libère la LH et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), mais en moindre quantité. Cette production est également régulée par un rétrocontrôle négatif. Si la testostérone est libérée en quantité trop importante, elle va inhiber la sécrétion de GnRH au niveau de l'hypothalamus et celle de la LH au niveau de l'hypophyse. Ceci va entraîner la diminution de sa propre production par les cellules de Leydig (figure 24)

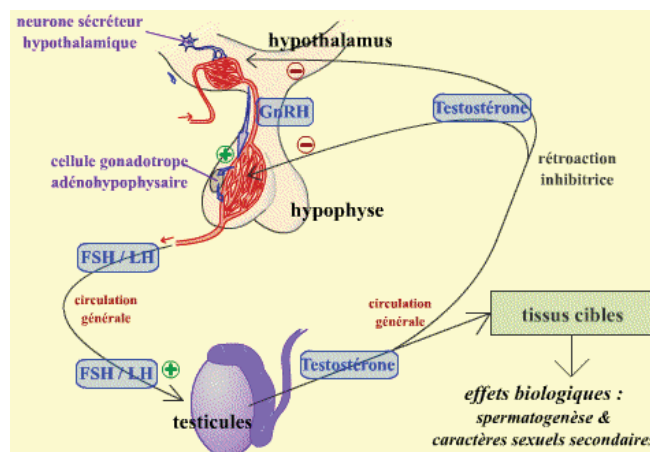


Figure 24. Contrôle de la sécrétion de la testostérone par l'axe hypothalamo-hypophysaire.

D'après : <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/cybernetique/03homme.htm>.

3.1.2 Le transport des androgènes

Environ 60% des androgènes circulants est complexé avec la protéine de transport des stéroïdes sexuels SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin), une minorité est complexée à l'albumine, et une faible partie est présente sous forme libre. La testostérone liée à la SHBG, contrairement à celle liée à l'albumine, se dissocie difficilement et n'est pas directement disponible pour les tissus. Une fois libérée, la testostérone peut diffuser librement au travers de la membrane plasmique (Michels and Hoppe, 2008).

3.1.3 Métabolisme de la testostérone

Après son entrée dans le cytoplasme d'une cellule cible, la testostérone peut se lier directement sur le récepteur des androgènes (RA) ou être convertie par la 5 α -réductase en DHT, métabolite plus actif. La testostérone est 10 à 12 fois plus présente dans la circulation que la DHT, alors que la concentration de la DHT tissulaire locale est souvent plus élevée.

Le muscle est un tissu dépourvu de 5 α -réductase, donc l'androgène qui a un effet prédominant dans ce tissu est la testostérone (Bartsch et al., 1980; Yarrow et al., 2012).

3.1.4 Catabolisme de la testostérone

La plupart des réactions cataboliques se font dans le foie, dans la prostate et la peau pour avoir une élimination dans l'urine et par la peau. La testostérone induit les enzymes hépatiques responsables de sa dégradation. Elle est convertie en DHEA (déhydroépiandrostérone), androstérone et étiocolanolone, androgènes peu actifs qui seront éliminés dans l'urine et la bile.

3.1.5 Fonctions des androgènes.

3.1.5.1 La spermatogénèse.

Pendant la puberté, la production d'androgènes, de LH et de FSH augmentent permettant la formation de tubes séminifères et la différenciation des cellules germinales en spermatozoïdes. Pendant la vie adulte, les androgènes et la FSH agissent sur les cellules de Sertoli dans les testicules pour permettre la production de spermatozoïdes (Nussey and Whitehead, 2001).

3.1.5.2 Inhibition d'un dépôt de graisse.

Les hommes ont moins de masse grasse que les femmes. Les androgènes inhibent la capacité de certaines cellules graisseuses de stocker des lipides en bloquant une voie de transduction de signal qui prend en charge la fonction normalement adipocytaire (Singh et al., 2006).

3.1.5.3 La masse musculaire.

Les androgènes favorisent l'élargissement de cellules du muscle squelettique et agissent sur plusieurs types de cellules dans le tissu musculaire squelettique (Sinha-Hikim et al., 2004). Des taux d'androgènes plus élevés conduisent à une augmentation de l'expression du RA. La fusion des myoblastes génère des myotubes, dans un processus lié aux niveaux de RA (Vlahopoulos et al., 2005).

3.1.5.4 Le cerveau.

Les taux circulants d'androgènes peuvent influencer le comportement humain parce que certains neurones sont sensibles aux hormones stéroïdes. Les taux d'androgènes ont été impliqués dans la régulation de l'agressivité humaine (Singh et al., 2006) et la libido. Les

androgènes ont un effet positif sur la neurogenèse hippocampique chez les préadolescents qui peut être liée à des symptômes de dépression (Zhang et al., 2010).

3.1.5.5 Effets spécifiques sur les femmes.

Les androgènes auraient un effet sur la relaxation du myomètre de façon non génomique, indépendante de la voie de signalisation du RA, prévenant les contractions utérines prématurées pendant la grossesse (Makieva et al., 2014).

Une grande partie de l'action des androgènes sur les tissus cibles est relayée par un récepteur nucléaire, le récepteur des androgènes (RA).

3.2 Le récepteur des androgènes (RA).

Le RA appartient à la famille multigénique des récepteurs nucléaires et plus précisément à la classe des récepteurs des hormones stéroïdiennes, où l'on trouve également le récepteur aux minéralocorticoïdes (RM), aux glucocorticoïdes (RG), des œstrogènes (RE) et de la progestérone (PR). Le RA est codé par un gène localisé en position q11-12 sur le chromosome X humain et possède 8 exons (Galani et al., 2008). Il code pour une protéine de 919 acides aminés et d'une masse molaire de 110 kDa (Lubahn et al., 1988). Comme les autres membres de la famille multigénique des RNs, le RA est constitué de régions fonctionnelles majeures.

3.2.1 Le domaine N-terminal : NTD.

La région A/B contient une fonction d'activation AF-1 qui, lorsqu'elle est isolée de la région C-terminale du récepteur, peut agir de manière ligand indépendante. Dans le contexte du récepteur entier, son activité est contrôlée par la liaison du ligand au LBD.

Il existe deux unités de transactivation TAU-1 (101-370) et TAU-5 (360-485) au sein de l'AF-1 du RA (Jenster et al., 1995). TAU-5 est un domaine autonome d'activation qui se lie aux domaines riches en glutamine des protéines de la famille des co-activateurs p160. L'affinité des motifs LXXLL des protéines p160 pour l'AF-2 du RA est faible donc TAU-5 est considéré comme le site d'interaction majeure avec les co-facteurs de la famille p160 (Christiaens et al., 2002). Une petite surface de liaison adjacente à AF-2 a été identifiée comme un modulateur allostérique de l'activité d'AF-2, et est appelée fonction de liaison-3 (BF-3). Cependant, le rôle de BF-3 *in vivo* est actuellement inconnu (Jehle et al., 2014).

Les interactions NTD-LBD sont essentielles pour la régulation des activités transcriptionnelles du RA. Le LBD reconnaît préférentiellement les motifs FXXLF, présents au niveau N-terminal, aux motifs LXXLL présents chez les co-facteurs de la famille p160 (Centenera et al., 2008). Le motif FXXLF (⁴³³WHTLF⁴³⁷) présent dans TAU-5 est proposé comme étant le site de liaison avec le RA-LBD mais sa contribution est peu claire (Claessens et al., 2008; Van Tilborgh et al., 2013). Le motif FXXLF (²³FQNLF²⁷) présent à l'extrémité N-terminale semblerait être le motif le plus important pour l'interaction NTD-LBD (He et al., 2004).

Au sein du NTD, il existe des variations polymorphiques avec la présence de nombreuses répétitions de glutamines (poly-Q, de 9 à 23 résidues avec une moyenne de 20), de glycine (poly-G) et de proline (poly-P). Une expansion anormale du segment poly-Q est à l'origine d'une maladie neurodégénérative, la maladie de Kennedy (Casella et al., 2001; Kumar, 2012). De courtes répétitions de glycines pourraient également être un facteur de risque dans le développement de cancer (Ding et al., 2005). La longueur des répétitions poly-Q entraîne une modification de la structure du NTD du RA (Davies et al., 2008).

Le domaine N-terminal du RA est considéré comme le domaine majeur d'activation du récepteur. La majorité des sites de modifications post-traductionnelles sont situés dans ce domaine, donc ces modifications pourraient directement moduler les capacités de transactivation du RA.

Le domaine N-terminal du RA est représenté figure 25.



Figure 25. Domaine N-terminale du RA.

Qn : répétitions de glutamines ; Pn : répétitions de proline ; Gn : répétitions de glycines. Modifié de (Claessens et al., 2008).

3.2.2 Le domaine de liaison à l'ADN : DBD.

3.2.2.1 Structure.

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est le domaine la plus conservé parmi les RNs. Les RNs fixent via ce domaine des séquences spécifiques de l'ADN appelées élément de réponse aux hormones (excepté DAX1 et SHP qui ne possèdent pas de DBD) (Ikonen et al., 1997). Le DBD se compose d'une région très conservée de 66 acides aminés, organisée en deux doigts de zinc, deux hélices α et une extension COOH. Au niveau du premier doigt de zinc se situe la boîte P, ensemble des acides aminés essentiels pour la reconnaissance de l'ADN (Laudet, 1997; Zilliacus et al., 1994). Le second doigt de zinc est composé de résidus très conservés parmi les RNs et formant la boîte D. Cette dernière est impliquée dans la dimérisation du récepteur (figure 26). L'extension C-terminale (CTE) joue un rôle dans la reconnaissance de l'élément de réponse ou dans la dimérisation du récepteur.

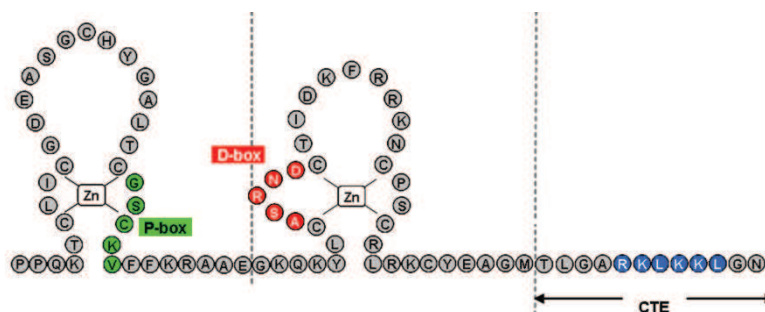


Figure 26. Schéma du DBD du récepteur des androgènes.

En vert, la boîte P. En rouge, la boîte D. CTE : extension carboxy terminale. D'après (Claessens et al., 2008).

3.2.2.2 Éléments de réponse.

Les RNs reconnaissent des éléments de réponse, ou demi-site, qui dérivent d'une séquence hexanucléotidique canonique 5'-PuGGTCA-3' (Pu= A ou G) (Aranda and Pascual, 2001). Des mutations et des duplications ont généré des répétitions de ces sites, caractérisés par des orientations et des polarités différentes. Certains récepteurs se lient sous forme monomérique sur un demi-site hexamérique. La plupart se lie sous forme d'homo- ou d'hétérodimères sur ces demi-sites. Pour ces derniers, les demi-sites peuvent être en palindrome, en palindrome

inversé ou en répétitions directes et séparés par un nombre variable de nucléotides (figure 27) (Aranda and Pascual, 2001).

Les acides aminés, constituant la boîte P, essentielle à la reconnaissance de l'ADN, sont les mêmes pour le RA, le RG, le RM et le RP. Les récepteurs stéroïdiens reconnaissent une séquence consensus qui s'organise en répétition inversée de demi-site hexamériques et espacés de trois nucléotides (IR3, inverted repeat 3) au niveau de l'ADN. 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3' est la séquence consensus du RE. Pour le RA, RG, RP et RM la séquence consensus est 5'-AGAACAnnnTGTTCT-3' (Germain et al., 2006). Les récepteurs stéroïdiens se fixent sous forme d'homodimère à ces séquences dans une configuration « tête-bêche » (figure 28).

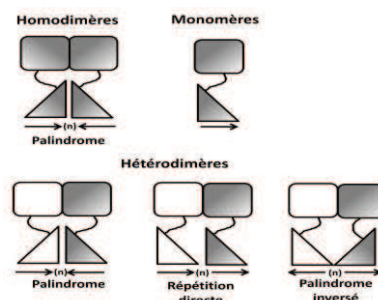


Figure 27. Les différents éléments de réponse des RNs. D'après (Aranda and Pascual, 2001).

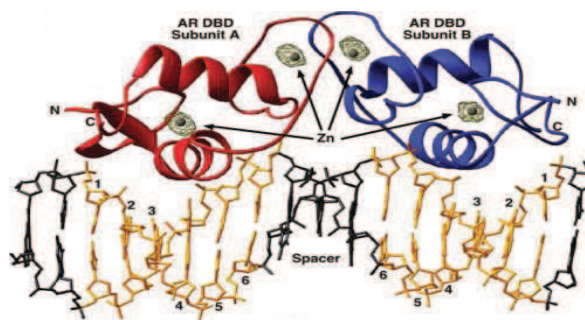


Figure 28. Configuration du récepteur des androgènes après reconnaissance de son élément de réponse. D'après (Shaffer et al., 2004).

La spécificité de réponse est établie par le niveau d'expression des récepteurs stéroïdiens dans les tissus, de la structure de la chromatine et de la disponibilité des co-facteurs. Des AREs spécifiques, non reconnus par les autres membres ont été établis. Il s'agit de répétitions directes de deux demi-site hexamériques espacés de trois nucléotides, 5'-TGTTCTnnnTGTTCT-3' appelés ADR3 (direct repeat 3) (Verrijdt et al., 2003). Les dimères de RNs reconnaissant ces séquences DR3 ont une conformation « tête-à-queue » sur ces sites. En revanche, le RA se fixe dans une conformation « tête-bêche » sur les IR3 et les ADR3. Le DBD du RA possède des sites d'interaction supplémentaires qui vont permettre de stabiliser le dimère et d'augmenter l'affinité du récepteur sur un site non consensus (Shaffer et al., 2004). L'extension carboxy-terminale (CTE) du DBD serait importante dans la reconnaissance de ADR3.

1.2.2. La région charnière.

3.2.3 La région charnière.

Le DBD et le LBD sont séparés par une région charnière flexible. La séquence de cette région charnière est peu conservée. Cependant cette région contient un signal de localisation nucléaire (NLS) pour tous les RNs (Germain et al., 2006). Plusieurs modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation du résidu sérine en position 650 par les MEKK kinases et les acétylations des résidus lysine en position 630, 632 et 633 effectuées par les co-facteurs p30/pCAF et Tip 60, ont lieu dans la région charnière du RA (Fu et al., 2000; Gaughan et al., 2002; Gioeli et al., 2006). Ce domaine possède une séquence PEST qui est impliquée dans l'engagement des protéines dans la voie de dégradation du protéasome 26S (Tanner et al., 2004). Une partie de la région charnière est impliquée dans la liaison aux DR3 et dans la liaison des co-facteurs (Claessens et al., 2008). La région charnière sert d'intégrateur de signaux venant de différentes signalisations qui exercent un rétrocontrôle sur l'activité du RA (Clinckemalie et al., 2012).

3.2.4 Le domaine de liaison au ligand : LBD.

Parmi les différents RNs, la structure tridimensionnelle des LBD est similaire. Le LBD est constitué d'une surface de dimérisation permettant l'interaction avec le LBD du récepteur partenaire, de la poche de fixation du ligand, d'une surface d'interaction avec les co-régulateurs (co-activateurs, co-represseurs, protéines de choc thermique) et la fonction d'activation AF-2 sur l'hélice H12. Cette fonction AF-2 relaye la transactivation de la transcription de manière ligand-dépendante. Les différentes structure de LBD disponibles montrent un domaine globulaire adoptant un repliement similaire, composé de 12 hélices α (H1 à H12) anti-parallèles disposées en trois couches, formant un sandwich d'hélices α et d'un feuillet β de deux brins anti-parallèles, entre l'hélice H5 et H6 (Moras and Gronemeyer, 1998; Wurtz et al., 1996). Le LBD du RA ne contient que 11 hélices α car l'hélice H2 est absente (figure 29). Ce ligand possède la fonction d'activation AF-2 dépendante du ligand. La poche du ligand est formée de 19 acides aminés principalement hydrophobes. Les résidus A575, Arg779, His 874 et Thr877 sont directement impliqués dans la reconnaissance du ligand (Poujol et al., 2000). L'intégrité du LBD est nécessaire pour la liaison du ligand, car de nombreuses mutations sont associées à des syndromes d'insensibilité des androgènes et des cancers de la prostate.

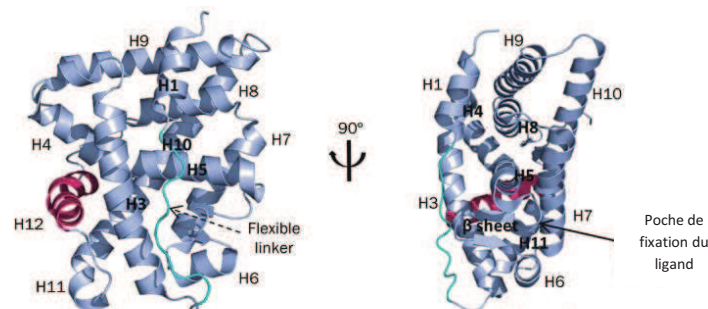


Figure 29. LBD du RA humain. D'après (Tan et al., 2014).

Lorsque le ligand se lie dans sa poche, il y a un changement de repliement de l'hélice 12, conduisant à la création d'une surface d'interaction protéine-protéine importante pour la fonction AF-2. L'AF-2 reconnaît les co-facteurs contenant un motif LXXLL, mais d'une faible affinité concernant le RA. Le LBD interagit également avec le NTD grâce aux motifs décrits précédemment, ce qui permet une stabilisation du récepteur avec son ligand et avec l'ADN. Pour tous les récepteurs stéroïdiens, il existe une dimérisation via leur LBD qui a lieu avant la liaison des récepteurs à l'ADN. Les motifs impliqués dans cette dimérisation sont différents de ceux impliqués dans l'interaction NTD-LBD (Centenera et al., 2008).

3.2.5 Les modifications post-traductionnelles du récepteur des androgènes.

La régulation de l'activité du RA implique une série de modifications post-traductionnelles, comme des phosphorylations, des acétylations et sumoylations. La plupart de ces modifications ont lieu dans la région N-terminale du récepteur (figure 30), pour modifier l'activité transcriptionnelle du RA [pour revue (Coffey and Robson, 2012; Gioeli and Paschal, 2012)].

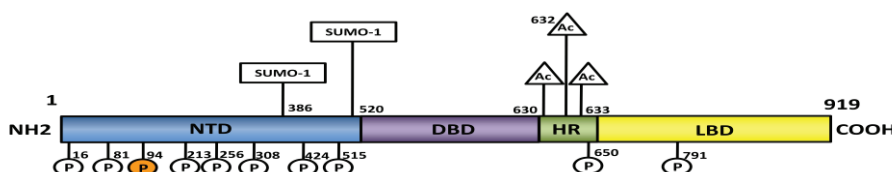


Figure 30. Schéma représentant les modifications post-traductionnelles du RA.

P : phosphorylation, SUMO-1 : sumoylation, Ac : Acétylation.

La phosphorylation du résidu sérine en position 94 est constitutive. D'après (Faus and Haendler, 2006).

3.3 Activités génomiques et non génomiques du récepteur des androgènes.

La liaison du ligand (Testostérone ou DHT), l'homodimérisation du récepteur des androgènes, sa migration dans le noyau, sa liaison à l'ADN et l'activation de la transcription des gènes cibles constituent la voie d'activation classique du RA (figure 31).

Les autres voies d'activation des androgènes sont qualifiées de non génomiques. Elles sont réalisées par des voies de signalisation impliquant un RA « classique » (intracellulaire) (figure 31) ou par des modifications de la concentration intracellulaire en ions et des changements de la fluidité membranaire (figure 32).

3.3.1 Actions des androgènes médiées par un RA classique.

Le RA peut interagir avec le domaine SH3 de la tyrosine kinase c-src lorsqu'il est associé à son ligand (Migliaccio et al., 2000). Une cible de Src est la protéine adaptatrice Shc, qui régule la voie des MAPK. L'activation de cette voie par c-Src entraîne de nombreux processus cellulaires comme la migration, la prolifération et la différenciation. Un traitement androgénique stimule deux membres de la famille des MAPK, Raf-1 et ERK-2 (Kousteni et al., 2001). L'induction de cette cascade de signalisation Src/Raf/ERK est abrogée par

l'inhibition de c-Src et par un traitement anti-androgénique (Kousteni et al., 2001; Migliaccio et al., 2000).

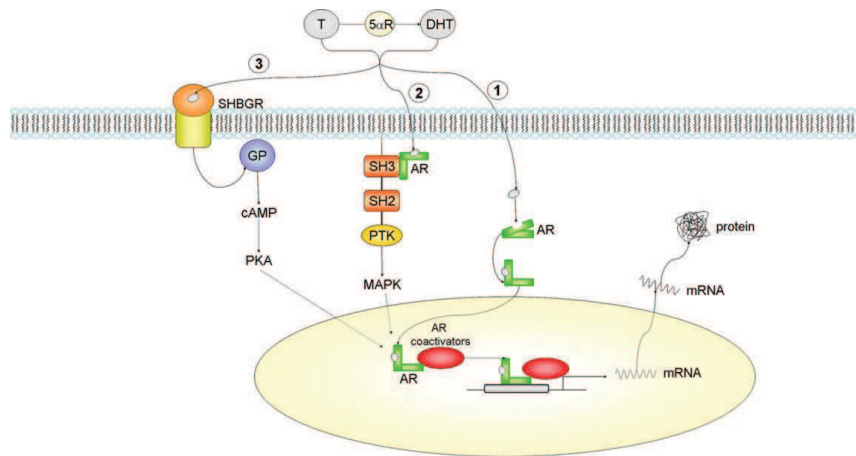


Figure 31. Actions des androgènes médiées par un RA classique (intracellulaire).

- I. Les androgènes diffusent à travers la membrane plasmique, se lient et activent le RA qui migre dans le noyau où il se fixe sur l'ADN pour activer la transcription. C'est la voie de signalisation classique des androgènes.
- II. Pour activer la voie des MAPK et phosphoryler le RA et/ou ces co-activateurs, le RA associé à son ligand interagit avec le domaine SH3 de la tyrosine kinase Src.
- III. Les androgènes se lient à la protéine de transport des stéroïdes (SHBG) pour activer le récepteur SHBG-R, qui couplé à la protéine G va activer la PKA.

T. testostérone ; DHT. Dihydrotestostérone ; 5αR. Enzyme 5 alpha réductase ; AR. Récepteur des androgènes ; PKA. Protéine kinase A ; GP. G-protéine ; SH2. Src homology domain 2 ; SH3. Src homology domain 3 ; PTK. Protéine tyrosine kinase ; MAPK. Mitogen-activated protein kinase ; SHBGR. Protein hormone-binding globulin receptor; cAMP. Cyclic adenosine monophosphate. D'après (Foradori et al., 2008).

Les MAPK peuvent modifier l'activité transcriptionnelle du RA en le phosphorylant directement ou en phosphorylant ses co-activateurs (figure 31) (Foradori et al., 2008). La plupart des androgènes circulants sont liés à la protéine SHBG (Sex Hormon-Binding Globulin) qui peut également être présente au niveau des membranes des cellules sensibles aux androgènes comme les cellules de l'épididyme, du testicule, de la prostate, du muscle squelettique, du foie, des neurones et des cardiomyocytes (Becchis et al., 1996; Caldwell et al., 2003; Frairia et al., 1994; Herbert et al., 2005; Schock et al., 2006). Les effets non génomiques peuvent être médiés via le SHBG-R, qui couplé à une protéine G module les niveaux d'AMPc ce qui active la PK (Grishkovskaya et al., 2000; Nakhla et al., 1999; Rosner et al., 1999a, b). La stimulation de la PKA a pour conséquence de modifier le statut de phosphorylation du RA et de ces co-activateurs ce qui module son activité transcriptionnelle. En 10 à 15 minutes l'activation de la PKA entraîne une déphosphorylation du RA (Blok et al., 1998). Il a également été montré que les canaux ioniques pourraient également être la cible de la PKA (Michels and Hoppe, 2008).

3.3.2 Actions des androgènes sur les concentrations intracellulaires en ions et la fluidité membranaire.

De nombreux auteurs ont suggéré qu'il existe un RA membranaire dans les cellules endothéliales (Figueroa-Valverde et al., 2002), les cellules de cancers du sein (Hatzoglou et al., 2005), de cancers de la prostate (Kampa et al., 2002; Thomas et al., 2014), les ostéoblastes (Kang et al., 2004), les macrophages (Guo et al., 2002) et les lymphocytes T (Benten et al., 1999). D'autres récepteurs stéroïdiens sont des récepteurs membranaires (Levin, 2008). Le RA membranaire serait couplé à une protéine G et régulerait des phospholipases, des sérines-thréonines, et des tyrosines kinases. Cette activation conduirait à la synthèse de seconds messagers (Ca^{2+} , IP_3 , AMPc). Ces messagers secondaires diffusent dans la cellule et activent des voies de signalisation qui modifieraient le statut de phosphorylation des protéines ou affecteraient la transcription des gènes (Benten et al., 1999; Kasbohm et al., 2005; Leung et al., 2001; Lieberherr and Grosse, 1994).

Les canaux ioniques dépendant des variations de potentiels (canaux calcium de type L par exemple) peuvent être directement modulés par les androgènes. En effet, l'addition de testostérone dans des cardiomyocytes de rats entraîne l'inhibition des canaux Ca^{2+} de type L, un traitement à la flutamide (antagoniste de RA) n'empêche pas cette inhibition (Er et al., 2007). L'épiandrostérone et la testostérone peuvent agir, avec des propriétés similaires à celles de la dihydropyridine, comme des antagonistes des canaux Ca^{2+} de type L (Gupte et al., 2002; Hall et al., 2006). Seyrek et collaborateurs suggèrent la modulation des canaux K_{ATP} par la testostérone (Seyrek et al., 2007).

Les androgènes peuvent modifier la fluidité de la membrane en interagissant avec les phospholipides membranaires. Les androgènes acquièrent des charges supplémentaires provenant de résidus sulfatés, et pénètrent dans la membrane des cellules ce qui aura pour conséquence d'entraîner une diminution de la fluidité de la membrane modulant l'action des enzymes impliquées dans l'hydrolyse de l'ATP (figure 32) (Zylinska et al., 1999).

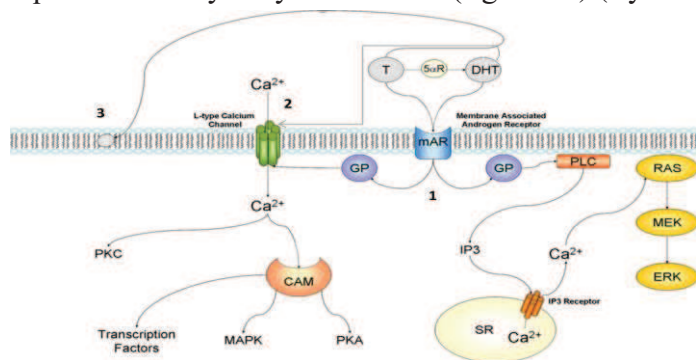


Figure 32. Modifications des concentrations intracellulaires en ions et de la fluidité membranaire par les androgènes.

- (1) Interaction des androgènes avec un RA membranaire conduit à la synthèse de messagers secondaires (IP_3 , Ca^{2+} ...) affectant la transcription des gènes cibles.
- (2) Interaction des androgènes avec les canaux calciques de type-L.
- (3) Modification de la fluidité membranaire par les androgènes.

T : testostérone, DHT : dihydrotestostérone, $5\alpha\text{R}$: enzyme 5 alpha reductase, GP : G-protein, PKA : protéine kinase A, PKC : protéine kinase C, CAM : calmoduline MAPK : mitogen-activated protein

kinase, PLC : phospholipase C, IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate, SR ; réticulum sarcoplasmique, ERK : extracellular-signal regulated kinase, MEK : MAPK/ERK. D'après (Foradori et al., 2008).

Les effets non génomiques peuvent donc être relayés par une multicité de mécanismes, mais la majorité de ces effets non génomiques reste mal compris *in vivo*. De plus, la réponse androgénique peut être initiée en réponse à la combinaison des actions génomiques et non génomiques (Hammes and Levin, 2011).

3.4 Maladies induites par les mutations du RA.

Des mutations dans le RA peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies.

3.4.1 *Syndrome d'insensibilité aux androgènes.*

Le syndrome d'insensibilité aux androgènes est une maladie rare liée à l'X. Elle est due à une mutation du RA (Quigley et al., 1995), dont plus de 400 ont été décrites, avec une prévalence de 1 pour 20400 naissances (Poletti et al., 2005). Ces mutations peuvent avoir pour conséquence une synthèse incomplète de la protéine, l'incapacité du RA muté de fixer son ligand ou anormalité dans la liaison du RA sur les ARES. Si l'insensibilité est complète, les individus mâles présentent un appareil génital féminin (absence d'épididyme, de canal déférent, de vésicules séminales et de prostate, et développement d'une gynécomastie) (Quigley et al., 1995). Cette insensibilité complète est connue sous le nom de Tfm pour Testicular Feminization Syndrome. L'insensibilité peut également être partielle, et on observe une dégradation des phénotypes en fonction de l'importance de l'insensibilité. Les individus touchés peuvent avoir une apparence féminine prédominante avec un appareil génital externe féminin, ambiguë ou une apparence masculine aussi appelé syndrome de Reifstein (Quigley et al., 1995).

3.4.2 *Le cancer de la prostate.*

Le cancer de la prostate est le plus commun des cancers chez l'homme. Il existe des facteurs de risque pour le développement de ce cancer comme l'âge ou la présence d'antécédents familiaux. Les androgènes peuvent constituer un facteur de risque, car les androgènes, via leur récepteur, peuvent stimuler la prolifération cellulaire. Le nombre de répétitions glutamines et glycines dans le domaine N-terminal du RA peut constituer un facteur contribuant au développement de ce cancer.

Plus le cancer est évolutif, plus les mutations du RA augmentent. On retrouve 0 à 4% de mutation dans les stades primaires du cancer, et 40% de mutations du RA dans les tumeurs métastatiques traitées avec des anti-androgènes (Tilley et al., 1996). Ces mutations du RA permettent aux cellules tumorales de s'adapter et d'augmenter leur taux de survie (Taplin et al., 1999). Ces mutations jouent donc un rôle prépondérant dans l'échappement du cancer de la prostate à la privation androgénique (Ben Jemaa et al., 2013).

Les courtes répétitions de glutamines seraient associées à une augmentation de l'activité transcriptionnelle du RA et par conséquent à une augmentation du risque de développer un cancer de la prostate (Sircar et al., 2007).

3.4.3 *La maladie de Kennedy.*

La maladie de Kennedy ou SMBA (spinal and bulbar muscular atrophy) est une maladie génétique liée à l’X. Elle est caractérisée par une faiblesse progressive des muscles bulbaires et des muscles des membres proximaux (Fischbeck, 1997). C’est une expansion du triplet CAG au niveau N-terminal de la protéine qui est à l’origine de cette maladie. Chez un individu sain, il existe entre 9 et 33 répétitions CAG alors que chez les personnes malades il y a entre 38 et 75 répétitions (Brinkmann, 2001). L’expansion polyglutamique conférerait un gain de fonction à la protéine qui serait toxique pour la cellule.

Les androgènes étant impliqués dans un grand nombre de processus biologiques (reproduction, cancer de la prostate, maintien de la force musculaire), l’intégrité du RA est donc essentielle pour le bon fonctionnement de l’organisme.

3.5 **Actions des androgènes dans le muscle squelettique.**

3.5.1 *Effets des androgènes chez l’homme.*

3.5.1.1 *Andropause.*

L’andropause est le nom donné à la diminution des niveaux de testostérone chez l’homme avec l’âge, également connu sous le nom d’ADAM (Androgen Deficiency in the Aging Male) ou PADAM (Partial Androgen Deficiency in the Aging Male). A partir de 30 ans, les niveaux de testostérone diminuent d’environ 1% par an. A 60 ans, 20% des hommes présentent une déficience en androgènes. Ce chiffre augmente à 50% à partir de 80 ans (Brawer, 2004) [pour revue (Singh, 2013)].

3.5.1.2 *Traitements androgéniques.*

3.5.1.2.1 Effets d’un traitement substitutif androgénique chez des hommes jeunes atteints d’hypogonadisme.

Plusieurs études se sont intéressées aux effets de la testostérone sur la composition du corps en graisse et en muscle chez des jeunes hommes souffrants d’hypogonadisme. Lorsque des hommes atteints d’hypogonadisme sont traités avec 100 mg de testostérone énanthate une fois par semaine pendant 10 semaines, il y a une augmentation du poids corporel et de la masse maigre, mais sans changement au niveau de la masse grasseuse, et une augmentation de la force musculaire (Bhasin et al., 1997). Le travail de Brodsky et collaborateurs a montré une augmentation de la masse maigre et une augmentation de la masse grasseuse après un traitement à 3 mg / kg pendant six mois de testostérone cypionate. D’autres ont mis en évidence une augmentation modeste de la masse maigre, ainsi que de la force avec un traitement avec des doses de testostérone inférieures (Wang et al., 1996).

L’ensemble de ces études montrent que des doses physiologiques de testostérone chez des jeunes hommes souffrants d’hypogonadisme entraînent une augmentation de la masse maigre et de la taille du muscle, généralement associé à une augmentation de la force

musculaire. D'autres traitements peuvent également être envisagés [pour revue (Watson et al., 2014)].

3.5.1.2.2 Effets d'un traitement substitutif androgénique chez des hommes âgés.

La supplémentation en testostérone d'hommes âgés avec un faible taux d'androgènes permet d'induire une augmentation de la masse maigre et une diminution de la masse grasseuse (Basaria, 2013; Morley et al., 1993; Sih et al., 1997; Snyder et al., 1999; Tenover, 2000; Tenover, 1992). Bien que la supplémentation androgénique soit associée à un gain de force d'agrippement, il est incertain que ces doses de testostérone de remplacement puissent apporter une réelle amélioration des performances musculaires (Snyder et al., 1999).

3.5.1.2.3 Androgènes et athlètes.

Un des agents dopant utilisé depuis longtemps est le traitement aux stéroïdes anabolisants dans les sports où la masse et la force musculaire sont importantes. La testostérone ne peut pas être utilisée sous sa forme naturelle. En effet lorsque celle-ci est absorbée par voie orale, elle est dégradée par le foie et n'atteint quasiment pas la circulation systémique. Pour ces composés anabolisants, la molécule a été modifiée pour augmenter sa durée de vie et sa capacité d'action dont les trois principales sont (1) l'estérification du groupement hydroxyl en position 17 β (ex : testostérone propionate, cypionate, énanthate - figure 33, type A), (2) l'alkylation en position 17 α (ex : oxandrolone - figure 33, type B) et (3) des modifications de la structure du noyau stérol (ex : nandrolone - figure 33, type C) (Wilson, 1988).

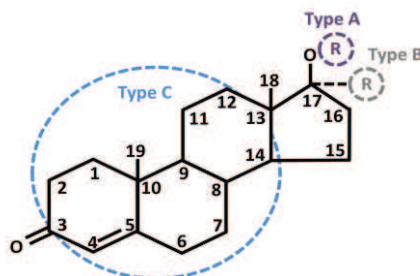


Figure 33. Les modifications de la molécule de testostérone.

Type A : Esther d'androgène ; Type B : Androgènes alkylés en position 17 α ; Type C : Modification du noyau stérol. D'après (Wilson, 1988).

Les composés alkylés en position 17 α sont catabolisés lentement par le foie et atteignent la circulation systémique en quantité suffisante. Ils peuvent donc être administrés oralement. Les esters de testostérone sont administrés par voie parentérale (dans une solution d'huile) ce qui permet de libérer lentement l'hormone dans le sang.

Plus l'ester a une chaîne carbonée longue, plus le composé est relargué lentement dans la circulation, et plus son action sera prolongée dans le temps. Les composés dont le noyau stérol est modifié sont administrés par voie orale ou parentérale (Wilson, 1988).

L'effet de stéroïdes anabolisant est difficile à évaluer chez les athlètes, car ils prennent ces composés à des doses variables de manière plus ou moins cyclique et parfois en combinaison les uns avec les autres. Ces études nécessitent une standardisation du composé utilisé, de la durée du traitement et doivent être réalisées en aveugle. Il y a des difficultés dans la

comparaison des différentes études réalisées, car les composés anabolisants utilisés, leur dose et la durée du traitement peuvent être différents, tout comme les programmes d'entraînement, les critères de mesures, les régimes alimentaires, le nombre de sujet ou le traitement des données statistiques. Parmi les études qui paraissent être correctement réalisées, les résultats sont contradictoires. Neufs ne montrent pas d'effet sur la force musculaire (Casner et al., 1971; Crist et al., 1983; Fahey and Brown, 1973; Fowler et al., 1965; Golding, 1974; Hervey et al., 1976; Johnson et al., 1975; Loughton and Ruhling, 1977; Stromme et al., 1974), alors que sept constatent une augmentation de la force (Ariel, 1973, 1974; Hervey et al., 1981; Johnson, 1972; O'Shea, 1971; Ward, 1973; Win-May, 1975).

Les études réalisées chez les athlètes ne permettent pas de mettre en évidence le rôle des androgènes sur la masse et la force musculaire.

3.5.1.2.4 Effets de doses supraphysiologiques de testostérone chez des hommes non athlétiques.

Chez des individus ne pratiquant pas de sport de haut niveau, les effets d'une dose supraphysiologique de testostérone sur la composition corporelle et la force musculaire sont également controversés. Les effets supraphysiologiques de testostérone avec ou sans exercice (d'haltérophilie) sur la taille et la force musculaire ont été étudiés (Bhasin et al., 1996). Leurs résultats montrent que la masse maigre, la taille du muscle et la force augmentent, de façon encore plus importante lorsque l'exercice est combiné au traitement à la testostérone. Donc, l'exercice pourrait augmenter l'effet des androgènes dans le muscle.

3.5.1.2.5 Effets de la supplémentation androgénique dans le cas de perte de masse musculaire liée à une maladie.

Des études de supplémentation androgéniques ont été réalisées chez des patients atteints de HIV avec des résultats contradictoires. Parmi les études réalisées avec des contrôles placebos, trois décrivent une augmentation de la masse maigre (Bhasin et al., 1998; Bhasin et al., 2000; Grinspoon et al., 1998), alors que deux ne montrent pas de modifications (Coodley and Coodley, 1997; Dobs et al., 1999). Il faut noter que des patients avec de très faibles niveaux de testostérone avaient été sélectionnés pour les trois études décrivant des effets. Bhasin et collaborateurs ont réalisé une étude en comparant les effets de la testostérone avec ou sans exercice vs un placebo avec ou sans exercice, mais en traitant cette fois des patients infectés du VIH. Les androgènes induisent une augmentation de la masse maigre en plus de la force musculaire chez des hommes infectés par le VIH avec de faibles niveaux de testostérone (Bhasin et al., 2000).

Une perte de la masse musculaire est observée chez des patients souffrant de maladies auto-immunes et traités par des glucocorticoïdes. Le traitement à la testostérone d'hommes sous glucocorticoïdes augmente la masse maigre et la densité osseuse (Reid et al., 1996).

Ainsi, un traitement androgénique peut atténuer la perte de masse liée à certaines maladies.

3.5.1.2.6 Effets des androgènes chez les femmes.

Suite à l'administration de doses pharmacologiques de testostérone propionate chez des femmes saines, on observe une augmentation de la rétention azotée (Kenyon, 1938). La combinaison d'un traitement œstrogénique avec un traitement androgénique permettrait une augmentation de la masse maigre et une diminution de la masse grasse de façon plus importante que lors d'un traitement aux œstrogènes seul (Davis et al., 1995). En revanche, Miller et collaborateur ont montré que la supplémentation en testostérone de femmes atteintes du VIH avec perte de poids n'affecte ni la masse maigre, ni la masse musculaire (Miller et al., 1998). L'administration de DHEA à des femmes post-ménopausées induit une augmentation de la masse corporelle (Diamond et al., 1996; Morales et al., 1998). Cependant dans une autre étude aucun effet n'a été mis en évidence (Callies et al., 2001).

Ces études ne permettent pas de conclure sur les effets des androgènes sur les muscles chez la femme, car la plupart ont examiné les effets des androgènes sur un échantillon de femmes limité et peu d'études ont été réalisées sur le muscle squelettique. Cependant, afin de favoriser un gain de masse musculaire, les stéroïdes anabolisants sont également utilisés chez les femmes. Ils ont un bénéfice sur le gain de masse musculaire, mais conduisent à des effets secondaires sérieux comme la virilisation avec hirsutisme important ou des problèmes gynécologiques avec des aménorrhées (Sjoqvist et al., 2008).

En conclusion, de nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre le rôle des androgènes dans le muscle squelettique. Ces résultats suggèrent que chez des hommes jeunes atteints d'hypogonadisme, un traitement androgénique induira une augmentation de la masse maigre, de la taille et de la force musculaire (lié à l'augmentation de masse musculaire). On observe également une amélioration des fonctions musculaires chez des hommes âgés ou infectés par le VIH après un traitement à la testostérone. Ces études présentent des limites comme le choix du patient (niveau de testostérone basal, mode de vie...), le type d'androgène utilisé, les doses et les temps de traitements, ainsi que les paramètres de mesure de la force. Ces derniers ne permettent donc pas de comprendre les mécanismes d'action des androgènes au niveau des muscles squelettiques.

Les traitements aux androgènes ont également des effets secondaires comme un risque de développement de cancer de la prostate plus élevé lorsque le taux de testostérone augmente (Shaneyfelt et al., 2000).

Afin d'utiliser les androgènes pour contrecarrer la perte de masse et de force musculaire liés à l'âge ou à certaines pathologies, des études complémentaires pour comprendre les effets des androgènes au niveau physiologique et moléculaire doivent être réalisées.

3.5.2 Effets des androgènes chez les animaux.

Afin de préciser le rôle des androgènes dans le muscle squelettique, les rongeurs sont fréquemment utilisés. Ils permettent le contrôle de certains paramètres, comme le fond génétique ou le régime alimentaire par exemple qui ne peuvent pas être contrôlés chez l'homme et qui induisent d'importantes variations lors d'une expérience. Des expériences de

traitements androgéniques ou de castration chez les rongeurs ont permis de montrer des différences de sensibilité aux androgènes entre les différents muscles squelettiques. Enfin, afin de comprendre les mécanismes d'action des androgènes, des modèles d'animaux chez lesquelles le RA est invalidé ont été générés.

3.5.2.1 *Les muscles du périnée.*

Les muscles du périnée [le muscle bulbocaverneux (BC) et le muscle élévateur de l'anus (LA)] permettent l'attachement de la base du pénis. Ces muscles sont présents chez les mâles et les femelles à la naissance et la production gonadal de testostérone chez le mâle entraine une prolifération des fibres musculaires du BC et du LA (Tobin and Joubert, 1991) alors que l'absence de testostérone chez les femelles conduit à une mort cellulaire avec l'involution de ces muscles (Jacob et al., 2008). Chez les rongeurs ces muscles sont absents chez les femelles adultes (Cihak et al., 1970). Le traitement androgénique de rattes dès la naissance entraine une masculinisation du BC/LA (Breedlove and Arnold, 1983b), alors que le traitement de rats avec un antagoniste du RA conduit à sa féminisation (Breedlove and Arnold, 1983a).

La taille de ces muscles est dépendante des androgènes chez l'adulte. Suite à une castration chez les souris et les rats, les muscles BC/LA sont atrophiés. En revanche leur taille augmente après un traitement androgénique (Axell et al., 2006; Balice-Gordon et al., 1990; Dorfman, 1963; Vyskocil and Gutmann, 1977; Wainman, 1941). Les effets anaboliques des androgènes sur ces muscles entrainent des changements de la taille des fibres sans changer le nombre de fibres musculaires (Venable, 1966). Chez les adultes, les androgènes ont un rôle dans le maintien de la taille des jonctions neuromusculaires (Balice-Gordon et al., 1990; Bleisch and Harrelson, 1989; Lubischer and Bebinger, 1999), le nombre de récepteurs à l'acétylcholine (Bleisch and Harrelson, 1989; Bleisch et al., 1982), ainsi que dans l'activité nerveuse (Fargo et al., 2003).

Ainsi, les muscles du périnée sont sensibles aux androgènes pour leur développement et leur maintien à l'âge adulte.

3.5.2.2 *Les muscles des membres.*

Il a été montré, qu'après une castration des souris, la masse des muscles des membres diminue (Jiang and Klueber, 1989; Rowe, 1968), ainsi que la force (Jiang and Klueber, 1989). Cependant, les études réalisées par Antonio et collaborateurs ne montre pas de diminution de la masse des muscles des membres (Antonio et al., 1999).

Tout comme chez l'homme, les résultats des traitements androgéniques chez le rongeur sont controversés. Trois à six semaines de traitement de souris avec un stéroïde anabolisant, le stanozolol, ne produit pas de changement de la masse de l'EDL (Extensor Digitorum Longus) et du muscle soléaire, mais la masse des muscles du périnée est augmentée dès trois semaines (Tingus and Carlsen, 1993). Il n'y a pas d'augmentation de la masse de l'EDL ou du muscle soléaire de rats jeunes ou âgés traités avec de la testostérone (Isayama, 2006). Un traitement androgénique substitutif (dix semaines) sur des souris castrées a montré qu'une castration induit une diminution de la masse des muscles rapides et intermédiaires (EDL, plantaris, tibialis), mais que cette diminution est restaurée après dix semaines de traitements. L'altération de la force observée est due à la diminution de la masse musculaire.

Chez les rongeurs, les muscles du périnée ont une croissance et une masse dépendante des androgènes, alors que les muscles des membres sont moins affectés par les androgènes.

3.5.2.3 *Modèle animaux d'invalidation du RA.*

Plusieurs modèles de souris chez lesquelles le RA a été invalidé dans la lignée germinale ont été générés (Notini et al., 2005; Sato et al., 2003; Yeh et al., 2002). Ces souris présentent un aspect externe de femelles, sans prostate, vésicules séminales et avec des testicules fortement atrophiés. Ces animaux présentent également des problèmes métaboliques et deviennent obèses. Aucun de ces auteurs ne s'est intéressé aux muscles squelettiques. Un groupe a étudié les fonctions musculaires de souris chez lesquelles le RA est invalidé (MacLean et al., 2008). Il a montré que l'absence de RA entraîne une absence du LA et une diminution de la masse des muscles des membres. De plus, chez ces souris KO, la force générée est plus faible dans les muscles rapides et cette diminution est liée à la diminution de la masse musculaire. Mais ces études ne permettent pas de caractériser le rôle des androgènes dans le muscle squelettique, car le RA est invalidé dans toutes les cellules de l'organisme. Il est donc important de développer de nouveaux modèles d'étude d'action des androgènes sur la fonction musculaire.

Le mécanisme d'action des androgènes dans le muscle est peu connu mais des hypothèses quant à leurs modes d'action sont suggérées.

3.5.3 *Mécanisme d'action potentiel des androgènes dans le muscle squelettique.*

Le RA est exprimé dans différentes cellules musculaires : les cellules souches mésenchymateuses, les fibroblastes, les cellules satellites et les myofibres (Johansen et al., 2007; Monks et al., 2004; Sinha-Hikim et al., 2004).

Plusieurs études montrent que les traitements androgéniques permettent d'augmenter le nombre de cellules satellites chez l'homme et l'animal. Une hypothèse est donc que les androgènes ciblent les cellules satellites pour réaliser leurs actions. Un traitement aux androgènes chez le rat avant la puberté entraîne une augmentation transitoire du nombre de cellules satellites dans le LA (Joubert et al., 1994). Chez le porc, la castration diminue la prolifération des cellules satellites, et les cellules satellites prolifèrent chez un cochon castré traité à la testostérone (Mylvaney et al., 1988). Les biopsies musculaires d'athlètes prenant des stéroïdes montrent une augmentation des noyaux centraux, ce qui témoigne de l'activation et de la prolifération des cellules satellites pour former les nouvelles fibres (Kadi et al., 1999). De plus, les travaux de Doumit et collaborateurs suggèrent que les androgènes augmentent l'expression du RA dans les cellules satellites, ce qui augmenterait la sensibilité des ces cellules aux androgènes (Doumit et al., 1996).

En plus de leur rôle direct sur la prolifération et la différenciation des cellules satellites, les androgènes peuvent jouer un rôle indirect sur l'activation de ces cellules grâce à la modulation de voies de signalisation (figure 34).

3.5.3.1 *Insulin-like Growth Factor-I: IGF-I.*

IGF-I est un régulateur de la masse musculaire car il stimule la croissance du muscle (Bassel-Duby and Olson, 2006). Une production locale d'IGF pourrait être en parti responsable des

effets anaboliques des androgènes dans le muscle squelettique. En effet, une administration de nandrolone chez le rat entraîne une augmentation de la protéine IGF-I dans le muscle (Lewis et al., 2002). Après un traitement à la testostérone, l'expression de cette protéine est augmentée dans le muscle chez l'homme (Ferrando et al., 2002). Voir paragraphe 1.2.3.3.

3.5.3.2 Récepteur des glucocorticoïdes: RG.

Les glucocorticoïdes, via leur récepteur (RG), ont des effets cataboliques sur le muscle squelettique. Le RA et le RG ont une structure proche et pourraient donc réguler les mêmes gènes, alors que dans le muscle squelettique leurs effets sont opposés. Il a été montré que l'administration d'androgènes à des hommes sous traitement aux glucocorticoïdes augmenterait leur masse musculaire (Crawford et al., 2003). Cependant les mécanismes moléculaires de cette action anti-glucocorticoïde des androgènes sont mal connus. Une hypothèse suggère une compétition entre les androgènes et les glucocorticoïdes pour la liaison au RG (Van Balkom et al., 1998). Une deuxième hypothèse propose que les androgènes réduisent l'expression du RG, ce qui a été montré dans les neurones CA1 et dans les motoneurones chez les rats (Blanco et al., 2002; Kerr et al., 1996; Yen et al., 1997). Le RA pourrait également exercer un effet dominant négatif sur la fonction du RG (Yen et al., 1997).

3.5.3.3 Myostatine.

Membre de la famille des TGF β , la myostatine est un régulateur négatif de la masse musculaire. Les souris déficientes pour la myostatine présentent une augmentation de la masse musculaire mais une diminution de la force (Amthor et al., 2007). Des études suggèrent un contrôle négatif direct de l'expression de la myostatine par le RA via un ARE (Ma et al., 2001; Mendler et al., 2007). Voir paragraphe 1.2.3.5.

3.5.3.4 Effets non génomique

Les androgènes pourraient exercer leur contrôle sur les cellules satellites par les voies non génomiques décrites précédemment (figure 34).

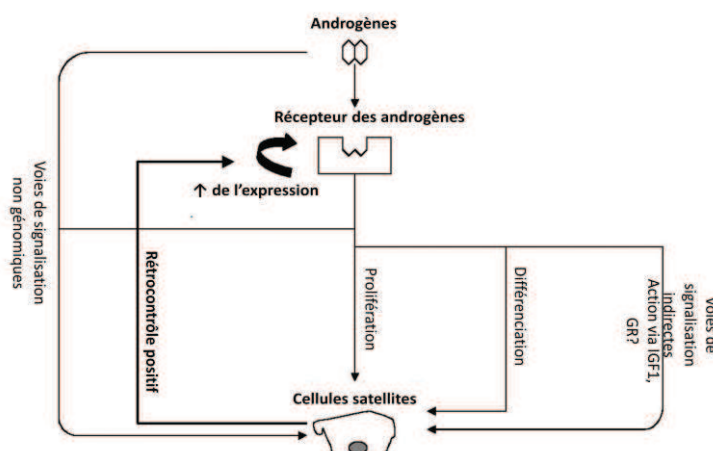


Figure 34. Mécanismes d'actions possibles des androgènes sur les cellules satellites. D'après (Chen et al., 2005).

Il est nécessaire de réaliser des études complémentaires afin de déterminer les voies de signalisation et les types cellulaires par lesquels les actions des androgènes sont relayées dans le muscle squelettique.

L'effet des androgènes pourrait également être médié par d'autres molécules comme les polyamines. En effet, les androgènes, augmentent la masse et la force musculaire mais stimule également l'accumulation des polyamines dans différents tissus. Dans le muscle, les androgènes agissent via leur récepteur pour réguler l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des polyamines qui pourrait être un des mécanismes par lequel les androgènes stimulent la croissance musculaire [pour revue (Lee and MacLean, 2011)].

4 Les polyamines.

Le terme polyamines (PA) est utilisé pour désigner trois composés : la putrescine, la spermidine et la spermine. Ils appartiennent à la famille très large des amines qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques et notamment l'immunité. Ils sont présents de façon ubiquitaire et jouent un rôle important dans la croissance cellulaire, la prolifération et dans la synthèse protéique. Ils sont également impliqués dans la réparation de la matrice extracellulaire, l'adhésion cellulaire et dans certains processus de signalisation. La réduction des PA entraîne une inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire, alors que son accumulation induit l'apoptose et la transformation cellulaire.

4.1 Structure des polyamines

Les trois polyamines, putrescine (1,4-butane diamine ou tetramethylenediamine), spermidine (N-(3-aminopropyl)-1,4-butane diamine ou aminopropyl-tetramethylenediamine) et spermine (N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,4-butane diamine ou diaminopropyl-tetramethylenediamine) sont dérivés de l'ornithine après une première étape de décarboxylation (Seiler et al., 1996).

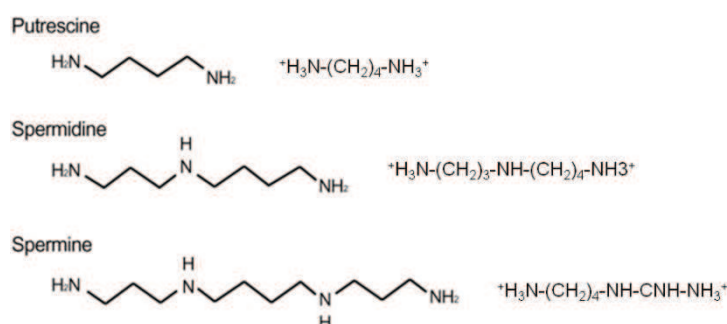


Figure 35. Structure des polyamines. D'après (Kim et al., 2007).

Il existe d'autres oligamines comme l'histamine, la thermine ou la cadaverine, mais celles-ci ne sont pas désignées sous le terme polyamine (Wallace, 2003).

Les PA sont des amines aliphatiques de faible poids moléculaire et soluble dans l'eau, et sont protonés au pH corporel (Seiler et al., 1996). Les fonctions des polyamines dépendent de leurs charges électriques. L'énergie de liaison décroît de la spermine à la spermidine, la spermine étant la plus active et la putrescine la moins active dans les différents processus biologiques (Yuan et al., 2001).

4.2 Métabolisme des polyamines.

Bien qu'identifiés dans le fluide séminal, les PA sont présents dans tous les types cellulaires. Le métabolisme de ces molécules ainsi que les caractéristiques des différentes enzymes impliqués, sont largement étudiés (Pegg, 2009).

4.2.1 Synthèse.

La putrescine est synthétisée à partir de l'ornithine par une réaction catalysée par l'ornithine-décarboxylase (ODC), une enzyme limitante dans la synthèse des polyamines (Pegg, 2006). Les deux autres polyamines dérivent de la putrescine par attachement successif de deux groupes propylamines par action de l'aminopropyl-transférase appelé spermine ou spermidine-synthase. Le groupe propylamine donneur est S-adenosyl-S-methylhomocysteamine dérivé de S-adenosyl-méthionine (SAM) par l'action de SAM-décarboxylase (SAMdc ou AMD) (Jeevanandam and Petersen, 2001). La synthèse de la spermine et de la spermidine est donc conditionnée par la disponibilité d'un acide aminé essentiel, la méthionine, précurseur de SAM par sa condensation avec l'ATP en présence d'ions Mg^{2+} (figure 36).

4.2.2 Interconversion et catabolisme

Les PA sont métabolisées en un très grand nombre de dérivés par l'action de différentes oxydases et acétyl-transférases.

4.2.2.1 Réaction d'acétylation.

Bien que les réactions catalysées par les aminopropyl-transférases soient irréversibles, la spermine et la spermidine peuvent être recyclées en spermidine et en putrescine respectivement (Jeevanandam and Petersen, 2001). Ces réactions nécessitent la formation d'intermédiaire N-acétylé, N¹-acétylspermine et N¹-acétylspermidine par l'action de l'acétyl-CoA : spermidine/spermine N¹-acétyl-transférase (SSAT). Le gène SSAT est régulé transcriptionnellement et post-transcriptionnellement par les acides aminés disponibles (Aubel et al., 2003). Par la suite, la polyamine oxydase (PAO), une enzyme FAD présente dans le péroxyosome, donne une polyamine avec libération d'un aldéhyde (3-acetamidopropanal) et d'un peroxyde d'hydrogène (Hoet and Nemery, 2000). Quand la putrescine, la spermine ou la spermidine radiomarquées sont administrées seules *in vivo*, il y a un marquage rapide des deux autres PA, ce qui témoigne d'une interconversion (Jeevanandam and Petersen, 2001). De plus, il existe une N⁸-acétyl-transférase nucléaire qui donne de la N⁸-acétyl-spermidine et de la N⁸-acétyl-putrescine qui seront finalement excrétées (Seiler et al., 1996) (figure 36).

Les réactions d'acétylation permettent à la cellule de réduire les interactions de PA avec différents polycations en diminuant le nombre de charges positives des PA. Un des mécanismes permettant de réguler la concentration de PA intracellulaire est d'augmenter l'excrétion des PA acétylés (Jeevanandam and Petersen, 2001).

La toxicité d'une forte concentration de PA peut provenir du stress oxydatif dû à la formation de peroxyde d'hydrogène dans cette étape d'interconversion.

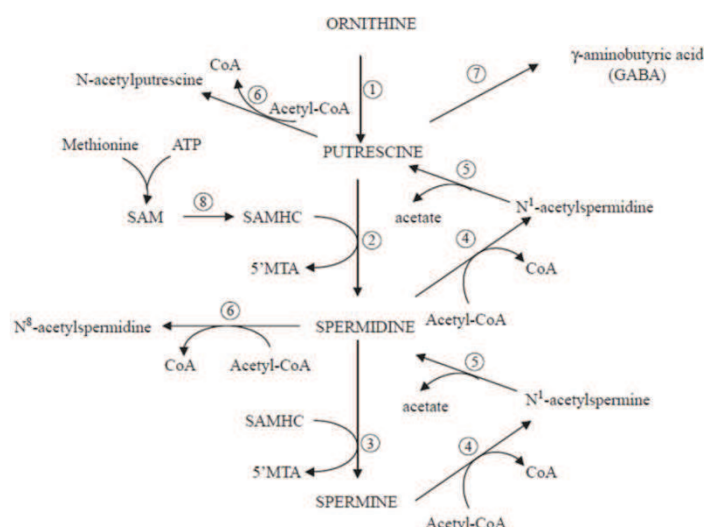


Figure 36. Synthèse et interconversion des polyamines.

1. Ornithine decarboxylase (ODC) ; 2. Spermidine synthétase ; 3. Spermine synthétase ; 4. Acétyl-CoA :spermidine/spermine N1-acétyltransférase (SSAT) ; 5. Polyamine-oxydase (PAO) ; 6. N8-acétyltransférase ; 7 diamine oxydase (DAO) ; 8. SAM-décarboxylase (SAMdc ou AMD). SAM : S-adenosyl-méthionine ; SAMHC : S-adenosyl-S-méthyl homocystéamine ; 5MTA: 5 méthylthioadénosine.

4.2.2.2 Catabolisme terminal.

Une partie du catabolisme terminal des PA est réalisée par la déamination oxydative par la diamine oxydase (DAO) Cu^{2+} dépendante, présente dans certains tissus comme la musculature intestinale, le foie et le rein (Seiler et al., 1996). La putrescine est l'un des précurseurs de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) sous l'action de DAO.

PAO est également impliquée dans le catabolisme des PA. Elle est particulièrement active sur la spermine et sur les dérivés N¹-acétylés, et moins sur la spermidine (Hoet and Nemery, 2000).

Les enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation des polyamines, ODC, AMD et SSAT sont régulées par les PA et par d'autres stimuli, comme les facteurs de croissance, les hormones, 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) (Pegg, 2009). Si le taux de spermine ou de spermidine est élevé dans la cellule, les niveaux d'ODC et AMD sont diminués et ceux de SSAT sont augmentés. Réciproquement, quand le niveau de PA est réduit, ODC et AMD sont surexprimés et SSAT est sous exprimé. Cette régulation se fait au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel, et les mécanismes de régulation de ces enzymes par les polyamines ont été très étudiés (Igarashi and Kashiwagi, 2010; Pegg, 2009).

Quand le niveau de PA augmente, ODC est dérégulé par l'induction de l'antizyme (Coffino, 2001; Ivanov et al., 1998). L'antizyme forme un complexe avec ODC pour inactiver l'enzyme et la diriger vers le protéasome 26S pour sa dégradation. De plus, l'antizyme inhibe la prise de polyamines et stimule leur sécrétion. Il existe également un inhibiteur de l'antizyme (AzI) (Fujita et al., 1982) mais qui est dépourvu de toutes activités enzymatiques.

4.2.3 Transport des polyamines.

Le transport est l'une des voies permettant la régulation du contenu intracellulaire en PA. Le transport est stimulé par la réduction des PA intracellulaire, par exemple par l'inhibition d'ODC, par un processus dépendant de la synthèse protéique (Seiler et al., 1996). Dans ces circonstances, l'apport en PA exogènes entraîne une augmentation rapide et marquée de la concentration intracellulaire de PA, induisant éventuellement une inhibition du transport (Seiler et al., 1996). Le transport des polyamines a été bien décrit chez la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais moins chez les mammifères.

Chez les mammifères, deux systèmes de transport ATP dépendant ont été décrits dans les cellules alvéolaires du poumon, l'un avec une forte affinité et l'autre avec une faible. Il a été montré que la spermine et la spermidine bloquent le transport de la putrescine de manière dose dépendante, alors que la putrescine ne bloque que partiellement le transport des deux autres PA (Hoet and Nemery, 2000). Un transporteur de diamines a été identifié dans les cellules épithéliales du colon qui serait responsable de l'excrétion de la putrescine et des PA acétylés (Uemura et al., 2008). Mise à part ces études, aucun transporteur n'a été décrit chez les mammifères.

4.3 Régulation du métabolisme des polyamines.

Le contenu en PA intracellulaire est le résultat d'une régulation simultanée de leur synthèse, dégradation, absorption et élimination (Persson et al., 1998; Seiler et al., 1996). Les enzymes limitantes du métabolisme sont ODC, SAMdc(AMD) et SSAT, trois enzymes contrôlées par une régulation post-traductionnelle (Coffino, 2000; Seiler, 2004).

4.3.1 Ornithine décarboxylase : ODC.

L'enzyme régulatrice majeure est ODC. Son activité est fortement augmentée par l'action de différents facteurs de croissance, d'acides aminés comme la glutamine, ou le stress hypotonique. De plus, la transcription du gène codant pour ODC, sa traduction, la dégradation de son ARNm et son catabolisme sont contrôlés (Yuan et al., 2001). Quand ODC est induit, l'augmentation de son ARNm est plus faible que l'augmentation de son activité, ce qui montre l'importance des mécanismes de régulation post-traductionnels (Persson et al., 1998).

Le mécanisme de contrôle de l'activité d'ODC implique une protéine dépourvue de toute activité enzymatique, l'ornithine décarboxylase antizyme (OAZ) (cf 4.2.2). Cette antizyme est induite par une accumulation intracellulaire de PA. Elle forme un complexe avec ODC, qui par un changement de conformation, va entraîner son inhibition et accélérer sa dégradation par le protéasome 26S, par un mécanisme qui ne nécessite pas l'ubiquitination d'ODC (Hayashi et al., 1996). OAZ existe sous trois isoformes, OAZ1, OAZ2 et OAZ3. OAZ1 et OAZ2 inhibe l'activité d'ODC et facilite sa dégradation. OAZ3 est uniquement exprimée dans les testicules pendant la fin de la spermatogénèse (Janne et al., 2004). De plus, OAZ prévient l'accumulation de PA en inhibant leur transport (Hayashi et al., 1996). Les PA ne semblent pas exercer d'inhibition directe de l'activité d'ODC, mais induit des modifications de sa conformation favorisant ainsi sa liaison à l'antizyme (Yuan et al., 2001).

4.3.2 Acétyl-CoA: spermidine/spermine N¹-acetyl-transferase (SSAT).

L'acétylation des PA par SSAT est l'étape limitante de leur dégradation et leur interconversion (Bettuzzi et al., 1999). L'augmentation des niveaux de PA intracellulaires induit SSAT, qui favorise l'excrétion des PA acétylées et la destruction de la putrescine par DAO. L'activation de SSAT prévient des effets néfastes d'une accumulation excessive de PA (Bettuzzi et al., 1999; Seiler, 2004).

4.3.3 S-adenosyl-S-methyl décarboxylase (SAMdc ou AMD).

AMD est régulé négativement par les PA qui agissent au niveau transcriptionnel et traductionnel et sur la demi-vie de la protéine (Ruan et al., 1996).

AMD catalyse la décarboxylation de SAM. Cette réaction est l'étape limitante de la conversion de la putrescine en spermidine ou spermine. L'activité d'AMD est régulée à plusieurs niveaux. Putrescine active AMD en induisant autoprocessement d'une proenzyme et en induisant son activité catalytique. Le spermidine et la spermine diminuent la synthèse de l'enzyme en inhibant la transcription du gène et la traduction de son ARNm. La spermine et la spermidine induisent également la dégradation de l'enzyme via le protéasome (Pegg, 2009).

4.3.4 Autres mécanismes de régulation.

Toutes les modifications de la concentration intracellulaire d'ornithine affectent la synthèse de PA (Han et al., 2001). L'arginine joue également un rôle majeur, puisqu'elle permet d'inhiber l'absorption de la putrescine (Seiler et al., 1996). L'agmatine, résultant de la décarboxylation de l'arginine, peut également interférer avec le transport des PA. Elle peut interagir avec le métabolisme des PA, non seulement en induisant OAZ, mais également en inhibant ODC (Babal et al., 2001). Il a également été montré qu'ODC est inactivé par les oxydes nitriques *in vivo* et *in vitro* (Satriano et al., 1999).

4.4 Propriétés des polyamines.

4.4.1 Les fonctions des polyamines.

4.4.1.1 Polyamines, structure de l'ADN et apoptose

Les PA stabilisent l'ADN : des complexes de la chromatine et des modifications de la chromatine et de la structure de l'ADN ont été montrés dans des cellules dépourvues de PA (Davidson et al., 1999). Inversement, une accumulation excessive de PA favorise l'apoptose (Hoet and Nemery, 2000). Dans les cellules intestinales épithéliales IEC-6, la diminution des PA par le difluorométhyle ornithine (DFMO, un inhibiteur d'ODC) ralentit l'apoptose. Dans les mêmes conditions, une supplémentation exogénique de putrescine ou l'induction d'une accumulation intracellulaire de putrescine en inhibant SAMdc restaure l'apoptose (Ray et al., 2000).

4.4.1.2 Polyamines et prolifération cellulaire.

L'importance des PA dans la prolifération cellulaire est bien établie (Bettuzzi et al., 1999). Leur effet doit impliquer la phosphoprotéine nucléaire p53, qui joue un rôle essentiel dans la

régulation des gènes impliqués dans la croissance et la mort cellulaire. La diminution de PA par le DFMO *in vivo* et *in vitro* entraîne une augmentation de l'expression de p53 et une inhibition de la croissance cellulaire. En parallèle, la diminution des PA entraîne une considérable augmentation de la stabilité de l'ARNm de p53 (Li et al., 2001). Les PA jouent un rôle important dans la migration des cellules vasculaires du muscle lisse après une lésion endothéliale (Liang et al., 2004).

De plus, le recrutement des PA pendant la croissance cellulaire doit être dû en parti au fait que la spermidine est le substrat nécessaire pour la modification de eIF-5A (Tome and Gerner, 1996).

4.4.1.3 Polyamines et expression génique.

Les PA stimulent la transcription des gènes et la traduction (Coffino, 2000). Leur habilité d'interaction avec les acides nucléiques est clairement illustré, par exemple, par leur effet sur l'expression de OAZ. Ce contrôle est exercé par un mécanisme appelé déplacement du frameshift transitionnel : OAZ a deux séquences (ORF1 et 2) qui se recoupent partiellement. Les PA produisent un changement dans le cadre de lecture du messenger par les ribosomes, ce qui est nécessaire à la correcte traduction de la deuxième séquence (Coffino, 2000).

L'interaction entre les PA et l'ARN a été observé en présence de concentration physiologique de Mg^{2+} (Yoshida et al., 2001). L'action de PA sur la synthèse protéique se fait à différents niveaux : expression des protéines dans un système cellulaire, stimulation de l'assemblage des sous unités 30S des ribosomes et stimulation de la formation de Ile-ARNt (Yoshida et al., 2001).

4.4.1.4 Polyamines et canaux ioniques.

Les PA endogènes, particulièrement la spermine et la spermidine, sont des régulateurs de l'activité de plusieurs canaux ioniques membranaires, et ont, en particulier, un effet de blocage sur certains canaux potassiques (impliqué dans la maintenance du potentiel de membrane) et sur le récepteur glutamate. La spermine a des effets multiples sur le sous type N-methyl D-aspartate (NMDA) des récepteurs au glutamate, incluant sa stimulation qui augmente la taille du récepteur NMDA et le blocage voltage-dépendant (Williams, 1997).

4.4.1.5 Polyamines et signalisation cellulaire.

Par leur effet de stabilisation de la membrane cellulaire, les PA sont capables de moduler l'activité des récepteurs comme ceux de certains facteurs de croissance, par exemple, EGF (Johnson and McCormack, 1999). A cause de leur caractère polycationique, les PA interagissent fortement avec les phospholipides membranaires et doivent donc jouer un rôle important dans la régulation des enzymes liés à la membrane (Moruzzi et al., 1993). Un effet activateur sur différentes protéines kinases (tyrosine kinase, MAP kinase) qui stimule l'expression des proto-oncogènes a été démontré (myc, jun, fos) (Johnson and McCormack, 1999). Les PA peuvent aussi interagir avec les protéines G (Hoet and Nemery, 2000), car leur activité GTPase est activé par les PA et particulièrement par la spermine (Yuan et al., 2001). Les PA stimulent la liaison de NF- κ B à son élément de réponse spécifique sur l'ADN (Yuan et al., 2001). Il a été montré que NF- κ B est activé par une diminution des PA dans les cellules

IEC6 (Pfeffer et al., 2001). De plus, une forte concentration de PA induit un stress oxydatif qui peut entraîner une activation de NF- κ B.

4.4.2 Autre fonction des polyamines : l'autophagie.

L'autophagie est un processus vacuolaire permettant de dégrader le contenu cytoplasmique des cellules au sein des lysosomes. C'est un mécanisme essentiel pour le maintien de l'homéostasie, la dégradation protéique pour les besoins énergétiques, et l'enlèvement des substrats endommagés pour de la biosynthèse de novo. L'autophagie est important pour la survie cellulaire dans différentes conditions, comme le stress induit pour les agrégats protéiques, la privation de nutriments et de facteurs de croissance et l'infection par un pathogène (Boya et al., 2005).

4.4.2.1 Mécanisme de l'autophagie

Plus de 30 gènes régulant l'autophagie ont été décrits chez la levure et la plupart ont des orthologues chez les mammifères. Ces gènes peuvent être classés selon leur fonction à différents stades de l'autophagie : l'élongation, la maturation et la fusion avec le lysosome (figure 37).

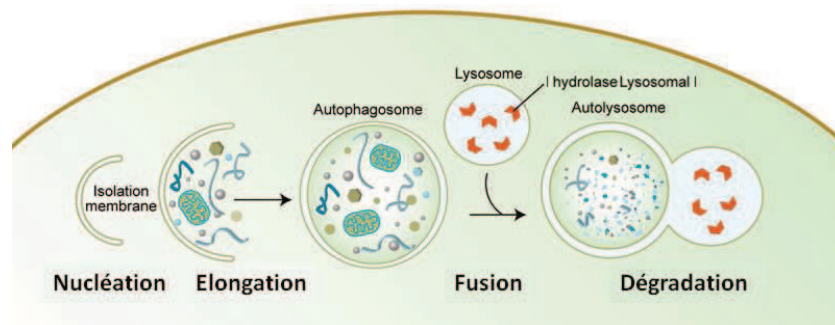


Figure 37. Mécanisme de l'autophagie. D'après (Melendez and Levine, 2009).

4.4.2.1.1 Formation de l'autophagosome

L'autophagosome est une structure établie à partir d'une invagination de la membrane, appelé pré-autophagosome, qui s'allonge et fusionne avec d'autres membranes. Il existe différentes sources de membranes pour l'initiation de la formation de l'autophagosome. Ils peuvent être générés à partir de molécules intra-cellulaires préexistantes ou peuvent provenir d'autres structures membranaires, comme le réticulum endoplasmique (Axe et al., 2008; Hayashi-Nishino et al., 2009; Yla-Anttila et al., 2009).

Les mitochondries peuvent également être une source de membranes pour l'autophagosome pendant une mise à jeûn (Hailey et al., 2010). La membrane plasmique contribue également au précurseur de l'autophagosome (Ravikumar et al., 2002).

La formation de nouveaux autophagosomes nécessite l'activité de la PI3kinase (phosphatidylinositol-3-kinase classe III), Vsp34. Phosphatidyl inositol 3 phosphate (PI-3-P), le produit de l'activité de Vsp34, joue un rôle essentiel dans les stades précoces de

l'autophagie (Axe et al., 2008). ATG8 se lie à PI3P, et est recruté à la membrane de l'autophagosome pendant l'induction de l'autophagie (Proikas-Cezanne et al., 2007). Une petite GTPase, Rab5, une protéine d'endocytose, interagit avec Vps34 et l'active (Christoforidis et al., 1999; Sartor, 2006). Vps34 fait partie du complexe macromoléculaire PI3K-complexe, composé de Beclin 1 / ATG6, ATG14 / Barkor et p150 / Vps15 (Itakura et al., 2008; Kihara et al., 2001; Sun et al., 2008). L'activité de Vps34 est initiée par son interaction avec Beclin 1 (Furuya et al., 2005). Les partenaires de Beclin 1 qui induisent l'autophagie sont Ambra1 (Fimia et al., 2007), UVRAG (Liang et al., 2006), et bif-1 (Takahashi et al., 2007). La liaison de Beclin 1 avec les protéines anti-apoptotic Bcl2 ou Bcl-xl inhibe l'autophagie (Pattingre et al., 2005). De plus, le récepteur inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃R) qui se lie à Bcl-2, peut également interagir avec Beclin 1. Un autre composant du complexe IP₃R, NAF-1 (nutrient-deprivation autophagy factor-1), agit au niveau du réticulum endoplasmique, avec Bcl-2 et stabilise l'interaction Bcl-2-Beclin 1 (Chang et al., 2010). L'activation de JNK1 (c-Jun NH₂-terminal kinase-1) pendant une mise à jeûn conduit à la phosphorylation de Bcl-2 et Bcl-X_L qui se détache de Beclin 1 ce qui induit la formation de l'autophagosome (Wei et al., 2008a).

FIP200-ULK1/Atg1 est un complexe macromoléculaire impliqué dans l'étape d'initiation de l'autophagie. Atg13 se lie à ULK1 ou 2 et sert de médiateur pour leur interaction avec FIP200. En condition de mise à jeûn, Atg13 et ULK1/2 sont déphosphorylés, activant ULK1/2, qui phosphoryle FIP200 pour induire la formation de l'autophagosome (Chan et al., 2007; Chang and Neufeld, 2009; Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009a; Jung et al., 2009).

4.4.2.1.2 L'élongation

Atg9 est une protéine transmembranaire qui circule entre le réseau trans-Golgi et les endosomes, transportant ainsi des membranes pour l'expansion du phagophore (Young et al., 2006). Deux réactions de type ubiquitine-like sont impliquées dans l'élongation des structures pré-autophagosomales. Dans la première réaction, la protéine Atg12 est destinée à lier Atg5 (Mizushima et al., 1998). Atg12 est d'abord activé par Atg7 (E1 ubiquitin activating enzyme-like) puis transféré à Atg10 (E2 ubiquitin conjugating enzyme-like). Atg12 est finalement lié à un résidu lysine (K130) d'Atg5 par la partie terminal COOH de sa glycine (Mizushima et al., 1998). Atg12-Atg5 forme alors un conjugué avec Atg16L1 (Atg12-Atg5.Atg16L), résultant en un complexe tétramérique de Atg12-Atg5.Atg16L lié via le domaine coiled-coil de Atg16L (Mizushima et al., 2003). Ce complexe est essentiel pour l'élongation de la membrane du pré-autophagosome, mais se dissocie de l'autophagosome entièrement formé. La deuxième réaction ubiquitine-like implique la protéine LC3 (protein microtubule-associated protein 1 light chain 3). LC3 est synthétisé sous forme d'un précurseur et est clivé dans sa partie COOH terminal par la protéase Atg4B (Hemelaar et al., 2003; Tanida et al., 2004a), résultant en un isoforme cytosolique LC3-I. LC3-I est conjugué à la phosphatidylethanolamine (PE) dans une réaction impliquant Atg7 (E1-like) et Atg3 (E2-like) pour former LC3-II (Kabeya et al., 2000; Tanida et al., 2004b). Ce dernier est adressé à la membrane en cours d'élongation et, contrairement au complexe Atg12-Atg5.Atg16L, reste sur l'autophagosome jusqu'à la fusion avec un lysosome, après quoi LC3-II sur la face

cytosolique de l'autolysosome peut délipidé par Atg4 et recyclé (Tanida et al., 2004a). LC3-II est également trouvé sur la surface interne de l'autophagosome et sera dégradé dans l'autolysosome. Son association spécifique avec l'autophagosome, fait de LC3-II un excellent marqueur pour étudier l'autophagie (Klionsky et al., 2012). Il existe une communication entre les deux systèmes ubiquitine-like c'est-à-dire que le complexe Atg12-Atg5-Atg16L peut fonctionner comme une protéine E3 ubiquitine ligase-like pour faciliter la conjugaison de LC3-I à la PE (Hanada et al., 2007). Atg10 interagit également avec LC3 pour faciliter sa conjugaison avec PE (Nemoto et al., 2003). Une perte d'Atg3 ou une mutation perte de fonction de Atg4B diminue la fermeture de la membrane (Fujita et al., 2008; Sou et al., 2008). Ces mécanismes sont schématisés figure 38.

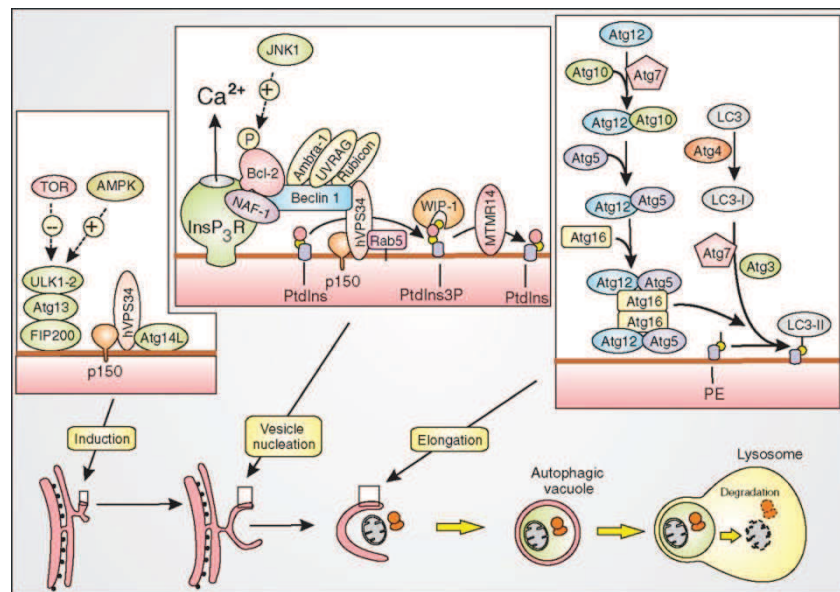


Figure 38. Mécanisme de l'autophagie. D'après (Berridge, 2012).

4.4.2.1.3 La maturation et la fusion

L'autophagosome se déplace de manière bidirectionnelle le long des microtubules avec une préférence pour le centre organisateur des microtubules (MTOC), où il y a un enrichissement de lysosomes. Ce transport nécessite la fonction des protéines motrices de dynéine (Kimura et al., 2008; Ravikumar et al., 2005; Webb et al., 2004; Williams et al., 2008). Une dépolymérisation des microtubules ou une inhibition du transport dépendant de la dynéine entraîne une inhibition de l'autophagie (Kochl et al., 2006; Webb et al., 2004). L'autophagosome fusionne avec l'endosome puis le lysosome. L'étape de fusion implique des protéines comme ESCRT, SNAREs, Rab7 et les protéines Vps de classe C (Atlashkin et al., 2003; Filimonenko et al., 2007; Jager et al., 2004; Lee et al., 2007; Rusten et al., 2007). UVRAG, une protéine interagissant avec Beclin 1, est impliquée dans l'étape de maturation en recrutant la machinerie de fusion sur l'autophagosome. Cette fonction est indépendante de Beclin 2. UVRAG active Rab7 en recrutant les protéines Vps de classe C, ce qui entraîne la fusion avec l'endosome tardif et le lysosome (Liang et al., 2008). Rubicon, une protéine qui interagit avec Beclin 1, fait partie d'un complexe contenant hVps34, hVps15, et UVRAG qui

supprime la maturation de l'autophagosome (Matsunaga et al., 2009; Zhong et al., 2009). L'acidification lysosomale est également nécessaire au bon fonctionnement de la fusion (Yamamoto et al., 1998).

4.4.2.2 Activation de l'autophagie en condition de mise à jeun.

Quand la cellule manque de nutriments essentiels, l'autophagie est activée pour fournir les composants manquants. Dans le foie, l'autophagie est déclenchée après une mise à jeun pour produire des acides aminés qui, après conversion en glucose, seront utilisés pour l'énergie nécessaire au cerveau et aux érythrocytes. Il en est de même dans le tissu musculaire, mais de façon moindre (Kuma et al., 2004; Mizushima et al., 2004).

4.4.2.2.1 Sirtuin et déacétylation des protéines.

Les sirtuins (Sirt) sont des protéines déacétylases agissant sur les histones et des cibles non-histones (Haigis and Sinclair, 2010; Michan and Sinclair, 2007). Il existe 7 paralogues dans le génome humain (Sirt1-7). La sirtuine la plus étudiée est la Sirt1 qui a un large répertoire de cibles non histones, incluant des facteurs de transcription et des composants de voies de signalisation impliqués dans le contrôle de la survie/mort cellulaire et de la dépense énergétique. Il a été montré qu'il existe une corrélation entre l'autophagie et les niveaux de Sirt1 (Cui et al., 2006; Zeng et al., 2012). L'induction de l'autophagie nécessite des processus activant Sirt1 ou des voies de signalisations modulées par l'activité de Sirt1 (True and Matthias, 2012). L'activité de Sirt1 peut influencer l'autophagie en agissant directement sur les composants de la machinerie autophagique. De plus, *in vitro*, Sirt1 peut déacétyler Atg5, Atg7, et LC3 (Lee et al., 2008). Les souris mutantes pour Sirt1 présentent un phénotype ressemblant aux souris Atg5 mutantes (Nezis and Stenmark, 2012). Sirt1 peut promouvoir l'expression de composants de la machinerie autophagique en désacétylant des facteurs de transcription qui vont activer des gènes de l'autophagie (Daitoku et al., 2011; Huang and Tindall, 2007). De plus Sirt1 peut désacétyler FoxO3 ce qui va entraîner une augmentation de l'expression du gène pro autophagique Bnip3 et d'autres gènes comme ULK2, Beclin1, VPS34, Atg12, Atg4B et LC3 (Kroemer et al., 2010). Sirt1 bloque la translocation nucléaire de p53 et donc réprime l'autophagie (Han et al., 2008). Sirt1 peut également inhiber la transactivation de RelA/p65 dans la signalisation NF- κ B (Yeung et al., 2004) ce qui peut moduler l'autophagie (Comb et al., 2011; Criollo et al., 2010b; Liu et al., 2012).

4.4.2.2.2 Voie de signalisation mTOR.

La voie de signalisation mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est la plus étudiée dans la régulation de l'autophagie chez les mammifères. mTOR régule diverses fonctions cellulaires comme l'initiation de la traduction, la croissance et la prolifération cellulaire, la biogénèse des ribosomes, la transcription, la réorganisation du cytosquelette (Sato-Kusubata et al., 2000). mTOR est l'orthologue de TOR chez la levure, connu pour réguler l'autophagie (Levine and Klionsky, 2004). Deux complexes sont impliqués dans cette voie, mTORC1, régulant l'autophagie, et mTORC2 qui ne régule pas directement l'autophagie (Guertin and Sabatini, 2009; Yang and Guan, 2007). Différents signaux, comme les facteurs de croissances, les acides aminés, le glucose, le statut énergétique et différentes formes de stress régulent la

signalisation via mTORC1 (Sarbasov et al., 2005). L'activité de mTORC1 peut être inhibée par la rapamycine, un inducteur de l'autophagie (Boland et al., 2008; Kim et al., 2002; Noda and Ohsumi, 1998; Ravikumar et al., 2002; Ravikumar et al., 2004; Rubinsztein et al., 2007). L'inhibition de mTORC1 et l'induction de l'autophagie par la rapamycine est associée à une diminution de la phosphorylation de S6K1 (ribosomal protein S6 kinase-1 appelée aussi p70S6K) et de la protéine de liaison du facteur d'initiation de la traduction 4EBP-1 sur la Thr389/Thr421/Ser424 et Thr37/Thr46, respectivement (Klionsky and Emr, 2000; Sarbasov et al., 2005; Schmelzle and Hall, 2000). Dans les corps gras de drosophile, TOR est inactivé pendant l'autophagie induite par une mise à jeun, 70S6K doit être activé pendant un moment pour permettre une autophagie maximale. Cela se fait probablement en inhibant la voie PI3K par une boucle de rétrocontrôle négatif impliquant la dérégulation du substrat du récepteur de l'insuline (IRS) (Scott et al., 2004). De plus, l'activation de p70S6K semble nécessaire, mais pas suffisante pour induire l'autophagie (Scott et al., 2004). Il existe une autre petite molécule inhibitrice de mTOR, Torin1, qui induit l'autophagie avec une meilleure efficacité que la Rapamycine. Bien que Torin1 inhibe mTORC1 et 2 directement, son effet sur l'autophagie est mTORC2 indépendant, mais mTORC1 dépendant, dû à la suppression de la fonction de résistance à la Rapamycine de mTORC1, qui est nécessaire à l'inhibition de l'autophagie (Thoreen et al., 2009).

D'autres conditions, comme la privation en nutriments, inhibe le complexe mTORC1 et induit l'autophagie (Kim et al., 2002; Klionsky and Emr, 2000; Meijer, 2008). L'autre complexe mTOR, mTORC2, qui phosphoryle (Ser-473) et active Akt, est connu pour être rapamycine insensible. Cependant, des études récentes ont montré qu'un traitement prolongé à la rapamycine inhibe l'activité de mTORC2 et la voie de signalisation d'Akt dans certains types cellulaires (Sarbasov et al., 2006; Zeng et al., 2007).

La plupart des mécanismes moléculaires liant la voie de signalisation TOR à l'autophagie a été étudié chez la levure où la kinase Atg1 et le complexe atg1-Atg13-Atg17 agissent en aval de la signalisation TOR, en régulant la formation de l'autophagosome (Kamada et al., 2000; Xie and Klionsky, 2007). Atg13 se lie à ULK1 ou 2 pour permettre son interaction avec FIP200, et former un complexe stable ULK1/2-Atg13-FIP200 qui envoie des signaux à la machinerie autophagique en aval de mTOR (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009a; Jung et al., 2009). En condition riche en nutriments, mTORC1 inhibe l'autophagie par une interaction directe avec ce complexe, et inhibe de façon phosphorylation dépendante l'activité kinase de Atg13 et Ulk1. Après mise à jeun ou traitement à la rapamycine, mTOR se dissocie du complexe résultant en une inhibition de la phosphorylation médié par mTOR de Atg13 et ULK1. Ceci conduit à l'activation par déphosphorylation de ULK1/2, Atg13 et FIP200 qui permet l'autophagie (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009a; Jung et al., 2009).

4.4.2.2.3 PI3K

Une cascade de signalisation majeure contrôlant mTORC1 est la voie de signalisation PI3K (Klionsky and Emr, 2000). PI3K activé, convertit PIP_2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP_3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate), qui à son tour recrute PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) et AKT/PKB, à la membrane plasmique (Cantley,

2002). AKT est phosphorylé par mTORC1 et PDK1. AKT module l'autophagie régulée par la voie PI3K (Datta et al., 1997).

Les différentes classes de PI3K ont différents effets sur l'autophagie (Meijer and Codogno, 2006). Une augmentation de PIP₃, inhibe l'autophagie en induisant l'activation d'AKT (Petiot et al., 2000), alors que l'hyperactivité de la phosphoinositide phosphatase PTEN, un suppresseur de tumeur, stimule l'autophagie en inhibant la voie PI3K (Arico et al., 2001). L'augmentation des niveaux des produits de PI3K de classe III, PI-3-P, stimule l'autophagie (Petiot et al., 2000).

4.4.2.2.4 AMPK

mTORC1 peut être un capteur de changement dans le statut énergétique de la cellule via AMPK (Meijer and Codogno, 2006). AMPK phosphoryle directement TSC2, qui permet d'autres phosphorylations de TSC2 par la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) pour inhiber la voie de signalisation mTOR (Inoki et al., 2006). L'inhibition de GSK3- β supprime l'autophagie en activant mTOR (Sarkar et al., 2008). Chez la levure l'activation d'AMPK inhibe TOR et stimule l'autophagie. Chez les mammifère, l'activateur d'AMPK, AICAR, inhibe l'autophagie mais cela n'est probablement pas dû à un effet direct sur AMPK (Meijer and Codogno, 2007). LKB1 et la protéine kinase β Ca²⁺/Calmoduline dépendante (CaMKK β) joue un rôle dans la phosphorylation et l'activation d'AMPK. De plus, AMPK peut être activé par d'autres kinases en amont, mais la signification physiologique n'est pas très claire.

4.4.2.2.5 Autres kinases impliquées dans l'autophagie induite par la mise à jeun.

La voie de signalisation MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase / extra cellular regulated kinase), qui est souvent activée dans les cancers, régule l'autophagie. Les carcinogènes activent la voie MAPK/ERK et entraînent une diminution de l'autophagie (Corcelle et al., 2006). Cependant l'autophagie induite par une mise à jeun active la voie de signalisation ERK1/2 MAPK et l'inhibition de cette voie de signalisation par un inhibiteur supprime l'induction de l'autophagie par une mise à jeun dans la lignée cellulaire HT-29 du cancer du colon humain (Ogier-Denis et al., 2000). Une activation continue de MEK/ERK entraîne un désassemblage complet de mTORC1 et mTORC2, améliorant fortement l'activité de Beclin 1 et entraînant une cytodestruction, alors qu'une faible amélioration de l'activité de Beclin 1, entraînant une cytoprotection est médiée par une activation transitoire de MEK/ERK (Wang et al., 2009a).

Une protéine hétérotrimérique G $_{\alpha 13}$ régule l'autophagie dans la lignée cellulaire HT-29. L'autophagie est minimale quand G $_{\alpha 13}$ est lié à GTP et elle est stimulée quand G $_{\alpha 13}$ est lié à GDP (Ogier-Denis et al., 1996). De même, G α -interacting protein (GAIP), qui est un régulateur de la signalisation protéine G (RGS) et active l'hydrolyse de GTP par la protéine G $_{\alpha 13}$, augmente l'autophagie (Ogier-Denis et al., 1997). L'activation de ERK1/2 stimule l'autophagie en phosphorylant GAIP qui stimule son activité GTPase envers la protéine G $_{\alpha 13}$ lié à GTP. Cette phosphorylation de GAIP est sensible aux acides aminés, car l'inhibition de l'autophagie par les acides aminés corrèle avec l'inhibition des MAP kinases ERK1/2 et un faible niveau de phosphorylation de GAIP (Ogier-Denis et al., 2000). Les acides aminés

interfèrent avec l'autophagie dépendante de ERK1/2 en inhibant l'activation de la kinase Raf-1 (Pattingre et al., 2003).

4.4.2.3 *Spermidine, autophagie et longévité.*

Le vieillissement est un mécanisme complexe, qui avec une accumulation de molécules endommagées, d'organelles, de cellules, de tissus et d'organes entraîne un déclin progressif des fonctions et l'organisme devient plus sensible aux maladies et éventuellement meure. L'autophagie est un processus de recyclage des protéines endommagées et le recyclage des composants cellulaires.

L'hypothèse que l'autophagie est impliquée dans le ralentissement du vieillissement et l'augmentation de la durée de vie est soutenue par trois constats : (1) l'abondance des protéines liées à l'autophagie et l'activité autophagique diminuent avec l'âge. Une diminution de l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes, et d'autres formes d'endocytose a lieu dans la plupart des tissus des organismes vieillissants (Cuervo and Dice, 2000). (2) Un criblage génétique de gènes impliqués dans la régulation de la durée de vie chronologique dans la levure a révélé qu'un certain nombre de mutants défectueux pour l'autophagie ont une durée de vie plus courte (Matecic et al., 2010). (3) Chez des organismes où la durée de vie est augmentée par des manipulations génétiques ou pharmacologiques, l'autophagie est nécessaire.

Donc l'autophagie doit jouer un rôle important dans le retardement du vieillissement et l'augmentation de la durée de vie.

La diminution du niveau des principales PA (putrescine et spermidine) est observée dans différents organes de mammifères au cours du vieillissement (Scalabrino and Ferioli, 1984). Il a été montré que la spermidine retarde le vieillissement et augmente la longévité chez les levures, les mouches et les vers. Un régime enrichi en PA (putrescine, spermine et spermidine) augmente également la durée de vie chez les souris (Soda et al., 2009).

Un traitement à la spermidine induit l'autophagie dans les systèmes modèles comme la levure, la mouche, le nématode et les mammifères. La diminution de PA diminue la durée de vie de la levure et augmente la nécrose. L'augmentation de la durée de vie médiée par la spermidine est abolie chez la levure, la mouche et le ver, si l'autophagie est bloquée en mutant des gènes essentiels à l'autophagie comme ATG7 ou BCN1. Ceci montre que la spermidine ralentit le vieillissement et augmente la durée de vie de manière dépendante de l'autophagie (Eisenberg et al., 2009b).

La spermidine promeut l'autophagie puis induit une augmentation de la durée de vie par une autre voie de signalisation que celle de la sirtuine 1. La spermidine inhibe l'histone acétylase. Ceci un rôle essentiel de l'hypoacétylation des protéines dans le contrôle de l'autophagie et dans la régulation de la longévité.

4.4.2.4 *Autophagie et muscle squelettique.*

L'autophagie et le muscle squelettique sont également étroitement liés. L'autophagie peut être régulée par les mécanismes d'adhésion cellulaire. Les protéines d'adhésion activent différentes voies de signalisation affectant l'autophagie. Quand le complexe dystrophine-glycoprotéine se lie à la laminine, un composant intracellulaire du complexe appelé

synthrophine se lie et active le complexe Rac1, entraînant l'activation de JNK, une protéine qui régule positivement ou négativement l'autophagie (figure 39) (Wei et al., 2008a). L'ablation de JNK entraîne l'activation de FoxO entraînant une augmentation de l'autophagie et des protéines BNIP3 et BNIP3L. JKN active également le facteur de transcription c-jun, qui lorsqu'il est surexprimé inhibe l'autophagie en condition de mise à jeun (Yogev et al., 2010). JKN peut phosphoryler Bcl-2 pour libérer Beclin 1 et entraîner l'autophagie (Wei et al., 2008b). Les intégrines peuvent induire l'autophagie via l'activation de p38 MAPK. Les intégrines peuvent stimuler Erk1/2 qui active l'autophagie via l'activation de JNK (Riol-Blanco et al., 2005). IKK α/β régule l'expression des gènes autophagiques en activant NF- κ B qui régule de manière positive ou négative l'autophagie. IKK α/β peut également activer l'autophagie de manière indépendante de NF- κ B (Salminen et al., 2012). Les cellules exprimant une sous unité active du complexe IKK présentent une augmentation de l'autophagie avec une augmentation du niveau d'AMPK et JNK phosphorylés (Criollo et al., 2010a).

La voie PI3/Akt supprime l'autophagie (Chen and Klionsky, 2011; Wu et al., 2009). Akt active le complexe TORC1 qui phosphoryle et inactive ULK1. Akt phosphoryle FoxO3a empêchant l'activation de l'autophagie (Mammucari et al., 2008). Les intégrines peuvent activer la voie PI3K/Akt (Miranti and Brugge, 2002) rendant possible la suppression de l'autophagie par les intégrines.

AMPK active l'autophagie en inhibant TORC1 et en activant ULK1 via une phosphorylation directe (Kim et al., 2011). Quand les niveaux d'ATP sont bas, LKB1 colocalise avec E-cadhérine et active AMPK, ce qui donne un mécanisme potentiel d'activation de l'autophagie par les mécanismes d'interaction cellule-cellule ce qui corrèle avec l'autophagie induite par le détachement où le contact cellule-cellule est maintenu (Sebbagh et al., 2009).

La régulation de l'autophagie est importante dans le muscle squelettique car elle permet le maintien de la structure des myofibres et de la masse musculaire (Masiero et al., 2009). Toutes ces régulations sont représentées figure 39.

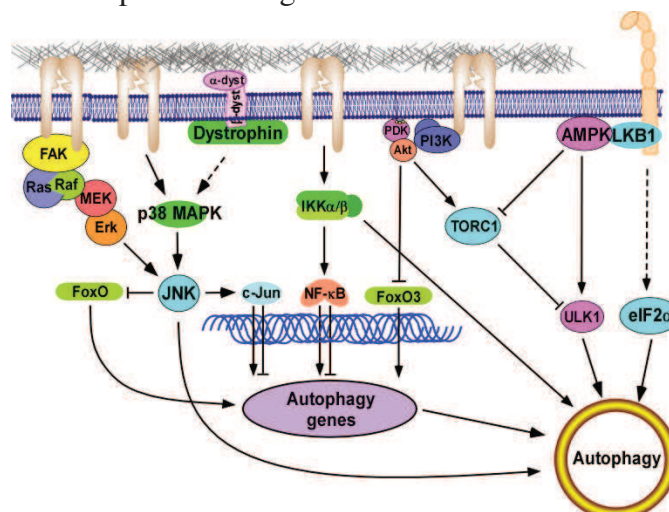


Figure 39. Autophagie induite par l'adhésion cellulaire.

Le domaine intracellulaire des intégrines se lie à FAK qui active la cascade de signalisation Ras/Raf/MEK/Erk. Les intégrines et la dystrophine peuvent activer la p38 MAPK. Erk et p38 phosphorylent JNK et induisent l'autophagie. JNK à son tour, peut inhiber l'autophagie en supprimant FoxO ou promouvoir l'autophagie en activant c-jun, qui peut réguler l'autophagie de manière

positive ou négative. Les intégrines peuvent également activer la voie IKK α / β -NF- κ B. IKK α / β peut induire l'autophagie de manière dépendante ou indépendante de NF- κ B ; cependant NF- κ B peut aussi inhiber l'autophagie dans certains cas. Les intégrines activent également PI3K/Akt/TORC1, qui inhibe l'autophagie en phosphorylant et en inhibant FoxO1 et Ulk1. LKB1 se lie aux E-cadhérine et active AMPK. AMPK active ULK1 et inhibe TORC1 entraînant une augmentation de l'autophagie. Certaines évidences montrent que l'adhésion cellule-cellule peut également activer l'inducteur autophagique eIF2 α . D'après <http://dx.doi.org/10.5772/55398> (Nollet, 2013).

4.5 Polyamine et maladies.

4.5.1 Cancer.

Les cellules à forte croissance et les cellules tumorales présentent une forte activité ODC et SAMdc décarboxylase. Comme les PA sont impliqués dans la croissance cellulaire, leur synthèse est une cible pour la thérapie anti-néoplastique (Chen et al., 2004; Davidson et al., 1999; Gugliucci, 2004; Thomas and Thomas, 2003; Wallace and Fraser, 2003). La surexpression d'ODC est souvent associée avec la tumorigénèse (Alhonen et al., 1995).

Dans le cancer du sein, il existe une corrélation positive entre le contenu en PA des tumeurs et la récurrence du cancer. D'autres études ont été menées et, dans la plupart des cas, il y a un lien entre un haut niveau de PA et de mauvais pronostics (Wallace et al., 2003).

Cependant, les traitements à la DFMO ne sont pas efficaces pour inhiber le développement des tumeurs (Gugliucci, 2004). La diminution du niveau de PA par la DFMO est, en partie, compensée par les PA retrouvés dans la nourriture. Les composants qui préviennent le transport des PA sont efficaces pour augmenter l'effet antiprolifératif de la DFMO (Thomas and Thomas, 2003). C'est pourquoi, différents analogues ont été générés pour inhiber la prise de PA (Wallace et al., 2003). Plusieurs composés cytotoxiques sont développés et deux groupes d'analogues de PA sont prometteurs : les oxa-polyamines et la bioxy-naphtalamide. L'oxa-spermine ou l'oxa-spermidine ne montrent pas d'activité biologique. Cependant, leur dérivé sulfoaminé présentent une cytotoxicité contre un panel de cellules tumorales humaines (Kong Thoo Lin et al., 2003).

4.5.2 Infections parasitaires.

Le DFMO est un agent anti-parasitaire efficace, puisqu'il permet de traiter des infections à la *Trypanosoma brucei brucei* (TB) chez les mammifères (Wallace et al., 2003). L'efficacité de DFMO contre TB a plusieurs causes. Une des raisons est la grande divergence de stabilité de l'enzyme ODC du parasite et de l'hôte. L'ODC du parasite est quasiment stable, alors que celle de l'humain a un turn-over rapide. Ceci implique que l'ODC nouvellement synthétisée remplace rapidement l'ODC inactivée par le DFMO chez l'humain mais pas chez le parasite (Heby et al., 2003). Donc le DFMO prévient la synthèse de trypanothione (l'équivalent du glutathion chez le parasite), qui protège la cellule du stress oxydatif (Wallace et al., 2003). Le DFMO est également efficace dans le traitement de maladies, comme la maladie de Chaga, la leishmaniose ou la malaria (Heby et al., 2003; Wallace et al., 2003).

4.5.3 Diabète.

Le glycation joue un rôle important dans les complications du diabète. Une étude *in vitro* a montré que la spermine et la spermidine pouvaient avoir des effets anti-glycation à une concentration physiologique (Gugliucci and Menini, 2003). Ceci suggère un rôle anti-glycation naturelle des polyamines. De plus, l'activation du catabolisme chez des souris SSAT transgéniques entraîne une augmentation du nombre de mitochondrie dans le tissu adipeux blanc, un taux plus élevé du métabolisme basal et une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Pirinen et al., 2007). Ces changements peuvent provenir de l'augmentation d'AMPK et de l'expression de PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α) dans le tissu adipeux blanc. AMPK est un activateur de PGC-1 α (Attie and Kendzierski, 2003), qui est le régulateur principal de la biogénèse mitochondriale et de la dépense énergétique (Canto and Auwerx, 2009). L'activation du catabolisme dans le foie va entraîner une augmentation de PGC-1 α , qui stimule l'expression de CYP7A1 dans le foie, le gène limitant dans la synthèse de l'acide biliaire et donc l'augmentation de l'élimination du cholestérol (Pirinen et al., 2010). De plus, la surexpression de PGC-1 α dans le foie des souris transgénique sur exprimant SSAT est associée à une amélioration de l'homéostasie du glucose (Cerrada-Gimenez et al., 2010). L'augmentation du catabolisme des PA dans le foie et le muscle squelettique améliore l'homéostasie du glucose et du cholestérol (Koponen et al., 2012).

4.6 Récepteur des androgènes et polyamines

L'expression d'ODC1 est régulée par l'âge et le sexe, ce qui reflète les niveaux de testostérone. Il a été montré que l'expression d'ODC1 est diminuée dans les muscles de souris chez lesquelles le RA est délété ou après castration (MacLean et al., 2008; Notini et al., 2005). Le RA régule l'expression d'ODC1 dans les myoblastes et ODC1 régule la prolifération des myoblastes (Lee et al., 2011).

ODC1 est directement régulé par le RA dans le rein (Goldstone et al., 1982), avec un ARE fonctionnel identifié dans la région promotrice (Croizat et al., 1992).

Il est nécessaire de réaliser des études complémentaires afin de déterminer les voies de signalisation par lesquels les actions des androgènes sont relayées dans le muscle squelettique et si ces actions se font via les PA.

Les PA étant également impliqué dans le développement du diabète de type 2, nous allons nous intéresser au métabolisme du glucose.

5 Rôle du récepteur des androgènes dans le métabolisme du glucose.

Dans les pays développés, l'augmentation du nombre de personnes obèses est de plus en plus marquée. De plus, le diabète de type II et d'autres facteurs de risques cardiovasculaires sont de plus en plus fréquents. Ces désordres métaboliques sont regroupés sous le terme syndrome métabolique.

5.1 Le syndrome métabolique : description et physiopathologie

C'est le professeur Reaven qui, dans les années 1980, propose le concept de syndrome métabolique (Reaven, 1988). Il décrit le regroupement chez un même individu de différentes anomalies métaboliques et cardiovasculaires, comme la résistance à l'insuline, l'obésité abdominale, l'hypertension, la dyslipidémie et l'hyperglycémie. La résistance à l'insuline et l'obésité abdominale sont considérées comme les principaux facteurs responsables du syndrome métabolique. Néanmoins d'autres facteurs y contribuent (inflammation et dysfonctionnements endothéliaux).

5.1.1 Physiopathologie de la résistance à l'insuline.

L'insuline est le régulateur majeur des niveaux de glucose sanguin. En effet, l'insuline stimule la captation du glucose par le muscle et le tissu adipeux, et inhibe la production de glucose hépatique. L'insuline stimule la lipogénèse, la synthèse de glycogène et de protéines dans le muscle, le foie et le tissu adipeux. Elle inhibe la glycogénolyse, la lipolyse et le catabolisme protéique. La résistance à l'insuline se définit comme une insuffisance de la réponse à cette hormone des organes cibles et conduit à la production compensatoire d'insuline par le pancréas, ce qui entraîne une hyperinsulinémie. Les facteurs contribuant au développement de la résistance à l'insuline sont le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) et les acides gras libres (AGLs).

5.1.1.1 Rôle de TNF α et AGLs dans le développement de la résistance à l'insuline

TNF α est une cytokine inflammatoire produite en réponse à un stimulus inflammatoire par plusieurs types cellulaires et notamment les macrophages. TNF α a des effets négatifs sur la sensibilité à l'insuline et le métabolisme du glucose. En interférant avec la cascade de signalisation de l'insuline, il exerce un effet inhibiteur sur la sensibilité à l'insuline (Hotamisligil et al., 1994; Hotamisligil et al., 1996).

Les AGLs participent au développement d'une résistance à l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux. Dans le muscle squelettique, c'est l'augmentation des acides gras qui interfère avec la cascade de signalisation insulinaire et induit la résistance à l'insuline (Boden et al., 1994; Savage et al., 2005; Shulman, 2000). Dans les adipocytes, la captation de glucose est réduite par les AGLs et les effets inhibiteurs de l'insuline sur la lipolyse sont supprimés ce qui renforce la production d'AGLs (Boden and Shulman, 2002).

5.1.1.2 Obésité et résistance à l'insuline.

La résistance à l'insuline et l'obésité sont fortement associés. En cas d'obésité, il y a une augmentation de la libération d'AGs par le tissu adipeux, ce qui va induire une résistance à l'insuline (Wassink et al., 2007).

Lorsque la production de cytokines inflammatoires (TNF α , leptine, interleukine-6) et anti-inflammatoire (adiponectine) par les adipocytes est déséquilibrée, cela conduit à un état inflammatoire et à une diminution de la sensibilité à l'insuline des organes cibles (Boden et al., 1994; Greenberg and McDaniel, 2002).

5.1.2 Conséquences métaboliques de la résistance à l'insuline.

5.1.2.1 Hyperglycémie.

La résistance à l'insuline va entraîner une augmentation de la production d'insuline par le pancréas afin de maintenir des niveaux normaux de glucose sanguin. Si cette compensation n'est pas suffisante, les niveaux de glucose augmentent ce qui conduit à une hyperglycémie (Reaven, 2005).

5.1.2.2 Hypertension

L'augmentation de la pression artérielle induite par l'insulino-résistance et l'obésité s'explique par plusieurs mécanismes agissant en synergie. Une stimulation du système nerveux sympathique serait à l'origine d'une vasoconstriction, une altération de la fonction endothéliale et une réabsorption accrue du sodium par le rein (Wassink et al., 2007).

5.1.2.3 Dyslipidémie

Le diabète de type II et le syndrome métabolique sont caractérisés par une très grande fréquence des anomalies lipidiques à la fois quantitatives et qualitatives. Les anomalies quantitatives sont l'hypertriglycémie et la diminution du HDL-cholestérol. Les qualitatives comprennent des VLDL de grandes tailles, un enrichissement des LDL et HDL en triglycérides et une oxydation des LDL. Ces anomalies sont athérogènes (Verges, 2005).

Les facteurs qui contribuent au développement du syndrome métabolique sont résumés sur la figure 40.

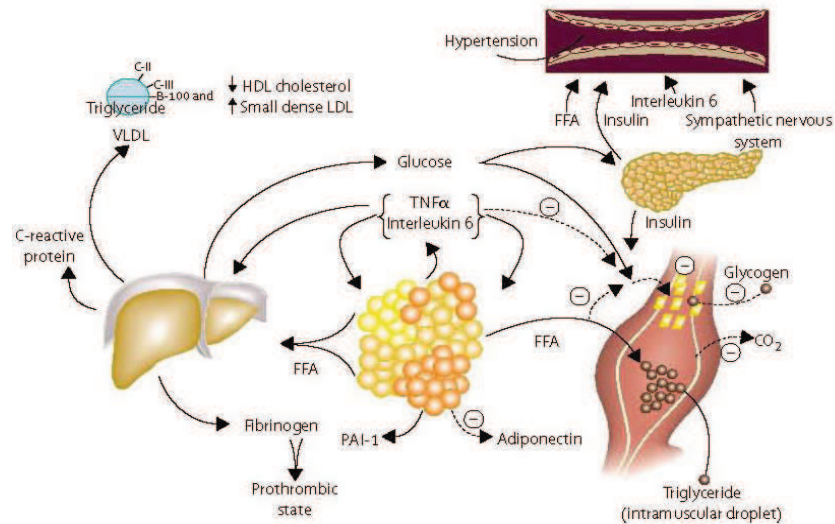


Figure 40. Physiopathologie du syndrome métabolique.

Surproduction des AGLs et production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL-6) par le tissu adipeux. Les AGLs sont responsables d'une augmentation de la production de glucose et de triglycérides dans le foie, une augmentation des lipoprotéines (VLDL, HDL, LDL). D'après (Eckel et al., 2005).

5.2 Androgènes et métabolisme du glucose

Les niveaux de testostérone sont plus faibles chez les hommes ayant un syndrome métabolique et un diabète de type 2 (Liu et al., 2013). Des études cliniques sur des patients ayant une déficience en androgènes (syndrome de Klinefelter) et des patients suivant un traitement de déprivation androgénique dans un cas avancé de cancer de la prostate confirment l'association entre les androgènes et les niveaux de glucose. Dans une étude japonnaise, les niveaux de testostérone sont plus hauts chez les hommes diabétiques comparés aux contrôles d'âge et d'indice de masse corporelle similaire (Goto et al., 2012).

Les niveaux de testostérone sont également importants pour déterminer les futurs risques de développer un diabète de type 2. Lorsque leur taux de testostérone total est élevé, les hommes présentent moins de risque de développer un diabète de type 2 que les hommes dont le niveau de testostérone est plus faible (Ding et al., 2006).

De nombreuses études incluant la testostérone et la globuline se liant aux hormones sexuelles (SHBG) ont montré que la SHBG est un déterminant plus important pour le diabète de type 2 (Grossmann, 2011; Lakshman et al., 2010). De plus, chez les hommes souffrants de diabète de type 2, la SHBG, mais pas les niveaux de testostérone, est associé à un mauvais contrôle glycémique (Grossmann et al., 2008). Il se peut que SHBG et l'adiposité interagissent en fonction de l'âge et du status d'obésité basal pour contribuer de façon différentielle au développement du syndrome métabolique chez l'homme.

Une étude a montré que dans un groupe de jeunes hommes en bonne santé atteints d'hypogonadisme hypogonadotrophique idiopathique étudié après l'arrêt de la thérapie de remplacement de la testostérone, les niveaux d'insuline après mise à jeun sont augmentés en

absence de changement dans la composition corporelle. Ceci suggère une modulation directe de la sensibilité à l'insuline par les androgènes (Yialamas et al., 2007).

Après une mise à jeun d'une nuit, les niveaux de testostérone sont plus élevés (Sartorius et al., 2012). Une mise à jeun plus longue, entraîne une diminution de la sécrétion de LH et de testostérone chez l'homme avec des effets différents en fonction de l'âge (Aloi et al., 1997; Bergendahl et al., 1998).

Les androgènes sont impliqués dans différents mécanismes au cours de la vie d'une personne et notamment dans la régulation de la masse et de la force musculaire mais exercent également des fonctions métaboliques. Il est nécessaire de réaliser des modèles animaux afin d'étudier spécifiquement le rôle des androgènes via leur récepteur dans muscle squelettique.

6 Système de mutations somatiques ciblées chez la souris.

L'invalidation fonctionnelle de gènes en introduisant une mutation dans la lignée germinale chez les souris a permis des avancées importantes dans la compréhension du rôle des gènes *in vivo*. Des souris chez lesquelles le RA est invalidé dans toutes les cellules ont été générées et il a été montré que la masse et la force musculaire et la résistance à la fatigue sont diminuées (MacLean et al., 2008). Cependant, l'invalidation d'un gène dans l'organisme entier peut entraîner un phénotype complexe qui ne permettra pas de déterminer les effets particuliers dans un tissu donné. En 1981, Austin et collaborateurs mettent en évidence le système de recombinaison Cre-LoxP dans le bactériophage P1, ce qui permet le développement d'une nouvelle technique de mutations somatiques ciblées (Austin et al., 1981). Le système Cre-LoxP consiste en une recombinaison homologue de deux segments d'ADN, les sites LoxP, grâce à la Cre recombinase. Les sites LoxP se composent de deux séquences palindromiques de 13 bp, séparées de 8 bp. La recombinaison entre deux sites loxP insérés dans l'ADN dans des directions opposées entraîne une inversion de la séquence comprise entre les deux sites loxP (séquence floxée). En revanche la recombinaison entre deux sites loxP de même orientation entraîne une excision de la région d'ADN comprise entre les deux sites.

Dans les années 1990, Orban et collaborateurs ont montré que l'expression de la Cre recombinase dans une souris portant des séquences d'ADN floxées induit l'excision de cette séquence (Orban et al., 1992). Puis l'utilisation de promoteurs tissus spécifiques pour l'expression de la Cre recombinase a permis de réaliser le ciblage de gènes de manière sélective dans un tissu donné. L'utilisation du promoteur de l'actine α squelettique humaine permet de cibler les gènes spécifiquement dans le muscle squelettique (Miniou et al., 1999; Schuler et al., 2005). De plus, il est également possible de contrôler dans le temps l'activité de la Cre recombinase. En effet, le laboratoire a généré une lignée de souris chez laquelle l'expression de la Cre Recombinase est inducible. Pour cela le gène Cre a été fusionné avec le cDNA codant pour le LBD du récepteur des œstrogènes humains (hER α) (Metzger et al., 1995). Afin d'éviter que la recombinase Cre ne soit activée par les œstrogènes endogènes, le LBD du hER α est muté, donnant une nouvelle recombinase Cre chimérique (Cre-ER^{T2}), dont l'activité est induite par un ligand de synthèse, le tamoxifène (Feil et al., 1997). Cette technique d'invalidation spacio-temporelle des gènes est un outil puissant pour l'étude de leur fonction *in vivo*.

7 Objectif de la thèse.

Le rôle anabolique sur les androgènes a été mis en évidence en réalisant des traitements androgéniques chez l'homme (Bhasin et al., 2001). Cependant ces études n'apportent pas de réponses concernant les mécanismes d'action des androgènes.

Il est vrai que des traitements androgéniques sont réalisés chez l'homme afin d'éviter la perte de masse et de force musculaire liée à l'âge ou à différente maladie. Mais un traitement prolongé aux androgènes peut entraîner différents effets secondaires et notamment le développement du cancer de la prostate. Afin de mettre en évidence le rôle des androgènes spécifiquement dans le muscle squelettique, il est important d'étudier les mécanismes moléculaires. Des études ont été réalisées sur des animaux dont le récepteur des androgènes est invalidé de manière ubiquitaire. Les effets relayés spécifiquement au niveau du muscle n'ont donc pas pu être déterminés. De plus, le RA étant exprimé dans différents types cellulaires au sein du muscle squelettique (fibroblastes, cellules satellites, myocytes) aucune étude n'a pu mettre en évidence le rôle des androgènes spécifiquement dans chacun de ces types cellulaires.

Une étude des souris AR^{skm-/y} réalisée au laboratoire a permis de mettre en évidence que les androgènes via leur récepteur dans les myofibres contrôlent la force musculaire, indépendamment de la masse dans les muscles des membres (Chambon et al., 2010). Cependant les mécanismes moléculaires sont mal connus. De plus ces résultats suggèrent que le contrôle de la masse des muscles des membres n'est pas contrôlé par les androgènes dans les myofibres.

Ainsi, l'objectif de ma thèse est de mieux comprendre le rôle des androgènes dans les différents types cellulaires dans le contrôle de la masse et de la force musculaire, et de déterminer par quelles voies de signalisation elles sont relayées. Pour répondre à ces questions nous avons générés au laboratoire des modèles murins chez lesquels le RA est sélectivement invalidé (1) dans les myofibres de manière constitutive ou spécifiquement à l'âge adulte et (2) dans les cellules satellites. Il s'agit également de comprendre si le RA joue un rôle dans la régénération musculaire.

De plus, des études chez l'homme suggèrent que les niveaux de testostérone jouent un rôle dans la prédiction du développement du diabète de type II. En revanche, peu d'analyse ont été réalisées afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents. C'est pourquoi, je me suis également intéressée au rôle des androgènes dans les myofibres sur le contrôle du métabolisme glucidique.

MATERIEL ET METHODES

Elevage des souris.

Les souris sont élevées au sein de l'animalerie de l'Institut de Génétique et de Biologie Cellulaire et Moléculaire (IGBMC) ou de l'Institut Clinique de la Souris (ICS) à une température et un taux d'humidité constants, une alternance jour/nuit de 12 h et un accès libre à l'eau et à la nourriture standard pour rongeur (2800 kcal/kg, usine d'alimentation rationnelle). Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale et les tissus sont prélevés, pesés et congelés dans de l'azote liquide. Les tissus sont conservés à -80°C en attendant d'effectuer les analyses biochimiques. Les croisements et le maintien des souris ont été réalisés en suivant les règles de l'institut, sous la supervision du Dr. Metzger Daniel (N° agrément : 67.109). Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique de l'IGBMC.

Génération de cohortes de souris chez lesquelles le RA est invalidé spécifiquement dans les myofibres.

Les souris HSA-Cre/AR^{L2/y} et les souris AR^{L2/y} ont été établies au laboratoire sur un fond génétique C57BL/6. Les groupes de souris HSA-Cre/AR^{L2/y} et les souris AR^{L2/y} ont été obtenus par accouplement d'un mâle HSA-Cre/AR^{L2/y} avec deux femelles AR^{L2/L2} ou d'un mâle AR^{L2/y} avec deux femelles HSA-Cre/AR^{L2/y}.

Les souris HSA-Cre-ER^{T2}/AR^{L2/y} et les souris AR^{L2/y} ont été établies au laboratoire sur un fond génétique C57BL/6. Les groupes de souris HSA-Cre-ER^{T2}/AR^{L2/y} et les souris AR^{L2/y} ont été obtenus par accouplement d'un mâle HSA-Cre-ER^{T2}/AR^{L2/y} avec deux femelles AR^{L2/L2} ou d'un mâle AR^{L2/y} avec deux femelles HSA-Cre-ER^{T2}/AR^{L2/y}. Les souris mâles, âgées de 6-7 semaines, sont injectées par voie intra-péritonéale avec 1 mg/jour de tamoxifène dans 100 µl d'huile pendant 5 jours. Les souris contrôles sont injectées avec de l'huile (véhicule). Les souris Pax-CreER^{T2}/AR^{L2/y} ont été générée en croisant les lignées Pax-CreER^{T2} (Murphy et al., 2011) et AR^{L2/y}. Les souris mâles, âgées de 6-7 semaines, sont injectées au tamoxifène de la même manière que les souris HSA-Cre-ER^{T2}/AR^{L2/y}.

Génotypage.

L'ADN génomique est isolé à partir de biopsies de queue ou de muscle. La digestion des tissus s'effectue pendant une nuit à 55°C dans 100 µl du tampon de lyse (Direct PCR lysis reagent, Viagen Biotech. Inc.), supplémenté de 1 mg/ml de protéinase K (Sigma chimie). Le lendemain, la protéinase K est dénaturée pendant 45 minutes à 85°C au bain marie. L'ADN est amplifié par réaction en chaîne par polymérase (0.3 mM oligonucléotides sens, 0.3 mM oligonucléotides anti-sens, 5 U/ml Taq polymérase, 10 mM dNTP dans du tampon contenant 3 M KCl, 1 M MgCl₂, 2 M Tris pH8.8). Les oligonucléotides utilisés pour déterminer la présence de l'allèle excisé et de la recombinase Cre ou Cre-ER^{T2} sont listés dans le tableau 1. L'ADN est dénaturé pendant 5 minutes à 94°C, puis amplifié sur 30 cycles (dénaturation pendant 15 secondes à 92°C, hybridation pendant 30 secondes à 61°C, élongation pendant 30 secondes à 72°C). Les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % et visualisés par révélation du bromure d'éthidium (0,5 mg/ml) incorporé dans l'ADN.

Cre	5'-TTCCCGCAGAACCTGAAGATGTTTCG-3'
Cre	5'-GGGTGTTATAAGCAATCCCCAGAAATGC-3'
AR	5'-CTGCCTCCGAAGTGTGGTAT-3'
AR	5'-GCCAGAAGCTTCATCTCCAC-3'
ODC1	5'-CATCCAAAGGCCAAAGTTGGA-3'
ODC1	5'-CATGGAAGCTCACACCAATG-3'
AMD	5'-TCATGAAGCCTTCTCACCAAGGGT-3'
AMD	5'-TCGGCTCTCTGGGAAATCCAAAGT-3'
SMOX	5'-TCTGCACAGAGATGCTTCGACAGT-3'
SMOX	5'-TTGAGCCACCTGTGTGTAGGAAT-3'
Myoméline	5'-GTGGCTTCTCGTTTTTCAGC-3'
Myoméline	5'-AGGTGGTCTCCCTGATGTTG-3'
Myotiline	5'-CATCCTGATCATTGGCCTCT-3'
Myotiline	5'-ATGCTGCTGCTGTGTTTCAG-3'
Téléthonine	5'-CTGGTACGGCAGCTGGTATT-3'
Téléthonine	5'-TTGCACGAGGAGGATACACA-3'
Ryr1	5'-GAAGGTTCTGGACAAACACGGG-3'
Ryr1	5'-TCGCTCTTGTGTAGAATTTGCGG-3'
Sarcolipine	5'-TGATTGCACACCAAGGCTT-3'
Sarcolipine	5'-TGTGCCCCTGCTCCTCTTC-3'
SERCA1	5'-CACCACCAACCAGATGTCAG-3'
SERCA1	5'-AGCCAGTGATGGAGAACTCG-3'
IGF1	5'-TGCTCTCAGTTCGTGTG-3'
IGF1	5'-ACATCTCCAGTCTCCTCAG-3'
Myogénine	5'-CCTTAAAGCAGAGAGCATCC-3'
Myogénine	5'-GGAATTCGAGGCATATTATGA-3'
Desmin	5'-ATCCAGACCTTCTCTGCTCTCA-3'
Desmin	5'-TGTCTTTTGGTATGGACTTCAGAAC-3'
Myostatine	5'-GGCCATGATCTTGCTGTAAC-3'
Myostatine	5'-TTGGGTGCGATAATCCAGTC-3'
Pax7	5'-TGGCCAACTGCTGTTGATT-3'
Pax7	5'-TAGGCTTGTCCCGTTTCCAC-3'
MyoD	5'-AGCACTACAGTGGCGACTCA-3'
MyoD	5'-GCTCCACTATGCTGGACAGG-3'
MHCe	5'-TGATATCGCAGAATCGCAAG-3'
MHCe	5'-AGAATTGTCAGGAGCCACGA-3'
GR1	5'-GACTGACAAAATCAGTGACCCTGGG-3'
GR2	5'-GTCAACACATGATCACCTTGACGTC-3'
GAPDH	5'-AGCTCACTGGCATGGCCTTC-3'
GAPDH	5'-ACGCCTGCTTCACCACCTTC-3'
18S	5'-TCGTCTTCGAACTCCGACT-3'
18S	5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour le géotypage et la PCR semi-quantitative

Traitement à la testostérone.

Les souris sont injectées à la testostérone propionate (12mg/kg dans de l'huile et de l'éthanol, Fluka), dihydrotestostérone (10mg/kg dans de l'huile et de l'éthanol, Sigma Aldrich), ou nandrolone décanoate (10mg/kg dans de l'huile, Sigma Aldrich) pendant 3 jours. Les souris sont disséquées 24h après la dernière injection.

Pour les traitements à long terme, la nandrolone décanoate est injectée deux fois par semaines en sous cutanée et les souris sont sacrifiées 24h après la dernière injection.

Les souris contrôles sont injectées avec la solution véhicule appropriée.

Traitement à la dexaméthasone.

La dexaméthasone est resuspendue à 10 mg/ml dans de l'éthanol absolu. Les souris sont injectées par voie intra-péritonéale avec 10 mg/kg de dexaméthasone (31381, Fluka) dans 100 μ L d'huile végétale. Les souris contrôles sont injectées avec de l'huile (véhicule) contenant la même concentration d'éthanol. Les souris reçoivent une injection par jour pendant 2 jours et sont sacrifiées 24 heures après la dernière injection.

Castration.

L'ablation chirurgicale des testicules est réalisée à 10 semaines et les souris sont sacrifiées un mois plus tard.

Surcharge mécanique.

Pour la surcharge mécanique, les souris sont anesthésiées avec du pentobarbital (ip, 50mg/kg poids de souris). Le muscle du plantaris des deux pattes sont surchargés mécaniquement (OVL) pendant 4 semaines en retirant les muscles soléaires et gastrocnémiens comme décrit précédemment (Joanne et al., 2012a).

Cardiotoxine.

Pour la régénération induite à la cardiotoxine (CDTX), les souris sont sacrifiées 1, 3, 6 et 16 jours après une injection de 50 μ l de CDTX (10 μ M ; Sigma-Aldrich) dans le tibialis antérieur.

Mesure de la force.

Un dynamomètre isométrique (BioSeb) est utilisé pour mesurer la force des membres antérieurs et postérieurs. Les souris sont posées sur la grille du dynamomètre et tirées par la queue. Pour chaque animal, trois mesures sont prises pour obtenir une valeur moyenne de leur force en grammes.

Mesure de force sur muscle isolé.

La force isométrique du tibialis antérieur est mesurée in situ en réponse à la stimulation nerveuse comme décrit précédemment (Lahoute et al., 2008), et la masse du muscle est mesurée afin de pouvoir calculer la force maximale spécifique. La résistance à la fatigue est mesurée après des contractions répétées (75Hz pendant 500 ms répétées toutes les secondes pendant 100 secondes), et le temps pour atteindre la moitié de la force initiale est calculé. Toutes les données obtenues sont enregistrées et analysées en utilisant le système *PowerLab/4SP system (AD Instruments)*.

Mesure de la régulation calcique.

Les fibres de l'EDL de souris âgées de 15 semaines sont micro-disséquées, placées en couche unique et mise en présence d'une sonde FURA-2 AM fluorescente. Puis les fibres isolées du muscle sont placées dans une chambre permettant une stimulation électrique afin de mesurer la force isométrique et le calcium cytosolique. La préparation est stimulée de manière à avoir un potentiel d'action unique. La fluorescence du FURA-2 est mesurée pour obtenir la concentration du calcium cytosolique.

Test de tolérance au glucose et de résistance à l'insuline.

Test de tolérance au glucose (IPGTT) :

L'IPGTT est réalisée sur des souris mise à jeun une nuit. Après avoir pris la mesure du niveau de glucose basal dans le sang prélevé dans la veine de la queue (T0), les souris sont injectées intrapéritonéalement avec une solution de 20% de glucose dans une solution saline stérile (0.9% NaCl) à la dose de 2g de glucose / kg de souris. Le sang est collecté dans la veine de la queue 15, 30, 45, 60, 90, 120 et 150 min afin de déterminer le taux de glucose à l'aide d'un glucomètre Accu-Check® Performa.

Test de sensibilité à l'insuline (IPIST) :

6h après avoir mis les souris à jeun, les souris sont injectées intrapéritonéalement avec de l'insuline porcine (0.5U/kg ; Sigma). Le sang est collecté 15, 30, 60 et 90 minutes après l'injection et le sang est analysé comme décrit précédemment.

Analyses histologiques.

Les tissus sont collectés et immédiatement congelés dans de l'isopentane refroidie dans l'azote.

Pour les colorations Hématoxyline/Eosine, des cryosections de 10µm sont colorées avec de l'hématoxyline Harris (VWR International S.A.S), rincées sous l'eau du robinet, décolorées dans de l'alcool acide pendant 2s, colorées avec de l'éosine (VWR International S.A.S), rincées sous l'eau du robinet, déshydratées, éclaircies et montées.

Pour l'étude de la taille des fibres, les sections de muscles sont analysées avec le programme MetaMorph (Molecular Devices).

Pour l'immunohistochimie, les cryosections de 10µm sont hydratées et fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes. Les sections fixées sont alors bloquées avec du serum de chèvre 5% (NGS, VS-1000, Coger Réactifs et Produit de la Recherche) dans du PBS contenant 0.1% Triton-X100 pour 1h à température ambiante et sont incubés une nuit avec l'anticorps AR (AR N20 Santa Cruz, 1/200), dystrophine (Abcam, 1/1000), cavéoline (SC-894 Tébu-bio 1/200). Pour l'anticorps Pax7 (Hybridome Bank), après la fixation au paraformaldéhyde, il y a une étape de fixation au méthanol 10 minutes à -20°C puis un démasquage dans du tampon sodium citrate pH6 à chaud pendant 10 minutes et les sections sont refroidies 30 minutes avant l'étape de blocage.

Microscopie électronique.

Les échantillons de muscle squelettique sont fixé par immersion dans 2.5% glutaraldéhyde et 2.5% paraformaldéhyde dans du tampon cacodylate (0.1M, pH 7.4), rincés dans du tampon cacodylate pendant 30 minutes et conservés à 4°C. La post-fixation est réalisée dans du 1% tétroxyde d'osmium dans du tampon cacodylate 0.1M pendant 1h à 4°C et la déshydratation est réalisée dans un gradient d'alcool (50, 70, 90 et 100%) et de l'oxyde de propylène pendant 30 minutes chacun. Les échantillons sont orientés longitudinalement et inclus dans de l'Epon 812 (Sigma Chimie). Des sections ultrafines sont réalisées à 70nm, contrastés avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb et examiné à 70kV avec un microscope électronique Morgagni 268D. Les images sont prises avec une caméra Mega View III (Soft Imaging System).

Analyse métabolomique.

Les muscles gastrocnémiens de souris âgées de 15 semaines ont été prélevés et congelés à -80°C jusqu'à leur envoi à l'entreprise Biocrates. Les métabolites ont été extraits et quantifiés par l'entreprise Biocrates. Pour extraire les métabolites, les muscles gastrocnémiens ont été traités avec un tampon d'extraction et mis dans un bain à ultrasons glacé pendant 5 minutes. Puis les échantillons sont centrifugés. Le supernatant est utilisé pour les analyses.

Le kit Biocrates (Biocrates) est utilisé pour la quantification des acides aminés, des acylcarnitines, des sphingomyélines, des phosphatidylcholines, des hexoses, et des amines biogéniques. Cette méthode automatique est basée sur PITC (phenylisothiocyanate)-dérivation en présence d'un standard interne suivi par une FIA-MS/MS (acylcarnitines, lipides, et hexose) et LC/MS (acides aminés, amines biogéniques) en utilisant un spectromètre de masse AB SCIEX 4000 QTrap® (AB SCIEX, Darmstadt, Allemagne) avec ionisation par électrospray. La technique expérimentale de mesure métabolomique est décrit en détail par le brevet US 2007/0004044 (Ramsay S.L 2007).

Extraction protéique.

Les muscles sont broyés sur de la glace à l'aide d'un homogénéisateur type « dounce » dans 1 ml de tampon de lyse [50 mM Tris pH 7.5, 1 % nonident P40, 0.5 % deoxycholate de sodium,

0.1 % sodium deoxysulfate, 150 mM NaCl, 5 mM Ethylenediaminetetraacetic acide, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride, 1 mM pyrophosphate, 10 mM β glycerophosphate, 1 mM fluoride de sodium, 1 mM orthovanadate de sodium, et un ensemble d'inhibiteurs de protéases (40 μ g/ml, Roche)]. Les débris cellulaires sont retirés par centrifugation à 20 000g sur une centrifugeuse 5417R (Eppendorf) avec le rotor FA45-30-11 pendant 10 min à 4°C. La concentration protéique est mesurée grâce à un test colorimétrique de type Bradford (Abcam) en utilisant des dilutions d'albumine de sérum bovin (BSA) (MP Biomedical) comme standard. L'absorbance est mesurée à 595 nm au spectrophotomètre (Biotek).

Electrophorèse.

Les extraits protéiques (25 μ g) sont dénaturés pendant 5 minutes à 95°C dans du tampon Laemmli [10 % β -mercaptoethanol, 125 mM Tris HCl (pH 6.8), 4 % sodium deoxysulfate, 20 % glycérol, 0.004 % bleu de bromophénol]. Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante de 6 % à 10 % pendant 1 h à 100 V dans un tampon glycine (2.5 mM Tris base, 19.2 mM de glycine, 0.1 % SDS). Le pageRuler Plus prestained (Fermentas) est utilisé comme marqueur de masse moléculaire. Les protéines sont transférées sur une membrane nitrocellulose 0.45 μ m pour les protéines de poids moléculaires supérieur à 20kDa ou sur membrane de Polyvinylidene Difluoride (PVDF) 0.2 μ m pour les bas poids moléculaires en utilisant un système semi-sec Transblot Turbo (BioRad) comme indiqué par le fournisseur. Pour le blocage des sites d'interaction non spécifiques, les membranes sont incubées pendant 1 h dans du TBST (Tris Buffer Saline and Tween, 2.5 mM Tris pH 7.6, 13.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.01 % Tween X 20) avec 5 % de lait en poudre écrémé (Régilait). Les membranes PVDF sont réactivées au méthanol avant le blocage. Les membranes sont incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TBST avec 5 % BSA. Les anticorps utilisés sont : anti-AR (sc816, Santa Cruz, 1/1000), anti-AKT (4691, Cell signaling, 1/1000), anti-phospho AKT S⁴⁷³ (4060, Cell Signaling, 1/1000), anti-mTOR (2983, Cell signaling, 1/1000), anti-phospho mTOR (5536, Cell Signaling, 1/1000), anti-4EBP1 (9644, Cell signaling, 1/1000), anti-AMPK (2532, Cell Signaling, 1/1000), anti-LC3 XP (3868, Cell Signaling, 1/1000), anti-pULK (6888S, Ozyme, 1/1000), anti-Beclin1 (3493P, Ozyme, 1/1000), anti-tubuline (IGBMC, 1/5000), et anti-GAPDH (MAB374, Millipore, 1/50000). Après lavage, les membranes sont incubées pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (Amersham Biosciences), dilués dans du TBST avec du lait (5 %). Les anticorps utilisés sont : un anticorps anti-lapin (Jackson immuno research, 1/10000) ou un anticorps anti-souris (Jackson immuno research 1/10000). Les membranes sont révélées à l'aide d'un système de détection chimiluminescent (ECL electrogenerated chemiluminescence) (GE Healthcare) en suivant le protocole fourni par le revendeur. La lumière émise est mesurée avec une caméra sensible à la chimiluminescence Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare). La quantification de l'intensité des bandes est effectuée à l'aide du logiciel Image J (Wayne Rasband).

Extraction d'ARNm, synthèse d'ADNc et RT-PCR quantitative.

L'ARN total est isolé en broyant le muscle gastrocnémien dans du TRIzol (Invitrogen) conformément aux instructions des fournisseurs. Deux μg d'ARNm sont retrotranscrits en utilisant l'ADN polymérase contenu dans le kit Superscript II (Invitrogen) ainsi que des hexamères comme amorce conformément aux instructions du fournisseur. Les RT-PCR quantitatives sont effectués par une réaction en chaîne par polymérase en présence de $10\ \mu\text{M}$ d'oligonucléotides spécifiques des gènes d'intérêt (Tableau 3). Le Syber green I master (Roche) est utilisé comme marqueur fluorescent. La fluorescence émise lors des cycles d'amplification est détecté par un Light Cycler 4800 équipé d'une plaque 384 puits (Roche). Les niveaux des transcrits sont normalisés par rapport à un gène référent, la GAPDH.

Analyses statistiques.

Les analyses statistiques sont effectuées via un test ANOVA pour déterminer la significativité des données. Elles sont jugées significativement différentes lorsque la p-valeur du test de Student est inférieure à 0,05. Elle est représentée par une astérisk sur les graphiques.

RÉSULTATS

Partie 1 : Rôle des androgènes dans le contrôle de la masse et de la force musculaire

L'étude de souris chez lesquelles le RA a été spécifiquement invalidé dans les myofibres réalisée au laboratoire a montré que les androgènes, via leur récepteur dans les myofibres, contrôlent la force musculaire. En revanche, la masse musculaire est similaire chez ces souris et les contrôles (Chambon et al., 2010). Un des objectifs de ma thèse est de préciser les mécanismes par lesquels les androgènes contrôlent la masse et la force musculaire.

Les souris HSA-Cre expriment la Cre Recombinase sous le contrôle du promoteur HSA et permettent son expression spécifique dans les myofibres du muscle squelettique (Miniou et al., 1999). Afin d'invalider spécifiquement le RA dans les myofibres, les souris HSA-Cre sont croisées avec des souris $AR^{L2/y}$ chez lesquelles l'exon 1 du gène codant pour le RA est encadré de deux sites loxP (allèle L2). Les descendants HSA-Cre/ $AR^{L2/y}$ possédant le transgène HSA-Cre et un allèle AR^{L2} sont appelées $AR^{skm-/y}$. Chez ces souris, le gène codant pour le RA, dont nous voulons étudier la fonction, est spécifiquement délété dans les myofibres.

Au laboratoire, il a été montré que la masse des muscles des membres est similaire chez les souris $AR^{skm-/y}$ et les souris $AR^{L2/y}$. En revanche, la force musculaire est réduite chez les souris $AR^{skm-/y}$. Cependant, comme la taille et le nombre de fibres peuvent varier sans influencer la masse musculaire, nous en avons fait l'étude.

Pour délimiter les fibres sur des coupes transversales du muscle gastrocnémien, nous avons réalisé un marquage immunohistochimique avec un anticorps dirigé contre la dystrophine, une protéine localisée sous la membrane cellulaire de toutes les fibres musculaires. Ce type de marquage est classiquement utilisé pour délimiter le contour des fibres et les rendre ainsi quantifiables.

1 Mise en évidence d'anomalies musculaires de la lignée transgénique HSA-Cre.

Nous avons réalisé un immunomarquage sur le muscle gastrocnémien avec un anticorps dirigé contre la dystrophine. Alors que dans nos conditions expérimentales toutes les fibres sont positives pour la dystrophine chez les souris contrôles $AR^{L2/y}$, nous avons constaté que les souris $AR^{skm-/y}$ présentent des fibres négatives pour la dystrophine (figure 41A). Afin de déterminer si ce défaut d'expression de la dystrophine est bien lié à l'absence du RA dans les myofibres, le marquage a été réalisé sur les souris possédant le transgène HSA-Cre uniquement. De façon inattendue, celles-ci présentent un nombre de fibres dystrophine positives réduit (figure 41A). Nous avons mis en évidence une diminution du nombre de fibres positives pour la dystrophine d'environ 25% chez les souris HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$ par rapport aux souris $AR^{L2/y}$ (figure 41B).

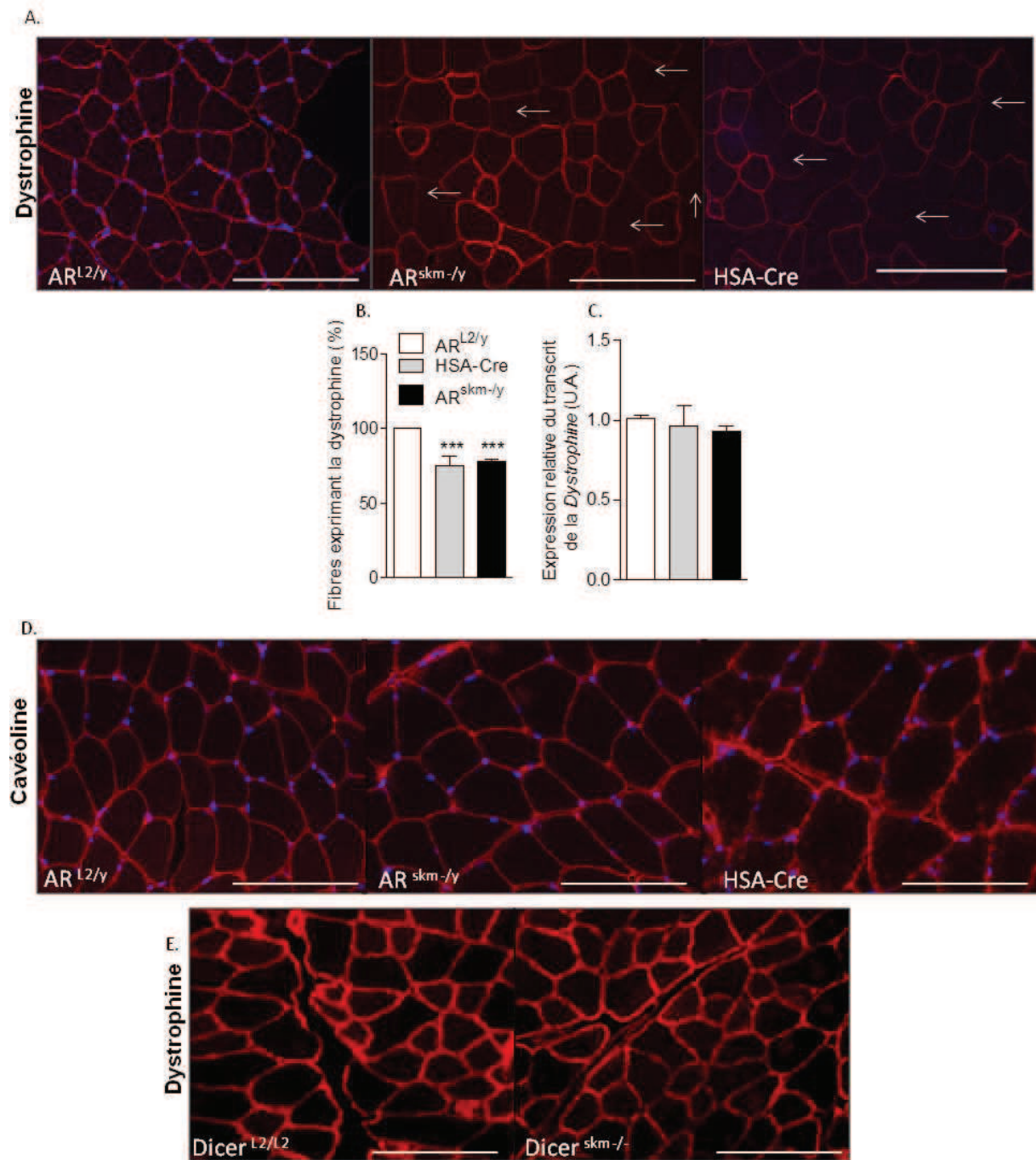


Figure 41. Expression de la dystrophine et de la cavéoline chez les souris AR^{skm-/y}, HSA-Cre et AR^{L2/y}.

- Immunohistochimie réalisée avec un anticorps dirigé contre la dystrophine sur une coupe transversale de muscle gastrocnémien de souris AR^{L2/y}, AR^{skm-/y} et HSA-Cre âgées de 15 semaines. Dystrophine en rouge, Dapi en bleu. Les flèches représentent les fibres non marquées par la dystrophine.
- Quantification des fibres exprimant la dystrophine par rapport aux fibres totales des souris AR^{L2/y} (n=7), AR^{skm-/y} (n=6) et HSA-Cre (n=5).
- Niveau d'expression relatif du transcrit de la dystrophine chez des souris AR^{L2/y} (n=8), AR^{skm-/y} (n=11) et HSA-Cre (n=2). U.A, Unité Arbitraire (U.A).

- D. Immunohistochimie réalisée avec un anticorps dirigé contre la cavéoline sur un muscle gastrocnémien de souris $AR^{L2/y}$, $AR^{skm-/y}$ et HSA-Cre.
Cavéoline en rouge, Dapi en bleu (n=4 par groupe).
- E. Immunohistochimie réalisée avec un anticorps dirigé contre la dystrophine sur un muscle gastrocnémien de souris $Dicer^{L2/L2}$ (n=4) et $Dicer^{skm-/-}$ (n=4), possédant le transgène HSA-Cre, âgées de 15 semaines. Dystrophine en rouge, Dapi en bleu.
- *** $p < 0,001$. Les barres représentent la moyenne $\pm$ l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les barres d'échelle représentent 100 μm .

Afin de déterminer si la perte d'expression de la dystrophine dans certaines fibres résultait d'une altération transcriptionnelle, nous avons quantifié les niveaux de transcrits de la dystrophine chez les souris $AR^{L2/y}$, $AR^{skm-/y}$ et HSA-Cre par RT-PCR semi-quantitative. Les niveaux d'ARNm de la dystrophine entre les souris $AR^{L2/y}$, $AR^{skm-/y}$ et HSA-Cre sont similaires (figure 41C).

Les défauts d'expression de la dystrophine sont liés à des événements traductionnels ou post-traductionnels.

Pour déterminer si l'expression d'autres protéines du costamère est dérégulée chez les souris qui expriment le transgène HSA-Cre, nous avons réalisé des immunomarquages avec un anticorps dirigé contre la cavéoline. Aucune différence d'expression de la cavéoline n'a été observée entre les souris $AR^{L2/y}$, $AR^{skm-/y}$ et HSA-Cre (figure 41D).

Donc l'ensemble du costamère ne semble pas être touché.

Nous avons alors réalisé des marquages avec un anticorps dirigé contre la dystrophine sur d'autres lignées du laboratoire exprimant le transgène HSA-Cre ($Dicer^{skm-/-}$). Nous avons constaté que ces souris ne présentent pas de défauts d'expression de la dystrophine en immunomarquage (figure 1E). De plus, d'autres lignées exprimant le transgène HSA-Cre, disponibles au laboratoire ont été étudiées et ne présentent pas de défauts d'expression de la dystrophine.

L'expression de la dystrophine, protéine majeure du costamère, est diminuée dans la lignée $AR^{skm-/y}$ et cette diminution est liée à la présence du transgène HSA-Cre.

Il semble donc que la lignée $AR^{skm-/y}$, exprimant le transgène HSA-Cre ait dérivé au cours du temps. Cependant, une telle dérivation n'a pas pu être mise en évidence dans une autre lignée exprimant ce transgène.

2 Confirmation du phénotype des souris $AR^{skm-/y}$.

La perte d'expression de la dystrophine a été étudiée dans différents laboratoires et une perte de la force n'a jamais été observée chez les souris mutantes pour la dystrophine à cet âge (Lynch et al., 2001), indiquant que la perte de la force musculaire observée chez les souris $AR^{skm-/y}$ ne provient pas du transgène HSA-Cre.

Afin de comprendre le rôle des androgènes via leur récepteur dans les myofibres et de poursuivre l'étude sur les souris $AR^{skm-/y}$, il a été important de vérifier que certains résultats précédemment obtenus sur cette lignée dans le laboratoire (Chambon et al., 2010) n'étaient pas dû à la présence du transgène HSA-Cre.

2.1 Etude de la force musculaire des souris $AR^{skm-/y}$.

Pour mesurer la force des souris à l'état basal, nous avons soumis des souris HSA-Cre, $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ âgées de 8 à 15 semaines à un test d'agrippement à l'aide d'un dynamomètre isométrique.

Nous avons montré qu'il n'y a pas de différence de la force chez les souris HSA-Cre comparées aux souris $AR^{L2/y}$. Cependant, dès la 8^{ème} semaine, la force des souris $AR^{skm-/y}$ est inférieure de 17% à celle des souris $AR^{L2/y}$ et HSA-Cre (Figure 42A). De plus, en accord avec les résultats publiés, nous avons montré une perte de la force maximale sur tibialis isolé à 17 semaines de 17% chez les souris $AR^{skm-/y}$ comparées aux souris $AR^{L2/y}$ (figure 42B).

Ceci démontre que la diminution de la force observée chez les souris $AR^{skm-/y}$ est bien liée à la perte du RA dans les myofibres et non à la présence du transgène HSA-Cre

Les résultats obtenus précédemment au laboratoire montrent également qu'il n'y a pas de différences de la masse des muscles des membres chez les souris $AR^{skm-/y}$ comparées aux souris contrôles $AR^{L2/y}$, alors qu'une diminution de la masse du muscle bulbocaverneux (BC) lorsque le RA est spécifiquement invalidé dans les myofibres a été observée (Chambon et al., 2010).

Pour vérifier que la masse du BC est bien régulée par les androgènes via leur récepteur dans les myofibres, nous avons pesé les muscles de souris $AR^{L2/y}$, HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$ âgées de 15 à 17 semaines. Il n'y a pas de différence de la masse du BC chez les souris HSA-Cre comparées aux souris $AR^{L2/y}$. En revanche, nous confirmons une diminution de 45% de la masse du BC chez les souris $AR^{skm-/y}$ comparée aux souris $AR^{L2/y}$ et HSA-Cre (figure 42C).

Cette diminution de la masse du muscle bulbocaverneux est liée à la présence du RA dans les myofibres et non à un défaut de la lignée HSA-Cre.

Nous n'avons constaté aucune différence de poids des muscles gastrocnémien, soléaire, tibialis, EDL et quadriceps des membres inférieurs entre ces souris (figure 42C).

Donc le RA dans les myofibres contrôlent bien la masse du muscle BC mais pas celle des muscles des membres.

Pour mesurer la taille des fibres des muscles gastrocnémiens des souris à l'état basal, nous avons réalisé une analyse immunohistologique sur des coupes transversales de muscle gastrocnémien de souris HSA-Cre, $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ âgées de 15 semaines avec un anticorps dirigé contre la cavéoline et nous avons montré qu'il n'y a pas de différences de taille des fibres en fonction du génotype des souris (figure 42D).

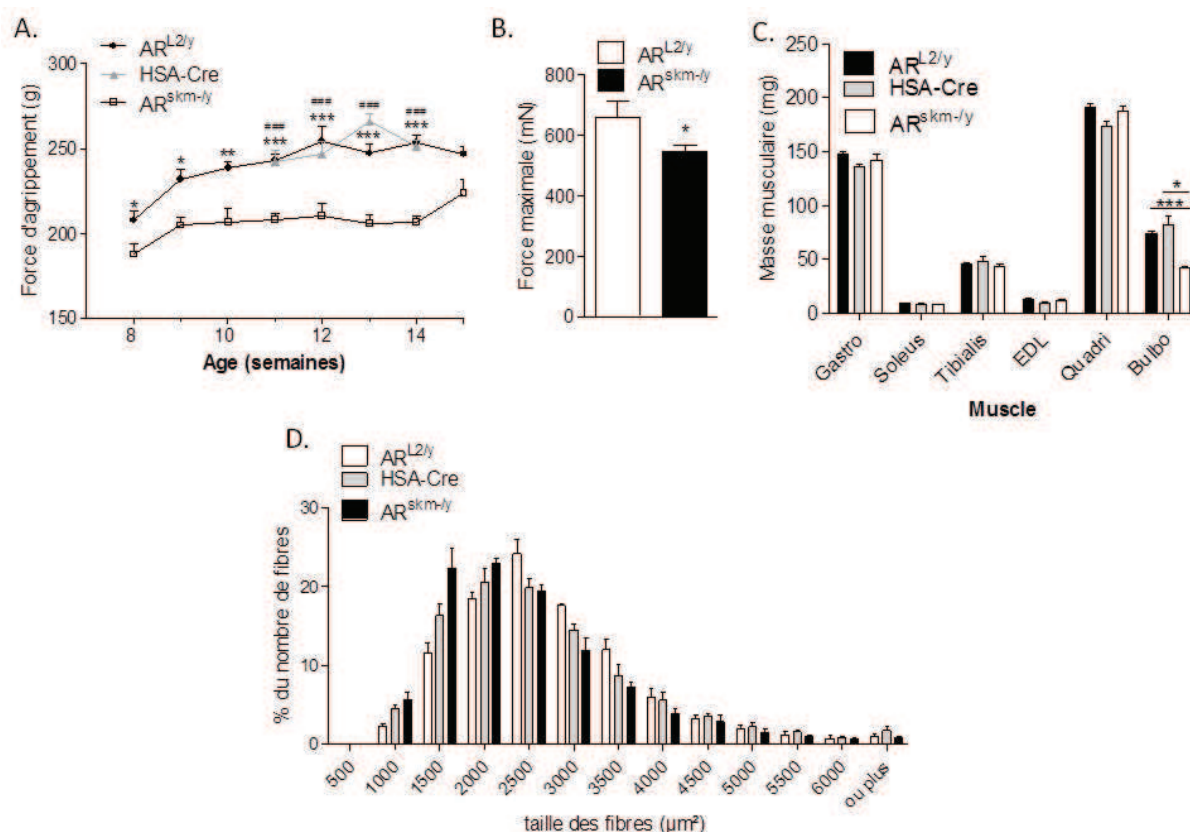


Figure 42. Force et masse musculaire des mâles AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y}.

- A. Test d'agrippement sur des souris AR^{L2/y} (n=8), HSA-Cre (n=4), et AR^{skm-/y} (n=6) entre l'âge de 8 et 15 semaines. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 (AR^{L2/y} et AR^{skm-/y}). ###p<0,001 (HSA-Cre et AR^{skm-/y}). Les points représentent les moyennes +/- SEM.
- B. Force sur tibialis isolé chez des souris AR^{L2/y} (n=2) et AR^{skm-/y} (n=6) âgées de 17 semaines.
- C. Masse musculaire chez des souris AR^{L2/y}, AR^{skm-/y} (n<10) et HSA-Cre (n=5) âgées de 15 à 20 semaines.
- D. Analyse de la taille des fibres du muscle gastrocnémien de souris AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y} âgées de 15 semaines avec un marquage à la cavéoline.
- *p<0,05 ; ***p<0,001. Les barres représentent les moyennes +/- SEM.

La majorité des expériences suivantes ont été réalisées en incluant un contrôle HSA-Cre afin de discriminer les défauts liés à l'absence du RA de ceux liés à la présence du transgène HSA-Cre. Ceci permettra de mettre en évidence le rôle des androgènes dans le muscle squelettique.

Les défauts de force observés ne sont donc pas liés à une diminution de la masse des muscles des membres, ni à la présence du transgène HSA-Cre, mais bien à l'absence du RA dans les myofibres.

Nous avons donc cherché à identifier par quels mécanismes la force musculaire est diminuée lorsque le RA est spécifiquement invalidé dans les myofibres.

2.2 Etude du rôle du RA dans le maintien de la structure sarcomérique.

Le laboratoire a montré précédemment que les souris $AR^{skm-/y}$ présentent des défauts au niveau de l'ultrastructure des sarcomères des muscles gastrocnémien et EDL de souris âgées de 15 semaines. Les sarcomères sont élargis, présentent un aspect plus clair en microscopie électronique et les lignes Z sont décalées (Chambon et al., 2010).

Les souris HSA-Cre présentent des défauts dans l'ultrastructure du muscle gastrocnémien. Les lignes Z sont décalées (figure 3, flèche) voire absentes (figure 43, tête de flèche) et les sarcomères sont plus courts (figure 43, double flèche). De plus, certains sarcomères ont un aspect plus clair ce qui signifie qu'il y a un nombre de myofilaments inférieur dans ces sarcomères (figure 43, *). Ces défauts sont identiques à ceux observés dans le muscle gastrocnémien des souris $AR^{skm-/y}$. Cependant, ces défauts sont accentués en absence du RA dans les myofibres.

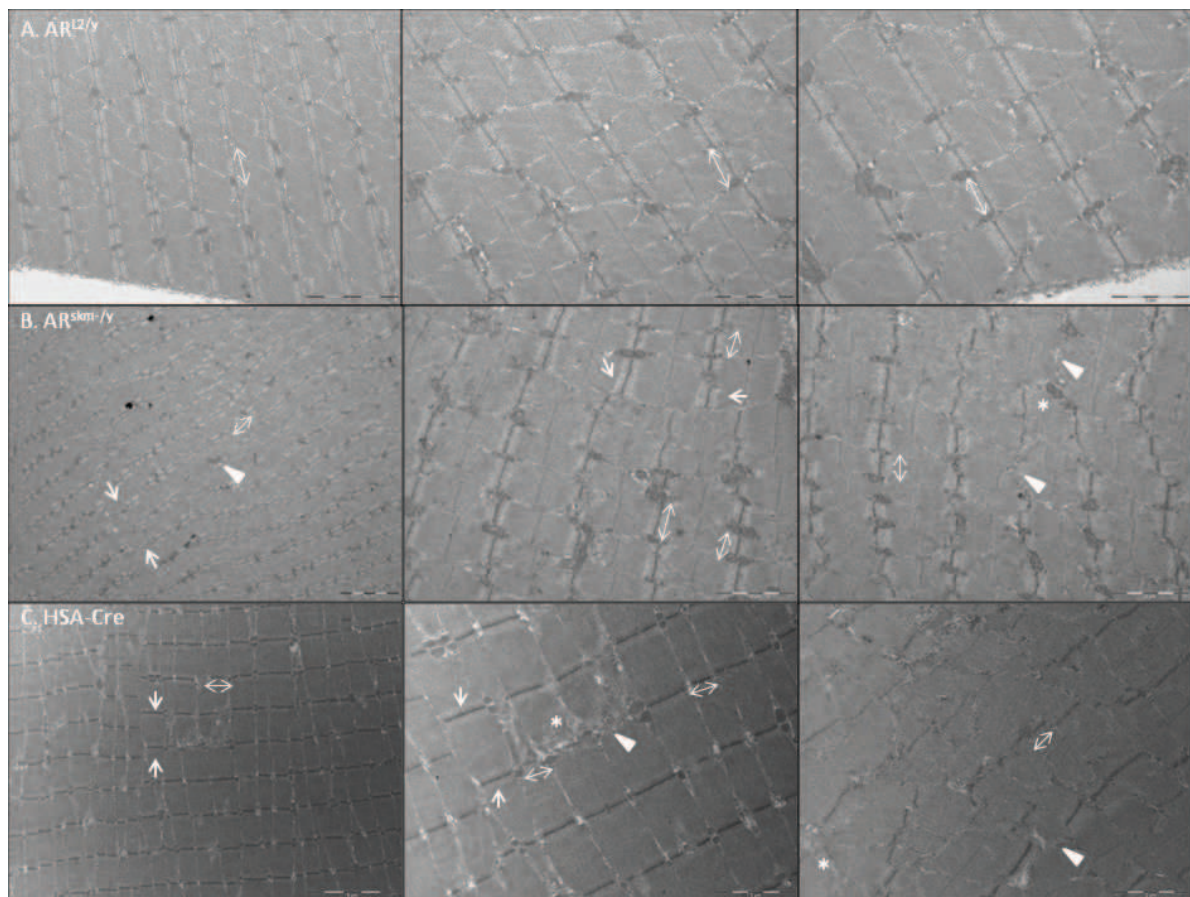


Figure 43. Comparaison de l'ultrastructure du muscle squelettique des souris $AR^{skm-/y}$, HSA-Cre et contrôles à 15 semaines.

Image représentative d'un muscle gastrocnémien de souris $AR^{L2/y}$ (n=6), HSA-Cre (n=3) et $AR^{skm-/y}$ (n=4) âgées de 15 semaines en microscopie électronique.

Flèche, Décalage de la ligne Z des sarcomères. Tête de flèche, absence de ligne Z. Double flèche, longueur du sarcomère. *, manque de myofibrilles.

Donc les androgènes via leur récepteur dans les myofibres contrôlent la structure des sarcomères.

Afin de déterminer si certains de ces défauts structuraux sont liés à l'excision du RA dans les myofibres et peuvent être liés à la perte de la force musculaire, ces expériences ont été répétées sur des souris chez lesquelles le RA est spécifiquement invalidé dans les myofibres à l'âge adulte, $AR^{(i)skm-/y}$.

2.3 Validation chez les souris $AR^{(i)skm-/y}$.

Afin de confirmer les résultats obtenus chez les souris $AR^{skm-/y}$ et de mieux comprendre le rôle du RA dans les myofibres, nous avons analysé des souris chez lesquelles le RA est invalidé spécifiquement dans les myofibres à l'âge adulte. Elles ne possèdent pas le transgène HSA-Cre mais le transgène HSA-Cre-ER^{T2}.

A 8 semaines, les souris ont été traitées au tamoxifène ce qui va libérer le site actif de la recombinaise chimérique Cre-ER^{T2} et permettre la recombinaison au niveau des sites LoxP et déléter l'exon 1 du gène codant pour le RA spécifiquement dans les myofibres du muscle squelettique (Schuler et al., 2005).

A 15 semaines, nous avons évalué la force d'agrippement des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)skm-/y}$. La force est diminuée de 9% lorsque le RA est absent dans les myofibres chez l'adulte (figure 44). Chez les souris $AR^{skm-/y}$, où le récepteur est délété de façon constitutive, la perte de force est plus importante (17%).

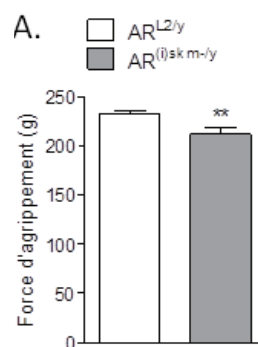


Figure 44. Force d'agrippement des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)skm-/y}$.

Force d'agrippement des souris $AR^{L2/y}$ (n=7) et $AR^{(i)skm-/y}$ (n=4) à 15 semaines.

**p<0.001. Les barres représentent les moyennes +/- SEM.

Cette diminution de force chez les souris $AR^{(i)skm-/y}$ et les souris $AR^{skm-/y}$ confirme que le RA joue un rôle dans le contrôle de la force musculaire à l'âge adulte. Nous avons alors analysé l'ultrastructure du muscle gastrocnémien de souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)skm-/y}$ âgées de 15 semaines en microscopie électronique et nous avons observé des défauts similaires à ceux observés chez les souris $AR^{skm-/y}$ (figure 45) mais dans une plus faible proportion.

Donc l'ablation du RA dans les myofibres conduit à des défauts de structure des sarcomères.

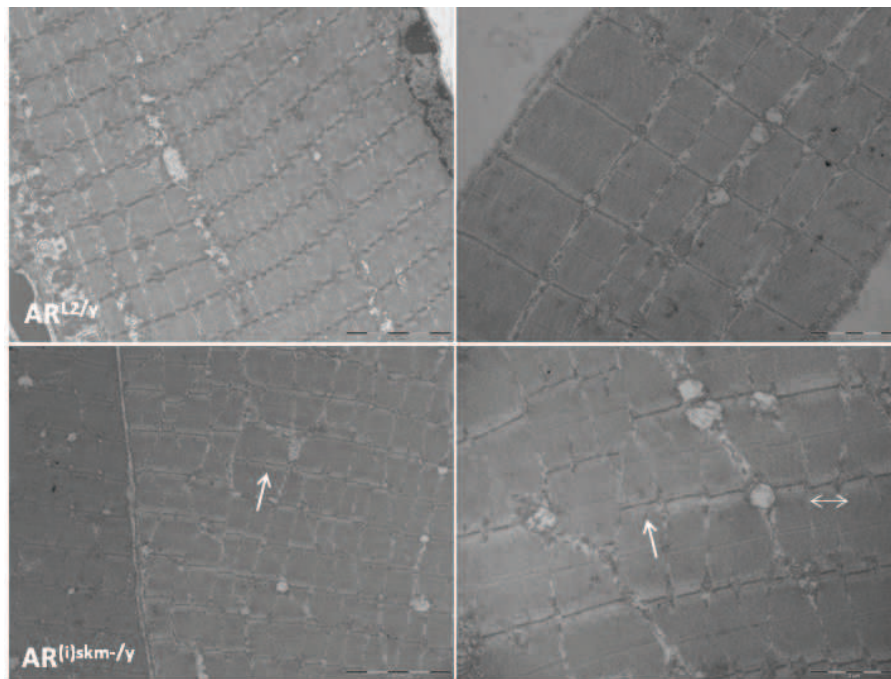


Figure 45. Force musculaire et ultrastructure du muscle gastrocnémien chez les souris $AR^{(i)skm-/y}$.

Ultrastructure du muscle gastrocnémien des souris $AR^{L2/y}$ (n=7) et $AR^{(i)skm-/y}$ (n=4) à 15 semaines en microscopie électronique. Les flèches représentent un décalage de la ligne Z et les doubles flèches représentent la longueur des sarcomères.

Les défauts de force plus importants chez les souris $AR^{skm-/y}$ comparées aux souris $AR^{(i)skm-/y}$, peuvent s'expliquer par le fait que la présence du transgène HSA-Cre induit également des défauts de structure.

Donc la structuration des sarcomères et la force musculaire sont régulés par les androgènes via leur récepteur dans les myofibres. Nos résultats indiquent qu'il existe un lien direct entre l'altération de la structure des fibres et la diminution de la force musculaire.

Comme les niveaux d'excision du RA dans les myofibres varient plus d'un individu à l'autre dans les souris $AR^{(i)skm-/y}$ que chez les souris $AR^{skm-/y}$, nous avons poursuivi l'étude de la lignée $AR^{skm-/y}$.

3 Mécanisme de régulation de la force musculaire.

3.1 Etude de l'expression des gènes codant pour les principales protéines de structure des sarcomères.

Afin de comprendre d'où proviennent les défauts de structure chez les souris HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$, j'ai analysé l'expression des gènes codant pour différentes protéines de structure du sarcomère.

La myoméline est une protéine qui fait partie de la bande M du sarcomère. Elle lie les filaments épais aux autres filaments, comme la titine, pour stabiliser et aligner la structure des sarcomères. Son niveau de transcrit est similaire chez les souris $AR^{L2/y}$, HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$ (figure 46).

La myotiline et la téléthonine sont des composants de la ligne Z. La myotiline se lie à l'alpha actinine, à l'actine et à la filamine et permet une bonne striation du muscle. Son expression génique ne varie pas en fonction du génotype des souris (figure 46). La téléthonine sert de substrat au domaine serine kinase de la titine qui lui permettra d'avoir une conformation favorable à la fixation d'autres protéines du sarcomère. Les niveaux de transcrite de la téléthonine sont diminués de 33 % chez les souris $AR^{skm-/y}$ et de 51% chez les souris HSA-Cre comparées aux souris $AR^{L2/y}$ (figure 46).

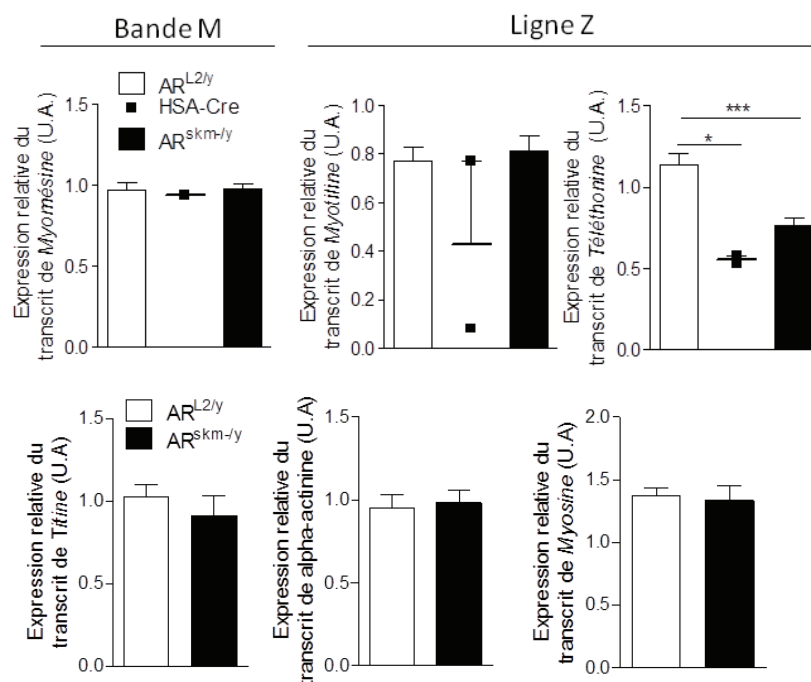


Figure 46. Expression des principaux gènes codant pour les protéines de structure des sarcomères du muscle gastrocnémien des souris $AR^{L2/y}$, HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$.

Niveau d'expression relative des gènes codant pour RA et pour les principales protéines de structure des sarcomères chez les souris $AR^{L2/y}$, HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$ à 15 semaines.

Myomesine exprimée au niveau de la bande M ; Myotiline et Téléthonine exprimées au niveau de la ligne Z, la Titine lie la ligne Z à la bande M et se fixe à l' α -actinine et à la myosine.

Pour les souris $AR^{L2/y}$, n=10 pour les différents gènes testés.

Pour les souris HSA-Cre, n=2 pour les différents gènes testés.

Pour les souris $AR^{skm-/y}$, n<10 pour les différents gènes testés.

*p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0,001. Les barres représentent les moyennes +/- SEM. Les valeurs de chaque échantillon HSA-Cre sont représentées par un carré.

U.A, Unité Arbitraire.

Cela signifie que la dérégulation de l'expression de la téléthonine n'est pas liée à la perte du récepteur des androgènes, mais à la présence du transgène HSA-Cre.

La présence du transgène HSA-Cre entraîne une altération de la structure des sarcomères qui peut s'expliquer par la perte de l'expression du gène codant pour la téléthonine et la diminution de la protéine dystrophine. Cependant ces défauts ne conduisent pas à une variation de la force musculaire

Donc le RA dans les myofibres contrôlent la force musculaire et permet la structuration des sarcomères. Cependant aucune régulation par le RA des gènes codant pour les protéines des sarcomères testé n'a été mise en évidence.

3.2 Etude de la régulation calcique.

La force musculaire est régulée par des flux calciques. Une des hypothèses pour expliquer la diminution de la force musculaire chez les souris chez lesquelles le RA est spécifiquement délété dans les myofibres est que la régulation calcique soit dérégulée. L'étude des flux calciques a été réalisée en collaboration avec le Dr Arnaud Ferry, et fait l'objet de la publication n°1.

La fluorescence du FURA-2 est mesurée pour obtenir la concentration du calcium cytosolique. L'amplitude calcique, le temps jusqu'au pic et de la constante de vitesse de dégradation du calcium sont similaires chez les souris $AR^{skm-/y}$ et les souris $AR^{L2/y}$ (figure 47A). De plus, l'expression des gènes codant pour des canaux calciques comme le Récepteur à la Ryanodine (RYR), pour des protéines qui catalysent le transport ATP dépendant du calcium comme la sarcolipine et la calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) sont similaires chez les souris $AR^{skm-/y}$ et les souris $AR^{L2/y}$ (figure 47B).

Les résultats obtenus montrent que le RA ne contrôle pas l'expression de ces gènes.

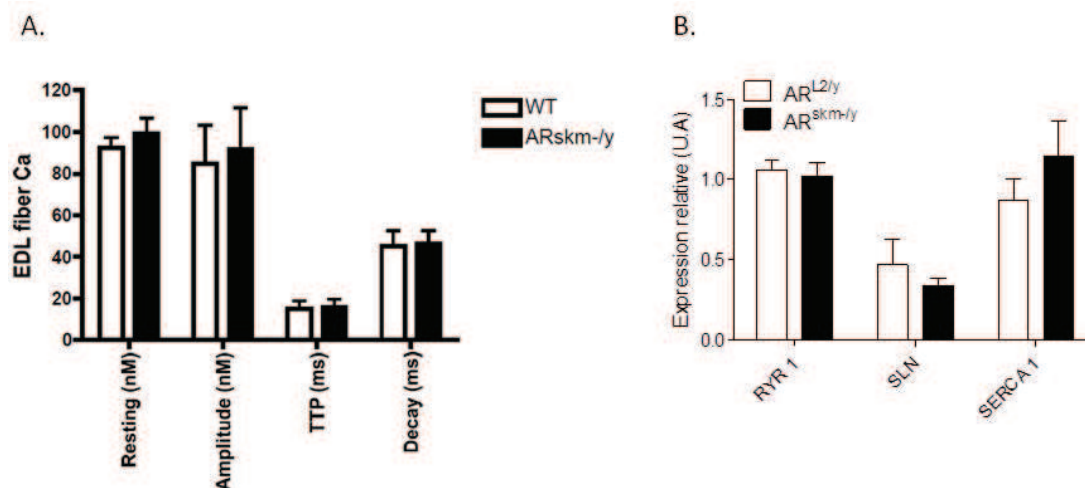


Figure 47. Régulation des flux calciques

A. Mesure de la résistance, de l'amplitude, du temps jusqu'au pic et de la constante de vitesse de dégradation du calcium au niveau des fibres de l'EDL de souris âgées de 15 semaines. n=6 à 19 par groupe.

B. Niveau d'expression relative des transcrits du Récepteur à la Ryanodine (RyR), de la sarcolipine (SLN) et de Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA1). $AR^{L2/y}$ n=5 ; $AR^{skm-/y}$ n=4.

Les barres représentent les moyennes +/- SEM. U.A, Unité Arbitraire.

Donc les défauts de force observés chez les souris $AR^{skm-/y}$ ne s'expliquent pas par un défaut calcique.

Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un mécanisme moléculaire permettant d'expliquer les défauts de force musculaire et de structure des sarcomères observés en l'absence du RA dans les myofibres.

4 Etude des traitements androgéniques sur le contrôle de la force et de la masse musculaire.

Nous avons montré que les androgènes via leur récepteur dans les myofibres jouent un rôle sur le contrôle de la force musculaire. Comme les androgènes pourraient également avoir une action rapide, RA indépendante, sur les cellules musculaires, nous avons analysé l'effet d'un traitement androgénique aigu sur la capacité de génération de la force maximale sur les souris AR^{L2/y} et AR^{skm-/y}. Ces résultats font également l'objet de la publication n°1.

4.1 Etude d'un traitement androgénique aigu sur le contrôle de la force musculaire.

Nous avons analysé l'effet d'un traitement aigu aux androgènes en collaboration avec le Dr Arnaud Ferry. Le traitement a été réalisé sur des souris AR^{L2/y} (WT) et AR^{skm-/y} afin de savoir si les androgènes agissent via leur récepteur dans la myofibre. Nous avons analysé la production de force *in situ* du tibialis antérieur en réponse à une stimulation électrique. Les souris ont été injectées intra péritonéalement avec des androgènes solubilisés dans de l'éthanol et du PBS (véhicule) ou avec le véhicule et les performances ont été évaluées 30, 60 et 90 minutes après l'injection. Comme aucune différence entre les différents temps n'a été observée, seules les données à 30 minutes sont présentées. Les traitements avec 10 mg/kg de Dihydrotestostérone (DHT) (figure 48A et B), 100 mg/kg de DHT (figure 48C) et la testostérone (1, 10 et 100 mg/kg) (figure 48D) ne modifient pas la force et la puissance maximale absolue chez les souris WT et AR^{skm-/y}. De plus, la résistance à la fatigue n'est pas augmentée chez les souris contrôles (figure 48A, C et D) et un traitement avec 100 mg/kg de testostérone dissous dans du DMSO n'altère pas les performances musculaires après 90 minutes (figure 48E). Pour s'assurer que la DHT est rapidement disponible dans le muscle, la DHT a également été appliquée localement et les mesures ont été réalisées 15 minutes après l'application. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences chez les souris traitées à la DHT comparées aux souris traitées au véhicule (figure 48F).

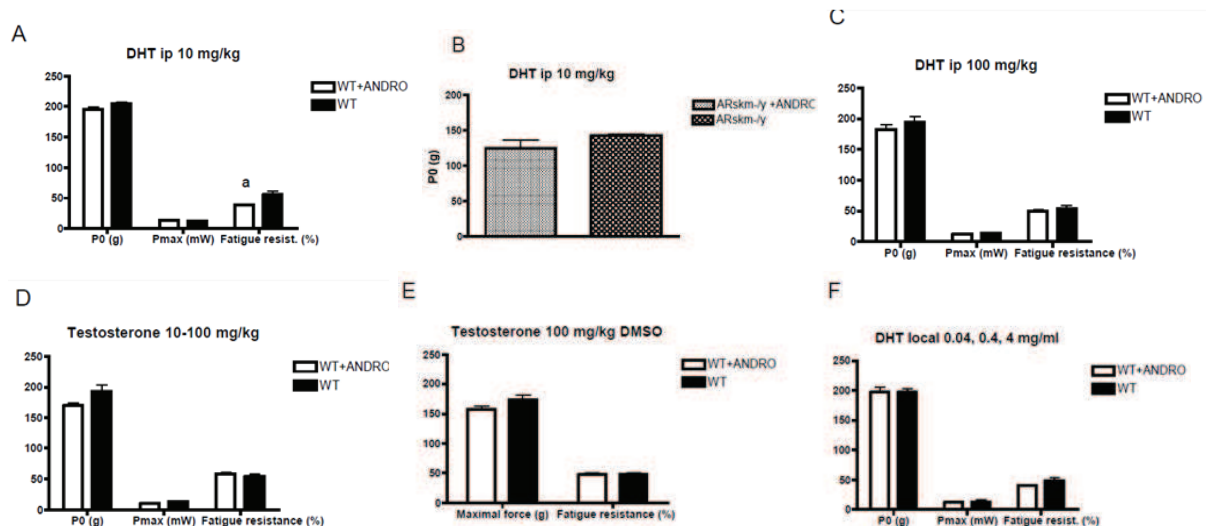


Figure 48. Effet d'un traitement androgénique aigu *in vivo* sur le tibialis antérieur de souris $AR^{L2/y}$ (WT) et $AR^{skm-/y}$ sur la force maximale absolue (P0), la puissance maximale absolue (Pmax) et la résistance à la fatigue.

Traitement des souris WT (A) et $AR^{skm-/y}$ (B) avec de la DHT à 10 mg/kg.

C. Traitement des souris WT avec de la DHT à 100 mg/kg.

D. Traitement des souris WT avec de la testostérone avec 1,10 et 100 mg/kg. Les données de ces traitements sont rassemblées.

Pour A, B, C et D le composé est dissout dans de l'éthanol/PBS. Les souris WT et $AR^{skm-/y}$ sont traitées avec le véhicule approprié (éthanol/PBS). Les souris sont injectées intra-péritonéalement (ip) puis anesthésiées.

E. Traitement de souris WT avec 100 mg/kg de testostérone. La testostérone est dissout dans du DMSO et injectée en ip. Les performances musculaires sont analysées 90 minutes après l'injection. Les souris WT contrôles sont traitées avec le véhicule.

F. La dihydrotestostérone (DHT) dissout dans de l'éthanol/PBS est appliquée localement. Les souris contrôles sont traitées avec le véhicule et les mesures sont réalisées 15 minutes après.

Les barres représentent les moyennes $\pm$ l'erreur standard de la moyenne. a, $p < 0.05$. $n = 6-12$ /groupe. P0 : force maximale absolue ; Pmax : puissance maximale absolue.

Afin de compléter cette étude, une analyse de l'effet des androgènes sur l'EDL après une stimulation électrique a été réalisée. L'EDL entier est incubé dans de la DHT solubilisée dans l'éthanol/thyrode et les mesures sont réalisées avant puis 15, 30 et 45 minutes après le traitement. Les traitements avec différentes doses de DHT (63 et 630 pg/ml et 6.3 ng/ml) n'altèrent pas la force maximale de l'EDL des souris WT (figure 49A). Nous avons également montré qu'il n'y a pas d'effet d'un traitement à la DHT *in vitro* sur la force submaximale et sur le temps de contraction (figure 49B). De même, la DHT dissous dans du DMSO n'a pas d'effet sur la force maximale absolue (figure 49C) et sur la force submaximale (figure 49D) 15, 30, 45, 60, 75 et 90 minutes après le traitement.

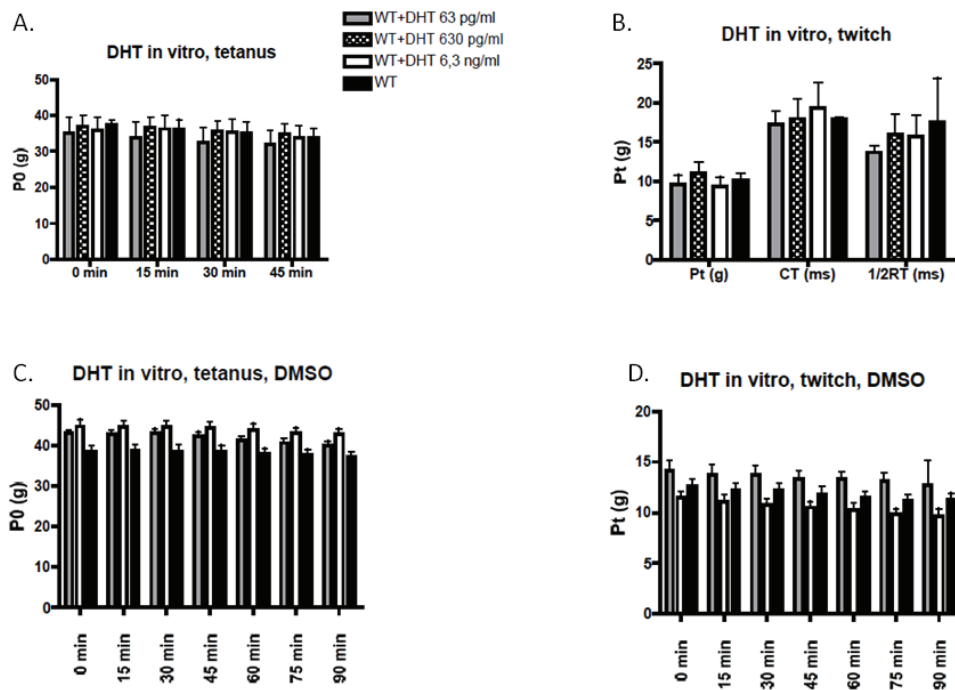


Figure 49. Effet d'un traitement androgénique *in vitro* aigu sur le tibialis antérieur de souris AR^{L2/y} (WT) et AR^{skm-/y} sur la force maximale absolue (P0), la puissance maximale absolue (Pmax) et la résistance à la fatigue.

- A. Force maximale absolue (P0) sur des souris contrôles traitées avec de la DHT à 63 pg/ml, 630 pg/ml ou 6.3 ng/ml
- B. Force absolue de contraction (Pt), contraction du mouvement convulsif (CT) et ½ temps de relaxation (1/2 RT) du tibialis de souris contrôles.
- A et B: la drogue est dissous dans l'éthanol et ajoutée après une période d'équilibration de 45 minutes dans une solution de Krebs.
- Les mesures sont réalisées au début, 15, 30 et 45 minutes après l'ajout de la drogue.
- C. Force maximale absolue (P0) de souris contrôles traitées avec de la DHT à 6.3 ng/ml ou 63 pg/ml.
- D. Force absolue de contraction (Pt) de souris contrôles traitées avec de la DHT à 6.3 ng/ml ou 63 pg/ml.

C et D: la drogue est dissous dans du DMSO et ajoutée après une période d'équilibration de 45 minutes dans une solution de Krebs.

Les mesures sont réalisées avant, 15, 30, 45, 60, 75 et 90 minutes après l'ajout de la drogue.

n=4 à 8 par groupe. Les barres représentent les moyennes +/- SEM.

Donc un traitement androgénique aigu n'a pas d'effet sur la production de force. Nous nous sommes alors intéressés au rôle du RA au cours d'un traitement androgénique prolongé.

4.2 Analyses des souris AR^{skm-/y}.

4.2.1 Efficacité de la nandrolone sur des souris de type sauvage.

Nous avons comparé dans un premier temps, l'efficacité de différents dérivés androgéniques: la dihydrotestotérone (DHT), la testostérone propionate (TP) et la nandrolone

sur des souris de type sauvage (WT) après un traitement de trois jours. Les androgènes étant connus pour leurs propriétés anaboliques, nous avons basé notre comparaison sur le poids des muscles. Aucun des trois dérivés androgéniques administrés n'a un effet sur la masse des muscles des membres et du muscle bulbocaverneux (BC) après un traitement de trois jours (figure 50A).

10 mg/kg de nandrolone ont alors été administrés aux souris deux fois par semaine pendant un mois. Nous avons choisi la nandrolone car elle a la propriété de diffuser plus lentement dans l'organisme. On peut noter une augmentation de 18% du poids du muscle du BC chez les souris traitées un mois à la nandrolone comparé aux souris traitées avec le véhicule (figure 50B).

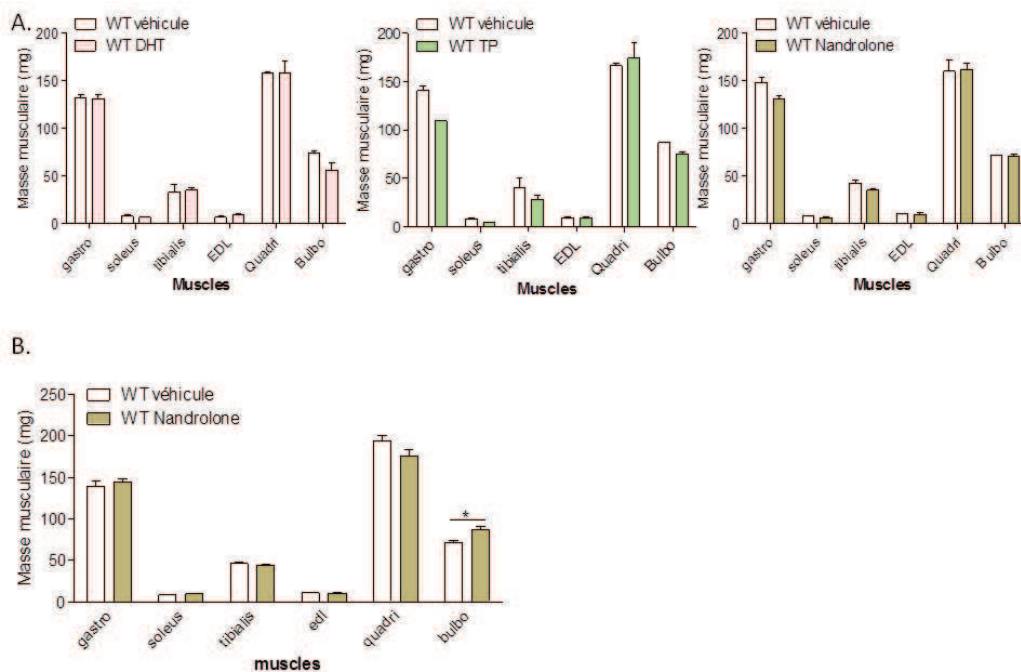


Figure 50. Efficacité d'un traitement androgénique.

A. Masse musculaire après trois jours de traitement à la dihydrotestostérone (DHT, 10 mg/kg), à la testostérone propionate (TP, 12 mg/kg) et à la nandrolone (10 mg/kg). n compris entre 2 et 4.

B. Masse musculaire après un mois de traitement à la nandrolone. n compris entre 8 et 11.

*p<0.05. Les barres représentent les moyennes +/- SEM.

Donc, un mois de traitement à la nandrolone est efficace pour augmenter le poids du BC. Cependant, il faudrait envisager un traitement plus long, une dose plus forte ou coupler le traitement à de l'exercice pour augmenter le poids des muscles des membres avec la nandrolone (Morley et al., 1993; Sih et al., 1997).

4.2.2 Traitement à la nandrolone des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$.

Nous nous sommes intéressés au rôle du RA dans les myofibres sur le contrôle de la masse et de la force musculaire après un traitement androgénique.

Un traitement des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ pendant un mois à raison de deux injections sous-cutanées par semaine avec 10 mg/kg de nandrolone a été effectué.

Sachant que le muscle BC est sensible à la nandrolone nous avons vérifié son poids après le traitement. Le poids du muscle BC est augmenté de 20% chez les souris $AR^{L2/y}$ traitées à la nandrolone (figure 51A). Ceci est en adéquation avec les résultats obtenus sur le muscle BC des souris sauvages (figure 50B). En revanche, la masse du muscle BC n'est pas augmentée chez les souris $AR^{skm-/y}$. Comme chez les souris contrôles, aucune augmentation de poids des muscles des membres n'est observée (figure 51A).

Donc la nandrolone a un effet anabolique sur le muscle BC via le RA dans les myofibres.

Nous avons observé une augmentation de la force d'agrippement après un traitement d'un mois à la nandrolone chez les souris contrôles et $AR^{skm-/y}$ (7% et 11% respectivement) (figure 51B).

Donc la nandrolone semble contrôler l'augmentation de la force musculaire, mais indépendamment du RA dans les myofibres.

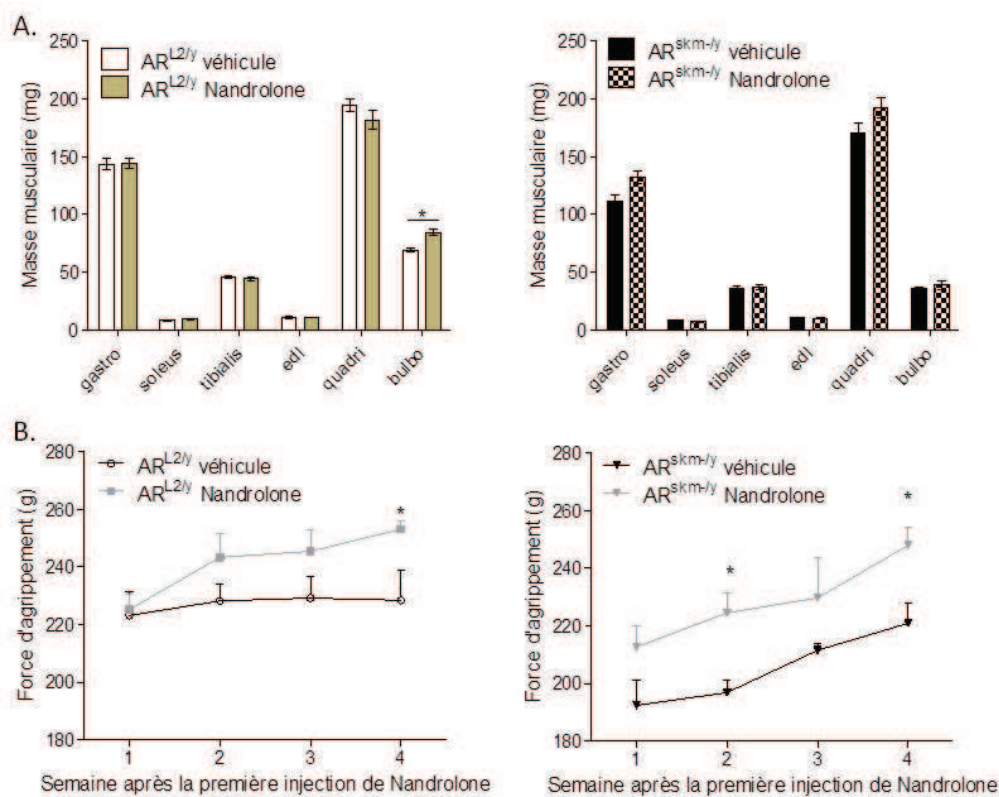


Figure 51. Effet d'un traitement d'un mois à la nandrolone sur le contrôle de la force et de la masse musculaire chez des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$.

- A. Masse musculaire des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ traitées à la nandrolone ou avec le véhicule.
 B. Force d'agrippement des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ traitées à la nandrolone ou avec le véhicule.
 n= 4 à 10 par groupe. Les barres représentent les moyennes +/- SEM. *p<0.05

Un traitement à la nandrolone permettrait une augmentation de la force musculaire sans augmentation du poids des muscles des membres à la fois chez les souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$. La nandrolone aurait un effet sur le contrôle de la force musculaire indépendante du RA dans les myofibres et un effet anabolique sur le muscle BC dépendant du RA dans les myofibres. Les résultats restent à confirmer.

4.2.3 Analyse moléculaire après un mois de traitement à la nandrolone des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$.

Nous n'avons pas mis en évidence d'effets de la nandrolone sur la masse des muscles des membres. Cependant, nous avons réalisé une analyse moléculaire du muscle gastrocnémien. Les niveaux d'expression des transcrits des gènes impliqués dans la régulation de la masse musculaire ont été étudiés. L'Insuline Growth Factor 1, ou IGF1, est une hormone connue pour son effet anabolique. Lorsqu'elle est surexprimée, les souris présentent une hypertrophie musculaire. L'IGF1 est impliquée dans la différenciation des cellules satellites, les cellules souches du muscle, en myofibres. Elle est également responsable de l'augmentation de la taille des myotubes. Le niveau relatif du transcrit d'IGF1 est augmenté de 47% dans le muscle gastrocnémien après un mois de traitement à la nandrolone chez les souris $AR^{L2/y}$. Le transcrit d'IGF1 n'est pas augmenté en l'absence du RA dans les myofibres (figure 52).

Donc l'induction d'IGF1 par la nandrolone est dépendante du RA dans les myofibres.

La myostatine est un régulateur négatif de la masse musculaire. En effet, la sous-expression de la myostatine conduit à une augmentation de la masse musculaire. Lorsque l'on traite les souris à la nandrolone, l'expression du transcrit de la myostatine est induit de 50% chez les souris $AR^{L2/y}$ et de seulement 26% chez les souris $AR^{skm-/y}$. L'induction n'a pas lieu si le RA est absent dans les myofibres (figure 52).

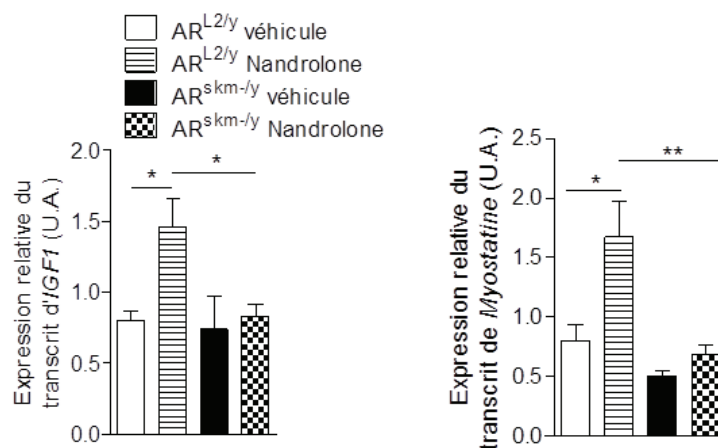


Figure 52. Niveau d'expression des gènes impliqués dans la régulation de la masse musculaire après un traitement androgénique.

Niveau d'expression relatif des transcrits d'IGF1 et de la myostatine dans le muscle gastrocnémien de souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ traitées un mois à la nandrolone (n=4 à 6 et n=4 respectivement) ou au véhicule (n=3 à 4 et n=3 respectivement).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM. U.A, Unité Arbitraire.

Donc la nandrolone induit l'expression de la myostatine via le RA dans les myofibres. Cette induction par les androgènes passe par leur récepteur dans les myofibres.

L'expression d'IGF1 et de la myostatine est régulée par le RA dans les myofibres. Leur effet sur le muscle est opposé. Cela pourrait expliquer pourquoi nous n'observons pas d'augmentation de la masse des muscles des membres après un traitement à la nandrolone.

4.3 Effet d'une castration sur la force et sur la masse musculaire.

Les testicules sont la source majeure de production de la testostérone. Afin de réduire les niveaux d'androgènes circulants, des souris de type sauvage sont castrées à l'âge de 14 semaines. Nous pouvons ainsi analyser l'effet des androgènes médiés ou non par leur récepteur. Le muscle BC est sensible aux androgènes pour la régulation de sa masse. C'est pourquoi, l'efficacité de la castration est évaluée en mesurant le poids du BC (Rand and Breedlove, 1992). Les souris considérées pour l'analyse des résultats présentent une masse du BC de 50 à 60% inférieure aux souris contrôles (opérées mais non castrées appelées « sham »). Une cinétique de force d'agrippement est réalisée sur des souris de type sauvage castrées ou contrôles (sham), afin d'étudier l'effet d'une castration sur la force musculaire. Dès la première semaine après la castration, une diminution de la force d'agrippement est observée passant de 241 g pour les souris contrôles à 207 g pour les souris castrées (figure 53A). Une perte de force similaire est observée 4 semaines après castration (figure 53A). Un mois après la castration, les muscles sont collectés. Le poids du BC est diminué de 54% chez les souris castrées (figure 53B). En revanche, le poids du quadriceps tend à diminuer, mais il n'y a pas de perte de masse musculaire significative un mois après castration. Donc la perte de force liée à la castration ne s'explique pas par une diminution de la masse des muscles des membres.

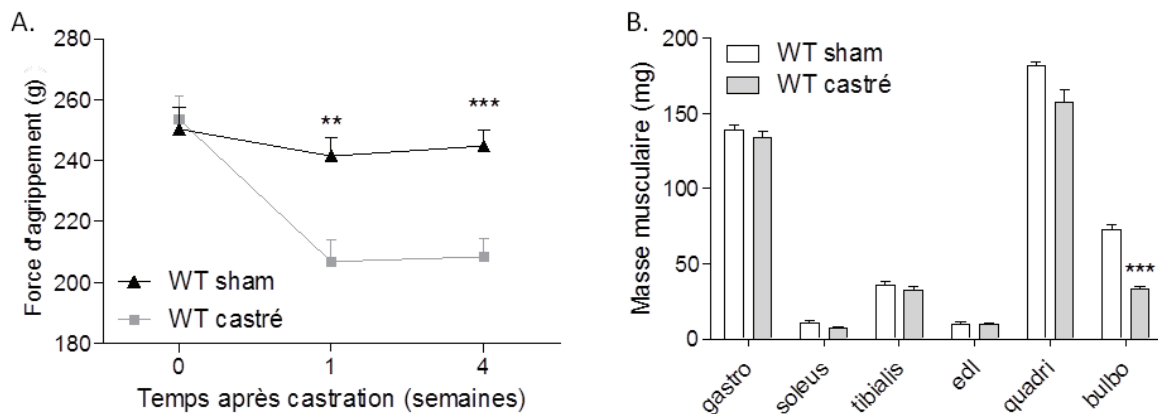


Figure 53. Effet d'une castration d'un mois sur la force et la masse musculaire.

- A. Evolution de la force musculaire des souris contrôles (WT) après une castration.
 B. Masse musculaire du gastrocnémien, soléaire, tibialis, extenseur commun des orteils (EDL), quadriceps et bulbocaverneux chez les souris $AR^{L2/y}$ (n=7) et $AR^{skm-/y}$ (n=7) âgées de 15 semaines un mois après une castration.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Les barres représentent les moyennes $\pm$ l'erreur standard.

4.4 Effet d'une castration avec supplémentation androgénique.

Nous avons étudié l'effet d'un traitement androgénique sur des souris castrées, afin de s'affranchir des androgènes endogènes.

Une semaine après castration ou non, les souris ont été traitées avec de la nandrolone (10 mg/kg de souris) ou de l'huile (véhicule) pendant un mois à raison de deux injections sous cutanées par semaine. La force des souris castrées, traitées à la nandrolone, a été suivie pendant un mois. La force des souris traitées à la nandrolone est similaire à celle observée chez les souris contrôles traitées à l'huile (véhicule) (figure 54A). Après castration, une forte diminution de la masse du BC (60%) est observée.

Un traitement d'un mois à la nandrolone permet de compenser la perte de masse du BC induite par une castration. Le poids du BC des souris castrées traitées à la nandrolone est similaire à celui des souris non castrées (figure 54B). Ceci confirme que le traitement à la nandrolone est efficace. En revanche, il n'y a pas d'augmentation du poids des muscles des membres des souris castrées traitées à la nandrolone (figure 54B).

Donc les mécanismes d'action de la nandrolone sont différents entre les muscles des membres et le muscle bulboocaverneux.

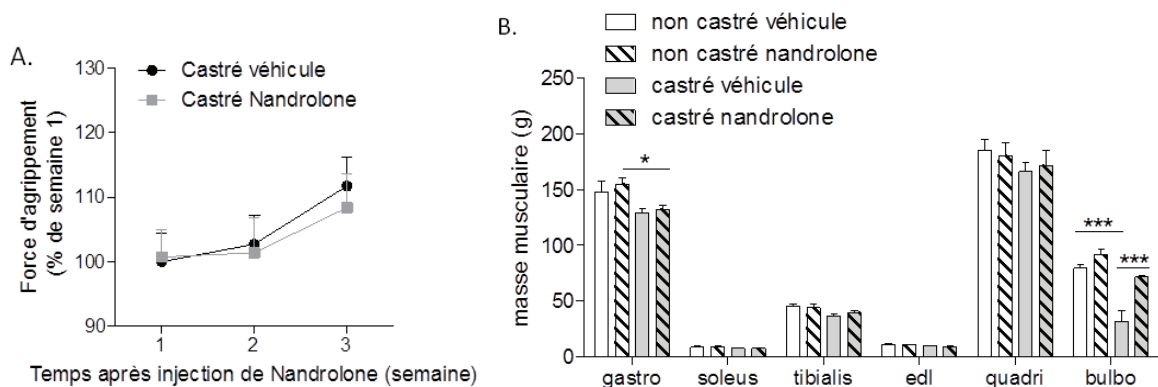


Figure 54. Effet d'un traitement d'un mois à la nandrolone sur des souris castrées.

A. Force d'agrippement des souris de types sauvage castrées traitée à la nandrolone (10mg/kg) pendant un mois. Les valeurs sont données en pourcentage de la première semaine.

B. Masse musculaire des souris de type sauvages, castrées ou non, traitées un mois à la nandrolone ou au véhicule (huile).

n=4 à 5 par groupe.

Les barres représentent les moyennes +/- SEM. *p<0.05 ; ***p<0.001.

Afin de voir si un traitement plus court mais à une concentration plus forte, peut avoir un effet sur la force et la masse des muscles de membres, un traitement de trois jours à la nandrolone sur des souris castrées un mois auparavant a été réalisé. La dose du traitement a été augmentée à 100 mg/kg de souris.

Les souris castrées présentent une diminution du poids du BC de 55% comparées aux souris sham (figure 55A). Les souris castrées traitées à la nandrolone présentent également une diminution du poids du BC (35%) comparées aux souris sham traitées à la nandrolone. Cependant le poids de ce muscle est légèrement supérieur chez les souris castrées après un

traitement à la nandrolone comparées aux souris traitées à l'huile (53 mg et 33 mg respectivement) (figure 55A).

Nous observons donc une restauration partielle de la perte de poids du BC induit par une castration après un traitement de trois jours à la nandrolone.

Le poids des muscles des membres est similaire quelque soit le traitement. Une tendance à la diminution est observée sur le muscle quadriceps après castration (figure 55B).

Les souris ont été soumises à un test d'agrippement avant la castration, une semaine après et quatre semaines plus tard après trois jours de traitement à la nandrolone (100 mg/kg).

La force musculaire des souris castrées diminue de 20% une semaine après l'opération comparée aux mêmes animaux avant la castration. Nous constatons que l'opération « sham » n'entraîne aucune difficulté pour réaliser le test (figure 55B) car les souris sham exercent une force similaire à celle exercée par les souris avant l'opération. Quatre semaines après la castration, les souris traitées à l'huile exercent une force sur le dynamomètre similaire à la première semaine après castration. En revanche, lorsque les souris sont traitées trois jours avec 100 mg/kg de nandrolone en sous cutanée, la force augmente pour atteindre celle des souris non castrées (figure 55B).

Un traitement de trois jours avec 100 mg/kg de nandrolone permet de compenser la perte de force entraînée par une castration.

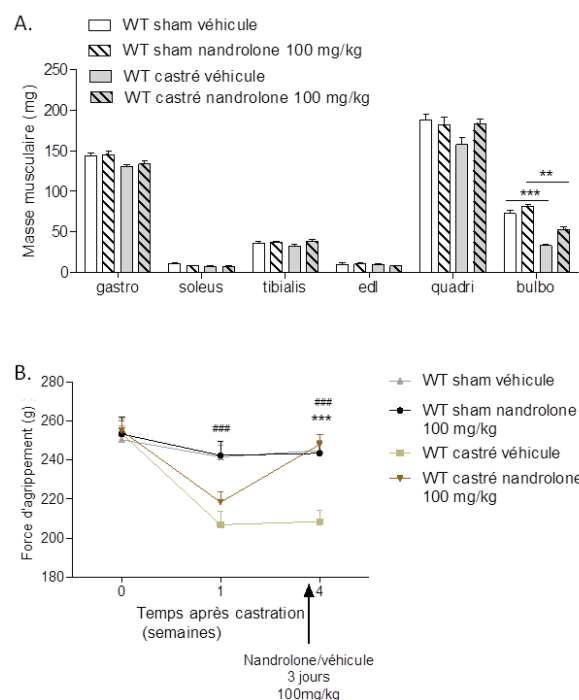


Figure 55. Effet d'un traitement de trois jours à la nandrolone (100mg/kg) sur des souris castrées un mois auparavant.

- Masse musculaire des souris de type sauvage (WT) âgées de 15 semaines, castrées ou sham, traitées à la nandrolone ou à l'huile (véhicule).
- Force d'agrippement des souris de type sauvage (WT) âgées de 15 semaines, castrées ou sham, traitées à la nandrolone ou à l'huile (véhicule).

Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Significativité entre les souris WT castrées traitées avec le véhicule et les souris WT castrées traitées à la nandrolone.

$p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$. Significativité entre les souris WT sham traitées avec le véhicule et les souris WT castrées traitées avec le véhicule.

n= 7 à 8 par groupe.

Ainsi, nous avons montré qu'un traitement de trois jours à la nandrolone (100 mg/kg) n'est pas suffisant pour induire une hypertrophie des muscles des membres ou du BC. En revanche, un traitement d'un mois avec 10 mg/kg de nandrolone entraîne une hypertrophie du muscle BC. Aucune hypertrophie n'est observée en l'absence du RA dans les myofibres.

Donc les androgènes agissent via leur récepteur dans les myofibres pour induire une hypertrophie du BC, mais pas des muscles des membres.

Nous avons également mis en évidence qu'un traitement d'un mois à la nandrolone restaure la perte de masse du BC induite par une castration. La restauration est également induite par un traitement de trois jours avec une dose de nandrolone dix fois supérieure un mois après la castration mais plus faiblement.

La perte de force induite par la castration est compensée par un traitement à la nandrolone de trois jours à une dose de 100 mg/kg.

5 Effet d'une surcharge mécanique sur le contrôle de la masse musculaire.

Cf publication n°2.

Les androgènes, en concentration physiologique, via leur récepteur dans les myofibres ne contrôlent pas la masse du muscle des membres dans des conditions sédentaires. Nous avons réalisé, en collaboration avec le Dr Arnaud Ferry, un modèle de surcharge mécanique sur des souris contrôles (WT) et AR^{skm-/y} afin de déterminer si l'hypertrophie et la régénération engendrées par cette surcharge est dépendante du RA dans les myofibres.

Pour cela les muscles gastrocnémiens et soléaires des pattes postérieures de souris WT et AR^{skm-/y} ont été retirés. Le plantaris est alors plus sollicité, ce qui simule un exercice intense et prolongé de ce muscle. Un mois après l'opération, la force et la masse du plantaris sont mesurées.

La force maximale absolue et la résistance à la fatigue augmentent chez les souris WT (63% et 73% respectivement) et AR^{skm-/y} (88% et 56% respectivement) (figure 56A, B, C, D). L'augmentation du poids des muscles est plus faible, en réponse à la surcharge mécanique, chez les souris AR^{skm-/y} (54%) que chez les souris WT (115%) (figure 56E et F). Malgré des hausses similaires du nombre de fibres par section (51% et 60%, figure 57A et B), le diamètre des fibres exprimant MHC-2b (26%) et MHC-2x (20%) est diminué chez les souris AR^{skm-/y} après la surcharge mécanique. Cela n'est pas le cas chez les souris contrôles (figure 57C et D). La transition des fibres MHC-2b en MHC-2a en réponse à une surcharge mécanique est

réduite chez les souris $AR^{skm-/y}$ comparées aux WT, car l'augmentation du pourcentage de fibres MHC-2a est plus faible chez les souris $AR^{skm-/y}$ (50% contre 103%).

Finalement, un traitement androgénique pendant la surcharge mécanique n'a pas d'effet sur le remodelage musculaire ou l'augmentation des performances (figure 56 et 57). Donc nos résultats montrent que le RA dans les myofibres est nécessaire en réponse à la surcharge mécanique mais qu'une administration d'androgènes n'a pas d'effets ergogéniques chez le mâle.

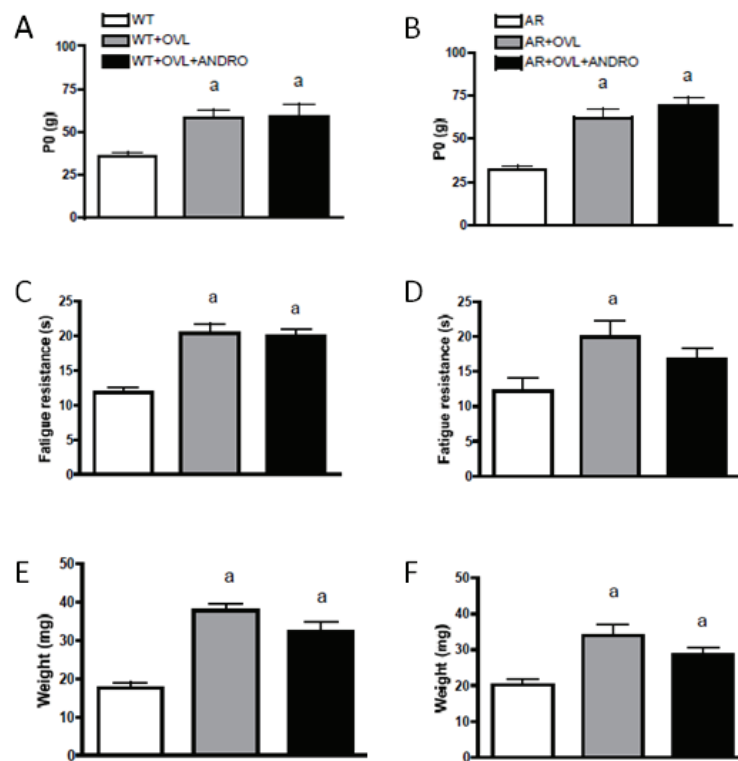


Figure 56. Effet d'une surcharge mécanique sur le contrôle de la masse et de la force musculaire.

Force maximale absolue du plantaris de souris $AR^{L2/y}$ (WT, A) et $AR^{skm-/y}$ (AR, B) traitées ou non à la nandrolone (andro) un mois après une surcharge mécanique (OVL).

La résistance à la fatigue est mesurée chez les souris $AR^{L2/y}$ (WT, C) et $AR^{skm-/y}$ (AR, D) traitées ou non à la nandrolone (andro) un mois après une surcharge mécanique (OVL).

Le poids du plantaris est mesurée chez les souris $AR^{L2/y}$ (WT, E) et $AR^{skm-/y}$ (AR, F) traitées ou non à la nandrolone (andro) un mois après une surcharge mécanique (OVL).

Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM.

a: $AR^{skm-/y}$ +OVL ou WT+OVL significativement différent de $AR^{skm-/y}$ ou WT, respectivement ($p < 0.05$) $n=6-16$ /groupe.

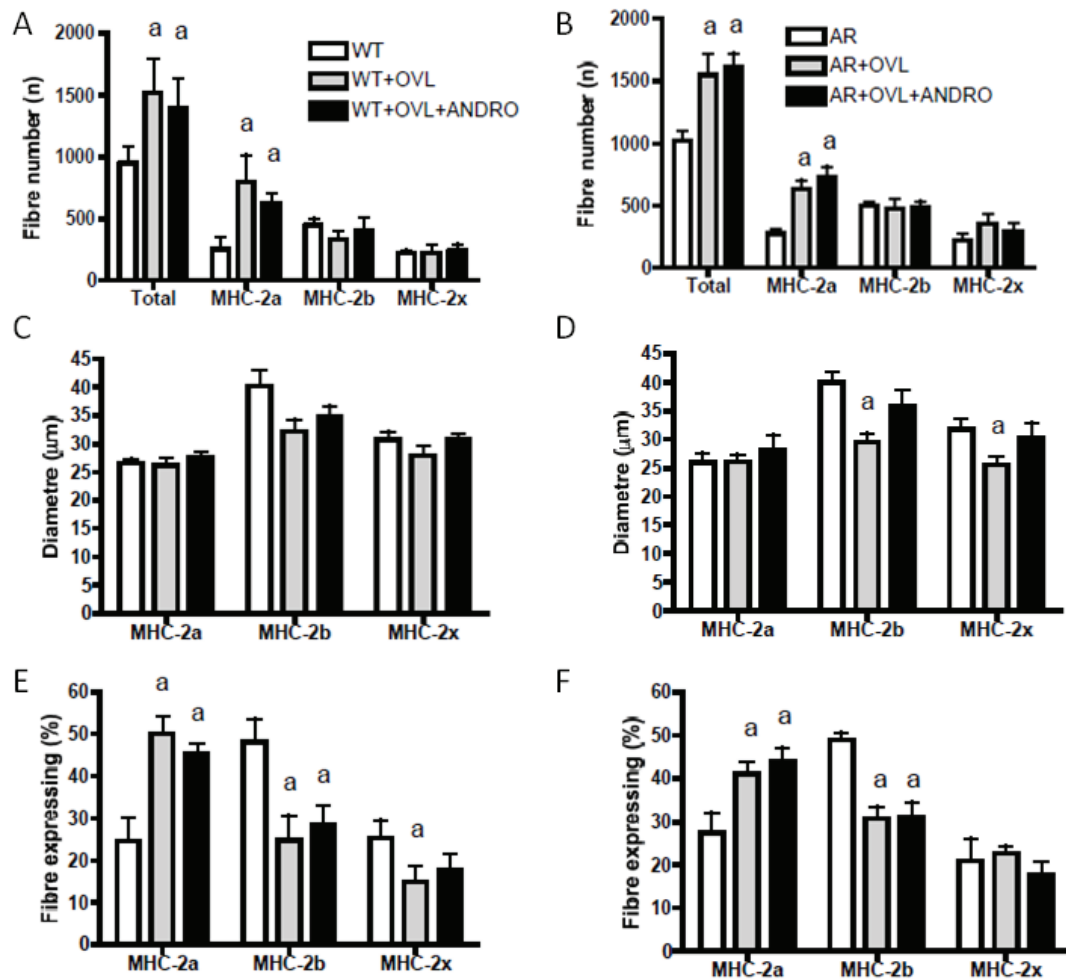


Figure 57. Effet d'une surcharge mécanique sur le type de fibre.

Nombre de fibres par section pour les différents types de fibres MHC-2a, MHC-2b et MHC-2x chez les souris WT (A) et AR^{skm-/y} (B) traitées ou non à la nandrolone (andro) un mois après une surcharge mécanique (OVL).

Diamètre des fibres pour les différents types de fibres MHC-2a, MHC-2b et MHC-2x chez les souris WT (C) et AR^{skm-/y} (D) traitées ou non à la nandrolone (andro) un mois après une surcharge mécanique (OVL).

Pourcentage d'expression des différents types de fibres MHC-2a, MHC-2b et MHC-2x chez les souris WT (E) et AR^{skm-/y} (F) traitées ou non à la nandrolone (andro) un mois après une surcharge mécanique (OVL).

Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM.

a : AR^{skm-/y} +OVL ou WT+OVL significativement différent de AR^{skm-/y} ou WT, respectivement ($p < 0.05$)
n=3-5/groupe.

6 Etude du rôle du RA dans les cellules satellites : la lignée Pax-CreER^{T2}/AR.

A l'état basal, la masse musculaire des membres n'est pas régulée par les androgènes via leur récepteur dans les myofibres. Cependant, la masse du BC augmente après un traitement à la nandrolone. Afin, de comprendre le rôle des androgènes et de leur récepteur sur le contrôle de la masse musculaire, une nouvelle lignée de souris chez lesquelles le RA est spécifiquement invalidé dans les cellules satellites chez l'adulte, les cellules souches du muscle, a été générée: la lignée Pax-CreER^{T2} / AR^{L2/y}.

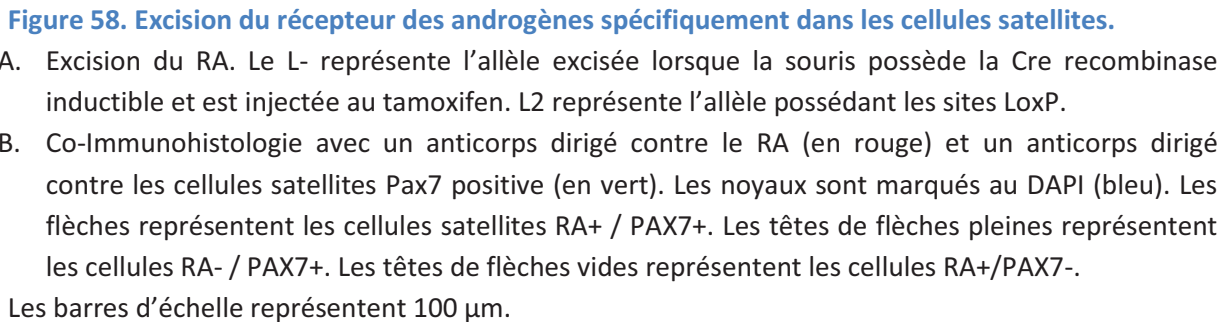
6.1 La lignée Pax-CreER^{T2} / AR^{L2/y}.

La lignée Pax-CreER^{T2} / AR^{L2/y} est une lignée dans laquelle le RA est invalidé dans les cellules satellites chez l'adulte. Les souris AR^{L2/y} où la recombinaison CreER^{T2} est absente, traitées au tamoxifène, sont les contrôles. Les souris AR^{(i)sat-/y} sont celles exprimant la CreER^{T2} recombinaison sous le contrôle du promoteur Pax7 activée après traitement au tamoxifène.

Afin de visualiser la présence du transgène, CreER^{T2} sous le contrôle du promoteur Pax7, Pax-CreER^{T2}, on réalise une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permettant d'amplifier un fragment spécifique de l'ADN sur une biopsie de queue de souris digérée dont l'ADN a été extrait. Afin de visualiser si le gène codant pour le RA est bien entouré de site LoxP (allèle L2), on réalise une PCR avec des amorces encadrant ces sites. Si le RA est flanqué de sites LoxP et que la souris possède le transgène Pax-CreER^{T2}, après injection de tamoxifène, il y aura excision du RA spécifiquement dans les cellules satellites et l'allèle excisée est appelée L-.

La figure 58A présente un gel d'agarose sur lequel a été déposé le produit de la PCR et qui permet de visualiser l'allèle L2 et l'allèle L-. Le fragment d'ADN L- n'est présent dans aucun tissu lorsque la CreER^{T2} est absente chez les souris AR^{L2/y} alors que l'allèle floxé L2 est présent dans tous les tissus (figure 58A). Lorsque la CreER^{T2} est présente chez les souris AR^{(i)sat-/y}, on visualise l'allèle L2 dans tous les tissus mais l'excision se fait uniquement dans les muscles des membres, le muscle bulbo-caverneux et le diaphragme (allèle L-) (figure 58A). Les cellules satellites représentent une faible proportion de cellules dans le muscle squelettique, c'est pourquoi les bandes visualisées sur le gel d'agarose sont faibles.

Afin de vérifier l'excision du RA dans les cellules satellites, un immunomarquage avec des anticorps dirigés spécifiquement contre le RA et Pax7, a été réalisé sur des coupes de muscle gastrocnémien. Chez les souris AR^{L2/y}, le RA est présent dans toutes les cellules PAX7 positives (figure 58B, flèches). Chez les souris AR^{(i)sat-/y}, le RA est absent dans les cellules PAX7 positives (figure 58B, pointe de flèches pleines).



Donc le récepteur des androgènes est bien absent dans les cellules satellites des souris AR^{(i)sat-^y}. Ces souris constituent donc un bon modèle afin d'étudier le rôle du RA dans les cellules satellites.

Nous avons mesuré la force et la masse musculaire des souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y}. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence de la force d'agrippement à 17 semaines entre les souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} (figure 59A). La masse corporelle ainsi que la masse musculaire des muscles des membres et du BC sont similaires entre les souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} (figure 59B et C).

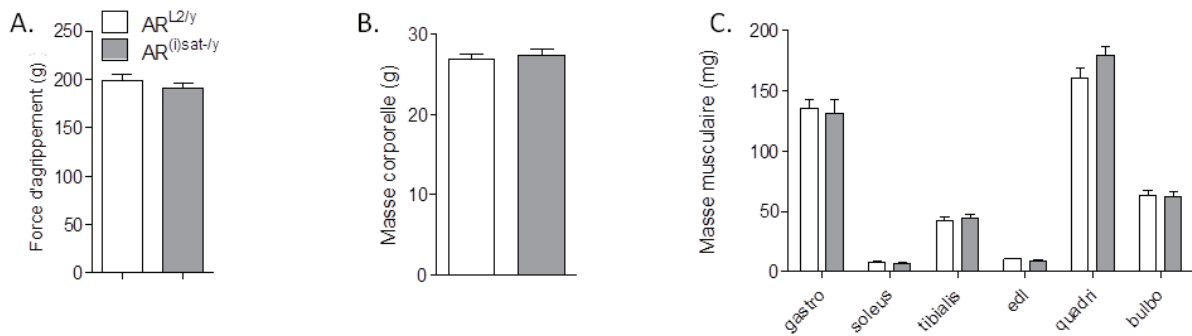


Figure 59. Etude de la force et de la masse musculaire

- A. Force musculaire mesurée par test d'agrippement chez des souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} âgées de 17 semaines.
- B. Masse corporelle des souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} âgées de 17 semaines.
- C. Masse musculaire des souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} âgées de 17 semaines.
- n=7 par groupe. Les barres représentent les moyennes +/- SEM.

Donc le RA dans les cellules satellites ne contrôlent ni la force ni la masse musculaire à l'état basal chez l'adulte.

6.3 Effet d'une surcharge mécanique sur la force et la masse musculaire en l'absence du RA dans les cellules satellites.

Un mois après l'opération créant une surcharge mécanique, la force et le poids du plantaris ont été mesurés. On observe une augmentation de la masse du plantaris d'environ 40% chez les souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} (figure 60A). La force du plantaris un mois après l'opération est augmentée de 62% chez les souris AR^{L2/y} et de 45% chez les souris AR^{(i)sat-/y} (figure 60B). Lorsque la force est rapportée au poids du plantaris, aucune différence n'est observée (figure 60C). En revanche, on constate qu'il y a une tendance à l'augmentation de la force du plantaris chez les souris AR^{(i)sat-/y} comparées aux souris AR^{L2/y}.

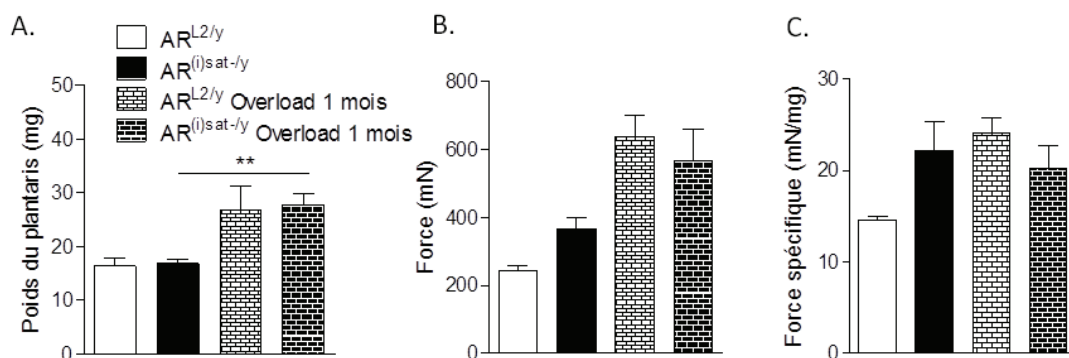


Figure 60. Effet d'une surcharge musculaire sur le contrôle de la force et de la masse musculaire en absence du RA dans les myofibres.

- A. Poids du plantaris de souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} un mois après une surcharge mécanique (Overload ; n=2 et n=4 respectivement) ou non (n=2 et n=6 respectivement).
- B. Force du plantaris de souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} un mois après une surcharge mécanique.

C. Force maximale du plantaris de souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} un mois après une surcharge mécanique. Les barres représentent les moyennes +/- SEM. **p< 0.01.

Donc l'augmentation de la force est liée à l'augmentation de la masse chez les souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} induite par la surcharge mécanique. En revanche, à l'état basal, le RA dans les cellules satellites semble contrôler négativement la force musculaire.

Le RA dans les cellules satellites à l'âge adulte, ne contrôlent pas l'augmentation de masse et de la force musculaire induites par une surcharge mécanique.

6.4 Etude de la régénération musculaire après une lésion induite par un traitement à la cardiotoxine.

Afin de comprendre le rôle des androgènes et de leur récepteur dans les cellules satellites sur le contrôle de la régénération musculaire, nous avons induit une lésion musculaire. Pour cela, les souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} sont traitées avec de la cardiotoxine (CDTX), un peptide isolé du venin de cobra *Naja mossambica mossambica* afin d'induire la régénération.

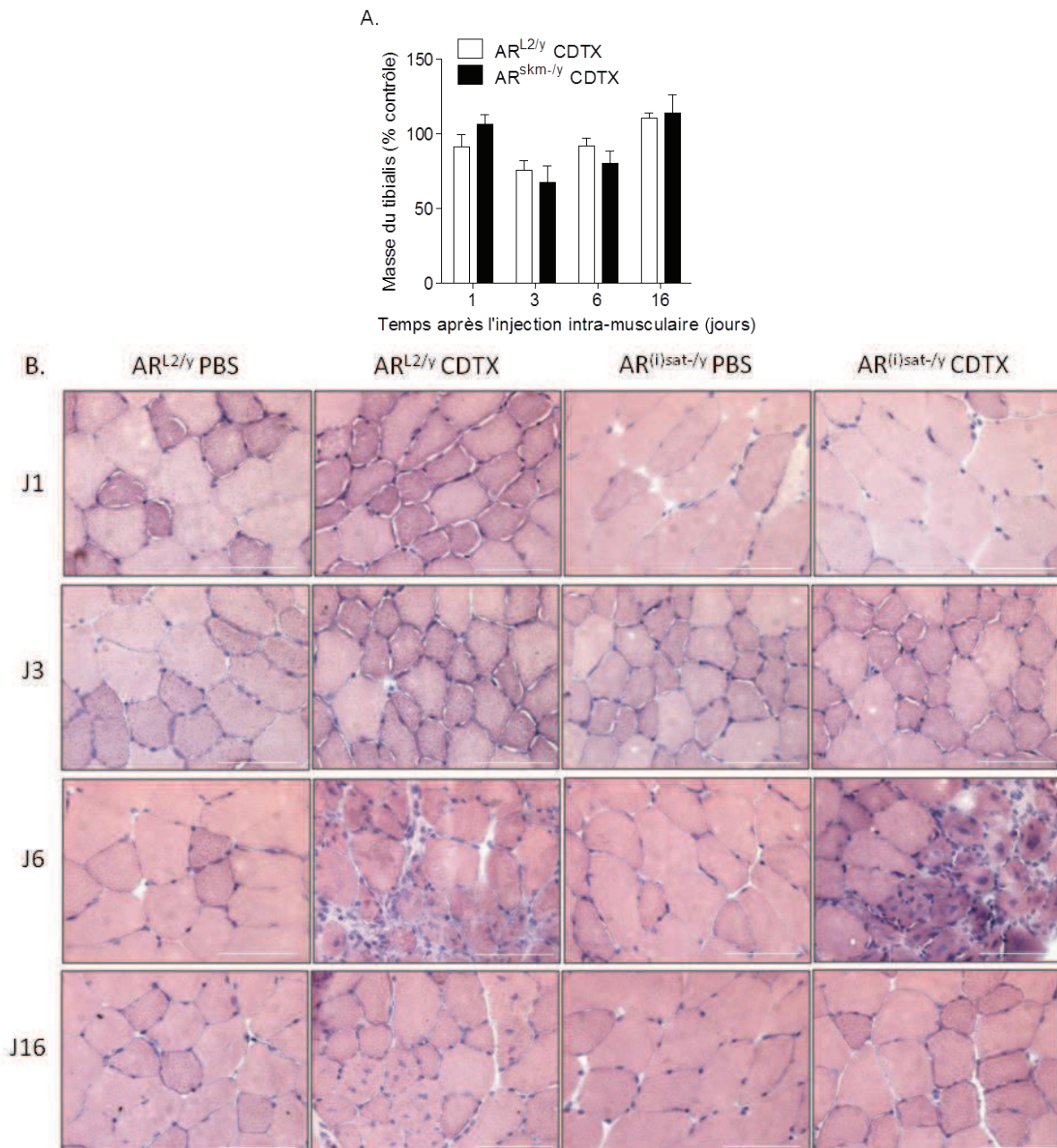
Des souris sont anesthésiées et un tibialis est injecté en intra-musculaire avec de la CDTX et le second avec du PBS. Les muscles ont été prélevés et analysés 1, 3, 6 et 16 jours après l'injection. On constate que trois jours après le traitement il y a une diminution du poids du tibialis des souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y}. Dès le 6ème jour après l'injection, le poids des tibialis réaugmentent. 16 jours après l'injection, le poids du tibialis est similaire à celui un jour après le traitement (figure 61A). Ces résultats montrent que la dégénérescence a lieu jusqu'au 6ème jour où le muscle commence à régénérer pour atteindre un poids similaire à celui du contrôle. Il n'y a pas de différence du poids des tibialis des souris AR^{(i)sat-/y} au cours du traitement comparées aux souris AR^{L2/y}.

Nos résultats permettent de conclure que le RA dans les cellules satellites ne contrôle pas la masse musculaire au cours de la régénération.

Les tibialis ont été analysé à l'aide d'une coloration Hématoxiline-Eosine. Après les premiers jours de traitement à la CDTX, aucun défaut des fibres n'est observé. A partir de trois jours après l'injection, on observe un début d'infiltration (figure 61B) chez les souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} traitées à la CDTX. Six jours après l'injection de CDTX, on retrouve des cellules mononuclées non musculaires infiltrées et on commence à apercevoir des petites cellules musculaires avec un noyau central (figure 61B). Seize jours après l'injection, les souris AR^{L2/y} présentent toujours quelques petites cellules en cours de régénération avec un noyau central, ce qui n'est pas le cas pour les fibres musculaires des souris AR^{(i)sat-/y} (figure 61B). Les tibialis des souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} traitées à la CDTX, ne présentent pas de différences histologiques majeures.

Nous avons analysé l'expression des transcrits de gènes codant pour des protéines impliquées dans la dégénérescence et la régénération musculaire. 24 heures après l'injection de CDTX, il y a une tendance à la diminution du niveau d'expression du transcrit de la

myostatine, un inhibiteur de la prolifération des cellules satellites pendant la dégénérescence chez les souris $AR^{L2/y}$. Dès le 3^{ème} jour, les transcrits de Pax7 et de la forme embryonnaire de MHC sont surexprimés après une lésion induite par une injection de CDTX (figure 61C) chez les contrôles. Ceci marque le début de la régénération. Ces gènes sont encore fortement induits six jours après le traitement chez les contrôles. Puis le 6^{ème} jour après l'induction de dommage musculaire, il y a une surexpression de MyoD et de la Myogénine, marqueur de la différenciation. L'expression de la Desmine est dérégulée le 3^{ème} jour, mais retrouve le même niveau que les souris traitées au PBS dès le 6^{ème} jour.



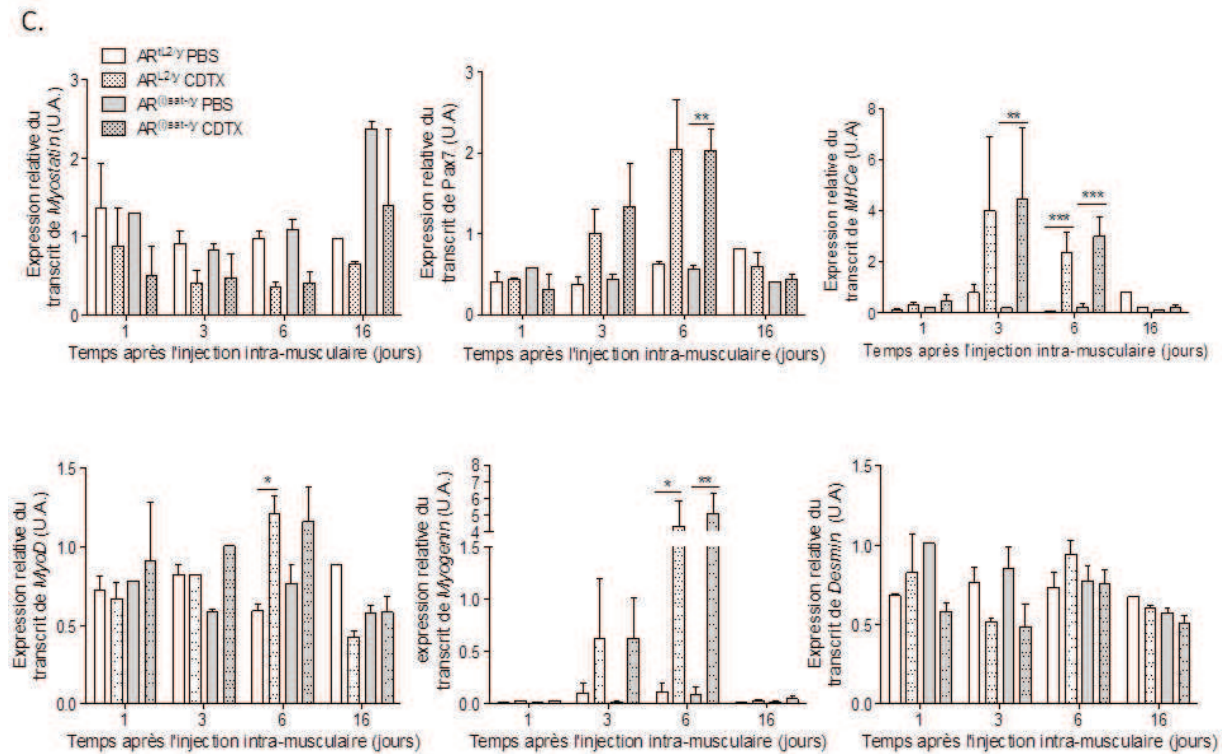


Figure 61. Effet d'un traitement à la cardiotoxine sur la régénération musculaire.

- A. Masse du tibialis des souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} 1 (n=2 par condition), 3 (n=3 et n=2 respectivement par condition), 6 (n=4 par condition) et 16 jours (n=3 et n=2 respectivement par condition) après une injection intramusculaire de cardiotoxine (CDTX) exprimé en % du poids du tibialis injecté au PBS.
- B. Coloration Hematoxiline-Eosine sur des coupes transversales de tibialis de souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y} 1, 3, 6 et 16 jours après une injection intramusculaire de cardiotoxine ou de PBS. La barre représente 100 μ m.
- C. Niveau d'expression relatif des principaux gènes impliqués dans la différenciation et la régénération musculaire.
- *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001. Les barres représentent les moyennes +/- SEM.
- U.A, Unité Arbitraire.

Tous ces gènes sont induits de façon similaire à ce qui est décrit dans la littérature (Chargé and Rudnicki, 2004) après un traitement à la CDTX. Aucune différence d'expression de ces gènes n'est observée chez les souris AR^{(i)sat-/y}.

Donc le RA dans les cellules satellites ne semble pas jouer un rôle dans la régénération musculaire induite par un traitement à la CDTX.

6.5 Effet d'un traitement androgénique sur la régulation de la force et de la masse musculaire des souris AR^{L2/y} et AR^{(i)sat-/y}.

L'ablation du RA dans les cellules satellites n'entraîne pas de défaut de la force ou de la masse musculaire. Nous avons traité des souris pendant un mois avec de la nandrolone afin de comprendre le rôle des androgènes dans les cellules satellites.

Chez les souris contrôles $AR^{L2/y}$, on observe une faible augmentation de la force d'agrippement de 9% après deux semaines de traitement à la nandrolone (figure 62A). Il faut noter que la force des souris $AR^{(i)sat-/y}$ augmente après un traitement à l'huile comme à la nandrolone, c'est pourquoi il n'y a pas de différence de la force entre les souris $AR^{(i)sat-/y}$ traité à la nandrolone et les souris traitées avec le véhicule.

On constate également une tendance à l'augmentation du poids du tibialis et du BC chez les souris $AR^{L2/y}$ traitées à la nandrolone comparées aux souris traitées avec le véhicule (figure 62B). Il y a une très légère tendance à l'augmentation du poids du tibialis et du BC chez les souris $AR^{(i)sat-/y}$ après un traitement à la nandrolone (figure 62B).

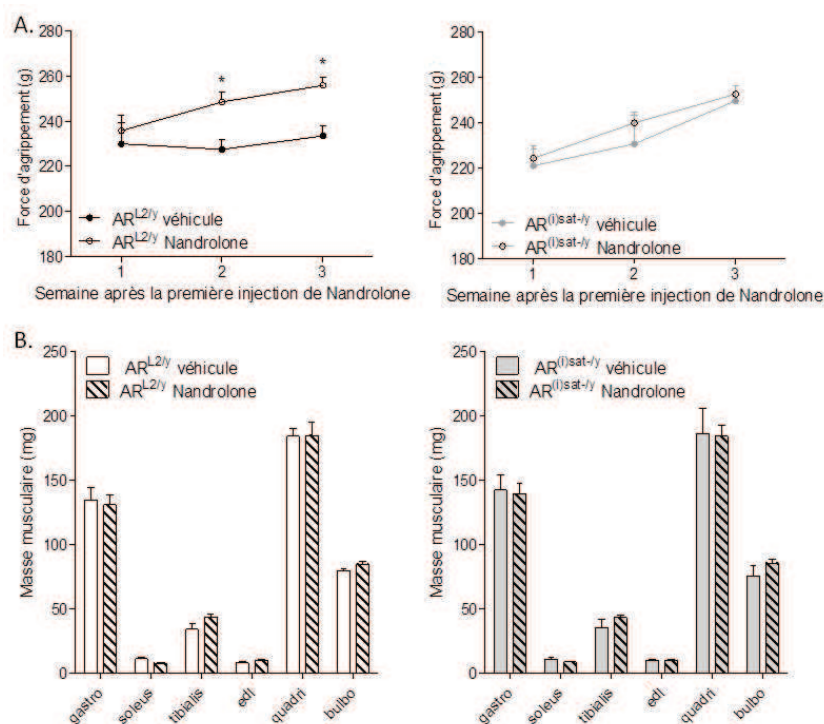


Figure 62. Rôle du RA dans les cellules satellites sur le contrôle de la masse et de la force musculaire après un traitement androgénique.

- Force d'agrippement des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)sat-/y}$ durant un mois de traitement à la Nandrolone ou à l'huile (véhicule).
- Masse musculaire chez les souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)sat-/y}$ après un mois de traitement à la Nandrolone ou à l'huile (véhicule).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM. $n=5$ et 3 pour les souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)sat-/y}$ respectivement traitées à l'huile. $n = 8$ et 10 pour les souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)sat-/y}$ respectivement traitées à la nandrolone.

Donc le RA ne contrôle pas la masse musculaire lors d'une supplémentation androgénique.

6.6 Analyse moléculaire après un mois de traitement à la nandrolone des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)sat-/y}$.

Une analyse de l'expression des transcrits des gènes impliqués dans la régulation de la masse musculaire a été réalisée sur le tibialis des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)sat-/y}$.

Nous n'avons observé aucune différence de l'expression des transcrits d'IGF1 (figure 63) après un traitement à la nandrolone. Nous ne reproduisons pas les résultats précédemment obtenu sur les muscles gastrocnémien des souris $AR^{L2/y}$ traitées à la nandrolone (figure 52). Or, l'induction d'IGF1 après un traitement à la nandrolone sur des souris $AR^{L2/y}$ (figure 52) est en accord avec le fait qu'IGF1 est connu pour être un médiateur des effets anaboliques dans le muscle squelettique (Lewis et al., 2002; Serra et al., 2011).

L'expression de la myostatine diminue de 60% chez les souris $AR^{(i)sat-/y}$ comparées aux souris $AR^{L2/y}$. En revanche, l'expression du transcrit de la myostatine chez les souris $AR^{(i)sat-/y}$ est similaire à celle observée chez les souris $AR^{L2/y}$ après un traitement à la nandrolone (figure 63). La myostatine est un régulateur négatif de la masse musculaire.

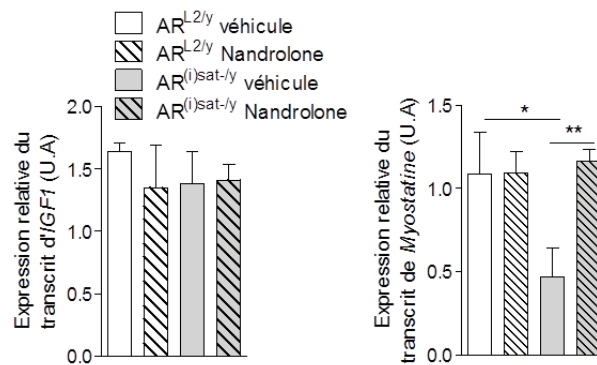


Figure 63. Niveau d'expression des gènes impliqués dans la régulation de la masse musculaire après un traitement androgénique.

Niveau d'expression relative des transcrits d'IGF et de la myostatine dans le tibialis de souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)sat-/y}$ traitées un mois à la nandrolone ou au véhicule (huile). $n=4$ et 3 pour les souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)sat-/y}$ respectivement traitées à l'huile. $n=9$ et 8 pour les souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{(i)sat-/y}$ respectivement traitées à la nandrolone.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$. Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM. U.A, Unité Arbitraire.

Un traitement à la nandrolone permet de compenser la perte d'expression de la myostatine induite par une absence du RA dans les cellules satellites.

On peut donc conclure que le RA dans les cellules satellites est nécessaire à l'expression de la myostatine. Ceci est en accord avec les résultats récents de (Dubois et al., 2014). Cependant, leur modèle ne permet pas l'excision du RA uniquement dans les cellules satellites mais ce dernier est également excisé dans les cellules qui en dérivent.

Partie 2. Rôle des androgènes dans la régulation de l'autophagie.

7 Analyse du transcriptome des souris $AR^{skm-/y}$ comparées aux souris $AR^{L2/y}$.

Afin de mieux comprendre le rôle des androgènes via leur récepteur dans les myofibres, un transcriptome a été réalisé sur des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$. Peu de gènes ont été mis en évidence comme dérégulés en absence du RA dans les myofibres. Seuls trois sont fortement sous-régulés : l'ornithine decarboxylase 1 (ODC1), la spermine oxidase (SMOX) et l'adenosylmethionine decarboxylase 1 (AMD1). Ces gènes codent pour des enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines (PA) : putrescine, spermidine et spermine (figure 64A). De plus, une autre enzyme est importante dans la synthèse et la dégradation des PA, SSAT (spermidine/spermine N-1 acetyl transferase).

7.1 En condition basale.

Les niveaux des transcrits d'ODC1, d'AMD et de SMOX sont similaires chez les souris HSA-Cre comparées aux souris $AR^{L2/y}$. L'expression des transcrits de ces gènes est diminuée de 67%, 82% et 72%, respectivement chez les souris $AR^{skm-/y}$ par rapport aux souris $AR^{L2/y}$ (figure 64B) confirmant les résultats obtenus avec le transcriptome.

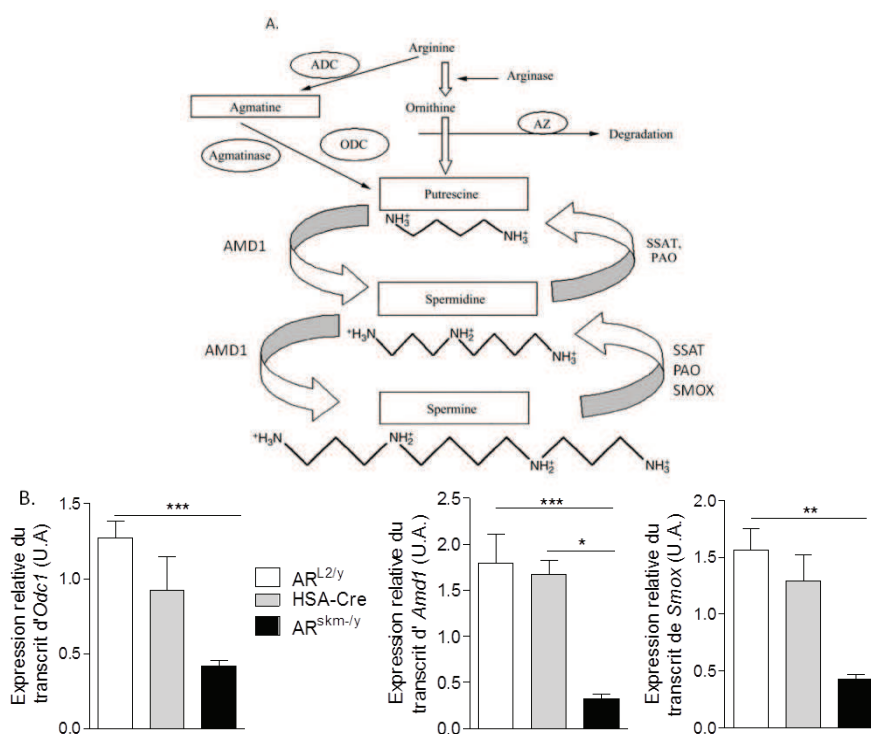


Figure 64. Voie de synthèse des polyamines et niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans leur synthèse en conditions basales.

- A. Schéma expliquant la synthèse et l'interconversion des différentes polyamines extrait de Childs et al., 2003.
- B. Niveau d'expression relative d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX dans le muscle gastrocnémien de souris AR^{L2/y} (n<10), HSA-Cre (n=2) et AR^{skm-/y} (n<10).

*p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001. Les barres représentent les moyennes +/- l'erreur standard de la moyenne. U.A, Unité Arbitraire.

Donc les androgènes via leur récepteur dans les myofibres contrôlent l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des PA.

7.2 Effet d'un traitement androgénique à court terme sur la régulation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines.

Des souris de types sauvages (WT) ont été traitées trois jours avec 10 mg/kg de nandrolone et sacrifiées 24h après la dernière injection. Nous avons étudié l'effet d'une supplémentation androgénique sur la régulation des niveaux d'expression des transcrits d'ODC1, AMD1 et SMOX.

Dans le muscle BC, très sensible aux androgènes, on observe une augmentation de l'expression des transcrits du RA et d'ODC1 après un traitement à la nandrolone (63% et plus de 90% respectivement, figure 65A). Donc notre traitement aux androgènes est efficace. Dans le muscle gastrocnémien, les souris traitées à la nandrolone pendant trois jours présentent une augmentation de l'expression du transcrit d'ODC1 de 30% par rapport aux souris traitées à l'huile (figure 65B). Nous n'observons pas de différence d'expression d'AMD1 et de SMOX après le traitement à la nandrolone dans le BC ou le muscle gastrocnémien.

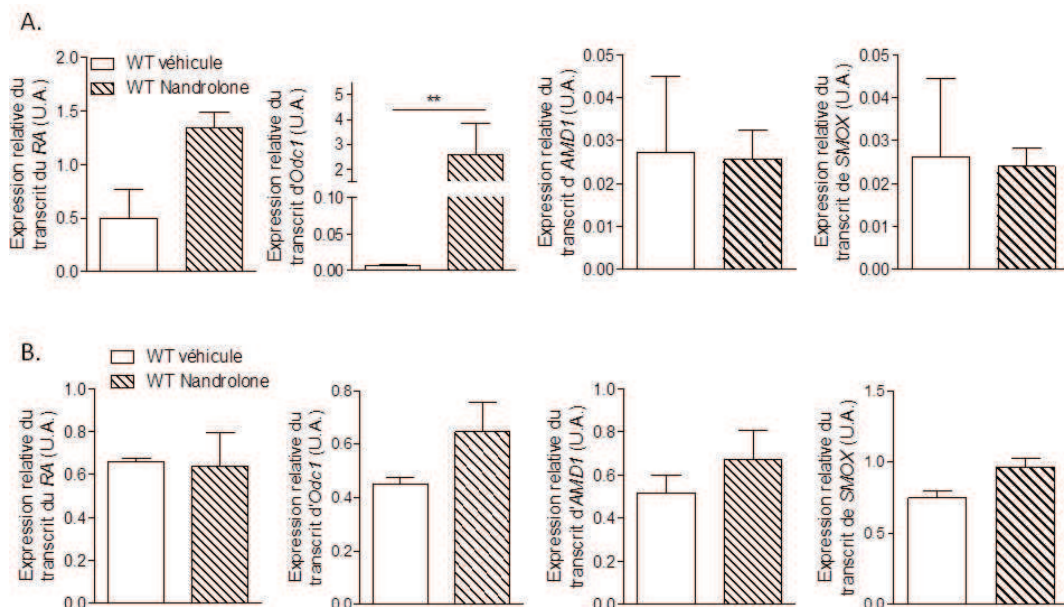


Figure 65. Niveau d'expression des transcrits du RA et des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines après un traitement androgénique court.

- A. Niveau d'expression du RA, d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX dans le muscle bulbo-caverneux de souris de types sauvages (WT) âgées de 15 semaines traitées trois jours avec de la nandrolone (n=3 ; 10 mg/kg de souris) ou le véhicule (n=2 ; huile).

B. Niveau d'expression du RA, d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX dans le muscle gastrocnémien de souris de types sauvages (WT) âgées de 15 semaines traitées trois jours avec de la nandrolone (n=3 ; 10 mg/kg de souris) ou le véhicule (n=2 ; huile).

Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM. U.A, Unité arbitraire.

Donc un traitement androgénique court entraine une induction de l'expression du RA et d'ODC1 dans le BC.

7.3 Effet d'un traitement androgénique à long terme sur la régulation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines.

Afin de connaître l'effet d'un traitement androgénique long, des souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ ont été traitées à la nandrolone deux fois par semaine par injection en sous cutanée pendant un mois.

Il y a une tendance à l'augmentation de l'expression du transcrit d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX dans le muscle gastrocnémien des souris $AR^{L2/y}$ traitées à la nandrolone (figure 66). L'expression d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX est diminuée chez les souris $AR^{skm-/y}$ (figure 66) confirmant nos résultats à l'état basal (figure 64B). Après un traitement d'un mois à la nandrolone, il n'y a pas d'induction de l'expression du transcrit de ces gènes chez les souris $AR^{skm-/y}$.

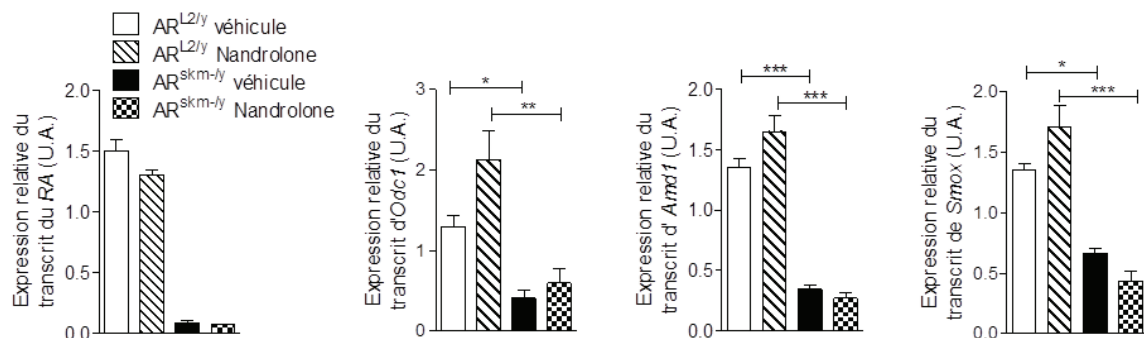


Figure 66. Niveau d'expression des transcrits du RA et des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines après un traitement d'un mois à la nandrolone.

Niveau d'expression relative du RA, d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX dans le muscle gastrocnémien des souris $AR^{L2/y}$ (n=4 à 6) et $AR^{skm-/y}$ (n=3 à 5) âgées de 17 semaines après un traitement d'un mois à l'huile ou à la nandrolone.

*p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001. Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM. U.A, Unité Arbitraire.

Donc, le RA dans les myofibres est nécessaire à l'expression de ces gènes.

7.4 Effet d'un traitement androgénique long après une castration sur la régulation des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines.

Afin de déterminer le rôle des androgènes dans la synthèse des polyamines, des souris sauvages ont été castrées afin de supprimer les niveaux d'androgènes endogènes, puis traitées avec 10 mg/kg de nandrolone deux fois par semaines pendant un mois.

Après une castration, un traitement androgénique ou une castration supplémentée à un traitement androgénique on constate que l'expression du RA tend à diminuer mais de manière non significative (figure 67). Les niveaux d'expression des transcrits d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX ne sont pas augmentés après un traitement d'un mois à la nandrolone. En revanche, lorsque les souris sont castrées, l'expression de ces trois gènes est diminuée d'environ 80% (figure 67). Lorsque les souris castrées sont traitées à la nandrolone pendant un mois, les niveaux d'expression des transcrit d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX sont similaires aux niveaux d'expression des souris non castrées (figure 67).

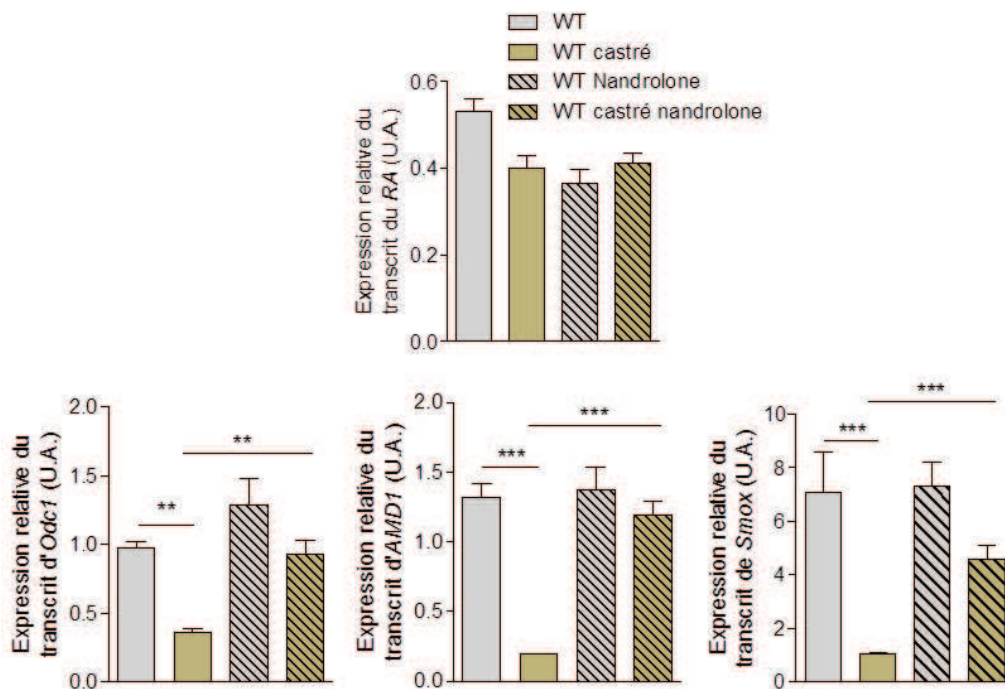


Figure 67. Niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes responsable de la synthèse des PA après une castration suivie d'un traitement androgénique.

Niveau d'expression relative du RA, d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX dans le muscle gastrocnémien des souris contrôles âgées de 17 semaines un mois après castration traitées ou non à la nandrolone (10 mg/kg) pendant un mois.

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM. U.A, Unité Arbitraire.

Ces résultats confirment que les androgènes via leur récepteur dans les myofibres contrôlent l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines.

De plus, il est connu que les gènes ODC1, AMD1 et SMOX possèdent des séquences ARE.

7.5 Etude métabolomique.

L'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines est dérégulée. Afin de connaître l'effet sur la quantité des différentes PA, une étude métabolomique a été réalisée dans le muscle gastrocnémien des souris $AR^{L2/y}$, HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$ âgées de 15 semaines.

Etonnamment, aucune différence des niveaux des PA (putrescine, spermidine, spermine) dans le muscle gastrocnémien chez les souris $AR^{skm-/y}$ (figure 68A). En revanche, cette analyse nous a permis de mettre en évidence que les niveaux de carnosine et de sarcosine, deux dérivés d'acides aminés, sont diminués de 60 % et 68 % respectivement dans le muscle gastrocnémien des souris $AR^{skm-/y}$ comparées aux souris HSA-Cre et $AR^{L2/y}$ (figure 68B). De plus, le niveau d'un troisième dérivé d'acides aminés, la méthionine-sulfoxyde est augmenté de plus de 50 % chez les souris $AR^{skm-/y}$ comparées aux souris contrôles HSA-Cre et $AR^{L2/y}$ (figure 68B). La concentration de ces trois molécules dans le muscle gastrocnémien des souris HSA-Cre est comparable à celle dans le muscle des souris $AR^{L2/y}$. Parmi 200 molécules testées, seules ces trois molécules ont des concentrations différentes dans le muscle gastrocnémien des souris $AR^{skm-/y}$ comparées aux souris $AR^{L2/y}$ et HSA-Cre (résultats non présentés).

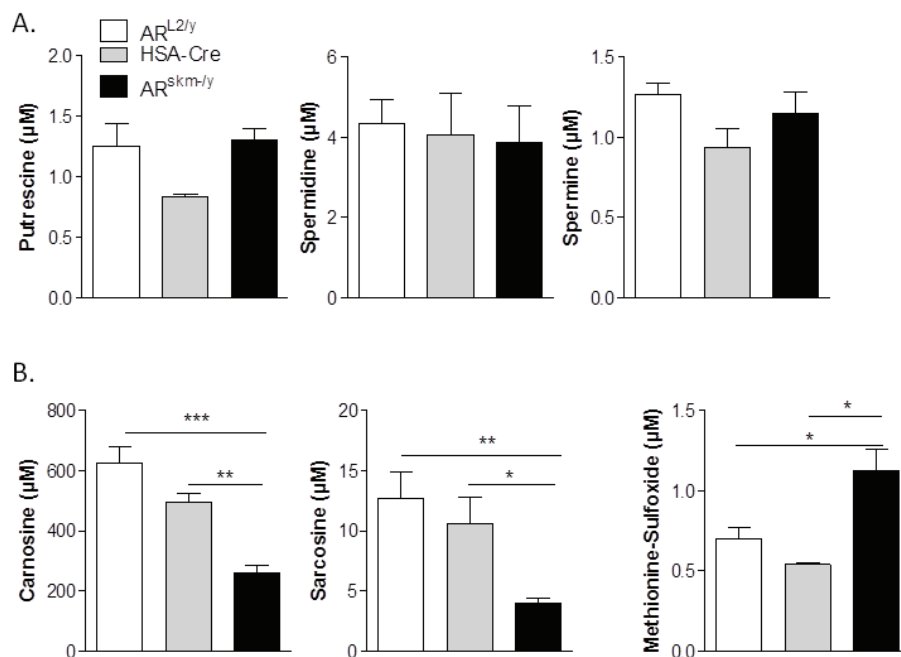


Figure 68. Analyse métabolomique du muscle gastrocnémien chez les souris $AR^{L2/y}$, HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$ âgées de 15 semaines.

- A. Concentration des différentes polyamines dans le muscle gastrocnémien des souris $AR^{L2/y}$, HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$ âgées de 15 semaines.
- B. Concentration de la carnosine, de la sarcosine et de la méthionine-sulfoxyde chez les souris $AR^{L2/y}$, HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$ âgées de 15 semaines.
- Les barres représentent les moyennes +/- SEM. n= 3 par groupe.

Donc les androgènes via leur récepteur dans les myofibres contrôlent l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines. Néanmoins, ceci

n'altère pas la quantité des PA dans le muscle gastrocnémien. En revanche, les androgènes grâce à leur récepteur dans les myofibres contrôlent les niveaux des dérivés d'acides aminés carnosine, sarcosine et méthionine-sulfoxyde.

7.6 Rôle du RA dans la régulation de l'autophagie.

Masiero et collaborateurs ont montré qu'un défaut d'autophagie entraîne une diminution de la force musculaire (Masiero et al., 2009). De plus, de nombreuses études ont été réalisées, notamment sur la levure *Saccharomyces Cerevisiae*. Il a été montré que les polyamines régulent l'autophagie (Eisenberg et al., 2009b).

L'initiation de l'autophagie se fait par la formation d'un conjugué formé des protéines atg5-atg12. Il va permettre le recrutement d'un deuxième conjugué sur l'autophagosome en formation et être recyclé vers le cytosol. Ce deuxième conjugué provient de la conjugaison de la protéine atg8 (ou LC3) à la phosphatidyléthanolamine (PE) ce qui lui permet de s'incorporer dans la membrane du pré-autophagosome. Donc LC3 existe sous forme cytosolique (LC3-I) ou associé à l'autophagosome (LC3-II). La conversion de LC3-I en LC3-II est donc un bon marqueur de l'autophagie.

Afin de savoir si l'autophagie est dérégulée en l'absence du RA dans les myofibres, nous avons analysé les niveaux de LC3-I et LC3-II sur les souris $AR^{L2/y}$, HSA-Cre et $AR^{skm-/y}$ à l'état basal.

Les niveaux de LC3-II sont augmentés chez les souris HSA-Cre par rapport au niveau chez les souris $AR^{L2/y}$. Les niveaux de LC3-II sont également augmentés chez les souris $AR^{skm-/y}$ comparées aux souris $AR^{L2/y}$ mais de manière plus importante que chez les souris HSA-Cre (figure 69A et B). Le rapport du niveau de LC3-I sur LC3-II est diminué chez les souris HSA-Cre et à plus de 90% chez les $AR^{skm-/y}$ par rapport aux souris $AR^{L2/y}$.

L'autophagie est donc induite de façon plus importante chez les souris $AR^{skm-/y}$ par rapport aux souris HSA-Cre. Donc le RA dans les myofibres régule l'autophagie. Bien que les niveaux d'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des PA soient diminués en l'absence du RA dans les myofibres, le taux des PA dans le muscle gastrocnémien est inchangé. L'induction de l'autophagie en l'absence du RA dans les myofibres ne peut donc pas s'expliquer par une dérégulation des niveaux de PA.

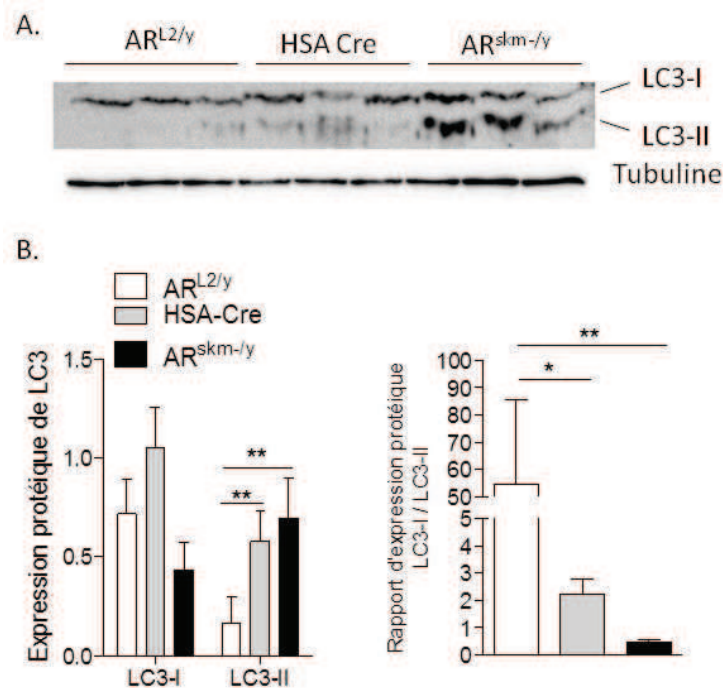


Figure 69. Étude de l'autophagie.

- A. Western blot représentatif du niveau d'expression protéique de LC3-I et LC3-II sur des souris AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y}.
- B. Quantification des niveaux d'expression protéique de LC3-I et LC3-II sur des souris AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y} et rapport des niveaux protéiques de LC3-I/LC3-II.
- n=5 par groupe. Les barres représentent les moyennes +/- l'erreur standard. *p<0.05 ; **p<0.01.

Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'induction de l'autophagie en présence du transgène HSA-Cre et de l'absence du RA dans les myofibres, l'expression des protéines impliquées dans la régulation de l'autophagie a été étudiée.

La protéine mTOR est un régulateur du processus autophagique. mTOR activée inhibe la voie de l'autophagie. Son inactivation (suite à une mise à jeun par exemple) permet de lever cette inhibition et d'induire l'autophagie. Nous n'avons pas observé de différence dans l'expression des protéines mTOR et pmTOR chez les souris AR^{skm-/y} comparées aux souris AR^{L2/y} (figure 70A).

La voie mTOR n'est pas impliquée dans l'activation de l'autophagie induite en l'absence du RA dans les myofibres.

Nous avons testé d'autres voies permettant la régulation de l'autophagie comme Beclin 1 et ULK. Beclin 1 est responsable de l'initiation de l'autophagie. Ici, il y a une légère augmentation de l'expression protéique de Beclin 1 et pas de différence de l'expression de pULK chez les souris AR^{skm-/y} comparées aux souris AR^{L2/y} (figure 70B). En revanche, AMPK (protéine kinase activée par AMP) est augmenté de 37% chez les souris AR^{skm-/y} comparées aux souris AR^{L2/y} et HSA-Cre.

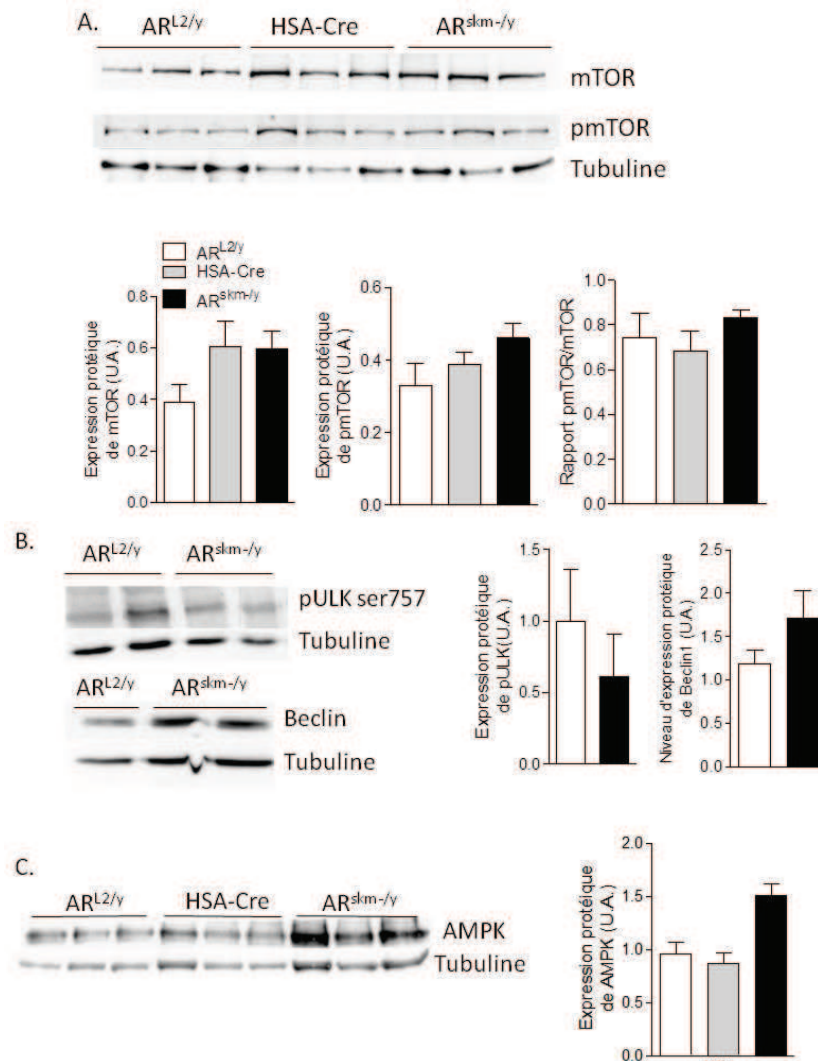


Figure 70. Analyse des voies impliquées dans la régulation de l'autophagie.

- A. Western blot représentatif des niveaux d'expression protéique de mTOR et pmTOR et leur quantification normalisée avec la tubuline chez les souris AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y}. Les barres représentent les moyennes +/- l'erreur standard de la moyenne. n=6 par groupe.
- B. Western blot représentatif des niveaux d'expression protéique de pULK et Beclin1 et leur quantification normalisée avec la tubuline chez les souris AR^{L2/y} et AR^{skm-/y}. Les barres représentent les moyennes +/- l'erreur standard de la moyenne. n=2 par groupe.
- Western blot représentatif des niveaux d'expression protéique d'AMPK et sa quantification normalisée avec la tubuline chez les souris AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y}. Les barres représentent les moyennes +/- SEM. n=3 par groupe. U.A, Unité Arbitraire.

Donc l'augmentation des niveaux d'AMPK uniquement chez les souris AR^{skm-/y} peut expliquer l'induction de l'autophagie. Cependant, il faudra vérifier les niveaux de pAMPK. De plus, il existe d'autre fonction d'AMPK comme la régulation de l'utilisation du glucose ou l'inhibition de la synthèse de glycogène. Ceci sera étudié dans la partie 3.

Nous nous sommes alors intéressés à l'autophagie induite par une mise à jeun et nous avons étudié l'impact sur le RA.

7.7 En condition de stress induit par une mise à jeun.

La mise à jeun est un modèle connu pour induire l'autophagie. Nous avons donc mis les souris $AR^{L2/y}$ à jeun afin de déterminer si les androgènes jouent un rôle dans la régulation de l'autophagie induite par une mise à jeun.

Nous avons montré que le niveau d'expression des transcrits du RA des souris $AR^{L2/y}$ est diminué de 20% après 24 heures de mise à jeun et de 58% après une mise à jeun de trois jours (figure 71A). Au niveau protéique, il y a une diminution de 70% du RA après 24h et trois jours de mise à jeun, atteignant un niveau proche de celui observé chez les souris $AR^{skm-/y}$ (figure 71B et C). Cette diminution de l'expression a été confirmée en immunohistologie avec un anticorps dirigé spécifiquement contre le RA, après trois jours de mise à jeun (figure 71D).

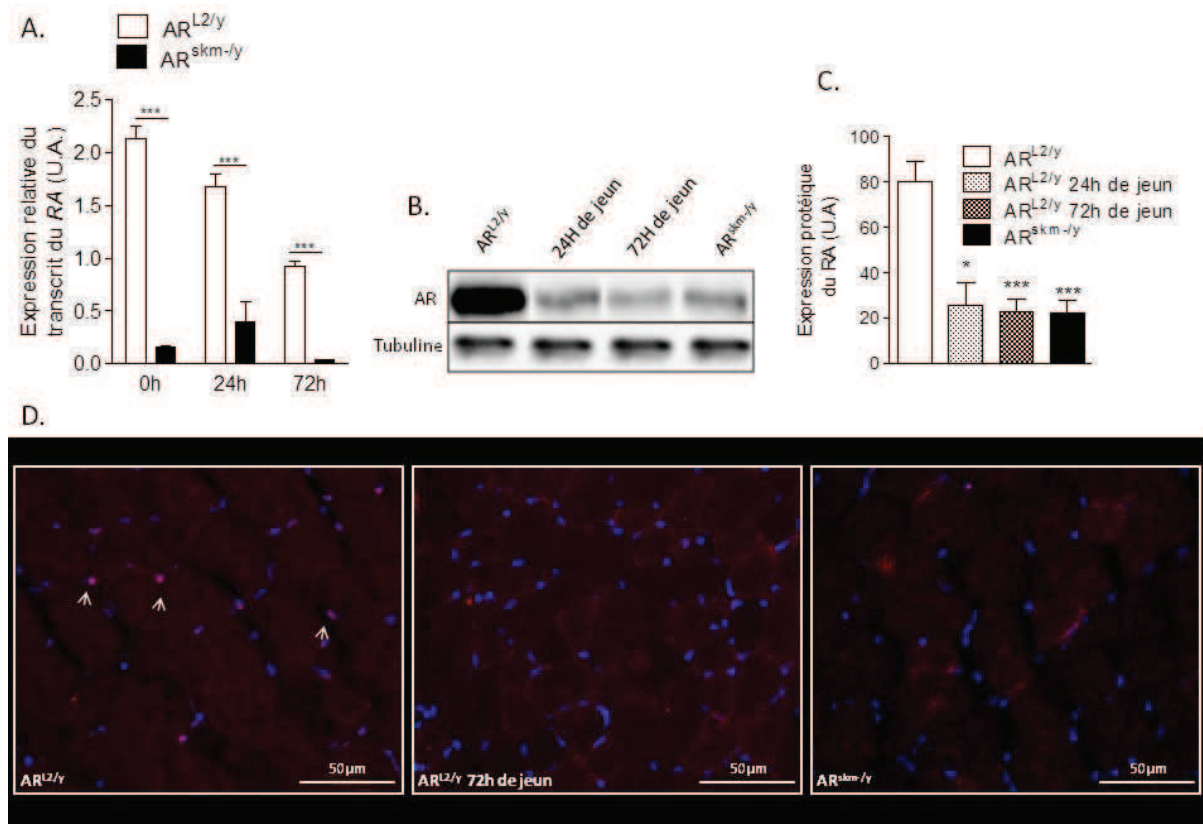


Figure 71. Niveau d'expression du RA après un stress induit par une mise à jeun.

- Niveau d'expression relative du RA chez les souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ en condition basale (n=20 et 23 respectivement) et après mise à jeun de 24h (n=8 et 9 respectivement) ou 72h (n=3).
- Western blot représentatif du niveau d'expression du RA en condition basal et après 24h ou 72h de mise à jeun des souris $AR^{L2/y}$.
- Quantification relative du niveau d'expression protéique du RA en condition basal et après 24h ou 72h de mise à jeun des souris $AR^{L2/y}$. U.A, Unité Arbitraire.
- Immunohistologie sur une coupe transversale du muscle gastrocnémien de souris âgées de 15 semaines en condition basal ou après 72h de mise à jeun d'une souris $AR^{L2/y}$.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM.

Donc, nous avons montré qu'un stress induit par une mise à jeun entraîne une perte du RA.

Vu que les androgènes contrôlent l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines et que leur RA est diminué pendant l'autophagie induite par une mise à jeun, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression des transcrits de ces enzymes pendant un jeun. L'expression d'ODC1 est augmentée chez les souris $AR^{L2/y}$ (environ 50%) et $AR^{skm-/y}$ (environ 80%) après 24, 48 et 72h de mise à jeun (figure 72). Donc le niveau d'ODC1 varie indépendamment de l'expression du RA pendant une mise à jeun. Les niveaux d'expression du transcrit d'AMD1 sont diminués chez les souris contrôles après 24, 48 et 72h de mise à jeun (de 90, 40 et 85% respectivement). Le niveau de transcrit d'AMD1 est également diminué après 24h et 72h de mise à jeun chez les souris $AR^{skm-/y}$. La quantité d'ARNm de SMOX est diminuée de 90% chez les souris $AR^{L2/y}$ après 24 et 72h de mise à jeun. Chez les souris $AR^{skm-/y}$, la diminution par rapport aux souris nourries est de 90% à 24h et 70% après une mise à jeun de 72H (figure 72). L'expression des transcrits d'AMD1 et de SMOX est diminuée de la même façon que celle du RA pendant une mise à jeun.

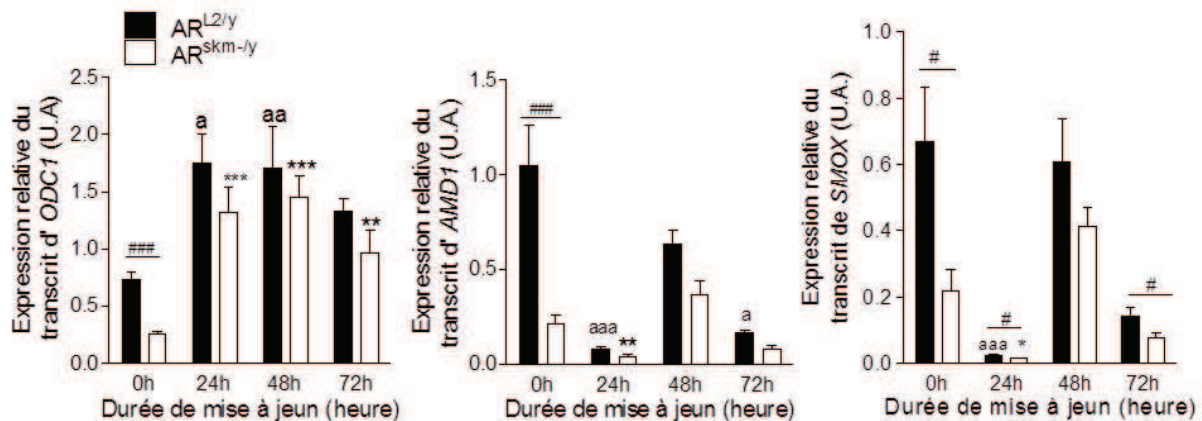


Figure 72. Niveau d'expression des polyamines et des gènes codant pour les enzymes impliquées dans leur synthèse en condition de stress induit par une mise à jeun.

Niveau d'expression relative des transcrits des gènes ODC1, AMD1 et SMOX dans le muscle gastrocnémien de souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ après 0, 24, 48h ou 72h de mise à jeun.

^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$ différences significatives entre les souris $AR^{L2/y}$ mises à jeun et nourries.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ différences significatives entre les souris $AR^{skm-/y}$ mises à jeun et nourries.

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ différences significatives entre les souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ au même temps.

Les barres représentent les moyennes $\pm$ SEM. U.A., Unité Arbitraire.

Donc l'induction de l'autophagie par une mise à jeun entraîne une diminution de l'expression de RA qui régule l'expression d'AMD et SMOX comme à l'état basal. En revanche ODC1 n'est pas régulé par le RA dans ces conditions. Donc le mécanisme permettant la régulation d'ODC1 est différent en condition basal et en condition de stress induit par une mise à jeun.

Partie 3 : Rôle des androgènes dans le métabolisme du glucose.

Il a été montré qu'il existe un lien entre les niveaux d'androgènes et le métabolisme du glucose (Ding et al., 2006; Liu et al., 2013). De plus, en analysant les voies susceptibles de réguler l'autophagie, nous avons constaté que les souris AR^{skm-/y} ont un niveau d'expression protéique d'AMPK plus élevé que les souris AR^{L2/y} et HSA-Cre. L'AMPK est impliquée dans le contrôle de mécanismes comme l'activation de la glycolyse ou l'inhibition de la synthèse d'acide gras.

Il a été montré qu'un changement dans le flux catabolique de polyamines via la surexpression de SSAT entraîne une diminution du niveau d'ATP, qui conduit à une induction d'AMPK. Ces souris sur-exprimant SSAT sont plus tolérantes au glucose et plus sensibles à l'insuline (Pirinen et al., 2007). Nos souris ne présentent pas de défaut des niveaux de PA dans le muscle gastrocnémien. Cependant, les gènes codant pour les enzymes impliquées dans leur synthèse étant dérégulé, cela pourrait entraîner un changement de l'expression de SSAT chez les souris AR^{skm-/y}.

8 Rôle des androgènes dans le métabolisme glucidique.

8.1 A l'état basal.

Les souris âgées de 15 semaines AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y} sont mises à jeun une nuit et le niveau de glucose sanguin est mesuré le lendemain matin. Les niveaux de glucose sont similaires chez les souris AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y} (figure 73A).

Donc dans ces conditions, le RA dans les myofibres ne régulent pas l'homéostasie du glucose.

8.2 Tolérance au glucose (IPGTT) et résistance à l'insuline (IPIST) chez les souris AR^{skm-/y}.

Les souris AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y} âgées de 17 ou 35 semaines sont mises à jeun une nuit avant de subir un test de tolérance au glucose. Après une injection intra-péritonéal d'un bolus de 2 mg de glucose / kg de souris, des échantillons de sang sont prélevés de la veine de la queue 0, 30, 45, 60 et 90 minutes après l'injection. Le glucose plasmatique est similaire entre les souris HSA-Cre et AR^{L2/y}. Cependant, les niveaux de glucose plasmatique sont plus élevés chez les souris AR^{skm-/y} comparées aux souris HSA-Cre et AR^{L2/y} à 17 semaines (figure 73B).

De plus, les niveaux plasmatiques de glucose après une mise à jeun de 7 heures suivie d'une injection d'insuline (0.036mg/kg de souris) sont plus élevés chez les souris AR^{skm-/y} comparées aux souris AR^{L2/y} et HSA-Cre à 17 semaines (figure 73C).

Cette diminution de la tolérance au glucose et de la résistance à l'insuline est temporaire puisqu'à 37 semaines, les niveaux de glucose plasmatique sont similaires chez les souris AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y}. Ce niveau est d'environ 400 mg/dl 30 minutes après l'injection de glucose ce qui correspond au niveau de glucose des souris AR^{skm-/y} jeunes (Figure 73B).

Cela peut s'expliquer par le fait que les souris sont plus âgées et donc ont un niveau d'androgènes plus faible Pour revue (Kaufman and Vermeulen, 2005)].

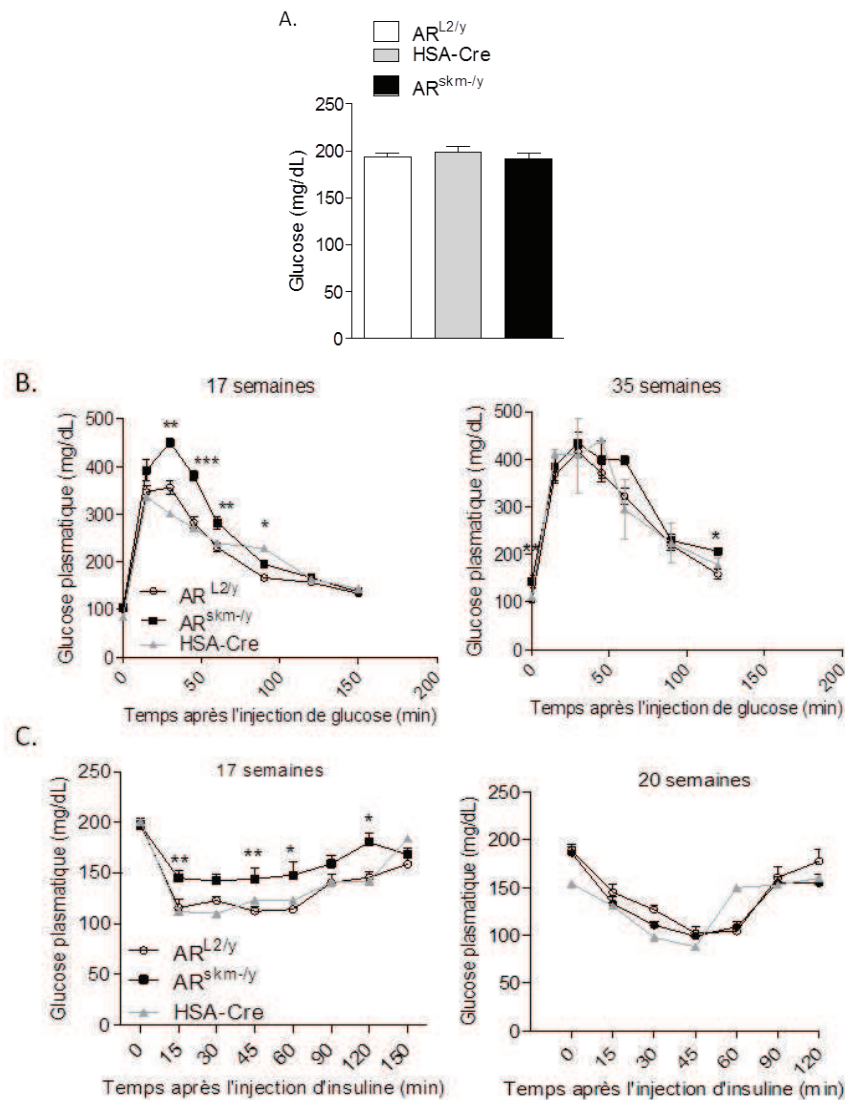


Figure 73. Niveau de glucose sanguin dans différentes conditions.

- A. Niveau de glucose sanguin chez les souris AR^{L2/y} (n<10), HSA-Cre (n=7) et AR^{skm-/y} (n<10). Les barres représentent les moyennes +/- SEM.
- B. Test de tolérance au glucose réalisé sur des souris AR^{L2/y}, HSA-Cre et AR^{skm-/y} âgées de 17 (n=26, 14 et 1 respectivement) et 35 semaines (n=13, 5 et 2 respectivement).
- C. Test de résistance à l'insuline réalisé sur des souris AR^{L2/y}, AR^{skm-/y} et HSA-Cre âgées de 17 (n=14, 11 et 1 respectivement) et 20 semaines (n=14, 10, 1 respectivement).

*p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001. Les symboles représentent les moyennes +/- SEM.

Donc au niveau basal, le RA n'est pas nécessaire au maintien des niveaux de glucose sanguin. En revanche, les souris AR^{skm-/y} sont intolérantes au glucose et résistantes à l'insuline. Donc nos résultats montrent que les androgènes via leur récepteur dans les myofibres sont nécessaires à la réabsorption du glucose dans des conditions riches en glucose ou en insuline.

8.3 Effet d'un traitement androgénique prolongé sur l'homéostasie du glucose.

Nous nous sommes intéressés à l'effet d'un traitement androgénique sur l'homéostasie du glucose.

Après un mois de traitement à la nandrolone, aucune différence des niveaux de glucose dans le sang au cours d'un test de tolérance au glucose ou de sensibilité à l'insuline n'est observées (figure 74A et B).

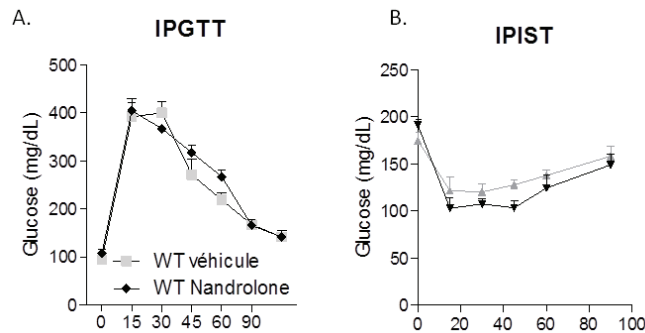


Figure 74. IPGTT et IPIST après un traitement d'un mois à la nandrolone.

Test de tolérance au glucose (A) et de résistance à l'insuline (B) sur des souris de type sauvage (WT) âgées de 14 semaines traitées à l'huile (véhicule ; n=3 à 4) ou à la nandrolone (10 mg/kg ; n=4 à 5) pendant un mois.

Donc un traitement androgénique ne modifie pas l'homéostasie du glucose bien, qu'une ablation du RA conduit à une intolérance au glucose et une hypersensibilité à l'insuline.

8.4 Effet d'une castration sur l'homéostasie du glucose.

Un mois après castration, nous avons soumis les souris à un test de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline. Nous n'avons pas observé de différence dans l'absorption du glucose (figure 75A). Après une injection d'insuline le taux de glucose sanguin varie très légèrement entre les souris castrées et non castrées (figure 75B).

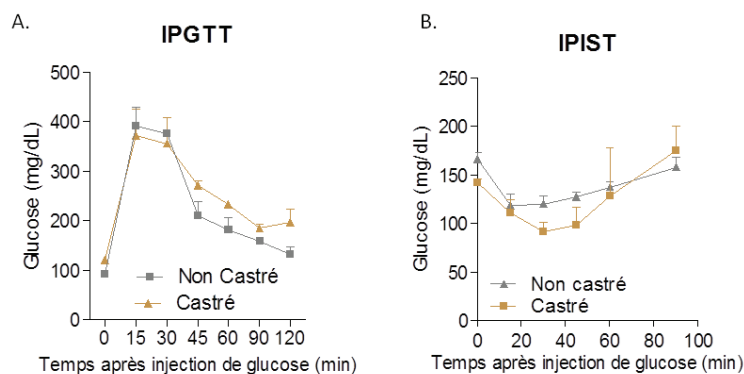


Figure 75. Effet d'une castration sur l'homéostasie du glucose.

Test de tolérance au glucose (A) et de résistance à l'insuline (B) sur des souris de type sauvage (WT) âgées de 14 semaines castrée (n=3 à 4) ou non (n=4 à 5).

Bien que l'ablation du RA dans les myofibres, conduise à un défaut dans la réabsorption du glucose, une castration d'un mois n'altère pas cette réabsorption. Ceci a également été montré par Morakinyo et collaborateurs sur des rats (Morakinyo et al., 2013).

8.5 Effet d'un traitement androgénique long après une castration sur l'homéostasie du glucose.

Afin de s'affranchir des niveaux d'androgènes endogènes, des souris castrées ont été traitées un mois à la nandrolone et soumises à un test de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline.

Lorsque les souris non castrées sont traitées à la nandrolone, nous n'observons aucune différence dans l'absorption du glucose (figure 76A et B). On constate que les souris castrées traitées à la nandrolone présentent un taux de glucose sanguin supérieur à celui des souris traitées à l'huile durant l'IPIST.

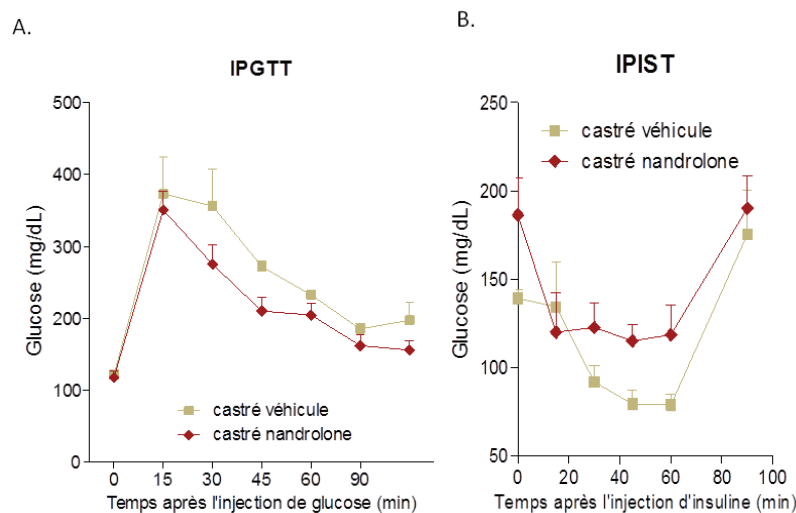


Figure 76. IPGTT et IPIST après un traitement d'un mois à la nandrolone sur des souris castrées.

- A. Test de tolérance au glucose réalisé sur des souris de type sauvage castrées et traitées un mois à la nandrolone ou à l'huile.
 - B. Test de sensibilité à l'insuline réalisé sur des souris de type sauvage castrées et traitées un mois à la nandrolone ou à l'huile.
- n=3 à 5 par groupe. Les points représentent les moyennes +/- SEM.

Donc le traitement à la nandrolone diminue la sensibilité à l'insuline et ramène le taux de glucose à un taux similaire à celui des souris non castrées (figure 76A et B). Lorsque l'on traite des souris à la nandrolone la réabsorption du glucose augmente chez les souris castrées (figure 76A et B).

9 Effet des androgènes via leur récepteur dans les myofibres sur la fonte musculaire induite par la dexaméthasone.

L'utilisation à long terme des glucocorticoïdes dans les traitements anti-inflammatoires est limitée, car ils induisent des effets secondaires importants, et notamment l'atrophie musculaire. Cette dernière est caractérisée par une diminution du niveau de protéines, du

diamètre des fibres, de la production de force et de la résistance à la fatigue. Le contrôle de la masse musculaire est déterminé par une balance entre les voies anaboliques permettant la synthèse de protéines et les voies cataboliques initiant le processus de dégradation des protéines (Hoffman and Nader, 2004).

9.1 Effet des GC sur la masse musculaire.

Les souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ sont injectées par voie intra-péritonéale avec 10 mg/kg de dexaméthasone et les souris $AR^{L2/y}$ avec le véhicule pendant deux jours à raison d'une injection par jour. Le troisième jour, les souris sont mis à mort et la rate, les muscles de la patte postérieure et le BC sont prélevés. La dexaméthasone induit une diminution de 35 % du poids de la rate de souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$ traitées à la dexaméthasone, comparées aux souris traitées au véhicule (Figure 77A). Ce qui signifie que le traitement est efficace conformément aux observations de Rooman et collaborateurs (Rooman et al., 1999) La dexaméthasone induit également une perte de la masse du muscle gastrocnémien des souris $AR^{L2/y}$, mais pas des souris $AR^{skm-/y}$ (Figure 77B). En revanche un traitement à la dexaméthasone n'induit pas d'atrophie du muscle BC chez les souris $AR^{L2/y}$. Le muscle BC n'est pas sensible à la dexaméthasone (figure 77B).

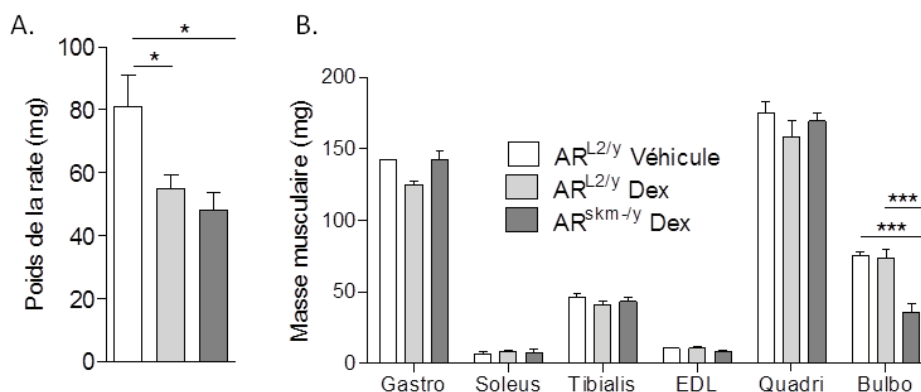


Figure 77. Effet d'un traitement de deux jours à la dexaméthasone sur la fonte musculaire en absence du RA dans les myofibres.

A. Poids de la rate des souris $AR^{L2/y}$ âgées de 22 semaines traitées à la dexaméthasone ou au véhicule et $AR^{skm-/y}$ traitées à la dexaméthasone.

B. Masse musculaire des souris $AR^{L2/y}$ âgées de 22 semaines traitées à la dexaméthasone ou au véhicule et $AR^{skm-/y}$ traitées à la dexaméthasone.

Les barres représentent les moyennes +/- l'erreur standard de la moyenne. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. $n = 3$ à 5.

Ainsi, le RA dans les myofibres est nécessaire pour permettre l'atrophie musculaire induite par les GC dans le muscle gastrocnémien.

9.2 Analyse moléculaire de l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes chez les souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$.

Afin de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de l'atrophie musculaire *in vivo* et de comprendre le rôle du RA dans les myofibres dans ce mécanisme, nous avons étudié l'expression relative de transcrits des gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies cataboliques via le système protéolytique.

Un traitement de deux jours à la dexaméthasone induit 3.5 fois l'expression d'une ubiquitine ligase E3 impliquée dans le système protéolytique, l'atrogine-1, chez les souris $AR^{L2/y}$ mais pas chez les souris $AR^{skm-/y}$ (figure 78A).

De plus, l'expression du facteur de transcription FoxO1 et FoxO3a (Figure 78B), connu pour activer ce système de dégradation protéique (Mammucari et al., 2007; Sandri et al., 2004) est augmentée d'un facteur 5 et 8 respectivement après deux jours de traitement à la dexaméthasone. Ces résultats sont en accord avec des études montrant que la dexaméthasone augmente l'expression des gènes FoxOs (Imae et al., 2003) et induit l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la voie de dégradation via le protéasome (Sandri et al., 2004). En revanche, l'expression de ces gènes n'est pas induite lorsque le RA est spécifiquement invalidé dans les myofibres.

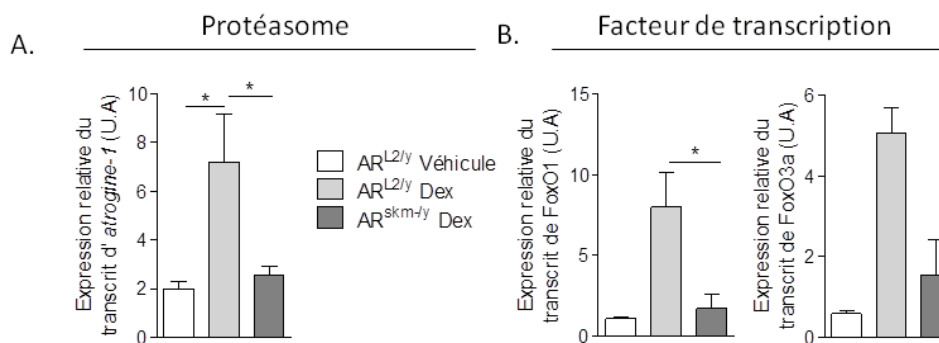


Figure 78. Analyse moléculaire de l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes dans le muscle gastrocnémien de souris $AR^{L2/y}$ et $AR^{skm-/y}$.

Niveau d'expression des transcrits des gènes impliqués dans la dégradation via le protéasome (A) et codant pour des facteurs de transcription (B) chez les souris $AR^{L2/y}$ (n=3), $AR^{L2/y}$ traitées à la dexaméthasone (n=6) ou $AR^{skm-/y}$ traitées à la dexaméthasone (n=5).

Les barres représentent les moyennes +/- SEM. *p<0.05. U.A, Unité Arbitraire.

Donc le RA dans les myofibres est nécessaire à la fonte musculaire induite par la dexaméthasone en induisant l'expression du gène codant pour l'atrogine-1 et les facteurs de transcription FoxOs.

DISCUSSION

Les études des traitements androgéniques substitutifs chez l'homme ont montré un rôle anabolique des androgènes sur la masse musculaire (Bhasin et al., 2001). En revanche, leurs mécanismes d'action moléculaires sont mal connus. Les souris KO pour le RA présentent une diminution de la masse musculaire associée à une diminution de la production de force (MacLean et al., 2008), confirmant ainsi que le rôle anabolique des androgènes est relayé par le RA. Cependant l'invalidation du RA chez ces souris étant ubiquitaire, il n'est pas possible de déterminer les effets ciblant spécifiquement les muscles squelettiques. De plus le RA est exprimé dans de nombreux types cellulaires dans le muscle squelettique comme les fibroblastes, les myofibres et les cellules satellites (Johansen et al., 2007; Monks et al., 2004; Sinha-Hikim et al., 2004).

C'est pourquoi, il a été essentiel de générer des lignées de souris chez lesquelles le RA est spécifiquement invalidé dans les myofibres de manière constitutive ($AR^{skm-/y}$) ou à l'âge adulte ($AR^{(i)skm-/y}$) ou dans les cellules satellites à l'âge adulte ($AR^{(i)sat-/y}$). Ces nouveaux modèles nous permettent de préciser les voies de signalisation contrôlées par le RA dans différents types cellulaires des muscles squelettiques.

Le muscle bulbocaverneux.

Les muscles squelettiques ne répondent pas tous de la même manière aux androgènes. Les muscles du périnée comme les muscles bulbocaverneux (BC) et élévateur de l'anus (LA) sont très sensibles aux androgènes pour leur maintien et leur fonction, alors que le muscle des membres long extenseur des orteils (EDL) ne répond que très peu aux androgènes et ne dépend pas des androgènes pour maintenir la taille de ses fibres (Lubischer and Bebing, 1999).

Une ablation du RA spécifiquement dans les myofibres entraîne une réduction de la taille des fibres du muscle (BC), entraînant une forte diminution de sa masse. Des résultats semblables sont obtenus après castration de souris sauvages, mettant ainsi en évidence que les effets anaboliques des androgènes sur les muscles du périnée sont relayés par le RA dans les myofibres (Chambon et al., 2010).

Nous avons mis en évidence qu'un traitement long à la nandrolone entraîne une augmentation du poids du BC chez les souris contrôles $AR^{L2/y}$ mais pas chez les souris $AR^{skm-/y}$. Ces résultats confirment que l'action anabolique des androgènes dans le BC est dépendante du RA dans les myofibres. Nous avons également mis en évidence, sur des souris sauvages, qu'une diminution du poids du BC lié à une castration est compensée par un traitement androgénique d'un mois.

Après la naissance, la production gonadale de testostérone va induire la prolifération des fibres musculaires du BC/LA (Tobin and Joubert, 1991). Dans le muscle BC des souris $AR^{skm-/y}$, seule la taille des fibres est altérée (Chambon et al., 2010), suggérant que d'autres voies de signalisation ou d'autres types cellulaires sont impliqués dans la prolifération cellulaire post-natale sous l'action des androgènes. En effet, les souris RA KO ne développent pas de muscle LA (MacLean et al., 2008). Cet effet pourrait être médié par le RA dans les cellules satellites. De plus, pendant la croissance musculaire les cellules satellites sont activées et prolifèrent (Chargé and Rudnicki, 2004) et les cellules satellites sont les sites prédominants d'expression du RA dans les muscles squelettiques (Sinha-Hikim et al., 2004).

Toutes ces études suggèrent que les androgènes devraient augmenter la masse musculaire principalement en stimulant les cellules satellites (Niel et al., 2008).

Nous avons généré des souris chez lesquelles le RA est spécifiquement invalidé dans les cellules satellites à l'âge adulte ($AR^{(i)sat-/y}$). Nous n'observons pas de perte de masse du BC chez les souris $AR^{(i)sat-/y}$, donc le maintien de la masse de ce muscle à l'âge adulte dans des conditions basales, se fait indépendamment de la présence du RA dans les cellules satellites. Il serait intéressant d'invalider le RA dans les cellules satellites chez des souris plus jeunes, pendant la croissance musculaire. De plus, il existe d'autres types cellulaires qui pourraient contribuer à l'action myogénique des androgènes. En effet, le RA est également exprimé dans les cellules souches mésenchymateuses CD34+ dans le muscle squelettique humain, capable d'engagement myogénique (Sinha-Hikim et al., 2004), et dans les neurones innervant le muscle squelettique (Matsumoto et al., 1996).

Les muscles des membres

Effets de l'invalidation du RA sur la masse musculaire.

La réduction des niveaux d'androgènes chez l'homme avec l'andropause (Mastrogiamo et al., 1982) ou chez les rongeurs suite à une castration (Axell et al., 2006), entraîne une diminution de la masse des muscles des membres, liée à une diminution de la taille des fibres de manière indépendante de la présence du RA dans les myofibres (Chambon et al., 2010). L'ablation du RA dans les myofibres n'affecte pas la masse des muscles des membres. Ainsi, le RA dans les myofibres n'est pas indispensable à la croissance des fibres, contrairement à ceux du périnée (Chambon et al., 2010). Cependant, les souris RA KO présentent une diminution de la masse des muscles des membres (MacLean et al., 2008). De plus, l'étude de Ophoff et collaborateurs suggèrent que la diminution de la masse musculaire chez les souris RA KO est due à une diminution du nombre de fibres (Ophoff et al., 2009). Ces résultats suggèrent que l'action des androgènes sur la masse des muscles des membres peut se faire via d'autres types cellulaires comme les cellules satellites. Nous avons montré que l'ablation du RA dans les cellules satellites chez l'adulte ($AR^{(i)sat-/y}$) n'entraîne pas de perte de la masse musculaire. Donc les androgènes via leur récepteur dans les cellules satellites ne contrôlent pas la masse musculaire à l'âge adulte dans des conditions de faible activité et croissance musculaire.

Un traitement d'un mois à la nandrolone, un androgène anabolisant, ne modifie pas la masse des muscles des membres chez les souris $AR^{L2/y}$, $AR^{skm-/y}$ ou $AR^{(i)sat-/y}$. Cependant, nous avons montré que les androgènes contrôlent l'expression d'IGF1 via le RA dans les myofibres. IGF1 est connu pour induire l'hypertrophie musculaire en augmentant la taille des myotubes et la synthèse protéique (Bark et al., 1998; Pelosi et al., 2007). De plus, IGF1 permet la croissance musculaire en inhibant la dégradation protéique et en supprimant l'expression de deux ligases relatives à l'atrophie dans le muscle, Murf1 et atrogine-1 (Bodine et al., 2001a; Sackey et al., 2004). L'expression des gènes codant pour ces deux ligases devra être testée.

La myostatine est un autre régulateur important de la masse musculaire et son invalidation chez le rat entraîne une forte augmentation de la masse musculaire (Lee, 2004).

L'hypertrophie observée chez les souris mst KO (KO pour la myostatine) est plus prononcée chez les mâles que chez les femelles (McPherron et al., 1997) et la diminution de la masse musculaire quand la myostatine est surexprimée chez la souris, est plus importante chez les mâles (Reisz-Porszasz et al., 2003). Ces résultats suggèrent que la signalisation des androgènes et de la myostatine interfère. Nous avons montré que les androgènes via leur récepteur dans les myofibres sont nécessaires à l'expression de la myostatine. Donc l'induction par la nandrolone de l'expression de l'IGF1 et de la myostatine chez les souris $AR^{L2/y}$ expliquera pourquoi il n'y a pas d'augmentation nette de la masse des muscles des membres.

Ainsi, les androgènes agissent via leur récepteur dans les myofibres pour maintenir leur masse musculaire en induisant l'expression de la myostatine et d'IGF1, afin de créer une balance entre anti-anabolisme et anabolisme.

Lorsque l'expérience a été réalisée sur les souris $AR^{(i)sat-/y}$ aucune induction de l'IGF1 et de la myostatine n'a été détectée chez les souris contrôles $AR^{L2/y}$. L'expérience nécessite donc d'être répétée.

Cependant, nous avons constaté une diminution de l'expression de la myostatine chez les souris $AR^{(i)sat-/y}$ comparées aux souris $AR^{L2/y}$. Ces résultats sont en accord avec les résultats récents de Dubois et collaborateurs qui montrent que la myostatine est régulée par le RA dans les cellules satellites et/ou leurs descendants (Dubois et al., 2014). Cependant, il faut noter que leur modèle induit l'ablation du RA dans les cellules satellites et les cellules qui en dérivent lors de la croissance musculaire post-natale, alors que dans notre modèle le RA est délété spécifiquement dans les cellules satellites chez l'adulte. Donc le RA dans les cellules satellites contrôlerait l'expression de la myostatine.

Les niveaux d'expression de la myostatine des souris $AR^{(i)sat-/y}$ sont restaurés après un traitement à la nandrolone et des valeurs similaires à celles obtenues chez les souris $AR^{L2/y}$ sont observées. Cependant, l'expérience nécessite d'être répétée, car nous ne reproduisons pas nos résultats précédemment obtenus sur les souris $AR^{L2/y}$ traitées, à savoir une induction d'IGF1 et de la myostatine par un traitement androgénique.

Nous avons également mis en évidence qu'un traitement court à la nandrolone (100 mg/kg), un mois après castration, permet une augmentation de la masse des muscles des membres. Des souris $AR^{skm-/y}$ et $AR^{(i)sat-/y}$ seront castrées puis traitées à la nandrolone afin de voir si cette augmentation de la masse est dépendante du RA dans les myofibres ou les cellules satellites.

Afin d'induire une lésion musculaire les souris $AR^{(i)sat-/y}$ ont été traitées à la cardiotoxine (CDTX). Cette toxine va permettre de former des pores (Forouhar et al., 2003) et entraîner la dépolarisation et la dégradation de la membrane plasmique de la cellule musculaire. La phase de dégénérescence dure environ 24 à 36 h avant le début de la régénération. Les cellules satellites sont considérées comme étant précurseurs de la régénération musculaire (Mauro, 1961). De plus, il est connu que les capacités de régénération musculaire diminuent avec l'âge (Dreyer et al., 2006) et de nombreuses études montrent que les hormones sexuelles augmentent l'activation des cellules satellites et modulent la réponse inflammatoire pendant la régénération musculaire (Bhasin et al., 2001; Enns et al., 2008; Enns and Tiidus, 2008; Ferry et al., 1999; Velders et al., 2012). La

testostérone augmente le nombre de cellules satellites dans les muscles des membres chez l'homme (Sinha-Hikim et al., 2002; Sinha-Hikim et al., 2006), dans le BC/LA chez le rongeur (Joubert and Tobin, 1995), et *in vitro* (Doumit et al., 1996; Powers and Florini, 1975; Serra et al., 2011). Le RA joue également un rôle dans la prolifération et la différenciation musculaire *in vivo* et *in vitro* (Diel et al., 2008; Lee, 2002; Sinha-Hikim et al., 2004). Plusieurs équipes ont étudié l'effet d'une administration d'androgènes sur la régénération musculaire. Ils montrent des effets variables en fonction du type de muscle lésé (Beiner et al., 1999). Au cours de notre étude, aucun rôle du RA dans les cellules satellites durant la régénération induite par un traitement à la cardiotoxine du tibialis antérieur n'a pu être mis en évidence. En revanche, Serra et collaborateurs, ont montré que la vitesse de régénération augmente lorsque l'on traite des souris castrées avec des androgènes (Serra et al., 2012), suggérant que l'effet des androgènes sur la régénération musculaire n'est pas relayé par le RA dans les cellules satellites.

Les gènes codant pour la myogénine, Pax7, MHCE, MyoD, Desmine et Myogénine sont induits de façon similaire à ce qui est décrit dans la littérature après un traitement à la CDTX (Chargé and Rudnicki, 2004) et nous n'observons pas de différences d'expression chez les souris AR^{(i)sat-/y}. D'autres facteurs devront être testés, comme Myf5, MGF, MRF4 ou IL-6 [pour revue (Chargé and Rudnicki, 2004)].

La surcharge mécanique simule un exercice intense. En réponse à une surcharge mécanique, le poids du plantaris double (Ianuzzo et al., 1976; Joanne et al., 2012b; Roy and Edgerton, 1995), sa force maximale absolue et sa résistance à la fatigue augmentent et il y a une transition des fibres rapides/glycolytiques vers des fibres de types lentes/oxydatives (Ianuzzo et al., 1976; Joanne et al., 2012b; Parsons et al., 2004; Roy and Edgerton, 1995). Il a également été montré que l'injection de testostérone restaure la réponse d'un muscle âgé une semaine après une surcharge mécanique (Lee et al., 2003b). Nous avons montré que la surcharge mécanique entraîne une augmentation de la masse musculaire des souris contrôles, par une augmentation du nombre de fibres exprimant MHC-2a par section (Ferry *et al.*, 2014 publication n°2). Ceci confirme les différentes études précédemment réalisées (Goodman et al., 2011; Ianuzzo et al., 1976; Joanne et al., 2012a; McCarthy et al., 2011; Parsons et al., 2004).

Nous avons également montré que le RA dans les myofibres contribue à la croissance musculaire en réponse à une surcharge mécanique, bien que la délétion du RA dans les myofibres n'ait pas d'effet sur la taille des muscles des membres en condition basale. La différence entre les conditions basales et la surcharge mécanique vient de la croissance musculaire (Lee et al., 2003b). Nous avons montré que cela n'est pas associé à une augmentation de l'expression du RA après une surcharge mécanique comparé aux contrôles. De plus, il a également été rapporté que la concentration protéique du RA n'est pas augmentée après un mois de surcharge mécanique chez des rats âgés de cinq mois (Lee et al., 2003a).

Le plus faible gain de poids induit par la surcharge mécanique chez les souris AR^{skm-/y} résulte de la diminution du diamètre des fibres exprimant MHC-2a et MHC-2x. Ceci peut provenir d'une activation plus faible de la voie Akt-mTOR, puisque cette voie joue un rôle important dans la croissance des myofibres en réponse à la surcharge mécanique (Bentzinger

et al., 2013; Bodine et al., 2001b; Goodman et al., 2011). White et collaborateurs ont montré que les androgènes activent la voie de signalisation mTOR (White et al., 2013), bien qu'une précédente étude ne le montre pas (Hourde et al., 2009). De plus, les androgènes stimulent l'import d'acides aminés qui activent la synthèse protéique et la voie de signalisation Akt-mTOR (Hamdi and Mutungi, 2013). La réduction de l'expression de la follistatine (Joanne et al., 2012a) chez les souris AR^{skm-/y} pourrait contribuer à la réduction du diamètre des fibres. Ces voies de signalisation seront testées sur ces souris. Une autre possibilité serait que les cellules satellites des souris AR^{skm-/y} auraient une capacité réduite à proliférer et à fusionner pour donner des fibres de diamètre normal.

La surcharge mécanique a été réalisée sur les souris chez lesquelles le RA est délété spécifiquement dans les myofibres et non dans les cellules satellites, suggérant une production insuffisante d'IGF, d'IL4 ou d'IL6 par les fibres présentant une délétion du RA (Chambon et al., 2010; Guerri et al., 2012; Serra et al., 2011). Nos résultats excluent la possibilité qu'une diminution du nombre de cellules satellites chez les souris AR^{skm-/y} soit de la réduction du diamètre des fibres réduit après une surcharge mécanique (Ferry *et al.*, 2014, publication n°2).

Le RA dans les myofibres participe à la transition du type de fibres induite par la surcharge mécanique. Cela résulte d'une diminution du nombre de fibres exprimant MHC-2a chez les souris AR^{skm-/y}. La calcineurine et les voies de signalisation PGC-1 α et PPAR participent à la formation des fibres lentes/oxydatives (Gundersen, 2010; Schiaffino et al., 2007; Schuler et al., 2006). Ces voies de signalisation pourraient être moins activées en réponse à une surcharge mécanique chez les souris AR^{skm-/y}.

Nos résultats confirment des études précédentes montrant qu'une dose pharmacologique d'androgènes n'entraînent pas d'hypertrophie plus importante induite par une surcharge mécanique chez les animaux mâles (McClung et al., 2003; McClung et al., 2005; Tamaki et al., 2009). La forte hypertrophie induite par la surcharge mécanique chez les souris sauvages suggère que le processus anabolique est déjà maximal en réponse à la surcharge mécanique seule. Cela n'exclut pas la possibilité que les androgènes, potentiellement médiés par le RA dans les myofibres au niveau des cellules satellites par exemple (Dubois et al., 2013; Kadi, 2008) ne puissent pas amplifier la croissance musculaire. Cependant, notre étude de surcharge mécanique sur des souris chez lesquelles le RA a été spécifiquement invalidé dans les cellules satellites démontre que le RA dans ces cellules n'est pas responsable de l'augmentation de la masse et de la force musculaire induite par la surcharge mécanique.

Les traitements androgéniques réduisent la transition des types de fibres induite par la surcharge mécanique chez les souris AR^{L2/y} et AR^{skm-/y}, suggérant que l'action des androgènes n'est pas médiée par le RA dans les myofibres. Pendant la surcharge mécanique, les androgènes n'affectent ni la force maximale absolue, ni la résistance à la fatigue, indiquant que les androgènes pendant la surcharge mécanique n'ont pas d'effets ergogéniques.

Les glucocorticoïdes sont des anti-inflammatoires puissants, prescrits dans le traitement de certaines maladies comme les maladies auto-immunes ou l'asthme. Cependant, leur utilisation entraîne des effets secondaires comme l'atrophie musculaire. L'hypertrophie et l'atrophie musculaire sont deux phénomènes opposés régulant la taille des cellules

musculaires, finalement déterminée par la balance entre l'accumulation de nouvelles protéines et la dégradation de protéines pré-existantes (Sandri, 2008). Dans les conditions d'atrophie musculaire, les niveaux de glucocorticoïdes sont augmentés. Au niveau moléculaire, un traitement aux glucocorticoïdes induit une surexpression des atrogènes. Différents GRE ont été identifiés dans le promoteur des atrogènes (Schakman et al., 2013; Waddell et al., 2008). Des études ont montré une régulation négative d'IGF1 et une sur-régulation de la sécrétion de la myostatine après un traitement aux glucocorticoïdes (Sacheck et al., 2004; Sandri et al., 2004; Schakman et al., 2008).

De façon surprenante, nous avons montré que le RA participe à la mise en place de l'atrophie induite par la dexaméthasone. En effet, l'expression d'atrogine-1 et des facteurs de transcriptions FoxOs, connus pour activer ce système de dégradation protéique (Mammucari et al., 2007; Sandri et al., 2004), est augmentée chez les souris $AR^{L2/y}$ traitées à la dexaméthasone, mais pas chez les souris $AR^{skm-/y}$.

Donc le RA dans les myofibres contribue à la fonte musculaire induite par la dexaméthasone. La dexaméthasone étant un corticoïde, cela suggère que le RA et le RG peuvent agir ensemble dans le muscle squelettique lors d'une atrophie musculaire induite par la dexaméthasone. Chen et collaborateurs ont suggéré que les glucocorticoïdes peuvent inhiber la signalisation médiée par les androgènes par l'interaction du RA avec le RG. Ils démontrent que ces récepteurs peuvent s'associer pour former un hétérodimère *in vitro* et que la formation de cet hétérodimère inhibe l'activité de chacun au niveau transcriptionnel (Chen et al., 1997). Zaho et collaborateurs proposent que l'oxandrolone, un stéroïde anabolisant, induit la formation de cet hétérodimère réprimant la transcription en recrutant des co-represseurs (Zhao et al., 2004). Des souris chez lesquelles le RG est spécifiquement invalidé dans les myofibres seront traitées avec des androgènes. De plus, une nouvelle lignée de souris permettant la délétion du RA et du RG dans les myofibres sera générée. Des expériences de ChIP avec des anticorps dirigés contre le RA et le RG vont être réalisées sur des souris de type sauvage et les souris $AR^{skm-/y}$ traitées à la dexaméthasone afin de déterminer si le RA et le RG se fixent sur des éléments de réponse communs.

Effets de l'invalidation du RA sur la force musculaire.

Il a été montré au laboratoire que les androgènes via leur récepteur dans les myofibres contrôlent la force musculaire indépendamment de la masse (Chambon et al., 2010). Une partie de mon travail de thèse a consisté à préciser par quels mécanismes les androgènes contrôlent la force musculaire.

Le calcium est connu pour jouer un rôle crucial dans la physiologie du muscle squelettique. Il est très important pour la génération de la force musculaire et plusieurs études montrent que les androgènes modulent l'homéostasie du calcium (Bouhrel et al., 2003; Tsang et al., 2009; Vicencio et al., 2011).

Nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence un dysfonctionnement de la régulation calcique dans les muscles squelettiques des souris $AR^{skm-/y}$ [(Frayssé et al., 2014), publication n°1]. Donc le RA dans les myofibres contrôlent la force musculaire mais indépendamment de la régulation des flux calciques.

Différentes études montrent que les hormones sexuelles peuvent avoir une action rapide via une voie de transduction du signal indépendante du RA (Basualto-Alarcon et al., 2013; Burge et al., 2013; Estrada et al., 2005; Gonzalez-Montelongo et al., 2010; Hamdi and Mutungi, 2010). De plus, il a été montré que ces hormones peuvent altérer différents aspects contrôlant le cycle d'excitation-contraction-relaxation, en augmentant l'excitabilité musculaire, l'homéostasie du calcium et la capacité de génération de la force maximale (Bouhlef et al., 2003; Estrada et al., 2000; Tsang et al., 2009; Vicencio et al., 2011). Nous avons montré qu'un traitement aigu aux androgènes *in vivo* n'altère pas la force maximale chez les souris exprimant ou non le RA. De plus, un traitement androgénique *in vitro* n'a pas d'effet sur la capacité de production de la force maximale du muscle entier et de faisceaux de fibres, ce qui élimine les problèmes potentiels de biodisponibilité de l'hormone. Par conséquent, nos résultats montrent que l'administration aiguë d'androgènes par voie systémique n'a pas d'effet sur les performances maximales du muscle [(Frayssé et al., 2014), publication n°1]. Un effet des androgènes sur la motricité *in vivo* ne peut cependant pas être exclu (Ibebunjo et al., 2011). Nos résultats ont permis de mettre en évidence qu'un traitement androgénique accru des muscles squelettiques n'a pas d'impact majeur sur la libération du calcium pendant le couplage excitation-contraction (Estrada et al., 2005).

Nos résultats permettent de conclure que la contractilité musculaire et le flux calcique ne sont pas altérés par un traitement aigu aux androgènes, indiquant que ces effets ne sont pas relayés par des actions rapides des androgènes. De plus, ils suggèrent que l'administration aiguë d'androgènes n'améliore pas les performances chez les athlètes ou la faiblesse musculaire chez des patients souffrant d'une maladie neuromusculaire [(Frayssé et al., 2014), publication n°1].

Il a été montré que les muscles soléaires des souris castrées étaient sensibles à un traitement androgénique (Gao et al., 2005) et que l'augmentation des performances musculaires par un traitement physiologique en parallèle d'une privation androgénique par castration n'est pas liée à une augmentation significative du poids des muscles ou de la taille des fibres (Borst et al., 2007; Gao et al., 2005; Hourde et al., 2009). Nous avons montré que la force musculaire diminue quand les souris sont castrées et qu'un traitement androgénique de trois jours permet une augmentation de la force des souris castrées. En revanche, un traitement androgénique d'un mois à une dose plus faible ne permet pas de compenser la perte de force induite par une castration. Il a été montré que les performances à l'exercice des rats castrés est similaires aux performances des rats sham (Petroianu et al., 2010). Nous allons évaluer les performances à l'exercice des souris castrées ou non traitées à la nandrolone.

Il a été montré que le RA dans les myofibres contrôle la structuration des sarcomères (Chambon et al., 2010). Nous avons mis en évidence que les souris possédant le transgène HSA-Cre présentent une diminution de l'expression de la dystrophine et de la téléthonine et ont des défauts de structure similaires à ceux observés sur ces souris, mais moins fréquents. La myomésine, la myotiline et la téléthonine sont des gènes connus pour avoir un ARE et codant pour des protéines de structure du sarcomère (Wyce et al., 2010). Cependant, l'expression de la myotiline, de la myomésine et de la téléthonine est similaire lorsque le RA est spécifiquement invalidé dans les myofibres. Un défaut d'expression de la titine (Peng et al.,

2005), de l'actine (Ochala et al., 2013) et de la myosine pourrait être responsable de ce défaut de structure et de force observée en l'absence du RA dans les myofibres, mais nos études ne montrent pas d'altération dans l'expression de ces gènes. Donc, le RA est nécessaire à la structuration des sarcomères afin d'établir une force optimale, mais nous n'avons pas mis en évidence de dérégulation de l'expression des gènes codant pour les protéines de structures pouvant expliquer ce phénotype en l'absence du RA dans les myofibres.

De plus, nous avons mis en évidence une diminution des niveaux d'expression des gènes codant pour les enzymes *odc1*, *amd1* et *smox* impliquées dans la synthèse des polyamines (PA), en absence du RA dans les myofibres. Plusieurs études ont mis en évidence un contrôle par les androgènes des gènes codant pour ces enzymes (MacLean et al., 2008; Yoshioka et al., 2006). Un traitement androgénique augmente légèrement l'expression de ces gènes chez les souris contrôles mais pas chez les souris $AR^{skm-/y}$. Une castration conduit à la diminution de l'expression de ces gènes chez les souris contrôles et un traitement androgénique d'un mois après la castration permet de rétablir leur expression.

Les PA induisent l'autophagie chez la levure (Eisenberg et al., 2009a). Dans une condition de stress induite par une mise à jeun, nous avons montré que les niveaux d'expression du RA sont fortement diminués. Le RA régule l'expression d'AMD1 et de SMOX dans ces conditions. En revanche, l'expression d'ODC1 est augmentée alors que celle du RA est diminuée, donc la régulation d'ODC1 dans des conditions de stress induites par une mise à jeun se fait indépendamment du RA. De plus Masiero et collègues ont montré qu'une diminution du mécanisme autophagique entraîne une déstructuration des sarcomères et une diminution de la force musculaire avec l'âge (Masiero et al., 2009). Il a également été montré que l'augmentation de l'accumulation d'autophagosome ou l'augmentation de l'autophagie entraîne des myopathies [pour revue (Vainshtein et al., 2014)]. Nous avons montré que le RA dans les myofibres est important pour la régulation de l'autophagie. En effet, l'induction de l'autophagie par une mise à jeun entraîne une forte diminution de l'expression du RA et les androgènes via leur récepteur dans les myofibres inhibent l'autophagie. Donc l'augmentation de l'autophagie en l'absence du RA dans les myofibres pourrait contribuer aux défauts structuraux et la diminution de la force musculaire observée en l'absence du RA dans les myofibres.

L'augmentation des niveaux d'autophagie chez les souris $AR^{skm-/y}$ pourrait être induite par les PA. Cependant l'analyse métabolomique n'a pas permis de mettre en évidence une différence des niveaux de putrescine, spermine ou spermidine. Donc la régulation de l'autophagie par les androgènes via leur récepteur dans les myofibres n'est pas liée aux niveaux de ces PA. D'autres enzymes comme la SSAT ou la PAO interviennent dans l'interconversion des PA et pourrait être dérégulées afin de compenser la perte d'expression d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX, ce qui expliquerait pourquoi nous n'observons pas de changement dans la concentration des PA musculaires. Cependant AMD1, a également d'autres fonctions. AdoMet, le donneur de méthyl pour convertir la glycine en sarcosine, est convertie en S-adenosylmethioninamine par AMD1. Nous avons montré que les niveaux de la sarcosine sont diminués dans le muscle en absence du RA dans les myofibres. Chez les souris $AR^{skm-/y}$, l'expression d'AMD1 est très fortement diminuée suggérant que l'AdoMet est moins convertie et s'accumule dans le muscle squelettique. On s'attendrait donc à une augmentation

de la conversion de glycine en sarcosine, cependant c'est l'inverse qui se produit en l'absence du RA dans les myofibres. La sarcosine est le dérivé n-méthylé de la glycine. Elle est présente en plus grande quantité dans le sérum et l'urine des patients atteints d'un cancer de la prostate (Lucarelli et al., 2013b). Cependant, il y a beaucoup d'études contradictoires quand au rôle de la sarcosine dans le cancer de la prostate (Bohm et al., 2012; de Vogel et al., 2014; Koutros et al., 2013; Lucarelli et al., 2013a; Lucarelli et al., 2013b; Struys et al., 2010).

L'activation de l'autophagie en l'absence du RA peut être contrôlée par l'expression d'AMPK, augmentée chez les souris AR^{skm-/y}. AMPK contrôle l'activité de ULK1 en supprimant l'activité de mTOR et en interagissant et en phosphorylant ULK1 (Hosokawa et al., 2009a; Hosokawa et al., 2009b; Jung et al., 2010; Sanchez et al., 2012). La suppression de l'activité de mTOR et la phosphorylation d'Ulk1 n'a cependant pas pu être mise en évidence dans nos conditions expérimentales.

Ainsi, nous avons montré que les androgènes via leur récepteur dans les myofibres régulent l'autophagie, conduisant probablement à une dégradation accrue des protéines du sarcomère. Ces sarcomères sont déstructurés, entraînant une diminution de la force musculaire. Mais notre étude n'a pas permis de mettre en évidence par quel mécanisme les androgènes régulent l'autophagie.

De plus, nous avons montré que la carnosine, un dipeptide de la beta-alanine et de l'histidine présente en grande concentration dans le tissu musculaire est diminuée chez les souris AR^{skm-/y}. Des études ont montré qu'un niveau élevé de carnosine dans le muscle est associé à une diminution de la fatigue et une amélioration des performances physiques chez l'homme (Derave et al., 2007; Hill et al., 2007; Stout et al., 2007; Suzuki et al., 2006; Van Thienen et al., 2009). Mannion et collaborateurs ont montré que le quadriceps des hommes contient 21% de carnosine en plus comparé aux femmes (Everaert et al., 2011; Mannion et al., 1992). En ce qui concerne l'âge, des études sur les rongeurs ont montré une diminution de la concentration en carnosine de 35 à 50% dans le muscle avec la sénescence (Derave et al., 2008; Everaert et al., 2011; Stuerenburg and Kunze, 1999). De nombreuses études ont confirmé une diminution de testostérone plasmatique chez les hommes âgés [Pour revue (Kaufman and Vermeulen, 2005)]. Une explication possible de la plus faible concentration en carnosine dans le muscle chez les personnes âgées et les femmes serait leur plus faible taux de testostérone dans le plasma. Chez les souris castrées, on observe une diminution de la carnosine et un traitement de femelles avec des androgènes augmente les niveaux de carnosine suggérant que les androgènes induisent l'expression de la carnosine synthase (Penafiel et al., 2004). Cependant, aucune corrélation entre le niveau de testostérone plasmatique et les niveaux de carnosine dans le muscle n'ont pu être mis en évidence chez des hommes sains (Everaert et al., 2011).

Nous avons montré que les niveaux de carnosine sont dépendants du RA dans les myofibres. La diminution de la concentration de la carnosine pourrait contribuer à la diminution de la force musculaire. L'expression de la carnosine synthase devra être testée, afin de comprendre comment le RA dans les myofibres contrôle les niveaux de carnosine.

Nous avons également montré que le RA dans les myofibres contrôle négativement les niveaux de méthionine-sulfoxyde. Il sera intéressant de mesurer l'expression de la méthionine-sulfoxyde réductase chez les souris AR^{skm-/y}.

La méthionine-sulfoxyde réductase est une enzyme qui réduit la L-méthionine (S)-sulfoxyde en L-méthionine. Un modèle de souris permettant la délétion de cette enzyme, montre une diminution de la contractilité des myocytes cardiaque quand ceux-ci sont mis en condition de stress. La méthionine-sulfoxyde est un dérivé oxydé de la méthionine. Ces molécules pourraient contribuer au phénomène de vieillissement car la conversion de la méthionine sulfoxyde conduit à la formation de radicaux libres (Shringarpure and Davies, 2002; Stadtman et al., 2005). Une étude a montré que les drosophiles sur-exprimant la méthionine-sulfoxyde réductase, entraînant une diminution du taux de méthionine-sulfoxyde, avaient une durée de vie augmentée (Ruan et al., 2002). Comme les niveaux d'androgènes diminuent avec l'âge, il est probable que les niveaux de méthionine-sulfoxyde augmentent.

Effets de l'invalidation du RA dans les myofibres sur le métabolisme glucidique.

Les hommes ayant un diabète de type 2 ont souvent des niveaux de testostérone plus faibles (Liu et al., 2013). Une étude a montré que lorsque le taux de testostérone total est élevé, le risque de développer un diabète de type 2 est moindre comparé aux hommes dont le niveau de testostérone est faible (Ding et al., 2006). Cela suggère un lien entre les androgènes et le métabolisme glucidique.

A l'état basal, les niveaux de glucose sanguin sont similaires chez les souris contrôles et les souris AR^{skm-/y}. En revanche, nous avons montré que les souris AR^{skm-/y} sont intolérantes au glucose et moins sensibles à l'insuline. Donc, le RA dans les myofibres stimule la vitesse d'absorption du glucose.

Cependant, un mois après une castration de souris contrôles, entraînant une diminution des niveaux de testostérone, nous ne reproduisons pas le phénotype observé chez les souris AR^{skm-/y}. Ces résultats confirment ceux obtenus par différentes études, qui montrent qu'il n'y a pas d'intolérance au glucose ou de sensibilité à l'insuline augmentée après castration (Morakinyo et al., 2013). De plus, nous avons constaté qu'un traitement androgénique prolongé ne permet pas d'augmenter la tolérance au glucose. Un traitement androgénique sur des souris castrées ne modifie l'homéostasie du glucose. Donc le RA dans les myofibres facilite l'absorption du glucose dans des conditions riches en glucose. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de conclure par quel mécanisme le RA contrôle l'absorption du glucose.

Une autre enzyme impliquée dans la synthèse des PA, la SSAT, semble importante dans la régulation du métabolisme glucidique. En effet, la surexpression de SSAT entraîne une diminution de la masse du tissu adipeux blanc, un métabolisme basal haut, une augmentation de la tolérance au glucose, une hypersensibilité à l'insuline, une augmentation de l'expression des gènes de la phosphorylation oxydative (OXPHOS), coordonné par l'augmentation des niveaux de PGC-1 et d'AMPK dans le tissu adipeux blanc (Pirinen et al., 2007). Selon Pirinen, une augmentation de SSAT entraîne une accélération du flux de

polyamines et le catabolisme de la spermidine et spermine. De plus, SSAT pourrait être dérégulée chez les souris $AR^{skm-/y}$ pour contrecarrer la perte de l'expression d'ODC1, d'AMD1 et de SMOX induite par la délétion du RA dans les myofibres. Ceci permettrait le maintien d'un niveau de PA constant.

Les niveaux de pAMPK augmentent dans le foie chez les souris SSAT KO. De plus, l'AMPK est activée pendant la contraction musculaire et a donc été proposé comme jouant un rôle clé dans l'initiation de la prise de glucose stimulé par la contraction (Hayashi et al., 1998; Merrill et al., 1997). Vu que nos souris présentent une force de contraction plus faible, il serait intéressant de tester l'activité de SSAT et l'expression de pAMPK. L'activation d'AMPK permet la translocation de GLUT-4 à la membrane plasmique. La localisation de GLUT-4 sera également testée.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les fonctions musculaires doivent être optimales pour maintenir l'homéostasie de l'organisme.

Une perte de masse musculaire liée à l'âge ou à des maladies a un impact négatif important sur la qualité de vie des individus. A l'heure actuelle, la population de personnes âgées est de plus en plus nombreuse, c'est pourquoi il est essentiel de développer des stratégies thérapeutiques afin de lutter contre la perte des fonctions musculaires. Les androgènes sont utilisés dans le traitement de la perte de masse musculaire liée à l'âge (sarcopénie), mais leur utilisation est limitée. En effet, une supplémentation androgénique peut entraîner des effets secondaires, notamment le risque accru de développer un cancer de la prostate et des risques cardiovasculaires chez l'homme ou la virilisation chez la femme. Il est donc important de disposer des nouveaux composés (SARM, Selective Androgen Receptor Modulator) capables de cibler spécifiquement un tissu, comme le muscle squelettique par exemple. Cependant, pour permettre le développement des SARMS, il est souhaitable de connaître les mécanismes et les voies de signalisation par lesquels les androgènes agissent dans un tissu cible.

Au cours de ma thèse, j'ai montré que le récepteurs des androgènes dans les cellules satellites adultes ne contrôlent ni la masse des muscles des membres ni celle des muscles du périnée. Les androgènes ne contrôlent pas la masse musculaire via leur récepteur dans les myofibres ou les cellules satellites à l'âge adultes dans des conditions basales. Cependant, nous avons montré que les voies anaboliques (IGF1) et cataboliques (myostatine) sont activées par le RA dans les myofibres en condition de supplémentation androgénique. Nous avons démontré, que lors d'un exercice intense, simulé par une surcharge mécanique, le RA dans les myofibres contribue à l'hypertrophie musculaire.

De plus, nous avons montré que le RA dans les myofibres contrôle la structuration des sarcomères et la génération d'une force optimale. En l'absence du RA, ces défauts structuraux peuvent s'expliquer par différents mécanismes comme l'induction de l'autophagie. Cependant nos études n'ont pas permis de mettre en évidence les mécanismes moléculaires sous jacents.

Nous avons également montré que le RA dans les myofibre régule l'expression de la sarcosine, la carnosine et la méthionine sulfoxide, trois dérivés d'acides aminés. Leurs fonctions dans le muscle squelettique sont mal connues mais ces molécules pourraient avoir un rôle dans le contrôle de la masse et de la force musculaire.

D'autre part, des désordres métaboliques comme l'obésité, le diabète de type II et les risques cardiovasculaires, regroupés sous le terme de syndrome métabolique, constituent un problème majeur de santé publique. Nous avons mis en évidence la contribution du RA dans les myofibres dans le contrôle de l'absorption du glucose au niveau du muscle squelettique lors d'une surcharge glucidique. En effet, l'inactivation du RA sélectivement dans les myofibres conduit à une diminution de l'absorption du glucose liée à une vitesse de captation du glucose plus lente. Ainsi, le RA est nécessaire à l'absorption de glucose dans des conditions riches en glucose.

Enfin, de façon inattendue, nous avons montré que le RA dans les myofibres participe à l'induction de l'atrophie par les glucocorticoïdes.

Nous avons donc mis en évidence que les rôles des androgènes dans le muscle squelettique sont variés et que leurs mécanismes d'action sont très complexes, dépendant des conditions et

du type de muscles étudiés. Ainsi, mon travail de thèse a permis de mieux comprendre le rôle du RA dans le muscle squelettique et ouvre de nouvelles perspectives de recherches.

ANNEXES

Publication n°1

Publié dans **Steroids**, Mai 2014.

Acute effect of androgens on maximal force-generating capacity and electrically evoked calcium transient in mouse skeletal muscles.

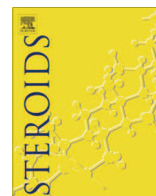
Bodvaël Frayssé^a, Alban Vignaud^b, Bourama Fane^a, Mélanie Schuh^c, Gillian Butler-Browne^a, Daniel Metzger^c, Arnaud Ferry^{a,d}.

^a Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, Sorbonne Universités, UMR 974S794, INSERM U974, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, Paris, France.

^b Généthon, 1 rue de l'Internationale, Evry, France.

^c Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS UMR 7104 / INSERM U964, Université de Strasbourg, Illkirch, France.

^d Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.



Acute effect of androgens on maximal force-generating capacity and electrically evoked calcium transient in mouse skeletal muscles



Bodvaël Frayssé^a, Alban Vignaud^b, Bourama Fane^a, Mélanie Schuh^c, Gillian Butler-Browne^a, Daniel Metzger^c, Arnaud Ferry^{a,d,*}

^a Université Pierre et Marie Curie-Paris6, Sorbonne Universités, UMR 974S794, INSERM U974, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, Paris, France

^b Génomique, 1 Rue de l'Internationale, Evry, France

^c Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS UMR7104/INSERM U964, Université de Strasbourg, Illkirch, France

^d Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2013

Received in revised form 17 April 2014

Accepted 6 May 2014

Available online 17 May 2014

Keywords:

Androgen

Rapid action

Maximal force

Androgen receptor deficient mice

Skeletal muscle

ABSTRACT

As androgens might have rapid androgen-receptor (AR) independent action on muscle cells, we analysed the *in vivo* acute effect of androgens on maximal force generation capacity and electrically evoked calcium transient responsible for the excitation–contraction coupling in skeletal muscle from wild-type male mice and muscle fibre androgen receptor (AR) deficient (AR^{skm-ly}) male mice. We tested the hypothesis that acute *in vivo* androgen treatment improves contractility and modifies calcium transient in mouse hindlimb muscles. In addition, we determined whether the reduced maximal force generation capacity of AR^{skm-ly} mice is caused by an alteration in calcium transient. We found that acute dehydrotestosterone (DHT) and testosterone treatment of mice does not change *in situ* maximal force, power or fatigue resistance of tibialis anterior muscles. In agreement with this observation, maximal force and twitch kinetics also remained unchanged when both whole extensor digitorum longus (EDL) muscle or fibre bundles were incubated *in vitro* with DHT. Electrically evoked calcium transient, i.e. calcium amplitude, time to peak and decay, was also not modified by DHT treatment of EDL muscle fibre bundles. Finally, we found no difference in calcium transient between AR^{skm-ly} and wild-type mice despite the reduced maximal force in EDL fibre bundles of AR^{skm-ly} mice. In conclusion, acute androgen treatment has no ergogenic effect on muscle contractility and does not affect calcium transient in response to stimulation. In addition, the reduced maximal force of AR^{skm-ly} mice is not related to calcium transient dysfunction.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Testosterone, a male sex steroid hormone that is converted to dihydrotestosterone (DHT), notably in skeletal muscle, binds the androgen receptor (AR) in the cytosol. This complex translocates into the nucleus where it either activates or represses target genes. The expression of many genes is modified within hours to days after androgen exposure. Chronically administrated androgens can exert an ergogenic action, i.e. increases skeletal muscle maximal force production via muscle growth. It has also been reported that androgens can exert fast actions that are thought to be too rapid to be explained by this process [1,2]. For example incubation of fast skeletal muscle fibre bundles isolated from mice of both sex

* Corresponding author at: G.H. Pitié-Salpêtrière, 47, bld de l'Hôpital, Bâtiment Babinski, INSERM U974, 75651 Paris Cedex 13, France.

E-mail address: arnaud.ferry@upmc.fr (A. Ferry).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2014.05.005>

0039-128X/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

with DHT at 630 µg/ml for 30 min increases maximal force production by 24–30% [3]. Moreover, treatment of such fibre bundles with an AR inhibitor did not block DHT-induced maximal force increase, suggesting that this effect of DHT does not involve AR signaling. Several other studies also support the possibility of signal transduction pathways independent of AR signalling [2–9]. In the present study we would like to confirm if this rapid response to acute androgen treatment is observed in skeletal muscle *in vivo*. If an increase in maximum force is observed we will then look at the effect on calcium handling since this rapid AR response does seem to not involve AR signalling. Calcium is known to play a crucial role in skeletal muscle physiology, and several lines of evidence indicate that androgens modulate calcium homeostasis [2,10–12]. Chronic androgen administration in orchidectomized rodent has been shown to interfere with many aspects of calcium release and uptake of the sarcoplasmic reticulum of the myocardium [11,12], responsible for the excitation–contraction–relaxation cycle.

Moreover, it was recently shown that acute testosterone treatment increases intracellular calcium in myotubes [4–6]. However, acute effects of androgens on calcium transient initiating the contraction of the skeletal muscle are poorly characterised. It is possible that the reduced maximal force generation capacity that was observed in skeletal muscle from AR^{skm-ly} mice, in which the AR was selectively ablated in skeletal muscle fibres [13], is related to an alteration of the calcium transient. The selective ablation of AR in muscle fibres from AR^{skm-ly} mice leads to a 20–25% reduction in the maximal force generation capacity in mouse fast muscle, with no change in muscle weight [13].

The main purpose of this study was to examine the acute effect of androgens on the skeletal muscle of wild-type (WT) and AR^{skm-ly} mice. To our knowledge, the acute effect of androgens *in vivo* on muscle performance has not yet been studied. Our first hypothesis was that maximal force would be increased by acute *in vivo* androgen administration in both WT and AR^{skm-ly} mice. A second hypothesis is that electrically evoked calcium transient would be affected by acute androgen administration in mice. A third hypothesis is that reduced force generation capacity of the AR^{skm-ly} mice would be related to altered calcium transient. Such findings would be of benefit to antidoping agencies, as they would indicate that acute androgen administration might have ergogenic effects in athletes. Moreover, they would open new avenues to develop treatments to combat the muscle weakness observed in different contexts (ageing, neuromuscular diseases, etc.).

2. Materials and methods

2.1. Animals

All procedures were performed in accordance with national and European legislations and all experimental protocols have been approved by the French Departmental Direction of Animal Protection (agreement 75-1102). Male CD1 mice (referred to below as WT), AR^{skm-ly} mice [13] and age-matched control (referred to below as WT) mice were analysed. Testosterone and DHT (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) treatments are described below.

2.2. *In situ* TA muscle contractility

We analysed *in situ* tibialis anterior (TA) muscle contraction in response to nerve stimulation as described previously [14,15]. Mice were anesthetized using pentobarbital (60 mg/kg ip). Body temperature was maintained at 37 °C using radiant heat. The knee and foot were fixed with pins and clamps and the distal tendon of the muscle was attached to a lever arm of a servomotor system (305B, Dual-Mode Lever, Aurora Scientific) using a silk ligature. The sciatic nerve was proximally crushed and distally stimulated by a bipolar silver electrode using supramaximal square wave pulses of 0.1 ms duration. Absolute maximal force (P_0) generated during isometric contractions in response to electrical stimulation (frequency of 75–150 Hz, train of stimulation of 500 ms) was determined at L0 (length at which maximal tension was obtained during the tetanus). Absolute maximal power (P_{max} , mW) was calculated from force–velocity data. The isometric contraction was initiated during the first 300 ms, then muscle shortening was allowed during the last 200 ms. Five shortening contractions (15–50% of P_0) were performed, each separated by a 45 s rest period. The corresponding shortening speeds were measured during the first 50 ms. Finally, the fatigue resistance was assessed. The fatigue resistance protocol consisted of 40 contractions (100 Hz for 300 ms, evoked once every second), and the force produced at the end of the protocol was measured (% of initial force).

2.3. *In vitro* EDL muscle contractility

Isometric contractile properties of extensor digitorum longus (EDL) muscles were studied *in vitro*. Measurements were performed according to methods previously detailed [16]. Briefly, muscles were dissected and connected at one end to an electromagnetic puller and at the other end to a force transducer. Muscles were dissected free from adjacent connective tissue and soaked in an oxygenated Tyrode solution (95% O₂ and 5% CO₂) containing (mM): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 5 KCl, 1 KH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1 MgSO₄, 5 glucose, maintained at a temperature of 20 °C. After equilibration (45 min), stimulation (frequency of 125 Hz, train of stimulation of 300 ms) was delivered through electrodes running parallel to the muscle. P_0 , the absolute twitch force (Pt), the contraction time and the half-relaxation time during the twitch were measured.

2.4. *In vitro* EDL fibre bundle contractility and calcium transient

EDL muscles were pinned in SYLGARD® coated dishes containing normal physiological solution (in mM: 148 NaCl, 4.5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid], and 5.5 glucose (pH = 7.4). Small bundles of 10–15 fibres arranged in a single layer were dissected lengthwise, tendon-to-tendon, with the use of microscissors. Muscle preparations were loaded during 1 h with 3 µM of the Fura-2 AM fluorescent calcium probe. After Fura-2 loading, muscle fascicles were mounted in an experimental chamber allowing isometric force and cytosolic calcium measurement and electrical stimulation. One extremity was attached to a hook linked to a micromanipulator and the other extremity was fixed to an electromagnetic force-transducer device described elsewhere [17]. Muscle preparations were stretched until the twitch amplitude elicited by efficient electrical stimuli (5 ms duration; 14 V; 0.2 Hz) reached the maximum value. The diameter of each contracting fibre was measured to calculate the cross sectional area. The sum of the areas was used to calculate the cross-sectional area (mm²) and to normalise force amplitude (mN). Electrical triggered force development was acquired under two stimulus protocols: (1) 5 ms duration/14 V/0.2 Hz, protocol designed to elicit single separated twitches (contraction related to a unique action potential); (2) 20 pulses of 5 ms duration/14 V/100 Hz, protocol designed to elicit perfect tetanus. The evaluation of the contractile responses was done by measuring the amplitude (mN/mm²), the time to peak (ms) and the time constant of relaxation (s⁻¹) of the twitch, and the amplitude (mN/mm²) and the time constant of relaxation (s⁻¹) of the tetanus. All experiments were conducted at room temperature.

Ratiometric Fura-2 fluorescence measurements were made using optical excitation filters of 380 and 360 nm and an IonOptix microStepper Switch integrated system. Emitted fluorescence (510 nm) was background subtracted. Cytosolic [Ca] was calculated at rest according to a modified method from Grynkiewicz and collaborators [18]. A pseudo ratiometric approach was used to acquire calcium transients. Preparations were electrically stimulated with a pace protocol (0.5 Hz; 4 ms duration; 14 V) designed to induce a single action potential. Fura-2 fluorescence was first recorded at 1000 Hz under 380 nm excitation during 10 electrical stimulations. Thereafter, Fura 2 fluorescence was recorded at 360 nm. The 10 records were averaged at each excitation wavelength. Finally the calcium transient was calculated by making the ratio of the means (360/380) and transformed in [Ca] values using the method described for resting [Ca] determination. The time to peak, the amplitude and the rate constant of the calcium decay (by fitting a monoexponential on the recovery phase of the calcium transient) were calculated.

2.5. Statistical analysis

Groups were statistically compared using variance analysis or Student's *t*-test. If necessary, subsequent Bonferroni post hoc test was performed. For groups that did not pass the tests of normality and equal variance, non-parametric tests were used (Kruskal Wallis and Wilcoxon). Values are means $\pm$ SEM.

3. Results

3.1. Does an acute *in vivo* androgen treatment increases muscle force?

We examined the acute effect of androgens *in vivo* by analysing *in situ* TA muscle force production in response to electric nerve stimulation. Mice were injected ip with androgens dissolved in ethanol/PBS or vehicle (ethanol/PBS) and muscle performance was evaluated 30, 60 and 90 min after injection. Since we found no difference between the different times ($p > 0.05$), only 30 min data are shown. Fig. 1 shows that treatment with 10 mg/kg DHT (Fig. 1A and B), 100 mg/kg DHT (Fig. 1C) and testosterone (1, 10

and 100 mg/kg) (Fig. 1D, and data not shown) did not change the absolute maximal force and absolute maximal power in WT and AR^{skm-ly} mice ($p > 0.05$). Fatigue resistance was not increased (Fig. 1A, C and D) ($p > 0.05$). In addition, 100 mg/kg of testosterone dissolved in DMSO did not alter muscle performance after 90 min (Fig. 1E) ($p > 0.05$). To ensure the drug is rapidly available in muscle, we locally applied androgens and measurement were carried out 15 min after administration. Since we found no difference between dosages, 0.04, 0.4 and 4 mg/ml DHT data were pooled ($p > 0.05$). Fig. 1F shows that locally applied DHT did not affect the absolute maximal force, absolute maximal power or fatigue resistance in WT mice ($p > 0.05$).

To complete our study, we investigated the *in vitro* effect of androgens on EDL muscle contraction in response to electric stimulation. The EDL muscle similarly to the TA muscle is mainly composed of fast fibres. Whole EDL muscle was incubated with DHT dissolved in ethanol/thyroid and measurements were performed before, and 15, 30 and 45 min after treatment. Treatment with different DHT doses (63 and 630 pg/ml, and 6.3 ng/ml) did not alter maximal force of the EDL muscle (Fig. 2A) in WT mice ($p > 0.05$).

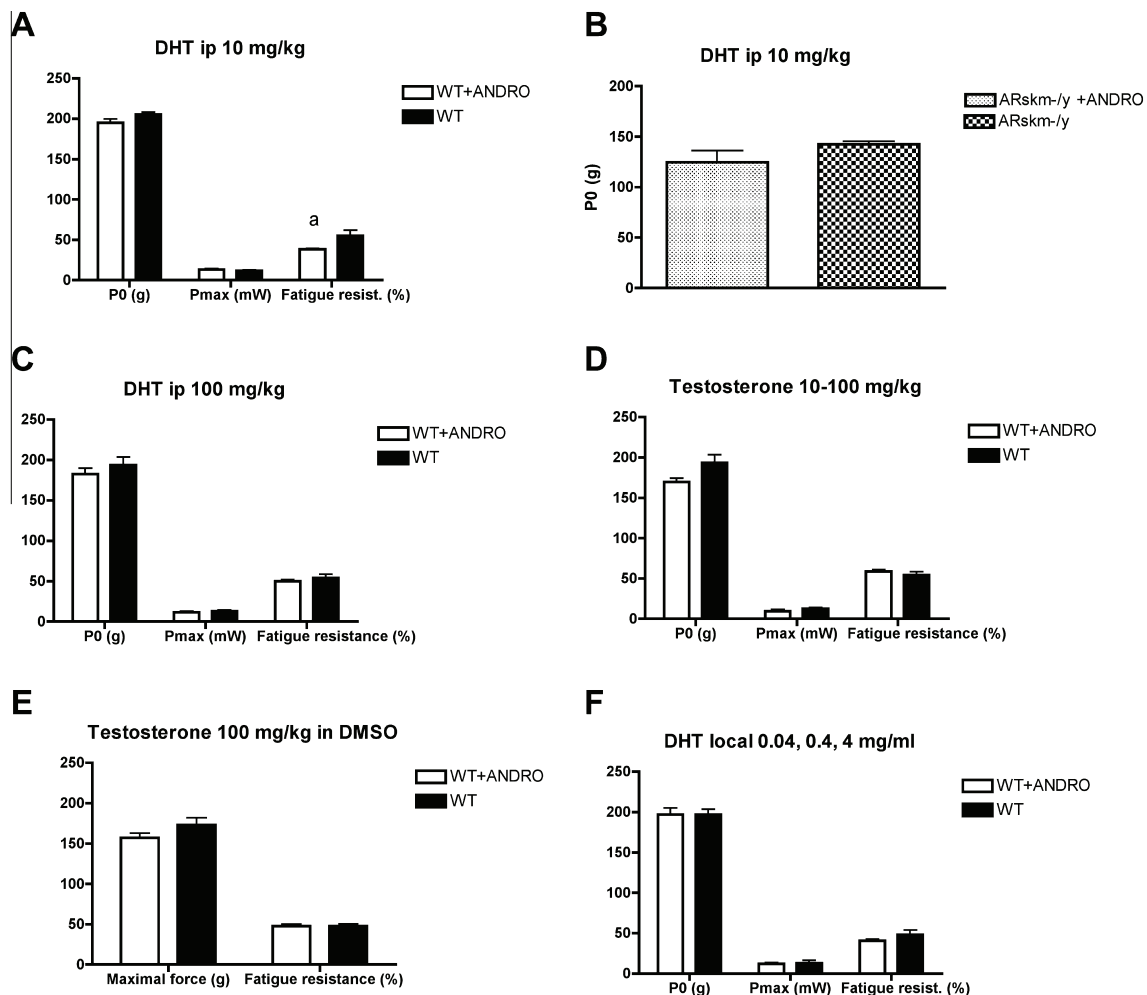


Fig. 1. Absolute maximal force (P0), absolute maximal power (Pmax) and fatigue resistance of TA muscle from WT and AR^{skm-ly} mice after *in vivo* acute androgen treatment. (A) 10 mg/kg DHT treatment of WT mice. (B) 10 mg/kg DHT treatment of AR^{skm-ly} mice. (C) 100 mg/kg DHT treatment of WT mice. (D) 1, 10 and 100 mg/kg testosterone treatment of WT mice. Data from 1, 10 and 100 mg/kg testosterone treatments were pooled. In A, B, C and D drugs were dissolved in ethanol/PBS. WT and AR^{skm-ly} control mice were treated with appropriate vehicle (ethanol/PBS). Mice were ip injected, then anesthetized and muscle performance was studied 30 min after. (E) 100 mg/kg testosterone treatment in WT mice. Drug was dissolved in DMSO and muscle performance was studied 90 min after ip injection. WT control mice were similarly treated with vehicle (70 μ l DMSO). (F) Drug was applied locally. Drug was dissolved in ethanol/PBS. Control mice were treated with appropriate vehicle (ethanol/PBS) and data were pooled. Measurements were done 15 min after. a: significant difference between treatment ($p < 0.05$) using variance analysis followed by Bonferroni post hoc analysis. P0: absolute maximal force, Pmax: absolute maximal power. $n = 6-12$ /group. Data are means $\pm$ SEM.

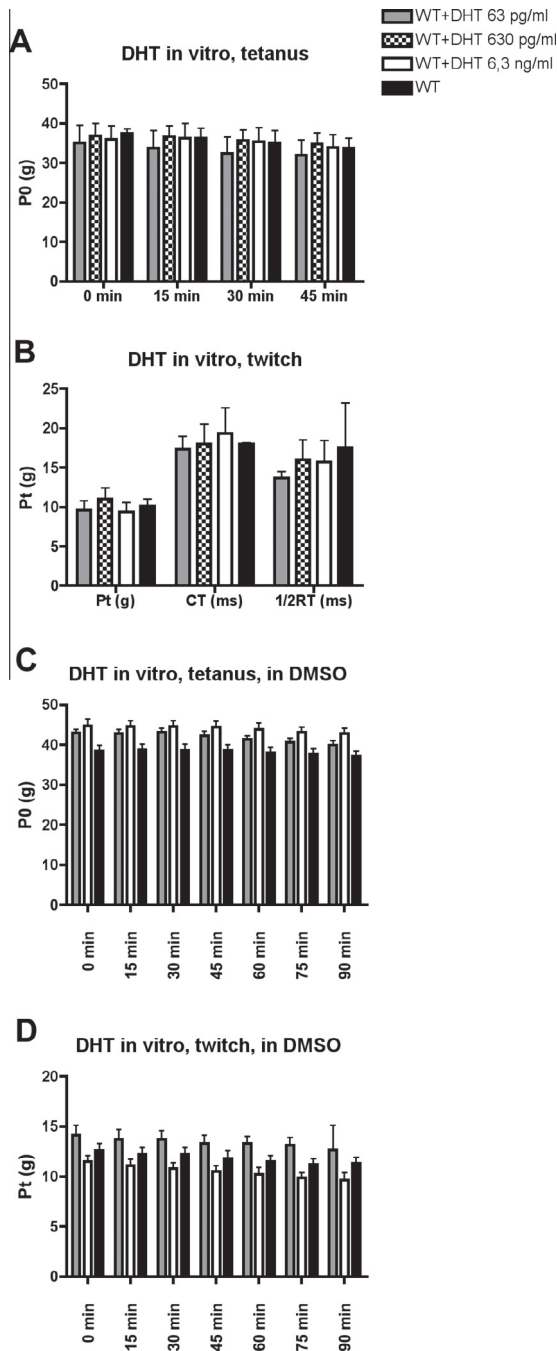


Fig. 2. Absolute maximal and submaximal forces and kinetic of the twitch of EDL muscle from WT mice after *in vitro* acute DHT treatment. (A) Absolute maximal force (P0), (B) absolute force of the twitch (submaximal force) (Pt), contraction of the twitch (CT) and half-relaxation time of the twitch (1/2RT). In (A) and (B) DHT was dissolved in ethanol and added after a 45 min period of equilibration in Tyrode solution. Muscles were measured before, 15, 30, and 45 min after the drug was added. (C) absolute maximal force (P0). (D) absolute force of the twitch (Pt). In (C) and (D) DHT was dissolved in DMSO and added after a 45 min period of equilibration in Tyrode solution. Muscles were measured before, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 min after the drug was added. $n = 4-8/\text{dose}$. Data are means $\pm$ SEM.

We also found no effect of these *in vitro* DHT treatments on submaximal force (force of the twitch) or the kinetic of the twitch (contraction time, half-relaxation time) (Fig. 2B) ($p > 0.05$). Similarly, DHT dissolved in DMSO had no effect on absolute maximal force (Fig. 2C) and submaximal forces (Fig. 2D) 15, 30, 45, 60, 75 and 90 min after treatment ($p > 0.05$).

To ensure uniform and adequate perfusion of DHT, we next used muscle fibre bundles isolated from EDL muscles. DHT treatment failed *in vitro* to affect specific maximal force in fibre bundles from WT and AR^{skm-ly} mice (Fig. 3A and B) ($p > 0.05$).

3.2. Do androgens affect calcium transient?

The effect of DHT on electrically evoked calcium transient was analysed *in vitro* on fibre bundles loaded with a calcium indicator. The magnitude and the kinetic of the evoked calcium transient were assayed in either WT or AR^{skm-ly} mice. We found that amplitude (Fig. 4A and B), time to peak (Fig. 4C and D) and the decay (Fig. 4E and F) of the calcium transient did not differ between DHT treated and untreated fibres bundles from both mouse strains ($p > 0.05$).

3.3. Is calcium transient alteration responsible for the reduced maximal force in AR^{skm-ly} mice mice?

In a previous study, we reported that the specific maximal force of TA and EDL muscles was reduced in AR^{skm-ly} mice [13]. Similarly, in the present study we found that the specific maximal force of EDL fibre bundles was decreased in such mice as compared to WT mice (Fig. 5A) ($p < 0.05$). However, this reduced muscle force capacity generation was no related to calcium transient dysfunction. Since, there was no difference in calcium amplitude, time to peak and decay between AR^{skm-ly} mice and WT mice (Fig. 5B) ($p > 0.05$).

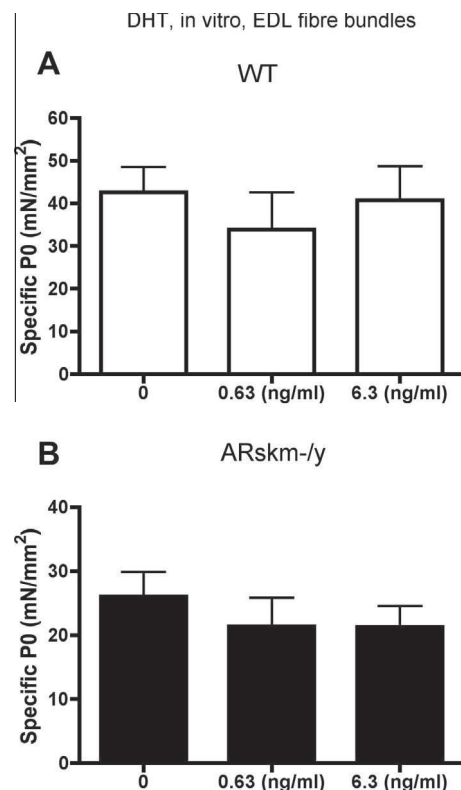


Fig. 3. Maximal force of EDL fibre bundles from WT (A) and AR^{skm-ly} (B) mice after *in vitro* acute DHT treatment. Drug was dissolved in ethanol and added after a 30 min period of equilibration in normal physiological solution. Fibre bundles were measured 30 min after the drug was added. $n = 6-19/\text{dose}$. Data are means measured 30 min after the drug was added $\pm$ SEM.

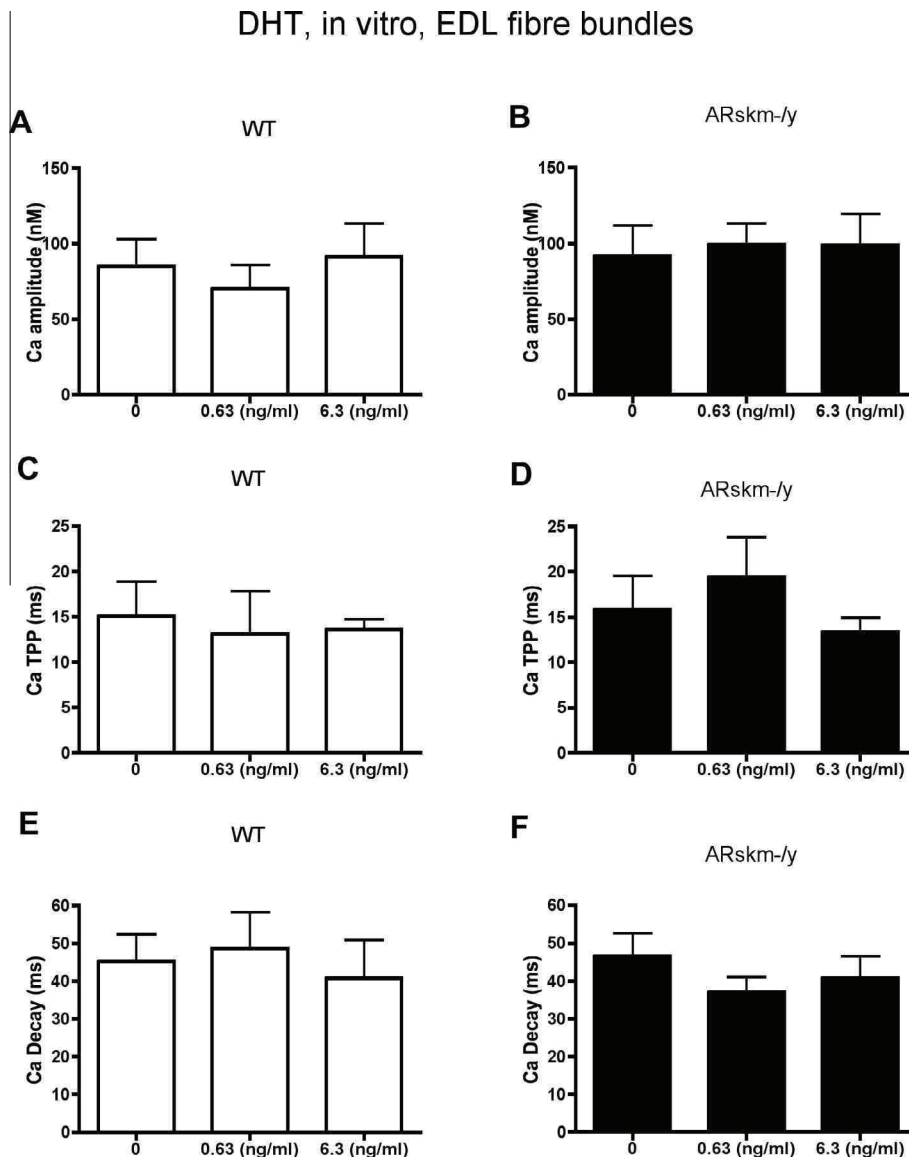


Fig. 4. Electrically evoked calcium transient of EDL fibre bundles from WT (A, C, E) and AR^{skm-/y} (B, D, F) mice after *in vitro* acute DHT treatment. (A and B): calcium amplitude, (C and D): calcium time to peak (TPP), (E and F): calcium decay. Drug was dissolved in ethanol and added after a 30 min period of equilibration in normal physiological solution. Fibre bundles were measured 30 min after the drug was added. $n = 6-19$ /group. Data are means $\pm$ SEM.

4. Discussion

Results from several recent studies support the possibility that sex hormones may have a rapid action via signal transduction pathways independently of AR [3–9,19,20]. Moreover, it was reported that they might alter various aspects controlling the muscle excitation–contraction–relaxation cycle: increased muscle excitability, calcium homeostasis and maximal force-generation capacity [2,5,6,10–12,19]. We first tested whether maximal force generation by skeletal muscle is increased by *in vivo* acute androgen administration in both WT and AR^{skm-/y} mice. Our study demonstrates that *in vivo* acute androgen treatment does not affect maximal force (and maximal power) of mouse muscle expressing or not AR. In addition, we found no effect of *in vitro* androgen treatment on maximal force generation capacity of whole muscle and fibre bundles, eliminating the potential problems of hormone bio-availability. Therefore, our results do not support an ergogenic action of acute androgens systemically administered on muscle maximal performance. An ergogenic effect of androgens on motor behaviour [21] *in vivo* can however not be excluded.

In addition, acute androgen treatment did not alter the calcium transient evoked electrically, in both WT and AR^{skm-/y} mice. This result is in agreement with the absence of an effect of acute androgen treatment on maximal force, since calcium transient plays a key role in the contraction. Our results indicate that the potential acute effect of androgens on intracellular calcium on skeletal muscle cells [4] has no major impact on the evoked calcium release during excitation–contraction coupling.

A reduction in the amplitude of the calcium signal delivered to the contractile apparatus would lead to a reduced maximal force generation capacity. A reduced calcium signal may be achieved via a reduced release from the ryanodine receptor, the calcium channel of the reticulum sarcoplasmic, or increased calcium buffering such as that performed via the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase pumps. However, muscle weakness induced by selective AR ablation in skeletal muscle fibres ([13], and present study) cannot be explained by such effects, since electrically calcium transient were similar in AR^{skm-/y} and WT mice. The marked alterations in force production observed in AR^{skm-/y} mice, both at the levels of the whole muscle and the fibre bundles, must

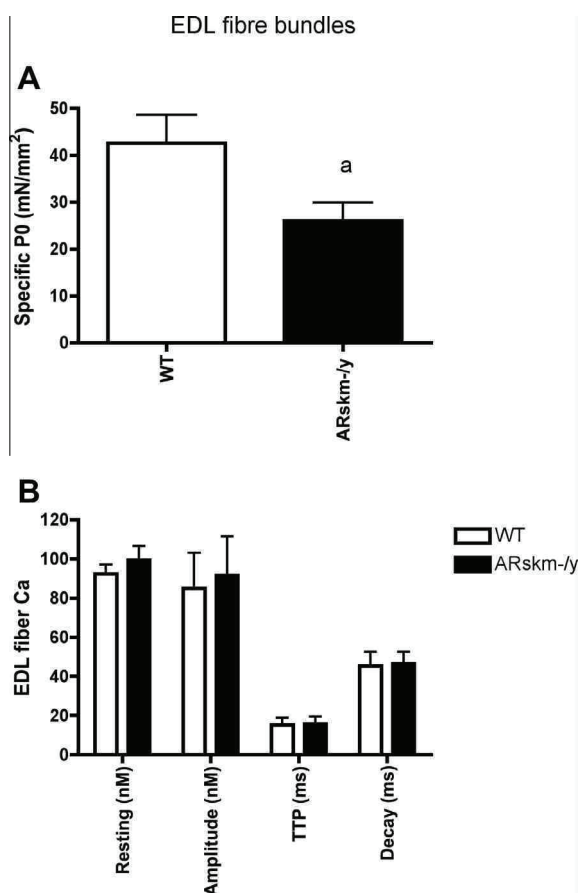


Fig. 5. Comparison of EDL fibre bundles between AR^{skm-ly} and WT mice. (A) Maximal specific force, (B) electrically calcium transient of EDL fibre bundles in WT and AR^{skm-ly} mice. Resting: resting Ca concentration TTP: calcium time to peak (TTP). a: significant difference between treatment ($p < 0.05$) using Student's *t*-test. $n = 6$ –19/group. Data are means $\pm$ SEM.

therefore be related to altered sarcomere structure and posttranslational modifications of contractile proteins, but not to a reduced in function/expression of reticulum sarcoplasmic proteins.

5. Conclusion

Our results show that muscle contractility and electrically evoked calcium transients are not affected by acute androgen treatment, indicating that androgens have no major rapid action on either intact fast skeletal muscle or isolated muscle fibres. In contrast, they suggest that acutely administered androgens cannot improve muscle performance in athletes or muscle weakness in patients with neuromuscular diseases. Moreover, the present study shows that an altered electrically evoked calcium transient is not responsible for the reduced maximal force observed in AR-deficient fast muscles.

Acknowledgements

We are grateful to Nicolas Guerchet and Guillaume Tanniu for technical assistance.

Financial support has been provided by Université Pierre et Marie Curie, CNRS, INSERM, University Paris Descartes, Université

de Strasbourg, the Association Française contre les Myopathies (AFM), ANR-Blanc Androgluco, and Agence Française de Lutte contre le Dopage. M.S. was supported by Assissi Foundation of Memphis.

References

- [1] Michels G, Hoppe UC. Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 2008;29:182–98.
- [2] Vicencio JM, Estrada M, Galvis D, Bravo R, Contreras AE, Rotter D, Szabadkai G, Hill JA, Rothermel BA, Jaimovich E, Lavandero S. Anabolic androgenic steroids and intracellular calcium signaling: a mini review on mechanisms and physiological implications. *Mini Rev Med Chem* 2011;11:390–8.
- [3] Hamdi MM, Mutungi G. Dihydrotestosterone activates the MAPK pathway and modulates maximum isometric force through the EGF receptor in isolated intact mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2010;588:511–25.
- [4] Estrada M, Espinosa A, Gibson CJ, Uhlen P, Jaimovich E. Capacitative calcium entry in testosterone-induced intracellular calcium oscillations in myotubes. *J Endocrinol* 2005;184:371–9.
- [5] Estrada M, Liberona JL, Miranda M, Jaimovich E. Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E132–9.
- [6] Estrada M, Espinosa A, Muller M, Jaimovich E. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2003;144:3586–97.
- [7] Basualto-Alarcon C, Jorquera G, Altamirano F, Jaimovich E, Estrada M. Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy. *Med Sci Sports Exerc* 2013;45:1712–20.
- [8] Gonzalez-Montelongo MC, Marin R, Gomez T, Marrero-Alonso J, Diaz M. Androgens induce nongenomic stimulation of colonic contractile activity through induction of calcium sensitization and phosphorylation of LC20 and CPI-17. *Mol Endocrinol* 2010;24:1007–23.
- [9] Fu R, Liu J, Fan J, Li R, Li D, Yin J, Cui S. Novel evidence that testosterone promotes cell proliferation and differentiation via G protein-coupled receptors in the rat L6 skeletal muscle myoblast cell line. *J Cell Physiol* 2012;227:98–107.
- [10] Bouhrel A, Joumaa WH, Leoty C. Nandrolone decanoate treatment affects sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase function in skinned rat slow- and fast-twitch fibres. *Pflügers Arch* 2003;446:728–34.
- [11] Witayavanitkul N, Woranush W, Bupha-Intr T, Wattanapernpool J. Testosterone regulates cardiac contractile activation by modulating SERCA but not NCX activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304:H465–72.
- [12] Tsang S, Wong SS, Wu S, Kravtsov GM, Wong TM. Testosterone-augmented contractile responses to α 1- and β 1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C766–82.
- [13] Chambon C, Duteil D, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Malivindi R, Kato S, Chambon P, Metzger D. Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14327–32.
- [14] Hourde C, Vignaud A, Beurdy I, Martelly I, Keller A, Ferry A. Sustained peripheral arterial insufficiency durably impairs normal and regenerating skeletal muscle function. *J Physiol Sci* 2006;56:361–7.
- [15] Vignaud A, Hourde C, Butler-Browne G, Ferry A. Differential recovery of neuromuscular function after nerve/muscle injury induced by crude venom from *Notechis scutatus*, cardiotoxin from *Naja atra* and bupivacaine treatments in mice. *Neurosci Res* 2007;58:317–23.
- [16] Joubert R, Vignaud A, Le M, Moal C, Messaddeq N, Buj-Bello A. Site-specific Mtm1 mutagenesis by an AAV-Cre vector reveals that myotubularin is essential in adult muscle. *Hum Mol Genet* 2013;22:1856–66.
- [17] Blanc FX, Salmeron S, Coirault C, Bard M, Fadel E, Dulmet E, Darteville P, Lecarpentier Y. Effects of load and tone on the mechanics of isolated human bronchial smooth muscle. *J Appl Physiol* 1999;86:488–95.
- [18] Frayse B, Desaphy JF, Rolland JF, Pierno S, Liantonio A, Giannuzzi V, Camerino C, Didonna MP, Cocchi D, De Luca A, Conte Camerino D. Fiber type-related changes in rat skeletal muscle calcium homeostasis during aging and restoration by growth hormone. *Neurobiol Dis* 2006;21:372–80.
- [19] Burge JA, Hanna MG, Schorge S. Non-genomic actions of progesterone and 17 β -estradiol on the chloride conductance of skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2013;48:589–91.
- [20] Belcher SM, Chen Y, Yan S, Wang HS. Rapid estrogen receptor-mediated mechanisms determine the sexually dimorphic sensitivity of ventricular myocytes to 17 β -estradiol and the environmental endocrine disruptor bisphenol A. *Endocrinology* 2013;153:712–20.
- [21] Ibejunjo C, Eash JK, Li C, Ma Q, Glass DJ. Voluntary running, skeletal muscle gene expression, and signaling inversely regulated by orchidectomy and testosterone replacement. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:E327–40.

Publication n°2

Publiée dans **Endocrinology**, Septembre 2014

Myofibers androgen receptor is indispensable for a full mechanical overload-induced muscle hypertrophy and fiber type transition in male mice.

Arnaud Ferry^{1,2}, Mélanie Schuh³, Ara Parlakian⁴, Takouhie Mgrditchian^{1,4}, Nicolas Valnaud¹, Pierre Joanne⁴, Gillian Butler-Browne¹, Onnik Agbulut⁴, Daniel Metzger³.

¹ UPMC Université Paris 6, Sorbonne Universités, INSERM U974, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, Paris, F-75013 France.

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, F-75006 France.

³ Université de Strasbourg, IGBMC, CNRS UMR7104, INSERM U964, 67404 Illkirch France.

⁴ UPMC Université Paris 06, Sorbonne Universités, UMR CNRS 8256, Biological Adaptation and Ageing, Paris, F-75005 France.

Myofiber androgen receptor promotes maximal mechanical overload-induced muscle hypertrophy and fiber type transition in male mice

Arnaud Ferry^{1,2}, Mélanie Schuh³, Ara Parlakian⁴, Takouhie Mgrditchian^{1,4}, Nicolas Valnaud¹, Pierre Joanne⁴, Gillian Butler-Browne¹, Onnik Agbulut⁴, Daniel Metzger³

1-UPMC Univ Paris 06, Sorbonne Universités, INSERM U974, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, Paris, F-75013 France; 2-Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, F-75006 France; 3-IGBMC, CNRS UMR 7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch France; 4-UPMC Univ Paris 06, Sorbonne Universités, UMR CNRS 8256, Biological Adaptation and Ageing, Paris, F-75005 France.

The first aim of this study was to examine the role of myofiber androgen receptor (AR) in male mice on muscle performance gain and remodeling induced muscle mechanical overloading (OVL), that mimics resistance training. The response of OVL in mice in which AR is selectively ablated in myofibers (AR^{skm-/-}) was compared to that of wild-type mice (WT). In addition, we determined whether the synthetic anabolic androgen nandrolone (NANDRO) administration affects the OVL response. We found that OVL increased absolute maximal force and fatigue resistance in both mouse genotypes ($p < 0.05$). However the absolute maximal force increased more in AR^{skm-/-} mice as compared to WT mice (+88% versus +63% $p < 0.05$). Muscle weight increased less in response to OVL in AR^{skm-/-} mice (+54%) than in WT mice (+115%) ($p < 0.05$). The fiber number per cross-section similarly increased in both mouse genotypes after OVL ($p < 0.05$). In contrast to WT mice, the fiber diameter expressing MHC-2x decreased after OVL in AR^{skm-/-} mice ($p < 0.05$). The MHC-2b to MHC-2a fiber type transition in response to OVL was reduced in AR^{skm-/-} mice as compared to WT mice ($p < 0.05$). Finally, NANDRO administration during OVL did not further improve absolute maximal force and fatigue resistance and markedly alter muscle remodeling in both mouse genotypes. Together, our results indicate that myofiber AR is required for a complete response to OVL and that exogenous androgens do not increase muscle performance during intensive remodeling in male mice.

Androgens play a role in all skeletal muscles as well as the very androgen responsive levator ani. They can increase growth, absolute maximal force production and fatigue resistance and modulate fiber type composition (1–14). Androgens, at least partially, exert their effects by binding to the nuclear androgen receptor (AR) of muscle fibers (myofiber AR) (3, 4). We recently found that the myofiber AR controls absolute maximal force, without affecting the mass, in hindlimb muscles from adult male mice (3). Myofiber AR deficiency decreases specific maximal force (absolute maximal force normalized by muscle weight) and impairs the organization of sarcomeres (3,

15). However, we do not yet know whether myofiber AR plays a role during the muscle remodeling induced by mechanical overloading (OVL) that mimics resistance training. In response to OVL, muscle weight is almost doubling, absolute maximal force and fatigue resistance are increased, and its fibers exhibit a fast/glycolytic to slow/oxidative type transition (16–19). Since AR expression can be increased by OVL (20), myofiber AR might play an important role during this remodeling process, and androgens might affect muscle remodeling, as they modulate many processes induced by OVL, such as cell cycle regulation (21), damage (22) and inflammation (23). Even

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2014 by the Endocrine Society

Received March 5, 2014. Accepted September 5, 2014.

Abbreviations:

doi: 10.1210/en.2014-1195

Endocrinology endo.endojournals.org 1

though several studies found that androgens do not enhance OVL-induced muscle hypertrophy in males (22, 24), androgens might affect the gain in absolute maximal force and fatigue resistance and/or fiber type transition induced by OVL.

The first aim of this study was to examine the role of myofiber AR on muscle remodeling and performance gain induced by OVL in male mice. We thus compared the effects of 1 month-OVL on absolute maximal force, specific maximal force, fatigue resistance, growth, and fiber type transition of the plantaris muscle from adult male wild-type (WT) mice and myofiber AR-deficient mice (AR^{skm-/y}). In addition, we determined whether the synthetic anabolic androgen nandrolone (NANDRO) administered during OVL affects muscle remodeling and performance gain in male mice, and whether the potential effects of NANDRO might be mediated by myofiber AR.

Materials and Methods

Animals and treatments

All procedures were performed in accordance with National and European legislations, under the license 75–1102. Wild-type C57/BL6 male mice (referred to below as WT) and myofiber AR-deficient male mice of the same genetic background (referred to below as AR^{skm-/y}) were used. AR^{skm-/y} mice were generated by breeding female AR^{L2/L2} mice carrying “floxed” AR L2 alleles with male HSA-Cre transgenic mice, as described (3). AR was efficiently ablated in myofiber from male AR^{skm-/y} mice. Indeed, quantitative RT-PCR showed that the AR gene expression was reduced by 92% in AR^{skm-/y} mice (0.16 ± 0.02 AU, $n = 22$) as compared to WT (2.13 ± 0.12 AU, $n = 20$) ($P < .05$) mice. For mechanical overloading at 2–3 months of age, mice were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg body weight, ip). The plantaris muscles of both legs were mechanically overloaded (OVL; $n = 6$ for AR^{skm-/y} mice and $n = 6$ for WT mice) for 4 weeks by the surgical removal of soleus muscles and a major portion of the gastrocnemius muscles as described (16). Nandrolone decanoate (NANDRO, 10 mg/kg, sc) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) ($n = 3$ for AR^{skm-/y} mice and $n = 4$ for WT mice) or vehicle (sesame seed oil) was injected every 3–4 days for 4 weeks. The first and the last injection were given 1 day after surgery and 3 days before the end of the study. NANDRO dose is usually 2 to 10 mg/kg (25). In a pilot study, we found that NANDRO (10 mg/kg) increased muscle weight and performance in WT mice. Control AR^{skm-/y} mice ($n = 6$) and WT mice ($n = 6$) were also used to obtain basal values.

Force measurement

Plantaris muscle function was evaluated by measuring in situ isometric force, as described (16, 26). Mice were anesthetized (pentobarbital sodium, 50 mg/kg, ip). During physiological experiments, supplemental doses were given as required, to maintain deep anesthesia. The knee and foot were fixed with clamps and stainless steel pins. The plantaris muscle was exposed and the distal tendon of the gastronecnmuis and soleus muscle complex

was cut. The distal tendon of the plantaris muscle was attached to an isometric transducer (Harvard Bioscience) with a silk ligature. The sciatic nerves were proximally crushed and distally stimulated by a bipolar silver electrode using supramaximal square wave pulses of 0.1 millisecond duration. Responses to tetanic stimulation (pulse frequency 75–143 Hz) were successively recorded. At least 1 minute was allowed between contractions. Absolute maximal forces were determined at optimal length (length at which maximal tension was obtained during the tetanus). Force was normalized to the muscle mass (m) as an estimate of specific maximal force. Fatigue resistance was then determined after a 5-minute rest period. The muscle was continuously stimulated at 50 Hz for 2 minutes (submaximal continuous tetanus). The duration corresponding to a 50% decrease in force was noted. Body temperature was maintained at 37°C using radiant heat. Mice were euthanized with an overdose of pentobarbital.

Histology

Transverse serial sections (8 μ m) of plantaris muscles (collected 1 month after OVL and NANDRO) were obtained using a cryostat, in the midbelly region. Some of sections were processed for histological analysis according to standard protocols (Sirius red). Other sections were processed for immunohistochemistry as described previously (16, 27). For determination of muscle fiber diameter, fiber expressing myosin heavy chain (MHC) and Pax 7+ satellite cells, frozen unfixed sections were blocked 1h in PBS plus 2% BSA, 2% sheep serum. Sections were then incubated overnight with primary antibodies against, laminin (Sigma, France), MHC isoform 2a (clone SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa), MHC isoform 2b (clone BF-F3, Developmental Studies Hybridoma Bank), MHC isoform 1 (clone BA-D5, Developmental Studies Hybridoma Bank) and Pax 7 (Studies Hybridoma Bank). After washes in PBS, sections were incubated 1 hour with secondary antibodies (Alexa Fluor, Invitrogen). Slides were finally mounted in Fluoromont (Southern Biotech). Images were captured using a digital camera (Hamamatsu ORCA-AG) attached to a motorized fluorescence microscope (Zeiss AxioImager.Z1), and morphometric analyses were made using the software ImageJ. MHC-2x fibers were identified as fibers that do not express MHC-2b, MHC2a or MHC-1. For determination of the percentage of fiber type and diameter (minimal), we attempted to analyze all the fibers of a cross-section. For example, we measured the diameter of 826–1427 fibers (WT mice), 1004–2386 fibers (WT+OVL mice), 887–1937 fibers (WT+OVL+NANDRO mice), 877–1134 fibers (AR^{skm-/y} mice), 1201–2016 fibers (AR^{skm-/y}+OVL mice), and 1433–1850 fibers (AR^{skm-/y}+OVL+NANDRO mice). Data presented correspond to pure MHC-2b, MHC-2x and MHC-2a expressing fibers (without MHC coexpression). Total fiber number was counted at the widest cross-section.

Gel electrophoresis

The plantaris muscles were extracted on ice for 60 minutes in 4 volumes of extracting buffer (pH 6.5), as previously described (28). After centrifugation, the supernatants were diluted 1:1 (vol/vol) with glycerol and stored at –20°C. Myosin heavy chain (MHC) isoforms were separated on 8% polyacrylamide gels, which were made in the Bio-Rad mini-Protean II Dual slab cell

system, as described previously (29, 30). The gels were migrated for 31 hours at 72 V (constant voltage) at 4°C. After migration, the gels were silver stained. The positions of the different MHC bands were confirmed as described (31, 32). The gels were scanned using a video acquisition system, and bands were quantified by densitometric software (Multi Gauge; Fujifilm, Clichy, France).

RNA preparation and analysis

Plantaris muscle RNA was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen). Two μ g RNA were converted to cDNA with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) and hexamers primers according to the supplier's protocol. Quantitative RT-PCR was performed by using the SYBR Green 1 marker PCR kit (Roche) according to the supplier's protocol. The 18S ribosomal RNA was used as an internal control. Primers were as follows: 5'-CTGCCTCCGAAGTGTTGGTAT-3' and 5'-GCCAGAAGCTTCATCTCCAC-3' (AR), and 5'-TCGTCTTCGAAACTCCGACT-3' and 5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3' (18S).

Statistical analysis

Groups were generally statistically compared using 2 way-analysis of variance (ANOVA). The 2 factors were generally treatment (basal, overload, and overload combined to nandrolone administration) and genotype (WT and AR^{skm-ly} mice). If appropriate, subsequent post hoc analysis (Bonferroni) was performed. Data from mice that were overloaded and overloaded and nandrolone treated were also expressed in percentage of basal values and analyzed using a 2 way-ANOVA in order to compare the effect of overload between the two genotypes. In the case of fiber diameter distribution analysis, the two genotypes were analyzed separately, using 2 way-ANOVA in which the 2 factors were treatment (basal, overload, and overload combined to nandrolone administration) and fiber diameter distribution (11 categories). AR expression in WT and AR^{skm-ly} mice was compared with Student T test. In the case of AR expression analysis in WT mice, the effect of OVL was analyzed, using 2 way-ANOVA in which the 2 factors were treatment (basal, overload) and OVL duration (1 week, 1 month). A p value < 0.05 was considered significant. Values are means $\pm$ SEM.

Results

Muscle performance gains in response to OVL are not impaired in myofiber AR deficient mice

To determine whether myofiber AR is involved in overload-induced muscle performance gains, plantaris muscles from both male WT and AR^{skm-ly} mice were analyzed after 1 month OVL ie,; after surgical removal of soleus and a major portion of gastrocnemius muscles. OVL increased absolute maximal force of plantaris muscle in both mouse genotypes (Figure 1A)($P < .05$), however the percentage of increase was slightly greater in AR^{skm-ly} mice (+88%) as compared to WT mice (+63%)($P < .05$). Specific maximal force was unchanged in response to OVL in both mouse genotypes (Figure 1B). Fatigue resistance increased

similarly in response to OVL by 73% and 56% in WT and AR^{skm-ly} mice respectively (Figure 1C)($P < .05$), since the percentage of increase was not different between the two mouse genotypes ($P > .05$).

Reduced muscle growth in response to OVL in myofiber AR deficient mice

Plantaris muscle weight increased in response to OVL in both mouse genotypes (Figure 2A)($P < .05$), even though the percentage of increase was lower in AR^{skm-ly}

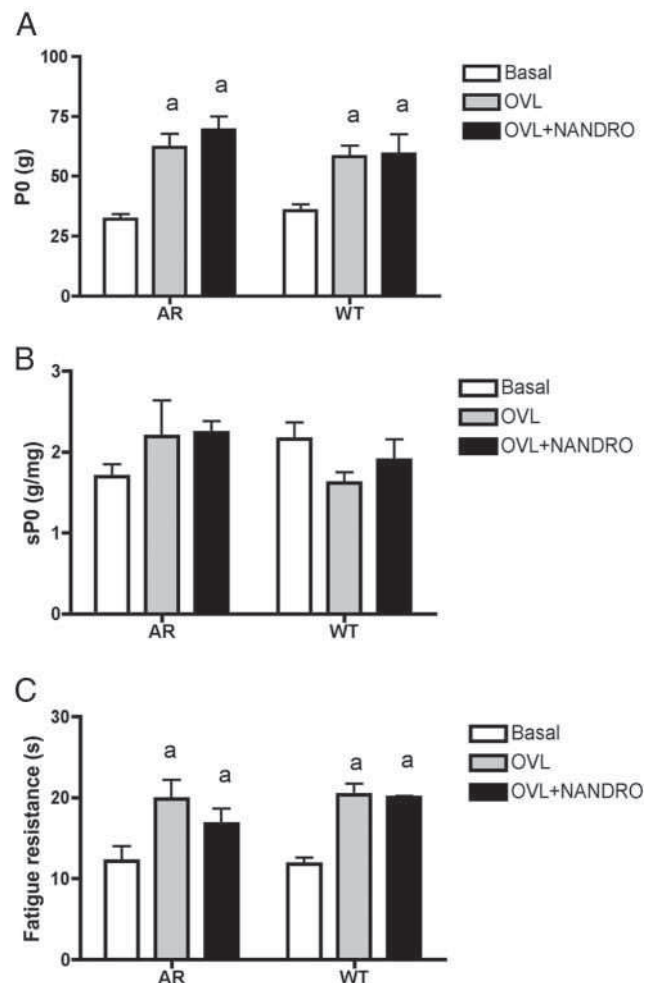


Figure 1. Absolute maximal force (A), specific maximal force (C) and fatigue resistance (E) in WT and AR^{skm-ly} mice. WT: Wild-type mice AR: AR^{skm-ly} mice, in which AR is selectively ablated in myofibers OVL: mechanically overloaded mice +NANDRO: mice treated with nandrolone a: AR+OVL and AR+OVL+NANDRO or WT+OVL and WT+OVL+NANDRO different from basal AR or basal WT, respectively ($P < .05$), $n = 12$ for AR basal, $n = 10$ for AR+OVL, $n = 6$ for AR+OVL+NANDRO, $n = 12$ for WT basal, $n = 16$ for WT+OVL, $n = 6$ for WT+OVL+NANDRO. The 2-way ANOVA revealed the main effect of treatment on absolute maximal force ($P = .0001$) and fatigue resistance ($P = .0001$). Bonferroni post hoc analysis showed that absolute maximal force and fatigue resistance of OVL and OVL+NANDRO were different from Basal ($P < .05$). There was no main effect of genotype and no interaction between the 2 factors ($P > .05$).

mice as compared to WT mice (+54% vs +115%, $P < .05$). Immunohistochemical analyses revealed that the number of fibers per plantaris muscle section increased similarly in response to OVL by 60% in WT and 51% in AR^{skm-/y} mice (Figure 2BC)($P < .05$). The number of fibers expressing MHC-2a increased in both mouse genotypes (Figure 2BC)($P < .05$), even though the percentage of increase was lower in AR^{skm-/y} mice (+129%) as compared to WT mice (+214%)($P < .05$). The diameter of the fibers was similarly decreased in both WT and AR^{skm-/y} mice by 19% and 22%, respectively (Figure 3A)($P < .05$). The

analysis of the distribution of the fiber diameter confirmed a reduced fiber size in AR^{skm-/y} mice ($P < .05$) but not in WT mice (Figure 4AB). In fact, there was a leftward shift in fiber diameter in only AR^{skm-/y} mice ($P < .05$). In particular, the diameter of the fibers expressing MHC-2b was similarly decreased in both WT and AR^{skm-/y} mice by 20% and 26%, respectively (Figure 3BC)($P < .05$). The change in fiber diameter distribution confirmed the reduced size of the fibers expressing MHC-2b in response to OVL in both mouse genotypes (Figure 4CD)($P < .05$) since there was a leftward shift in fiber diameter distribution. In addition, the analysis of the fiber diameter distribution showed that the diameter of the fiber expressing MHC-2x was reduced in response to OVL in AR^{skm-/y} mice ($P < .05$)

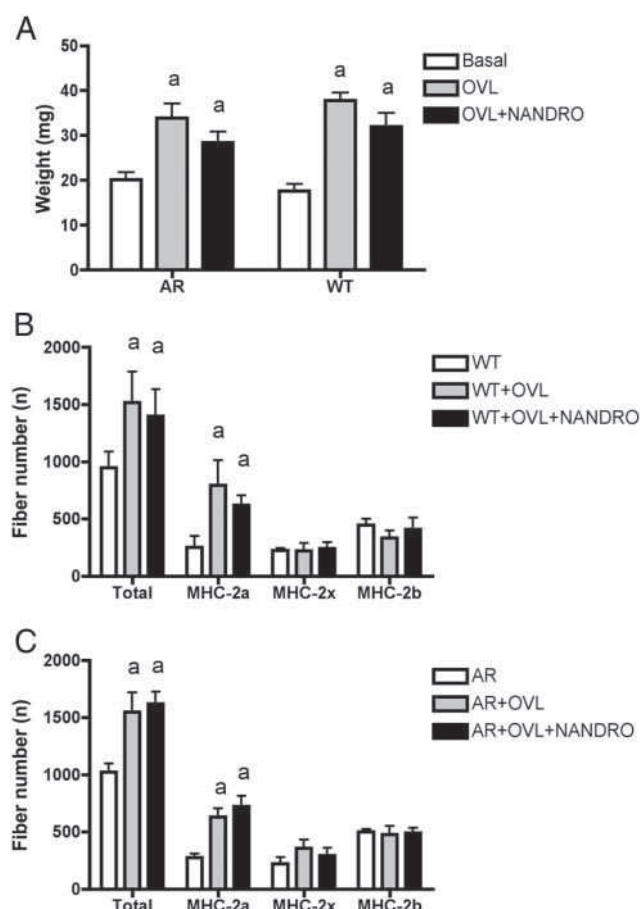


Figure 2. Muscle weight (A) and fiber number per section (B, C) in WT (A, B) and AR^{skm-/y} (A, C) mice. WT: Wild-type mice AR: AR^{skm-/y} mice, in which AR is selectively ablated in myofibers OVL: mechanically overloaded mice +NANDRO: mice treated with nandrolone a: AR +OVL or WT+OVL different from AR or WT ($P < .05$). For muscle weight, $n = 12$ for AR basal, $n = 10$ for AR+OVL, $n = 6$ for AR+OVL+NANDRO, $n = 12$ for WT basal, $n = 16$ for WT+OVL, $n = 6$ for WT+OVL+NANDRO. For fiber number, $n = 5$ for AR basal, $n = 4$ for AR+OVL, $n = 4$ for AR+OVL+NANDRO, $n = 5$ for WT basal, $n = 5$ for WT+OVL, $n = 4$ for WT+OVL+NANDRO. The 2-way ANOVA revealed the main effect of treatment on muscle weight ($P = .0001$), total fiber number ($P = .006$) and the number of fibers expressing MHC-2a ($P = .0009$). Bonferroni post hoc analysis showed that muscle weight, total fiber number and the number of fibers expressing MHC-2a of OVL and OVL+NANDRO were different from Basal, WT or AR ($P < .05$). There was no main effect of genotype and no interaction between the 2 factors ($P > .05$).

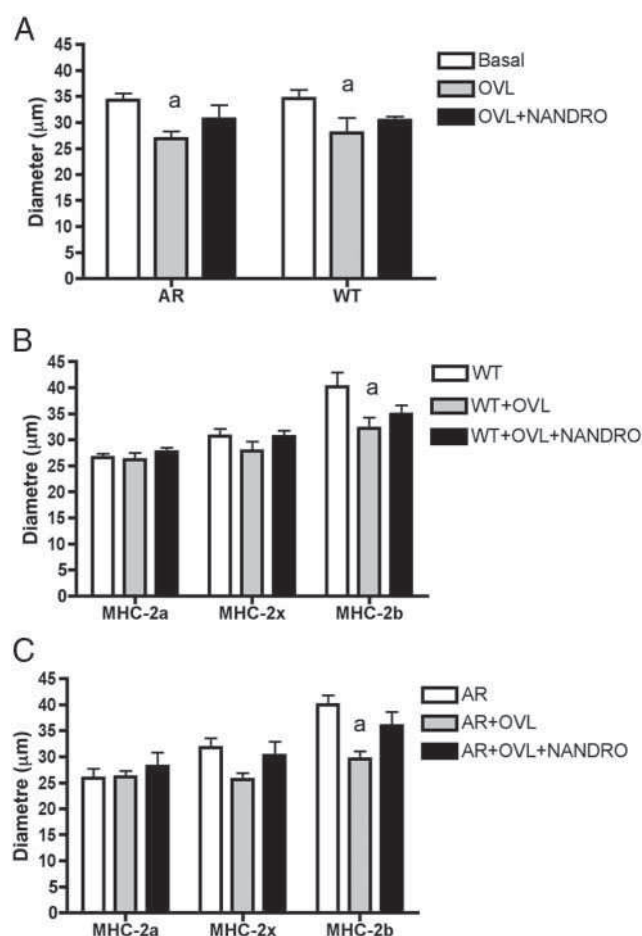


Figure 3. Fibers diameter of all fibers (A), and diameter of fibers expressing MHC-2a, MHC-2x or MHC-2b (B) in WT (AB) and AR^{skm-/y} (AC) mice. WT: Wild-type mice AR: AR^{skm-/y} mice, in which AR is selectively ablated in myofibers OVL: mechanically overloaded mice +NANDRO: mice treated with nandrolone a: AR +OVL or WT+OVL different from AR or WT ($P < .05$), $n = 5$ for AR basal, $n = 4$ for AR+OVL, $n = 3$ for AR+OVL+NANDRO, $n = 5$ for WT basal, $n = 5$ for WT+OVL, $n = 4$ for WT+OVL+NANDRO. The 2-way ANOVA revealed the main effect of treatment on fiber diameter ($P = .005$) and diameter of fibers expressing MHC-2b ($P = .006$). Bonferroni post hoc analysis showed that fiber diameter and diameter of fibers expressing MHC-2b of OVL differed from Basal ($P < .05$). There was no main effect of genotype and no interaction between the 2 factors ($P > .05$).

but not WT mice (Figure 4 EF). The diameter and diameter distribution of the fibers expressing MHC-2a was not altered by OVL in both mouse genotypes (Figure 3BC and Figure 4GH)($P > .05$). Thus, our results indicate that the lower increase in muscle weight in AR^{skm-y} mice after OVL was related to the atrophy of MHC-2x expressing fibers. However, it was not associated with a reduced number of Pax 7-positive cells (satellite cells)(Figures 5A)

and differential change in fibrosis between mouse genotypes after OVL (Figure 5B).

Attenuated fiber type transition in response to OVL in myofiber- AR deficient mice

After OVL, the percentage of plantaris muscle fibers expressing MHC-2b was reduced by 49% in WT mice and by 37% in AR^{skm-y} mice (Figure 6AB)($P < .05$), with no

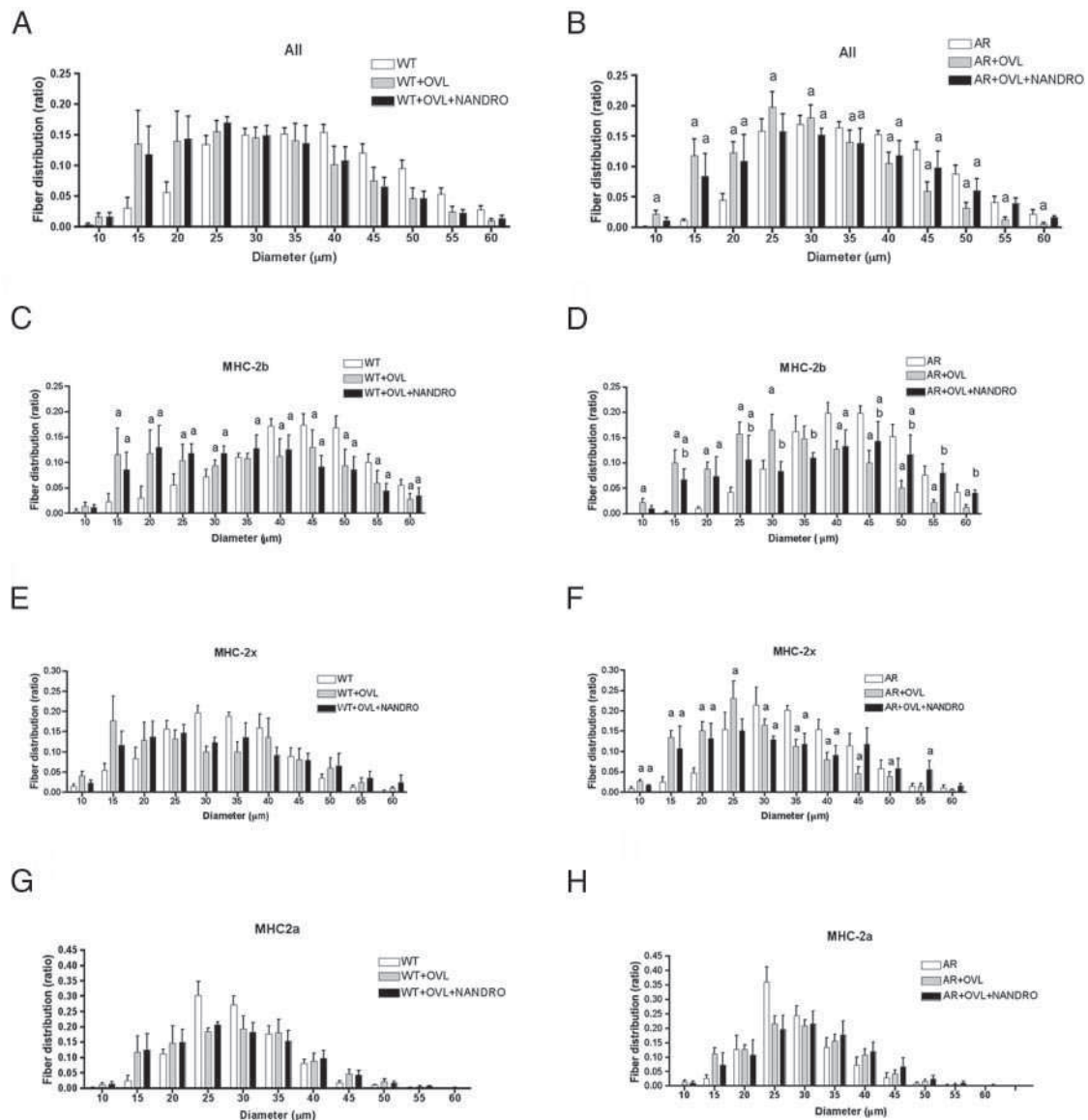


Figure 4. Distribution of the diameter of fibers (AB) and diameter distribution of fibers expressing MHC-2b (C, D), MHC-2x (E, F) and MHC-2a (G, H) in WT (A, C, E, G) and AR^{skm-y} (B, D, F, H) mice. WT: Wild-type mice AR: AR^{skm-y} mice, in which AR is selectively ablated in myofibers OVL: mechanically overloaded mice +NANDRO: mice treated with nandrolone a: AR +OVL or WT+OVL different from AR or WT ($P < .05$), b: AR +OVL+NANDRO different from AR+OVL+NANDRO ($P < .05$) n = 5 for AR basal, n = 4 for AR+OVL, n = 3 for AR+OVL+NANDRO, n = 5 for WT basal, n = 5 for WT+OVL, n = 4 for WT+OVL+NANDRO. The 2-way ANOVA revealed no main effect of treatment on fiber diameter distribution ($P > .05$) whereas there was a main effect of distribution ($P = .0001$). There was an interaction between the 2 factors concerning the diameter distribution of fibers in AR mice ($P = .0001$), of fibers expressing MHC-2b in both mouse genotypes ($P = .02$ and $P = .001$), and of fibers expressing MHC-2x in AR mice ($P = .0001$). Bonferroni post hoc analysis showed that OVL and OVL+NANDRO were different from Basal in both mouse genotypes concerning the diameter distribution of MHC-2b expressing fibers, and in AR mice concerning the diameter distribution of all fibers and the diameter distribution of fibers expressing MHC-2x ($P < .05$). Moreover post hoc analysis showed that AR+OVL+NANDRO differ from AR+OVL concerning the diameter distribution of fibers expressing MHC-2b in AR mice ($P < .05$).

difference in the percentage of decrease between mouse genotypes ($P > .05$). Accordingly, plantaris muscle composition in MHC-2b, assessed by gel electrophoresis, was similarly decreased in response to OVL in both WT (-77%) and AR^{skm-/y} (-70%) mice (Figure 6CD)($P < .05$). Moreover, the percentage of fibers expressing MHC-2a increased in response to OVL in both WT and AR^{skm-/y} mice (Figure 6AB)($P < .05$). However, the percentage of fibers expressing MHC-2a increased less in response to OVL in AR^{skm-/y} mice (+50%) as compared to WT mice (+103%)($P < .05$). In addition, we found an increase of MHC-2x muscle composition in response to OVL in both mouse genotypes (Figure 6CD, $P < .05$), even though the percentage of increase was greater in AR^{skm-/y} mice (+223%) as compared to WT mice (+73%)($P < .05$). Moreover, it was noteworthy that there was a main effect of genotype: the muscle composition in MHC-2b and MHC-2a was increased and reduced, respectively, in AR-

skm-/y mice as compared to WT mice (Figure 6CD)($P < .05$).

Together, our results indicate that two aspects of the plantaris muscle remodeling induced by OVL differed between AR^{skm-/y} mice and WT mice, suggesting that they were related to myofiber AR. Increased muscle weight in response to OVL was reduced in AR^{skm-/y} mice as compared to WT mice. Moreover, the fast/glycolytic to slow/oxidative muscle type transition in response to OVL was lower in AR^{skm-/y} mice as compared to WT mice. It should be noted that using quantitative RT-PCR we found no effect of 1 week and 1 month OVL on AR gene expression in WT mice (Figure 7).

Nandrolone administration during OVL has minor effects on myofibers

Next, we determined whether NANDRO affects performance gain and muscle remodeling induced by OVL and whether myofiber AR plays a role in the potential effects of NANDRO. We found no effect of NANDRO during OVL on absolute (Figure 1A) and specific (Figure 1B) maximal forces, fatigue resistance (Figure 1C), muscle weight (Figure 2A), total fiber number per cross-section (Figure 2BC), number of cells expressing Pax 7 (Figure 5A) and fast-to-slow fiber type transition (Figure 6A-D) in both mouse genotypes. The only 2 differences between NANDRO and untreated mice were the diameter of the fibers expressing MHC-2b and fibrosis. Indeed, the fiber diameter expressing MHC-2b (Figure 3BC) was not reduced in WT and AR^{skm-/y} mice after OVL when treated with NANDRO. Fiber diameter distribution analysis confirmed the effect of NANDRO on MHC-2b expressing fiber size, at least in AR^{skm-/y} mice (Figure 4D). Moreover, fibrosis was not increased in WT and AR^{skm-/y} mice after OVL when treated with NANDRO (Figure 5B). Together, these results indicate that the fiber atrophy and fibrosis induced by OVL is slightly reduced by NANDRO in both mouse genotypes, and thus this effect is not mediated by myofiber AR.

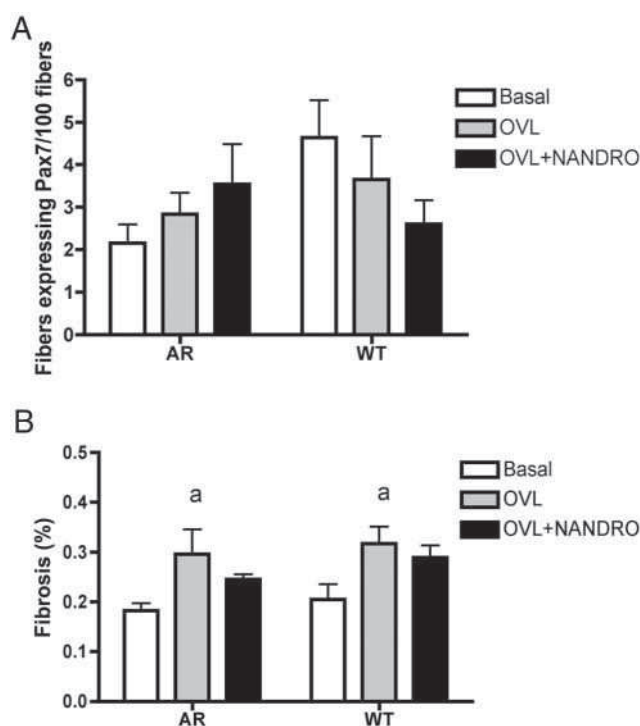


Figure 5. Number of cells expressing Pax 7 (A) and fibrosis (B) in WT and AR^{skm-/y} mice. WT: Wild-type mice AR: AR^{skm-/y} mice, in which AR is selectively ablated in myofibers OVL: mechanically overloaded mice +NANDRO: mice treated with nandrolone a: AR +OVL or WT+OVL different from AR or WT ($P < .05$), $n = 5$ for AR basal, $n = 4$ for AR+OVL, $n = 3$ for AR+OVL+NANDRO, $n = 5$ for WT basal, $n = 5$ for WT+OVL, $n = 4$ for WT+OVL+NANDRO. The 2-way ANOVA revealed no main effect of treatment, no main effect of genotype and no interaction between the 2 factors concerning the number of fibers expressing Pax 7 ($P > .05$). The 2-way ANOVA revealed a main effect of treatment on fibrosis ($P = .006$). Bonferroni post hoc analysis showed that fibrosis from OVL and basal were different in both mouse genotypes ($P < .05$). There was no main effect of genotype and no interaction between the 2 factors ($P > .05$).

Discussion

Reduced muscle growth in myofiber AR deficient mice in response to OVL

Generally, previous studies indicated that the muscle growth in response to OVL is due to hypertrophy of the fibers but not hyperplasia, ie, increased number of fibers per cross-section (33). Fewer studies reported that it is both the increases of the fiber diameter and number that are responsible for the muscle hypertrophy (17, 18, 34). In agreement with our previous study (16), we show here that

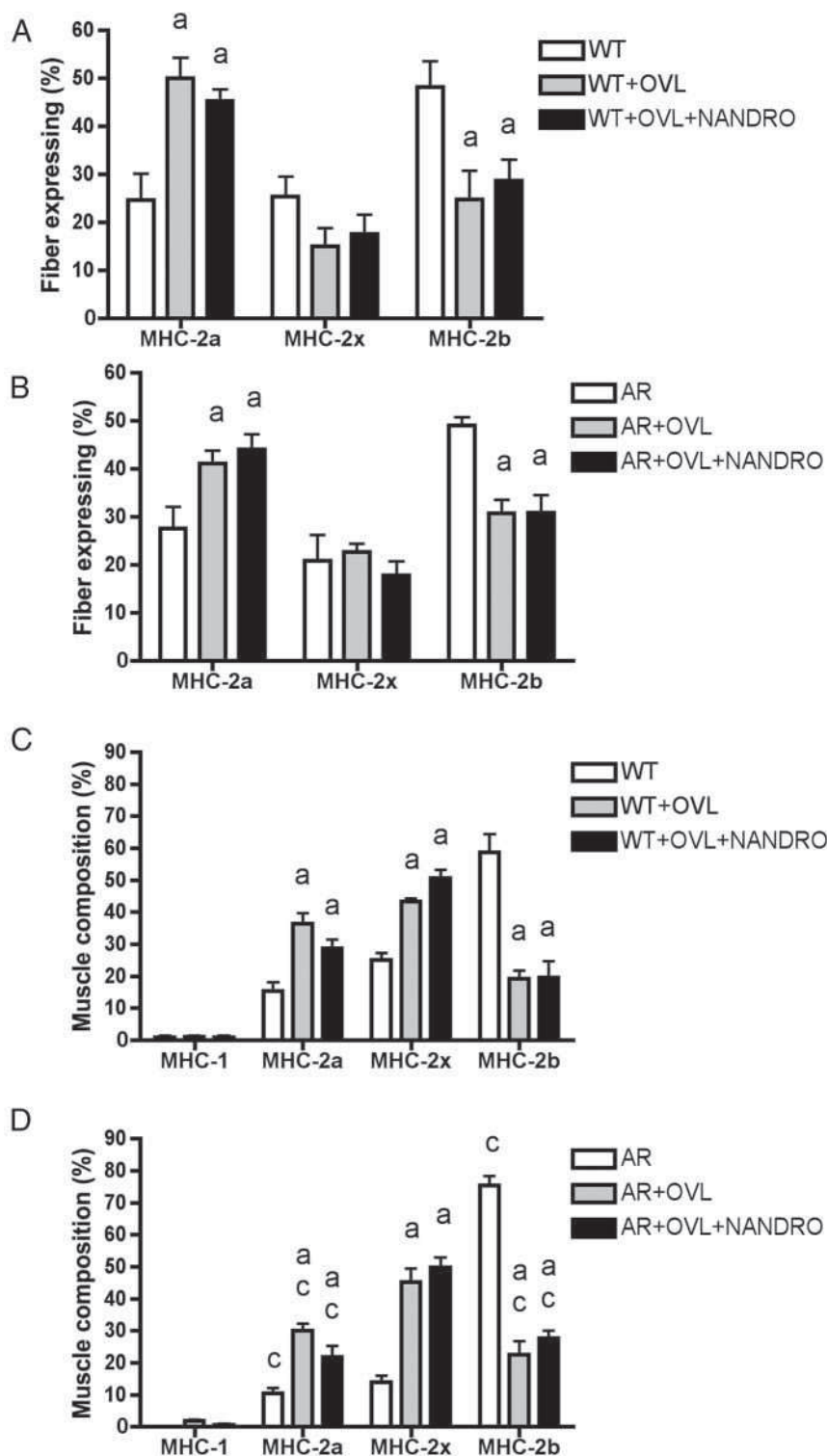


Figure 6. Percentage of MHC-2a-, MHC-2x- and MHC-2b- expressing fibers (A, B) and muscle composition in MHC-1, MHC-2a, MHC-2x, and MHC-2b (C, D) in WT (A, C) and AR^{skm-ly} mice (B, D). WT: Wild-type mice AR: AR^{skm-ly} mice, in which AR is selectively ablated in myofibers OVL: mechanically overloaded mice +NANDRO: mice treated with nandrolone a: AR +OVL or WT+OVL different from AR or WT ($P < .05$), c: AR different from WT ($P < .05$), n = 5 for AR basal, n = 4 for AR+OVL, n = 3 for AR+OVL+NANDRO, n = 5 for WT basal, n = 5 for WT+OVL, n = 4 for WT+OVL+NANDRO. The 2-way ANOVA revealed the main effect of treatment on the percentage of fibers expressing MHC-2a ($P = .0001$) and MHC-2b ($P = .0001$), and the muscle composition in MHC-2a ($P = .0001$), MHC-2x ($P = .0001$) and MHC-2b ($P = .001$). Bonferroni post hoc analysis showed that the percentage of fibers expressing MHC-2a and

the increased muscle weight is attributable to hyperplasia but not fiber hypertrophy. Whatever the unknown reasons for the discrepancy, we found that the increase in muscle weight in response to OVL is reduced in male AR^{skm-ly} mice as compared to WT mice, demonstrating that the myofiber AR is required for a maximal muscle growth in response to OVL, even though myofiber AR deletion has no effect on hindlimb muscle size under basal conditions (3). The difference between basal and OVL conditions might result from sustained growth in the OVL condition (20). We also found that it is not associated with increased myofiber AR transcript levels in OVL as compared to basal condition in WT mice, in agreement with a previous report showing that AR protein level is not increased by 1 month OVL in plantaris from 5 month-old rats (35).

The reduced muscle weight gain in AR^{skm-ly} mice in response to OVL is not related to a lesser increase in fiber number (in particular those expressing MHC-2a), a greater reduction in the diameter of fibers expressing MHC-2b, a lower increase in fibrosis, or a greater decrease in the percentage of the largest diameter fibers expressing MHC-2b in AR^{skm-ly} mice. It may be the result from the atrophy of the fibers expressing MHC-2x in AR^{skm-ly} mice in response to OVL. This might originate from lower activation of the Akt-mTOR pathway, since this pathway plays an important role in controlling protein synthesis in response to OVL (34, 36, 37). Recently, androgens have been shown to activate mTOR pathway (38), even though a previous study did not (8). Moreover, androgens stimulate amino acid uptake that activate protein synthesis and the Akt-mTOR pathway (39). A lower OVL-induced reduction in myostatin or a lower increase in follistatin (16) in AR^{skm-ly} mice might

also contribute to a reduced increase in muscle weight. Follistatin, a myostatin antagonist, is suggested to mediate androgen action (40). Alternative possibility is that the satellite cells from AR^{skm-/y} mice during OVL have a reduced capacity to proliferate and merge into supernumerary fibers of normal protein content. As in our murine model, AR deletion occurs in fibers but not satellite cells, the production of IGF1, IL4 and/or IL6 by the fibers might be impaired in AR deficient myofibers (3, 33, 41). Our findings exclude the possibility of fewer satellite cells expressing Pax 7 in AR^{skm-/y} mice as a cause of the reduced muscle weight after OVL. Finally, since muscle growth in response to OVL is not only associated with protein synthesis, but also with protein degradation (42), a change in proteasome activity in the absence of AR can be a potential explanation for the reduced increase in muscle weight in AR^{skm-/y} mice.

Attenuated fiber type transition in myofiber- AR deficient mice in response to OVL

Fast/glycolytic to slow/oxidative fiber type transition in response to OVL was reduced in mice, indicating that myofiber AR is required for a full OVL-induced fiber type switching. It results from a lower promotion of fibers expressing MHC-2a in response to OVL in AR^{skm-/y} mice. Since calcineurin, PGC-1 α , and PPAR signaling pathways promote the formation of slow/oxidative/fatigue resistant fibers (43–45), these pathways might be less activated in response to OVL in AR^{skm-/y}. It has been demonstrated that calcineurin deletion prevents the fiber type transition in response to OVL (17), in contrast to PGC-1 α inactivation (46). The role of myofiber AR in fiber type determination is supported by the fact that there was a main genotype effect: AR^{skm-/y} mice exhibited an increased and lower muscle composition in MHC-2b and MHC-2a as compared to WT.

NANDRO does not further increase remodeling and performance gain induced by OVL

There is general consensus that androgen administration can induce muscle hypertrophy at the basal state or with androgen deficiency in human (6, 7). It is also suggested that resistance training acts synergically to exogenous androgens to induce hypertrophy (9). However, previous studies reported that androgen administration does not further increase muscle hypertrophy induced by OVL

alone in male animal (21, 22, 24). In line with these previous studies, we did not find an increase in muscle weight in both NANDRO treated mouse genotypes even though fibers expressing MHC-2b had not a reduced diameter in AR^{skm-/y} mice. The very large muscle hypertrophy in response to OVL in WT mice suggests that anabolic processes are already maximally activated by OVL alone. These results do not exclude the possibility that androgen administration - potentially mediated by AR at the level of satellite cells (6, 7) - might amplify milder muscle growth in male. Moreover, a recent study reported that exogenous androgen increases overload-induced muscle hypertrophy in female mice (47).

The present study also indicates that NANDRO during OVL does not alter the fiber type transition induced by OVL in both AR^{skm-/y} and WT mice. It should be also noted that NANDRO during OVL affect neither absolute maximal force nor fatigue resistance, indicating that NANDRO during OVL have no ergogenic effect. It is not excluded that androgen administration could have a notable impact in the case of resistance training inducing alone a milder performance gain.

Conclusion

In the present study, we show that myofiber AR deletion decreases by half OVL-induced muscle weight gain. It is likely the result from the atrophy of the fiber expressing MHC-2x in response to OVL. Moreover, the fast/glycolytic to slow/oxidative fiber type transition in response to OVL is attenuated in the absence of myofiber AR. Whatever the underlying mechanisms of altered muscle remodeling, the large performance gains in absolute maximal force and fatigue resistance induced by OVL are not decreased by myofiber AR deletion. Finally, we found that nandrolone administration does not increase performance gains and markedly alter muscle remodeling induced by OVL, although it can prevent at least partly the fiber atrophy and increased fibrosis following OVL. Together, our results demonstrate that myofiber AR is required for a maximal OVL-induced muscle remodeling and that exogenous androgens have no ergogenic action when muscle remodeling is large.

Acknowledgments

We are grateful to Pr. S. Kato for floxed AR mice. We would like to thank Aziza Chibah for technical assistance and

Legend to Figure 6 Continued. . .

MHC-2b, and the muscle composition in MHC-2a, MHC-2x and MHC-2b of OVL and OVL+NANDRO were different from WT or AR ($P < .05$). There was a main effect of genotype on the muscle composition in MHC-2a ($P = .03$) and MHC-2b ($P = .04$), showing that AR mice had a reduced and increased muscle composition in MHC-2a and MHC-2b, respectively. There was no interaction between the 2 factors ($P > .05$).

Philippe Noirez for developing imageJ software macros.

Financial support has been provided by Université Pierre et Marie Curie (UPMC), CNRS, INSERM, University Paris Descartes, Université de Strasbourg, the Association Française contre les Myopathies (AFM), ANR-Blanc Androgluco, and Agence Française de Lutte contre le Dopage.

Address all correspondence and requests for reprints to: A. Ferry, G.H. Pitié-Salpêtrière, Bâtiment Babinski, INSERM U974, 47, bld de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France

This work was supported by .

AF, MS, AP, TM, NV, PJ, GB, OA, DM. have nothing to declare.

References

- Ophoff J, Van Proeyen K, Callewaert F, De Gendt K, De Bock K, Vanden Bosch A, Verhoeven G, Hespel P, Vanderschueren D. Androgen signaling in myocytes contributes to the maintenance of muscle mass and fiber type regulation but not to muscle strength or fatigue. *Endocrinology*. 2009;150:3558–3566.
- Ferry A, Vignaud A, Noirez P, Bertucci W. Respective effects of anabolic/androgenic steroids and physical exercise on isometric contractile properties of regenerating skeletal muscles in the rat. *Arch Physiol Biochem*. 2000;108:257–261.
- Chambon C, Duteil D, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Malivindi R, Kato S, Chambon P, Metzger D. Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:14327–14332.
- MacLean HE, Chiu WS, Notini AJ, Axell AM, Davey RA, McManus JF, Ma C, Plant DR, Lynch GS, Zajac JD. Impaired skeletal muscle development and function in male, but not female, genomic androgen receptor knockout mice. *Faseb J*. 2008;22:2676–2689.
- Axell AM, MacLean HE, Plant DR, Harcourt LJ, Davis JA, Jimenez M, Handelsman DJ, Lynch GS, Zajac JD. Continuous testosterone administration prevents skeletal muscle atrophy and enhances resistance to fatigue in orchidectomized male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291:E506–516.
- Dubois V, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D, Claessens F. Androgens and skeletal muscle: cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic actions. *Cell Mol Life Sci*. 2013;69:1651–1667.
- Kadi F. Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. *Br J Pharmacol*. 2008;154:522–528.
- Hourde C, Jagerschmidt C, Clement-Lacroix P, Vignaud A, Ammann P, Butler-Browne GS, Ferry A. Androgen replacement therapy improves function in male rat muscles independently of hypertrophy and activation of the Akt/mTOR pathway. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;195:471–482.
- Bhasin S, Woodhouse L, Storer TW. Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol*. 2001;170:27–38.
- Gao W, Reiser PJ, Coss CC, Phelps MA, Kearbey JD, Miller DD, Dalton JT. Selective androgen receptor modulator treatment improves muscle strength and body composition and prevents bone loss in orchidectomized rats. *Endocrinology*. 2005;146:4887–4897.
- Altuwaijri S, Lee DK, Chuang KH, Ting HJ, Yang Z, Xu Q, Tsai MY, Yeh S, Hanchett LA, Chang HC, Chang C. Androgen receptor regulates expression of skeletal muscle-specific proteins and muscle cell types. *Endocrine*. 2004;25:27–32.
- Egginton S. Effects of an anabolic hormone on aerobic capacity of rat striated muscle. *Pflugers Arch*. 1987;410:356–361.
- Lewis MI, Fournier M, Yeh AY, Micevych PE, Sieck GC. Alterations in diaphragm contractility after nandrolone administration: an analysis of potential mechanisms. *J Appl Physiol (1985)*. 1999;86:985–992.
- Van Zyl CG, Noakes TD, Lambert MI. Anabolic-androgenic steroid increases running endurance in rats. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27:1385–1389.
- Frayssé B, Vignaud A, Fane B, Schuh M, Butler-Browne G, Metzger D, Ferry A. Acute effect of androgens on maximal force-generating capacity and electrically evoked calcium transient in mouse skeletal muscles. *Steroids*. 2014;87C:6–11.
- Joanne P, Hourde C, Ochala J, Caudevan Y, Medja F, Vignaud A, Mouisel E, Hadj-Said W, Arandel L, Garcia L, Goyenvalle A, Mounier R, Zibroba D, Sakamoto K, Butler-Browne G, Agbulut O, Ferry A. Impaired adaptive response to mechanical overloading in dystrophic skeletal muscle. *PLoS One*. 2012;7:e35346.
- Parsons SA, Millay DP, Wilkins BJ, Bueno OF, Tsika GL, Neilson JR, Liberatore CM, Yutzey KE, Crabtree GR, Tsika RW, Molkentin JD. Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy. *J Biol Chem*. 2004;279:26192–26200.
- Ianuzzo CD, Gollnick PD, Armstrong RB. Compensatory adaptations of skeletal muscle fiber types to a long-term functional overload. *Life Sci*. 1976;19:1517–1523.
- Roy RR, Edgerton VR. Response of mouse plantaris muscle to functional overload: comparison with rat and cat. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1995;111:569–575.
- Lee WJ, Thompson RW, McClung JM, Carson JA. Regulation of androgen receptor expression at the onset of functional overload in rat plantaris muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285:R1076–1085.
- McClung JM, Mehl KA, Thompson RW, Lowe LL, Carson JA. Nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded rat soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:R1543–1552.
- Tamaki T, Uchiyama Y, Okada Y, Tono K, Nitta M, Hoshi A, Akatsuka A. Anabolic-androgenic steroid does not enhance compensatory muscle hypertrophy but significantly diminish muscle damages in the rat surgical ablation model. *Histochem Cell Biol*. 2009;132:71–81.
- Thompson RW, McClung JM, Baltgalvis KA, Davis JM, Carson JA. Modulation of overload-induced inflammation by aging and anabolic steroid administration. *Exp Gerontol*. 2006;41:1136–1148.
- McClung JM, Lee WJ, Thompson RW, Lowe LL, Carson JA. RhoA induction by functional overload and nandrolone decanoate administration in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 2003;447:345–355.

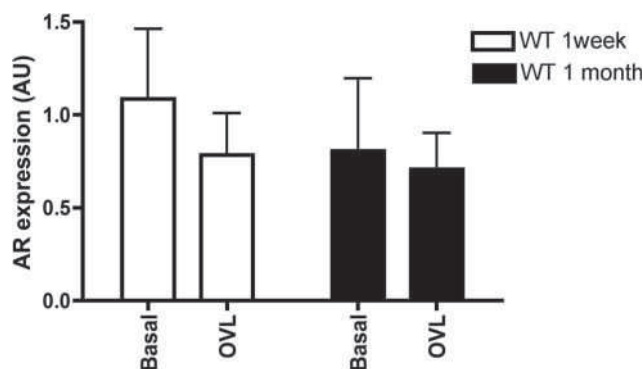


Figure 7. AR transcript levels in response to OVL in WT mice. WT: Wild-type mice. OVL: mechanically overloaded mice. $n = 3$ for WT basal 1 week, $n = 4$ for WT+OVL 1 week, $n = 4$ for WT 1 month, $n = 5$ for WT+OVL 1 month. The 2-way ANOVA revealed no main effect of OVL, main effect of OVL duration and interaction between the 2 factors ($P > .05$).

25. Aggarwal T, Polanco MJ, Scaramuzzino C, Rocchi A, Milioto C, Emionite L, Ognio E, Sambataro F, Galbiati M, Poletti A, Pennuto M. Androgens affect muscle, motor neuron, and survival in a mouse model of SOD1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2014;35:1929–1938.
26. Vignaud A, Hourde C, Butler-Browne G, Ferry A. Differential recovery of neuromuscular function after nerve/muscle injury induced by crude venom from *Notechis scutatus*, cardiotoxin from *Naja atra* and bupivacaine treatments in mice. *Neurosci Res*. 2007;58:317–323.
27. Hourde C, Joanne P, Medja F, Mougenot N, Jacquet A, Mouisel E, Pannerec A, Hatem S, Butler-Browne G, Agbulut O, Ferry A. Voluntary Physical Activity Protects from Susceptibility to Skeletal Muscle Contraction-Induced Injury But Worsens Heart Function in mdx Mice. *Am J Pathol*. 2013;182:1509–1518.
28. Butler-Browne GS, Whalen RG. Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev Biol*. 1984;102:324–334.
29. Schirwis E, Agbulut O, Vadrot N, Mouisel E, Hourde C, Bonniieu A, Butler-Browne G, Amthor H, Ferry A. The beneficial effect of myostatin deficiency on maximal muscle force and power is attenuated with age. *Exp Gerontol*. 2013;48:183–190.
30. Noirez P, Ferry A. Effect of anabolic/androgenic steroids on myosin heavy chain expression in hindlimb muscles of male rats. *Eur J Appl Physiol*. 2000;81:155–158.
31. Agbulut O, Li Z, Mouly V, Butler-Browne GS. Analysis of skeletal and cardiac muscle from desmin knock-out and normal mice by high resolution separation of myosin heavy-chain isoforms. *Biol Cell*. 1996;88:131–135.
32. Agbulut O, Noirez P, Beaumont F, Butler-Browne G. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biol Cell*. 2003;95:399–406.
33. Guerci A, Lahoute C, Hebrard S, Collard L, Graindorge D, Favier M, Cagnard N, Battonnet-Pichon S, Precigout G, Garcia L, Tuil D, Daegelen D, Sotiropoulos A. Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab*. 2012;15:25–37.
34. Goodman CA, Frey JW, Mabrey DM, Jacobs BL, Lincoln HC, You JS, Hornberger TA. The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. *J Physiol*. 2011;589:5485–5501.
35. Lee WJ, McClung J, Hand GA, Carson JA. Overload-induced androgen receptor expression in the aged rat hindlimb receiving nandrolone decanoate. *J Appl Physiol (1985)*. 2003;94:1153–1161.
36. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*. 2001;3:1014–1019.
37. Bentzinger CF, Lin S, Romanino K, Castets P, Guridi M, Summermatter S, Handschin C, Tintignac LA, Hall MN, Ruegg MA. Differential response of skeletal muscles to mTORC1 signaling during atrophy and hypertrophy. *Skelet Muscle*. 2013;3:6.
38. White JP, Gao S, Puppa MJ, Sato S, Welle SL, Carson JA. Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;365:174–186.
39. Hamdi MM, Mutungi G. Dihydrotestosterone stimulates amino acid uptake and the expression of LAT2 in mouse skeletal muscle fibres through an ERK1/2-dependent mechanism. *J Physiol*. 2013;589:3623–3640.
40. Braga M, Bhasin S, Jasuja R, Pervin S, Singh R. Testosterone inhibits transforming growth factor-beta signaling during myogenic differentiation and proliferation of mouse satellite cells: potential role of follistatin in mediating testosterone action. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;350:39–52.
41. Serra C, Bhasin S, Tangherlini F, Barton ER, Ganno M, Zhang A, Shansky J, Vandenberg HH, Travison TG, Jasuja R, Morris C. The role of GH and IGF-I in mediating anabolic effects of testosterone on androgen-responsive muscle. *Endocrinology*. 2011;152:193–206.
42. Baehr LM, Tunzi M, Bodine SC. Muscle hypertrophy is associated with increases in proteasome activity that is independent of MuRF1 and MAFbx expression. *Front Physiol*. 2014;5:69.
43. Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2010;86:564–600.
44. Schiaffino S, Sandri M, Murgia M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:269–278.
45. Schuler M, Ali F, Chambon C, Duteil D, Bornert JM, Tardivel A, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Metzger D. PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2006;4:407–414.
46. Perez-Schindler J, Summermatter S, Santos G, Zorzato F, Handschin C. The transcriptional coactivator PGC-1alpha is dispensable for chronic overload-induced skeletal muscle hypertrophy and metabolic remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;
47. Egner IM, Bruusgaard JC, Eftestol E, Gundersen K. A cellular memory mechanism aids overload hypertrophy in muscle long after an episodic exposure to anabolic steroids. *J Physiol*. 2013;591:6221–6230.

RÉFÉRENCES

- Adams, G.R., and McCue, S.A. (1998). Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* (1985) **84**, 1716-1722.
- Al-Qusairi, L., and Laporte, J. (2011). T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skelet Muscle* **1**, 26.
- Alhonen, L., Halmekyto, M., Kosma, V.M., Wahlfors, J., Kauppinen, R., and Janne, J. (1995). Life-long over-expression of ornithine decarboxylase (ODC) gene in transgenic mice does not lead to generally enhanced tumorigenesis or neuronal degeneration. *Int J Cancer* **63**, 402-404.
- Allen, R.E., and Boxhorn, L.K. (1987). Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* **133**, 567-572.
- Aloi, J.A., Bergendahl, M., Iranmanesh, A., and Veldhuis, J.D. (1997). Pulsatile intravenous gonadotropin-releasing hormone administration averts fasting-induced hypogonadotropism and hypoandrogenemia in healthy, normal weight men. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1543-1548.
- Amthor, H., Macharia, R., Navarrete, R., Schuelke, M., Brown, S.C., Otto, A., Voit, T., Muntoni, F., Vrbova, G., Partridge, T., *et al.* (2007). Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1835-1840.
- Anastasi, S., Giordano, S., Sthandier, O., Gambarotta, G., Maione, R., Comoglio, P., and Amati, P. (1997). A natural hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect of the constitutive Met kinase activation on myogenic differentiation. *J Cell Biol* **137**, 1057-1068.
- Antonio, J., Wilson, J.D., and George, F.W. (1999). Effects of castration and androgen treatment on androgen-receptor levels in rat skeletal muscles. *J Appl Physiol* (1985) **87**, 2016-2019.
- Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* **81**, 1269-1304.
- Arico, S., Petiot, A., Bauvy, C., Dubbelhuis, P.F., Meijer, A.J., Codogno, P., and Ogier-Denis, E. (2001). The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* **276**, 35243-35246.
- Ariel, G. (1973). The effect of anabolic steroid upon skeletal muscle contractile force. *J Sports Med Phys Fitness* **13**, 187-190.
- Ariel, G. (1974). Residual effect of an anabolic steroid upon isotonic muscular force. *J Sports Med Phys Fitness* **14**, 103-111.
- Asakura, A., Komaki, M., and Rudnicki, M. (2001). Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* **68**, 245-253.
- Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A., and Rudnicki, M.A. (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* **159**, 123-134.
- Atlashkin, V., Kreykenbohm, V., Eskelinen, E.L., Wenzel, D., Fayyazi, A., and Fischer von Mollard, G. (2003). Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol Cell Biol* **23**, 5198-5207.
- Attie, A.D., and Kendzierski, C.M. (2003). PGC-1alpha at the crossroads of type 2 diabetes. *Nat Genet* **34**, 244-245.
- Aubel, C., Chabanon, H., Carraro, V., Wallace, H.M., and Brachet, P. (2003). Expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in HeLa cells is regulated by amino acid sufficiency. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1388-1398.
- Austin, S., Ziese, M., and Sternberg, N. (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* **25**, 729-736.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**, 685-701.
- Axell, A.M., MacLean, H.E., Plant, D.R., Harcourt, L.J., Davis, J.A., Jimenez, M., Handelsman, D.J., Lynch, G.S., and Zajac, J.D. (2006). Continuous testosterone administration prevents skeletal muscle atrophy and enhances resistance to fatigue in orchidectomized male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E506-516.

- Babal, P., Ruchko, M., Campbell, C.C., Gilmour, S.P., Mitchell, J.L., Olson, J.W., and Gillespie, M.N. (2001). Regulation of ornithine decarboxylase activity and polyamine transport by agmatine in rat pulmonary artery endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 372-377.
- Baek, S.H., and Rosenfeld, M.G. (2004). Nuclear receptor coregulators: their modification codes and regulatory mechanism by translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 707-714.
- Balice-Gordon, R.J., Breedlove, S.M., Bernstein, S., and Lichtman, J.W. (1990). Neuromuscular junctions shrink and expand as muscle fiber size is manipulated: in vivo observations in the androgen-sensitive bulbocavernosus muscle of mice. *J Neurosci* 10, 2660-2671.
- Bark, T.H., McNurlan, M.A., Lang, C.H., and Garlick, P.J. (1998). Increased protein synthesis after acute IGF-I or insulin infusion is localized to muscle in mice. *Am J Physiol* 275, E118-123.
- Baroffio, A., Bochaton-Piallat, M.L., Gabbiani, G., and Bader, C.R. (1995). Heterogeneity in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation* 59, 259-268.
- Baroffio, A., Hamann, M., Bernheim, L., Bochaton-Piallat, M.L., Gabbiani, G., and Bader, C.R. (1996). Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation* 60, 47-57.
- Bartsch, W., Krieg, M., and Voigt, K.D. (1980). Quantification of endogenous testosterone, 5 alpha-dihydrotestosterone and 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol in subcellular fractions of the prostate, bulbocavernosus/levator ani muscle, skeletal muscle and heart muscle of the rat. *J Steroid Biochem* 13, 259-264.
- Basaria, S. (2013). Testosterone therapy in older men with late-onset hypogonadism: a counter-rationale. *Endocr Pract* 19, 853-863.
- Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2006). Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75, 19-37.
- Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16.
- Basualto-Alarcon, C., Jorquera, G., Altamirano, F., Jaimovich, E., and Estrada, M. (2013). Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy. *Med Sci Sports Exerc* 45, 1712-1720.
- Beauchamp, J.R., Heslop, L., Yu, D.S., Tajbakhsh, S., Kelly, R.G., Wernig, A., Buckingham, M.E., Partridge, T.A., and Zammit, P.S. (2000). Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 151, 1221-1234.
- Becchis, M., Sullivan, P.M., Ordronneau, P., Petrusz, P., and Joseph, D.R. (1996). Distribution of immunoreactive androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in tissues of the fetal rat. *Steroids* 61, 392-400.
- Beiner, J.M., Jokl, P., Cholewicki, J., and Panjabi, M.M. (1999). The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *Am J Sports Med* 27, 2-9.
- Ben Jemaa, A., Sallami, S., Ceraline, J., and Oueslati, R. (2013). A novel regulation of PSMA and PSA expression by Q640X AR in 22Rv1 and LNCaP prostate cancer cells. *Cell Biol Int* 37, 464-470.
- Benten, W.P., Lieberherr, M., Giese, G., Wrehlke, C., Stamm, O., Sekeris, C.E., Mossmann, H., and Wunderlich, F. (1999). Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J* 13, 123-133.
- Bentzinger, C.F., Lin, S., Romanino, K., Castets, P., Guridi, M., Summermatter, S., Handschin, C., Tintignac, L.A., Hall, M.N., and Ruegg, M.A. (2013). Differential response of skeletal muscles to mTORC1 signaling during atrophy and hypertrophy. *Skelet Muscle* 3, 6.
- Bergendahl, M., Aloj, J.A., Iranmanesh, A., Mulligan, T.M., and Veldhuis, J.D. (1998). Fasting suppresses pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion and enhances orderliness of LH release in young but not older men. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1967-1975.
- Berrabah, W., Aumercier, P., Lefebvre, P., and Staels, B. (2011). Control of nuclear receptor activities in metabolism by post-translational modifications. *FEBS Lett* 585, 1640-1650.
- Berridge, M.J. (2012). Cell Stress, Inflammatory Responses and Cell Death. *Cell Signalling Biology*.

- Berthier, C., and Blaineau, S. (1997). Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. A review. *Biol Cell* 89, 413-434.
- Bettuzzi, S., Davalli, P., Astancolle, S., Pinna, C., Roncaglia, R., Boraldi, F., Tiozzo, R., Sharrard, M., and Corti, A. (1999). Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett* 446, 18-22.
- Bhasin, S., Storer, T.W., Asbel-Sethi, N., Kilbourne, A., Hays, R., Sinha-Hikim, I., Shen, R., Arver, S., and Beall, G. (1998). Effects of testosterone replacement with a nongenital, transdermal system, Androderm, in human immunodeficiency virus-infected men with low testosterone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 3155-3162.
- Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Callegari, C., Clevenger, B., Phillips, J., Bunnell, T.J., Tricker, R., Shirazi, A., and Casaburi, R. (1996). The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med* 335, 1-7.
- Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Yarasheski, K.E., Clevenger, B., Phillips, J., Lee, W.P., Bunnell, T.J., and Casaburi, R. (1997). Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 407-413.
- Bhasin, S., Storer, T.W., Javanbakht, M., Berman, N., Yarasheski, K.E., Phillips, J., Dike, M., Sinha-Hikim, I., Shen, R., Hays, R.D., *et al.* (2000). Testosterone replacement and resistance exercise in HIV-infected men with weight loss and low testosterone levels. *JAMA* 283, 763-770.
- Bhasin, S., Woodhouse, L., and Storer, T.W. (2001). Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol* 170, 27-38.
- Blanco, C.E., Peltz, A., Staley, R., and Kim, F. (2002). Effects of pharmacologic androgen treatment duration on glucocorticoid receptor alpha immunoreactivity of lumbosacral motor neurons in the male rat. *Neuroscience* 115, 941-949.
- Blaveri, K., Heslop, L., Yu, D.S., Rosenblatt, J.D., Gross, J.G., Partridge, T.A., and Morgan, J.E. (1999). Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: studies on isolated fibers. *Dev Dyn* 216, 244-256.
- Bleisch, W.V., and Harrelson, A. (1989). Androgens modulate endplate size and ACh receptor density at synapses in rat levator ani muscle. *J Neurobiol* 20, 189-202.
- Bleisch, W.V., Harrelson, A.L., and Luine, V.N. (1982). Testosterone increases acetylcholine receptor number in the "levator ani" muscle of the rat. *J Neurobiol* 13, 153-161.
- Blok, L.J., de Ruiter, P.E., and Brinkmann, A.O. (1998). Forskolin-induced dephosphorylation of the androgen receptor impairs ligand binding. *Biochemistry* 37, 3850-3857.
- Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, J.V., and Rossetti, L. (1994). Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 93, 2438-2446.
- Boden, G., and Shulman, G.I. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 3, 14-23.
- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., *et al.* (2001a). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704-1708.
- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., *et al.* (2001b). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3, 1014-1019.
- Bohm, L., Serafin, A.M., Fernandez, P., Van der Watt, G., Bouic, P.J., and Harvey, J. (2012). Plasma sarcosine does not distinguish early and advanced stages of prostate cancer. *S Afr Med J* 102, 677-679.
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F.M., Wegiel, J., Yu, W.H., and Nixon, R.A. (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28, 6926-6937.
- Borst, S.E., Conover, C.F., Carter, C.S., Gregory, C.M., Marzetti, E., Leeuwenburgh, C., Vandenborne, K., and Wronski, T.J. (2007). Anabolic effects of testosterone are preserved during inhibition of 5alpha-reductase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E507-514.

- Bosnakovski, D., Xu, Z., Li, W., Thet, S., Cleaver, O., Perlingeiro, R.C., and Kyba, M. (2008). Prospective isolation of skeletal muscle stem cells with a Pax7 reporter. *Stem Cells* 26, 3194-3204.
- Bouhrel, A., Joumaa, W.H., and Leoty, C. (2003). Nandrolone decanoate treatment affects sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase function in skinned rat slow- and fast-twitch fibres. *Pflugers Arch* 446, 728-734.
- Bourke, D.L., and Ontell, M. (1984). Branched myofibers in long-term whole muscle transplants: a quantitative study. *Anat Rec* 209, 281-288.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Casares, N., Perfettini, J.L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., *et al.* (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 25, 1025-1040.
- Brawer, M.K. (2004). Testosterone replacement in men with andropause: an overview. *Rev Urol* 6 Suppl 6, S9-S15.
- Breedlove, S.M., and Arnold, A.P. (1983a). Hormonal control of a developing neuromuscular system. I. Complete Demasculinization of the male rat spinal nucleus of the bulbocavernosus using the anti-androgen flutamide. *J Neurosci* 3, 417-423.
- Breedlove, S.M., and Arnold, A.P. (1983b). Hormonal control of a developing neuromuscular system. II. Sensitive periods for the androgen-induced masculinization of the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J Neurosci* 3, 424-432.
- Brinkmann, A.O. (2001). Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 179, 105-109.
- Brooke, M.H., and Kaiser, K.K. (1970). Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23, 369-379.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 202, 59-68.
- Burge, J.A., Hanna, M.G., and Schorge, S. (2013). Nongenomic actions of progesterone and 17beta-estradiol on the chloride conductance of skeletal muscle. *Muscle Nerve* 48, 589-591.
- Caldwell, J.D., Song, Y., Englof, I., Hofle, S., Key, M., and Morris, M. (2003). 5alpha-Reduced androgens block estradiol-BSA-stimulated release of oxytocin. *Brain Res* 976, 259-261.
- Callies, F., Fassnacht, M., van Vlijmen, J.C., Koehler, I., Huebler, D., Seibel, M.J., Arlt, W., and Allolio, B. (2001). Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency: effects on body composition, serum leptin, bone turnover, and exercise capacity. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1968-1972.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Canto, C., and Auwerx, J. (2009). PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 20, 98-105.
- Carlson, B.M., and Faulkner, J.A. (1983). The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Med Sci Sports Exerc* 15, 187-198.
- Casar, J.C., McKechnie, B.A., Fallon, J.R., Young, M.F., and Brandan, E. (2004). Transient up-regulation of biglycan during skeletal muscle regeneration: delayed fiber growth along with decorin increase in biglycan-deficient mice. *Dev Biol* 268, 358-371.
- Casella, R., Maduro, M.R., Lipshultz, L.I., and Lamb, D.J. (2001). Significance of the polyglutamine tract polymorphism in the androgen receptor. *Urology* 58, 651-656.
- Casner, S.W., Jr., Early, R.G., and Carlson, B.R. (1971). Anabolic steroid effects on body composition in normal young men. *J Sports Med Phys Fitness* 11, 98-103.
- Centenera, M.M., Harris, J.M., Tilley, W.D., and Butler, L.M. (2008). The contribution of different androgen receptor domains to receptor dimerization and signaling. *Mol Endocrinol* 22, 2373-2382.
- Cerrada-Gimenez, M., Hayrinen, J., Juutinen, S., Reponen, T., Janne, J., and Alhonen, L. (2010). Proteomic analysis of livers from a transgenic mouse line with activated polyamine catabolism. *Amino Acids* 38, 613-622.

- Chakravarthy, M.V., Davis, B.S., and Booth, F.W. (2000). IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 89, 1365-1379.
- Chambon, C., Duteil, D., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., Malivindi, R., Kato, S., Chambon, P., and Metzger, D. (2010). Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14327-14332.
- Chan, E.Y., Kir, S., and Tooze, S.A. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* 282, 25464-25474.
- Chang, N.C., Nguyen, M., Germain, M., and Shore, G.C. (2010). Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *EMBO J* 29, 606-618.
- Chang, Y.Y., and Neufeld, T.P. (2009). An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Mol Biol Cell* 20, 2004-2014.
- Charge, S.B., and Rudnicki, M.A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84, 209-238.
- Chargé, S.B., and Rudnicki, M.A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84, 209-238.
- Chen, S., Wang, J., Yu, G., Liu, W., and Pearce, D. (1997). Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J Biol Chem* 272, 14087-14092.
- Chen, Y., Hu, J., Boorman, D., Klein-Szanto, A., and O'Brien, T.G. (2004). Therapy of murine squamous cell carcinomas with 2-difluoromethylornithine. *J Carcinog* 3, 10.
- Chen, Y., and Klionsky, D.J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci* 124, 161-170.
- Chen, Y., Zajac, J.D., and MacLean, H.E. (2005). Androgen regulation of satellite cell function. *J Endocrinol* 186, 21-31.
- Christiaens, V., Bevan, C.L., Callewaert, L., Haelens, A., Verrijdt, G., Rombauts, W., and Claessens, F. (2002). Characterization of the two coactivator-interacting surfaces of the androgen receptor and their relative role in transcriptional control. *J Biol Chem* 277, 49230-49237.
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S.C., Waterfield, M.D., Backer, J.M., and Zerial, M. (1999). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* 1, 249-252.
- Cihak, R., Gutmann, E., and Hanzlikova, V. (1970). Involution and hormone-induced persistence of the M. sphincter (levator) ani in female rats. *J Anat* 106, 93-110.
- Claessens, F., Denayer, S., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C., and Haelens, A. (2008). Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal* 6, e008.
- 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.
- Clinckemalie, L., Vanderschueren, D., Boonen, S., and Claessens, F. (2012). The hinge region in androgen receptor control. *Mol Cell Endocrinol* 358, 1-8.
- Coffey, K., and Robson, C.N. (2012). Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *J Endocrinol* 215, 221-237.
- Coffino, P. (2000). Polyamines in spermiogenesis: not now, darling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4421-4423.
- Coffino, P. (2001). Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 188-194.
- Collins, R.A., and Grounds, M.D. (2001). The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF-alpha(-/-) and TNF-alpha(-/-)/LT-alpha(-/-) mice. *J Histochem Cytochem* 49, 989-1001.
- Comb, W.C., Cogswell, P., Sitcheran, R., and Baldwin, A.S. (2011). IKK-dependent, NF-kappaB-independent control of autophagic gene expression. *Oncogene* 30, 1727-1732.
- Conboy, I.M., and Rando, T.A. (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 3, 397-409.

- Coodley, G.O., and Coodley, M.K. (1997). A trial of testosterone therapy for HIV-associated weight loss. *AIDS* 11, 1347-1352.
- Cooper, R.N., Tajbakhsh, S., Mouly, V., Cossu, G., Buckingham, M., and Butler-Browne, G.S. (1999). In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci* 112 (Pt 17), 2895-2901.
- Corcelle, E., Nebout, M., Bekri, S., Gauthier, N., Hofman, P., Poujeol, P., Fenichel, P., and Mograbi, B. (2006). Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res* 66, 6861-6870.
- Cornelison, D.D., Olwin, B.B., Rudnicki, M.A., and Wold, B.J. (2000). MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol* 224, 122-137.
- Cornelison, D.D., and Wold, B.J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 191, 270-283.
- Cottin, P., Brustis, J.J., Poussard, S., Elamrani, N., Broncard, S., and Ducastaing, A. (1994). Ca(2+)-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1223, 170-178.
- Craig, R., and Woodhead, J.L. (2006). Structure and function of myosin filaments. *Current opinion in structural biology* 16, 204-212.
- Crawford, B.A., Liu, P.Y., Kean, M.T., Bleasel, J.F., and Handelsman, D.J. (2003). Randomized placebo-controlled trial of androgen effects on muscle and bone in men requiring long-term systemic glucocorticoid treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3167-3176.
- Criollo, A., Senovilla, L., Authier, H., Maiuri, M.C., Morselli, E., Vitale, I., Kepp, O., Tasdemir, E., Galluzzi, L., Shen, S., et al. (2010a). The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J* 29, 619-631.
- Criollo, A., Senovilla, L., Authier, H., Maiuri, M.C., Morselli, E., Vitale, I., Kepp, O., Tasdemir, E., Galluzzi, L., Shen, S., et al. (2010b). IKK connects autophagy to major stress pathways. *Autophagy* 6, 189-191.
- Crist, D.M., Stackpole, P.J., and Peake, G.T. (1983). Effects of androgenic-anabolic steroids on neuromuscular power and body composition. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 54, 366-370.
- Crozat, A., Palvimo, J.J., Julkunen, M., and Janne, O.A. (1992). Comparison of androgen regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression in rodent kidney and accessory sex organs. *Endocrinology* 130, 1131-1144.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000). Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 275, 31505-31513.
- Cui, Q., Tashiro, S., Onodera, S., and Ikejima, T. (2006). Augmentation of oridonin-induced apoptosis observed with reduced autophagy. *J Pharmacol Sci* 101, 230-239.
- Daitoku, H., Sakamaki, J., and Fukamizu, A. (2011). Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1954-1960.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Davidson, N.E., Hahm, H.A., McCloskey, D.E., Woster, P.M., and Casero, R.A., Jr. (1999). Clinical aspects of cell death in breast cancer: the polyamine pathway as a new target for treatment. *Endocr Relat Cancer* 6, 69-73.
- Davies, P., Watt, K., Kelly, S.M., Clark, C., Price, N.C., and McEwan, I.J. (2008). Consequences of poly-glutamine repeat length for the conformation and folding of the androgen receptor amino-terminal domain. *J Mol Endocrinol* 41, 301-314.
- Davis, S.R., McCloud, P., Strauss, B.J., and Burger, H. (1995). Testosterone enhances estradiol's effects on postmenopausal bone density and sexuality. *Maturitas* 21, 227-236.
- de Vogel, S., Ulvik, A., Meyer, K., Ueland, P.M., Nygard, O., Vollset, S.E., Tell, G.S., Gregory, J.F., 3rd, Tretli, S., and Bjorge, T. (2014). Sarcosine and other metabolites along the choline oxidation

pathway in relation to prostate cancer--a large nested case-control study within the JANUS cohort in Norway. *Int J Cancer* **134**, 197-206.

Dedieu, S., Dourdin, N., Dargelos, E., Poussard, S., Veschambre, P., Cottin, P., and Brustis, J.J. (2002). Calpain and myogenesis: development of a convenient cell culture model. *Biol Cell* **94**, 65-76.

Delfini, M.C., Hirsinger, E., Pourquie, O., and Duprez, D. (2000). Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. *Development* **127**, 5213-5224.

Derave, W., Jones, G., Hespel, P., and Harris, R.C. (2008). Creatine supplementation augments skeletal muscle carnosine content in senescence-accelerated mice (SAMP8). *Rejuvenation Res* **11**, 641-647.

Derave, W., Ozdemir, M.S., Harris, R.C., Pottier, A., Reyngoudt, H., Koppo, K., Wise, J.A., and Achten, E. (2007). beta-Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *J Appl Physiol* (1985) **103**, 1736-1743.

Dhawan, J., and Rando, T.A. (2005). Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol* **15**, 666-673.

Diamond, P., Cusan, L., Gomez, J.L., Belanger, A., and Labrie, F. (1996). Metabolic effects of 12-month percutaneous dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. *J Endocrinol* **150 Suppl**, S43-50.

Diel, P., Baadners, D., Schlupmann, K., Velders, M., and Schwarz, J.P. (2008). C2C12 myoblastoma cell differentiation and proliferation is stimulated by androgens and associated with a modulation of myostatin and Pax7 expression. *J Mol Endocrinol* **40**, 231-241.

Ding, D., Xu, L., Menon, M., Reddy, G.P., and Barrack, E.R. (2005). Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate* **62**, 133-139.

Ding, E.L., Song, Y., Malik, V.S., and Liu, S. (2006). Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **295**, 1288-1299.

Dobs, A.S., Cofrancesco, J., Nolten, W.E., Danoff, A., Anderson, R., Hamilton, C.D., Feinberg, J., Seekins, D., Yangco, B., and Rhame, F. (1999). The use of a transscrotal testosterone delivery system in the treatment of patients with weight loss related to human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* **107**, 126-132.

Dorfman, K.D., Kincl, F.A. (1963). Relative potency of various steroids in an anabolic androgenic assay using castrated rat. *Endocrinology*, **7**.

Doumit, M.E., Cook, D.R., and Merkel, R.A. (1996). Testosterone up-regulates androgen receptors and decreases differentiation of porcine myogenic satellite cells in vitro. *Endocrinology* **137**, 1385-1394.

Dourdin, N., Balcerzak, D., Brustis, J.J., Poussard, S., Cottin, P., and Ducastaing, A. (1999). Potential m-calpain substrates during myoblast fusion. *Exp Cell Res* **246**, 433-442.

Doyonnas, R., LaBarge, M.A., Sacco, A., Charlton, C., and Blau, H.M. (2004). Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13507-13512.

Dreyer, H.C., Blanco, C.E., Sattler, F.R., Schroeder, E.T., and Wiswell, R.A. (2006). Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve* **33**, 242-253.

Dubois, V., Laurent, M., Boonen, S., Vanderschueren, D., and Claessens, F. (2013). Androgens and skeletal muscle: cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic actions. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1651-1667.

Dubois, V., Laurent, M.R., Sinnesael, M., Cielen, N., Helsen, C., Clinckemalie, L., Spans, L., Gayan-Ramirez, G., Deldicque, L., Hespel, P., *et al.* (2014). A satellite cell-specific knockout of the androgen receptor reveals myostatin as a direct androgen target in skeletal muscle. *FASEB J*.

Dulor, J.P., Cambon, B., Vigneron, P., Reyne, Y., Nougues, J., Casteilla, L., and Bacou, F. (1998). Expression of specific white adipose tissue genes in denervation-induced skeletal muscle fatty degeneration. *FEBS Lett* **439**, 89-92.

- Dusterhoft, S., and Pette, D. (1999). Evidence that acidic fibroblast growth factor promotes maturation of rat satellite-cell-derived myotubes in vitro. *Differentiation* 65, 161-169.
- Eckel, R.H., Grundy, S.M., and Zimmet, P.Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet* 365, 1415-1428.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Buttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., *et al.* (2009a). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11, 1305-1314.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., *et al.* (2009b). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11, 1305-1314.
- Engert, J.C., Berglund, E.B., and Rosenthal, N. (1996). Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol* 135, 431-440.
- Enns, D.L., Iqbal, S., and Tiidus, P.M. (2008). Oestrogen receptors mediate oestrogen-induced increases in post-exercise rat skeletal muscle satellite cells. *Acta Physiol (Oxf)* 194, 81-93.
- Enns, D.L., and Tiidus, P.M. (2008). Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J Appl Physiol* (1985) 104, 347-353.
- Er, F., Michels, G., Brandt, M.C., Khan, I., Haase, H., Eicks, M., Lindner, M., and Hoppe, U.C. (2007). Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium* 41, 467-477.
- Escriva, H., Delaunay, F., and Laudet, V. (2000). Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 22, 717-727.
- Estrada, M., Espinosa, A., Gibson, C.J., Uhlen, P., and Jaimovich, E. (2005). Capacitative calcium entry in testosterone-induced intracellular calcium oscillations in myotubes. *J Endocrinol* 184, 371-379.
- Estrada, M., Liberona, J.L., Miranda, M., and Jaimovich, E. (2000). Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E132-139.
- Everaert, I., Mooyaart, A., Baguet, A., Zutinic, A., Baelde, H., Achten, E., Taes, Y., De Heer, E., and Derave, W. (2011). Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNDP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. *Amino Acids* 40, 1221-1229.
- Fahey, T.D., and Brown, C.H. (1973). The effects of an anabolic steroid on the strength, body composition, and endurance of college males when accompanied by a weight training program. *Med Sci Sports* 5, 272-276.
- Fargo, K.N., Foster, A.M., Harty, M.W., and Sengelaub, D.R. (2003). Estrogen alters excitability but not morphology of a sexually dimorphic neuromuscular system in adult rats. *J Neurobiol* 56, 66-77.
- Faus, H., and Haendler, B. (2006). Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60, 520-528.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 752-757.
- Ferrando, A.A., Sheffield-Moore, M., Yeckel, C.W., Gilkison, C., Jiang, J., Achacosa, A., Lieberman, S.A., Tipton, K., Wolfe, R.R., and Urban, R.J. (2002). Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E601-607.
- Ferry, A., Noirez, P., Page, C.L., Salah, I.B., Daegelen, D., and Rieu, M. (1999). Effects of anabolic/androgenic steroids on regenerating skeletal muscles in the rat. *Acta Physiol Scand* 166, 105-110.
- Figuerola-Valverde, L., Luna, H., Castillo-Henkel, C., Munoz-Garcia, O., Morato-Cartagena, T., and Ceballos-Reyes, G. (2002). Synthesis and evaluation of the cardiovascular effects of two, membrane impermeant, macromolecular complexes of dextran-testosterone. *Steroids* 67, 611-619.

- Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerod, L., Fisher, E.M., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H., and Simonsen, A. (2007). Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 179, 485-500.
- Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., *et al.* (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447, 1121-1125.
- Fischbeck (1997). Kennedy disease. *Journal of inherited metabolic disease*, 7.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z., and Coolican, S.A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 17, 481-517.
- Floss, T., Arnold, H.H., and Braun, T. (1997). A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev* 11, 2040-2051.
- Flucher, B.E., Andrews, S.B., Fleischer, S., Marks, A.R., Caswell, A., and Powell, J.A. (1993). Triad formation: organization and function of the sarcoplasmic reticulum calcium release channel and triadin in normal and dysgenic muscle in vitro. *J Cell Biol* 123, 1161-1174.
- Foradori, C.D., Weiser, M.J., and Handa, R.J. (2008). Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 29, 169-181.
- Forouhar, F., Huang, W.N., Liu, J.H., Chien, K.Y., Wu, W.G., and Hsiao, C.D. (2003). Structural basis of membrane-induced cardiotoxin A3 oligomerization. *J Biol Chem* 278, 21980-21988.
- Fowler, W.M., Jr., Gardner, G.W., and Egstrom, G.H. (1965). Effect of an anabolic steroid on physical performance of young men. *J Appl Physiol* 20, 1038-1040.
- Frairia, R., Fortunati, N., Revelli, A., Guidetti, D., Cavaglia, S., and Massobrio, M. (1994). Binding of sex steroid binding protein to plasma membranes of human testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 51, 319-322.
- Fraysse, B., Vignaud, A., Fane, B., Schuh, M., Butler-Browne, G., Metzger, D., and Ferry, A. (2014). Acute effect of androgens on maximal force-generating capacity and electrically evoked calcium transient in mouse skeletal muscles. *Steroids* 87C, 6-11.
- Frost, R.A., Nystrom, G.J., and Lang, C.H. (2004). Epinephrine stimulates IL-6 expression in skeletal muscle and C2C12 myoblasts: role of c-Jun NH2-terminal kinase and histone deacetylase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E809-817.
- Fu, M., Wang, C., Reutens, A.T., Wang, J., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Ogryzko, V., Avantiaggiati, M.L., and Pestell, R.G. (2000). p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem* 275, 20853-20860.
- Fujita, K., Murakami, Y., and Hayashi, S. (1982). A macromolecular inhibitor of the antizyme to ornithine decarboxylase. *Biochem J* 204, 647-652.
- Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Omori, H., Yamamoto, A., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol Biol Cell* 19, 4651-4659.
- Furuya, N., Yu, J., Byfield, M., Patingre, S., and Levine, B. (2005). The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* 1, 46-52.
- Gadient, R.A., and Patterson, P.H. (1999). Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 17, 127-137.
- Galani, A., Kitsiou-Tzeli, S., Sofokleous, C., Kanavakis, E., and Kalpini-Mavrou, A. (2008). Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. *Hormones (Athens)* 7, 217-229.
- Gallucci, S., Provenzano, C., Mazzearelli, P., Scuderi, F., and Bartoccioni, E. (1998). Myoblasts produce IL-6 in response to inflammatory stimuli. *Int Immunol* 10, 267-273.
- Ganley, I.G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 284, 12297-12305.

- Gao, W., Reiser, P.J., Coss, C.C., Phelps, M.A., Kearbey, J.D., Miller, D.D., and Dalton, J.T. (2005). Selective androgen receptor modulator treatment improves muscle strength and body composition and prevents bone loss in orchidectomized rats. *Endocrinology* 146, 4887-4897.
- Garry, D.J., Meeson, A., Elterman, J., Zhao, Y., Yang, P., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2000). Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5416-5421.
- Gaughan, L., Logan, I.R., Cook, S., Neal, D.E., and Robson, C.N. (2002). Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem* 277, 25904-25913.
- Geiger, B., and Ayalon, O. (1992). Cadherins. *Annu Rev Cell Biol* 8, 307-332.
- Georgiadis, V., Stewart, H.J., Pollard, H.J., Tavsanoglu, Y., Prasad, R., Horwood, J., Deltour, L., Goldring, K., Poirier, F., and Lawrence-Watt, D.J. (2007). Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev Dyn* 236, 1014-1024.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58, 685-704.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645-652.
- Gioeli, D., Black, B.E., Gordon, V., Spencer, A., Kesler, C.T., Eblen, S.T., Paschal, B.M., and Weber, M.J. (2006). Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Mol Endocrinol* 20, 503-515.
- Gioeli, D., and Paschal, B.M. (2012). Post-translational modification of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 352, 70-78.
- Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.
- Golding, L., Freyding, J.E., Fishel, S.S. (1974). Weight, size, and strength: unchanges with steroids. *Physician Sports Medicine* 2.
- Goldring, K., Partridge, T., and Watt, D. (2002). Muscle stem cells. *J Pathol* 197, 457-467.
- Goldstone, A., Koenig, H., and Lu, C. (1982). Testosterone-dependent sexual dimorphism of the mouse kidney is mediated by polyamines. *Biochem Biophys Res Commun* 104, 165-172.
- Gonzalez-Montelongo, M.C., Marin, R., Gomez, T., Marrero-Alonso, J., and Diaz, M. (2010). Androgens induce nongenomic stimulation of colonic contractile activity through induction of calcium sensitization and phosphorylation of LC20 and CPI-17. *Mol Endocrinol* 24, 1007-1023.
- Goodman, C.A., Frey, J.W., Mabrey, D.M., Jacobs, B.L., Lincoln, H.C., You, J.S., and Hornberger, T.A. (2011). The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. *J Physiol* 589, 5485-5501.
- Gordon, A.M., Homsher, E., and Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 80, 853-924.
- Gordon, A.M., Huxley, A.F., and Julian, F.J. (1966). The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 184, 170-192.
- Goto, A., Morita, A., Goto, M., Sasaki, S., Miyachi, M., Aiba, N., Terauchi, Y., Noda, M., and Watanabe, S. (2012). Associations of sex hormone-binding globulin and testosterone with diabetes among men and women (the Saku Diabetes study): a case control study. *Cardiovasc Diabetol* 11, 130.
- Greenberg, A.S., and McDaniel, M.L. (2002). Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 3, 24-34.
- Greenberg, C.C., Jurczak, M.J., Danos, A.M., and Brady, M.J. (2006). Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E1-8.
- Grinspoon, S., Corcoran, C., Askari, H., Schoenfeld, D., Wolf, L., Burrows, B., Walsh, M., Hayden, D., Parlman, K., Anderson, E., *et al.* (1998). Effects of androgen administration in men with the AIDS wasting syndrome. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 129, 18-26.

- Grishkovskaya, I., Avvakumov, G.V., Sklenar, G., Dales, D., Hammond, G.L., and Muller, Y.A. (2000). Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *EMBO J* 19, 504-512.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3, 950-964.
- Grossmann, M. (2011). Low testosterone in men with type 2 diabetes: significance and treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 96, 2341-2353.
- Grossmann, M., Thomas, M.C., Panagiotopoulos, S., Sharpe, K., Macisaac, R.J., Clarke, S., Zajac, J.D., and Jerums, G. (2008). Low testosterone levels are common and associated with insulin resistance in men with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 1834-1840.
- Grounds, M.D., White, J.D., Rosenthal, N., and Bogoyevitch, M.A. (2002). The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem* 50, 589-610.
- Guerci, A., Lahoute, C., Hebrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Precigout, G., Garcia, L., *et al.* (2012). Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab* 15, 25-37.
- Guertin, D.A., and Sabatini, D.M. (2009). The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2, pe24.
- Gugliucci, A. (2004). Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chim Acta* 344, 23-35.
- Gugliucci, A., and Menini, T. (2003). The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sci* 72, 2603-2616.
- Gundersen, K. (2010). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev Camb Philos Soc* 86, 564-600.
- Guo, Z., Benten, W.P., Krucken, J., and Wunderlich, F. (2002). Nongenomic testosterone calcium signaling. Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages. *J Biol Chem* 277, 29600-29607.
- Gupte, S.A., Tateyama, M., Okada, T., Oka, M., and Ochi, R. (2002). Epiandrosterone, a metabolite of testosterone precursor, blocks L-type calcium channels of ventricular myocytes and inhibits myocardial contractility. *J Mol Cell Cardiol* 34, 679-688.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., and Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-394.
- Haigis, M.C., and Sinclair, D.A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5, 253-295.
- Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656-667.
- Hall, J., Jones, R.D., Jones, T.H., Channer, K.S., and Peers, C. (2006). Selective inhibition of L-type Ca²⁺ channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology* 147, 2675-2680.
- Hamdi, M.M., and Mutungi, G. (2010). Dihydrotestosterone activates the MAPK pathway and modulates maximum isometric force through the EGF receptor in isolated intact mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 588, 511-525.
- Hamdi, M.M., and Mutungi, G. (2013). Dihydrotestosterone stimulates amino acid uptake and the expression of LAT2 in mouse skeletal muscle fibres through an ERK1/2-dependent mechanism. *J Physiol* 589, 3623-3640.
- Hammes, S.R., and Levin, E.R. (2011). Minireview: Recent advances in extranuclear steroid receptor actions. *Endocrinology* 152, 4489-4495.
- Han, M.K., Song, E.K., Guo, Y., Ou, X., Mantel, C., and Broxmeyer, H.E. (2008). SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell* 2, 241-251.

- Han, X., Kazarinoff, M.N., Seiler, N., and Stanley, B.A. (2001). Rat colon ornithine and arginine metabolism: coordinated effects after proliferative stimuli. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G389-399.
- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 282, 37298-37302.
- Hatzoglou, A., Kampa, M., Kogia, C., Charalampopoulos, I., Theodoropoulos, P.A., Anezinis, P., Dambaki, C., Papakonstanti, E.A., Stathopoulos, E.N., Stournaras, C., *et al.* (2005). Membrane androgen receptor activation induces apoptotic regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 893-903.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 11, 1433-1437.
- Hayashi, S., Aso, H., Watanabe, K., Nara, H., Rose, M.T., Ohwada, S., and Yamaguchi, T. (2004). Sequence of IGF-I, IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle. *Histochem Cell Biol* 122, 427-434.
- Hayashi, S., Murakami, Y., and Matsufuji, S. (1996). Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends Biochem Sci* 21, 27-30.
- Hayashi, T., Hirshman, M.F., Kurth, E.J., Winder, W.W., and Goodyear, L.J. (1998). Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* 47, 1369-1373.
- He, B., Gampe, R.T., Jr., Kole, A.J., Hnat, A.T., Stanley, T.B., An, G., Stewart, E.L., Kalman, R.I., Mingos, J.T., and Wilson, E.M. (2004). Structural basis for androgen receptor interdomain and coactivator interactions suggests a transition in nuclear receptor activation function dominance. *Mol Cell* 16, 425-438.
- Heby, O., Roberts, S.C., and Ullman, B. (2003). Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. *Biochem Soc Trans* 31, 415-419.
- Hemelaar, J., Lelyveld, V.S., Kessler, B.M., and Ploegh, H.L. (2003). A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem* 278, 51841-51850.
- Herbert, Z., Gothe, S., Caldwell, J.D., Bernstein, H.G., Melle, C., von Eggeling, F., Lewis, J., and Jirikowski, G.F. (2005). Identification of sex hormone-binding globulin in the human hypothalamus. *Neuroendocrinology* 81, 287-293.
- Hervey, G.R., Hutchinson, I., Knibbs, A.V., Burkinshaw, L., Jones, P.R., Norgan, N.G., and Levell, M.J. (1976). "Anabolic" effects of methandienone in men undergoing athletic training. *Lancet* 2, 699-702.
- Hervey, G.R., Knibbs, A.V., Burkinshaw, L., Morgan, D.B., Jones, P.R., Chettle, D.R., and Vartsky, D. (1981). Effects of methandienone on the performance and body composition of men undergoing athletic training. *Clin Sci (Lond)* 60, 457-461.
- Hickey, M.S., Carey, J.O., Azevedo, J.L., Houmard, J.A., Pories, W.J., Israel, R.G., and Dohm, G.L. (1995). Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am J Physiol* 268, E453-457.
- Hill, C.A., Harris, R.C., Kim, H.J., Harris, B.D., Sale, C., Boobis, L.H., Kim, C.K., and Wise, J.A. (2007). Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids* 32, 225-233.
- Hill, M., and Goldspink, G. (2003). Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J Physiol* 549, 409-418.
- Hirata, A., Masuda, S., Tamura, T., Kai, K., Ojima, K., Fukase, A., Motoyoshi, K., Kamakura, K., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2003). Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin. *Am J Pathol* 163, 203-215.

- Hoet, P.H., and Nemery, B. (2000). Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L417-433.
- Hoffman, E.P., and Nader, G.A. (2004). Balancing muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Med* 10, 584-585.
- Holmes, B.F., Lang, D.B., Birnbaum, M.J., Mu, J., and Dohm, G.L. (2004). AMP kinase is not required for the GLUT4 response to exercise and denervation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E739-743.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., *et al.* (2009a). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 20, 1981-1991.
- Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S., Natsume, T., Hara, T., and Mizushima, N. (2009b). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* 5, 973-979.
- Hotamisligil, G.S., Budavari, A., Murray, D., and Spiegelman, B.M. (1994). Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest* 94, 1543-1549.
- Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., and Spiegelman, B.M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665-668.
- Hourde, C., Jagerschmidt, C., Clement-Lacroix, P., Vignaud, A., Ammann, P., Butler-Browne, G.S., and Ferry, A. (2009). Androgen replacement therapy improves function in male rat muscles independently of hypertrophy and activation of the Akt/mTOR pathway. *Acta Physiol (Oxf)* 195, 471-482.
- Huang, H., and Tindall, D.J. (2007). Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 120, 2479-2487.
- Husmann, I., Soulet, L., Gautron, J., Martelly, I., and Barritault, D. (1996). Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 249-258.
- Huxley, A.F., and Simmons, R.M. (1971). Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* 233, 533-538.
- Ianuzzo, C.D., Gollnick, P.D., and Armstrong, R.B. (1976). Compensatory adaptations of skeletal muscle fiber types to a long-term functional overload. *Life Sci* 19, 1517-1523.
- Ibebunjo, C., Eash, J.K., Li, C., Ma, Q., and Glass, D.J. (2011). Voluntary running, skeletal muscle gene expression, and signaling inversely regulated by orchidectomy and testosterone replacement. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300, E327-340.
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 39-51.
- Ikonen, T., Palvimäki, J.J., and Janne, O.A. (1997). Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem* 272, 29821-29828.
- Illa, I., Leon-Monzon, M., and Dalakas, M.C. (1992). Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Ann Neurol* 31, 46-52.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., *et al.* (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126, 955-968.
- Irintchev, A., and Wernig, A. (1987). Muscle damage and repair in voluntarily running mice: strain and muscle differences. *Cell Tissue Res* 249, 509-521.
- Isayama, R., Oishi, J., Alves Cagnon, V.H., Rocha Campos, G.E. (2006). Effect of testosterone on skeletal muscle of young and old male rats. *Braz J morphol Sci*, 7.
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 19, 5360-5372.

- Ivanov, I.P., Gesteland, R.F., Matsufuji, S., and Atkins, J.F. (1998). Programmed frameshifting in the synthesis of mammalian antizyme is +1 in mammals, predominantly +1 in fission yeast, but -2 in budding yeast. *RNA* 4, 1230-1238.
- Jackman, M.R., and Willis, W.T. (1996). Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *Am J Physiol* 270, C673-678.
- Jacob, D.A., Ray, T., Bengston, C.L., Lindsten, T., Wu, J., Thompson, C.B., and Forger, N.G. (2008). The role of cell death in sexually dimorphic muscle development: male-specific muscles are retained in female bax/bak knockout mice. *Dev Neurobiol* 68, 1303-1314.
- Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., and Eskelinen, E.L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* 117, 4837-4848.
- Janne, J., Alhonen, L., Pietila, M., and Keinanen, T.A. (2004). Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur J Biochem* 271, 877-894.
- Jeevanandam, M., and Petersen, S.R. (2001). Clinical role of polyamine analysis: problem and promise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4, 385-390.
- Jehle, K., Cato, L., Neeb, A., Muhle-Goll, C., Jung, N., Smith, E.W., Buzon, V., Carbo, L.R., Estebanez-Perpina, E., Schmitz, K., *et al.* (2014). Coregulator control of androgen receptor action by a novel nuclear receptor-binding motif. *J Biol Chem* 289, 8839-8851.
- Jenster, G., van der Korput, H.A., Trapman, J., and Brinkmann, A.O. (1995). Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 270, 7341-7346.
- Jeukendrup, A.E. (2002). Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci* 967, 217-235.
- Jiang, B., and Klueber, K.M. (1989). Structural and functional analysis of murine skeletal muscle after castration. *Muscle Nerve* 12, 67-77.
- Joanne, P., Hourde, C., Ochala, J., Cauderan, Y., Medja, F., Vignaud, A., Mouisel, E., Hadj-Said, W., Arandel, L., Garcia, L., *et al.* (2012a). Impaired adaptive response to mechanical overloading in dystrophic skeletal muscle. *PLoS One* 7, e35346.
- Joanne, P., Hourde, C., Ochala, J., Cauderan, Y., Medja, F., Vignaud, A., Mouisel, E., Hadj-Said, W., Arandel, L., Garcia, L., *et al.* (2012b). Impaired adaptive response to mechanical overloading in dystrophic skeletal muscle. *PLoS One* 7, e35346.
- Johansen, J.A., Breedlove, S.M., and Jordan, C.L. (2007). Androgen receptor expression in the levator ani muscle of male mice. *J Neuroendocrinol* 19, 823-826.
- Johnson, L.C., Fisher, G., Silvester, L.J., and Hofheins, C.C. (1972). Anabolic steroid: effects on strength, body weight, oxygen uptake and spermatogenesis upon mature males. *Medicine and Sciences in sports*, 3.
- Johnson, L.C., Roundy, E.S., Allsen, P.E., Fisher, A.G., and Silvester, L.F. (1975). Effect of anabolic steroid treatment on endurance. *Med Sci Sports* 7, 287-289.
- Johnson, L.R., and McCormack, S.A. (1999). Healing of Gastrointestinal Mucosa: Involvement of Polyamines. *News Physiol Sci* 14, 12-17.
- Jones, D., Round, J., De Haan, A (2005). *Physiologie du muscle squelettique: de la structure au mouvement.*, Elsevier SAS edn.
- Jorgensen, S.B., Richter, E.A., and Wojtaszewski, J.F. (2006). Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol* 574, 17-31.
- Joubert, Y., and Tobin, C. (1995). Testosterone treatment results in quiescent satellite cells being activated and recruited into cell cycle in rat levator ani muscle. *Dev Biol* 169, 286-294.
- Joubert, Y., Tobin, C., and Lebart, M.C. (1994). Testosterone-induced masculinization of the rat levator ani muscle during puberty. *Dev Biol* 162, 104-110.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.H., Kim, Y.M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20, 1992-2003.
- Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584, 1287-1295.

- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19, 5720-5728.
- Kablar, B., and Rudnicki, M.A. (2000). Skeletal muscle development in the mouse embryo. *Histol Histopathol* 15, 649-656.
- Kadi, F. (2008). Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. *Br J Pharmacol* 154, 522-528.
- Kadi, F., Eriksson, A., Holmner, S., and Thornell, L.E. (1999). Effects of anabolic steroids on the muscle cells of strength-trained athletes. *Med Sci Sports Exerc* 31, 1528-1534.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150, 1507-1513.
- Kami, K., and Senba, E. (2002). In vivo activation of STAT3 signaling in satellite cells and myofibers in regenerating rat skeletal muscles. *J Histochem Cytochem* 50, 1579-1589.
- Kami, K., and Senba, E. (2005). Galectin-1 is a novel factor that regulates myotube growth in regenerating skeletal muscles. *Curr Drug Targets* 6, 395-405.
- Kampa, M., Papakonstanti, E.A., Hatzoglou, A., Stathopoulos, E.N., Stournaras, C., and Castanas, E. (2002). The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *FASEB J* 16, 1429-1431.
- Kang, H.Y., Cho, C.L., Huang, K.L., Wang, J.C., Hu, Y.C., Lin, H.K., Chang, C., and Huang, K.E. (2004). Nongenomic androgen activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res* 19, 1181-1190.
- Kasbohm, E.A., Guo, R., Yowell, C.W., Bagchi, G., Kelly, P., Arora, P., Casey, P.J., and Daaka, Y. (2005). Androgen receptor activation by G(s) signaling in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 280, 11583-11589.
- Kastner, S., Elias, M.C., Rivera, A.J., and Yablonka-Reuveni, Z. (2000). Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. *J Histochem Cytochem* 48, 1079-1096.
- Kaufman, J.M., and Vermeulen, A. (2005). The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev* 26, 833-876.
- Kaufmann, U., Martin, B., Link, D., Witt, K., Zeitler, R., Reinhard, S., and Starzinski-Powitz, A. (1999). M-cadherin and its sisters in development of striated muscle. *Cell Tissue Res* 296, 191-198.
- Kenyon, A., Sandiford, I., Bryan, AM. (1938). The effect of testosterone propionate on nitrogen, electrolyte, water and energy metabolism in eunuchoidism. *Endocrinology*, 10.
- Kerr, J.E., Beck, S.G., and Handa, R.J. (1996). Androgens modulate glucocorticoid receptor mRNA, but not mineralocorticoid receptor mRNA levels, in the rat hippocampus. *J Neuroendocrinol* 8, 439-447.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2, 330-335.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13, 132-141.
- Kim, Y.C., Sim, J.H., Kim, Y.H., Kwon, S.C., Lee, S.J., Kim, S.R., Kim, D.W., Park, S.M., Youn, S.J., Xing, D.G., *et al.* (2007). Effects of polyamines on contractility of guinea-pig gastric smooth muscle. *J Korean Med Sci* 22, 48-56.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* 33, 109-122.
- Kirk, S., Oldham, J., Kambadur, R., Sharma, M., Dobbie, P., and Bass, J. (2000). Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol* 184, 356-363.

- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., *et al.* (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544.
- Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-1721.
- Kochl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y., and Tooze, S.A. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* 7, 129-145.
- Kong Thoo Lin, P., Dance, A.M., Bestwick, C., and Milne, L. (2003). The biological activities of new polyamine derivatives as potential therapeutic agents. *Biochem Soc Trans* 31, 407-410.
- Koponen, T., Cerrada-Gimenez, M., Pirinen, E., Hohtola, E., Paananen, J., Vuohelainen, S., Tusa, M., Pirnes-Karhu, S., Heikkinen, S., Virkamaki, A., *et al.* (2012). The activation of hepatic and muscle polyamine catabolism improves glucose homeostasis. *Amino Acids* 42, 427-440.
- Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L.I., O'Brien, C.A., Bodenner, D.L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G.B., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., *et al.* (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104, 719-730.
- Koutros, S., Meyer, T.E., Fox, S.D., Issaq, H.J., Veenstra, T.D., Huang, W.Y., Yu, K., Albanes, D., Chu, L.W., Andriole, G., *et al.* (2013). Prospective evaluation of serum sarcosine and risk of prostate cancer in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *Carcinogenesis* 34, 2281-2285.
- Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40, 280-293.
- Krook, A., Bjornholm, M., Galuska, D., Jiang, X.J., Fahlman, R., Myers, M.G., Jr., Wallberg-Henriksson, H., and Zierath, J.R. (2000). Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49, 284-292.
- Kuang, S., Charge, S.B., Seale, P., Huh, M., and Rudnicki, M.A. (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* 172, 103-113.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 129, 999-1010.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhi, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.
- Kumar, R. (2012). Role of androgen receptor polyQ chain elongation in Kennedy's disease and use of natural osmolytes as potential therapeutic targets. *IUBMB Life* 64, 879-884.
- Kurek, J.B., Nouri, S., Kannourakis, G., Murphy, M., and Austin, L. (1996). Leukemia inhibitory factor and interleukin-6 are produced by diseased and regenerating skeletal muscle. *Muscle Nerve* 19, 1291-1301.
- Kwak, K.B., Chung, S.S., Kim, O.M., Kang, M.S., Ha, D.B., and Chung, C.H. (1993). Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1175, 243-249.
- LaBarge, M.A., and Blau, H.M. (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111, 589-601.
- Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D., and Daegelen, D. (2008). Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS One* 3, e3910.
- Lakshman, K.M., Bhasin, S., and Araujo, A.B. (2010). Sex hormone-binding globulin as an independent predictor of incident type 2 diabetes mellitus in men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65, 503-509.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., and Kambadur, R. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 277, 49831-49840.

- Lariviere, L., Seizl, M., and Cramer, P. (2012). A structural perspective on Mediator function. *Curr Opin Cell Biol* 24, 305-313.
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19, 207-226.
- Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 19, 628-633.
- Lee, D.K. (2002). Androgen receptor enhances myogenin expression and accelerates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 408-413.
- Lee, I.H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D.B., Liu, J., Bruns, N.E., Tsokos, M., Alt, F.W., and Finkel, T. (2008). A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3374-3379.
- Lee, J.A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* 17, 1561-1567.
- Lee, J.Y., Qu-Petersen, Z., Cao, B., Kimura, S., Jankowski, R., Cummins, J., Usas, A., Gates, C., Robbins, P., Wernig, A., *et al.* (2000). Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 150, 1085-1100.
- Lee, N.K., and MacLean, H.E. (2011). Polyamines, androgens, and skeletal muscle hypertrophy. *J Cell Physiol* 226, 1453-1460.
- Lee, N.K., Skinner, J.P., Zajac, J.D., and MacLean, H.E. (2011). Ornithine decarboxylase is upregulated by the androgen receptor in skeletal muscle and regulates myoblast proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301, E172-179.
- Lee, S.J. (2004). Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 61-86.
- Lee, S.J., and McPherron, A.C. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9306-9311.
- Lee, W.J., McClung, J., Hand, G.A., and Carson, J.A. (2003a). Overload-induced androgen receptor expression in the aged rat hindlimb receiving nandrolone decanoate. *J Appl Physiol* (1985) 94, 1153-1161.
- Lee, W.J., Thompson, R.W., McClung, J.M., and Carson, J.A. (2003b). Regulation of androgen receptor expression at the onset of functional overload in rat plantaris muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R1076-1085.
- Lescaudron, L., Peltekian, E., Fontaine-Perus, J., Paulin, D., Zampieri, M., Garcia, L., and Parrish, E. (1999). Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul Disord* 9, 72-80.
- Leshem, Y., Spicer, D.B., Gal-Levi, R., and Halevy, O. (2000). Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits skeletal muscle cell differentiation: a role for the bHLH protein twist and the cdk inhibitor p27. *J Cell Physiol* 184, 101-109.
- Leung, G.P., Cheng-Chew, S.B., and Wong, P.Y. (2001). Nongenomic effect of testosterone on chloride secretion in cultured rat efferent duct epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1160-1167.
- Levin, E.R. (2008). Rapid signaling by steroid receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1425-1430.
- Levin, E.R. (2014). Extra-nuclear Estrogen Receptors Roles in Physiology: Lessons From Mouse Models. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-477.
- Levinovitz, A., Jennische, E., Oldfors, A., Edwall, D., and Norstedt, G. (1992). Activation of insulin-like growth factor II expression during skeletal muscle regeneration in the rat: correlation with myotube formation. *Mol Endocrinol* 6, 1227-1234.
- Lewis, M.I., Horvitz, G.D., Clemmons, D.R., and Fournier, M. (2002). Role of IGF-I and IGF-binding proteins within diaphragm muscle in modulating the effects of nandrolone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E483-490.

- Li, L., Rao, J.N., Guo, X., Liu, L., Santora, R., Bass, B.L., and Wang, J.Y. (2001). Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C941-953.
- Li, Y.P. (2003). TNF-alpha is a mitogen in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C370-376.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.H., and Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 8, 688-699.
- Liang, C., Lee, J.S., Inn, K.S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., *et al.* (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 10, 776-787.
- Liang, M., Ekblad, E., Hellstrand, P., and Nilsson, B.O. (2004). Polyamine synthesis inhibition attenuates vascular smooth muscle cell migration. *J Vasc Res* 41, 141-147.
- Lieberherr, M., and Grosse, B. (1994). Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem* 269, 7217-7223.
- Liu, F., Xia, Y., Parker, A.S., and Verma, I.M. (2012). IKK biology. *Immunol Rev* 246, 239-253.
- Liu, R.T., Chung, M.S., Wang, P.W., Chen, C.D., Lee, J.J., Lee, W.C., Chancellor, M.B., Yang, K.D., and Chuang, Y.C. (2013). The prevalence and predictors of androgen deficiency in Taiwanese men with type 2 diabetes. *Urology* 82, 124-129.
- Loughton, S.J., and Ruhling, R.O. (1977). Human strength and endurance responses to anabolic steroid and training. *J Sports Med Phys Fitness* 17, 285-296.
- Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652-660.
- Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Sar, M., Tan, J., Higgs, H.N., Larson, R.E., French, F.S., and Wilson, E.M. (1988). The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol* 2, 1265-1275.
- Lubischer, J.L., and Bebinger, D.M. (1999). Regulation of terminal Schwann cell number at the adult neuromuscular junction. *J Neurosci* 19, RC46.
- Lucarelli, G., Ditonno, P., Bettocchi, C., Spilotros, M., Rutigliano, M., Vavallo, A., Galleggiante, V., Fanelli, M., Larocca, A.M., Germinario, C.A., *et al.* (2013a). Serum sarcosine is a risk factor for progression and survival in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Future Oncol* 9, 899-907.
- Lucarelli, G., Rutigliano, M., Bettocchi, C., Palazzo, S., Vavallo, A., Galleggiante, V., Trabucco, S., Di Clemente, D., Selvaggi, F.P., Battaglia, M., *et al.* (2013b). Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel diagnostic biomarker for prostate cancer. *J Urol* 190, 2271-2277.
- Luo, G., Hershko, D.D., Robb, B.W., Wray, C.J., and Hasselgren, P.O. (2003). IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R1249-1254.
- Lynch, G.S., Hinkle, R.T., Chamberlain, J.S., Brooks, S.V., and Faulkner, J.A. (2001). Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. *J Physiol* 535, 591-600.
- Ma, K., Mallidis, C., Artaza, J., Taylor, W., Gonzalez-Cadavid, N., and Bhasin, S. (2001). Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E1128-1136.
- MacLean, H.E., Chiu, W.S., Notini, A.J., Axell, A.M., Davey, R.A., McManus, J.F., Ma, C., Plant, D.R., Lynch, G.S., and Zajac, J.D. (2008). Impaired skeletal muscle development and function in male, but not female, genomic androgen receptor knockout mice. *FASEB J* 22, 2676-2689.
- Makieva, S., Saunders, P.T., and Norman, J.E. (2014). Androgens in pregnancy: roles in parturition. *Hum Reprod Update* 20, 542-559.
- Maley, M.A., Fan, Y., Beilharz, M.W., and Grounds, M.D. (1994). Intrinsic differences in MyoD and myogenin expression between primary cultures of SJL/J and BALB/C skeletal muscle. *Exp Cell Res* 211, 99-107.

- Mammucari, C., Schiaffino, S., and Sandri, M. (2008). Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* 4, 524-526.
- Mannion, A.F., Jakeman, P.M., Dunnett, M., Harris, R.C., and Willan, P.L. (1992). Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64, 47-50.
- Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S., and Sandri, M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 10, 507-515.
- Mastrogiacomio, I., Feghali, G., Foresta, C., and Ruzza, G. (1982). Andropause: incidence and pathogenesis. *Arch Androl* 9, 293-296.
- Matecic, M., Smith, D.L., Pan, X., Maqani, N., Bekiranov, S., Boeke, J.D., and Smith, J.S. (2010). A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors. *PLoS Genet* 6, e1000921.
- Matsumoto, A., Arai, Y., and Prins, G.S. (1996). Androgenic regulation of androgen receptor immunoreactivity in motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus of male rats. *J Neuroendocrinol* 8, 553-559.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., *et al.* (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 11, 385-396.
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 493-495.
- Mayans, O., van der Ven, P.F., Wilm, M., Mues, A., Young, P., Furst, D.O., Wilmanns, M., and Gautel, M. (1998). Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 395, 863-869.
- McCarthy, J.J., Mula, J., Miyazaki, M., Erfani, R., Garrison, K., Farooqui, A.B., Srikuea, R., Lawson, B.A., Grimes, B., Keller, C., *et al.* (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development* 138, 3657-3666.
- McClung, J.M., Davis, J.M., and Carson, J.A. (2007). Ovarian hormone status and skeletal muscle inflammation during recovery from disuse in rats. *Exp Physiol* 92, 219-232.
- McClung, J.M., Lee, W.J., Thompson, R.W., Lowe, L.L., and Carson, J.A. (2003). RhoA induction by functional overload and nandrolone decanoate administration in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 447, 345-355.
- McClung, J.M., Mehl, K.A., Thompson, R.W., Lowe, L.L., and Carson, J.A. (2005). Nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded rat soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R1543-1552.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. (1999a). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321-344.
- McKenna, N.J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1999b). Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 3-12.
- McLennan, I.S., and Koishi, K. (2002). The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *Int J Dev Biol* 46, 559-567.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83-90.
- Meijer, A.J. (2008). Amino acid regulation of autophagosome formation. *Methods Mol Biol* 445, 89-109.
- Meijer, A.J., and Codogno, P. (2006). Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med* 27, 411-425.
- Meijer, A.J., and Codogno, P. (2007). AMP-activated protein kinase and autophagy. *Autophagy* 3, 238-240.
- Melendez, A., and Levine, B. (2009). Autophagy in *C. elegans*. *WormBook*, 1-26.

- Mendler, L., Baka, Z., Kovacs-Simon, A., and Dux, L. (2007). Androgens negatively regulate myostatin expression in an androgen-dependent skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 237-242.
- Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., and Winder, W.W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol* 273, E1107-1112.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., and Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6991-6995.
- Michan, S., and Sinclair, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404, 1-13.
- Michels, G., and Hoppe, U.C. (2008). Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 29, 182-198.
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M.V., Ametrano, D., Zannini, M.S., Abbondanza, C., *et al.* (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta- Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 19, 5406-5417.
- Miller, K., Corcoran, C., Armstrong, C., Caramelli, K., Anderson, E., Cotton, D., Basgoz, N., Hirschhorn, L., Tuomala, R., Schoenfeld, D., *et al.* (1998). Transdermal testosterone administration in women with acquired immunodeficiency syndrome wasting: a pilot study. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2717-2725.
- Miller, K.J., Thaloor, D., Matteson, S., and Pavlath, G.K. (2000). Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C174-181.
- Miller, R.J. (1992). Voltage-sensitive Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 267, 1403-1406.
- Miniou, P., Tiziano, D., Frugier, T., Roblot, N., Le Meur, M., and Melki, J. (1999). Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. *Nucleic Acids Res* 27, e27.
- Miranti, C.K., and Brugge, J.S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4, E83-90.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 116, 1679-1688.
- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (1998). A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* 273, 33889-33892.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15, 1101-1111.
- Monks, D.A., O'Bryant, E.L., and Jordan, C.L. (2004). Androgen receptor immunoreactivity in skeletal muscle: enrichment at the neuromuscular junction. *J Comp Neurol* 473, 59-72.
- Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T., and Buckingham, M. (2005). Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309, 2064-2067.
- Moore, R., and Walsh, F.S. (1993). The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle. *Development* 117, 1409-1420.
- Morakinyo, A.O., Adekunbi, D.A., Dada, K.A., and Adegoke, O.A. (2013). Testosterone promotes glucose intolerance, lipid disorder and oxidative stress in type 1 diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 1-8.
- Morales, A.J., Haubrich, R.H., Hwang, J.Y., Asakura, H., and Yen, S.S. (1998). The effect of six months treatment with a 100 mg daily dose of dehydroepiandrosterone (DHEA) on circulating sex

steroids, body composition and muscle strength in age-advanced men and women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49, 421-432.

Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10, 384-391.

Morley, J.E., Perry, H.M., 3rd, Kaiser, F.E., Kraenzle, D., Jensen, J., Houston, K., Mattammal, M., and Perry, H.M., Jr. (1993). Effects of testosterone replacement therapy in old hypogonadal males: a preliminary study. *J Am Geriatr Soc* 41, 149-152.

Moruzzi, M.S., Marverti, G., Piccinini, G., Frassinetti, C., and Monti, M.G. (1993). Effect of spermine on membrane-associated and membrane-inserted forms of protein kinase C. *Mol Cell Biochem* 124, 1-9.

Mourkioti, F., and Rosenthal, N. (2005). IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol* 26, 535-542.

Mulvaney, D.R., Marple, D.N., and Merkel, R.A. (1988). Proliferation of skeletal muscle satellite cells after castration and administration of testosterone propionate. *Proc Soc Exp Biol Med* 188, 40-45.

Murphy, M.M., Lawson, J.A., Mathew, S.J., Hutcheson, D.A., and Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* 138, 3625-3637.

Nakhla, A.M., Leonard, J., Hryb, D.J., and Rosner, W. (1999). Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G protein. *Steroids* 64, 213-216.

Nemoto, T., Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Minematsu-Ikeguchi, N., Yokota, M., Ohsumi, M., Ueno, T., and Kominami, E. (2003). The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *J Biol Chem* 278, 39517-39526.

Nezis, I.P., and Stenmark, H. (2012). p62 at the interface of autophagy, oxidative stress signaling, and cancer. *Antioxid Redox Signal* 17, 786-793.

Niel, L., Willemsen, K.R., Volante, S.N., and Monks, D.A. (2008). Sexual dimorphism and androgen regulation of satellite cell population in differentiating rat levator ani muscle. *Dev Neurobiol* 68, 115-122.

Nieschlag E, H.M.B. (2004). Testosterone (Action-Deficiency-Substitution). Cambridge University Press edition.

Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273, 3963-3966.

Nollet, C.K.M.a.E.A. (2013). Integrin and Adhesion Regulation of Autophagy and Mitophagy, . In *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?*, D.Y.B. (Ed.), ed. (InTech).

Notini, A.J., Davey, R.A., McManus, J.F., Bate, K.L., and Zajac, J.D. (2005). Genomic actions of the androgen receptor are required for normal male sexual differentiation in a mouse model. *J Mol Endocrinol* 35, 547-555.

Nussey, S., and Whitehead, S. (2001). *Endocrinology: an integrated approach*. Endocrinology.

O'Shea, J. (1971). The effects of an anabolic steroid on dynamic strength levels of weightlifters. *Nutr Rep Int* 4.

Ochala, J., Carpen, O., and Larsson, L. (2009). Maintenance of muscle mass, fiber size, and contractile function in mice lacking the Z-disc protein myotilin. *Ups J Med Sci* 114, 235-241.

Ochala, J., Iwamoto, H., Ravenscroft, G., Laing, N.G., and Nowak, K.J. (2013). Skeletal and cardiac alpha-actin isoforms differently modulate myosin cross-bridge formation and myofibre force production. *Hum Mol Genet* 22, 4398-4404.

Ogier-Denis, E., Houri, J.J., Bauvy, C., and Codogno, P. (1996). Guanine nucleotide exchange on heterotrimeric Gi3 protein controls autophagic sequestration in HT-29 cells. *J Biol Chem* 271, 28593-28600.

Ogier-Denis, E., Pattingre, S., El Benna, J., and Codogno, P. (2000). Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J Biol Chem* 275, 39090-39095.

- Ogier-Denis, E., Petiot, A., Bauvy, C., and Codogno, P. (1997). Control of the expression and activity of the Galpha-interacting protein (GAIP) in human intestinal cells. *J Biol Chem* 272, 24599-24603.
- Ophoff, J., Van Proeyen, K., Callewaert, F., De Gendt, K., De Bock, K., Vanden Bosch, A., Verhoeven, G., Hespel, P., and Vanderschueren, D. (2009). Androgen signaling in myocytes contributes to the maintenance of muscle mass and fiber type regulation but not to muscle strength or fatigue. *Endocrinology* 150, 3558-3566.
- Orban, P.C., Chui, D., and Marth, J.D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6861-6865.
- Papadimitriou, J.M., Robertson, T.A., Mitchell, C.A., and Grounds, M.D. (1990). The process of new plasmalemma formation in focally injured skeletal muscle fibers. *J Struct Biol* 103, 124-134.
- Pardo, J.V., Siliciano, J.D., and Craig, S.W. (1983). A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1008-1012.
- Parsons, S.A., Millay, D.P., Wilkins, B.J., Bueno, O.F., Tsika, G.L., Neilson, J.R., Liberatore, C.M., Yutzey, K.E., Crabtree, G.R., Tsika, R.W., *et al.* (2004). Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy. *J Biol Chem* 279, 26192-26200.
- Pastoret, C., and Seville, A. (1995). mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 129, 97-105.
- Pattingre, S., Bauvy, C., and Codogno, P. (2003). Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem* 278, 16667-16674.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927-939.
- Pavlat, G.K., Dominov, J.A., Kegley, K.M., and Miller, J.B. (2003). Regeneration of transgenic skeletal muscles with altered timing of expression of the basic helix-loop-helix muscle regulatory factor MRF4. *Am J Pathol* 162, 1685-1691.
- Peault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J.P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L.M., and Huard, J. (2007). Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* 15, 867-877.
- Pegg, A.E. (2006). Regulation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 281, 14529-14532.
- Pegg, A.E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61, 880-894.
- Pelosi, L., Giacinti, C., Nardis, C., Borsellino, G., Rizzuto, E., Nicoletti, C., Wannenes, F., Battistini, L., Rosenthal, N., Molinaro, M., *et al.* (2007). Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *FASEB J* 21, 1393-1402.
- Penafiel, R., Ruzafa, C., Monserrat, F., and Cremades, A. (2004). Gender-related differences in carnosine, anserine and lysine content of murine skeletal muscle. *Amino Acids* 26, 53-58.
- Peng, J., Raddatz, K., Labeit, S., Granzier, H., and Gotthardt, M. (2005). Muscle atrophy in titin M-line deficient mice. *J Muscle Res Cell Motil* 26, 381-388.
- Persson, L., Wallstrom, E.L., Nasizadeh, S., Dartsch, C., Jeppsson, A., Wendt, A., and Holmgren, J. (1998). Regulation of mammalian ornithine decarboxylase. *Biochem Soc Trans* 26, 575-579.
- Peter, J.B., Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Gillespie, C.A., and Stempel, K.E. (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11, 2627-2633.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F., Meijer, A.J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 275, 992-998.
- Petroianu, A., Veloso, D.F., Alberti, L.R., Figueiredo, J.A., and Rodrigues, F.H. (2010). Is there a relationship between physical performance and orchiectomy? *Andrologia* 42, 302-304.

- Pette, D. (1984). J.B. Wolffe memorial lecture. Activity-induced fast to slow transitions in mammalian muscle. *Med Sci Sports Exerc* 16, 517-528.
- Peuker, H., Conjard, A., Putman, C.T., and Pette, D. (1999). Transient expression of myosin heavy chain MHCI alpha in rabbit muscle during fast-to-slow transition. *J Muscle Res Cell Motil* 20, 147-154.
- Pfeffer, L.M., Yang, C.H., Murti, A., McCormack, S.A., Viar, M.J., Ray, R.M., and Johnson, L.R. (2001). Polyamine depletion induces rapid NF-kappa B activation in IEC-6 cells. *J Biol Chem* 276, 45909-45913.
- Philippou, A., Halapas, A., Maridaki, M., and Koutsilieris, M. (2007). Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7, 208-218.
- Pirinen, E., Gylling, H., Itkonen, P., Yaluri, N., Heikkinen, S., Pietila, M., Kuulasmaa, T., Tusa, M., Cerrada-Gimenez, M., Pihlajamaki, J., *et al.* (2010). Activated polyamine catabolism leads to low cholesterol levels by enhancing bile acid synthesis. *Amino Acids* 38, 549-560.
- Pirinen, E., Kuulasmaa, T., Pietila, M., Heikkinen, S., Tusa, M., Itkonen, P., Boman, S., Skommer, J., Virkamaki, A., Hohtola, E., *et al.* (2007). Enhanced polyamine catabolism alters homeostatic control of white adipose tissue mass, energy expenditure, and glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 27, 4953-4967.
- Poletti, A., Negri-Cesi, P., and Martini, L. (2005). Reflections on the diseases linked to mutations of the androgen receptor. *Endocrine* 28, 243-262.
- Ponsot, E., Zoll, J., N'Guessan, B., Ribera, F., Lampert, E., Richard, R., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., and Mettauer, B. (2005). Mitochondrial tissue specificity of substrates utilization in rat cardiac and skeletal muscles. *J Cell Physiol* 203, 479-486.
- Popov, V.M., Wang, C., Shirley, L.A., Rosenberg, A., Li, S., Nevalainen, M., Fu, M., and Pestell, R.G. (2007). The functional significance of nuclear receptor acetylation. *Steroids* 72, 221-230.
- Porter, G.A., Dmytrenko, G.M., Winkelmann, J.C., and Bloch, R.J. (1992). Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol* 117, 997-1005.
- Poujol, N., Wurtz, J.M., Tahiri, B., Lumbroso, S., Nicolas, J.C., Moras, D., and Sultan, C. (2000). Specific recognition of androgens by their nuclear receptor. A structure-function study. *J Biol Chem* 275, 24022-24031.
- Powers, M.L., and Florini, J.R. (1975). A direct effect of testosterone on muscle cells in tissue culture. *Endocrinology* 97, 1043-1047.
- Pratt, W.B., and Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-360.
- Price, F.D., Kuroda, K., and Rudnicki, M.A. (2007). Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1772, 272-283.
- Proikas-Cezanne, T., Ruckerbauer, S., Stierhof, Y.D., Berg, C., and Nordheim, A. (2007). Human WIPI-1 puncta-formation: a novel assay to assess mammalian autophagy. *FEBS Lett* 581, 3396-3404.
- Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., *et al.* (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 157, 851-864.
- Quigley, C.A., De Bellis, A., Marschke, K.B., el-Awady, M.K., Wilson, E.M., and French, F.S. (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16, 271-321.
- Ramsay S.L., S.W.M., Weinberger K. M., Graber A., and Guggenbichler W. (2007). Apparatus and method for analyzing a metabolite profile.
- Rand, M.N., and Breedlove, S.M. (1992). Androgen locally regulates rat bulbocavernosus and levator ani size. *J Neurobiol* 23, 17-30.
- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C.J., Brown, S.D., and Rubinsztein, D.C. (2005). Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat Genet* 37, 771-776.

- Ravikumar, B., Duden, R., and Rubinsztein, D.C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11, 1107-1117.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., *et al.* (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36, 585-595.
- Ray, R.M., Viar, M.J., Yuan, Q., and Johnson, L.R. (2000). Polyamine depletion delays apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C480-489.
- Reaven, G.M. (1988). Role of Insulin Resistance in Human-Disease. *Diabetes* 37, 1595-1607.
- Reaven, G.M. (2005). Compensatory hyperinsulinemia and the development of an atherogenic lipoprotein profile: the price paid to maintain glucose homeostasis in insulin-resistant individuals. *Endocrinol Metab Clin North Am* 34, 49-62.
- Reeves, E.K., Rayavarapu, S., Damsker, J.M., and Nagaraju, K. (2012). Glucocorticoid analogues: potential therapeutic alternatives for treating inflammatory muscle diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 12, 95-103.
- Reid, I.R., Wattie, D.J., Evans, M.C., and Stapleton, J.P. (1996). Testosterone therapy in glucocorticoid-treated men. *Arch Intern Med* 156, 1173-1177.
- Reisz-Porszasz, S., Bhasin, S., Artaza, J.N., Shen, R., Sinha-Hikim, I., Hogue, A., Fielder, T.J., and Gonzalez-Cadavid, N.F. (2003). Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E876-888.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A., and Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol* 172, 91-102.
- Riol-Blanco, L., Sanchez-Sanchez, N., Torres, A., Tejedor, A., Narumiya, S., Corbi, A.L., Sanchez-Mateos, P., and Rodriguez-Fernandez, J.L. (2005). The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol* 174, 4070-4080.
- Robinson-Rechavi, M., Maina, C.V., Gissendanner, C.R., Laudet, V., and Sluder, A. (2005). Explosive lineage-specific expansion of the orphan nuclear receptor HNF4 in nematodes. *J Mol Evol* 60, 577-586.
- Rochette-Egly, C. (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* 15, 355-366.
- Rooman, R., Koster, G., Bloemen, R., Gresnigt, R., and van Buul-Offers, S.C. (1999). The effect of dexamethasone on body and organ growth of normal and IGF-II-transgenic mice. *J Endocrinol* 163, 543-552.
- Root, D.D., and Wang, K. (1994). Calmodulin-sensitive interaction of human nebulin fragments with actin and myosin. *Biochemistry* 33, 12581-12591.
- Rosner, W., Hryb, D.J., Khan, M.S., Nakhla, A.M., and Romas, N.A. (1999a). Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via G-proteins and cyclic adenosine monophosphate. *Steroids* 64, 100-106.
- Rosner, W., Hryb, D.J., Khan, M.S., Nakhla, A.M., and Romas, N.A. (1999b). Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 481-485.
- Rossi, A.E., and Dirksen, R.T. (2006). Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve* 33, 715-731.
- Rowe, R.W. (1968). Effect of castration on muscle growth in the mouse. *J Exp Zool* 169, 59-64.
- Roy, R.R., and Edgerton, V.R. (1995). Response of mouse plantaris muscle to functional overload: comparison with rat and cat. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 111, 569-575.
- Ruan, H., Shantz, L.M., Pegg, A.E., and Morris, D.R. (1996). The upstream open reading frame of the mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase is a polyamine-responsive translational control element. *J Biol Chem* 271, 29576-29582.

- Ruan, H., Tang, X.D., Chen, M.L., Joiner, M.L., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S.H., Iverson, L., Wu, C.F., *et al.* (2002). High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2748-2753.
- Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O., and Klionsky, D.J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 6, 304-312.
- Rusten, T.E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L.M., Nezis, I.P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J.P., Brech, A., Bilder, D., *et al.* (2007). ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* 17, 1817-1825.
- Ryder, J.W., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., and Zierath, J.R. (2003). Skeletal muscle reprogramming by activation of calcineurin improves insulin action on metabolic pathways. *J Biol Chem* 278, 44298-44304.
- Ryder, J.W., Yang, J., Galuska, D., Rincon, J., Bjornholm, M., Krook, A., Lund, S., Pedersen, O., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J.R., *et al.* (2000). Use of a novel impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia-stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49, 647-654.
- Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Seale, P., Asakura, A., and Rudnicki, M.A. (1999). Reduced differentiation potential of primary MyoD-/- myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol* 144, 631-643.
- Sacheck, J.M., Ohtsuka, A., McLary, S.C., and Goldberg, A.L. (2004). IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E591-601.
- Sachidanandan, C., Sambasivan, R., and Dhawan, J. (2002). Tristetraprolin and LPS-inducible CXC chemokine are rapidly induced in presumptive satellite cells in response to skeletal muscle injury. *J Cell Sci* 115, 2701-2712.
- Saclier, M., Cuvellier, S., Magnan, M., Mounier, R., and Chazaud, B. (2013). Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS J* 280, 4118-4130.
- Salmikangas, P., van der Ven, P.F., Lalowski, M., Taivainen, A., Zhao, F., Suila, H., Schroder, R., Lappalainen, P., Furst, D.O., and Carpen, O. (2003). Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Hum Mol Genet* 12, 189-203.
- Salminen, A., Hyttinen, J.M., Kauppinen, A., and Kaarniranta, K. (2012). Context-Dependent Regulation of Autophagy by IKK-NF-kappaB Signaling: Impact on the Aging Process. *Int J Cell Biol* 2012, 849541.
- Sambasivan, R., and Tajbakhsh, S. (2007). Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin Cell Dev Biol* 18, 870-882.
- Sanchez, A.M., Csibi, A., Raibon, A., Cornille, K., Gay, S., Bernardi, H., and Candau, R. (2012). AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J Cell Biochem* 113, 695-710.
- Sandri, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)* 23, 160-170.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117, 399-412.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17, 596-603.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22, 159-168.
- Sarkar, S., Krishna, G., Imarisio, S., Saiki, S., O'Kane, C.J., and Rubinsztein, D.C. (2008). A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet* 17, 170-178.

- Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3, 390-407.
- Sartorius, G., Spasevska, S., Idan, A., Turner, L., Forbes, E., Zamojska, A., Allan, C.A., Ly, L.P., Conway, A.J., McLachlan, R.I., *et al.* (2012). Serum testosterone, dihydrotestosterone and estradiol concentrations in older men self-reporting very good health: the healthy man study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 77, 755-763.
- Sato-Kusubata, K., Yajima, Y., and Kawashima, S. (2000). Persistent activation of Gsalpha through limited proteolysis by calpain. *Biochem J* 347 Pt 3, 733-740.
- Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H., and Kato, S. (2003). Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 167-171.
- Satriano, J., Ishizuka, S., Archer, D.C., Blantz, R.C., and Kelly, C.J. (1999). Regulation of intracellular polyamine biosynthesis and transport by NO and cytokines TNF-alpha and IFN-gamma. *Am J Physiol* 276, C892-899.
- Savage, D.B., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2005). Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension* 45, 828-833.
- Scalabrino, G., and Ferioli, M.E. (1984). Polyamines in mammalian ageing: an oncological problem, too? A review. *Mech Ageing Dev* 26, 149-164.
- Schakman, O., Gilson, H., and Thissen, J.P. (2008). Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 197, 1-10.
- Schakman, O., Kalista, S., Barbe, C., Loumaye, A., and Thissen, J.P. (2013). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2163-2172.
- Schiaffino, S., Sandri, M., and Murgia, M. (2007). Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)* 22, 269-278.
- Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103, 253-262.
- Schock, H.W., Herbert, Z., Sigusch, H., Figulla, H.R., Jirikowski, G.F., and Lotze, U. (2006). Expression of androgen-binding protein (ABP) in human cardiac myocytes. *Horm Metab Res* 38, 225-229.
- Schoenauer, R., Bertoncini, P., Machaidze, G., Aebi, U., Perriard, J.C., Hegner, M., and Agarkova, I. (2005). Myomesin is a molecular spring with adaptable elasticity. *J Mol Biol* 349, 367-379.
- Schuler, M., Ali, F., Chambon, C., Duteil, D., Bornert, J.M., Tardivel, A., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., and Metzger, D. (2006). PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab* 4, 407-414.
- Schuler, M., Ali, F., Metzger, E., Chambon, P., and Metzger, D. (2005). Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. *Genesis* 41, 165-170.
- Schultz, E. (1996). Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 175, 84-94.
- Scott, R.C., Schuldiner, O., and Neufeld, T.P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Dev Cell* 7, 167-178.
- Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2000). A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218, 115-124.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777-786.
- Sebbagh, M., Santoni, M.J., Hall, B., Borg, J.P., and Schwartz, M.A. (2009). Regulation of LKB1/STRAD localization and function by E-cadherin. *Curr Biol* 19, 37-42.
- Seiler, N. (2004). Catabolism of polyamines. *Amino Acids* 26, 217-233.
- Seiler, N., Delcros, J.G., and Moulinoux, J.P. (1996). Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 843-861.

- Serra, C., Bhasin, S., Tangherlini, F., Barton, E.R., Ganno, M., Zhang, A., Shansky, J., Vandenburg, H.H., Travison, T.G., Jasuja, R., *et al.* (2011). The role of GH and IGF-I in mediating anabolic effects of testosterone on androgen-responsive muscle. *Endocrinology* 152, 193-206.
- Serra, C., Tangherlini, F., Rudy, S., Lee, D., Toraldo, G., Sandor, N.L., Zhang, A., Jasuja, R., and Bhasin, S. (2012). Testosterone Improves the Regeneration of Old and Young Mouse Skeletal Muscle. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 68, 17-26.
- Seyrek, M., Yildiz, O., Ulusoy, H.B., and Yildirim, V. (2007). Testosterone relaxes isolated human radial artery by potassium channel opening action. *J Pharmacol Sci* 103, 309-316.
- Shaffer, P.L., Jivan, A., Dollins, D.E., Claessens, F., and Gewirth, D.T. (2004). Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4758-4763.
- Shaneyfelt, T., Husein, R., Bubley, G., and Mantzoros, C.S. (2000). Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 18, 847-853.
- Sheehan, S.M., Tatsumi, R., Temm-Grove, C.J., and Allen, R.E. (2000). HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve* 23, 239-245.
- Shi, X., and Garry, D.J. (2006). Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev* 20, 1692-1708.
- Shringarpure, R., and Davies, K.J. (2002). Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32, 1084-1089.
- Shulman, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106, 171-176.
- Sih, R., Morley, J.E., Kaiser, F.E., Perry, H.M., 3rd, Patrick, P., and Ross, C. (1997). Testosterone replacement in older hypogonadal men: a 12-month randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1661-1667.
- Singh, P. (2013). Andropause: Current concepts. *Indian J Endocrinol Metab* 17, S621-629.
- Singh, R., Artaza, J.N., Taylor, W.E., Braga, M., Yuan, X., Gonzalez-Cadavid, N.F., and Bhasin, S. (2006). Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology* 147, 141-154.
- Sinha-Hikim, I., Artaza, J., Woodhouse, L., Gonzalez-Cadavid, N., Singh, A.B., Lee, M.I., Storer, T.W., Casaburi, R., Shen, R., and Bhasin, S. (2002). Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E154-164.
- Sinha-Hikim, I., Cornford, M., Gaytan, H., Lee, M.L., and Bhasin, S. (2006). Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community-dwelling older men. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 3024-3033.
- Sinha-Hikim, I., Taylor, W.E., Gonzalez-Cadavid, N.F., Zheng, W., and Bhasin, S. (2004). Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5245-5255.
- Sircar, K., Gottlieb, B., Alvarado, C., Aprikian, A., Beitel, L.K., Alam-Fahmy, M., Begin, L., and Trifiro, M. (2007). Androgen receptor CAG repeat length contraction in diseased and non-diseased prostatic tissues. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 10, 360-368.
- Sjoqvist, F., Garle, M., and Rane, A. (2008). Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *Lancet* 371, 1872-1882.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L., and DiMauro, S. (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2, 342-352.
- Smith, C.K., 2nd, Janney, M.J., and Allen, R.E. (1994). Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol* 159, 379-385.
- Smythe, G.M., Davies, M.J., Paulin, D., and Grounds, M.D. (2001). Absence of desmin slightly prolongs myoblast proliferation and delays fusion in vivo in regenerating grafts of skeletal muscle. *Cell Tissue Res* 304, 287-294.

- Snow, M.H. (1977). Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat Rec* 188, 201-217.
- Snyder, P.J., Peachey, H., Hannoush, P., Berlin, J.A., Loh, L., Lenrow, D.A., Holmes, J.H., Dlewati, A., Santanna, J., Rosen, C.J., *et al.* (1999). Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2647-2653.
- Soda, K., Dobashi, Y., Kano, Y., Tsujinaka, S., and Konishi, F. (2009). Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp Gerontol* 44, 727-732.
- Soderlund, K., and Hultman, E. (1991). ATP and phosphocreatine changes in single human muscle fibers after intense electrical stimulation. *Am J Physiol* 261, E737-741.
- Song, X.M., Ryder, J.W., Kawano, Y., Chibalin, A.V., Krook, A., and Zierath, J.R. (1999). Muscle fiber type specificity in insulin signal transduction. *Am J Physiol* 277, R1690-1696.
- Sorichter, S., Mair, J., Koller, A., Gebert, W., Rama, D., Calzolari, C., Artner-Dworzak, E., and Puschendorf, B. (1997). Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol* (1985) 83, 1076-1082.
- Sorichter, S., Mair, J., Koller, A., Muller, E., Kremser, C., Judmaier, W., Haid, C., Calzolari, C., and Puschendorf, B. (2001). Creatine kinase, myosin heavy chains and magnetic resonance imaging after eccentric exercise. *J Sports Sci* 19, 687-691.
- Sorichter, S., Puschendorf, B., and Mair, J. (1999). Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exerc Immunol Rev* 5, 5-21.
- Sorrentino, V. (2004). Molecular determinants of the structural and functional organization of the sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1742, 113-118.
- Sou, Y.S., Waguri, S., Iwata, J., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., *et al.* (2008). The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell* 19, 4762-4775.
- Stadtman, E.R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N.B., and Levine, R.L. (2005). Methionine oxidation and aging. *Biochim Biophys Acta* 1703, 135-140.
- Stephenson, D.G. (2006). Tubular system excitability: an essential component of excitation-contraction coupling in fast-twitch fibres of vertebrate skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 27, 259-274.
- Stocco, D.M., and Clark, B.J. (1997). The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids* 62, 29-36.
- Stout, J.R., Cramer, J.T., Zoeller, R.F., Torok, D., Costa, P., Hoffman, J.R., Harris, R.C., and O'Kroy, J. (2007). Effects of beta-alanine supplementation on the onset of neuromuscular fatigue and ventilatory threshold in women. *Amino Acids* 32, 381-386.
- Stromme, S.B., Meen, H.D., and Aakvaag, A. (1974). Effects of an androgenic-anabolic steroid on strength development and plasma testosterone levels in normal males. *Med Sci Sports* 6, 203-208.
- Struys, E.A., Heijboer, A.C., van Moorselaar, J., Jakobs, C., and Blankenstein, M.A. (2010). Serum sarcosine is not a marker for prostate cancer. *Ann Clin Biochem* 47, 282.
- Stuerenburg, H.J., and Kunze, K. (1999). Concentrations of free carnosine (a putative membrane-protective antioxidant) in human muscle biopsies and rat muscles. *Arch Gerontol Geriatr* 29, 107-113.
- Suelves, M., Lluís, F., Ruiz, V., Nebreda, A.R., and Muñoz-Canoves, P. (2004). Phosphorylation of MRF4 transactivation domain by p38 mediates repression of specific myogenic genes. *EMBO J* 23, 365-375.
- Sun, L., Ma, K., Wang, H., Xiao, F., Gao, Y., Zhang, W., Wang, K., Gao, X., Ip, N., and Wu, Z. (2007). JAK1-STAT1-STAT3, a key pathway promoting proliferation and preventing premature differentiation of myoblasts. *J Cell Biol* 179, 129-138.
- Sun, Q., Fan, W., Chen, K., Ding, X., Chen, S., and Zhong, Q. (2008). Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19211-19216.

- Suzuki, Y., Nakao, T., Maemura, H., Sato, M., Kamahara, K., Morimatsu, F., and Takamatsu, K. (2006). Carnosine and anserine ingestion enhances contribution of nonbicarbonate buffering. *Med Sci Sports Exerc* 38, 334-338.
- Tajbakhsh, S., Bober, E., Babinet, C., Pournin, S., Arnold, H., and Buckingham, M. (1996). Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Dev Dyn* 206, 291-300.
- Tajbakhsh, S., and Buckingham, M.E. (1994). Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 747-751.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H.D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J.U., Cheng, J.Q., Mule, J.J., *et al.* (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9, 1142-1151.
- Tamaki, T., Uchiyama, Y., Okada, Y., Tono, K., Nitta, M., Hoshi, A., and Akatsuka, A. (2009). Anabolic-androgenic steroid does not enhance compensatory muscle hypertrophy but significantly diminish muscle damages in the rat surgical ablation model. *Histochem Cell Biol* 132, 71-81.
- Tan, M.E., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., and Yong, E.L. (2014). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*.
- Tanida, I., Sou, Y.S., Ezaki, J., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E. (2004a). HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem* 279, 36268-36276.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004b). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2503-2518.
- Tanner, C.J., Barakat, H.A., Dohm, G.L., Pories, W.J., MacDonald, K.G., Cunningham, P.R., Swanson, M.S., and Houmard, J.A. (2002). Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E1191-1196.
- Tanner, T., Claessens, F., and Haelens, A. (2004). The hinge region of the androgen receptor plays a role in proteasome-mediated transcriptional activation. *Ann N Y Acad Sci* 1030, 587-592.
- Taplin, M.E., Bubley, G.J., Ko, Y.J., Small, E.J., Upton, M., Rajeshkumar, B., and Balk, S.P. (1999). Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res* 59, 2511-2515.
- Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D.H., Jr., Kull, F.C., Jr., and Gonzalez-Cadavid, N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E221-228.
- Tedesco, F.S., Dellavalle, A., Diaz-Manera, J., Messina, G., and Cossu, G. (2010). Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 120, 11-19.
- Tenover, J.L. (2000). Experience with testosterone replacement in the elderly. *Mayo Clin Proc* 75 Suppl, S77-81; discussion S82.
- Tenover, J.S. (1992). Effects of testosterone supplementation in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 1092-1098.
- Termin, A., Staron, R.S., and Pette, D. (1989). Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 92, 453-457.
- Thomas, P., Dong, J., Berg, A.H., and Pang, Y. (2014). Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: II. Role of human ZIP9 in testosterone-induced prostate and breast cancer cell apoptosis. *Endocrinology*, en20141201.
- Thomas, T., and Thomas, T.J. (2003). Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med* 7, 113-126.
- Thoreen, C.C., Kang, S.A., Chang, J.W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L.J., Sim, T., Sabatini, D.M., and Gray, N.S. (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 284, 8023-8032.
- Thornton, J.W., and DeSalle, R. (2000). Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1, 41-73.

- Tilley, W.D., Buchanan, G., Hickey, T.E., and Bentel, J.M. (1996). Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin Cancer Res* 2, 277-285.
- Tingus, S.J., and Carlsen, R.C. (1993). Effect of continuous infusion of an anabolic steroid on murine skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 25, 485-494.
- Tobin, C., and Joubert, Y. (1991). Testosterone-induced development of the rat levator ani muscle. *Dev Biol* 146, 131-138.
- Tome, M.E., and Gerner, E.W. (1996). Hypusine modification in eukaryotic initiation factor 5A in rodent cells selected for resistance to growth inhibition by ornithine decarboxylase-inhibiting drugs. *Biochem J* 320 (Pt 1), 55-60.
- Torrente, Y., Tremblay, J.P., Pisati, F., Belicchi, M., Rossi, B., Sironi, M., Fortunato, F., El Fahime, M., D'Angelo, M.G., Caron, N.J., *et al.* (2001). Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol* 152, 335-348.
- Tremblay, F., Dubois, M.J., and Marette, A. (2003). Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle. *Front Biosci* 8, d1072-1084.
- True, O., and Matthias, P. (2012). Interplay between histone deacetylases and autophagy--from cancer therapy to neurodegeneration. *Immunol Cell Biol* 90, 78-84.
- Tsang, S., Wong, S.S., Wu, S., Kravtsov, G.M., and Wong, T.M. (2009). Testosterone-augmented contractile responses to alpha1- and beta1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C766-782.
- Uemura, T., Yerushalmi, H.F., Tsapraillis, G., Stringer, D.E., Pastorian, K.E., Hawel, L., 3rd, Byus, C.V., and Gerner, E.W. (2008). Identification and characterization of a diamine exporter in colon epithelial cells. *J Biol Chem* 283, 26428-26435.
- Vainshtein, A., Grumati, P., Sandri, M., and Bonaldo, P. (2014). Skeletal muscle, autophagy, and physical activity: the menage a trois of metabolic regulation in health and disease. *J Mol Med (Berl)* 92, 127-137.
- Vaittinen, S., Lukka, R., Sahlgren, C., Hurme, T., Rantanen, J., Lendahl, U., Eriksson, J.E., and Kalimo, H. (2001). The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 588-597.
- Van Balkom, R.H., Dekhuijzen, P.N., Folgering, H.T., Veerkamp, J.H., Van Moerkerk, H.T., Franssen, J.A., and Van Herwaarden, C.L. (1998). Anabolic steroids in part reverse glucocorticoid-induced alterations in rat diaphragm. *J Appl Physiol* (1985) 84, 1492-1499.
- Van Thienen, R., Van Proeyen, K., Vanden Eynde, B., Puype, J., Lefere, T., and Hespel, P. (2009). Beta-alanine improves sprint performance in endurance cycling. *Med Sci Sports Exerc* 41, 898-903.
- Van Tilborgh, N., Spans, L., Helsen, C., Clinckemalie, L., Dubois, V., Lerut, E., Boonen, S., Vanderschueren, D., and Claessens, F. (2013). The transcription intermediary factor 1beta coactivates the androgen receptor. *J Endocrinol Invest* 36, 699-706.
- Velders, M., Schleipen, B., Fritzemeier, K.H., Zierau, O., and Diel, P. (2012). Selective estrogen receptor-beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FASEB J* 26, 1909-1920.
- Venable, J.H. (1966). Morphology of the cells of normal, testosterone-deprived and testosterone-stimulated levator ani muscles. *Am J Anat* 119, 271-301.
- Verges, B. (2005). New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 31, 429-439.
- Verrijdt, G., Haelens, A., and Claessens, F. (2003). Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Mol Genet Metab* 78, 175-185.
- Vicencio, J.M., Estrada, M., Galvis, D., Bravo, R., Contreras, A.E., Rotter, D., Szabadkai, G., Hill, J.A., Rothermel, B.A., Jaimovich, E., *et al.* (2011). Anabolic androgenic steroids and intracellular calcium signaling: a mini review on mechanisms and physiological implications. *Mini Rev Med Chem* 11, 390-398.

- Vlahopoulos, S., Zimmer, W.E., Jenster, G., Belaguli, N.S., Balk, S.P., Brinkmann, A.O., Lanz, R.B., Zoumpourlis, V.C., and Schwartz, R.J. (2005). Recruitment of the androgen receptor via serum response factor facilitates expression of a myogenic gene. *J Biol Chem* 280, 7786-7792.
- Volonte, D., Liu, Y., and Galbiati, F. (2005). The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair. *FASEB J* 19, 237-239.
- Vyskocil, F., and Gutmann, E. (1977). Anabolic effect of testosterone on the levator ani muscle of the rat. *Pflugers Arch* 371, 3-8.
- Wada, M.R., Inagawa-Ogashiwa, M., Shimizu, S., Yasumoto, S., and Hashimoto, N. (2002). Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* 129, 2987-2995.
- Waddell, D.S., Baehr, L.M., van den Brandt, J., Johnsen, S.A., Reichardt, H.M., Furlow, J.D., and Bodine, S.C. (2008). The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E785-797.
- Wainman, P., Shipounoff, G.C. (1941). The effects of castration and testosterone propionate on the striated perineal musculature in the rat. *Endocrinology*, 4.
- Wallace, H.M. (2003). Polyamines and their role in human disease--an introduction. *Biochem Soc Trans* 31, 354-355.
- Wallace, H.M., and Fraser, A.V. (2003). Polyamine analogues as anticancer drugs. *Biochem Soc Trans* 31, 393-396.
- Wallace, H.M., Fraser, A.V., and Hughes, A. (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 376, 1-14.
- Wang, C., Eyre, D.R., Clark, R., Kleinberg, D., Newman, C., Iranmanesh, A., Veldhuis, J., Dudley, R.E., Berman, N., Davidson, T., *et al.* (1996). Sublingual testosterone replacement improves muscle mass and strength, decreases bone resorption, and increases bone formation markers in hypogonadal men--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3654-3662.
- Wang, J., Whiteman, M.W., Lian, H., Wang, G., Singh, A., Huang, D., and Denmark, T. (2009a). A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem* 284, 21412-21424.
- Wang, Q., Jin, C.L., Lin, C.K., Cui, W.T., Ma, H.W., and Wu, Y.Y. (2009b). [Prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy by multiplex ligation-dependent probe amplification]. *Yi Chuan* 31, 600-604.
- Ward, P. (1973). The effect of an anabolic steroid on strength and lean body mass. *Medicine and science in sports*, 6.
- Warren, G.L., Hulderman, T., Jensen, N., McKinstry, M., Mishra, M., Luster, M.I., and Simeonova, P.P. (2002). Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J* 16, 1630-1632.
- Wassink, A.M., Olijhoek, J.K., and Visseren, F.L. (2007). The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Invest* 37, 8-17.
- Watson, S., Fuqua, J.S., and Lee, P.A. (2014). Treatment of hypogonadism in males. *Pediatr Endocrinol Rev* 11 Suppl 2, 230-239.
- Webb, J.L., Ravikumar, B., and Rubinsztein, D.C. (2004). Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2541-2550.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008a). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 30, 678-688.
- Wei, Y., Sinha, S., and Levine, B. (2008b). Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* 4, 949-951.
- Whalen, R.G., Harris, J.B., Butler-Browne, G.S., and Sesodia, S. (1990). Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol* 141, 24-40.
- White, J.P., Gao, S., Puppa, M.J., Sato, S., Welle, S.L., and Carson, J.A. (2013). Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* 365, 174-186.

- Wiesner, R.J., Ruegg, J.C., and Morano, I. (1992). Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 183, 553-559.
- Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., *et al.* (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol* 4, 295-305.
- Williams, K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 325 (Pt 2), 289-297.
- Wilson, J.D. (1988). Androgen abuse by athletes. *Endocr Rev* 9, 181-199.
- Win-May, M., Mya-Tu, M. (1975). The effect of anabolic steroids on physical fitness. *J Sports Med Phys Fitness* 14.
- Wu, Y.T., Tan, H.L., Huang, Q., Ong, C.N., and Shen, H.M. (2009). Activation of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway promotes necrotic cell death via suppression of autophagy. *Autophagy* 5, 824-834.
- Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* 3, 206.
- Wyce, A., Bai, Y., Nagpal, S., and Thompson, C.C. (2010). Research Resource: The androgen receptor modulates expression of genes with critical roles in muscle development and function. *Mol Endocrinol* 24, 1665-1674.
- Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9, 1102-1109.
- Yablonka-Reuveni, Z., and Rivera, A.J. (1994). Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* 164, 588-603.
- Yablonka-Reuveni, Z., Rudnicki, M.A., Rivera, A.J., Primig, M., Anderson, J.E., and Natanson, P. (1999). The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Dev Biol* 210, 440-455.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 23, 33-42.
- Yang, Q., and Guan, K.L. (2007). Expanding mTOR signaling. *Cell Res* 17, 666-681.
- Yang, S.Y., and Goldspink, G. (2002). Different roles of the IGF-I Ec peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS Lett* 522, 156-160.
- Yarrow, J.F., McCoy, S.C., and Borst, S.E. (2012). Intracrine and myotrophic roles of 5alpha-reductase and androgens: a review. *Med Sci Sports Exerc* 44, 818-826.
- Yeh, S., Tsai, M.Y., Xu, Q., Mu, X.M., Lardy, H., Huang, K.E., Lin, H., Yeh, S.D., Altuwaijri, S., Zhou, X., *et al.* (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13498-13503.
- Yen, P.M., Liu, Y., Palvimo, J.J., Trifiro, M., Whang, J., Pinsky, L., Janne, O.A., and Chin, W.W. (1997). Mutant and wild-type androgen receptors exhibit cross-talk on androgen-, glucocorticoid-, and progesterone-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 11, 162-171.
- Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., and Mayo, M.W. (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23, 2369-2380.
- Yialamas, M.A., Dwyer, A.A., Hanley, E., Lee, H., Pitteloud, N., and Hayes, F.J. (2007). Acute sex steroid withdrawal reduces insulin sensitivity in healthy men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4254-4259.
- Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5, 1180-1185.

- Yogev, O., Goldberg, R., Anzi, S., and Shaulian, E. (2010). Jun proteins are starvation-regulated inhibitors of autophagy. *Cancer Res* 70, 2318-2327.
- Yoshida, M., Kashiwagi, K., Kawai, G., Ishihama, A., and Igarashi, K. (2001). Polyamine enhancement of the synthesis of adenylate cyclase at the translational level and the consequential stimulation of the synthesis of the RNA polymerase sigma 28 subunit. *J Biol Chem* 276, 16289-16295.
- Yoshida, N., Yoshida, S., Koishi, K., Masuda, K., and Nabeshima, Y. (1998). Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci* 111 (Pt 6), 769-779.
- Yoshioka, M., Boivin, A., Ye, P., Labrie, F., and St-Amand, J. (2006). Effects of dihydrotestosterone on skeletal muscle transcriptome in mice measured by serial analysis of gene expression. *J Mol Endocrinol* 36, 247-259.
- Young, A.R., Chan, E.Y., Hu, X.W., Kochl, R., Crawshaw, S.G., High, S., Hailey, D.W., Lippincott-Schwartz, J., and Tooze, S.A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* 119, 3888-3900.
- Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J.L., and Inesi, G. (1993). H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys J* 64, 1232-1242.
- Yuan, Q., Ray, R.M., Viar, M.J., and Johnson, L.R. (2001). Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G130-138.
- Zammit, P.S., Golding, J.P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T.A., and Beauchamp, J.R. (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 166, 347-357.
- Zammit, P.S., Heslop, L., Hudon, V., Rosenblatt, J.D., Tajbakhsh, S., Buckingham, M.E., Beauchamp, J.R., and Partridge, T.A. (2002). Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* 281, 39-49.
- Zammit, P.S., Relaix, F., Nagata, Y., Ruiz, A.P., Collins, C.A., Partridge, T.A., and Beauchamp, J.R. (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 119, 1824-1832.
- Zatz, M., Rapaport, D., Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Bortolini, E.R., Pavanetto Rde, C., and Peres, C.A. (1991). Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 102, 190-196.
- Zeng, R., Chen, Y., Zhao, S., and Cui, G.H. (2012). Autophagy counteracts apoptosis in human multiple myeloma cells exposed to oridonin in vitro via regulating intracellular ROS and SIRT1. *Acta Pharmacol Sin* 33, 91-100.
- Zeng, Z., Sarbassov dos, D., Samudio, I.J., Yee, K.W., Munsell, M.F., Ellen Jackson, C., Giles, F.J., Sabatini, D.M., Andreeff, M., and Konopleva, M. (2007). Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 109, 3509-3512.
- Zeschnigk, M., Kozian, D., Kuch, C., Schmoll, M., and Starzinski-Powitz, A. (1995). Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 9), 2973-2981.
- Zhang, J.M., Tonelli, L., Regenold, W.T., and McCarthy, M.M. (2010). Effects of neonatal flutamide treatment on hippocampal neurogenesis and synaptogenesis correlate with depression-like behaviors in preadolescent male rats. *Neuroscience* 169, 544-554.
- Zhao, J., Bauman, W.A., Huang, R., Caplan, A.J., and Cardozo, C. (2004). Oxandrolone blocks glucocorticoid signaling in an androgen receptor-dependent manner. *Steroids* 69, 357-366.
- Zhao, P., Iezzi, S., Carver, E., Dressman, D., Gridley, T., Sartorelli, V., and Hoffman, E.P. (2002). Slug is a novel downstream target of MyoD. Temporal profiling in muscle regeneration. *J Biol Chem* 277, 30091-30101.
- Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 11, 468-476.
- Zhu, X., Topouzis, S., Liang, L.F., and Stotish, R.L. (2004). Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* 26, 262-272.

Zilliacus, J., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A., and Wright, A.P. (1994). Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4175-4179.

Zylinska, L., Gromadzinska, E., and Lachowicz, L. (1999). Short-time effects of neuroactive steroids on rat cortical Ca²⁺-ATPase activity. *Biochim Biophys Acta* 1437, 257-264.

RESUME

Les muscles permettent de générer force et mouvements et ont des fonctions métaboliques importantes. Mon travail a consisté à caractériser le rôle et les mécanismes d'actions des androgènes dans le muscle strié.

Nous avons montré que l'ablation du récepteur des androgènes dans les myofibres n'affecte pas la masse musculaire car à la fois les voies anaboliques (IGF1) et cataboliques (myostatine) sont dérégulées. Cependant, l'absence du récepteur dans les myofibres diminue l'hypertrophie musculaire induite par une surcharge mécanique et limite l'atrophie induite par les glucocorticoïdes. Son ablation augmente également l'autophagie, entraînant une déstructuration des sarcomères, conduisant à une diminution de la force musculaire. De plus, sa délétion diminue la vitesse d'absorption du glucose lors d'une surcharge glucidique. Le récepteur des androgènes dans les myofibres régule donc la masse et la force musculaire, ainsi que l'import du glucose.

Androgènes, récepteur des androgènes, muscle squelettique, myofibres, cellules satellites, anabolisme, catabolisme, force, autophagie, polyamines, glucose.

ABSTRACT

Muscles generate strength and movement, and have important metabolic functions. The aim of my work was to characterize the role and mechanisms of action of androgen receptor in skeletal muscle.

We show that ablation of the androgen receptor in skeletal muscle myofibers does not affect muscle mass as both anabolic (IGF1) and catabolic pathways (myostatin) are deregulated. However, the absence of this receptor in myofibers decreases muscle hypertrophy induced by mechanical overload and limits glucocorticoids-induced muscle atrophy. Its ablation also increases autophagy, leading to sarcomeres deconstruction, resulting in decreased muscle strength. Moreover, its deletion reduced the rate of glucose absorption during a glucidic overload. Thus, myofibres androgen receptor regulates muscle mass and strength, as well as glucose import.

Androgen, androgen receptor, skeletal muscle, myofibers, satellite cells, anabolism, catabolism, strength, autophagy, polyamines, glucose.