



HAL
open science

Effets du resvératrol et de formulations de micro-nutriments alimentaires sur les fonctions du muscle squelettique chez la souris et sur les cellules musculaires en culture

Jacques Kaminski

► **To cite this version:**

Jacques Kaminski. Effets du resvératrol et de formulations de micro-nutriments alimentaires sur les fonctions du muscle squelettique chez la souris et sur les cellules musculaires en culture. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS092 . tel-01247016

HAL Id: tel-01247016

<https://theses.hal.science/tel-01247016>

Submitted on 4 Jan 2016

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

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



Université de Bourgogne - Dijon

Ecole doctorale E2S

Thèse

Présentée par

Jacques Kaminski

en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bourgogne - Dijon

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Effets du resvératrol et de formulations de micro-nutriments alimentaires sur les fonctions du muscle squelettique chez la souris et sur les cellules musculaires en culture.

Soutenue le 20 décembre 2012

Membres du jury :

| | |
|---|---------------------------|
| Dr Jean Bastin, DR INSERM UMR-S 747, Université René Descartes, Paris | Rapporteur |
| Dr Joseph Vamecq, CR INSERM, CHRU, Université de Lille I | Rapporteur |
| Pr Athanase Visvikis, Université de Lorraine, Nancy | Examineur |
| Dr Michel Prost, Sté Lara-Spiral, Couternon, | Examineur |
| Pr Norbert Latruffe, Université de Bourgogne, Dijon | Directeur de thèse |

Thèse réalisée au laboratoire équipe 9 INSERM U866 puis au :



Avec les partenaires suivants :



NB : Compte tenu du caractère novateur et non publié de certains résultats (parties 2 et 3), cette thèse est dans l'état actuel confidentielle et la soutenance sera faite à huit clos.

Sommaire

| | |
|--|-----|
| Sommaire | p3 |
| Abréviations | p8 |
| Liste des figures | p11 |
| Liste des tableaux | p13 |
| Remerciements | p15 |
| Contexte et objectifs du travail | p17 |
| Rappels Bibliographiques | p20 |
| I. Le muscle squelettique : caractéristiques, fonctions métaboliques et pathologies associées | p22 |
| I.1 <u>Caractéristiques du muscle squelettique</u> | p23 |
| I.1.1 <u>Structure du muscle squelettique</u> | p24 |
| I.1.2 <u>La cellule musculaire (fibre musculaire)</u> | p24 |
| I.1.3 <u>Les compartiments du muscle squelettique</u> | p24 |
| I.1.4 <u>Les fibres musculaires</u> | p25 |
| I.1.4.1 <u>Les fibres de type I dites lentes, oxydatives ou rouges</u> | p26 |
| I.1.4.2 <u>Les fibres de type IIa dites intermédiaires</u> | p26 |
| I.1.4.3 <u>Les fibres de type IIb dites rapides, glycolytiques, blanches</u> | p26 |
| I.1.5 <u>La myogenèse</u> | p26 |
| I.1.5.1 <u>Les facteurs de transcription de la myogenèse</u> | p27 |
| I.1.5.2 <u>Les microRNA (miR) contrôlant la myogenèse</u> | p27 |
| I.1.6 <u>Les voies de signalisation contrôlant la myogenèse</u> | p28 |
| I.1.6.1 <u>La voie de signalisation Notch</u> | p28 |
| I.1.6.2 <u>La voie de signalisation NF-κB</u> | p28 |
| I.1.6.3 <u>La voie de signalisation Wnt (wingless-type)</u> | p28 |
| I.2 <u>Fonctions métaboliques du muscle squelettique</u> | p29 |
| I.2.1 <u>L'AMPK</u> | p30 |
| I.2.2 <u>Le métabolisme lipidique</u> | p30 |
| I.2.2.1 <u>La β-oxydation mitochondriale des acides gras</u> | p31 |
| I.2.3 <u>Le métabolisme glucidique</u> | p32 |
| I.2.3.1 <u>La glycolyse</u> | p32 |
| I.2.4 <u>L'AMPK et régulation génique au niveau musculaire</u> | p33 |
| I.2.4.1 <u>PGC1α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Co-activator 1-alpha)</u> | p34 |

| | |
|---|------------|
| I.3 <u>Les pathologies liées au muscle squelettique</u> | p35 |
| I.3.1 <u>Les myopathies</u> | p35 |
| I.3.2 <u>Le diabète de type 2</u> | p36 |
| I.3.3 <u>Le vieillissement des cellules musculaires</u> | p37 |
| | |
| II. <u>Le resvératrol, ses propriétés générales et son impact sur le muscle squelettique</u> | p38 |
| II.1 <u>Histoire et découverte d'une molécule naturelle : le resvératrol</u> | p39 |
| II.1.1 <u>Sources du resvératrol</u> | p39 |
| II.1.2 <u>Biosynthèse du resvératrol</u> | p41 |
| II.1.3 <u>Les autres polyphénols du raisin et du vin</u> | p41 |
| II.2 <u>Les propriétés biologiques du resvératrol</u> | p42 |
| II.2.1 <u>Propriétés générales</u> | p43 |
| II.2.1.1 <u>Le resvératrol et ses effets anti-vieillessement : les sirtuines</u> | p43 |
| II.2.1.2 <u>Le resvératrol et ses effets antioxydants</u> | p43 |
| II.2.1.3 <u>Le resvératrol et ses effets anti-inflammatoires</u> | p44 |
| II.2.1.4 <u>Le Resvératrol et ses effets cardio-protecteurs</u> | p44 |
| II.2.1.5 <u>Le resvératrol et ses potentiels anticancéreux</u> | p45 |
| II.2.1.6 <u>Le resvératrol et ses effets neuroprotecteurs</u> | p46 |
| II.2.1.7 <u>Le Resvératrol et le muscle squelettique</u> | p46 |
| II.3 <u>Le resvératrol et la myogenèse</u> | p47 |
| | |
| III. « X », une formulation naturelle dirigée contre le stress oxydant | p48 |
| Rappels sur les espèces réactives d'oxygène et de l'azote | |
| III.1 <u>Informations sur le produit</u> | p49 |
| III.2 <u>Rappels du contexte</u> | p49 |
| III.2.1 <u>Le stress oxydant</u> | p49 |
| III.2.2 <u>Description des radicaux libres</u> | p50 |
| III.2.3 <u>L'origine des ROS</u> | p51 |
| III.2.4 <u>Le système antioxydant</u> | p51 |
| III.2.5 <u>Le système antioxydant non enzymatique</u> | p51 |
| III.2.6 <u>Le système antioxydant enzymatique</u> | p52 |
| III.2.7 <u>Autre système antioxydant</u> | p53 |
| | |
| IV. Y, une formulation naturelle à propriétés hypolipémiantes | p55 |
| IV.1 <u>Rappels du contexte</u> | p56 |
| IV.1.1 <u>Le syndrome métabolique</u> | p56 |
| IV.1.2 <u>Définition du syndrome métabolique</u> | p56 |
| IV.1.3 <u>Syndrome métabolique et obésité</u> | p57 |
| IV.1.4 <u>Le tissu adipeux</u> | p58 |

| | |
|--|------------|
| IV.2 <u>Syndrome métabolique, muscle squelettique et résistance à l'insuline</u> | p59 |
| IV.3 <u>Informations sur le produit</u> | p59 |
| Matériels et méthodes | p63 |
| I. Tissus, lignées et culture cellulaire | p64 |
| I.1 <u>Modèle <i>in vivo</i></u> | p64 |
| I.2 <u>Modèle <i>in vitro</i></u> | p65 |
| I.2.1 <u>Cellules musculaires squelettiques murines C2C12</u> | p65 |
| I.2.2 <u>Conditions de culture des cellules C2C12</u> | p65 |
| I.2.3 <u>Analyse morphométrique</u> | p66 |
| II. Traitements appliqués sur les cellules | p66 |
| II.1 <u>Traitements des cellules C2C12 avec du resvératrol</u> | p66 |
| II.2 <u>Traitements avec « X »</u> | p67 |
| II.3 <u>Traitement avec « Y »</u> | p68 |
| III. Transcription inverse et Réaction en chaîne par polymérisation (RT-qPCR) | p68 |
| III.1 <u>Extraction d'ARN totaux à partir de tissus</u> | p68 |
| III.2 <u>Extraction d'ARN totaux à partir de cellules</u> | p69 |
| III.3 <u>Dosage des ARN totaux</u> | p70 |
| III.4 <u>Transcription inverse</u> | p70 |
| III.5 <u>Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel</u> | p70 |
| III.6 <u>Préparations des échantillons</u> | p71 |
| III.7 <u>Polymérisation en chaîne quantitative</u> | p71 |
| III.8 <u>Analyse quantitative de l'expression des ARNm</u> | p72 |
| IV. Analyse des protéines par électrophorèse et immunoblotting | p77 |
| IV.1 <u>Préparation et dosage à partir d'extraits protéiques</u> | p77 |
| IV.2 <u>Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)</u> | p77 |
| IV.3 <u>Electrotransfert et immunodétection</u> | p77 |
| V. Mesure de l'activité enzymatique Superoxyde Dismutase (SOD) totale | p78 |
| VI. Etude cytotoxique | p79 |
| VI.1 <u>Test de viabilité au bleu trypan</u> | p79 |
| VI.2 <u>Test au crystal violet</u> | p79 |
| VI.3 <u>Dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH)</u> | p79 |

| | |
|---|-------------|
| VII. Cytométrie en flux | p80 |
| VII.1 <u>Marquage au IP et DIOC(6)₃</u> | p80 |
| VII.2 <u>Dosage de ROS intracellulaires avec sonde DHE (dihydroéthydine)</u> | p81 |
| | |
| VIII. Evaluation de la formulation « Y » comme possible activateur de PPARα ou PPARγ par transfection transitoire C2C12. | p81 |
| VIII.1 <u>Préparation des plasmides</u> | p82 |
| VIII.2 <u>Purification des plasmides</u> | p83 |
| VIII.3 <u>Dosage des plasmides</u> | p83 |
| VIII.4 <u>Transfection des cellules C2C12</u> | p83 |
| VIII.5 <u>Lecture de l'activité luciférase</u> | p84 |
| VIII.6 <u>Dosage de l'activité β-galactosidase (β-Gal)</u> | p84 |
| | |
| IX. Effet de « Y » sur l'activité de la glycogène synthase (GS) | p85 |
| | |
| X. Numération sanguine | p85 |
| | |
| Résultats | p87 |
| I. Effet du resvératrol sur la différenciation et le métabolisme des cellules musculaires squelettiques murines C2C12 | p88 |
| I.1 <u>Le resvératrol initie la différenciation des cellules musculaires squelettiques murines C2C12</u> | p89 |
| I.2 <u>Le resvératrol module les fonctions métaboliques dans les cellules squelettiques musculaires</u> | p100 |
| | |
| II. « X » et ses effets anti-oxydants <i>in vivo</i> dans les muscles squelettiques de souris et <i>in vitro</i> sur les cellules musculaires C2C12 | p106 |
| II.1 <u>« X » et ses effets antioxydants (étude <i>in vivo</i>)</u> | p107 |
| II.1.1 <u>Induction du stress oxydant</u> | p107 |
| II.1.2 <u>Etude de l'activité SOD totale sur les muscles gastrocnémiens</u> | p107 |
| II.1.3 <u>Etude de l'expression de gènes impliqués dans les défenses anti-radicalaires</u> | p108 |
| II.2 <u>Etude <i>in vitro</i> (cellules C2C12, stade myoblaste)</u> | p109 |
| II.2.1 <u>Etude du pouvoir de défense anti-radicalaire de « X » :</u> <u>Test KRL et mesure du MDA (malondialdehyde)</u> | p109 |
| II.2.2 <u>Effet global de « X » sur les cellules C2C12 traitées avec un générateur de ROS en co-traitement ou pré-traitement</u> | p110 |
| II.2.3 <u>Etude de l'expression de gènes impliqués dans les défenses anti-radicalaires</u> | p112 |
| II.2.4 <u>Dosage de ROS intracellulaire avec sonde DHE (dihydroéthydine)</u> | p113 |
| II.3 <u>Conclusions</u> | p115 |

| | |
|---|-------------|
| III. Effet de « Y » sur le métabolisme des cellules du muscle squelettique C2C12 | p116 |
| III.1 <u>Etude de la cytotoxicité de « Y » par cytométrie en flux, double marquage IP et DIOC(6)₃</u> | p117 |
| III.2 <u>Etude de gènes cibles de « Y »</u> | p119 |
| III.3 <u>Evaluation de « Y » comme possible activateur de PPARα ou PPARγ</u> | p119 |
| III.4 <u>Effet de « Y » sur l'activité de la glycogène synthase</u> | p121 |
| III.5 <u>Numération sanguine</u> | p122 |
| | |
| Discussion | p123 |
| | |
| Conclusions et Perspectives | p131 |
| | |
| Annexe/Publication « review » en support | p134 |
| | |
| Références Bibliographiques | p143 |
| | |
| <i>Addendum</i> | p155 |
| | |
| Resumé/Summary | |

Abréviations

A

AAPH: 2-2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride
Acads: Short chain acyl-CoA dehydrogenase
ACS: Acyl CoA synthetase
Acox: Acyl-CoA oxidase
ADP: adénosine diphosphate
ADN: acide désoxyribonucléique
AG: acide gras
AICAR: 5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide
Akt/PKB: Protein kinase B
AMP: adénosine monophosphate
Amp: ampicilline
AMPK: adénosine monophosphate-activated protein kinase
AS160: Akt substrat 160
ATB: antibiotique
ATGL: adipose triglycérine lipase
ATP: adénosine triphosphate
ARE: Antioxydant Response Element
ARN: Acide ribonucléique

B

BAT/TAB: tissu adipeux brun
BCA: Bicinchoninic Acid
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
BSA: bovine albumin serum

C

CamKK: calmodulin kinase kinase
CaMKIV: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV
CnA: Calcineurine
CoA: Co-enzyme A
COX2: Cyclooxygénase 2
Cpt1: carnitine palmitoyltransferase
CREB: cAMP responsive element binding protein
CRPG: chlorophénol Red β-D-galactopyranoside
Csrp3: cysteine and glycine-rich protein 3
CT: cycle threshold
Cu: cuivre

D

DAG: diacylglycerol
DBD: DNA binding domain
DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene 8
DHE: dihydroéthidine
DIOC(6)3: 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine Iodide
DMD: dystrophie musculaire de Duchenne
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Diméthylsulfoxyde
DNase: désoxyribonucléase
DPBS: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

E

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
ERR: Estrogen Related Receptor
EtOH: éthanol
Eya1/2: Eyes-absent homologs

F

FABP: Fatty acid binding protein
FAD: flavine adénine dinucléotide
FAT/CD36: Fatty acid translocase/
cluster of differentiation 36
FATP: Fatty acid transport protein
FGF: Fibroblast growth factor
FL: Fluorescence
Foxo1: Forkhead box O1
FSC: Forward Scatter
FT: Facteur de transcription

G

GLUT4: Glucose transporter type 4
GP: glycogène phosphorylase
GPx: glutathion peroxydase
GS: glycogène synthase
GTP: guanosine triphosphate

H

HCl: acide chlorhydrique
HDL: high density lipoprotein
HF/HS: High Fat/High Sucrose
4HNE: 4 Hydroxynonanal
HNF: Hepatocyte Nuclear factor
HRP: horseradish peroxidase
HSL: Hormone sensitive lipase
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

I

IGF1: Insulin-like growth factor
IgG: Immunoglobuline de type G
IL: Interleukine
IP: Iodure de propidium

K

KOH: Hydroxyde de potassium

L

LB: Lysogeny Broth
LDH: Lactate déshydrogénase
LDL: low density lipoprotein
LKB1: Liver kinase B1

M

MCAD: Medium chain acyl-CoA dehydrogenase
MDA: Malondialdehyde
Mdx: Muscular dystrophy X-linked
Mef: Myocyte enhancer factor
MGLL/Mgl: monoglycérine lipase
mir: MicroRNA
MMP: matrix métalloprotéinase
Mn: manganèse
MOPS: acide 3-N-morpholino-propane sulfonique
Mrf: Myogenic regulator factor
MyoD: Myogenic différenciation
Myf: myogenic factor 5
MyoG: Myogénine

N

NaCl: chlorure de sodium
NAD: nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCEP/ATP III: National Cholesterol Education Program/
NFκB: nuclear factor-kappa B Adult Treatment Panel III
NO: monoxyde d'azote
NRF/nrf 1/2: Nuclear respiratory factor

P

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis
PAL: phénylalanine ammonium lyase
Pax3/7: Paired box
PBS: Phosphate buffered saline
PGC1α: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
Gamma coactivator 1-alpha
PIF: Proteolysis inducing factor
PKC: Protein Kinase C
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptors
Prdx: Peroxiredoxin
Prdx1: Peroxiredoxin 1
PVDF: polyvinylidene fluoride
p38MAPK: p38 Mitogen-activated protein kinase

Q

qPCR: PCR quantitative

R

RC: restriction calorique
RelB: v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
REST: Relative Expression Software Tool
RL: radicaux libre
RNase: ribonucléase
RNaseIII like: ribonuclease III like
RNS: espèces réactives de l'azote
ROS: espèces réactives de l'oxygène

S

SCAP: Sterol regulatory element binding protein
Cleavage-Activating Protein
SD: standard diet
SDS: sodium dodecyl sulfate
SIRT/Sir2: Silent mating type information regulation 2 homolog
Six: Sine oculis-related homeobox
SOD: Superoxyde Dismutase
SREBP1c: Sterol Regulatory Element-Binding Protein
SRF: Serum regulator factor
SSC: Side Scatter Detector
STS: stilbène synthase
SVF: Serum de veau foetal

T

TAB/BAT: tissue adipeux brun
TBC1D1/4: TBC1 domain family member 1
TCA: Tricarboxylic acid
TCF: Transcription factor
TFAM/tfam: Transcription factor A, mitochondrial

TNFα: Tumor necrosis factor α
TG: Triglycérides
Thrx: thioredoxin
tpm : Tour par minute
T2D: Diabète de type 2

U

UCP: uncoupling protein
UV : ultraviolet

V

VEGF: Vascular endothelial growth factor
VLCAD: Very long chain Acyl-CoA
VLDL: very low density lipoprotein

W

WAT: White adipose tissue
WHO: World Health Organization
Wnt: Wingless type
WST: 2-(4-Iodophenyl)- 3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium

Liste des figures

| | |
|--|------|
| Figure 1. L'alimentation, un facteur déterminant de notre santé | p17 |
| Figure 2. Principaux types musculaires | p23 |
| Figure 3. Coupe longitudinale d'un muscle squelettique | p24 |
| Figure 4. Schéma descriptif d'un muscle squelettique | p25 |
| Figure 5. Expression des différents facteurs de transcription dans la progression de la lignée myogénique | p29 |
| Figure 6. L'AMPK au cœur du métabolisme énergétique musculaire | p31 |
| Figure 7. La régulation du métabolisme du glucose | p33 |
| Figure 8. Translocation de GLUT4 insulino-dépendante | p33 |
| Figure 9. Régulation post-traductionnelle de PGC1 α | p34 |
| Figure 10. Structure chimique du resvératrol | p39 |
| Figure 11. Ellébore Blanche | p39 |
| Figure 12. Les sources naturelles du resvératrol | p40 |
| Figure 13. La voie de biosynthèse du resvératrol | p41 |
| Figure 14. Les effets protecteurs du resvératrol | p42 |
| Figure 15a. Le resvératrol, inducteur du facteur de transcription Nrf2 | p43 |
| Figure 15b. Gènes cibles de Nrf2 | p44 |
| Figure 16. Stress oxydatif ; causes et conséquences | p50 |
| Figure 17. Le système antioxydant enzymatique | p53 |
| Figure 18. Mécanisme d'action hypothétique des UCP dans la diminution du taux de ROS dans la mitochondrie | p54 |
| Figure 19. Représentation schématique du phénotype Androïde dit « pomme » chez l'homme et du phénotype Gynoïde dit « poire » chez la femme | p58 |
| Figure 20. Comparaison du nombre de gènes exprimés (n) par traitement « Y » | p61 |
| Figure 21. Profil lipidique après 5 semaines et 12 semaines de traitement à la « Y » | p61 |
| Figure 22. Souris C57BL/6 | p64 |
| Figure 23. Gastrocnemius (patte arrière) de souris | p65 |
| Figure 24. Morphologie des cellules C2C12 non différenciées (a: Myoblastes) et différenciées (b: Myotubes) | p66 |
| Figure 25. Courbe de fusion représentant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la T°C | p72 |
| Figure 26. Courbe d'étalonnage obtenue après dilution en série des échantillons | p72 |
| Figure 27. Formule du calcul du niveau d'expression d'un gène par le logiciel REST | p73 |
| Figure 28. Principe du dosage de l'activité SOD | p79 |
| Figure 29. Histogramme de cytométrie en flux des cellules C2C12 après double marquage IP/DIOC(6) ₃ | p80 |
| Figure 30. Représentation schématique du dosage des anions superoxyde | p81 |
| Figure 31a. Le plasmide pFR LUC | p82 |
| Figure 31b. Le plasmide pcDNA 3.1 contenant les séquences de PPAR α ou PPAR γ | p82 |
| Figure 32. Schéma représentatif de la co-transfection des cellules C2C12 avec les différents plasmides | p82 |
| Figure 33. Lymphocyte au milieu d'hématies | p86 |
| Figure 34. Les activités SOD totale des différents régimes | p107 |
| Figure 35. Dosage KRL sur les muscles gastrocnémiens de souris traitées ou non avec le produit X pendant 90 jours | p109 |
| Figure 36. Dosage MDA sur les muscles gastrocnémiens de souris traitées ou non avec le produit X pendant 90 jours | p110 |
| Figure 37. Morphologie des cellules C2C12 après 24h de co-traitement avec X et AAPH | p111 |
| Figure 38. Comptage cellulaire au bleu trypan après 24h de co-traitement des cellules C2C12 | p111 |
| Figure 39. Expression de gènes impliqués dans les défenses anti-radicalaires après co-traitement avec le générateur de ROS et le produit X sur cellules C2C12 (stade myoblaste) | p112 |
| Figure 40. Intensité de fluorescence après co-traitement par activation de la sonde DHE | p113 |
| Figure 41. Intensité de fluorescence après test de « scavenging » par activation de la sonde DHE | p114 |
| Figure 42. Intensité de fluorescence après pré-traitement par activation de la sonde DHE | p114 |
| Figure 43. Histogramme de cytotoxicité des cellules C2C12 après double marquage IP/DIOC(6) ₃ en cytométrie en flux | p118 |
| Figure 44. Activité luciférase après transfection avec le plasmide PPAR α (A) ou le plasmide PPAR γ (B) | p120 |
| Figure 45. Incorporation de ¹⁴ C glucose dans la fraction glycogène de cellules C2C12 différenciées après 48H de traitement | p121 |
| Figure 43. Comptage lymphocytaire sur frottis sanguin provenant de souris sous régime HFHS, HFHS+ « Y », SD et SD+ « Y » | p122 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-------------|
| Tableau 1. Récapitulatif des caractéristiques des fibres musculaires de la souris | p26 |
| Tableau 2. Concentration en trans-resvératrol (mg/L) dans différentes boissons | p40 |
| Tableau 3. Mécanismes moléculaires induits par le resvératrol et son potentiel chimiothérapeutique | p45 |
| Tableau 4. Les espèces réactives de l'oxygène | p50 |
| Tableau 5. Quelques espèces réactives de l'azote | p51 |
| Tableau 6. Les différentes isoformes d'UCP chez les mammifères et leur localisation | p53 |
| Tableau 7. Les différents critères définissant le syndrome métabolique | p57 |
| Tableau 8. Listes des facteurs sécrétés par le tissu adipeux et leur cibles métaboliques | p58 |
| Tableau 9. Composition de la préparation de « Y » | p60 |
| Tableau 10. Les différents régimes administrés aux souris | p64 |
| Tableau 11. Séquences des amorces utilisées pour l'étude de la différenciation musculaire avec le resvératrol | p74 |
| Tableau 12. Séquences des amorces utilisées pour l'étude du stress oxydant avec « X » | p75 |
| Tableau 13. Séquences des amorces utilisées pour l'étude du métabolisme énergétique avec « Y » | p76 |
| Tableau 14. Les différents mélanges plasmidiques | p84 |
| Tableau 15. Expression de gènes impliqués dans les défenses radicalaires dans les différents régimes à 45 jours ou 90 jours de traitement | p108 |
| Tableau 16. Expression de gènes après traitement des cellules C2C12 (myoblastes) pendant 24h par différentes concentrations « Y » | p119 |

Remerciements

Ces quelques lignes ne suffiront pas à exprimer toute la gratitude et tous les moments que nous avons partagés ensemble, mais parfois un simple merci vaut bien plus que tous les discours du monde.

Je tiens donc à remercier particulièrement le Professeur *Norbert Latruffe* pour m'avoir donné la chance de réaliser ma thèse dans son laboratoire. Merci Norbert pour votre soutien et vos encouragements dans les moments difficiles. Merci pour votre disponibilité, les conseils prodigués et votre bonne humeur. Enfin, merci d'avoir partagé votre goût pour la nature, votre amour du vin et les fruits et légumes de saison. Ce fût un plaisir de vous côtoyer durant ces 4 années.

Merci aussi à *Gérard Lizard* pour tous vos conseils apportés durant ma thèse sur la cytométrie en flux et sur le stress oxydant.

Je tiens également à remercier tous les organismes et les partenaires qui ont participé à la fois au financement et au bon déroulement de mes travaux :

- Le pôle de compétitivité Vitagora
- Le Centre INSERM
- La Région de Bourgogne
- L'Université de Bourgogne
- Les laboratoires Spiral (*M.Prost*)

Je voudrais remercier aussi les différentes personnes qui ont apporté leur pierre à l'édifice :

- *Jean Demarquoy* (formation à la dissection des muscles de souris)
- *Jean-Jacques Michaille* (analyse des microRNA)
- L'équipe du Dr *Laurent Lagrost* (pour la collaboration lors de l'étude *in vivo*)
- Le Pr *Walter Wahli* (pour les plasmides)
- Le Dr *Laurence Duvillard* (pour les dosages biochimiques)

Cette thèse m'a permis de rencontrer également des personnes merveilleuses et d'une rare générosité. Tout d'abord merci à la Team « Thiolase », ma « *Valoche !!!* » merci pour ton écoute et le temps que tu m'as consacré. *Monsieur Mandard*, merci pour toutes ces discussions enflammées.

Place à la Team « Acox » (innelle), *Mouss* et *Pierre* (pierre qui roule n'amasse pas mouss 'tafa !!!), merci pour votre soutien et votre humour très contagieux.

Voyons maintenant la Team « X-ALD » avec *Stéphane*, *Doriane*, *Catherine*. Merci *Stéphane* pour tes conseils en biologie moléculaire (transfection et autres). *Catherine* et *Doriane* merci pour votre gentillesse et votre disponibilité. Il est temps maintenant de passer aux personnes qui ont égayé mes journées et amené une ambiance qu'on n'aura nul par ailleurs. Alors *Allan* dit *Doudur* (dit H.K.J) merci à toi pour toutes ces heures passées dans ton bureau à parler de sciences. Mr El Hajj, véritable compagnon de route, merci de m'avoir soutenu au cours de ce processus long et fastidieux qu'est l'écriture de la thèse. Merci aussi pour ces soirées foot et pour l'amour de la bonne « bouff » qu'on continuera à partager le plus longtemps possible. *Emeric* merci (t'as vu presque un anagramme de ton prénom) pour l'aide que tu m'as apporté à la réalisation de la publication dans *Biochem Pharmacol* et de m'avoir transmis ton enthousiasme. Je te souhaite bonne chance pour ton futur doctorat. *Thomas* (l'homme des bois) dit aussi « cosplay légume », merci d'avoir pris du temps pour m'aider et merci aussi pour ton humour ravageur (j'ai les yeux qui brûle). *Nathalie* et *Anne* deux sacrées femmes, vous allez beaucoup me manquer mais on se fera des restos chinois à volonté promis. Passons aux nanas qui sont parties du labo mais qui sont présentes dans mon cœur *Soelix*, *Sandy*, *Ségolène* (les 3 S), *Virginie* (pour son aide précieuse à la réalisation de la publication dans *Biochem Pharmacol*), *Alexia* et *Didier* (^) merci pour les fous rires et de m'avoir supporté tous les jours. *Franck* et *Fred* deux fous en libertés. Une pensée pour *Laila* et *Marie-Claude* que j'aurai voulu connaître un peu plus. Ah, j'allais oublier quelqu'un : *Kevin*. Tout d'abord tu passeras le bonjour à qui tu sais. Amoureux des meuporgs, un jour viendra où je m'occuperai de ton cas sérieusement. Enfin « the least but not the last » : *Flore*. Je voudrais juste te dire que tu as été indispensable durant ces 4 années. Ta présence, ton soutien et ton humour ont su toujours me pousser à aller de l'avant malgré tous ces moments difficiles. Merci simplement d'avoir été là et de m'avoir encouragé et ne t'inquiète pas, tout ira bien pour toi aussi.

A mes parents

A mes grands-parents

A ma famille

Contexte et objectifs du travail

Obésité, diabète de type II, syndrome métabolique, inflammation ... autant de termes étroitement liés à la nutrition et qui font l'objet de nombreuses études. Malgré l'existence de facteurs génétiques, un mode de vie sédentaire, une alimentation trop riche en graisses (**Figure 1**) associée à un manque d'activité physique sont souvent à l'origine de pathologies liées au métabolisme glucido-lipidique. En France par exemple, le diabète de type II est en constante augmentation avec plus de 3 millions de diabétiques recensés selon l'Institut de Veille Sanitaire. Le développement de ces pathologies a lieu principalement dans les pays industrialisés comme par exemple en Europe ou aux Etats Unis où le phénomène touche de plus en plus les adultes jeunes (de Ferranti *et al* 2004). Enfin, les pays en voie de développement tels que le Mexique, le Brésil ou l'Inde sont de plus en plus concernés par ces problèmes de santé publique. Des molécules pharmacologiques existent sur le marché pour lutter contre différentes pathologies (diabète, obésité) comme par exemple les statines, utilisées dans le cadre d'hypercholestérolémie. Cependant, ces médicaments peuvent présenter des effets secondaires voire même létaux comme le benfluorex plus connu sous le nom de Mediator. Ainsi, des laboratoires essaient de mettre en place des formulations naturelles à base omega 3, polyphénols connus pour leurs activités anti-athéromateuses, anti-inflammatoires, antioxydantes et anti syndrome métabolique. L'avantage de ces produits naturels est qu'ils présentent peu ou pas d'effet secondaire et pourraient donc remplacer ou améliorer les effets de certains médicaments.

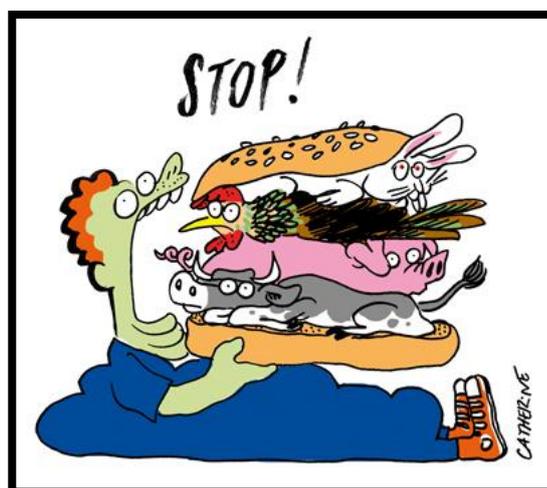


Figure 1. L'alimentation, un facteur déterminant de notre santé
D'après le dessinateur Catherine

L'objectif de notre travail de thèse a consisté donc à étudier le(s) mécanisme(s) d'action(s) d'un polyphénol du vin, le resvératrol, et de deux formulations naturelles, et sur un modèle de cellules squelettiques musculaires murines C2C12 ainsi que sur modèle de souris C57BL/6. Nous avons pu ainsi utiliser des outils biochimiques, moléculaires et physiologiques afin de comprendre le(s) mécanisme(s) d'action(s) de ces composants naturels sur ces 2 modèles.

La 1^{ère} partie de mon travail a consisté à étudier les effets pro-différenciateurs du resvératrol sur les cellules C2C12. Pendant cette étude, nous avons suivi les cellules C2C12 traitées au resvératrol lors d'une cinétique de 24h. Nous avons alors étudié la toxicité du resvératrol sur ces cellules, observé la morphologie des cellules pendant les différents temps de traitement et étudié l'expression des gènes et des protéines de la différenciation musculaire.

Dans la seconde partie de mon travail nous avons étudié les effets d'une formulation naturelle antioxydante appelée « X ». Afin de provoquer un stress oxydant sur nos cellules C2C12, nous avons utilisé un générateur de radicaux libres (générateur KRL). Une fois le modèle validé, nous avons étudié l'expression de gènes antioxydants ainsi que l'activité superoxyde dismutase totale (SOD). Nous avons également travaillé sur des muscles (gastrocnémiens) provenant de souris C57BL/6 ayant reçu 4 régimes différents pendant 45 jours et 90 jours : un régime standard (SD), un régime SD+ « X », un régime riche en énergie High Fat High Sucrose (HFHS) et un régime HFHS+ « X ». Nous avons réalisé une étude de l'expression de gènes antioxydants ainsi que le dosage de l'activité SOD totale. Enfin, sur les gastrocnémiens ont été réalisés des tests KRL permettant de mesurer le potentiel global de défenses anti-radicalaires ainsi que le taux de malonedialdéhyde (MDA) un sous-produit de la peroxydation lipidique.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons étudié les effets d'une formulation naturelle appelée « Y », réputée pour son activité hypolipémiante. Le modèle de cellules C2C12 a été encore une fois utilisé. Ces cellules ont été traitées avec « Y » afin d'observer un effet possible au niveau métabolique. Enfin nous avons essayé de déterminer les réseaux de gènes sous contrôle de ce produit et pouvant servir de bio-marqueurs.

Avant de présenter les résultats obtenus et leur discussion, nous commencerons par un rappel bibliographique.

Dans un premier temps, nous décrirons le modèle d'étude utilisé durant la thèse, qui est le muscle squelettique. Nous verrons dans cette partie, les caractéristiques du muscle squelettique, son métabolisme et les pathologies qui lui sont associées.

Ensuite, nous verrons les propriétés d'un polyphénol connu qui est le resvératrol. Nous verrons aussi l'implication de ce polyphénol au niveau du muscle squelettique.

Puis, nous mentionnerons une formulation naturelle impliquée dans la lutte contre le stress oxydant : « X ». Cette partie aura pour but d'introduire le contexte du stress oxydant et de présenter les cibles potentielles antioxydantes de « X ».

Enfin, nous indiquerons, une formulation naturelle « Y » à effets hypolipémiants, mise au point pour lutter contre le syndrome métabolique. Comme pour le « X », nous définirons le contexte qui est ici le syndrome métabolique et les cibles potentielles de « Y ».

En conclusion, l'utilisation de tous ces produits naturels aura pour but de mettre en relation la (micro)nutrition et leurs propriétés ainsi que leur implication dans diverses pathologies.

RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

Les rappels bibliographiques seront composés de quatre parties distinctes. Dans la première partie, nous présenterons le modèle d'étude qui a été utilisé tout au long de notre travail à savoir le muscle squelettique. Nous verrons sa morphologie, son métabolisme ainsi que les pathologies dans lesquelles il intervient.

La seconde partie sera consacrée à la présentation d'un polyphénol connu qui est le resvératrol. Nous verrons son origine, ses propriétés générales ainsi que son intérêt au niveau du muscle squelettique. Les résultats de cette partie ont fait l'objet de publications scientifiques et seront présentées dans la partie résultats.

La troisième partie sera consacrée à la présentation d'une formulation à base de polyphénols appelée « X ». Nous décrirons dans cette partie le stress oxydant avec ses acteurs pro-oxydants et ses acteurs antioxydants.

La dernière partie des rappels bibliographiques portera sur une autre formulation naturelle « Y ». « Y » est destinée à corriger les désordres de nature lipidique de sujets présentant un syndrome métabolique. Dans cette partie, nous décrirons donc les études réalisées et nous définirons le syndrome métabolique.

I.

*Le muscle squelettique :
caractéristiques, fonctions
métaboliques et pathologies associées*

I. Le muscle squelettique : caractéristiques, fonctions métaboliques et pathologies associées

I.1. Caractéristiques du muscle squelettique

Notre corps est composé d'environ 700 muscles différents, ce qui représente 40% de notre masse corporelle totale. Le terme « squelettique » vient du fait que ces muscles sont directement attachés aux os par des tendons. Il existe trois principaux types musculaires (**Figure 2**) qui se distinguent par leur structure et leurs fonctions biologiques mais qui ont pour but la contraction. Le premier type musculaire est le muscle squelettique. Ce muscle représente la majeure partie de la masse musculaire (environ 600 muscles) et est à l'origine de la motricité et de la posture chez un individu. Le muscle squelettique a été choisi comme modèle d'étude durant notre travail et sera décrit par la suite. Les deux autres types musculaires sont les muscles cardiaques responsables des contractions cardiaques et les muscles lisses responsables par exemple des contractions de l'intestin.

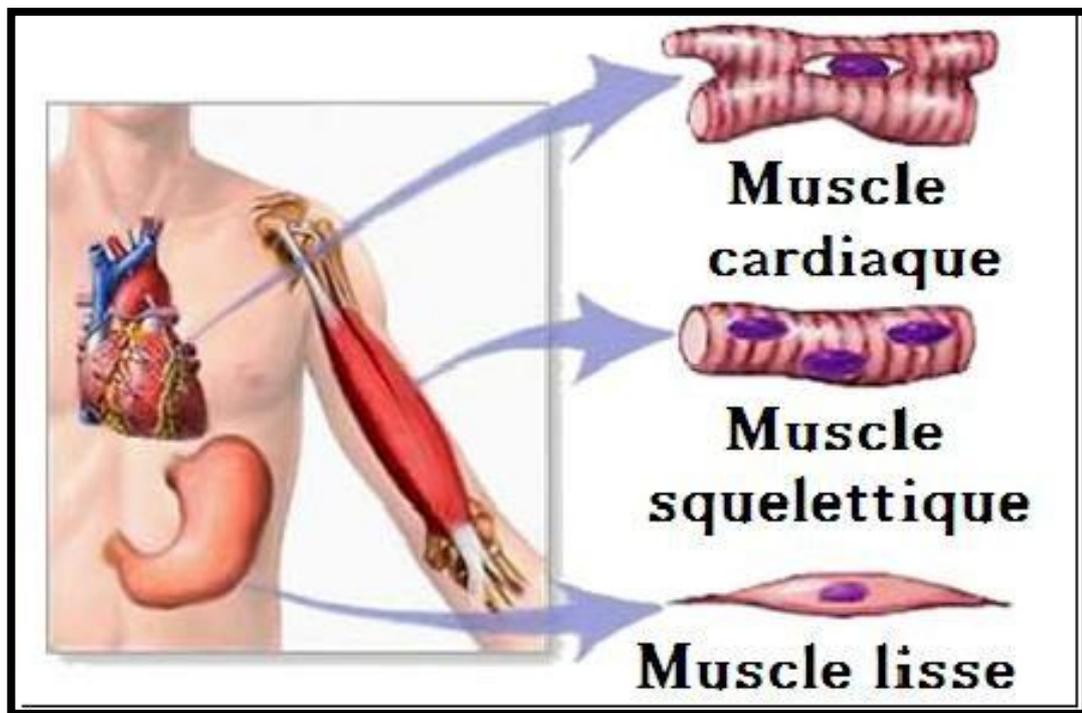


Figure 2. Principaux types musculaires.

D'après (http://proticblog.net/simona/wiki3-32/wakka.php?wiki=SystemeMusculosquelettique&show_comments=1)

I.1.1. Structure du muscle squelettique

I.1.2. La cellule musculaire (fibre musculaire)

Les rhabdomyocytes (**Figure 3**) sont les cellules qui constituent le muscle squelettique. Leur caractéristique principale sur coupe longitudinale est la présence d'un grand nombre de noyaux (jusqu'à 500) en périphérie du cytoplasme et la présence de stries.

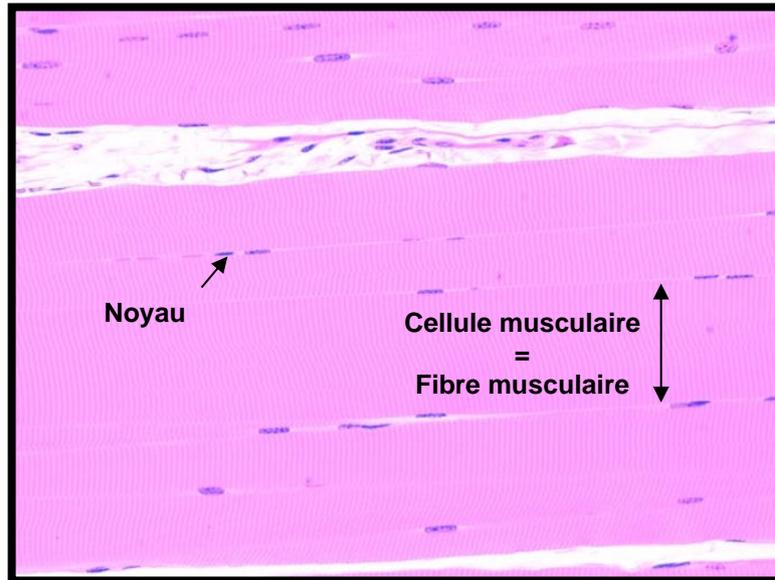


Figure 3. Coupe longitudinale d'un muscle squelettique

I.1.3. Les compartiments du muscle squelettique

Un muscle squelettique comprend, à l'intérieur d'une membrane appelée *Epimysium*, plusieurs fascicules musculaires, chacun délimité par une membrane, le *Perimysium*. Chaque fascicule comprend plusieurs fibres musculaires, délimitées entre elles par une membrane, l'*Endomysium*. Enfin, les fibres musculaires sont composées de myofilaments comprenant des sarcomères qui constituent l'unité contractile du muscle grâce à la présence d'un réseau d'actine et de myosine (Koubassova & Tsaturyan 2011) (**Figure 4**). Les contractions musculaires sont contrôlées par le système nerveux central.

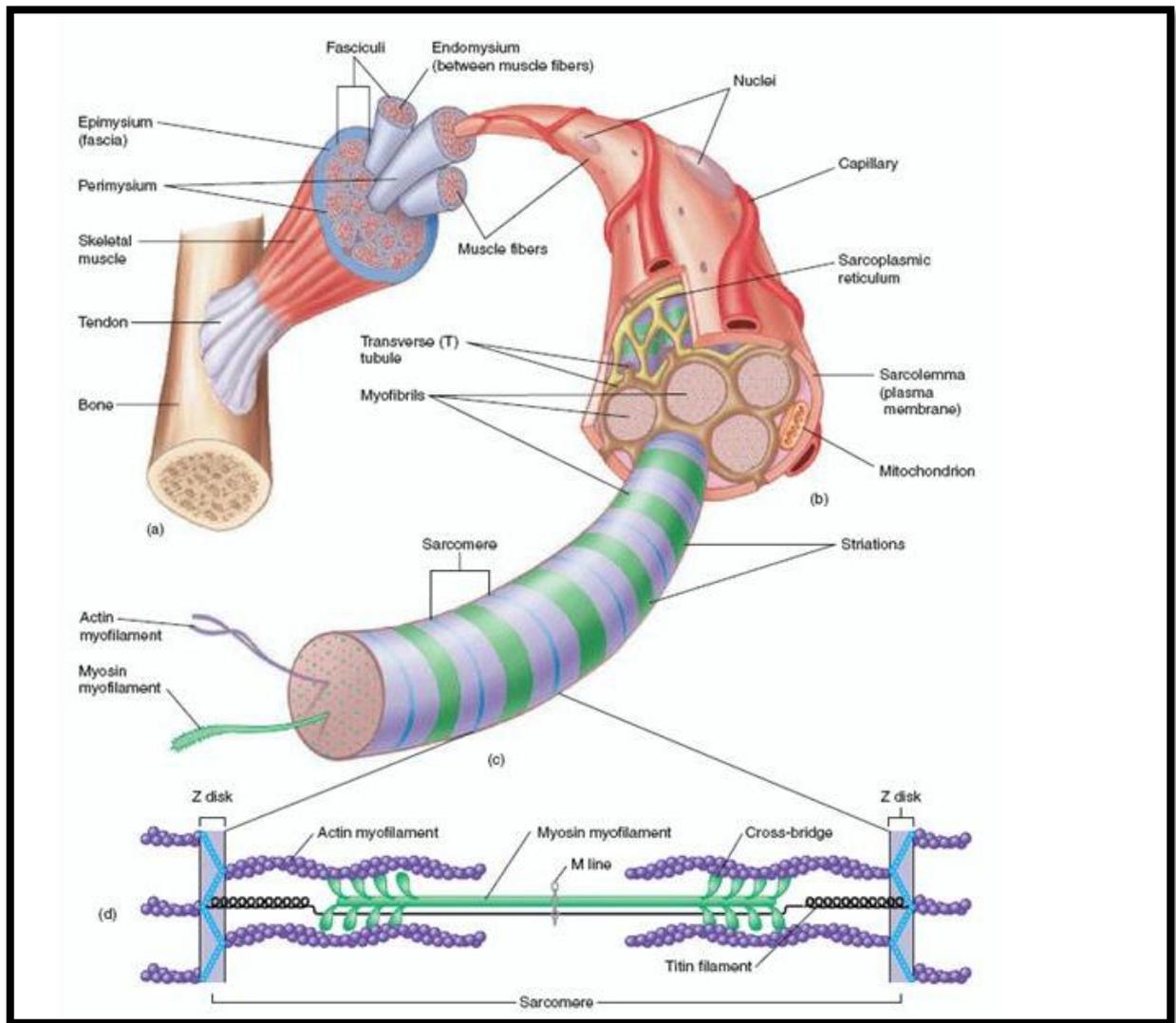


Figure 4. Schéma descriptif d'un muscle squelettique.
 D'après (<http://www.shoppingtrolley.net/skeletal%20muscle.shtml.jpg>)

I.1.4. Les fibres musculaires

Le muscle squelettique est composé de différentes fibres musculaires (**Tableau 1**) qui se différencient par leur métabolisme, leur morphologie mais surtout par leur composition en myosine. L'intérêt de ces fibres réside dans leur capacité d'utilisation de différents substrats énergétiques : glucose ou acides gras. Leur seconde particularité est leur capacité de transition d'un type de fibre à un autre. Ce phénomène peut avoir lieu lors d'un exercice physique particulier ou lors de pathologies (Wang *et al* 2004). Par conséquent, des produits pharmacologiques ou naturels pourraient initier ce processus de transition dans un but thérapeutique possible.

I.1.4.1. Les fibres de type I dites lentes, oxydatives ou rouges

Ce sont les fibres dites de l'endurance, qui se contractent en premier lors d'un effort physique et qui peuvent rester contractées dans le temps. Elles expriment les chaînes lourdes de myosine type I β . Leur contenu riche en myoglobine est responsable de la couleur rouge qui les caractérise. Leur métabolisme est un métabolisme aérobie oxydatif (Schiaffino & Reggiani 2011) dû à la présence d'un très grand nombre de mitochondries.

I.1.4.2. Les fibres de type IIa dites intermédiaires

Ces fibres ont un métabolisme à la fois aérobie et anaérobie. Elles peuvent se contracter rapidement mais ont une résistance moyenne et expriment les chaînes lourdes de myosine de type IIa. Lors du développement de l'individu et de son activité physique ces fibres pourront « switcher » en type I ou en type IIb.

I.1.4.3. Les fibres de type IIb dites rapides, glycolytiques, blanches

Ces fibres sont capables de se contracter très rapidement mais ne peuvent pas soutenir un effort prolongé. Elles expriment les chaînes lourdes de myosine de types IIb. Pauvres en mitochondries, elles ont un métabolisme anaérobie, glycolytique. Une activité physique régulière permet à ces fibres d'améliorer leur métabolisme aérobie.

| Type de Fibre | Métabolisme | Taux de mitochondrie | Type isoforme myosine |
|----------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Ib | Oxydatif | Elevé | I β |
| IIa | Glycolytique | Moyen | IIa |
| IIb | Glycolytique | Faible | IIb |

Tableau 1. Récapitulatif des caractéristiques des fibres musculaires de la souris

I.1.5. La myogenèse

Par définition, la myogenèse est la formation des muscles. C'est un processus complexe qui débute dès l'embryogenèse et continue tout au long de la vie. Il fait intervenir de nombreux facteurs dont l'expression varie selon le stade de développement de l'individu. C'est au moment de la somitogenèse que les muscles squelettiques prennent leur origine.

Les somites qui donneront par la suite les vertèbres, le derme et le muscle squelettique poursuivent leur développement en formant le dermomyotome puis le myotome à l'origine entre autres des cellules musculaires squelettiques (Carvajal & Rigby 2010).

I.1.5.1. Les facteurs de transcription de la myogenèse

A partir de ce stade, les cellules du myotome expriment deux facteurs de transcription, Pax3 et Pax7 (Kang & Krauss 2010), responsables de la spécialisation de ces cellules en lignée musculaire squelettique. Ces facteurs de transcription sont sous le contrôle des gènes Six 1 (sine oculis-related homebox) et Six4 qui sont associés à des co-activateurs Eya1 (eyes-absent homologs) et Eya 2. On considère les gènes Pax et Six comme des gènes « masters » c'est-à-dire qu'ils sont en amont de tous les autres. Les progéniteurs Pax3⁺/Pax7⁺ vont exprimer tour à tour différents facteurs à motif particulier dit « Helix-Loop-Helix » (HLH) caractéristique des facteurs de transcription. Ces facteurs sont des « myogenic regulator factor » (Mrf) et leur expression dépendra du stade d'avancement de la lignée myogénique. Six1 et Six4 sont capables aussi de réguler directement l'expression des Mrf.

Les progéniteurs vont devenir dans un premier temps des cellules satellites ou cellules souches, dont l'expression de Myf5 et MyoD va augmenter, c'est la spécification.

Les cellules souches vont ensuite proliférer sous l'influence de facteurs tels que « Fibroblaste growth factor » (FGF), puis devenir des myoblastes qui expriment toujours Myf5 et MyoD.

Enfin, les myoblastes vont devenir des myocytes qui fusionneront entre eux pour donner des myotubes. Les myotubes vont alors exprimer les facteurs Mrf4 et MyoG (myogénine) et réprimer l'expression de Myf5 et MyoD (**Figure 5**), c'est la différenciation musculaire (Bentzinger *et al* 2012, Kaminski *et al* 2012). La différenciation musculaire sera traitée plus en profondeur dans le chapitre du resvératrol.

C'est grâce à des modèles *in vivo* ou *in vitro* que les facteurs de différenciation ont pu être mis en évidence. Nous pouvons voir ainsi leur rôle essentiel dans le développement du tissu musculaire.

Par exemple chez des souris mutantes (déficientes) pour certains facteurs (précédemment cités), il a été montré que l'absence d'un ou plusieurs facteurs entraîne un retard du développement du tissu musculaire, voire une absence totale du muscle squelettique (Tajbakhsh *et al* 1997).

I.1.5.2. Les microRNA (miR) contrôlant la myogenèse

Les microRNA sont des petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides localisés au niveau des introns. La synthèse des miR débute par la formation d'un pré-mir obtenu par clivage d'un pri-miR

(« primary miR ») par le complexe enzymatique Drosha qui est une « Rnase III like » et son co-facteur DGCR8 (« DiGeorge syndrome critical region gene 8 ») également appelé Pasha. Ce pré-miR va subir un second clivage au niveau du cytoplasme, par une seconde « RNase III » appelée Dicer et aboutir au miR mature d'environ 22 nucléotides (Gromak 2012).

Récemment, l'étude des miR a montré que ces petits ARN régulent l'expression de gènes de la myogenèse au niveau post-traductionnel. Par exemple, miR-1/miR-133/miR-206 spécifiques du muscle squelettique, sont impliqués dans régulation de la différenciation des myoblastes en réprimant l'expression de certains gènes (Ge & Chen 2011).

I.1.6. Les voies de signalisation contrôlant la myogenèse

I.1.6.1. La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation « Notch » impliquée dans la communication entre cellules, peut également réguler des gènes responsables de la différenciation des myoblastes (Buas & Kadesch 2010).

I.1.6.2. La voie de signalisation NF- κ B

La voie classique de NF- κ B par l'intermédiaire de son inhibiteur IK β a un effet anti-myogénique. Une fois la différenciation initiée, c'est par sa voie alternative comprenant le complexe RelB/p52 que NF- κ B activerait la biogenèse mitochondriale au niveau des myotubes (Bakkar & Guttridge 2010).

I.1.6.3. La voie de signalisation Wnt (wingless-type)

La voie Wnt quant à elle serait impliquée dans la différenciation des myotubes. C'est par l'activation du complexe β catenin/TCF que Wnt pourrait induire l'expression des gènes de la myogenèse tels que MyoD ou Myf5 (von Maltzahn *et al* 2012).

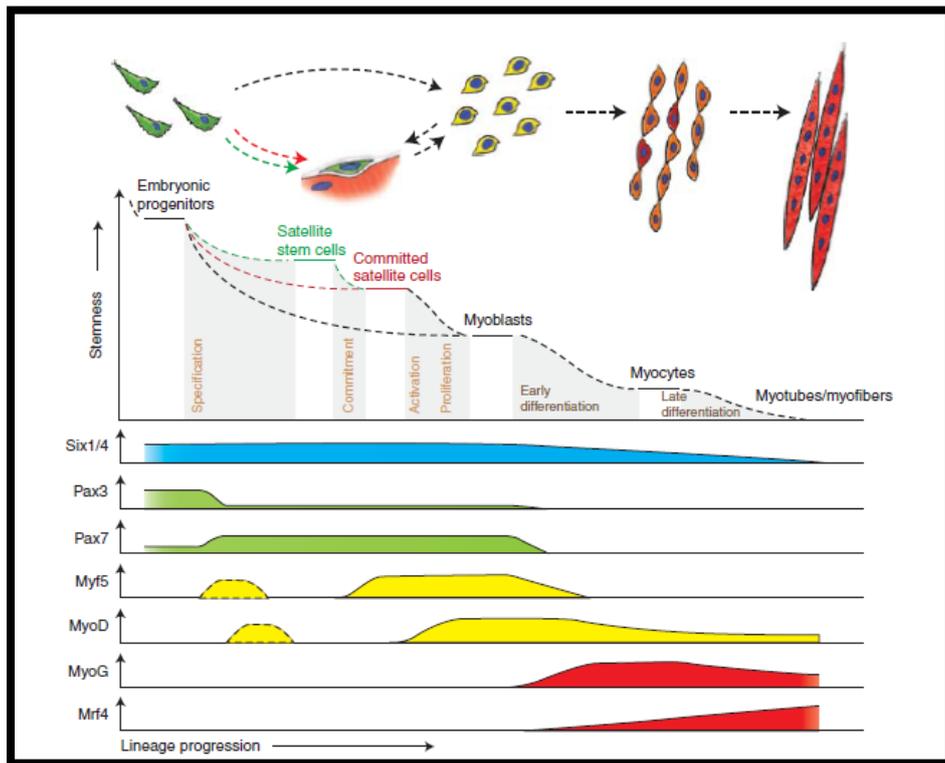


Figure 5. Expression des différents facteurs de transcription dans la progression de la lignée myogénique. D'après Bentzinger *et al.* 2012

En conclusion, la myogenèse est un processus à la fois long, complexe et difficile à définir à cause de l'intervention de nombreux facteurs dont l'expression varie au cours du développement de l'individu, des voies de signalisation mises en jeu et de nouveaux facteurs régulateurs tels que les miR. Cependant, malgré sa complexité le muscle squelettique est un organe qui participe aux fonctions métaboliques essentielles à l'organisme et est souvent impliqué dans diverses pathologies que nous verrons par la suite.

I.2. Fonctions métaboliques du muscle squelettique

Le muscle squelettique permet de réaliser la mobilité et les performances physiques, il a donc besoin de produire de l'énergie pour effectuer toutes ces tâches. Deux sources d'énergies principales sont à la disposition du muscle : les acides gras et le glucose. Le muscle a une très faible capacité de stockage, nous verrons donc d'où proviennent ses substrats énergétiques et leur devenir. Avant toute production d'énergie, l'organisme doit être tenu au courant des quantités d'énergies disponibles qui indiqueront si oui ou non une production est nécessaire.

L'un des mécanismes qui permet de jouer le rôle senseur d'énergie au niveau musculaire est celui qui fait intervenir l'enzyme AMPK (AMP activated protein kinase).

I.2.1. L'AMPK

L'AMPK est un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique (AMPK α) et de deux sous-unités régulatrices (AMPK β et AMPK γ) dont chaque sous-unité comporte plusieurs isoformes. L'enzyme a une activité sérine/thréonine kinase qui est étroitement liée à la disponibilité en substrat énergétique de la cellule. En effet, l'AMPK est activée directement par une augmentation du taux AMP/ATP (Jordan & Lamia 2012), c'est-à-dire lorsqu'il y a augmentation du taux d'AMP (et baisse du taux d'ATP) lors de carence énergétique, comme par exemple lors d'une activité sportive ou lors d'une hypoglycémie.

La phosphorylation sur le résidu thréonine 172 de l'AMPK est essentielle à son activation. Il a été montré que deux kinases sont capables de phosphoryler l'AMPK, d'un côté la Ca²⁺/calmodulin kinase kinase (CaMKK) et de l'autre côté LKB1 (Koh *et al* 2008). Une fois activée, l'AMPK va stimuler les voies cataboliques productrices d'énergie et réprimer les mécanismes anaboliques qui ont besoin d'énergie. L'AMPK peut être activée par une molécule synthétique qui est l'AICAR (aminoimidazole carboxamide ribonucleotide).

Voici quelques effets qui vont permettre la production d'énergie (Sanchez *et al* 2012) et qui seront développés par la suite :

- Déplacement de la « Fatty acid translocase/ cluster of differentiation 36 » (FAT/CD36), nécessaire pour le transport des acides gras pour la β -oxydation.
- Déplacement du transporteur GLUT4 nécessaire au transport du glucose pour la glycolyse.
- Régulation de l'activité de facteurs de transcription au niveau musculaire comme par exemple le « Nuclear respiratory factor » (NRF1/2)

I.2.2. Le métabolisme lipidique

L'origine des acides gras (AG) est multiple et leur utilisation aussi. Ils peuvent provenir de la lipolyse à partir du tissu adipeux, ils peuvent être libérés par hydrolyse des lipoprotéines de basse densité (VLDL) ou ils peuvent provenir des triglycérides contenus dans des gouttelettes lipidiques intramusculaires.

Les AG peuvent à la fois servir de substrat énergétique, de matériel pour les membranes plasmiques ou peuvent être stockés dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides. Une fois libérés par des lipases (Watt & Hoy 2012) comme l'ATGL (adipose triglycéride lipase), l'HSL (Hormone sensitive lipase) et la MGL (monoglyceride lipase), les AG doivent pénétrer à l'intérieur de la cellule pour être β -oxydés.

I.2.2.1. La β -oxydation mitochondriale des acides gras

La β -oxydation est la principale voie de dégradation des acides gras (AG). Au niveau du muscle squelettique, elle a lieu dans les mitochondries pour les AG libres à longue chaîne (de 12 à 18 carbones).

Dans un premier temps, les AG doivent pénétrer à l'intérieur de la cellule. Leur transport se fait soit par diffusion passive soit par des protéines de transport (Kiens *et al* 2011): FAT/CD36, Fatty acid transport protein (FATP), Fatty acid binding protein (FABP).

A l'intérieur du cytoplasme, les acides gras vont être dirigés vers la mitochondrie où aura lieu la β -oxydation. Dans un premier temps, les AG vont être activés par l'acylCoA synthétase (ACS), puis transférés à l'intérieur de la mitochondrie par la carnitine palmitoyl transferase I (Cpt I) présente au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Cpt I est considérée comme l'étape limitante de la β -oxydation et peut être inhibée par le malonyl-Co (Sebastian *et al* 2009). A l'intérieur de la mitochondrie l'acide gras subira plusieurs cycles de β -oxydation pour donner l'**acétyl-coenzyme A** (l'acétyl-CoA). L'acétyl-CoA va pouvoir servir de substrat pour le cycle de Krebs ou cycle TCA (« tricarboxylic acid cycle ») afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine-5'-triphosphate) dans les cellules musculaires (**Figure 6**).

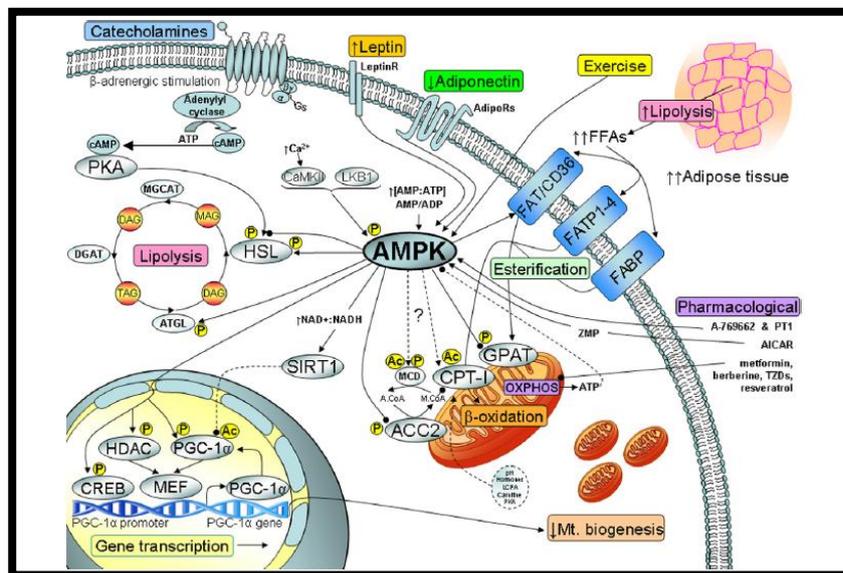


Figure 6. L'AMPK au cœur du métabolisme énergétique musculaire. D'après (O'Neill *et al* 2012)

I.2.3. Le métabolisme glucidique

La seconde source d'énergie du muscle squelettique est le glucose. Ce dernier peut provenir soit du plasma, soit du glycogène, la molécule de réserve. Comme les acides gras, le glucose a besoin de pénétrer à l'intérieur de la cellule afin d'être transformé en énergie.

I.2.3.1. La glycolyse

Le transporteur GLUT4 « glucose transporter 4 » spécifique du muscle squelettique va permettre le passage du glucose dans la cellule. Ce transporteur est localisé dans des vésicules intracytoplasmiques et sa translocation vers la membrane plasmique dépend du besoin énergétique. L'AMPK va encore une fois jouer ce rôle de senseur. Une fois activée, l'AMPK va phosphoryler des médiateurs du déplacement de GLUT4 qui sont TBC1D1 (TBC1 domain family member/TBC1D4 (Akt substrat) AS160), appartenant à la famille des Rab protéines. La phosphorylation de ces protéines aura pour conséquence d'inhiber le domaine de l'activité GTPase de TBC1D1/4. Ce domaine potentialise l'hydrolyse du GTP par les protéines Rab. Ainsi, les protéines Rab seront plus chargées en GTP et se dissocieront sous cette forme des vésicules contenant GLUT4 facilitant son incorporation à la membrane plasmique (**Figure 7**) (Friedrichsen *et al* 2012).

Le signal glucidique est aussi sous la dépendance de l'insuline qui va activer la voie Akt/PKB à travers son récepteur. Akt/PKB par son activité kinase va aussi phosphoryler TBC1D1/4 et améliorer la captation du glucose par la translocation de GLUT4 (**Figure 8**) (Rowland *et al* 2011).

L'activation de l'AMPK est aussi responsable, d'une part, de la phosphorylation de la glycogène phosphorylase (GP) permettant le relargage du glucose-1-phosphate, et d'autre part, de la phosphorylation de la glycogène synthase (GS) empêchant le stockage du glucose et rendant ce substrat plus accessible pour la glycolyse (Jensen & Richter 2012). Enfin, le glucose peut rentrer dans la voie de glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas où il sera dégradé en pyruvate. Ce dernier va être transformé au niveau mitochondrial en acétyl-CoA par l'intermédiaire de la pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-CoA pourra alors fournir l'énergie nécessaire à partir du cycle de Krebs.

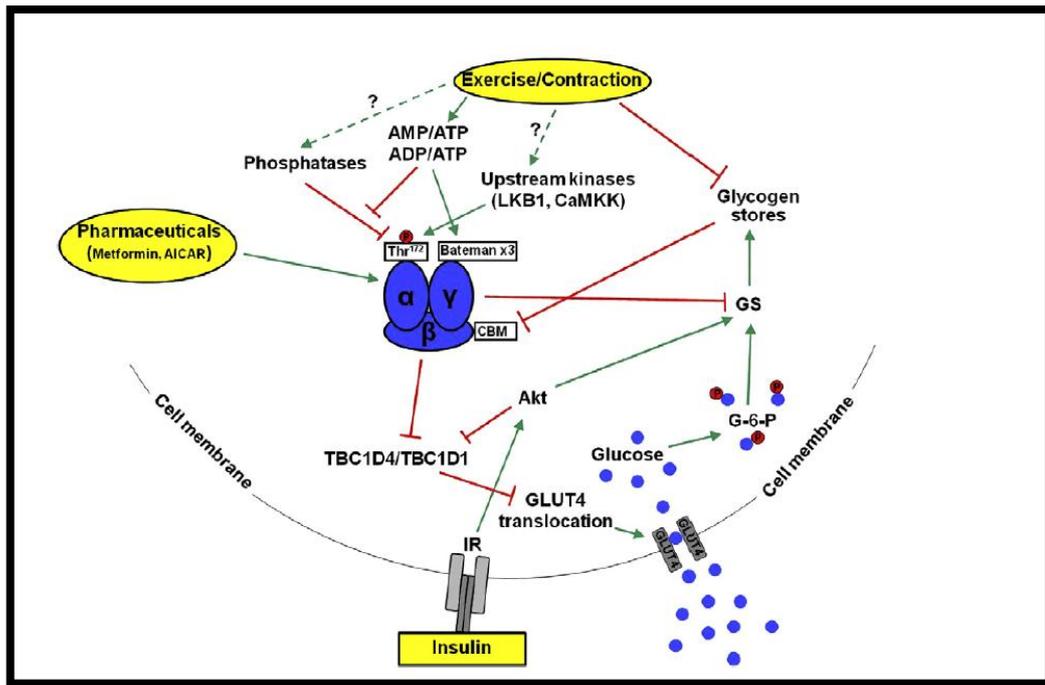


Figure 7. La régulation du métabolisme du glucose.
D'après Friedrichsen *et al* 2012

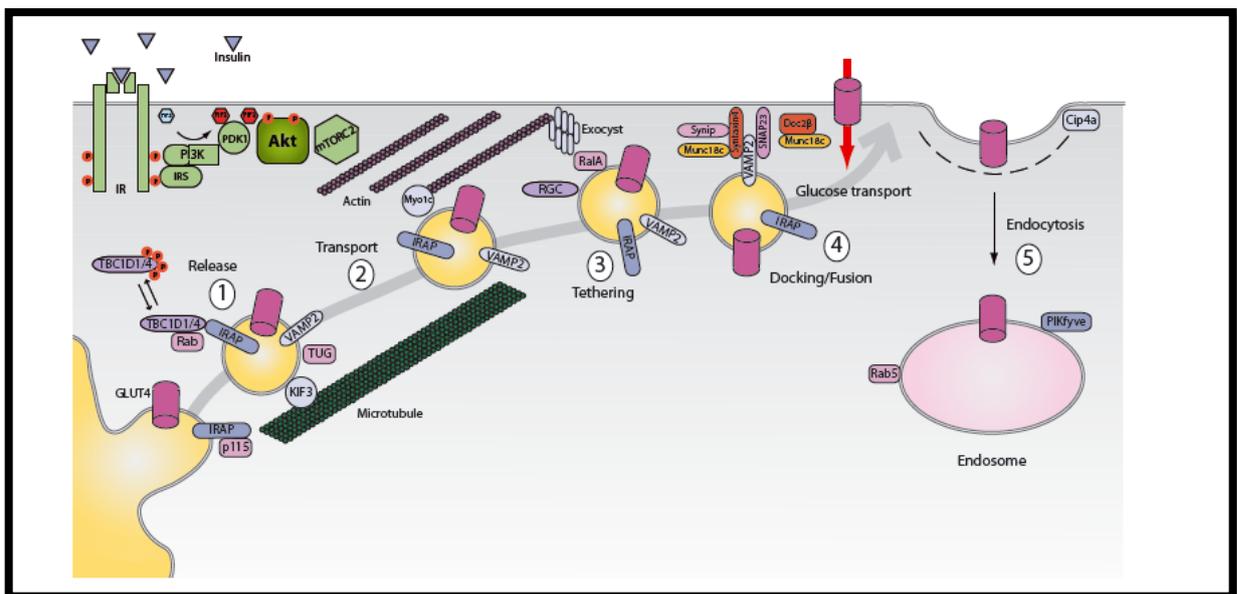


Figure 8. Translocation de GLUT4 insulino-dépendante.
D'après Rowland *et al* 2011

I.2.4. L'AMPK et régulation génique au niveau musculaire

Nous avons vu que l'AMPK est au cœur de la régulation du métabolisme énergétique musculaire et que l'énergie est principalement fournie par la mitochondrie. Cependant, l'AMPK n'est pas seulement un senseur d'énergie et peut également réguler l'expression de gènes en modulant l'activité de nombreux facteurs de transcription.

Nous verrons comment l'AMPK peut jouer son rôle en tant que régulateur génique en phosphorylant un de ses partenaires qui est PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Co-activator 1-alpha) et les conséquences d'une telle régulation.

I.2.4.1. PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Co-activator 1-alpha)

L'un des principaux partenaires de l'AMPK dans la régulation de gènes est PGC1 α . L'expression du gène de PGC1 α est régulée par différents facteurs de transcription (MEF, Foxo1, CREB). Au niveau musculaire, lors d'un exercice physique, la stimulation nerveuse induite par la signalisation du calcium active principalement deux protéines : la protéine kinase IV dépendante du Ca²⁺/calmoduline (CaMKIV) et la calcineurine (CnA). Ces dernières vont activer les différents facteurs de transcription qui vont se fixer sur leur élément de réponse sur le gène PGC1 α et induire son expression (Fernandez-Marcos & Auwerx 2011). Comme nous allons le voir un peu plus loin, les facteurs de transcription MEF sont aussi la cible de PGC1 α qui pourra ainsi autoréguler son expression.

L'activation post-transcriptionnelle de PGC1 α est complexe et fait intervenir à la fois des phosphorylations, des désacétylations et des méthylations (**Figure 9**). L'AMPK ou p38 MAPK en phosphorylant PGC1 α permettent à ce dernier de se dissocier de son répresseur p160 myb (*Fan et al 2004*).

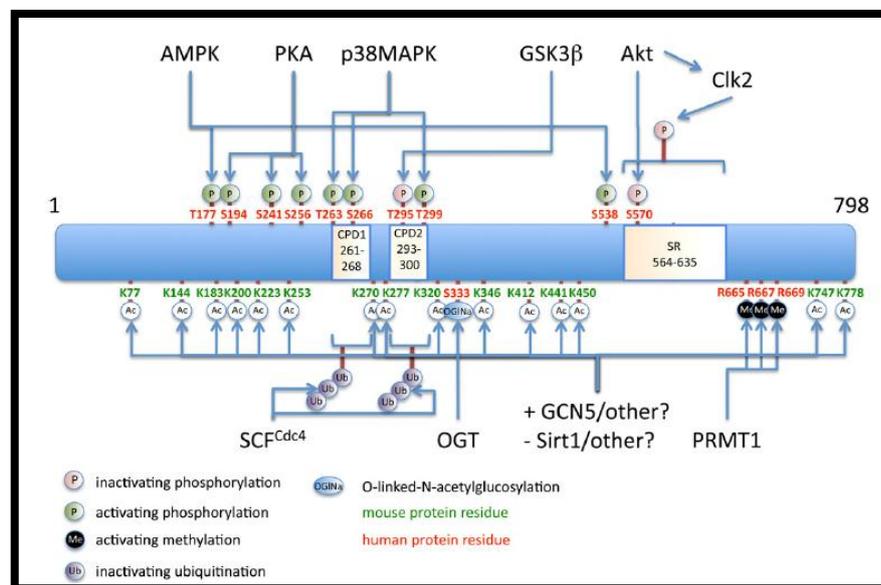


Figure 9. Régulation post-traductionnelle de PGC1 α .
D'après Fernandez-Marcos et Auwerx 2011

Une fois activé, PGC1 α peut jouer son rôle de co-activateur en interagissant avec divers facteurs de transcription pour induire l'expression de gènes. Voici une liste non exhaustive de facteurs de transcription avec lesquels PGC1 α peut interagir (Canto & Auwerx 2010) :

- PPAR $\alpha/\beta/\gamma$ “**P**eroxisome **P**roliferator-**A**ctivated **R**eceptors”
- ERR α “**E**strogen **R**elated **R**eceptor”
- Foxo “**F**orkhead **box o**”
- HNF “**H**epatocyte **N**uclear **F**actor 4”
- NRF1/2 “**N**uclear **R**espiratory **F**actor”
- MEF “**M**yocyte **E**nhancer **F**actor”

Chez la souris, au niveau musculaire, l'activation de l'AMPK conduit donc à l'activation de PGC1 α . PGC1 α va alors interagir avec les différents facteurs de transcription pour induire l'expression de gènes au niveau musculaire.

- L'interaction entre PPAR β et PGC1 α peut conduire à l'expression des gènes du métabolisme lipidique comme par exemple celle de CptI (Moreno *et al* 2010).
- L'interaction entre Foxo1 et PGC1 α peut conduire à l'expression des gènes du métabolisme lipidique comme celle de FAT/CD36 (Kousteni 2012).
- L'interaction de NRF1/2 avec PGC1 α peut induire l'expression des gènes de la fonction respiratoire de la mitochondrie, comme par exemple celle des sous-unités des chaînes respiratoires (Complexe I-V, Cytochrome c) ou encore celle du facteur de transcription mitochondrial TFAM qui régule la réplication de l'ADN mitochondrial (Scarpulla 2008).
- L'interaction entre MEF2c et PGC1 α peut conduire à une augmentation de l'expression de GLUT4 (Finck & Kelly 2006).

En conclusion, le muscle squelettique est l'organe qui permet à la fois la régulation du métabolisme glucidique et lipidique, tout en assurant une production d'énergie nécessaire à l'activité physique. Cependant, il peut être sujet à différentes pathologies, d'origine génétique ou nutritionnelle, qui seront décrites dans le prochain paragraphe.

I.3. Les pathologies liées au muscle squelettique

I.3.1. Les myopathies

Par définition, une myopathie est une pathologie neuromusculaire qui aboutit à la dégénérescence du tissu musculaire. Le terme de myopathie est souvent associé à la myopathie décrite par Duchenne de Boulogne au milieu du XIX^{ème} siècle. Pathologie liée au chromosome X, qui touche

donc les garçons et est transmise par la mère. La cause de cette pathologie est due à la mutation du gène DMD qui code une protéine : la dystrophine (Malik *et al* 2012). Cette protéine est indispensable à l'architecture cellulaire et au maintien de la stabilité des fibres musculaires.

La mutation du gène DMD peut aboutir soit à une protéine tronquée donc moins fonctionnelle (myopathie de Becker), soit à un déficit complet de la dystrophine (myopathie de Duchenne), forme la plus sévère. Les personnes atteintes meurent principalement à cause de complications respiratoires.

Cependant, les myopathies de Duchenne ou de Becker ne sont pas les seules dystrophies musculaires rencontrées. A la base d'observations cliniques, histopathologiques, plusieurs affections musculaires ont été décrites selon leur physiopathologie

- Dystrophie musculaire caractérisée par une altération primaire des fibres musculaires et une disparition progressive de celles-ci.
- Myopathies dites congénitales où le développement de la fibre musculaire au cours de la période fœtale est perturbé, conduisant à des altérations de la structure interne des fibres.
- Myopathies dites métaboliques car secondaires à un dysfonctionnement de la voie de dégradation des sucres (glycogénoses), du métabolisme des graisses (lipidoses), de la chaîne respiratoire mitochondriale (myopathies mitochondriales).
- Affections musculaires dues à une anomalie de l'excitabilité membranaire (syndromes myotoniques, paralysies périodiques).
- Affections musculaires acquises, d'origine inflammatoire, toxique et iatrogène, endocrinienne.
- Syndromes myasthéniques, dus à une perturbation de la transmission neuromusculaire.

I.3.2. Le diabète de type 2

Le muscle squelettique est l'organe qui a la capacité d'absorber environ 80% du glucose total apporté par l'alimentation (DeFronzo & Tripathy 2009). On peut donc penser que celui-ci joue un rôle primordial dans le développement du diabète de type 2 (T2D). Les mécanismes d'actions impliquant le muscle squelettique dans le développement du T2D restent encore flous mais différentes hypothèses sont envisagées. Parmi ces hypothèses, il y a celle qui fait intervenir les AG comme responsables de cette pathologie. En effet, il existe un équilibre entre le métabolisme lipidique et le métabolisme glucidique appelé le cycle de Randle (Hue & Taegtmeyer 2009). Cet équilibre peut être rompu, par exemple par un apport trop important en graisses. Le stockage des AG par le tissu adipeux ne pourra plus avoir lieu et les AG seront libérés en grande quantité. Ces AG vont alors s'accumuler dans d'autres organes à faible capacité de stockage comme par exemple

le muscle squelettique. A partir de là, les AG intramusculaires vont pénétrer dans les cellules musculaires et s'accumuler sous forme de TG ou DAG. Des études ont montré que les DAG sont capables d'activer des PKC qui vont phosphoryler des résidus sérine sur IRS-1.

Cette phosphorylation va empêcher l'insuline d'induire son effet par son récepteur, qui est responsable de la translocation de Glut4 vers la membrane plasmique (Lewis *et al* 2002). Les AG peuvent aussi s'accumuler sous forme de céramides qui vont faciliter la déphosphorylation d'Akt/PKB. Ce dernier (voir paragraphe glycolyse) ne pourra plus promouvoir la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique (Martins *et al* 2012).

I.3.3. Le vieillissement des cellules musculaires

Les cellules musculaires comme toutes les cellules de l'organisme vieillissent au cours de la vie. Le vieillissement musculaire serait à l'origine de la perte de la masse musculaire mais aussi de la force musculaire. L'un des principaux responsables serait la mitochondrie. Cet organite, bien qu'essentiel pour le métabolisme énergétique, est aussi à l'origine de la production d'espèces radicalaires oxygénées (ROS) par sa chaîne respiratoire. Les ROS sont des molécules très réactives et peuvent conduire à la formation de lipides oxydés, de mutations au niveau de l'ADN mitochondrial et à la synthèse de protéines non fonctionnelles (Peterson *et al* 2012). L'ensemble de ces altérations peut conduire à une perte de la masse musculaire mais aussi à un défaut du métabolisme musculaire.

En conclusion de ce chapitre, nous avons vu que le muscle squelettique est l'organe du métabolisme énergétique. Il régule le trafic lipidique et glucidique. Il est aussi impliqué dans diverses pathologies soit d'origine génétique soit d'origine nutritionnelle. Des molécules pharmaceutiques, telles que l'AICAR, sont utilisées pour corriger certains troubles métaboliques. Mais depuis quelques années, les laboratoires tentent d'utiliser des molécules naturelles ayant des propriétés intéressantes (antioxydantes, anti-inflammatoires) et qui pourront suppléer ou compléter les molécules pharmacologiques. Les prochains chapitres présenteront les molécules naturelles que j'ai utilisées au cours de notre travail et le contexte dans lequel elles peuvent être utilisées.

II.

Le resvératrol : ses propriétés générales et son impact sur le muscle squelettique

II. Le resvératrol, ses propriétés générales et son impact sur le muscle squelettique

II.1. Histoire et découverte d'une molécule naturelle : le resvératrol

Le 3,4',5 trihydroxy-trans-stilbène ou plus communément trans-resvératrol (**Figure 10**) est un polyphénol appartenant à la classe des stilbènes. L'origine de son nom provient d'une plante (*Veratrum grandiflorum*), l'ellébore blanche (**Figure 11**) d'où il a été extrait des racines pour la 1^{ère} fois par M.Takaoka (Takaoka 1940). Cette plante pousse de façon commune dans les prairies, les pâturages et les bois clairs de montagnes en Europe et en Asie (Japon). Enfin, l'utilisation dans la médecine traditionnelle chinoise et japonaise de racines séchées de renouée du Japon ou « *Polygonumcuspidatum* » a permis de mettre en évidence une grande quantité de resvératrol dans cette plante (Kimura *et al* 1983).

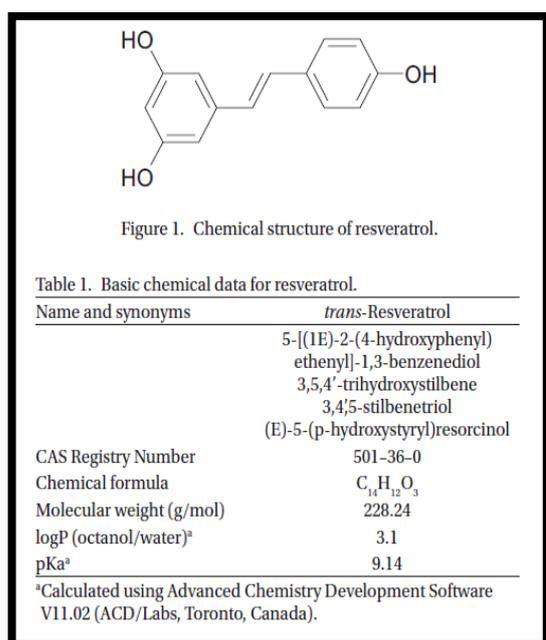


Figure 10. Structure chimique du resvératrol.
D'après (Detampel *et al* 2012)



Figure 11. Ellébore Blanche

II.1.1. Sources du resvératrol

Le resvératrol est produit naturellement par plus de 72 espèces végétales différentes (Catalgol *et al* 2012) . En Europe, la source principale du resvératrol se trouve dans le vin rouge et plus précisément dans la peau des raisins. Ce polyphénol est considéré comme une phytoalexine produite par la vigne (*Vitis vinifera*) en réponse à un stress environnemental. Ce stress peut avoir plusieurs origines:

- Une attaque par des agents pathogènes, par exemple *Botrytis cinerea*.
- Des irradiations UV.
- Des carences nutritionnelles.

La fermentation alcoolique des baies de raisin entières du vin est responsable de l'extraction du resvératrol par macération avec les peaux. Le processus de macération n'intervient que dans la production des vins rouges, d'où les faibles concentrations en resvératrol dans les vins blancs (Tableau 2).

| Boissons | Trans-resvératrol (mg/L) | Références |
|----------------------|--------------------------|----------------------------|
| Pinot noir (rouge) | 10,6 | (Burns <i>et al</i> 2002) |
| Gamay (rouge) | 28,3 | (Adrian <i>et al</i> 2000) |
| Régent (rouge) | 10 | (Adrian <i>et al</i> 2000) |
| Gamay (rosé) | 4,8 | (Adrian <i>et al</i> 2000) |
| Chardonnay (blanc) | 0,43 | (Adrian <i>et al</i> 2000) |
| Chasselas (blanc) | 0,86 | (Adrian <i>et al</i> 2000) |
| Ko-Jo-Kon (infusion) | 0,68 | (Burns <i>et al</i> 2002) |

Tableau 2. Concentration en trans-resvératrol (mg/L) dans différentes boissons

Le resvératrol est également produit par des végétaux tels que les arbres (pins, eucalyptus), les légumineuses (rhubarbe), les arachides (cacahuète) ou encore par les fruits (mûre, cassis, myrtille, canneberge) (Figure 12).

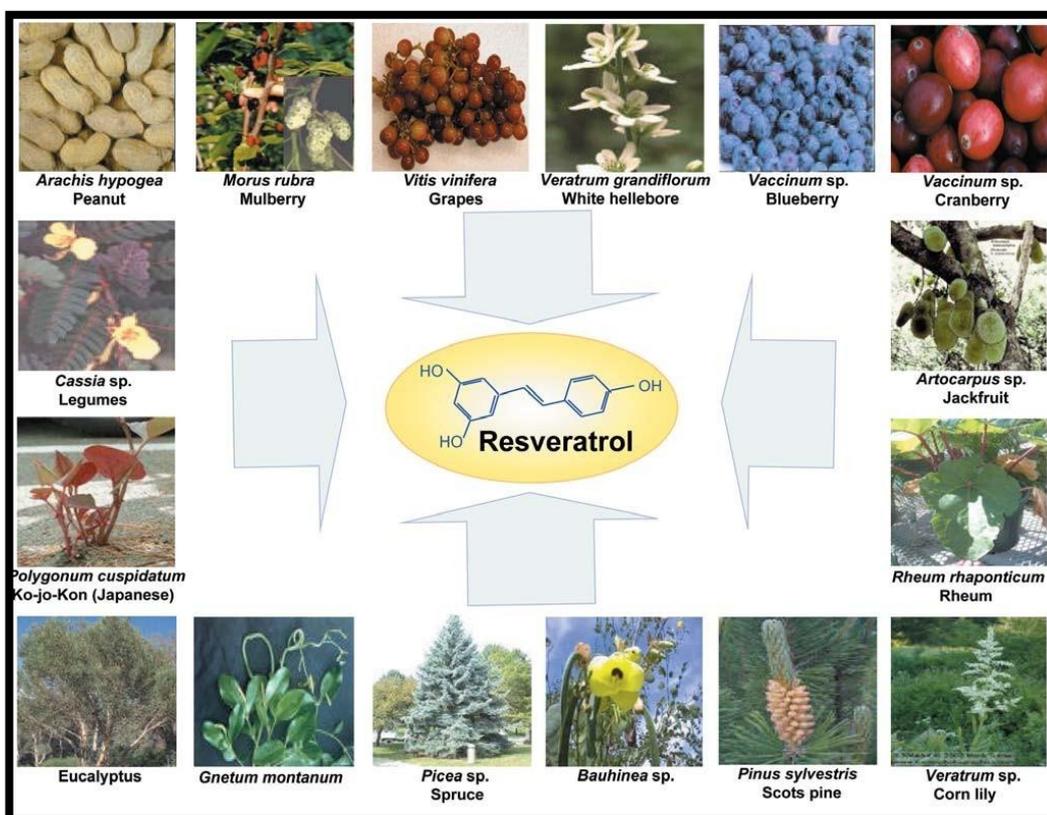


Figure 12. Les sources naturelles du resvératrol.

D'après (<http://www.china-resveratrol.org/En-Post/Sources-of-resveratrol.html>)

II.1.2. Biosynthèse du resvératrol

La synthèse du resvératrol est induite chez la plante par la voie phénylalanine/polymalonates (**Figure 13**). Deux enzymes clés interviennent dans la synthèse du trans-resvératrol. La première enzyme clé est la phénylalanine ammonium lyase (PAL). Elle va diriger la phénylalanine vers la synthèse des phénylpropanoïdes (C₆-C₃) et des flavonoïdes (C₆-C₃-C₆).

La seconde enzyme clé est la stilbène synthase (STS). Celle-ci va permettre la construction du squelette stilbénique, caractéristique de la famille des stilbènes dont le resvératrol fait partie (Jeandet *et al* 2002).

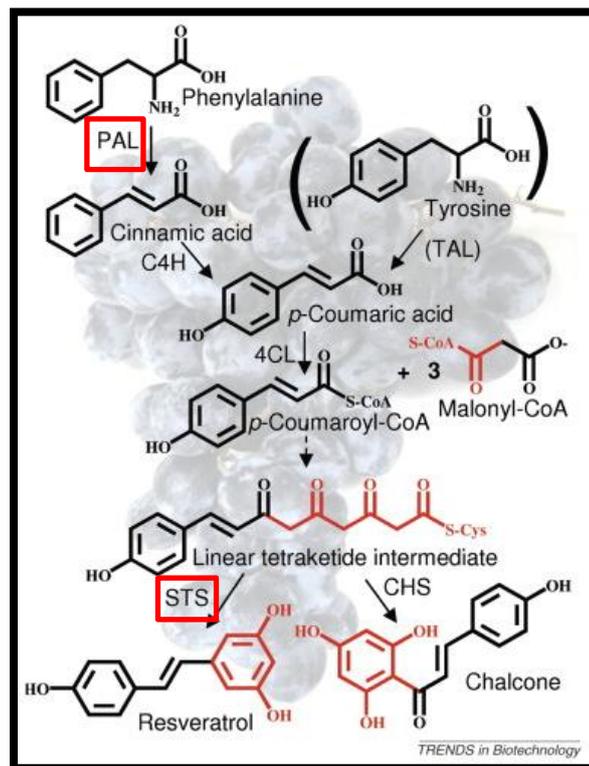


Figure 13. La voie de biosynthèse du resvératrol.
D'après (Halls & Yu 2008)

II.1.3. Les autres polyphénols du raisin et du vin

Bien que le resvératrol soit l'un des polyphénols les plus étudiés, il n'est pas le seul présent dans le vin. En effet, d'autres composés phénoliques composent le vin et sont subdivisés en deux groupes : les flavonoïdes et les non flavonoïdes.

Dans le groupe des composés flavonoïdes, on retrouve différents sous-groupes, parmi eux, il y a les anthocyanines, les flavan-3-ols et les flavonols dont le composé le plus connu est la quercétine, connue entre autres pour ses effets anti-cancéreux (Borska *et al* 2012).

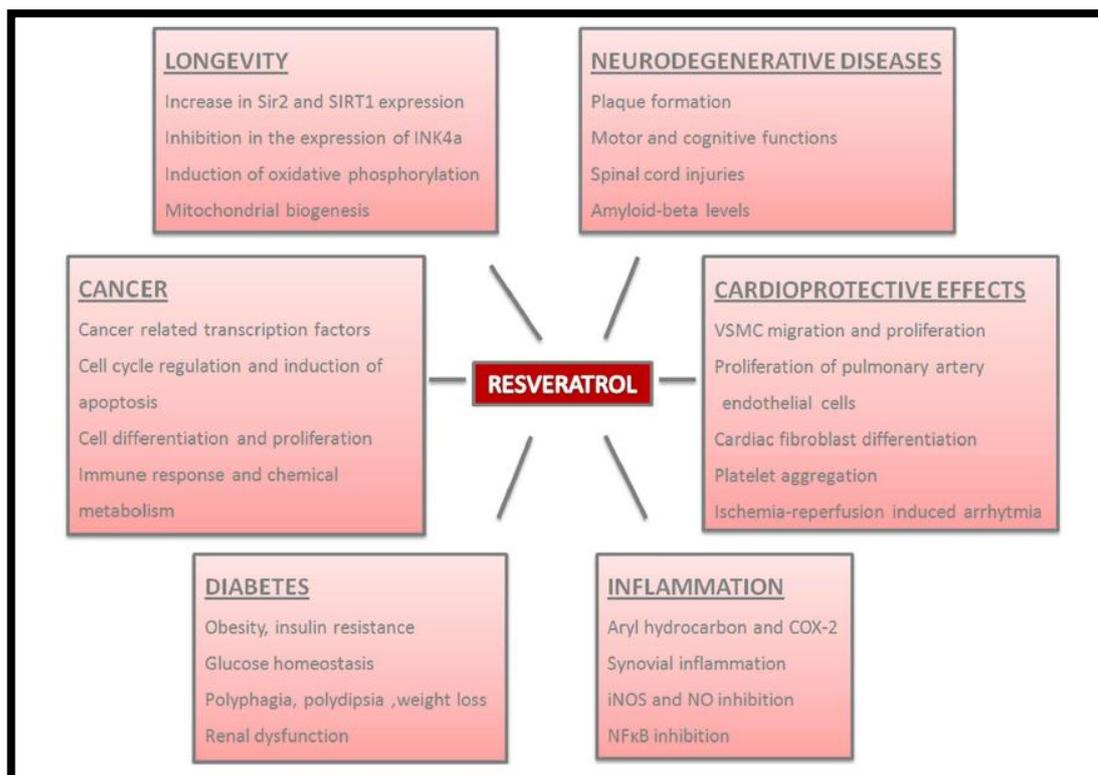
Le groupe des composés non flavonoïdes (Jackson 1994) se subdivise en:

- Acide benzoïque
- Benzaldéhyde
- Acide cinnamique
- Cinnamaldéhyde
- Tyrosol

II.2. Les propriétés biologiques du resvératrol

La recherche sur le resvératrol a réellement commencé dans les années 1990 avec l'émergence du concept du « French Paradox ».

Selon ce concept, la population française serait moins encline à développer des pathologies cardiovasculaires par rapport aux autres pays, et ce malgré un régime riche en graisses saturées. Une consommation modérée en vin serait à l'origine de cet effet bénéfique. De nombreux effets ont été alors rapportés dans la littérature (Yu *et al* 2012), montrant que le resvératrol intervient dans de nombreux mécanismes (**Figure 14**). Le paragraphe suivant va traiter de quelques-uns de ses effets *in vivo* et *in vitro*.



**Figure 14. Les effets protecteurs du resvératrol.
D'après (Catalgol *et al* 2012)**

II.2.1. Propriétés générales

II.2.1.1. Le resvératrol et ses effets anti-vieillessement : les sirtuines

L'un des effets du resvératrol, décrit dans la littérature, est sa capacité à mimer la restriction calorique (RC) (Park *et al* 2012). La RC est alors capable de stimuler l'activité d'enzymes particulières qui sont les sirtuines. Ces protéines sont des enzymes à activité désacétylase dépendantes du NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) (Pacholec *et al* 2010). Des travaux chez la levure ont montré que le resvératrol est capable d'activer Sir2 (Silent Information Regulator 2), un membre de la famille des sirtuines, et d'allonger la durée de vie de ces organismes de 70% (Howitz *et al* 2003). Chez les mammifères, il existe 7 sirtuines différentes (SIRT1-7). Chez la souris, le resvératrol active SIRT1 « silent mating type information regulation 2 homolog », homologue de Sir2 qui améliore les fonctions cellulaires ainsi que l'état de santé de l'animal sous un régime riche en calories (Baur *et al* 2006).

II.2.1.2. Le resvératrol et ses effets antioxydants

L'un des effets antioxydants du resvératrol est sa capacité à capter directement les radicaux libres. On parle d'effet « scavenger » du resvératrol (Leonard *et al* 2003). Le resvératrol est capable d'induire des enzymes antioxydantes telles que la manganèse superoxyde dismutase (Mn-SOD) impliquée dans la dismutation de l'ion superoxyde (O₂⁻, espèce radicalaire très réactive) en oxygène et peroxyde d'hydrogène (Nakata *et al* 2012). Le resvératrol peut également prévenir l'oxydation des LDL en chélatant le cuivre et capturant les ROS (Markus & Morris 2008). L'activité désacétylase est nécessaire à l'activation du co-activateur PGC1α (cf I.2.3.1). Une fois activé, PGC1α peut interagir avec des facteurs de transcription comme Nrf1/Nrf2 afin d'induire la transcription de gènes antioxydants tels que la quinone oxidoreductase 1, la γ-glutamylcysteine synthétase ou l'hème oxygenase-1 (Figure 15a/15b).

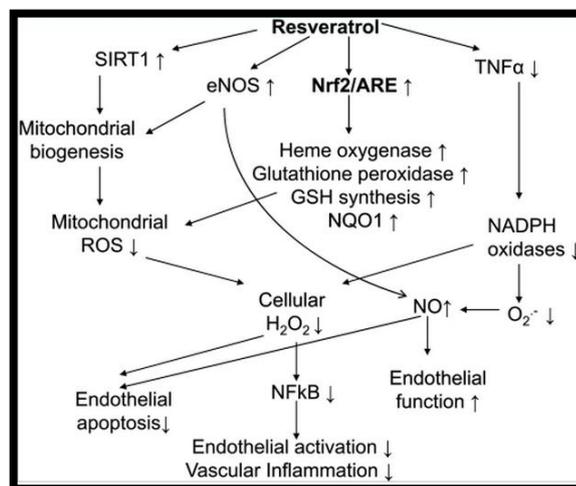


Figure 15a. Le resvératrol, inducteur du facteur de transcription Nrf2.
D'après (Hasko & Pacher 2010)

| Group | Gene symbol | Gene name | Function |
|--|-------------|--------------------------------------|---|
| Glutathione homeostasis | GSH | γ -glutamyl-cysteinyl-glycine | Maintains redox homeostasis during oxidative stress |
| | GST | Glutathione-S-transferase | Cellular detoxification |
| | Gcl | Glutamate cysteine ligase | Catalyzes glutathione synthesis |
| | Gcs | Glutamate cysteine synthetase | Catalyzes glutathione synthesis |
| | GS | Glutathione synthetase | Catalyzes glutathione synthesis |
| | GPx | Glutathione Peroxidase | Catalyzes reduction of H ₂ O ₂ or organic hydroperoxides to water |
| Drug metabolism | GR | Glutathione Reductase | Catalyzes reduction of oxidized GSSH to GSH |
| | NQO-1 | NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 | Catalyzes two-electron reduction of quinones |
| | Ugt | UDP-glucuronosyltransferases | Catalyzes endogenous and exogenous substances with glucuronic acid |
| Stress response proteins/iron metabolism | mEH | Microsomal epoxide hydrolase | Inactivates epoxides converting to vicinal dihydrodiol |
| | Ferritin | Ferritin | Iron binding protein having role in iron oxidative stress |
| | HO-1 | Heme oxygenase-1 | Catalyzes oxidative cleavage of Fe-protoporphyrin-IX |

Figure 15b. Gènes cibles de Nrf2.
Adapté en partie de (Tufekci *et al* 2011)

II.2.1.3 Le resvératrol et ses effets anti-inflammatoires

Le processus inflammatoire est souvent associé à de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose. De nombreuses études ont montré que le resvératrol est capable de diminuer significativement le taux de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α (tumor necrosis factor α), IL6 (interleukine 6), IL8 (Kang *et al* 2009). Le resvératrol est aussi capable d'inhiber l'activité du facteur de transcription pro-inflammatoire NF κ B et l'expression de gènes régulée par celui-ci comme la COX2 (cyclooxygénase 2), les MMP3 et MMP9 (matrix métalloprotéinases), le facteur VEGF (vascular endothelial growth factor) (Csaki *et al* 2009) (Cianciulli *et al* 2012). Tous ces résultats permettent de supposer que le resvératrol est un bon agent anti-inflammatoire et pourrait être utilisé dans de nombreuses pathologies associées au processus inflammatoire.

II.2.1.4. Le Resvératrol et ses effets cardio-protecteurs

L'un des effets cardio-protecteurs du resvératrol est sa capacité à empêcher l'agrégation plaquettaire dans les vaisseaux sanguins. Cette agrégation peut développer la formation d'un thrombus à l'origine d'une ischémie ou d'un infarctus (Crescente *et al* 2009).

Le resvératrol peut également améliorer les fonctions endothéliales, en augmentant le taux de NO (Oxyde nitrique) qui est un puissant vasodilatateur et peut prévenir le développement d'athérogenèse (Li *et al* 2012).

Des études sur rongeurs ont montré que le resvératrol est capable de réduire les hypertrophies cardiaques ainsi que la pression sanguine (Dolinsky & Dyck 2011). Enfin, le resvératrol permet également d'améliorer la survie des souris sous un régime riche en calories (Baur *et al* 2006).

II.2.1.5. Le resvératrol et ses potentiels anticancéreux

Les recherches sur le cancer ont montré que le resvératrol est capable d'inhiber les trois phases de développement d'une tumeur qui sont l'initiation, la promotion et la progression (**Tableau 3**). Le resvératrol est capable d'induire des voies de signalisation qui aboutissent à la mort des cellules cancéreuses (Colin *et al* 2011). Le resvératrol par ces propriétés antiprolifératives module le cycle cellulaire provoquant son arrêt dans les lignées cancéreuses (Delmas *et al* 2011). Enfin, le resvératrol est considéré comme un chimio-sensibilisant. En effet, il permet d'améliorer les effets de certaines molécules chimio-thérapeutiques (Casanova *et al* 2012).

| Type de cancer | Mécanismes | Références |
|---|--|-----------------------------------|
| Colon | Redistribution de Fas/DR4/DR5 dans les rafts ↓ des protéines anti-apoptotiques (Mcl-1, Bcl-2) | (Delmas <i>et al</i> 2004) |
| Cancer des poumons à petites cellules | ↓ survivine | (Fulda & Debatin 2004) |
| Cancer des poumons à petites cellules | ↓ survivine | (Zhao <i>et al</i> 2010) |
| Lymphome Non Hodgkien/Myélome Multiple | ↓ Bcl-xL / arrêt en G2/M | (Jazirehi & Bonavida 2004) |
| Poumons | ↑p21 | (Kubota <i>et al</i> 2003) |
| Colon | centrosome amplification ↑ caspase 6 | (Chan <i>et al</i> 2008) |
| Colon | ↑cdk1/2 ↑cycline A/E | (Colin <i>et al</i> 2009) |
| Myélome Multiple et Lymphome à cellules T | Redistribution de Fas/DR4/DR5 dans les rafts | (Reis-Sobreiro <i>et al</i> 2009) |
| Mélanome | ↑p53 / ↓ cycline D1 | (Gatouillat <i>et al</i> 2010) |
| Leucémie | ↓ MRP1 | (Kweon <i>et al</i> 2010) |
| Myélome Multiple | ↓ NFκB / ↓ STAT3 | (Bhardwaj <i>et al</i> 2007) |
| Pancréas | ↓ NFκB | (Harikumar <i>et al</i> 2010) |

Tableau 3. Mécanismes moléculaires induits par le resvératrol et son potentiel chimiothérapeutique

II.2.1.6. Le resvératrol et ses effets neuroprotecteurs

Le resvératrol apparaît aussi comme un agent neuroprotecteur de par ses effets anti-inflammatoires et antioxydants. Dans différents modèles murins, le resvératrol induit une protection contre la neurodégénérescence axonale en activant les sirtuines (Suzuki & Koike 2007). Des traitements avec du resvératrol ont montré également une diminution du taux de peptides β -amyloïdes qui jouent un rôle important dans le développement de pathologies telle la maladie d'Alzheimer (Marambaud *et al* 2005).

II.2.1.7. Le Resvératrol et le muscle squelettique

Les études utilisant le resvératrol au niveau du muscle squelettique se focalisent sur l'axe SIRT1-AMPK-PGC1 α considéré comme l'axe « senseur » d'énergie (Canto & Auwerx 2009). En effet, SIRT1 et AMPK sont indispensables pour l'activation de PGC1 α (cf paragraphe I.2.3.1). Cependant, il n'a pas encore été défini clairement si le resvératrol active SIRT1 via AMPK en augmentant le taux de NAD⁺ (Canto *et al* 2009) ou SIRT1 qui désacétyle LKB1 nécessaire à l'activation de l'AMPK. L'activation de PGC1 α permet de réguler l'activité de facteurs de transcription au niveau du muscle squelettique comme PPAR α . Ce facteur de transcription induit l'expression de protéines du transport des acides gras (FABP3, CPT1), ainsi que des enzymes de l'oxydation des acides gras (Mead, Acads) (Ventura-Clapier 2012). L'activation de PGC1 α par le resvératrol dans des modèles murins augmente la capacité oxydative des muscles. Cette capacité oxydative se traduit à la fois par une augmentation de fibres oxydatives qui permettent la résistance à la fatigue, une augmentation de la biogenèse mitochondriale (augmentation du facteur Tfam) et une augmentation de l'activité de la succinate déshydrogénase et de la citrate synthase, enzymes mitochondriales engagées dans le cycle de Krebs (Lagouge *et al* 2006). Grâce à cette capacité oxydative améliorée et aux effets antioxydants du resvératrol, le muscle squelettique est susceptible de faire face à des pathologies telles que la résistance à l'insuline, un des facteurs clé du syndrome métabolique (Zheng *et al* 2012). Le resvératrol peut également stimuler le transport du glucose dans les myotubes C2C12 et potentialiser le signal de l'insuline via l'activation de l'AMPK (Park *et al* 2007). Enfin, il a été montré que le resvératrol peut restaurer la β -oxydation mitochondriale au niveau des fibroblastes humains. Cette stimulation de la β -oxydation mitochondriale est SIRT1 et PGC1 α dépendante, ce qui souligne l'importance de l'axe SIRT1- PGC1 α -AMPK au niveau musculaire mais aussi dans d'autres types cellulaires (Bastin *et al* 2011).

II.3. Le resvératrol et la myogenèse

Avant notre travail, très peu d'études existaient sur l'effet myogénique des polyphénols sur le muscle squelettique. Dans un modèle de souris myopathes (mdx) qui est un modèle d'étude pour la dystrophie musculaire de Duchenne, le resvératrol montre une perte moins importante de la masse musculaire par rapport à des souris non traitées (Hori *et al* 2011).

De plus, le resvératrol a été montré capable d'inhiber des protéines de dégradation telles que PIF (proteolysis inducing factor), Angiotensin I/II diminuant ainsi l'atrophie du muscle squelettique (Russell *et al* 2006, Wyke *et al* 2004).

Dans notre modèle d'étude de cellules squelettiques myoblastiques murines (lignée C2C12), nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux effets pro-différenciateurs du resvératrol sur l'expression de différents facteurs de transcription (FT) qui contrôlent la myogenèse. En effet, la différenciation musculaire est gouvernée par une multitude de facteurs qui sont soit des cytokines, soit des facteurs de prolifération, mais surtout des FT appelés Mrf (Braun & Gautel 2011). Nous avons donc observé l'expression de ces facteurs au cours d'une cinétique de 24h avec du resvératrol. Nous avons également étudié l'expression de régulateurs de ces FT que sont les Mir et les MEF. Ces derniers peuvent interagir directement avec les Mrf permettant la transcription de gènes spécifiques du muscle squelettique. Une étude rapporte aussi que le facteur Forkhead box O1 (FoxO1) favorise la spécification des fibres musculaires dans la lignée cellulaire C2C12 durant la différenciation (Yuan *et al* 2011). Nous pouvons penser alors que le resvératrol pourrait jouer un rôle dans la différenciation musculaire par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription tels que Foxo1. En conclusion, l'étude des effets pro-différenciateurs du resvératrol ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques où ce polyphénol se comporte comme un agent pro-différenciateur favorisant la résistance du muscle squelettique. Le resvératrol pourrait alors empêcher ou ralentir les atrophies musculaires dues aux pathologies soit d'origine génétique (myopathie), soit d'origine métabolique (diabète).

III.

*« X », une formulation naturelle
dirigée contre le stress oxydant.
Rappels sur les espèces réactives*

III. « X », une formulation naturelle dirigée contre le stress oxydant, rappels sur les espèces réactives d'oxygène et de l'azote

III.1. Informations sur le produit

Notre partie dans le projet « X » s'inscrit dans l'étude du statut antioxydant du muscle squelettique. Le produit « X » est une formulation à base de différents polyphénols dont la composition reste confidentielle selon l'accord de consortium signé dans le cadre d'un projet collaboratif porté par VITAGORA et sélectionné par le Fond Unique Interministériel (FUI).

Deux principaux axes sont à l'étude :

L'étude *in vivo* de l'effet antioxydant de « X » au niveau du muscle squelettique.

L'étude *in vitro* de l'effet antioxydant de « X » sur cellules musculaires squelettiques murines (C2C12). Le choix de l'étude du stress oxydant au niveau musculaire est justifié par l'intervention de cet organe dans les processus d'oxydation due à son métabolisme actif (lipides, sucres). Cette oxydation met en jeu l'un des principaux organites producteurs de ROS qui est la mitochondrie. En effet, la production de radicaux libres par les mitochondries pourrait être à l'origine de la fragilisation du tissu musculaire et intervenir dans diverses pathologies. Par conséquent, des stratégies utilisant des antioxydants pourraient retarder ces processus ou constituer de possibles traitements.

III.2. Rappels du contexte

III.2.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant (ou stress oxydatif) correspond à une agression de l'organisme qui conduit à une production massive et continue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou d'espèces réactives de l'azote (RNS). Lorsque la production de ces radicaux libres (RL) est excédante par rapport aux défenses antioxydantes, il y a perturbation de la « balance redox » et développement du stress oxydant. Les espèces radicalaires peuvent alors causer des dommages irréversibles dans la cellule, en s'attaquant aux protéines, aux lipides et à l'ADN (acide désoxyribonucléique) conduisant à la mort cellulaire (Deavall *et al* 2012). Le stress oxydant a plusieurs origines (**Figure 16**):

- Environnementales : pollution, tabac, alcool, vieillissement.
- Génétiques : absence de défense antioxydante (enzyme, protéine).
- Pathologiques : cancer, diabète.

La production excessive de RL peut conduire au développement de pathologies telles que : le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives.

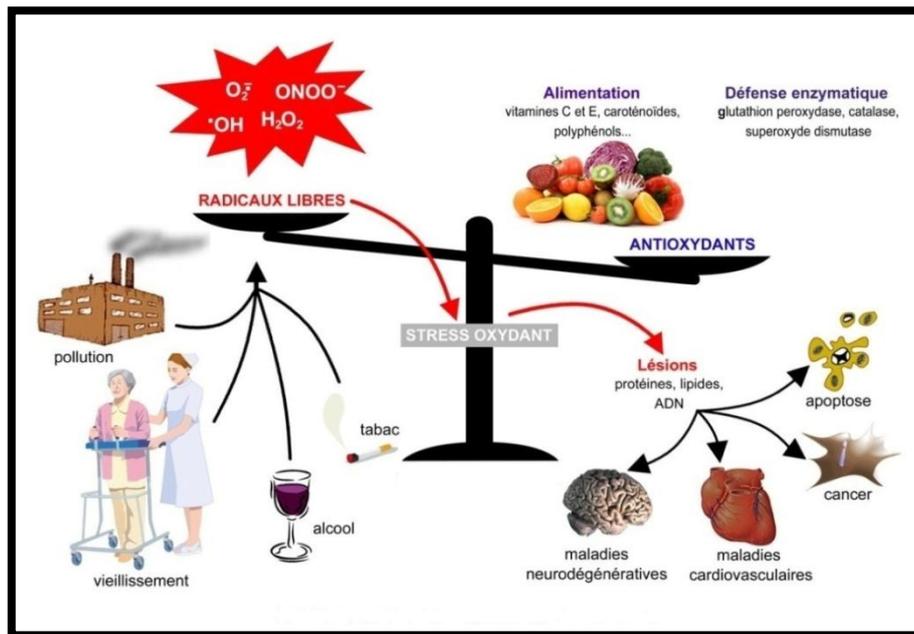


Figure 16. Stress oxydatif ; causes et conséquences

Pour contrebalancer les effets du stress oxydatif, l'organisme a mis en place un système antioxydant composé principalement de vitamines, d'oligo-éléments, de protéines et d'enzymes antioxydantes. Enfin, une production transitoire et modérée de ROS correspond à un mécanisme de défense de la cellule, lui permettant par exemple, d'activer des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie (Ray *et al* 2012).

III.2.2. Description des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques très réactives à durée de vie courte. Ils proviennent de l'oxygène et sont appelés ROS (reactive oxygen species) (**Tableau 4**):

| Dérivés de l'oxygène | | | |
|----------------------|-------------------|--------------------------|----------------------|
| espèces radicalaires | | espèces non radicalaires | |
| Formule | Nom | Formule | Nom |
| $O_2^{\bullet -}$ | Anion superoxyde | $\bullet O-O\bullet$ | Oxygène singulet |
| $HO\bullet$ | Radical Hydroxyle | H_2O_2 | Peroxyde d'hydrogène |
| $ROO\bullet$ | Radical peroxyde | R = chaîne carbonée | |
| $RO\bullet$ | Radical alkoxyde | | |

Tableau 4. Les espèces réactives de l'oxygène

Une fois libérés, les ROS peuvent réagir avec le monoxyde d'azote pour générer les RNS (reactive nitrogen species) (**Tableau 5**) :

| | |
|-------------------------|------------------|
| ONOOH | Nitroperoxyde |
| ONOO⁻ | Peroxynitrite |
| NO⁻ | Monoxyde d'azote |

Tableau 5. Quelques espèces réactives de l'azote

III.2.3. L'origine des ROS

L'un des organites principaux responsable de la formation des ROS est la mitochondrie. C'est par le transport d'électrons au niveau de sa chaîne respiratoire que la mitochondrie est capable de former les radicaux oxygénés (Barbieri & Sestili 2012). Cependant, la mitochondrie n'est pas la seule impliquée dans la formation de radicaux libres. Le peroxysome, autre organite qui participe entre autres à la β -oxydation des acides gras à très longue chaîne (supérieures à 22 atomes de carbone), est capable de former des ROS par l'intermédiaire d'enzymes oxydases FAD dépendantes (Antonenkov *et al* 2010).

Dans le cytosol, les différentes oxydases à l'origine d'une production de ROS sont :

- Xanthine oxydase
- Aldéhyde oxydase
- Galactose oxydase
- NADPH oxydase
- Monoamine oxydase

III.2.4. Le système antioxydant

Pour contrebalancer les effets du stress oxydatif, l'organisme a mis en place un système antioxydant composé principalement de vitamines, d'oligo-éléments et d'enzymes.

III.2.5. Le système antioxydant non enzymatique

Le rôle principal des antioxydants non enzymatiques est un effet « scavenger » des ROS.

L'alimentation est l'une des sources principales d'antioxydants sous forme de (Augustyniak *et al* 2010):

- Vitamine C : agrumes, oseille, choux...
- Vitamine E : huile de tournesol, soja, beurre ...
- Vitamine A : foie, beurre, œufs...
- Sélénium : poissons, œufs, viandes...
- Zinc : fruits de mer, viandes, légumes verts...
- Polyphénols : vin, thé, cacao...

III.2.6. Le système antioxydant enzymatique

Le système antioxydant enzymatique est composé d'enzymes qui catalysent des réactions de dismutation des ROS. Ces enzymes agissent à différents niveaux : dans le cytoplasme, dans la mitochondrie ou de façon extracellulaire (à la surface des membranes par exemple).

Les SOD (Superoxydes dismutases) sont les enzymes majeures du système antioxydant enzymatique. Leur activité est liée à la présence de métaux Cu ou Mn (cuivre ou manganèse) et elles catalysent l'élimination par dismutation des anions superoxydes en faisant apparaître de l'O₂ et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) moins toxique (Fukai & Ushio-Fukai 2011).

On compte 3 isoformes SOD chez les mammifères :

- Cu/Zn SOD (SOD1) enzyme cytoplasmique
- Mn SOD (SOD2) enzyme mitochondriale
- Cu/Zn SOD (SOD3) enzyme extracellulaire

Une fois formé, le peroxyde d'hydrogène peut être réduit en H₂O par deux autres enzymes antioxydantes : la catalase ou la glutathion peroxydase (GPx) (**Figure 17**).

Un autre système antioxydant important est celui qui fait intervenir les peroxyredoxines (Prdx). Ces protéines contiennent des sites actifs cystéine sensibles à l'H₂O₂ qui vont permettre de réduire ce radical. De plus, l'activité des peroxyredoxines est souvent associée à celle des thioredoxines (Thrx), autres protéines antioxydantes.

Ces dernières peuvent réduire les radicaux libres grâce à leur activité thioredoxine réductase (Rhee *et al* 2012). Chez les mammifères, on trouve six isoformes de Prdx, classées en trois catégories en fonction de leur partenaire réducteur:

- 2-Cys Prdx (substrat = glutathion)
- Prdx 2-Cys Atypique
- 1-Cys Prdx (substrat = acide ascorbique, glutathion)

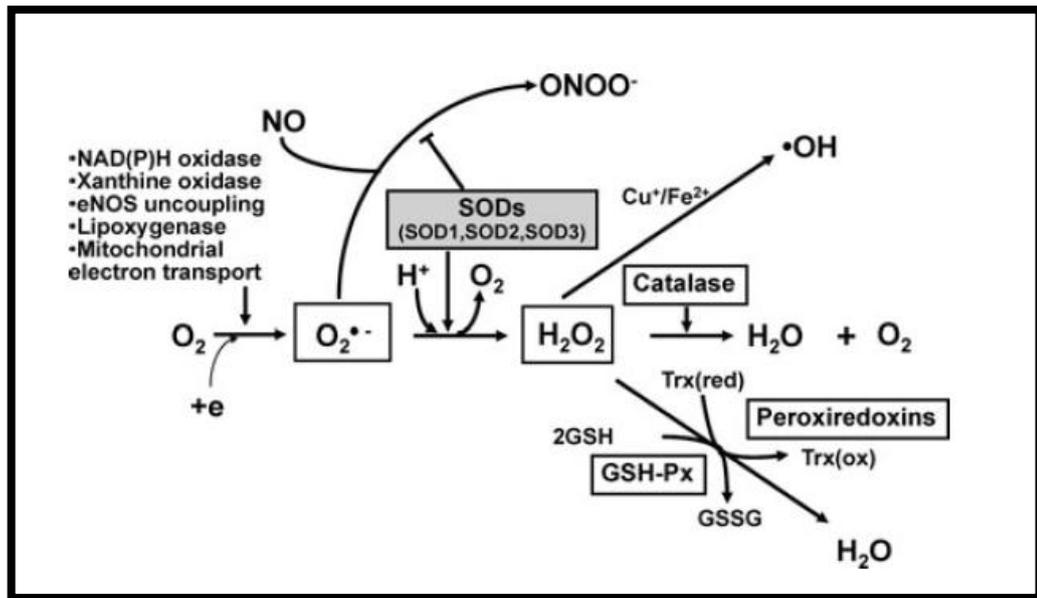


Figure 17. Le système antioxydant enzymatique.
D'après (Fukai & Ushio-Fukai 2011)

III.2.7. Autre système antioxydant

Chez les mammifères, sont localisées au niveau de la membrane des mitochondries des protéines de découplage appelées UCP « uncoupling protein ». On trouve cinq isoformes d'UCP dont l'expression est tissu spécifique (**Tableau 6**). L'UCP1 est bien décrite dans la littérature comme étant la protéine de régulation de la thermogenèse chez les rongeurs, chez les hibernants et les nouveaux nés. Le rôle de l'UCP2 et l'UCP3 reste encore flou, mais l'une des propriétés proposées dans la littérature est leur implication dans le stress oxydant.

Le flux constant de protons au niveau de la membrane interne de la mitochondrie provoque la production de ROS par les complexes respiratoires I et III. Les ROS peuvent alors former des produits tels que le 4-hydroxynonanal (4-HNE), un sous-produit de l'oxydation lipidique (Echtay 2007). Ce dernier peut activer les UCP, qui pourront diminuer la production de ROS (Ricquier 2005) (**Figure 18**).

| Isoformes | Localisation |
|--------------|--------------------------|
| UCP1 | BAT (tissu adipeux brun) |
| UCP2 | Ubiquitaire |
| UCP3 | Muscle squelettique |
| UCP4 | Cerveau |
| UCP5 (BMCP1) | Cerveau, testicules... |

Tableau 6. Les différentes isoformes d'UCP chez les mammifères et leur localisation

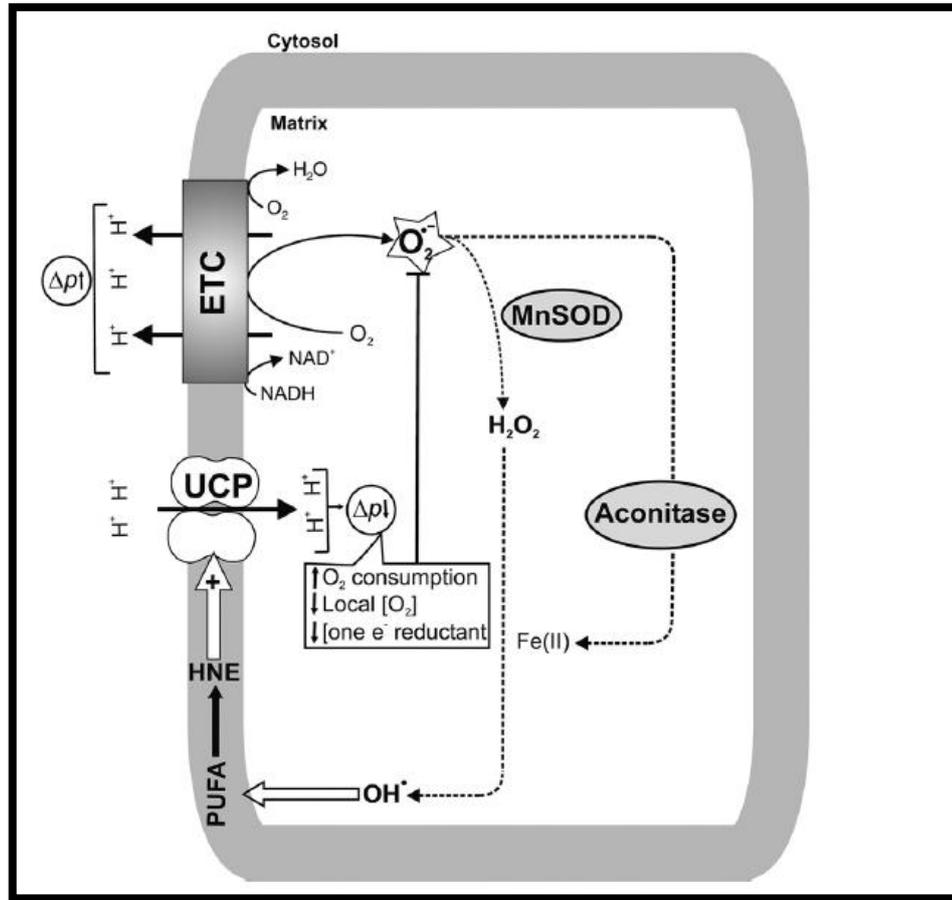


Figure 18. Mécanisme d'action hypothétique des UCP dans la diminution du taux de ROS dans la mitochondrie. D'après (Echtay 2007)

L'étude d'expression de gènes, d'activité enzymatique après traitement au X, ainsi que des dosages de ROS intracellulaires par cytométrie en flux seront les indicateurs d'une possible activité antioxydante de « X ».

IV.

*« Y » une formulation
naturelle à propriétés
hypolipidémiantes*

IV. « Y », une formulation naturelle à propriétés hypolipémiantes

IV.1. Rappels du contexte

IV.1.1. Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique, syndrome X ou encore syndrome de l'insulino-résistance, a été décrit dès 1988 par le Pr G.Reaven (Reaven 1988). Ce syndrome n'est pas une pathologie en soi mais un ensemble d'anomalies telles qu'une obésité abdominale, une hypertension artérielle ou une hyperglycémie. Cependant, la cause principale du syndrome est la résistance à l'insuline (Despres & Lemieux 2006). Le développement du syndrome métabolique est dû en partie à un mode de vie sédentaire, à une mauvaise alimentation associée à un manque d'activité physique. En Europe par exemple, 15% de la population adulte est affectée dont les femmes de plus de 60 ans et les hommes de plus de 50 ans (Hu *et al* 2004). Le syndrome métabolique est devenu un problème majeur de santé publique avec un essor chez les jeunes adultes. D'après l'étude DESIR (Données Epidémiologique sur le Syndrome d'Insulino-Résistance) réalisée en France auprès de 5000 volontaires entre 1994 à 2004, la fréquence d'apparition de facteurs de risques est plus importante dans la population nord-américaine par rapport à la population européenne et plus particulièrement en France (Gautier *et al* 2010). Enfin, cette étude a permis de mettre en évidence l'étroite relation qui existe entre ce syndrome et l'obésité à l'origine entre autres de pathologies cardio-vasculaires et du diabète de type II.

IV.1.2. Définition du syndrome métabolique

Définir le syndrome métabolique revient à étudier l'ensemble des signes physiopathologiques qui vont permettre d'établir un diagnostic simple et précis chez un individu.

Ce diagnostic varie quelque peu selon les pays ou les organismes de santé. Les critères préconisés (**Tableau 7**) par l'organisation mondiale de la santé (WHO : World Health Organization), puis simplifiés par NCEP/ATP III (National Cholesterol Education Program/ Adult Treatment Panel III), permettent de dire qu'il y a syndrome métabolique lorsqu'au moins trois des facteurs de risque suivants sont présents chez un patient :

- Surpoids/obésité (tour de taille):
♀ > 88 cm ♂ > 102 cm
- Hypertension artérielle :
> à 130 mm Hg /85 mm Hg
- Taux élevé de triglycérides :
≥ à 1,7 mmol/L (1,5 g/L)
- Faible taux de HDL :
< à 1 mmol/L (inf. à 0,39 g/L)
- Glycémie élevée :
> à 6,1 mmol/L (sup. 1,1 g/L)

| WHO ⁹ | ATP III ¹⁰ |
|--|---|
| One of the following | At least three of the following |
| Insulin resistance HOMA-IR ≥ 2.5 | Waist circumference Men >102 cm Women >88 cm |
| Impaired glucose tolerance 2 hour OGTT 8–11 mmol/l | Fasting triglycerides ≥1.7 mmol/l |
| Type 2 diabetes mellitus Fasting glucose ≥7 mmol/l or 2 hour OGTT ≥11 mmol/l | HDL cholesterol Men <1 mmol/l Women <1.3 mmol/l |
| Plus at least two of the following | Blood pressure ≥130/85 mm Hg |
| Blood pressure ≥140/9 mm Hg | |
| BMI ≥30 kg/m ² or | Fasting glucose ≥6.1 mmol/l |
| Waist to hip ratio Men >0.90 Women >0.85 | |
| Fasting triglycerides ≥1.7 mmol/l and/or | |
| Low serum HDL concentration Men <0.9 mmol/l Women <1 mmol/l | |
| Albumin creatinine ratio Men >2.5 mg/mmol Women >3.5 mg/mmol | |

HOMA, homeostasis model assessment; OGTT, oral glucose tolerance test; BMI, body mass index. HOMA-IR, fasting serum insulin (μU/ml) × fasting plasma glucose (mmol/l)/22.5.

Tableau 7. Les différents critères définissant le syndrome métabolique. D'après (Kolovou *et al* 2005)

IV.1.3. Syndrome métabolique et obésité

Le développement de l'obésité est fortement corrélé au développement du syndrome métabolique. On parle d'obésité si la masse grasse (masse adipeuse) est supérieure à 20% du poids total chez l'homme et chez la femme supérieure à 30% (Prasad *et al* 2011). Lors d'une prise alimentaire (sucres et graisse) le tissu adipeux blanc va stocker les acides gras sous formes de triglycéride (TG). L'accumulation excessive de TG va induire une hypertrophie des adipocytes à l'origine de l'obésité (Zhang *et al* 2012). Il existe différents phénotypes d'obésité caractérisés par des répartitions différentes de graisses au niveau du corps (**Figure 19**):

- Type I : Excès de graisses sans localisation préférentielle.
- Type II : **Obésité androïde** : excès de graisses présent au niveau du tronc et abdomen.
- Type III : **Obésité viscérale** : excès de graisses au niveau de l'abdomen.
- Type IV : **Obésité gynoïde** : excès de graisses au niveau des hanches et cuisses.

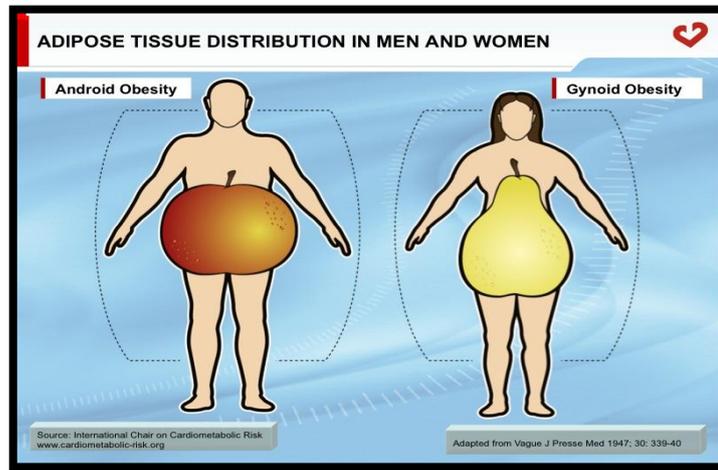


Figure 19. Représentation schématique du phénotype Androïde dit « pomme » chez l'homme et du phénotype Gynoïde dit « poire » chez la femme. D'après (<http://www.flickr.com/photos/57142493@N03/6830278641/>).

IV.1.4. Le tissu adipeux

Il existe deux types de tissus adipeux (TA) chez les mammifères : un TA brun (TAB) et un TA blanc (WAT). Le TA brun se différencie du TA blanc de par le nombre de mitochondries, plus importantes dans ce dernier d'où sa coloration brune. Le TAB est essentiellement présent chez les mammifères qui hibernent, les rongeurs et les nouveaux nés. Son rôle principal est de réguler la thermogénèse, mais de récentes publications montrent que le TAB pourrait jouer un rôle prépondérant dans le diabète de types 2 chez l'homme (Virtanen *et al* 2009).

Le TA blanc quant à lui, moins chargé en mitochondries, est responsable principalement du stockage de graisses sous formes de triglycérides qui serviront de source d'énergie pour d'autres organes tels que le muscle squelettique par exemple. Ce tissu est capable également de sécréter à la fois des cytokines (IL6, TNF α), des hormones (leptine, adiponectine) et des enzymes adipeuses (ATGL, HSL, MGLL) (Tableau 8).

| Produits sécrétés par le tissu adipeux | |
|--|--|
| <p>Métabolisme des lipides et lipoprotéines</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lipoprotéine lipase (LPL) • Cholesterol ester transfer protein (CETP) • Acylation stimulating protein (ASP) • Autotaxine (phospholipase D) • Retinol binding protein (RBP) • Prostaglandines | <p>Métabolisme et homéostasie énergétique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leptine • Adiponectine • Résistine • Interleukine-6, TNFα |
| <p>Homéostasie vasculaire/Angiogenèse</p> <ul style="list-style-type: none"> • VEGF • Leptine • Angiotensinogène • Tissue factor (TF) • Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) | <p>Inflammation-Immunité</p> <ul style="list-style-type: none"> • TNFα • Interleukines 1b, 6, 8, 10 ... • Leptine, Adiponectine • CRP, SAA, Haptoglobine • Facteurs du complément (B, D) • MCP-1, MIP-1α, MIF, ... • NGF, VEGF |
| <p>Matrice extracellulaire</p> <ul style="list-style-type: none"> • Collagènes • Métalloprotéases, TIMPs ... • Cathepsines (S, K) | |

Tableau 8. Listes des facteurs sécrétés par le tissu adipeux et leur cibles métaboliques. D'après (Guerre-Millo 2006)

IV.2. Syndrome métabolique, muscle squelettique et résistance à l'insuline

De nombreuses études soulignent l'implication du muscle squelettique dans le syndrome de l'insulino-résistance. En effet, lorsque l'apport en acides gras dépasse la capacité du stockage du tissu adipeux blanc, les acides gras vont s'accumuler au niveau d'autres organes tels que le foie ou le muscle squelettique (Martins *et al* 2012). Nous avons vu (cf I.3.2) que l'accumulation d'acides gras au niveau musculaire est responsable de la perturbation du signal insulinique empêchant la captation du glucose. De plus, les acides gras peuvent provoquer des altérations de la fonction mitochondriale à l'origine d'une diminution de la capacité oxydative du muscle (Hoeks & Schrauwen 2012). Afin d'améliorer la réponse insulinique au niveau du muscle lors du syndrome métabolique, il est nécessaire d'améliorer la capacité oxydative de ce dernier. Nous avons vu que PGC-1 α est au centre de l'homéostasie énergétique avec l'AMPK. Ce co-activateur a la possibilité d'activer des facteurs de transcription tels que les PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors). Ces derniers au niveau du muscle squelettique peuvent induire l'expression de gènes de l'oxydation des acides gras comprenant à la fois des enzymes de β -oxydation (Acads, Mcad, Vlcad) et des protéines de transport (FAT/CD36, FABP3) (Moreno *et al* 2010).

IV.3. Informations sur le produit

Le produit « Y » est un mélange naturel destiné à corriger les désordres de nature lipidique de sujets présentant un syndrome métabolique (**Tableau 9**).

L'équipe du Pr Norbert Latruffe dans laquelle j'ai participé, s'est intéressée à l'étude des mécanismes d'action de « Y » sur le métabolisme énergétique du muscle squelettique.

| Formulation « Y » | |
|---|--|
| Trace elements | |
| Iron | |
| Zinc | |
| Selenium enriched yeast (<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>) | |
| Vitamins | |
| Retinoids/carotenoids (vitamin A) | |
| Tocopherol (vitamin E) | |
| Thiamin (vitamin B1) | |
| Niacin (vitamin B3) | |
| Folic acid (vitamin B9) | |
| Ascorbic acid (vitamin C) | |
| Linoleic acid (vitamin F) | |
| Mineral elements | |
| Calcium | |
| Magnesium | |
| Sodium | |
| Oils | |
| Rapeseed oil (<i>Brassica Napus Oleum</i>) | |
| Olive oil (<i>Olea Oleum</i>) | |
| Grapeseed oil (<i>Acini Uva Oleum</i>) | |
| Evening Primrose (<i>Oenothera Biennis Oleum</i>) | |
| Cold seas fish oil (<i>Pisci Mare Fresca Oleum</i>) | |
| Plant extracts | |
| Copra (<i>Cocos Nucifera</i>) | |
| Garlic (<i>Allium Sativum</i>) | |
| Shiitake (<i>Lentinus Edodes</i>) | |
| Grape seed (<i>Vitis Vinifera</i>) | |
| Rock Samphire (<i>Critillum Maritimum</i>) | |
| Bladder wrack (<i>Fucus Vesiculosus</i>) | |
| Dulse (<i>Palmaria Palmata</i>) | |
| Carrageen moss (<i>Chondrus Crispus</i>) | |

Tableau 9. Composition de la préparation « Y »

Ce mélange naturel à activité hypolipémiante, a présenté de nombreux effets sur l'animal ainsi que chez l'homme d'après des informations non publiées. Tout d'abord chez les souris Ob/Ob (souris obèses mutées pour le récepteur de la leptine), « Y » a entraîné une augmentation de la consommation d'oxygène et un accroissement des performances physiques associées à une surexpression au niveau musculaire (**Figure 20**).

D'autres études portant sur des souris invalidées pour le récepteur LDL développant spontanément des plaques d'athérosclérose et sous régime « Y » ont montré :

- Une limitation de la prise de poids des souris (-20% après 9 semaines)
- Une diminution des aires athérosclérotiques
- Une forte diminution de la stéatose hépatique
- Une réduction de la masse grasse au profit de la masse maigre
- Une réduction du taux des triglycérides plasmatiques

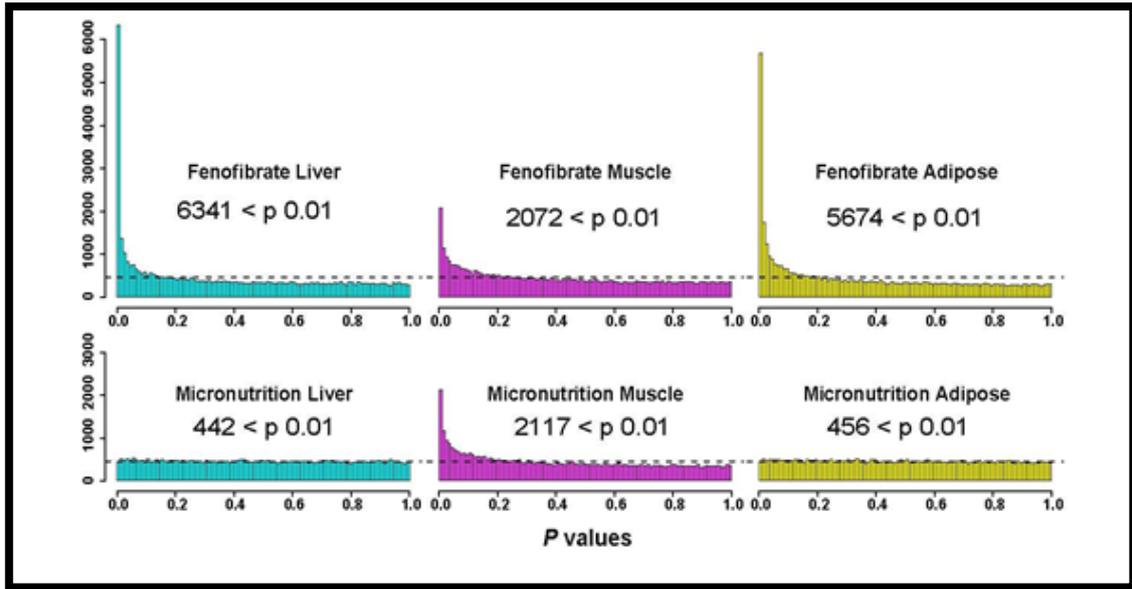


Figure 20. Comparaison du nombre de gènes exprimés (n) par traitement « Y » (micronutrition) ou par à un traitement au Fenofibrate, un hypolipidémiant agoniste de PPAR α chez des souris Ob/Ob par rapport à des souris témoins. (Données confidentielles transmises)

Chez l'Homme, des études précliniques (données confidentielles fournies) réalisées durant 5 et 12 semaines en régime « Y » et sur individus hyperlipidémiques ont montré une importante diminution plasmatique du taux de cholestérol total, du taux de cholestérol LDL ainsi que du taux de triglycérides, sans pour autant modifier significativement le taux de cholestérol HDL (Figure 21). Il apparaît donc que le muscle squelettique est un organe de choix dans la lutte contre le syndrome métabolique. Des formulations naturelles, par exemple à base de polyphénols (resvératrol) ou autre, associées à une activité sportive, apparaissent alors comme des thérapies possibles dans la lutte contre le syndrome métabolique.

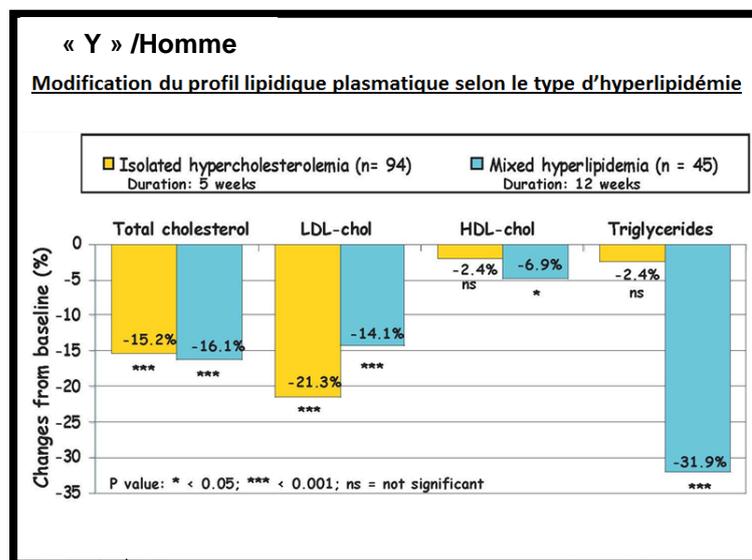


Figure 21. Profil lipidique après 5 semaines et 12 semaines de traitement « Y » (Données confidentielles transmises)

L'ensemble des travaux réalisés au laboratoire du Pr Walter Wahli a fait l'objet d'une publication scientifique (El Kochairi *et al* 2011).

Matériels et méthodes

I. Tissus, lignées et culture cellulaire

I.1. Modèle *in vivo*

Le modèle *in vivo* choisi au cours des différentes études est un modèle de souris de fond génétique C57BL6/J (**Figure 22**). C'est un modèle très utilisé en laboratoire, qui permet à la fois de reproduire et d'étudier des pathologies humaines telles que le diabète, les cancers.



Figure 22. Souris C57BL/6

Les animaux ont été traités par l'équipe du Dr L.Lagrost sur lesquels nous avons prélevé les muscles. Les souris ont reçu 4 régimes différents pendant 45 jours et 90 jours : un régime standard (SD), un régime SD+ « X », un régime riche ne calorie (High-Fat High-Sucrose = HFHS) et un régime HFHS+ « X » (**Tableau 10**).

| D01060501, D03062301, D10062601, -02 | | | | | | | | |
|---|-----------------|-------------|---------------|-------------|------------------|-------------|---------------|-------------|
| Rodent Diet With 10 kcal% Fat With Corn Starch or 60 kcal% Fat and Increased Sucrose and Same With Compound X | | | | | | | | |
| Product # | D01060501 | | D10062601 | | D03062301 | | D10062602 | |
| | Low Fat Control | | LF + X | | High Fat Control | | HF + X | |
| | gm% | kcal% | gm% | kcal% | gm% | kcal% | gm% | kcal% |
| Protein | 19.2 | 20 | 19.2 | 20 | 26.2 | 20 | 26.1 | 20 |
| Carbohydrate | 67.3 | 70 | 67.0 | 70 | 26.3 | 20 | 26.2 | 20 |
| Fat | 4.3 | 10 | 4.2 | 10 | 34.9 | 60 | 34.7 | 60 |
| Total | | 100 | | 100 | | 100 | | 100 |
| kcal/gm | 3.85 | | 3.83 | | 5.24 | | 5.22 | |
| Ingredient | gm | kcal | gm | kcal | gm | kcal | gm | kcal |
| Casein_80 Mesh | 200 | 800 | 200 | 800 | 200 | 800 | 200 | 800 |
| L-Cystine | 3 | 12 | 3 | 12 | 3 | 12 | 3 | 12 |
| Corn Starch | 575 | 2300 | 575 | 2300 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Maltodextrin 10 | 125 | 500 | 125 | 500 | 93.8 | 375.2 | 93.8 | 375.2 |
| Sucrose | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 400 | 100 | 400 |
| Cellulose, BW200 | 50 | 0 | 50 | 0 | 50 | 0 | 50 | 0 |
| Soybean Oil | 25 | 225 | 25 | 225 | 25 | 225 | 25 | 225 |
| Lard | 20 | 180 | 20 | 180 | 245 | 2205 | 245 | 2205 |
| Mineral Mix, S10026 | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| DiCalcium Phosphate | 13 | 0 | 13 | 0 | 13 | 0 | 13 | 0 |
| Calcium Carbonate | 5.5 | 0 | 5.5 | 0 | 5.5 | 0 | 5.5 | 0 |
| Potassium Citrate, 1 H2O | 16.5 | 0 | 16.5 | 0 | 16.5 | 0 | 16.5 | 0 |
| Vitamin Mix, V10001 | 10 | 40 | 10 | 40 | 10 | 40 | 10 | 40 |
| Choline Bitartrate | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| Compound X | 0 | 0 | 4.25 | 0 | 0 | 0 | 3.72 | 0 |
| FD&C Yellow Dye #5 | 0.025 | 0 | 0 | 0 | 0.025 | 0 | 0.05 | 0 |
| FD&C Red Dye #40 | 0.025 | 0 | 0.025 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FD&C Blue Dye #1 | 0 | 0 | 0.025 | 0 | 0.025 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 1055.05 | 4057 | 1059.3 | 4057 | 773.85 | 4057 | 777.57 | 4057 |

Research Diets, Inc. ConnatC06.for

6/24/10

**Tableau 10. Les différents régimes administrés aux souris.
(Données fournies par l'équipe du Dr Laurent Lagrost)**

Après sacrifice des animaux, trois muscles ont été prélevés sur les pattes arrières des souris et immédiatement congelés à sec dans l'azote liquide et stockés à -80°C:

Le *tibialis* qui est un muscle glycolytique.

Le *soleus* qui est un muscle oxydatif.

Le *gastrocnemius* qui est un muscle mixte.

Il a été décidé que seul le *gastrocnemius* (**Figure 23**) sera utilisé pour la suite de l'étude. Une partie de ces muscles a servi à l'étude de l'expression de gènes antioxydants et une autre à l'étude de l'activité SOD totale.



Figure 23. Gastrocnemius (patte arrière) de souris

I.2. Modèle *in vitro*

I.2.1. Cellules musculaires squelettiques murines C2C12

Obtenues à partir de souris femelles C3H au niveau de la cuisse, les cellules C2C12 sont une lignée myoblastique immortalisée (Yaffe & Saxel 1977). Ce sont des cellules adhérentes avec un temps de doublement d'environ de 12 heures. Arrivées à confluence, les cellules C2C12 sont capables de se différencier en myotubes, état proche des cellules de muscle squelettique *in vivo*. Elles peuvent ainsi acquérir des propriétés contractiles.

I.2.2. Conditions de culture des cellules C2C12

Les cellules C2C12 sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Ce milieu est composé entre autres : de glucose (4,5 g/L) supplémenté en glutamine (584 g/l). Un cocktail de 2 antibiotiques à 1% (Pénicilline (10,000 U/ml)/Streptomycine (10 mg/ml)) est ajouté ainsi que du sérum de veau fœtal (10%). Les cellules C2C12 sont maintenues dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. L'entretien est réalisé dans des boîtes de Pétri (80 cm²) toutes les 48 h.

Lorsque les cellules arrivent entre 50%-60% de confluence, elles sont lavées avec 5 ml de DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), puis trypsinées avec 2 ml d'une solution de trypsine 0,05 %/EDTA 0,02%.

Les cellules sont alors reprises dans 8 ml de milieu frais, puis centrifugées à 900 tpm pendant 5 min. Pour différencier les myoblastes en myotubes, le sérum de veau fœtal est remplacé par 2% de sérum de cheval (Sigma Aldrich, H1270-500ml) quand les cellules C2C12 atteignent 100% de confluence (Kubo 1991). Le milieu de différenciation est alors changé toutes les 48h pendant une semaine (**Figure 24**).

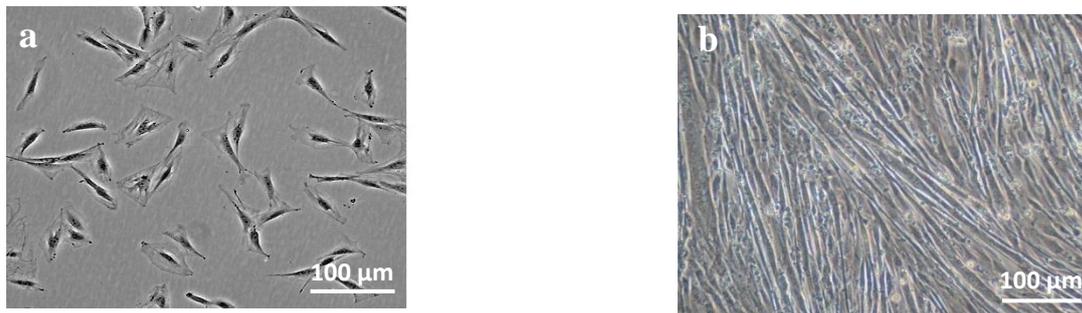


Figure 24. Morphologie des cellules C2C12 non différenciées (a: Myoblastes) et différenciées (b: Myotubes). D'après (Kaminski *et al* 2012)

I.2.3. Analyse morphométrique

L'analyse morphométrique a été réalisée sur les cellules C2C12 (myoblastes) après une cinétique au resvératrol (voir traitement au resvératrol). Les images ont été obtenues en utilisant un microscope inverse (Zeiss Axiovert 40 CFL x100, MicroImaging, Inc, Thornwood, NY, USA) combiné à la fois à une caméra (AxioCam1Cm1) et au logiciel Axiovision software. L'analyse morphométrique a été effectuée selon la méthode employée de Cicha 2011 (Cicha *et al* 2011), en mesurant l'index d'élongation (EI) ou $EI = (L-S)/(L+S)$ où L est la longueur de la cellule et S la largeur de la cellule. A chaque temps de traitement donné, plus de 150 cellules ont été mesurées par le logiciel ImageJ.

II. Traitements appliqués sur les cellules

II.1. Traitements des cellules C2C12 avec du resvératrol

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de pétri (80 cm²) à raison de 2500 cellules/cm², puis laissées adhérentes dans le milieu DMEM (voir conditions de culture). Après 24 h d'incubation, les cellules ont été mises en contact avec du milieu DMEM contenant du resvératrol* à la concentration finale de 20 μM.

Le resvératrol étant dissous dans l'éthanol, un contrôle correspondant à des cellules incubées avec un même volume d'éthanol 0,1% final a été effectué. Une cinétique a été ensuite réalisée allant de 2 h, 6 h, 12 h, 18 h et 24 h d'incubation avec le resvératrol. Les cellules ont été ensuite lavées au DPBS deux fois, puis lysées avec un tampon de lyse (RNeasy mini kit) et conservées à -80°C. Après l'extraction des ARN totaux, le niveau d'expression des ARNm des gènes de différenciation musculaire a été évalué par RT-qPCR.

* Préparation de la solution de resvératrol

La solution de resvératrol (Sigma Aldrich, R5010, 100 mg) a été solubilisée avec de l'EtOH 100% donnant une concentration mère de 30 mM. La solution ainsi reconstituée est protégée de la lumière et stockée à -20°C.

II.2. Traitements avec « X »

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri (80 cm²) à raison de 2500 cellules/cm² puis laissées adhérentes dans le milieu DMEM (voir conditions de culture). Après 24 h d'incubation, les cellules ont été mises en contact durant 24 h ou 48 h avec du milieu DMEM contenant à la fois un générateur de ROS** (5 mM final) et une solution X*** à une concentration finale comprise entre de 10 µg/ml et 50 µg/ml. Dans d'autres séries d'expériences, les cellules C2C12 ont été pré-traitées durant 24 h par du « X » à une concentration comprise entre 10 µg/ml et 50 µg/ml, avant de recevoir le milieu contenant le générateur de ROS en présence ou non de « X » pour une seconde période de 24 h.

Les cellules ont été ensuite lavées au DPBS deux fois, puis lysées avec un tampon de lyse RLT de RNeasy mini kit et conservées à -80°C. Après l'extraction des ARN totaux, le niveau d'expression des ARNm des gènes antioxydants a été évalué par RT-qPCR.

Préparation de la solution « générateur KRL » = générateur de ROS (AAPH).

** La solution de générateur de ROS a été reconstituée avec du PBS 1X stérile donnant une solution mère de 100 mM, permet de générer des radicaux hydroxyl et peroxy.

*** La solution « X » a été reconstituée à partir d'une poudre « X » (20 mg) et a été solubilisée dans 1 mL de milieu DMEM. La solution « X » est ensuite protégée de la lumière, agitée pendant la nuit et enfin filtrée (20 µm).

L'ependorff contenant le culot de la solution « X » est séché puis nous pesons l'excédent de poudre non dissoute. Ainsi, nous obtenons une solubilisation de la poudre « X » de plus de 90%.

II.3. Traitement avec « Y »

Les cellules C2C12 ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri à raison de 2500 cellules/cm² puis laissées adhérentes dans le milieu DMEM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été mises en contact avec du milieu DMEM contenant quatre concentrations différentes de « Y »**** : 0,04 pg/ml, 0,4 pg/ml, 4 pg/ml, 40 pg/ml 0,1% EtOH final.

Des témoins absolus ainsi que des témoins 0,1% EtOH ont été réalisés et les différents traitements + témoins ont été incubés à 37°C pendant 24 h ou 48 h. Les cellules ont ensuite été lavées au DPBS 1X deux fois, puis lysées avec un tampon de lyse (RNeasy mini kit) et conservées à -80°C. Après l'extraction des ARN totaux, le niveau d'expression des ARNm des gènes du métabolisme énergétique musculaire a été évalué par RT-qPCR.

Préparation de la solution de « Y »

**** L'éthanol a été choisi après différents tests de solubilisation comme le meilleur solvant de « Y ». A partir d'une solution mère de 790 µg/L, ont été réalisées les solutions de traitements de 0,04 pg/ml, 0,4 pg/ml, 4 pg/ml, 40 pg/ml 0,1% EtOH final.

III. Transcription inverse et Réaction en chaîne par polymérisation (RT-qPCR)

III.1. Extraction d'ARN totaux à partir de tissus

L'extraction des ARN totaux des tissus (*gastrocnemius*) a été réalisée au moyen du kit d'extraction « RNeasyFibrous Tissue » de QIAGEN. Un échantillon de tissu (environ 30 mg) a été placé dans un tube eppendorf de 2 ml contenant 300 µl de tampon de lyse RLT. Les échantillons sont rapidement broyés par l'intermédiaire du « TissueRuptor de Qiagen ».

Cinq cents quatre-vingt-dix µl d'eau sans RNase ainsi que 10 µl de solution de protéinase K sont ajoutés au lysat et homogénéisés à l'aide d'une pipette.

Une incubation est alors effectuée à 55°C pendant 10 min. Après centrifugation (10000 g, 3 min, T°C ambiante), la phase supérieure qui contient les ARN a été transférée dans un nouvel Eppendorf de 2 ml auquel on ajoute 450 µl d'EtOH 100%, homogénéisé à l'aide d'une pipette.

Sept cents µl du lysat sont transférés sur la colonne RNeasy Mini spin. Les colonnes sont centrifugées à 8000 g pendant 20 sec. La même étape est effectuée avec le reste du lysat. Une étape de lavage a été réalisée avec du tampon RW1[®] (350 µl). La colonne a été de nouveau centrifugée à 8000 g pendant 20 sec et une étape de digestion à la DNase a été réalisée en incubant la colonne avec de la DNase (Qiagen) diluée dans du tampon RDD[®] pendant 20 min à T°C ambiante. Les colonnes ont été rincées puis éluées au moyen respectivement, de tampon RW1[®] (350 µl) et de

tampon RPE[®] (500 µl deux fois). Les colonnes sont transférées dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml et les ARN ont été élués avec 30 µl de H₂O « RNase-free » à 8000 g pendant 1 min.

III.2. Extraction d'ARN totaux à partir de cellules

L'extraction des ARN totaux des tissus a été réalisée au moyen du kit d'extraction « RNeasy mini kit » de QIAGEN à partir de 2500 cellules/cm². Après un lavage au DPBS deux fois, les cellules en culture ont été lysées à l'aide du tampon de lyse RLT[®] (600 µl) de Qiagen. Les culots sont congelés à -80°C. Lors de l'extraction, les culots ont été lysés mécaniquement à l'aide d'une seringue. Six cents µl d'EtOH 70% ont été ajoutés au lysat et homogénéisés à l'aide d'une pipette afin de précipiter les ARN. Sept cents µl ont été transférés sur colonne RNeasy Spin puis centrifugé à 8000 g pendant 20 sec. La même étape est réalisée avec le reste du lysat. Une première étape de lavage a été effectuée avec 700 µl du tampon RW1, puis une seconde avec 350 µl du tampon RW1[®] à 8000 g pendant 20 sec. Une étape de digestion à la DNase a été ensuite réalisée en incubant la colonne avec de la « RNase free DNase » (Qiagen) diluée dans du tampon RDD[®] pendant 20 min à T°C ambiante. Les échantillons ont été lavés avec 350 µL de tampon RW1[®], puis avec 500 µL de tampon RPE[®] (deux fois) à 8000 g pendant 20 sec.

La colonne a été transférée dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml et les ARN ont été élués avec 30 µl de H₂O « RNase-free » à 8000 g pendant 1 min.

La qualité des ARN purifiés a été vérifiée par analyse électrophorétique sur gel d'agarose 1 % préparé dans du tampon MOPS (acide 3-N-morpholino-propane sulfonique) 20 mM, acétate de sodium 5 mM, EDTA 1mM, pH 7) contenant du bromure d'éthidium. Les échantillons ont été chauffés à 70°C pendant 10min avant le dépôt (1µg d'ARN + ^xtampon de charge V/V) sur gel d'agarose 1%. Les ARN ont été visualisés après exposition du gel sur table UV.

^xLe tampon de charge contient :

- 95% formamide
- 0,025% SDS
- 0,025% Blue de bromophénol
- 0,025% xylene cyanol FF
- 0,025% Ethidium bromide
- 0,5 mM EDTA

III.3. Dosage des ARN totaux

Les ARN totaux extraits ont été dosés par spectrophotométrie avec un spectrophotomètre UV1800 Shimadzu sur cellule Traycell de Hellma.

L'absorbance a été mesurée entre 240 nm et 320 nm de longueur d'onde, 260 nm correspondant à l'absorption maximale des acides nucléiques. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg d'ARN totaux/ml. Enfin, le ratio 260 nm/280 nm doit être compris entre 1,8 et 2,2.

III.4. Transcription inverse

La transcription inverse est la synthèse d'ADN complémentaire (ADN_c) monobrin à partir des ARN totaux extraits. La réaction a été réalisée avec le kit iScript cDNA Synthesis kit dans un volume total de 20 µl. Le mélange contenait 1 µg d'ARN, 1 µl iScript reverse transcriptase, 4 µl 5x iScript reaction mix (contenant à la fois des oligo(dT) et des random hexamer primers), et le mélange réactionnel a été complété à 20 µl avec de l'eau ultrapure. Le mélange a été chauffé à 25°C pendant 5 min, puis à 42°C pendant 1h, et enfin à 85°C pendant 5 min. Les produits de RT ont été ensuite conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

III.5. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

On mesure lors de la PCR en temps réel la quantité d'ADN synthétisé grâce à la fluorescence émise par un fluorophore qui s'intercale entre les brins de l'ADN néosynthétisé au cours de la réaction de PCR.

Le fluorophore utilisé au cours de cette réaction est le MesaGreen (Mesa Green qPCRMasterMix Plus for SYBR assay w/fluorescein d'Eurogentec). La PCR quantitative est utilisée ici sur les produits issus de l'étape de transcription-inverse. Pour un couple d'amorce dont l'efficacité est proche de 100%, la quantité d'ADN néosynthétisé est directement dépendante de la quantité de matrice initiale.

Utilisées dans une expérience de RT-QPCR, les quantités relatives synthétisées sont considérées comme refléter les quantités relatives d'ARN initiales en supposant que les efficacités de transcription inverse sont identiques entre molécules d'ARNm.

Les amorces d'origine murine utilisées pour chacun des gènes amplifiés ont été choisies grâce à la base de données PrimerBanK (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Le gène de référence utilisé est le gène 36B4 ou RPLP0 dont la séquence est très conservée entre différentes espèces.

Chaque couple d'amorce a été confronté à la base de séquences génomiques de souris grâce au logiciel BLAST, puis analysé sur le site DNACalc de Sigma (<http://www.sigma->

genosys.com/calc/DNACalc.asp) afin de vérifier si des structures secondaires (épingle à cheveux) pouvaient exister, ce qui aurait pour conséquence de réduire la spécificité de la PCR.

III.6. Préparations des échantillons

La réaction de transcription inverse de 20 µl a été diluée avec de l'eau dans un volume final de 100µl. A partir de ces échantillons, une gamme de dilution a été réalisée pour servir de standard pour la réaction de qPCR. Un volume de 25 µl de chacun des échantillons a été prélevé et mélangé aux autres pour constituer le premier point de gamme, nommé arbitrairement 1 (100%). Les points suivants de la gamme ont été obtenus par dilutions en cascade au ½ et ont donné les points «1/2», «1/4», « 1/8 », « 1/16 », « 1/32 » et « 1/64 ». Les 75 µl de produit de RT restant ont été complétés avec de l'eau ultrapure pour donner un volume final de 300 µl.

III.7. Polymérisation en chaîne quantitative

Chaque échantillon a été analysé en double dans des plaques 96 puits (AppliedBiosystems). Le volume réactionnel dans chaque puits est de 25 µl et est constitué de la manière suivante : 12,5 µl de « Mesa Green qPCRMasterMix Plus for SYBR assay w/fluorescein d'Eurogentec », 5 µl d'ADNc (produit de RT dilués) et 330 nM de chaque amorce.

La PCR débute par une étape de chauffage à 95°C pendant 10 min, suivie de 40 cycles de dénaturation de 15 sec à 95°C et 1 min d'hybridation à 60°C. La spécificité de l'amplicon a été évaluée par la « melting curve » (**Figure 25**) ou courbe de fusion qui permet de déduire la température de fusion (T_m) spécifique d'un amplicon donné. Durant cette étape, la température est élevée lentement de 55°C à 95°C par palier de 0,5°C toutes les 10 sec. Lorsque la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, ce qui provoque la libération du fluorophore et donc la diminution progressive de la fluorescence.

Quand 50 % de l'ADN double brin ont été dissociés la fluorescence chute brutalement, cela correspond à la T_m du produit synthétisé. Un seul pic d'intensité est observé sur la courbe de fusion, lorsqu'un produit unique est synthétisé.

L'efficacité d'amplification (E) est définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification. Pour que la PCR soit exploitable, l'efficacité doit être comprise entre 90% et 105%. Cette droite d'étalonnage a pour équation $C_t = \log(\text{facteur de dilution}) + C_t \text{ ADN}_c \text{ non dilués}$.

Le C_t (« cycle threshold » ou cycle seuil) est défini comme la valeur du cycle pour laquelle la quantité de fluorescence dépasse de manière significative le seuil de détection de l'appareil.

En parallèle à cette gamme d'étalonnage, les échantillons sont amplifiés et les valeurs de Ct obtenues sont reportées sur la droite standard (**Figure 26**).

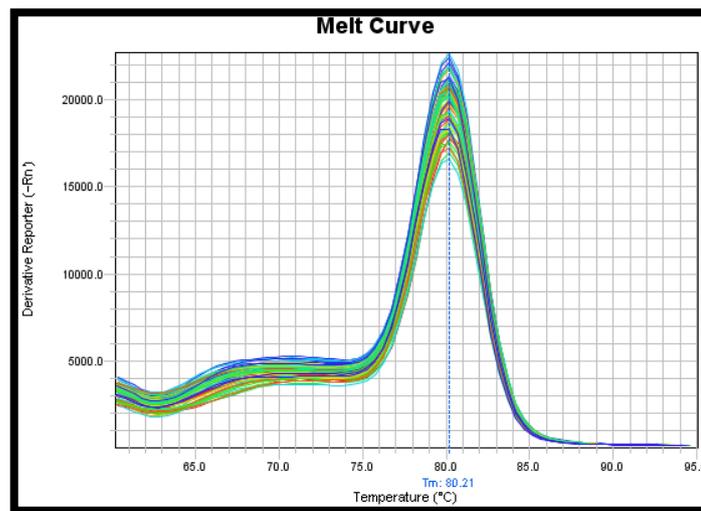


Figure 25. Courbe de fusion représentant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la T°C.

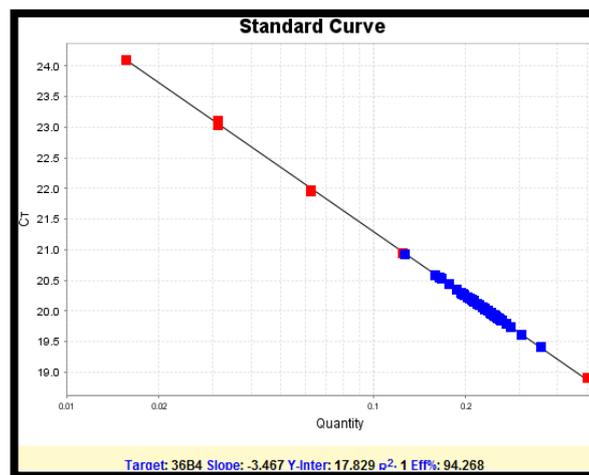


Figure 26. Courbe d'étalonnage obtenue après dilution en série des échantillons. L'abscisse correspond à la concentration en ADN_c et l'ordonnée donne la valeur de Ct. La courbe d'étalonnage permet d'avoir aussi l'efficacité de la PCR

III.8. Analyse quantitative de l'expression des ARNm

La quantification relative des résultats de PCR en temps réel a été analysée par le logiciel REST (<http://www.gene-quantification.de/rest-paper.html>). Ce logiciel calcule l'expression relative des différents gènes en incluant à la fois l'efficacité (E) de la PCR et une normalisation des résultats par rapport à un gène de référence, dans notre cas le gène 36B4 (**Figure 27**). REST (Pfaffl *et al* 2002) intègre aussi un test statistique ANOVA avec un algorithme de randomisation permettant d'observer si des variations des valeurs moyennes de Ct entre deux groupes sont significativement différentes.

$$\text{Ratio} = \frac{E \text{ Target}^{\Delta\text{Ct Target (control-sample)}}}{E \text{ Reference}^{\Delta\text{Ct Reference (control-sample)}}$$

Figure 27. Formule du calcul du niveau d'expression d'un gène par le logiciel REST

L'étude avec le resvératrol a permis de mesurer les expressions d'ARNm de gènes de la différenciation musculaire (**Tableau 11**).

L'étude avec « X » a permis de mesurer l'expression d'ARNm de gènes antioxydants (**Tableau 12**).

L'étude avec la « Y » a permis de mesurer l'expression d'ARNm de gènes du métabolisme énergétique (**Tableau 13**).

| Gène | Séquences des amorces | NCBI Locus |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>Csrp3</i> | Forward: CACAGACACTGGCGAGCAT | NM_013808.4 |
| | Reverse: GCTTTGGGGATTGTTGGAAGT | |
| <i>Mef2A</i> | Forward: CCTGTGACCAGCCCTAATGC | NM_001033713.1 |
| | Reverse: ACTCCCTGGGTTAGTGTACGA | |
| <i>Mef2B</i> | Forward: AGGCTCCACAGATTGCAGC | NM_001045484.1 |
| | Reverse: TACAGCGTCCCTCGTTGGT | |
| <i>Mef2C</i> | Forward: ACGAGGATAATGGATGAGCGT | NM_025282.3 |
| | Reverse: ATCAGTGCAATCTCACAGTCG | |
| <i>Mef2D</i> | Forward: AAGGGTTTCAACGGCTGTGA | NM_133665.3 |
| | Reverse: GCCGGTACTTGTCTCCAG | |
| <i>Myf5</i> | Forward: AGACGCCTGAAGAAGGTCAA | NM_008656.5 |
| | Reverse: ACCTTGGGGAGTCTCTGGTT | |
| <i>Myod1</i> | Forward: ATGATGACCCGTGTTTCGACT | NM_010866.2 |
| | Reverse: CACCGCAGTAGGGAAGTGT | |
| <i>Myogenin</i> | Forward: CGATCTCCGCTACAGAGGC | NM_031189.2 |
| | Reverse: GTTGGGACCGAAGTCCAGT | |
| <i>Srf</i> | Forward : CCAGGTGTCGGAATCTGACAG | NM_020493.2 |
| | Reverse: GCTGACTTGCATGGTGGTAGA | |
| <i>36B4</i> | Forward: CGACCTGGAAGTCCAACACTAC | NM_007475.5 |
| | Reverse: ATCTGCTGCATCTGCTTG | |

Tableau 11. Séquences des amorces utilisées pour l'étude de la différenciation musculaire avec le resvératrol.

Forward : sens

Reverse : anti-sens

NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

| Gène | Séquences des amorces | NCBI Locus |
|--------------|------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Sod1</i> | Forward: GACCTGGGCAATGTGACTGCTG | NM_011434.1 |
| | Reverse: CACCAGTGTACGGCCAATGATG | |
| <i>Sod2</i> | Forward: ATTAACGCGCAGATCATGCAG | NM_013671.3 |
| | Reverse: CTGAGTTGTAACATCTCCCTTGG | |
| <i>Ucp2</i> | Forward: CAAGTCTCCACGACCCATTT | NM_011671.4 |
| | Reverse: TTCACAGCTGCCAGACAATC | |
| <i>Ucp3</i> | Forward: GCCTTCTCTCTCGGAGGTTT | NM_009464.3 |
| | Reverse: GAGAGCAGGAGGAAGTGTGG | |
| <i>Nrf1</i> | Forward: AGCACGGAGTGACCCAAAC | NM_001164229.1 |
| | Reverse: TGTACGTGGCTACATGGACCT | |
| <i>Nrf2</i> | Forward: TAGATGACCATGAGTCGCTTGC | NM_010902.3 |
| | Reverse: GCCAAACTTGCTCCATGTCC | |
| <i>Gpx</i> | Forward: CCCTAGGAGAATGGCAAG | NM_008160.6 |
| | Reverse: CAGAGTGCAGCCAGTAATCACCAAG | |
| <i>Pgc1a</i> | Forward: AGACGGATTGCCCTCATTTGA | NR_027710.1 |
| | Reverse: TGTAGCTGAGCTGAGTGTGG | |
| <i>Sirt1</i> | Forward: ATGACGCTGTGGCAGATTGTT | NM_019812.2 |
| | Reverse: TTTCCGCTTTGGTGGTTCTGA | |
| <i>36b4</i> | Forward: CGACCTGGAAGTCCAACACTAC | NM_007475.5 |
| | Reverse: ATCTGCTGCATCTGCTTG | |

Tableau 12. Séquences des amorces utilisées pour l'étude du stress oxydant avec « X ».

| Gène | Séquences des amorces | NCBI Locus |
|-----------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Ppara | Forward: CTGAACATCGAGTGTCTGAATAT | NM_011144.6 |
| | Reverse: GGTCTTCTTCTGAATCTTGCAGCT | |
| Pparβ | Forward: TTGAGCCCAAGTTTCGAGTTTG | NM_011145.3 |
| | Reverse: CGGTCTCCACACAGAATGATG | |
| Pparγ | Forward: CACAATGCCATCAGGTTTGG | NM_011146.3 |
| | Reverse: CTGGTCGATATCACTGGAGATC | |
| Srebp1c | Forward: GAGGCGGCTCTGGAACAGA | NM_011480.3 |
| | Reverse: TGTCTTCGATGTCTGTTCAAACC | |
| Srebp2 | Forward: CTGCAGCCTCAAGTGCAAAG | NM_033218.1 |
| | Reverse: CAGTGTGCCATTGGCTGTCT | |
| Gs1 | Forward: GAACGCAGTGCTTTTCGAGG | NM_030678.3 |
| | Reverse: CAGATAGTAGTTGTCAACCCAT | |
| Acads | Forward: GGCACGGAGTTTCAGTGTTT | NM_007383.2 |
| | Reverse: TCTACAGCAGAACACGCACC | |
| Mcad | Forward: ATCTGCAAAGTCTTACAGGGC | NM_054094.5 |
| | Reverse: TCCTCAGGTGAATCATGGTCA | |
| Vlcad | Forward: GGAGGACGACACTTTGCAGG | NM_017366.2 |
| | Reverse: AGCGAGCATACTGGGTATTAGA | |
| Fat/Cd36 | Forward: ATGGGCTGTGATCGGAACTG | NM_007643.4 |
| | Reverse: GTCTTCCAATAAGCATGTCTCC | |
| Fabp3 | Forward: GACGAGGTGACAGCAGATGA | NM_010174.1 |
| | Reverse: TGCCATGAGTGAGAGTCAGG | |
| Cpt1β | Forward: CGAGGATTCTCTGGAAGTGC | NM_009948.2 |
| | Reverse: GGTCGCTTCTTCAAGGTCTG | |
| Acox1 | Forward: AAGTCCCTCTGTATAGATTGGCA | NM_028765.3 |
| | Reverse: CCTTGGCAGACAACACACTC | |
| Scap | Forward: CTGCCATTGTCTGCAACTTT | NM_001103162.1 |
| | Reverse: ACCTGCCTTCAGTCCAGTTT | |
| Pgc1α | Forward: AGACGGATTGCCCTCATTTGA | NR_027710.1 |
| | Reverse: TGTAGCTGAGCTGAGTGTGG | |
| 36B4 | Forward: CGACCTGGAAGTCCAACACTAC | NM_007475.5 |
| | Reverse: ATCTGCTGCATCTGCTTG | |

Tableau 13. Séquences des amorces utilisées pour l'étude du métabolisme énergétique avec « Y ».

IV. Analyse des protéines par électrophorèse et immunoblotting

IV.1. Préparation et dosage à partir d'extraits protéiques

Les cinétiques de traitement avec le resvératrol sur les myoblastes et myotubes ainsi que les différents contrôles ont été réalisés dans des boîtes de Pétri (80 cm² de diamètre), ensemencées initialement à 2500 cellules/cm². A l'issue du traitement, les cellules ont été lavées au DPBS deux fois, puis lysées durant 30 min sur la glace dans du tampon RIPA (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NaF 50 mM, SDS 0,1%, désoxycholate de sodium 0,5%, NP40 1%, pH 8) contenant des inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics). Le surnageant constituant l'extrait protéique a ensuite été récupéré puis centrifugé à 20000 g pendant 15 min à 4°C.

Les concentrations protéiques ont été mesurées selon la méthode BCA (« Bicinchoninic Acid »), en plaque 96 puits, contre une gamme de BSA allant de 1 µg/puits à 20 µg/puits. Le volume final de chaque essai est de 225 µl comprenant 200 µl de réactif (acide bicinchiniquique (réactif A) : Cu²⁺ (réactif B), 50 :1) et 25 µl d'extrait protéique. La plaque est incubée à 37°C pendant 30 min, puis l'absorbance est lue à 570 nm. Le blanc a été fait sur 200 µl de réactif auxquels sont ajoutés 25 µl de RIPA.

IV.2. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturante SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Cinquante microgrammes de protéines ont été repris dans un tampon dénaturant (Tris HCl 250 mM, glycérol 40%, β-mercaptoéthanol 20%, SDS 10%, pH 6,8, bleu de bromophénol 0,003%). Un gel de séparation entre 8 et 14% d'acrylamide/bisacrylamide (38:1) et d'épaisseur 1,5 mm a d'abord été coulé dans un système d'électrophorèse MiniPROTEAN (BioRad), puis un gel de concentration de 4% est ajouté. Cinquante microgrammes de protéines ont été déposés sur le gel de 4% (Tris HCl 125 mM, SDS 0,1%, acrylamide/bisacrylamide 4%, pH 6,8), puis la migration est réalisée à 50 V dans le gel de concentration, puis à 120 V dans le gel de séparation dans un tampon de migration SDS, Tris et Glycine pH 8,8.

IV.3. Electrotransfert et immunodétection

Après leur séparation, les protéines sont transférées sur membrane PVDF (polyvinylidènefluoride) à 50 V dans un tampon de transfert Tris 50 mM /Borate 100 mM pendant deux heures à température ambiante.

Les membranes obtenues ont été incubées durant une heure dans une solution de saturation (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) à laquelle a été ajouté du lait délipidé 5%.

Les membranes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire, dirigé spécifiquement contre la chaîne lourde de la myosine (Millipore, Réf 05-716, IgG de souris) ou contre la β tubuline (Ozyme, Réf 2128S, IgG de lapin) dans une solution de saturation (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) contenant du lait délipidé 5%, sur la nuit à 4°C sous agitation.

Le lendemain, les membranes ont été rincées trois fois 5 minutes à chaque fois avec du PBS 1X 0,1% tween-20, puis incubées pendant 1 h à température ambiante sous agitation en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (Santa Cruz, anti-IgG de souris, Réf sc 2005, anti-IgG de lapin, Réf sc 2004, 200 μ g/0,5 ml) dilué au 1/10000 dans la solution de saturation (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) contenant du lait délipidé 5%. Enfin, les membranes ont encore été une fois lavées pendant 5 min avec du PBS1X 0,1% tween-20, puis révélées par chimioluminescence en présence d'un substrat à base de luminol (Santa Cruz, Immuno Cruz, Réf sc 2048). La détection de la chimioluminescence a été effectuée avec le ChemiDoc XRS+ System de Biorad. L'Image Lab software de Biorad a permis de faire l'analyse par densitométrie.

V. Mesure de l'activité enzymatique Superoxyde Dismutase (SOD) totale

L'activité enzymatique a été mesurée sur les mêmes muscles qui ont servi à l'étude de l'expression de gènes antioxydants. Dix muscles par régime ont été choisis aléatoirement et pesés afin d'avoir 20 mg de tissu. Chaque muscle a été placé dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant 500 μ l de tampon de lyse glacé (sucrose 0,25 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4). Les tissus ont été ensuite broyés à l'aide du TissueRuptor de Qiagen afin d'obtenir un lysat homogène. Le lysat tissulaire a été centrifugé à 10000 g pendant 15 min à 4°C et le surnageant a été transféré dans un nouvel Eppendorf, puis dilué avec de l'eau ultrapure pour le dosage des protéines avec le kit BCA. Le dosage de l'activité SOD totale a été effectué avec le Kit : « *SOD Assay Kit – WST* » des laboratoires Dojindo (Japon). Celui-ci permet le dosage de l'activité SOD par méthode colorimétrique à 450 nm. Le principe du dosage repose sur l'inhibition par la SOD de l'oxydation du WST (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, sel monosodique), via la prise en charge des anions superoxydes (**Figure 28**). L'activité SOD sera exprimée en U/ μ g de protéine.

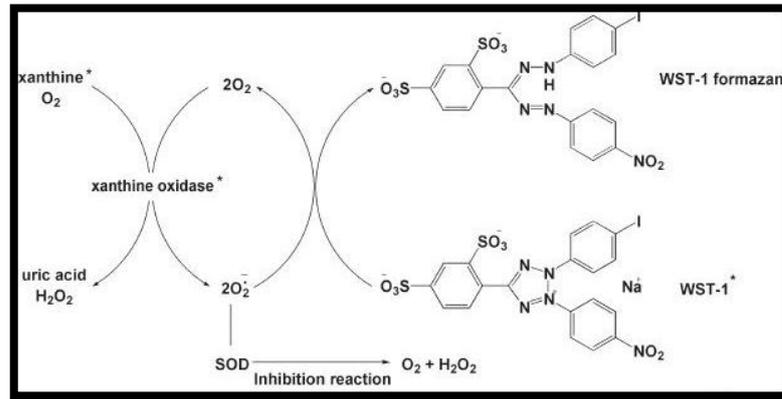


Figure 28. Principe du dosage de l'activité SOD

VI. Etude cytotoxique

VI.1. Test de viabilité au bleu trypan

Dans un premier temps, un test de viabilité au Bleu Trypan a été réalisé pour chaque composé. Celui-ci permet de distinguer et de réaliser un comptage de deux populations de cellules, l'une colorée en bleu représentant les cellules mortes et l'autre réfringente et transparente représentant la population de cellules vivantes.

VI.2. Test au crystal violet

Le Crystal violet est un colorant spécifique du noyau. Après traitement, les cellules ont été lavées au PBS 1X, puis fixées et colorées par une solution de crystal violet (crystal violet 0,5% (m/V), méthanol : eau (1/4 v/v)) pendant 5 min. Elles ont été lavées trois fois à l'eau ultrapure. Le Crystal violet incorporé dans les noyaux a ensuite été dissout par ajout d'une solution contenant du citrate de sodium (0,1 M) et 50% éthanol absolu. Après 30 min d'incubation à température ambiante sous agitation, l'absorbance de la solution a été lue à 450 nm. L'absorbance du contrôle a été rapportée à 100% et les absorbances mesurées pour les échantillons traités ont été exprimées en pourcentage du contrôle.

VI.3. Dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH)

Tous les dosages de LDH ont été effectués sur les milieux de culture après les différents temps de traitements. Selon l'étude, deux témoins positifs ont été utilisés pour induire la mort cellulaire et donc le relargage de LDH dans le milieu de culture, soit du Triton X 100 à 0,1% final, soit du 7-cétocholestérol à 40 µg/ml. Tous les dosages de LDH ont été réalisés au plateau technique du Bocage (Hôpital de Dijon) sous la direction de Mme L. Duvillard.

VII. Cytométrie en flux

La dernière technique utilisée pour étudier la cytotoxicité est la cytométrie en flux.

VII.1. Marquage au IP et DIOC(6)₃

Après traitement des cellules C2C12 non différenciées par « Y », des doubles marquages avec des sondes fluorescentes ont été effectuées avec IP (5 µg/ml, Sigma Aldrich) + DIOC(6)₃ (40 nM, Molecular Probes, Invitrogen) (Figure 29). Deux sondes, marqueurs de l'état cellulaire ont été utilisées :

- IP (Iodure de Propidium) → Identifie l'altération membranaire, ne pénètre que dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire.
- DIOC(6)₃ → Mesure la polarisation mitochondriale

Grâce à ce procédé nous avons pu distinguer différentes populations cellulaires en fonction de leur taille (FSC), de leur granularité relative (SSC) et de leur intensité de fluorescence (FL).

Les cellules et le surnageant sont récupérés après traitement puis lavés et incubés avec le DIOC(6)₃ à 40 nM final pendant 15 min à 37°C. Après incubation, 5 µg/ml d'IP sont ajoutés et 10000 cellules sont analysées avec le cytomètre.

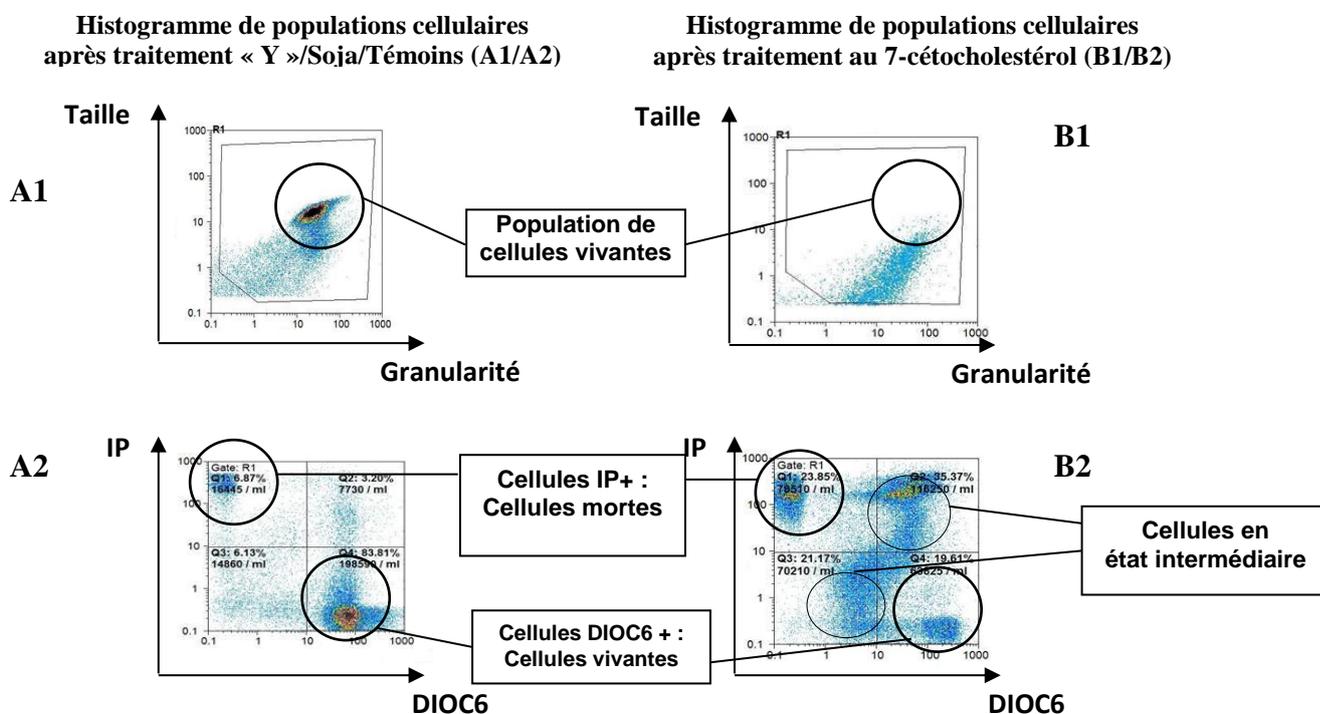


Figure 29. Histogramme de cytométrie en flux des cellules C2C12 après double marquage IP/DIOC(6)₃.

Les analyses de cytométrie en flux ont été effectuées sur un « Galaxy de Partec » équipé d'un laser solide bleu 488 nm comme source d'excitation. La fluorescence de l'IP a été mesurée sur le canal FL3 équipé d'un filtre 630/15 nm. La fluorescence du DIOC(6)₃ a été mesurée sur le canal FL1 équipé d'un filtre 527/30 nm.

VII.2. Dosage de ROS intracellulaires avec sonde DHE (dihydroéthidine)

Le principe de ce dosage repose sur la formation du bromure d'éthidium à partir de l'hydroéthidine (2 μ M, Molecular Probes, Invitrogen) en présence d'anions superoxyde (**Figure 30**). Par conséquent, ce dosage permet de doser indirectement la quantité d'anions superoxyde intracellulaires.

Les cellules et le surnageant sont récupérés après traitement puis lavés et incubés avec la sonde DHE à 2 μ M finale pendant 15 min à 37°C. Après incubation 10000 cellules sont analysées au cytomètre.

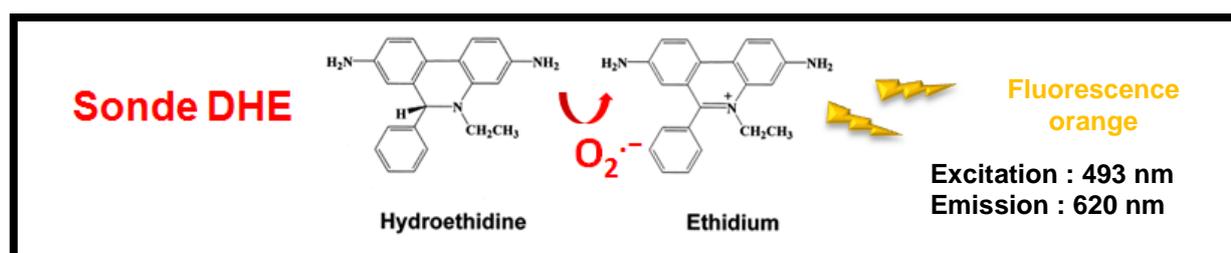


Figure 30. Représentation schématique du dosage des anions superoxyde

Les analyses de cytométrie en flux ont été effectuées sur un « Galaxy de Partec », grâce au logiciel FlowMax[®] équipé d'un laser solide bleu 488 nm comme source d'excitation. La fluorescence de Bromure d'éthidium a été mesurée sur le canal FL2 équipé d'un filtre 590/30 nm.

VIII. Evaluation de « Y » comme possible activateur de PPAR α ou PPAR γ par transfection transitoire C2C12.

Trois plasmides différents ont permis d'étudier les mécanismes d'actions possibles de « Y » (**Figure 31a/b**) : un plasmide appelé pfr LUC servira à l'analyse de l'activité luciférase, et deux plasmides appelés arbitrairement PPAR α et PPAR γ en raison de la présence des séquences codantes de ces gènes sur le plasmide pcDNA3,1/GBH reverse pri.

L'ensemble des plasmides servira à co-transfecter les cellules C2C12 afin d'étudier une possible activité PPAR par lecture de l'activité luciférase (**Figure 32**).

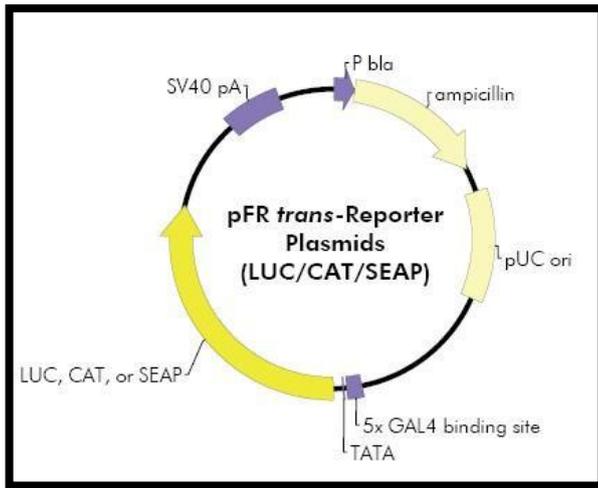


Figure 31a. Le plasmide pfr LUC

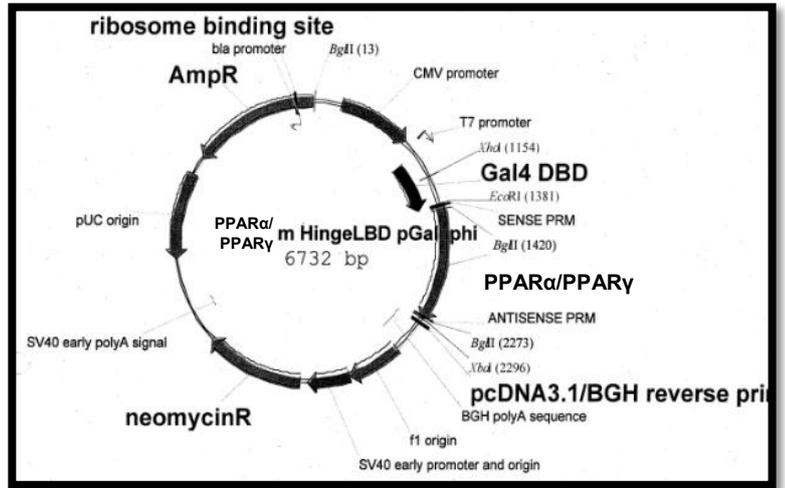


Figure 31b. Le plasmide pcDNA 3.1 contenant les séquences de PPAR α ou PPAR γ

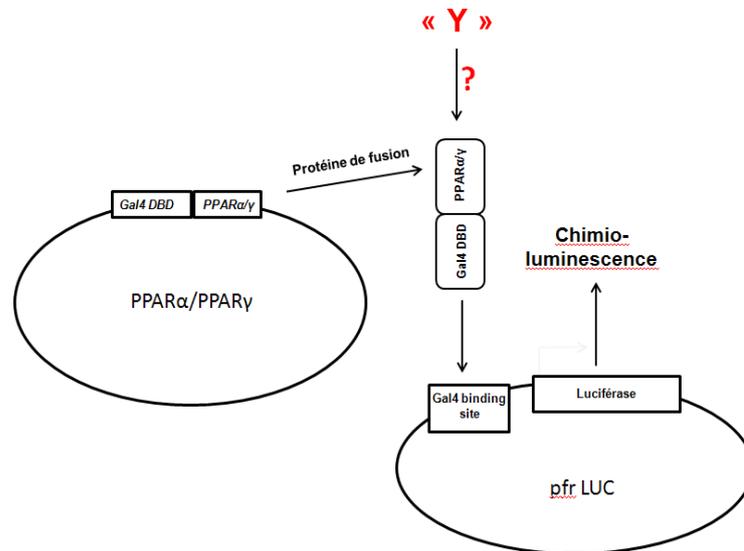


Figure 32. Schéma représentatif de la co-transfection des cellules C2C12 avec les différents plasmides

Dans un premier temps, tous les plasmides ont été transformés dans des bactéries dites super compétentes « DH5 α » afin de les amplifier et de constituer un stock de plasmides.

VIII.1. Préparation des plasmides

Une colonie bactérienne est ensemencée dans 5ml de milieu LB+Amp à 37°C pendant 4h sous agitation (230 tpm). La totalité de la suspension est alors transférée dans 100 ml de LB+Amp et incubée à 37°C pendant la nuit sous agitation (230 tpm), c'est la « midi prep ».

Un stock de chaque plasmide est alors réalisé dans du glycérol. 400 μ l de midi prep sont mélangés à 600 μ l de glycérol 20% stérile et placés à -80°C.

VIII.2. Purification des plasmides

Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 4°C pendant 10 min à 4000 tpm. Le culot a été resuspendu dans 4ml de solution P1 (kit plasmide Qiagen). Quatre ml de tampon P2 (tampon de lyse) ont été ajoutés, et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 5 min. Quatre ml de tampon P3 (tampon de neutralisation) ont été ajoutés puis incubés à 4°C pendant 15 min afin de précipiter les protéines et les acides nucléiques dénaturés.

Après incubation, le mélange a été centrifugé à 4°C pendant 10 min à 15000 tpm. Le surnageant a été alors déposé sur des colonnes « Tip 100 » préalablement équilibrées avec 4ml de tampon QBT[®]. Après passage du surnageant à travers la colonne, celle-ci a été lavée deux fois avec 10 ml de tampon QC[®].

Le plasmide a ensuite été élué par 5 ml de tampon QF[®] (préalablement incubé dans un bain-marie à 42°C), puis précipité par 3,5 ml d'isopropanol et centrifugé 1h à 9000 tpm. Après un lavage du culot à l'éthanol 70%, celui-ci est resuspendu dans 200 à 300 µl d'eau ultrapure stérile.

VIII.3. Dosage des plasmides

Les plasmides ont été dosés par spectrophotométrie avec un spectrophotomètre UV1800 Shimadzu sur cellule Traycell de Helma. Un spectre d'absorbance a été réalisé entre 230 nm à 280 nm en diluant les plasmides au 1/100, 1/200 afin de comparer les concentrations obtenues entre les différentes dilutions. 1 unité d'absorbance est égale à 50 µg/ml de produit ADN.

VIII.4. Transfection des cellules C2C12

Le kit lipofectamine plus reagent de Qiagen a été utilisé pour la transfection des cellules C2C12. Dans un premier temps, les myoblastes ont été repiqués dans des plaques 24 puits à $1,5 \times 10^5$ cellules/puits, puis incubés à 37°C pendant 24 h. Dans un second temps, différents mélanges de plasmides ont été réalisés pour les transfections en utilisant 500 ng d'ADN total dans un volume final de 0,5 ml (voir tableau). Le plasmide pUC est un plasmide dit vide servant ici à maintenir la quantité d'ADN totale transfectée constante. Le plasmide βGal est transfecté en quantité équivalente dans tous les essais et servira à estimer l'efficacité de transfection dans chaque essai (**Tableau 14**).

| Plasmides | Quantité en ng |
|------------------------------|----------------|
| pfr Luc | 250 |
| PPAR α /PPAR γ | 50 |
| pUC | 170 |
| β Gal | 30 |

| Plasmides | quantité en ng |
|-------------|----------------|
| pfr LUC | 250 |
| pUC | 220 |
| β Gal | 30 |

Tableau 14. Les différents mélanges plasmidiques

Une fois les mélanges entre les différents plasmides effectués, les 500 ng de plasmides (0,5 ml) sont transférés dans 50 μ l de milieu DMEM à 1 g/L de glucose sans SVF, sans ATB et auxquels a été ajouté 1 μ l de Plus reagent. Les solutions plasmidiques ont été incubées à T°C ambiante pendant 5 min. Deux μ l de lipofectamine dilués dans 50 μ l de milieu DMEM ont été ajoutés aux mélanges plasmidiques, puis incubés 30 min à température ambiante.

Enfin, les 100 μ l de mélange lipofectamine + plasmide sont incubés durant 6 h à 37°C dans chaque puits de la plaque cellulaire, à la place du milieu habituel. A l'issue de cette incubation, ce milieu de transfection a été remplacé par du milieu de culture contenant soit un activateur de PPAR α , le Wy 14,643 dissous dans du DMSO, à une concentration finale de 50 μ M, soit du DMSO seul dans la même proportion de 0,1%.

Lorsque PPAR γ est utilisé dans les transfections, la Roziglitazone à une concentration finale de 10 μ M est utilisée en tant qu'activateur.

VIII.5. Lecture de l'activité luciférase

Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été lavées deux fois au DBPS, lysées avec 100 μ l de tampon lyse (Promega, Reporter Lysis Buffer 5X, E397A) et soumises à trois congélations - décongélations successives entre l'azote liquide et 37°C.

Le lysat cellulaire a été transféré ensuite dans un Eppendorf de 1,5 ml et centrifugé à T°C ambiante pendant 5 min à vitesse maximale.

La lecture de l'activité luciférase a été effectuée sur le surnageant à raison de 10 μ l de surnageant pour 50 μ l de substrat luciférase par l'appareil Microlite TLX1 de Serlabo Technologies.

VIII.6. Dosage de l'activité β -galactosidase (β -Gal)

L'efficacité de la transfection a été analysée par la mesure de l'activité β -Gal.

Dans un premier temps, un mélange réactionnel est préparé comportant par échantillon:

190 μ l de Tampon phosphate 0,1M pH 7,5 (conservé à 4°C), 2 μ l 100x Mg (0,1M MgCl₂, 4,5M β mercaptoethanol conservé à 4°C) et 0,4 μ l CRPG (chlorophénol Red β -D-galactopyranoside, substrat pour la β -Gal, 0,5M dans tampon phosphate, Roche).

Cent quatre-vingt-dix μl de ce mélange ont été déposés dans chaque puits d'une plaque 96. La réaction est déclenchée par l'addition de 10 μl de lysat cellulaire dans le puits. La génération de rouge de phénol au cours du temps suivie par l'absorbance à 575 nm au cours du temps est considérée comme le reflet de l'activité β -galactosidase dans chaque échantillon.

IX. Effet de « Y » sur l'activité de la glycogène synthase (GS) d'après le protocole de (Al-Khalili *et al* 2003).

L'activité de la glycogène a été étudiée sur cellules C2C12 différenciées (myotubes) et permet de mesurer la quantité de glucose marqué ^{14}C (PerkinElmer, Réf NEC-042X GLUCOSE, D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ -) incorporé dans la fraction glycogène des cellules.

Les cellules C2C12 sont amenées à confluence dans du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose et 10 % de sérum de veau fœtal, puis différenciées dans un milieu 4,5 g/L glucose et 2 % de sérum de cheval. Nous réalisons dans un premier temps des traitements avec « Y » (4 pg/ml et 40 pg/ml, témoin huile de soja) pendant 24 h sur les myotubes. Un appauvrissement en glucose est ensuite réalisé pendant 6 h en utilisant un milieu DMEM 1 g/L de glucose et 0,5 % en sérum de veau fœtal. Nous réalisons un témoin positif en ajoutant 100 nM d'insuline (30 min à 37°C). L'insuline va permettre l'incorporation du glucose dans les cellules et accélérer son stockage. Nous ajoutons alors sur tous les traitements 0,3 μCi de Glucose /puits à 5 mM final. Nous réalisons alors une étape de rinçages (3 fois) au PBS glacé et nous lysons les cellules avec 200 μl de KOH (30%) pendant 1 h à température ambiante. Nous ajoutons du glycogène froid (2 mg/puits) pour améliorer l'extraction puis nous incubons le lysat pendant 30 min à 95°C. Nous ajoutons ensuite 1 ml d'EtOH à 100 % pour précipiter le glycogène total sous agitation douce à 4°C pendant la nuit. Nous réalisons une première centrifugation à 1700 g pendant 35 min et nous jetons les surnageants. Nous ajoutons alors 1 ml d'EtOH à 70 % par échantillon, nous centrifugeons de nouveau à 1700 g pendant 35 min, les surnageants sont jetés et les culots sont repris dans 200 μl H₂O.

Enfin, nous ajoutons 4 ml par échantillon de picofluore 40 qui est un liquide à scintillation. Ce dernier réagit avec les éléments radioactifs en émettant de la luminescence. Cette luminescence sera mesurée par l'appareil Beckman Coulter.

X. Numération sanguine

En collaboration avec l'équipe 7 INSERM U866 dirigée par le Dr. Laurent Lagrost (DR INSERM), impliquée dans l'étude des effets *in vivo* de « Y » chez la souris, nous avons récolté des échantillons sanguins (frottis) d'animaux sous régime HF/HS (High Fat, High Sucrose) traités ou non par « Y ».

Ces échantillons de sang ont été utilisés pour réaliser une étude de l'état inflammatoire par comptage de lymphocytes (**Figure 33**) par coloration au May Grünwald Giemsa.

Cette coloration permet de marquer les différents constituants cellulaires (noyau, cytoplasme, les granulations), différenciant ainsi les cellules du sang comme les monocytes, les granulocytes, les lymphocytes (à noyau prédominant) et les hématies.

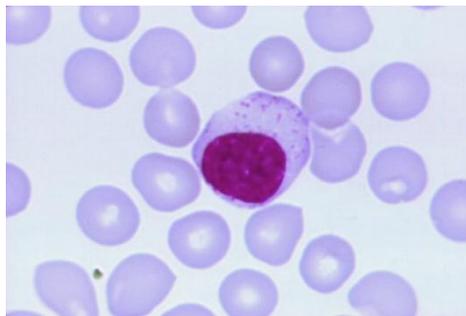


Figure 33. Lymphocyte au milieu d'hématies

Résultats

I.

*Effet du resvératrol sur la
différenciation et le métabolisme
des cellules musculaires
squelettiques murines C2C12*

I.1 Le resvératrol initie la différenciation des cellules musculaires squelettiques murines C2C12 (Kaminski *et al* 2012)

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce travail de thèse, le muscle est sujet à diverses pathologies qui provoquent une perte de la masse musculaire (atrophie). Retarder la perte musculaire ou améliorer la myogenèse apparaissent comme des thérapies possibles. Le resvératrol est bien décrit dans la littérature comme stimulateur de la biogenèse mitochondriale, favorisant ainsi la résistance des muscles durant des excès caloriques. Cependant, il existe très peu de données sur les effets pro-différenciateurs de polyphénols et en particulier du resvératrol. D'après les travaux de Lagouge *et al* de 2006, les souris traitées par le resvératrol ont vu leur capacité physique améliorée. Cette étude a également montré que ce polyphénol est capable de reprogrammé l'expression de nombreux gènes au niveau du muscle squelettique intervenant entre autres dans la contraction musculaire. Suite à une observation de changement de morphologie de nos cellules C2C12 après traitement au resvératrol et les résultats de Lagouge, nous avons entrepris de caractériser un possible effet pro-différenciateur du resvératrol, en étudiant l'expression de facteurs de la différenciation musculaire au cours d'une cinétique de 24h. Nous avons également suivi la morphologie des cellules C2C12 au cours de cette cinétique. Enfin, nous avons étudié le niveau de transcrits de facteurs de transcription de la myogenèse, l'expression de la myosine, une des protéines responsables de la contraction musculaire, ainsi que l'expression de gènes cibles des micro ARN.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le resvératrol augmente l'expression de deux facteurs de transcription de la différenciation musculaire qui sont la myogénine et Scrp3. Les cellules C2C12 sous traitement commencent à acquérir un phénotype dit myotube caractérisé par l'élongation de ces cellules. Enfin, nous avons observé une augmentation de l'expression du facteur Srf « serum controlled factor » qui est un gène cible du miRNA-133b, impliqué directement dans la différenciation musculaire.

Le travail est publié dans la revue suivante *Biochemical Pharmacology* (voir ci-après) :



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm



Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts

Jacques Kaminski^a, Allan Lançon^a, Virginie Aires^a, Emeric Limagne^a, Esmerina Tili^b,
Jean-Jacques Michaille^a, Norbert Latruffe^{a,*}

^a University of Burgundy, Laboratory of Biochemistry (Bio PeroxIL), INSERM IFR 100 6, Bd Gabriel, F-21000 Dijon, France

^b Ohio State University, Department of Molecular Virology, Immunology and Medical Genetics, 460 W. 12th Avenue, Columbus, OH 43210, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2012
Accepted 29 August 2012
Available online xxx

Keywords:

Resveratrol
Differentiation transcription factors
C2C12 skeletal muscle cells
Myoblasts
Myotubes
MicroRNAs

ABSTRACT

Resveratrol is one of the most widely studied bio-active plant polyphenols. While its effect on endothelial blood vessel cells, cancer cells, inflammatory processes and neurodegenerative events is well documented, little is known about the implication of this phytophenol in differentiating processes, particularly in skeletal muscle cells. Here, we report the effects of resveratrol on mouse skeletal muscle-derived cells (C2C12) in either a nondifferentiated (myoblasts) or differentiated state (myotubes) by evaluating resveratrol uptake, cell proliferation, changes in cell shape, and the expression of genes encoding muscle-specific transcription factors or contractile proteins. Resveratrol: (1) rapidly accumulates within cells through passive and facilitated processes; (2) does not strongly affect cell viability, cell cycle and apoptosis; (3) behaves as a pro-differentiating agent as shown by the lengthening of cells, leading to a myotube phenotype; (4) upregulates muscular pro-differentiation markers and transcription factors (myogenin, *Scp3*) starting after 12 h of exposure and strongly increases heavy chain myosin content after 18 h of exposure to resveratrol; (5) increases the *Srf* transcription factor's transcript level, a target mRNA of the miRNA-133b, which is itself downregulated by this polyphenol. These results put forward new pro-differentiating regulatory properties of resveratrol on skeletal muscles at least partly via modulation of specific miRNAs.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Muscle physiology is an absolutely essential component of the body, and a great deal of research over the years has been deployed to understand the unique properties of muscles. Muscle functions depend closely on nutritional status and the quality of food, i.e., its composition in fatty acids, carbohydrates, amino acids, etc. In addition, food also contains a wide variety of polyphenols that are able to modify both the physical capabilities and aging of muscles [1].

Resveratrol is a unique grape wine polyphenol with potent antioxidant properties. It is a phytoalexin that stimulates cell defense in plants, but also plays protective roles in animals. Resveratrol's preventive properties against several human pathologies have been abundantly described [2]. For instance, resveratrol delays cardiovascular alterations, cancer, inflammation, aging processes, etc. However, the mechanism of action of this phytophenol has thus far only been partially understood. While it modulates apoptosis, the cell cycle, the MAP kinase signaling

pathway and transcription factors such as NFκB and NRF2, only little information is available on receptors bearing affinity to resveratrol except for sirtuin, α V β 3 integrin receptor and quinone reductase. However, recent publications have established that one reason resveratrol can affect so many different regulatory pathways is its capability to modulate the expression, and consequently the regulatory effects, of a number of small noncoding microRNAs [3].

Numerous papers have reported the antiproliferative properties of resveratrol toward cancer cell lines [4]. Interestingly, however, resveratrol also appears to be a pro-differentiation agent. Indeed, several recent papers have reported its pro-differentiation effects on hematopoietic stem cells [5], cancer cells (thyroid [6], glioblastoma [7], colon [8]), human lung fibroblasts [9], keratinocytes [10] and embryonic cardiomyoblasts [11]. In contrast, resveratrol, as well as piceatannol [12], a hydroxylated resveratrol analog, were reported to block the differentiation of adipocytes [12,13]. On the other hand, whether resveratrol exerts pro- or anti-differentiation effects on osteoblasts remains controversial [14,15].

Concerning the metabolic effects of resveratrol on muscle cells, recent clinical and preclinical studies have shown resveratrol to increase the levels of PGC-1α, AKT, oxygen consumption, and sirt-1

* Corresponding author. Tel.: +33 3 80 39 62 37; fax: +33 3 80 39 62 50.
E-mail address: latruffe@u-bourgogne.fr (N. Latruffe).

expression in muscle from obese humans [16], or to inhibit PDE4 expression in mouse [17]. However, very little is currently known regarding the implication of resveratrol in muscle cell differentiation processes [18]. Therefore, we investigated the ability of resveratrol to promote early differentiation of the mouse C2C12 myoblast cell line by studying the changes in cell shape and proliferation, in the expression of muscle-specific differentiation transcription factors and myosin, and in the modulation of the gene transcript as a target of miRNAs controlled by resveratrol.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

All basic chemicals were purchased from Sigma Chemical Reagents (La Verpillière, France). A standard stock solution of resveratrol at a concentration of 30 mM was prepared in ethanol, and the sample solutions of various concentrations were prepared by appropriate dilution of the stock solution when needed with a maximum of 0.1% ethanol, final concentration. Heavy chain myosin (A4.1025) and β -tubulin (9F3) antibodies were purchased from Upstate and Cell Signaling Technology (from Ozyme, St Quentin, France), respectively.

2.2. Cell line culture, treatment and microscopic observation

C2C12 myoblasts purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC), Sigma–Aldrich, St Quentin Fallavier, France (passage < 16) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Lonza, Amboise, France), 4.5 g/l glucose, supplemented with 10% fetal calf serum (Dutscher, Brumath, France) and 1% penicillin/streptomycin solution (Dutscher, Brumath, France). Cells were maintained at 37 °C in a saturated humidity atmosphere containing 95% air and 5% CO₂. C2C12 cells were seeded for the time course in 100-mm × 20-mm tissue culture dishes (BD Falcon) at 2500 cells/cm². In order to differentiate myoblasts into myotubes, the fetal calf serum was replaced by 2% horse serum (Sigma Chemical Reagents, St Quentin-Fallavier, France) when myoblast reached 100% confluence. The cells were maintained in this medium (changed every 48 h) for 6 days to obtain myotubes.

2.3. Cell toxicity and apoptosis analysis

C2C12 myoblasts were seeded in six-well plates and were treated with 20 μ M (R20), 30 μ M (R30) or 75 μ M (R75) resveratrol (Sigma Chemical Reagents, St Quentin-Fallavier, France) or vehicle alone (0.1% ethanol) for various time courses (0–72 h). Then the supernatant of each well was collected and the adherent cells were recovered with trypsinization with 1 mL of trypsin/EDTA solution (Dutscher, Brumath, France). These suspensions containing supernatant and trypsinized cells were homogenized and used for counting viable cells using the trypan blue (Dutscher, Brumath, France) exclusion test. Cell toxicity was determined by LDH release in the medium using the procedure of Dimension Vista[®] System, Flex[®] reagent cartridge (Siemens, Munchen, Germany). Subsequently, cell suspensions were divided into two sets, one for cell cycle analysis and the other for apoptosis evaluation. The distribution of cells through the cell cycle phases was examined after propidium iodide (PI) (Sigma–Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) staining. Briefly, after centrifugation (5 min, 1600 rpm, 4 °C), medium was removed and pellets were washed three times with cold PBS (Euromedex, Mundolsheim, France). Cell pellets were then fixed with 2 mL of cold 80% (v/v) ethanol and stored at –20 °C for at least 2 h until PI labeling. Pellets were subsequently washed twice with cold PBS and dissolved in 500 μ l of a solution containing 200 μ g/mL RNase A (Life Technologies, St Aubin,

France) and 30 μ g/mL PI and incubated for 1 h at 37 °C. DNA content was measured with a Galaxy flow cytometer (Dako/Partec, Münster, Germany). Data were analyzed using the FlowMax software (Partec) and were expressed as means \pm SD of two independent experiments, each conducted in triplicate.

Apoptosis was evaluated by staining the nuclear chromatin of trypsinized cells with 1 μ g/mL Hoechst 33342 (Sigma–Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) for 15 min at 37 °C. The percentage of apoptotic cells was determined by analyzing 300 cells from randomly selected fields.

For cell morphology and morphometric analysis, phase contrast pictures were obtained using the inverted microscope Zeiss Axiovert 40 CFL at 100 \times magnification (Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Thornwood, NY, USA) combined with the AxioCam ICm1 (1.4-megapixel monochrome CCD) and Axiovision software. Morphometric analysis of shape changes was performed according to the method employed by Cicha et al. [19] by measuring the elongation index (EI) where $EI = (L - S)/(L + S)$, where L is the length of the cell and S the short axis (width). In each sample (control with vehicle and resveratrol-treated samples) the long and the short axes of more than 150 cells from two independent triplicate experiments were measured using ImageJ Software (Open Source Software developed by the National Institute of Health, Bethesda, USA).

2.4. Tritiated resveratrol uptake measurement

Resveratrol uptake was measured by incubating C2C12 cells (myoblasts or myotubes) seeded in six-well plates over 2 h with [³H]resveratrol (specific activity: 74 GBq/mmol, GE Healthcare Life Science, Velizy-Villacoublay, France) at various concentrations. Resveratrol uptake was examined by incubating cells at either 37 °C or 4 °C to discriminate between passive and facilitated (i.e., temperature-dependent) processes as previously described [20]. After incubation, the labeled medium was removed and cells were washed three times with cold PBS and then lysed in a lysis buffer (NaOH 0.1 M, Na₂CO₃ 2%, SDS 0.1%). Cell homogenates were transferred into flasks and cell-associated radioactivity was counted in a liquid scintillation analyzer. The radioactivity in cell medium was also determined at this time.

2.5. Gene expression estimation using real-time qRT-PCR

The qRT-PCR procedure followed the MIQE guidelines for publication of quantitative real-time PCR experiments [21] as below described. Total RNA from C2C12 myoblasts was extracted and purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen Courtaboeuf, France) with a 20 min DNase treatment (Qiagen Courtaboeuf, France). Total RNA concentration was measured with TrayCell (Hellma Paris, France) and the purity of nucleic acids was controlled by the ratio of the absorbance 260 nm/280 nm (1.8–2.2). Quality control of RNAs and the lack of genomic DNA contamination were checked by agarose MOPS gel. One microgram total RNA was used for reverse transcription with the iScript[®] cDNA Synthesis Kit (Biorad, Life Science, Marnes-la-Coquette, France) according to the following reaction protocol: 5 min at 25 °C, 1 h at 42 °C, 5 min at 85 °C and hold at 4 °C. cDNA was amplified using the MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR[®] Assay w/fluorescein (Eurogentec, Liege, Belgium). All PCR reactions were performed on an Applied Biosystem Step One QPCR machine (Life Technologies, St Aubin, France).

Primers were designed to generate a PCR amplification product of 100–200 bp and were selected according to indications provided by PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). All primers were checked by DNA calculator (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNAcalc.asp>) in case of any dimer or secondary structure formation.

Please cite this article in press as: Kaminski J, et al. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem Pharmacol* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.023>

As previously used by Barnes et al. [22] for RT-PCR of gene expression in mouse skeletal muscle, the 36B4 housekeeping gene was selected as a reference gene without giving any changes in its expression according to resveratrol or mocked treated cells and whatever the time course. PCR reaction mix was realized with 300 nM of each primers, 12.5 μ l MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR[®] Assay w/fluorescein and 5 μ l of DNA in a 25 μ l volume adjusted with RNase free water. Samples aliquots for each times were pooled together to realize a serial dilution for establish standard curve. The specificity of the amplicon was evaluated by melting curves (from 60 °C to 95 °C) and the efficiency (E) was assessed by standard curve ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$) calculated by Step One software from a standard curve. All PCR reactions were performed on an Applied Biosystems StepOne QPCR (MeterTaq polymerase activation 20 s at 90 °C, 40 cycles 3 s at 95 °C and 30 s at 60 °C). For sequences of primers, see Table 1, supplemental data.

2.6. Electrophoresis and immunoblotting

Cells were washed in PBS and lysed for 15 min on ice in Ripa buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet NP40, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA, and 50 mM NaF) in the presence of protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics, Saint-Egrève, France). Following centrifugation at 20,000 \times g for 15 min at 4 °C, proteins were denatured in concentrated sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% β -mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol and 0.003% bromophenol blue). A total of 50 μ g of protein was separated on polyacrylamide gel and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Molsheim, France) in a 50 mM Tris/100 mM borate buffer at 50 V for 2 h at room temperature. After blocking nonspecific binding sites in saturation buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 5% BSA or powdered milk), membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody. Membranes were then washed three times using PBS-0.1% Tween-20, incubated further with HRP-conjugated antibody (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) for 1 h at room temperature and washed again before chemiluminescence detection with ChemiDoc XRS+ System (Biorad). Densitometric analysis was done using Image Lab software (Biorad).

2.7. Statistical analysis

The morphometric analysis data were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The unpaired t -test was then carried out using Microsoft Office Excel software to express the statistical significance: *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

For qPCR gene expression, we used the relative expression software tool REST[®] (<http://www.gene-quantification.de/rest-paper.html>) with PCR efficiency correction and normalization by a reference gene (36B4). REST[®] [23] integrates an analysis ANOVA test associated with a statistical randomization algorithm to calculate whether the variation in the mean cycle threshold values between two groups was significant. This software includes the efficiency (E) of PCR amplification and Ct (cycle threshold) to evaluate the relative expression of different genes:

$$\text{ratio} = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_t \text{target}(\text{control sample})}}{E_{\text{reference}}^{\Delta C_t \text{reference}(\text{control sample})}}$$

3. Results

The C2C12 mouse cell line is a useful cell model to investigate the effect of various components (signaling molecules, hormones, xenobiotics, drugs or natural compounds) on muscle functions and on its differentiation processes into myotubes since they express characteristic muscle proteins. The differentiation can be easily induced by 2% horse serum for 6 days [24]. In contrast human myoblasts differentiated into myotubes that do not develop a contractile phenotype.

3.1. Resveratrol uptake by cultured C2C12 myoblasts and myotubes

We first evaluated resveratrol uptake by both undifferentiated myoblasts and differentiated myotubes. As shown in Fig. 1, [³H]resveratrol was rapidly taken up by both differentiated (A) and undifferentiated (B) C2C12 cells with similar kinetics. At 37 °C, the uptake reached a plateau after 20 min of treatment, indicating that a steady state was reached. Interestingly, we noted that the absolute uptake value was higher in differentiated cells (myotubes), which can possibly be explained by the cell enlargement and cell fusion that occurs during myotube formation, or it may be linked to enrichment in proteins that may would bind resveratrol in the intracellular compartment and then increase its cell content. Resveratrol uptake was sensitive to low temperature (4 °C), indicating that two types of transport processes, i.e., passive and facilitated, were taking place, as previously observed in human hepatocytes [20].

3.2. Effects of resveratrol on C2C12 myoblast proliferation and on apoptosis

Resveratrol has been shown to behave as an anti-proliferative agent, particularly in cancer cell lines. Its effects on non-tumor cells

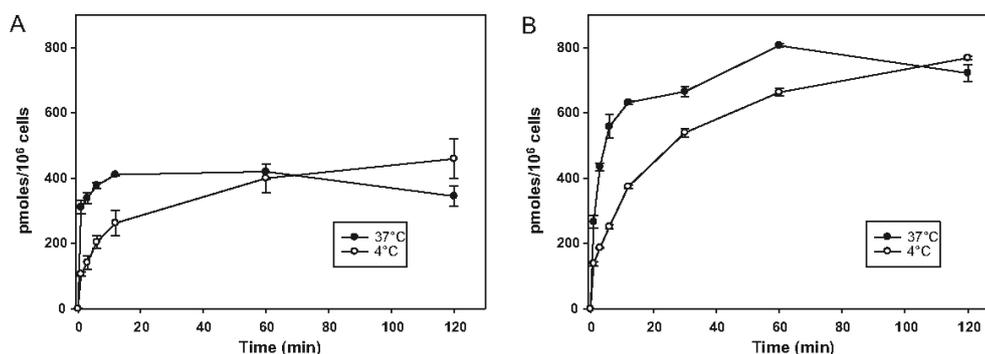


Fig. 1. Analysis of resveratrol uptake in C2C12 myotubes and in myoblast cells. Myoblasts (A) and myotubes (B) were incubated in the presence of [³H]resveratrol at either 37 °C or 4 °C for 2 h. After cell lysis, cell-associated radioactivity was counted to estimate the uptake of tritiated resveratrol. Each point represents the mean of three determinations on separate wells from two independent experiments \pm SD.

Please cite this article in press as: Kaminski J, et al. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem Pharmacol* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.023>

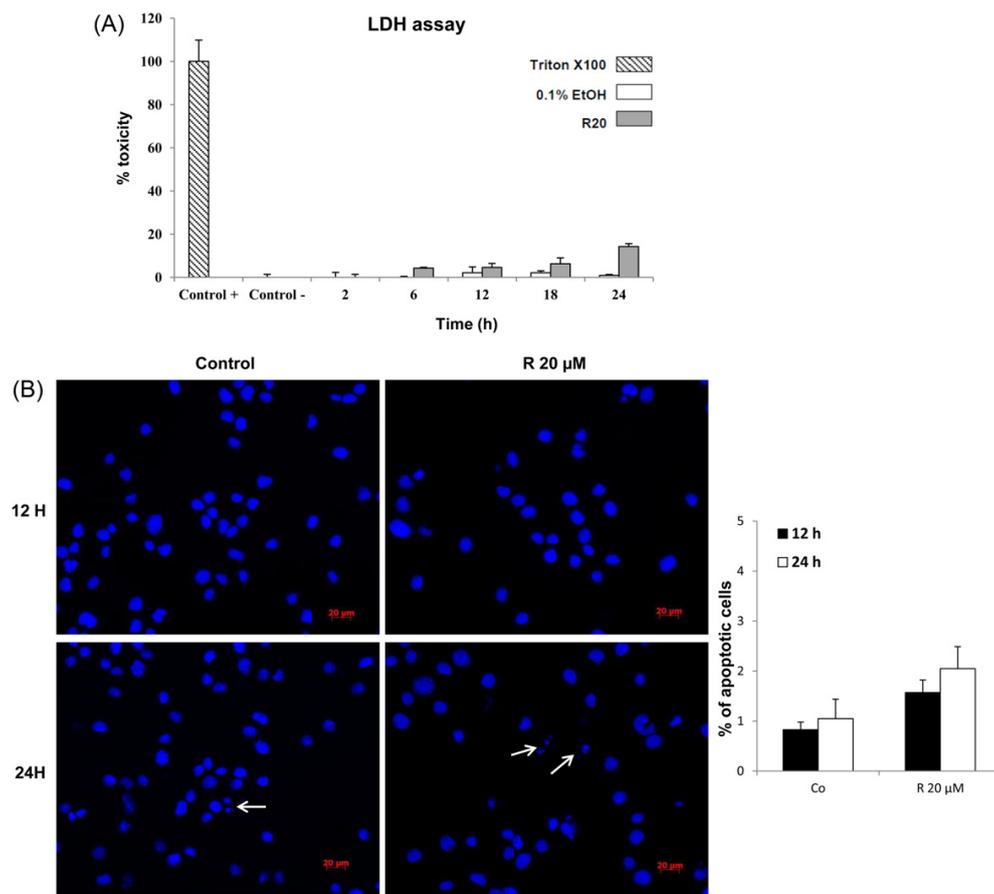


Fig. 2. (A) Effect of resveratrol on C2C12 myoblast cell toxicity. C2C12 cells were treated with 20 μ M resveratrol or 0.1% ethanol as resveratrol solvent from 2 h to 24 h. A, Cell toxicity was determined by LDH release in the medium. Positive control of cell lysis was done with 0.1% triton X 100 for 30 min. Values were expressed as means \pm SD of two independent experiments, each at least in duplicate. (B) Effect of resveratrol on C2C12 myoblast apoptosis after Hoechst dye staining. C2C12 cells were treated with resveratrol for 12 or 24 h. Morphological analysis of apoptotic cells was done after nuclear chromatin staining with Hoechst 33342 dye, as described in Section 2. Left part, representative images of nuclear chromatin after 12 and 24 h of resveratrol treatment. The white arrows indicate nuclear chromatin of apoptotic cells. Right part, apoptosis, means \pm SD of two independent experiments.

have, however, been less thoroughly described and, to our knowledge, only a few data are available concerning resveratrol toxicity in C2C12 cells. We therefore investigated resveratrol's effects on C2C12 myoblast viability and proliferation. Resveratrol (30 μ M) slightly decreased the number of viable cells after 48 (–19%) and 72 h (–15%) of treatment but without modifying the cell populations in the different phases of the cell cycle (data not shown). This effect was more pronounced at 75 μ M (data not shown). Since a high concentration of resveratrol interfered with cell growth, we choose in the following experiments to use a concentration of 20 μ M resveratrol which did not induced any significant toxicity as evaluated by LDH assay (lactate dehydrogenase) (Fig. 2A). This slight effect of resveratrol is not accompanied by an induction of an apoptotic process since less than 2% of apoptotic cells was found at the tested resveratrol concentration (Fig. 2B). Therefore, the apparent lack of resveratrol cytotoxicity, associated with a decrease in cell number, led us to the conclusion that this polyphenol may trigger C2C12 fusion, and thus differentiation.

3.3. Morphometric analysis of resveratrol-treated C2C12 myoblasts

Resveratrol's effects on cell shape were followed by measuring cell length and width (Fig. 3A). These data were then used to

calculate the cell elongation index (EI) (Fig. 3B). Under resveratrol (20 μ M) treatment, myoblasts showed a continuous increase in length (L) from 65 to 150 μ m at 24 h, reaching statistical significance beginning at 6 h. In contrast, the small axis (S) remained almost unchanged around 30 μ m. These observations were completed by calculating the elongation index (EI), which significantly increased beginning at 6 h of treatment. These data indicate that, even at low doses, resveratrol behaves as a potent lengthening inducer of C2C12 myoblasts, suggesting that it may initiate their early differentiation into myotubes, although the cell width only slightly increases after 24 h as compared to the differentiating effect of horse serum (see Section 2.2 and Fig. 1, supplemental data). Further investigations (see below) were then conducted to confirm this newly discovered property in resveratrol.

3.4. Resveratrol's effects on the expression of muscle-specific pro-differentiation transcription factors

Myogenesis is a complex process that involves the sequential expression of specific transcription factors. To ascertain the pro-differentiating effect of resveratrol, we analyzed the relative expression of genes encoding muscle-specific markers (*Csrp3*, *Mef2a*

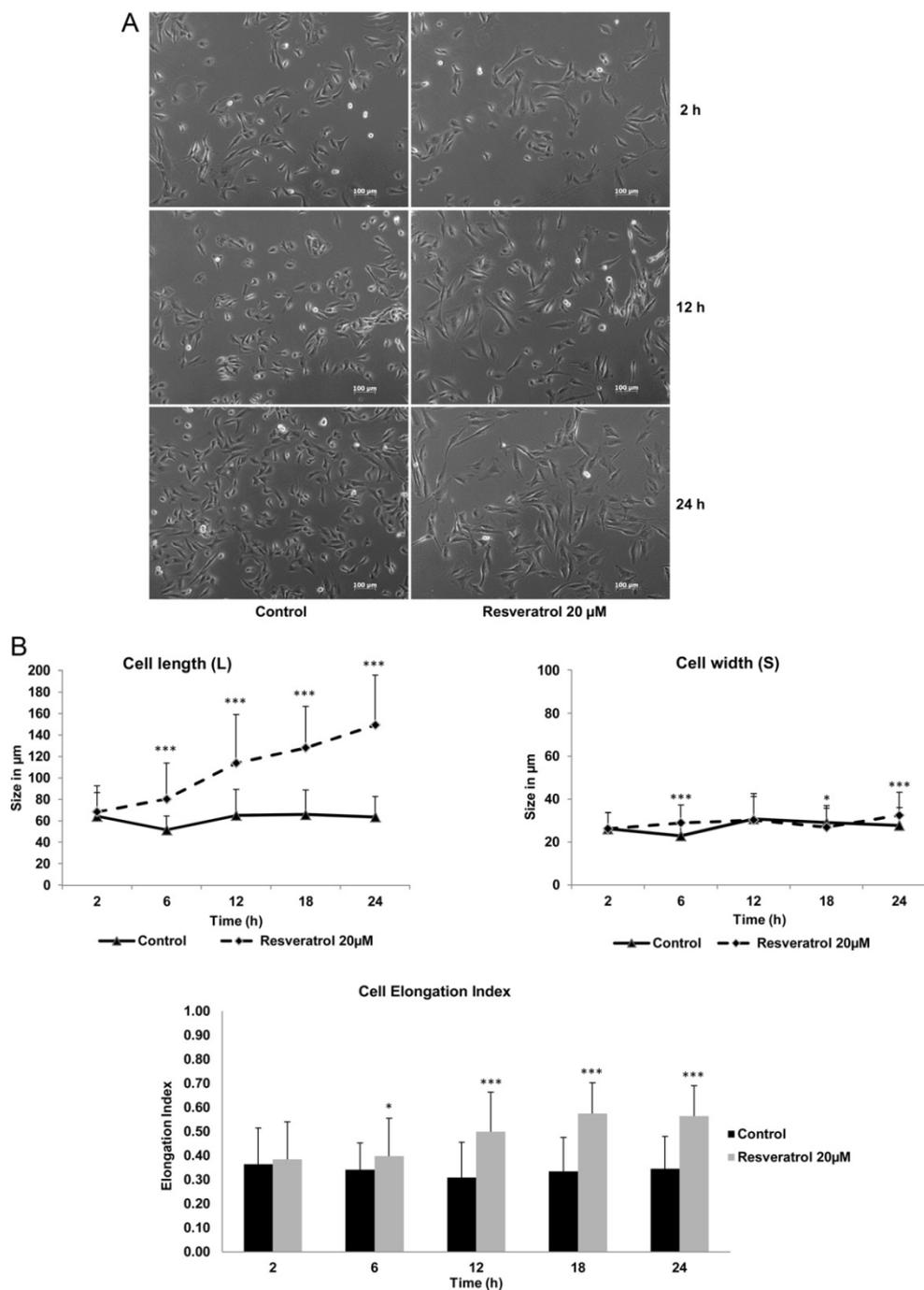


Fig. 3. Resveratrol effect on C2C12 myoblast morphology during time course treatment. (A) Microscopic pictures; (B) morphometric analysis; (B1) L, cell length; (B2) S, small width; (B3) EI, elongation index.

and *Mef2d* [23] and the transcription factor (myogenin) using qRT-PCR. As shown in Fig. 4, a 20- μ M resveratrol treatment significantly increased the expression of both *Csrp3*, a marker of myogenic differentiation encoding the LIM protein essential in the upcoming myogenic differentiation, and *myogenin*, a factor implicated in the

regulation of myogenesis [25]. In contrast, resveratrol did not affect the expression of other markers of differentiation, *Mef2a* and *Mef2d* during a 24-h period. The upregulation of *Csrp3* and myogenin indicates that resveratrol actually initiated the transcriptional program required for myoblast differentiation.

Please cite this article in press as: Kaminski J, et al. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem Pharmacol* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.023>

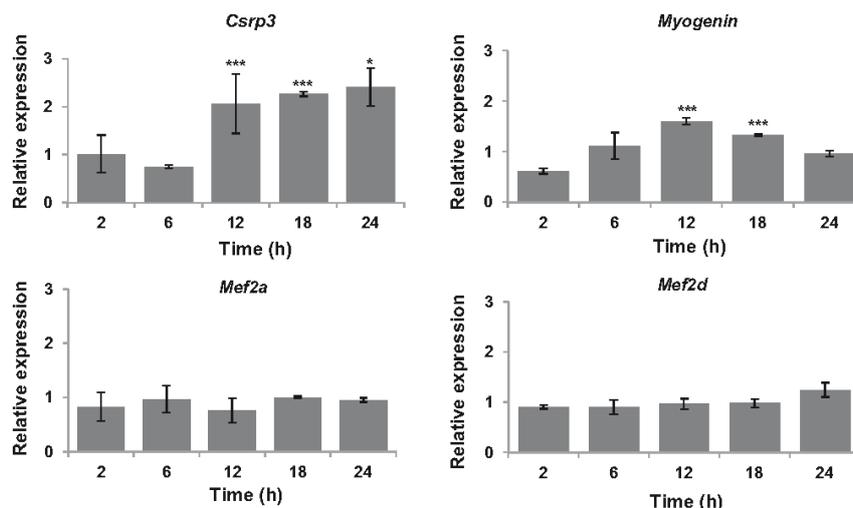


Fig. 4. Resveratrol effects on the transcripts of genes encoding muscle-specific transcription factors in C2C12 myoblast. Cells were treated with resveratrol 20 μ M for the time periods indicated. qRT-PCRs were done in triplicate. Results (fold changes) are given as means \pm SD. *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05 from three determinations on separate wells from two independent experiments. The experiments were performed by qRT-PCR. The data correspond to the ratio of PCR Ct of 20 μ M resveratrol-treated cells versus non-treated cells for each time point. There were no significant changes in the expression of the studied genes as well as the housekeeping gene in the control conditions. The relative expression corresponds to the ratio of treated cells over non-treated cells. Data are representative of two independent experiments, each in triplicate.

3.5. Expression of myosin in resveratrol-treated C2C12 myoblast and myotube cells

We then used Western blots to analyze the effects of resveratrol on the expression of myosin heavy chain, a marker of muscle cell differentiation. The blot illustrated in Fig. 5, part A shows that a 24-h 20-mM resveratrol treatment increased the expression of heavy chain myosin \pm fivefold (Fig. 5, part B). However, the absolute myosin content is lower than that observed in horse serum-dependent, fully differentiated myotubes obtained after 4 days of cell growth and 1 day at cell confluence (Fig. 5 part C).

3.6. Resveratrol's effect on the expression of miRNAs targeting transcripts encoding transcription factors inducing the muscular differentiation of C2C12 myoblast cells

An increasing number of reports have shown that microRNAs regulate all the aspects of cell differentiation and homeostasis [26,27], and that the expression of some of them is affected by polyphenols [28], especially resveratrol [29]. While these miRNAs have been extensively studied for their role in inflammation [30] and cancer [31], their implication in skeletal muscle cell differentiation has not been established. Recently, we reported

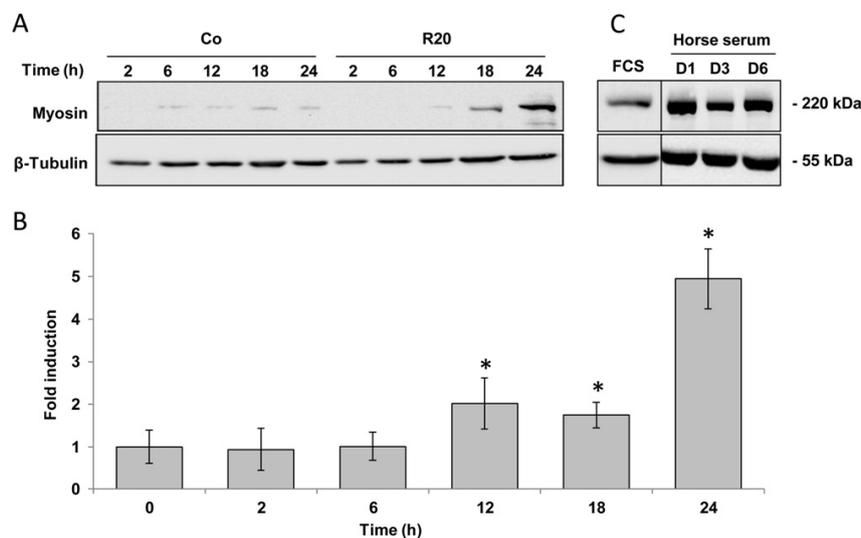


Fig. 5. Effects of resveratrol on myosin heavy chain content of C2C12 myoblast. Panel A: Cells were treated with either vehicle (Co) or 20 μ M resveratrol (R20) for the time periods indicated. Data presented are representative of two independent experiments. Panel B: Fold induction of myosin, as determined by scanning the blots of panel A. Panel C: Level of myosin in fully differentiated C2C12 myotubes. To differentiate myoblasts into myotubes, the fetal calf serum (SVF) was replaced with 2% of horse serum, after which cells were allowed to differentiate for at least 4 days. Myosin content was determined at Day 1, 3 or 6. Loading control of protein on electrophoresis apparatus was checked with β -tubulin level.

Please cite this article in press as: Kaminski J, et al. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. Biochem Pharmacol (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.023>

Table 1
Post-transcriptional level of muscle differentiation transcription factors modulated by miRNAs in resveratrol-treated C2C12 myoblasts.

| MicroRNA-targeted gene transcripts | Time of cell exposure to resveratrol | | | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|----------|-------|-------|-------|
| | 2 h | 6 h | 12 h | 18 h | 24 h |
| <i>Myf5</i> | 0.627 | 0.972 | 1.134 | 1.059 | 1.247 |
| <i>Myo1d</i> | 0.656*** | 0.813*** | 1.093 | 0.867 | 0.817 |
| <i>Srf</i> | 0.595* | 0.765*** | 0.708 | 0.822 | 0.96 |

Myf5 (myogenic factor 5) and *Myo1d* (myosin ID) transcripts are putative targets of miR-20b. *Srf* (serum response factor) transcript was demonstrated to be a target of miR-133b [30].

The data presented are representative of two independent experiments reproduced in triplicate. For further information, see Section 2. The values correspond to the ratio of treated cells over non-treated cells.

The experiments were performed by qRT-PCR. The data correspond to the ratio of PCR Ct of 20 μ M resveratrol-treated cells versus non-treated cells for each time point. For further information, see Section 2.

*** correspond to $p < 0.001$.

* correspond to $p < 0.05$.

** correspond to $p < 0.01$.

[3] that 26 miRNAs were upregulated by resveratrol treatment of C2C12 myoblasts, while 20 other miRNAs were downregulated. Interestingly, these changes may potentially have a substantial impact in the differentiation/proliferation process. Indeed, miR-20b, downregulated by resveratrol putatively targets transcripts encoding *Myo1d* and *Myf5* myogenic regulatory factors [25]. Moreover, miR-133, reported to target the transcript encoding the serum-controlled factor (*Srf*) involved in myoblast differentiation [32], is also downregulated by resveratrol. RT-qPCR analysis indicates an increase of *Myf5* and *Myo1d* transcript levels, although not statistically significant (Table 1). In contrast, *Srf* transcript is significantly increased in resveratrol-treated myoblasts at 6 h and also increases up to 24 h (Table 1).

4. Discussion

Myogenesis is a process involving muscle stem cells and muscle progenitor cells to proliferate as myoblasts and then to differentiate into myotubes. These events are controlled by myogenic regulatory factors *MyoD*, *Myf5*, myogenin and *Mrf4* and by transcription factors of the myocyte enhanced factor family (*MEF2 a, d*). Due to the complexity of the myogenesis process, the transcriptional expression profiles of both myogenic marker genes and myogenic regulatory factors often show different time courses [25].

In this paper, we analyzed the effects of resveratrol on myoblast differentiation initiation. The results establish that: (i) resveratrol is absorbed by myoblasts and myotubes by both a passive and a facilitated mechanism; (ii) resveratrol treatment induces the fusion of myoblasts, a prerequisite for their differentiation; (iii) resveratrol induces the elongation of myoblasts; (iv) resveratrol induces the expression of muscle-specific transcription factors as well as of myosin heavy chain; (v) resveratrol increases the transcription factor *Srf* transcript level, which is a target mRNA of the miRNA-133b downregulated by resveratrol. In results not reported here we have observed that resveratrol increases the mitochondrial DNA (mtDNA) content by 40% in early differentiated myotubes, while in horse serum-dependent differentiated myotubes mtDNA is increased by 30%. These values are comparable to the data published by Lagouge et al. [1] who reported a 40% increase of mtDNA in muscle of resveratrol-fed rats. Given the muscle cells' need for energy, the measurement of mtDNA, reflects the mitochondrial number and biogenesis, then consequently the mitochondrial functions in muscle performances.

Resveratrol is one of the best-known bio-active plant polyphenols. While its effect on endothelial blood vessel cells, cancer cells, inflammatory processes and neurodegenerative events is well documented, its effect on skeletal muscle cells is only partially understood [17,33]. While several papers report that resveratrol has a pro-differentiating property on different cells, although this remains controversial [5–15], only little has been investigated on

skeletal muscle cells. Here, we report the effect of resveratrol on mouse skeletal muscle cells (C2C12) based on the evaluation of its cell uptake, the measurement of cell proliferation, the morphological changes in cell shape, the expression of tissue-specific transcription factors and muscle proteins, and the modulation of non-coding microRNA expression. In summary, resveratrol rapidly accumulates in the cells following passive and facilitated processes; it does not strongly affect cell cycle and apoptosis. Instead, it behaves as an early differentiating molecule as shown by lengthening cultured cells, leading to a myotube phenotype; it upregulates muscular differentiation marker genes and transcription factors (myogenin, *Csrp3*) and greatly increases myosin content. These results are in agreement with those obtained on embryonic H9c2 cardiomyoblast cell line from rats in which resveratrol (although at higher concentrations) inhibits cell cycle through CDK2 and stimulates myogenin expression and the light chain myosin level [11]. Recently, Saini et al. [18] reported the implication of resveratrol in the inhibition of TNF- α and the IGF-1-dependent apoptotic process of C2C12 cells via an *Sirt-1*-mediated mechanism. The mechanisms of resveratrol controlling various cell functions appear to be confirmed, i.e., the cell proliferation through the inhibition of the α V β 3 integrin membrane receptor [34], oxidative stress through the inhibition of NFkB and the activation of NRF2 nuclear receptors [2]; or control of the chromatin state through the de-acetylase activity of *Sirt-1* [35]. In contrast, the control of miRNA expression and their regulatory effect by resveratrol appears to be a new mechanism of the differentiation initiation properties of this polyphenol. Indeed, resveratrol modulates the level of skeletal muscle cell expression of microRNAs, most particularly by downregulating miR-133, which leads to stimulating myoblast differentiation through the *Srf* factor [32]. In contrast, the lack of changes in *Myf5* and *Myo1d* transcripts in resveratrol-treated cells for 24 h can be explained by the fact that these genes start to be overexpressed at 48 h for *Myo1d* while *Myf5* remains unchanged [25].

Related to muscular physiopathology, skeletal muscle is a vital tissue in an organism where its normal function, performance and possible dysfunction are key parameters. Moreover, myogenesis is a complex process involving muscle stem cells and muscle progenitor cells to proliferate as myoblasts and then to differentiate into myotubes. These events involve the sequential expression of specific transcription factors.

Lagouge et al. [1] already shown that resveratrol improves mitochondrial functions and biogenesis in muscle of mouse fed with resveratrol-containing diet. Moreover, recently Price et al. [36] showed that mice treated with 25–30 mg/kg/day of resveratrol showed increased mitochondrial biogenesis and function, AMPK activation, and increased NAD⁺ levels in skeletal muscle. In contrast, SIRT1 knockouts displayed none of these benefits. A mouse overexpressing SIRT1 mimicked these effects. Concerning

Please cite this article in press as: Kaminski J, et al. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem Pharmacol* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.023>

muscular dysfunctions, Hori et al. [37] reported a resveratrol-dependent decrease in the loss of muscle mass and a decrease of oxidative damages in the dystrophic mdx mouse model fed with resveratrol (4 g/kg the diet) for 34 weeks. These effects were shown to be Sirtuin-1 gene dependent. Recently, Dolinsky et al. [38] published the improvements in skeletal muscle strength induced by resveratrol during exercise training contributing to enhance the exercise performance in rats. On the other hand, Bastin et al. [39] reported that the exposure to resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid β -oxidation in fibroblasts from patients showing mitochondrial muscular partial deficiency affecting either very long chain fatty acyl-CoA dehydrogenase or carnitine palmitoyl transferase 1 encoding gene. As we suggest, our work opens the possibility of developing nutraceutical and functional foods based either on chronically absorption of dietary resveratrol or by limited administration of pharmacological dosage of resveratrol aiming to prevent or reverse muscular dysfunctions by stimulating myogenesis process. Our results also put forward new pro-differentiating regulatory properties of resveratrol on skeletal muscles at least partially through specific miRNAs and highlight new potential applications of this molecule in muscle performance [1]. Related to the question whether resveratrol concentrations inducing an effect in vitro can be reached in vivo, the debate is still open due to the lack of precise data in skeletal muscle. Interestingly, compared to the plasmatic level of resveratrol, several papers already reported accumulation of resveratrol in liver [40] and in colon [41]. Similar mechanism may also exist in muscle tissue. This hypothesis needs to be demonstrated. However, indirect in vivo data published by Lagouge et al. [1] and Hiro et al. [37] showing improvement of muscle functions in resveratrol-treated rats are good indications for an active resveratrol concentration in muscle tissue.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Burgundy Vitagora cluster "Taste, Nutrition, Health" and by the Regional Council of Burgundy. Thanks to Mrs Linda Northrup for usefull English corrections and Mr Thomas Nury for helping us in flux cytometry assays.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.023>.

References

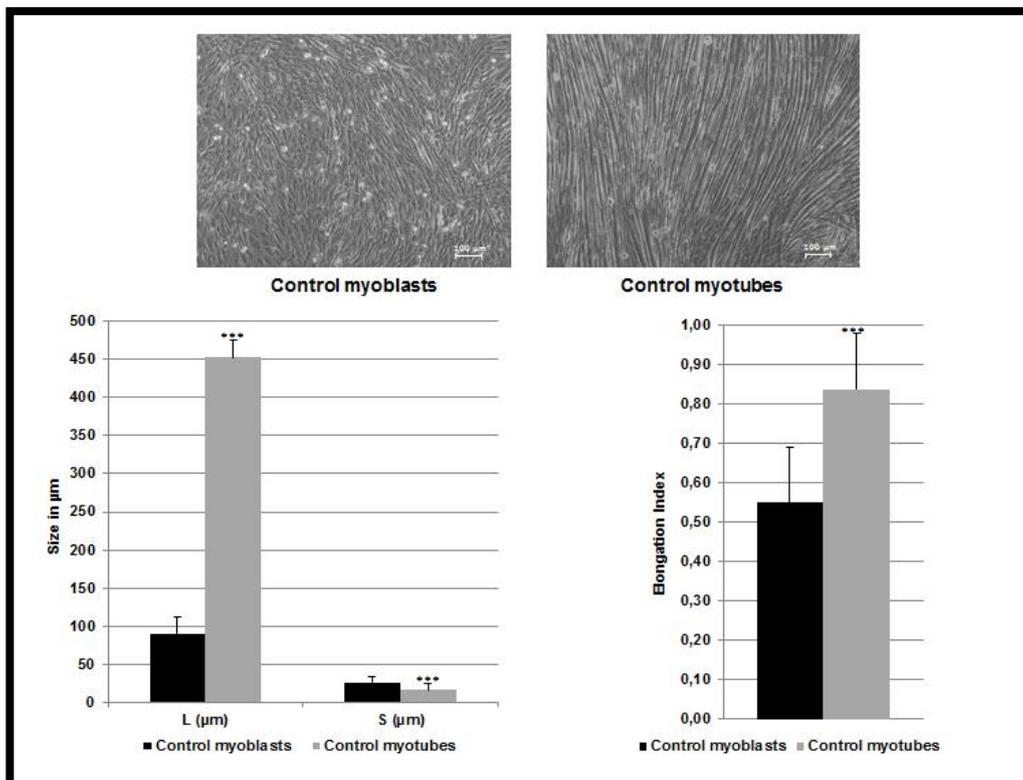
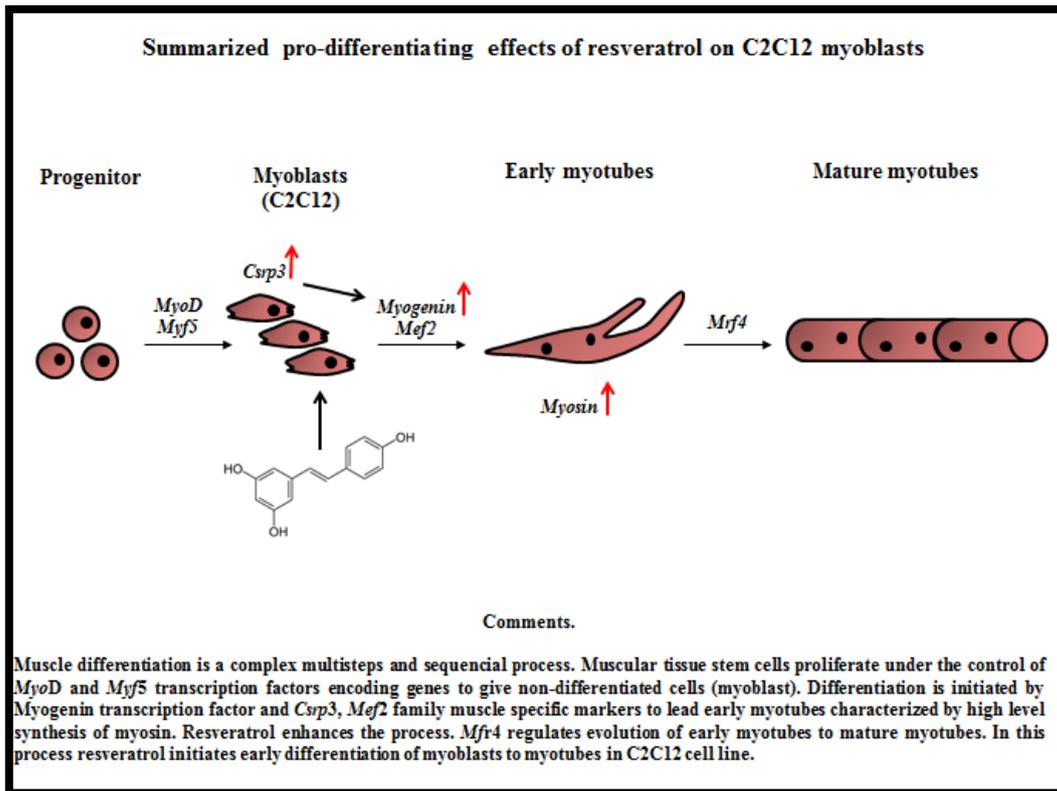
- [1] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 2006;127:1109–22.
- [2] Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 2006;71:1397–421.
- [3] Lançon A, Kaminski J, Tili E, Michaille J-J, Latruffe N. Control of microRNA expression as a new way for resveratrol to deliver its beneficial effects. *J Agric Food Chem* 2012. <http://dx.doi.org/10.1021/jf301479v>, in press.
- [4] Delmas D, Solary E, Latruffe N. Resveratrol: a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr Med Chem* 2011;18:1100–21.
- [5] Matsui K, Ezoe S, Oritani K, Shibata M, Tokunaga M, Fujita N, et al. NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;418(4):811–7.
- [6] Kang HJ, Youn YK, Hong MK, Kim LS. Antiproliferation and redifferentiation in thyroid cancer cell lines by polyphenol phytochemicals. *J Korean Med Sci* 2011;26(7):893–9.
- [7] Castino R, Pucer A, Veneroni R, Morani F, Peracchio C, Lah TT, et al. Resveratrol reduces the invasive growth and promotes the acquisition of a long-lasting differentiated phenotype in human glioblastoma cells. *J Agric Food Chem* 2011;59(8):4264–72.
- [8] Lea MA, Ibeh C, Han L, Desbordes C. Inhibition of growth and induction of differentiation markers by polyphenolic molecules and histone deacetylase inhibitors in colon cancer cells. *Anticancer Res* 2010;30(2):311–8.
- [9] Fagone E, Conte E, Gili E, Fruciano M, Pistorio MP, Lo Furno D, et al. Resveratrol inhibits transforming growth factor- β -induced proliferation and differentiation of ex vivo human lung fibroblasts into myofibroblasts through ERK/Akt inhibition and PTEN restoration. *Exp Lung Res* 2011;37(3):162–74.
- [10] Blander G, Bhimavarapu A, Mammone T, Maes D, Elliston K, Reich C, et al. SIRT1 promotes differentiation of normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2009;129(1):41–9.
- [11] Leong CW, Wong CH, Lao SC, Leong EC, Lao IF, Law PT, et al. Effect of resveratrol on proliferation and differentiation of embryonic cardiomyoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;360(1):173–80.
- [12] Kwon JY, Seo SG, Yong-Seok Heo Y-S, Yue S, Cheng J-X, Lee KW, et al. Piceatannol, natural polyphenolic stilbene, inhibits adipogenesis via modulation of mitotic clonal expansion and insulin receptor-dependent insulin signaling in early phase of differentiation. *J Biol Chem* 2012;287:11566–78.
- [13] Chen S, Li Z, Li W, Shan Z, Zhu W. Resveratrol inhibits cell differentiation in 3T3-L1 adipocytes via activation of AMPK. *Can J Physiol Pharmacol* 2011;89(11):793–9.
- [14] Kao CL, Tai LK, Chiou SH, Chen YJ, Lee KH, Chou SJ, et al. Resveratrol promotes osteogenic differentiation and protects against dexamethasone damage in murine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2010;19(2):247–58.
- [15] He X, Andersson G, Lindgren U, Li Y. Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264.7 cells through inhibition of ROS production. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;401(3):356–62.
- [16] Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab* 2011;14(5):612–22.
- [17] Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* 2012;148(3):421–33.
- [18] Saini A, Al-Shanti N, Sharples AP, Stewart CE. Sirtuin 1 regulates skeletal myoblast survival and enhances differentiation in the presence of resveratrol. *Exp Physiol* 2012;97(3):400–18.
- [19] Cicha I, Regler M, Urschel K, Goppelt-Strube M, Daniel WG, Garlich CD. Resveratrol inhibits monocytic cell chemotaxis to MCP-1 and prevents spontaneous endothelial cell migration through Rho kinase-dependent mechanism. *J Atheroscler Thromb* 2011;18(12):1031–42.
- [20] Lançon A, Delmas Osman H, Thenot J-P, Jannin B, Latruffe N. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both carrier mediated and diffusion processes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:1132–7.
- [21] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55(April (4)):611–22.
- [22] Barnes BR, Long YC, Steiler TL, Leng Y, Galuska D, Wojtaszewski JFP, et al. Changes in exercise-induced gene expression in α -AMP-activated protein kinase gamma3-null and gamma3 R225Q transgenic mice. *Diabetes* 2005;54:3484–9.
- [23] Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
- [24] Kubo Y. Comparison of initial stages of muscle differentiation in rat and mouse myoblastic and mouse mesodermal stem cell lines. *J Physiol* 1991;442:743–59.
- [25] Janot M, Audfray A, Loriol C, Germot A, Maftah A, Dupuy F. Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. *BMC Genomics* 2009;10:483.
- [26] Aranha MM, Santos DM, Solá S, Steer CJ, Rodrigues CM. miR-34a regulates mouse neural stem cell differentiation. *PLoS One* 2011;6(8):e21396.
- [27] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993;75:843–66.
- [28] Milenkovic D, Deval C, Gouranton E, Landrier JF, Scalbert A, Morand C, et al. Modulation of miRNA expression by dietary polyphenols in apoE deficient mice: a new mechanism of the action of polyphenols. *PLoS One* 2012;7(1):e29837.
- [29] Tili E, Michaille JJ. Resveratrol, microRNAs, inflammation, and cancer. *J Nucleic Acids* 2011;2011:102431.
- [30] Tili E, Michaille J-J, Adair B, Alder H, Limagne E, Taccioli C, et al. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a new anti-inflammatory microRNA targeting JunB and JunD. *Carcinogenesis* 2010;31:1561–6.
- [31] Tili E, Michaille J-J, Alder H, Volinia S, Delmas D, Latruffe N, et al. Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor-suppressors and effectors of TGF β signaling pathway in SW480 cells. *Biochem Pharmacol* 2010;80:2057–65.
- [32] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006;38:228–33.
- [33] Kaminski J, Lançon A, Tili E, Aires V, Demarquoy J, Lizard G, et al. Dietary resveratrol modulates metabolic functions in skeletal muscle cells. *J Food Drug Anal* 2012;20(Suppl. 1):398–401.

Please cite this article in press as: Kaminski J, et al. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem Pharmacol* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.023>

- [34] Colin D, Limagne E, Jeanningros S, Jacquel A, Lizard G, Athias A, et al. Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4:1095–106.
- [35] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003;425:191–6.
- [36] Price NL, Gomes AP, Ling AJY, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab* 2012;15:675–90.
- [37] Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K, et al. Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;338(3):784–94.
- [38] Dolinsky VW, Jones KE, Sidhu RS, Haykowsky M, Czubyrt MP, Gordon T, et al. Improvements in skeletal muscle strength and cardiac function induced by resveratrol during exercise training contribute to enhanced exercise performance in rats. *J Physiol* 2012;590(11):2783–99.
- [39] Bastin J, Lopes-Costa A, Djouadi F. Exposure to resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid utilization in human fatty acid oxidation-deficient fibroblasts. *Hum Mol Genet* 2011;20:2048–57.
- [40] Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res* 1998;24:133–8.
- [41] Patel KR, Brown VA, Jones DJ, Britton RG, Hemingway D, Miller AS, et al. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 2010;70:7392–9.

Please cite this article in press as: Kaminski J, et al. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem Pharmacol* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.023>

Données supplémentaires :



Comparaison morphologique entre cellules C2C12 non différenciées (myoblastes) et cellules C2C12 différenciées (myotubes)

I.2 Le resvératrol module les fonctions métaboliques dans les cellules squelettiques musculaires

La seconde partie de notre travail sur le resvératrol était un travail préliminaire où nous nous sommes intéressés aux effets du resvératrol sur le métabolisme énergétique des cellules C2C12. D'après les travaux de Lagouge *et al* 2006 ou encore de Baur *et al* 2006, le resvératrol est capable de moduler les expressions de gènes du métabolisme énergétique tel que Pgc1 α , un des principaux acteurs du réseau énergétique. Ce dernier peut alors jouer son rôle de co-activateur de facteurs de transcription comme les PPAR impliqués dans l'induction de gènes participant à la β -oxydation. PGC1 α peut réguler également des gènes du transport du glucose comme Glut4. Dans ce travail, nous avons donc vérifié l'effet de ce polyphénol sur la prolifération des cellules C2C12, l'expression de certains gènes du métabolisme énergétique comme Acads, Glut4, Pgc1 α . Nous avons également regardé l'expression des Mir qui peuvent être soit impliqués dans le métabolisme énergétique, soit impliqués dans d'autres voies métaboliques comme dans la différenciation musculaire, ainsi que certains gènes sous leur dépendance.

Nos résultats montrent que le resvératrol diminue faiblement la prolifération des cellules C2C12. Il augmente également de façon significative l'expression de Pgc1 α et diminue de façon significative l'expression des gènes Acads, Glut4 et Srebp2. Enfin, le resvératrol module de façon significative certains Mir dont miR-21 ou miR-27b qui ont pour cible possible PPAR α . Le resvératrol diminue également l'expression de miR-133 (données non montrées) impliqué dans la différenciation musculaire.

Le travail a été publié dans la revue Journal of Food and Drug Analysis (voir ci-après):

Dietary Resveratrol Modulates Metabolic Functions in Skeletal Muscle Cells

JACQUES KAMINSKI¹, ALLAN LANÇON¹, ESMERINA TILI², VIRGINIE AIRES¹, JEAN DEMARQUOY¹, GERARD LIZARD¹, JEAN-JACQUES MICHAILLE I^{1,2} AND NORBERT LATRUFFE^{1*}

¹ *Laboratory of Biochemistry of Metabolism and Nutrition, University of Burgundy, Dijon, France*

² *Ohio State University, Department of Molecular Virology, Immunology and Medical Genetics, Biological Research Tower, Columbus, U.S.A.*

ABSTRACT

Resveratrol is one of the best known polyphenol. While its effect on endothelial blood vessel cells, cancer cells, inflammatory processes and neurodegenerative events is well documented, only little is established on the metabolic implication of this phytochemical, particularly on skeletal muscle cells. Here, we report the effect of resveratrol on mouse skeletal muscle cells (C2C12) by measurement of cell proliferation, expression of metabolic genes and their transcription factor dependency, and modulation of non-coding microRNA expression. Resveratrol slightly decreases cell proliferation, while it up regulates PGC-1 α a PPAR transcription factor co-activator involved in the control of metabolic genes. It also modulates microRNAs which are expressed in skeletal muscle cells and are involved in differentiation or contraction-relaxation. Results put forward new regulatory properties of resveratrol on skeletal muscles and highlight new potential applications of this molecule in muscle performances.

Key words: Resveratrol, metabolic functions, C2C12 skeletal muscle cells, microRNA

INTRODUCTION

There are thousand of different plant polyphenols produced by plants. These non nutritional compounds may play a role as signaling molecules and exhibit defense and/or attractive properties. Interestingly, animal and human cells react to plant polyphenols exposure as they behave towards chemical drugs, i.e. by recognizing these molecules as xenobiotic/pharmacological compounds.

It is now widely admitted that dietary phenolic compounds lead to beneficial effects for health^(1,2). Among such positive effects of polyphenols, resveratrol (RSV) has been considered as a powerful antioxidant with a direct impact on oxidative stress and related pathologies (i.e. atherosclerotic cardiovascular diseases, cancer, neurodegenerative processes, inflammation, ageing...). For instance, the proliferative signaling pathway is modulated by polyphenols through membrane receptors (death receptors, integrin receptor...), MAP kinases, nuclear factors (NF κ B, NRF2, cyclins, CDK...). Moreover, we recently demonstrated the implication of a new resveratrol-controlled regulatory pathway involving microRNAs. For example, miR-663 is directly involved in the anti-inflammatory effect of resveratrol by lowering the content of AP-1 transcription factor in human monocyte derived cells⁽³⁾.

While these effects are well documented, and beside a study on mice physiology⁽⁴⁾ and on cardiac cells⁽⁵⁾, only little is so far established on the metabolic implication of this phyto-

phenol, particularly on muscle cells. Here we report the effect of resveratrol on mouse skeletal muscle cell line (C2C12). The chosen approaches were the following: proliferation, expression of metabolic genes and their dependant-transcription factors, the modulation of non-coding microRNAs. Results demonstrate new regulatory properties of resveratrol on the metabolism of skeletal muscle cells.

MATERIALS AND METHODS

I. Materials and Reagents

All chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma Chemical Reagents (La Verpillière, France). Deionized and sterile water was used throughout the experiment. A standard stock solution of resveratrol at a concentration of 80 mM was prepared in ethanol, and the sample solutions of various concentrations were prepared by appropriate dilution of the stock solution when needed.

II. Cell lines and Culture

C2C12 mouse skeletal muscle cell line was grown either as myoblasts (undifferentiated) or as myotubes (differentiated). Phase contrast microscopy of these cells is presented in Figure 1. The differentiation protocol was the

* Author for correspondence. Tel: +33380396237;

Fax: +33380396250; E-mail: Latruffe@u-bourgogne.fr

following: cells were grown to confluence in DEMEM medium (4.5g/L of glucose) supplemented with 10% fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 0.3 mM ascorbic acid, at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂/95% air. When confluence was reached, differentiation of cells into myotubes was induced by replacing in the DEMEM medium, the fetal bovine serum by 5% of horse serum. Cells were allowed to differentiate during 4 days.

(I) Cell Treatments

Cells were seeded 24 h before treatment on 6-well plates at a density of 0.3×10^6 cells per well. The next day, cells were challenged with RSV or with ethanol (control). After 48 or 72 h the supernatant of each well was collected and the adherent cells collected after trypsinization with 1 mL of Trypsin/EDTA solution. These suspensions containing supernatant and trypsinized cells were homogenized and used for counting cells by trypan blue exclusion test.

(II) Phase Contrast Microscopy

Phase contrast pictures were taken with a Zeiss LSM 5 Pascal microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Thornwood, NY, USA). Based on morphological criteria, the pictures were used to determine the number of live cells in each group.

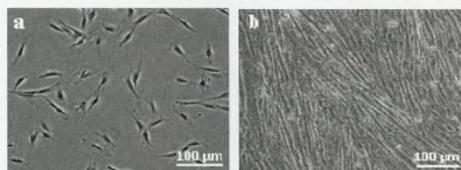


Figure 1. C2C12 cell morphologies; a: myoblasts, non-differentiated state and b: myotubes, differentiated state.

III. MiRNA Micro-array Analyses

RNAs extracted with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) were subsequently subjected to DNase digestion (Turbo-DNase from Ambion, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). MicroRNA micro-array analyses were performed at the Ohio State University micro-array facility. Data were submitted to MIAME database with the accession numbers to be received after confirmation.

IV. Gene Expression Estimation

(I) RNA Isolation and Reverse Transcription Step

RNA from cultured cells was extracted and purified (from free nucleotides and contaminating genomic DNA)

using RNeasy mini Kit (Qiagen) with DNase treatment. One µg of RNA was used for reverse transcription with iScript Reverse Transcriptase (Biorad).

(II) Real Time Quantitative PCR

PCR reactions were performed using the qPCR MasterMix Plus for SYBR Green I with fluorescein (Eurogentec). All PCR reactions were performed with MultiGuard Barrier Tips (Sorenson BioScience, Inc.) and an Applied Biosystem Step One QPCR machine. Primers were designated to generate a PCR amplification product of 50 - 120 bp and were selected according to indication provided by the PrimerBank web site: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/> and were checked by nucleotide Blast (PubMed).

V. Statistical Analysis

Statistical analysis of data was performed by applying one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc test. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS AND DISCUSSION

I. Effect of Resveratrol on C2C12 Myoblasts Proliferation.

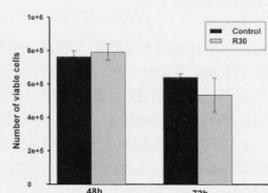


Figure 2. Effect of Resveratrol on C2C12 cell proliferation.

C2C12 myoblast cells were treated with RSV 30 µM (R30) for 48 and 72 h or with vehicle alone (0.1% ethanol). Cell proliferation was determined by counting the viable cells by trypan blue exclusion staining with a haemocytometer. Values are expressed as means \pm SD of two independent experiments each performed in triplicate.

Figure 1 indicates that C2C12 cell proliferation is slightly sensitive to resveratrol only after 72 h of exposure in contrast to the inhibition obtained in tumour cell lines.^(1,5)

II. Influence of RSV on Post-transcriptional Expression of Metabolic Genes and Related Transcription Factors

Table 1 shows that resveratrol treatment upregulated the gene expression of PGC-1 α , a key co-activator of the PPAR signaling pathway and slightly PPAR γ gene (but not

statistically significant). In contrast Glut4 (a membrane glucose carrier), ACAD (a mitochondrial enzyme of the fatty acid oxidation pathway) and SREBP2 (involved in the sterol regulation metabolism) were downly expressed.

Table 1. RT-qPCR analysis of gene expression of selected genes in resveratrol-treated C2C12 cells

| Gene | Relative expression level | Significance (<i>p</i>) | Variation |
|---------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| ACAD | 0.843 | 0.041 | Down |
| Glut4 | 0.471 | 0.001 | Down |
| PGC1 α | 1.586 | 0.011 | Up |
| PPAR γ | 1.118 | NS | / |
| SREBP2 | 0.434 | 0.001 | Down |

C2C12 myoblast cells were treated for 48h with 30 μ M resveratrol in 0.1% ethanol (final concentration). Relative level was compared to ethanol-treated cells. The results are the mean of 2 \times 3 independent assays. They are reported on the 36B4 ribosomal protein expression gene, a chosen house keeping gene.

ACAD: acyl-CoA dehydrogenase; Glut4: glucose transporter; PGC1 α : PPAR γ cofactor 1- α ; SOD1: superoxyde dismutase 1; PPAR γ : peroxisome proliferators-activated receptor γ ; SREBP2: steroid receptor element binding protein 2; NS: not statistically significant.

III. Resveratrol and Expression of Non-coding mi RNAs on C2C12 Myoblast Cells (Table 2)

There is more and more evidence that microRNAs are non-coding small RNAs (near 25 nt) that target specific mRNAs for cleavage and/or translational inhibition. Numerous microRNAs are expressed in a tissue specific manner and are involved in different biological processes like differentiation, immune response, cancer, neurodegenerescence. Recently, microRNAs have been implicated in various cardiovascular functions and pathologies⁽⁶⁾. However, until now, no information was available on skeletal muscle function regarding regulation by resveratrol. Here, we describe microRNA expression profiles in C2C12 myoblast cell lines treated or not with resveratrol.

In Table 2, we have selected four microRNAs whose levels changed significantly ($p < 0.05$) following resveratrol treatment of C2C12 cells. These selected microRNAs have numerous putative target genes and are the following: miR-20b, miR-21, miR-27 and miR-149. MiR-20b shows 813 putative genes. Resveratrol decreased its expression by -33%. MiR-20b which modulates VEGF is strongly down regulated by resveratrol (6-fold variation) in rat cardiomyocytes. The expression of miR-21 which may target 142 genes, increased 2-fold following resveratrol treatment. In rat heart resveratrol up regulated this microRNA by near 4-fold⁽⁶⁾. MiR-21 has been shown to regulate the ERK/MAP kinase signaling pathway. MiR-27b appears to target 737 putative genes and is up regulated (2-fold) by resveratrol. In contrast,

resveratrol down regulated miR-27b in rat heart by 1.4-fold⁽⁶⁾. One target of miR-27b may be FoxO1 transcription factor. MiR-149 shows 185 putative genes and resveratrol strongly decreased its expression. Among miR-149 putative targets, we found several important genes in skeletal muscles such as Map3k13 of the JNK pathway; Prdx6 a specific skeletal muscle gene; Atp2a2 in the contraction/relaxation cycle; and Stard3 gene in involved in the binding and transport of cholesterol.

Table 2. Expression level in mouse skeletal C₂C₁₂ myoblasts of selected microRNAs resulting from microRNA chips screening and putative gene targets. Effect of resveratrol treatment

| microRNA | miR-20b | miR-21 | miR-27b | miR-149 |
|--|---|---|---|---|
| Fold changes after resveratrol treatment | 0.67 | 1.93 | 2.97 | 0.026 |
| Variation | down | up | up | down |
| Parametric p-value | 0.0087745 | 0.0141262 | 0.303593 | 0.0135363 |
| Current putative target genes | 813 | 142 | 737 | 185 |
| Selected possible key target genes | Map3k5 ⁽¹⁾ Myo1d ⁽²⁾ Myf ⁽³⁾ | Bcl2 ⁽⁴⁾ Ppara ⁽⁵⁾ | Ppar γ ⁽⁶⁾ Ppara ⁽⁵⁾ FoxO1 ⁽⁷⁾ Igf1 ⁽⁸⁾ | Map3k13 ⁽⁹⁾ Prdx6 ⁽¹⁰⁾ Atp2A2 ⁽¹¹⁾ Stard3 ⁽¹²⁾ |

⁽¹⁾Map3k5: Mitogen-activated protein kinase5; ⁽²⁾Myo1d: Myosin ID; ⁽³⁾Myf: Myogenic factor 5; ⁽⁴⁾Bcl2: anti-apoptotic activity; ⁽⁵⁾Ppara: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha; ⁽⁶⁾Ppar γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; ⁽⁷⁾FoxO1: Forkhead box O1 involved in the transformation of Arf-1-myoblasts; ⁽⁸⁾Igf1: Insulin-like growth factor 1; ⁽⁹⁾Map3k13: JNK signaling pathway; ⁽¹⁰⁾Prdx6: Expressed in skeletal muscle; ⁽¹¹⁾Atp2A2: Involved in the contraction/relaxation cycle regulation; ⁽¹²⁾Stard3: binds and transports cholesterol. The data result from microRNA chips screening. They are the mean of 3 samples. The changes obtained by screening were not compared with qRT-PCR approach.

IV. Conclusions and Perspectives

In skeletal muscle cell lines, resveratrol only slightly decreased C2C12 cell proliferation, but up regulated PPAR transcription factor complex encoding gene (PGC-1 α). Moreover, we identified new signaling pathways modulated by resveratrol which implicate the regulation of microRNAs. Related to this the lack of up regulation of PPAR α gene by resveratrol (data not shown) is coherent with the up regulation of miR-27b, which is a potentially target PPAR α (cf. Table 2). Interestingly, from microRNA screening, miR-133 appeared down regulated by resveratrol in C2C12 treated cells (results not shown). MiR-133 is known to stimulate myoblast differentiation⁽⁸⁾. Thus, results are in agreement with the cell proliferation inhibition by resveratrol after a long period of culture (cf. Figure 2). The effect of resveratrol on differentiated C2C12 (myotubes) is in progress.

The determination of the part taken by microRNAs in resveratrol sensitivity can have some pharmacological interests to improve resveratrol efficiency in various major diseases. In addition, Bastin *et al.*, have reported that exposure to human fibroblasts resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid utilization in human fatty acid oxidation-deficient cells⁽⁷⁾.

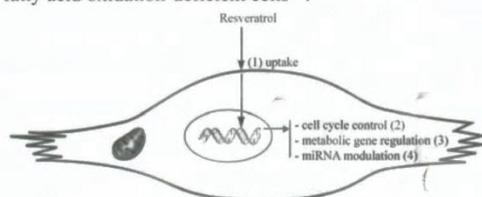


Figure 3. Functions and metabolic pathways modulated by resveratrol in C2C12 mouse skeletal muscle cell line. (1) Resveratrol penetrates in C2C12 cells (unpublished data). (2) Moderated inhibition of cell proliferation in myoblasts (this work) but no apoptosis (unpublished data). (3) PPAR/PGC-1 α dependent gene expression encoding for mitochondrial metabolism. (4) Transcription factors dependent differentiation, contraction-relaxation.

Our present data summarized in Figure 3 support the objective to develop nutraceutical and functional foods based on dietary resveratrol with the aim to prevent or reverse muscular dysfunctions associated with various diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was encouraged by Burgundy Vitagora cluster and by the Regional Council of Burgundy.

REFERENCES

1. Delmas, D., Solary, E. and Latruffe, N. 2011. Resveratrol: a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr. Med. Chem.* 18: 1100-1121.
2. Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R. and Sinclair, D.A. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 444: 337-342.
3. Tili, E., Michaille, J. J., Adair, B., Alder, H., Limagne, E., Taccioli, C., Volinia, S., Delmas, D., Latruffe, N. and Croce, C. M. 2010. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a new anti-inflammatory microRNA targeting JunB and JunD. *Carcinogenesis* 31: 1561-1566.
4. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P. and Auwerx, J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127: 1109-1122.
5. Baarine, M., Thandapilly, S., Louis, X., Mazué, F., Yu, L., Delmas, D., Neticadan, T., Lizard, G. and Latruffe, N. 2011. Pro-apoptotic vs anti-apoptotic properties and cell signaling of dietary resveratrol on normal and on tumour cells. *Genes Nutr.* 6: 161-169.
6. Mukhopadhyay, P., Mukherjee, S., Ahsan, K., Bagchi, A., Pacher, P. and Das, D. K. 2010. Restoration of altered micro RNA expression in the ischemic heart with resveratrol. *PLoS One* 5(12): e15705.
7. Bastin, J., Lopes-Costa, A. and Djouadi, F. 2011. Exposure to resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid utilization in human fatty acid oxidation-deficient fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 20: 2048-2057.
8. Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., Conlon, F. L. and Wang, D. Z. 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* 38: 228-233.

Copyright of Journal of Food & Drug Analysis is the property of Bureau of Food & Drug Analysis and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

II.

« X » et

ses effets anti-oxydants

in vivo dans les muscles squelettiques

de souris et in vitro sur les cellules

musculaires C2C12

CONFIDENTIEL

II. « X » et ses effets anti-oxydants *in vivo* dans les muscles squelettiques de souris et *in vitro* sur les cellules musculaires C2C12

II.1. Le « X » et ses effets antioxydants (étude *in vivo*)

II.1.1. Induction du stress oxydant

Dans le but d'étudier les effets antioxydants du produit « X », des souris (20 par régime) de fond génétique C57BL6/J ont été soumises à 4 régimes différents (cf I.1) : SD, SD+ « X », HFHS (régime riche en calories) et HFHS+ « X » pendant 90 jours. Le régime HFHS a pour but d'induire une obésité chez les animaux. Dans la bibliographie, il est bien admis qu'un excès de masse grasse est associé à une surproduction de ROS (Feillet-Coudray *et al* 2009). Ainsi, les animaux seront dans un environnement pathologique propice à l'étude du stress oxydant. Après chaque temps de traitement, nous avons prélevé les muscles gastrocnémiens.

II.1.2. Etude de l'activité SOD totale sur les muscles gastrocnémiens

Nous avons réalisé l'étude de l'activité SOD totale (**Figure 34**) sur dix animaux par lot de régime et nous l'avons rapportée à la quantité totale de protéines. Un test « t de Student » a été réalisé et a permis de comparer les activités SOD totale en fonction des régimes et en fonction de la présence ou non du produit « X ».

Les résultats présentés montrent qu'il n'y a pas de différence d'activité SOD entre les régimes SD et SD+ « X », ni entre les régimes SD et HFHS ($p>0,05$). Cependant, une diminution significative de l'activité SOD est observée entre le régime SD+ « X » et le régime HFHS+ « X » ($p=0,003$). Le même résultat est obtenu entre le régime HFHS et le régime HFHS+ « X » ($p=0,03$).

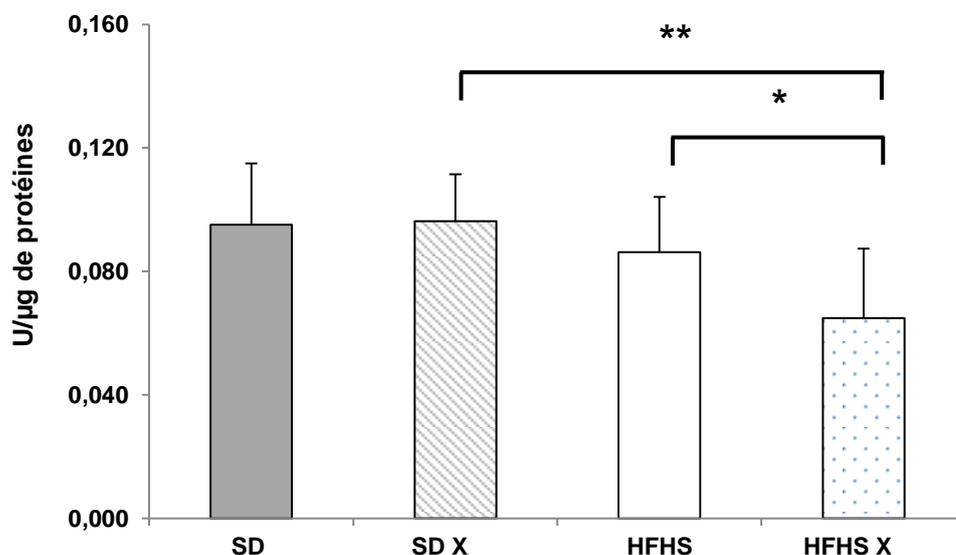


Figure 34. Les activités SOD totale des différents régimes.

(n=10 pour SD, HFHS, HFHS+X, n=9 pour SD+X).

Les barres d'erreur représentent les écarts-types

Test t de Student * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$

CONFIDENTIEL

II.1.3. Etude de l'expression de gènes impliqués dans les défenses anti-radicalaires

L'étude de l'expression de gènes impliqués dans les défenses anti-radicalaires a été effectuée sur les muscles gastrocnémiens de souris ayant reçu les 4 régimes (cf I.1) mais cette fois-ci à 45 jours et 90 jours de traitement. L'étude de l'expression de gènes a été effectuée par PCR quantitative sur 14 muscles par régime. Les résultats ont été analysés par le logiciel « REST » qui inclut à la fois une standardisation par rapport à un gène de référence (ici 36B4), l'efficacité de la PCR et une analyse statistique de randomisation. Nous avons comparé chaque expression de gènes avec le produit « X » par rapport à son régime équivalent sans produit « X » à un temps donné de traitement, par exemple SD + « X » contre SD à 45 jours (1,5 mois) ou à 90 jours (3 mois) (**Tableau 15**).

Les résultats présentés montrent qu'il y a induction significative des ARNm de NRF1, de SIRT1, de SOD1 et d'UCP2 lorsqu'on compare le régime HFHS + « X » et le régime HFHS à 90 jours de traitement. Il y a très peu de gènes dont l'expression varie à 1,5 mois de traitement. En effet, seule la GPx montre une diminution significative de son expression quand nous comparons le régime SD + « X » et le régime SD, d'une part, et d'autre part, l'expression de SIRT1 est augmentée de façon significative lorsqu'on compare le régime HFHS + « X » et le régime HFHS. L'expression d'UCP2 et d'UCP3 est augmentée de façon significative à 3 mois de traitement lorsqu'on compare le régime HFHS + « X » et le régime HFHS. Enfin, l'expression de PRXD1 n'a pas montré de modulation significative entre les différents régimes (données non montrées).

| Gènes étudiés | Expression après 1,5 mois (SD+ « X » vs SD) | Expression après 3 mois (SD+ « X » vs SD) | Expression après 1,5 mois (HFHS+ « X » vs HFHS) | Expression après 3 mois (HFHS+ « X » vs HFHS) |
|---------------|---|---|---|---|
| GPx | 0,595 ** | 1,039 | 0,944 | 1,198 |
| NRF1 | 1,104 | 0,975 | 1,1 | 1,155 * |
| NRF2 | 1 | 1,006 | 1 | 0,984 |
| PGC1 α | 1,126 | 1,163 | 0,842 | 0,997 |
| SIRT1 | 0,977 | 0,960 | 1,307 ** | 1,277 ** |
| SOD1 | 1,069 | 0,921 | 1,091 | 1,158 *** |
| UCP3 | 1,143 | 1,203 * | 0,865 | 1,004 |
| UCP2 | 1,324 | 1,984 *** | 1,326 | 2,269 * |

Tableau 15. Expression de gènes impliqués dans les défenses radicalaires dans les différents régimes à 45 jours ou 90 jours de traitement.

(n=14) * p \leq 0,05 ** p \leq 0,01 *** p \leq 0,001

CONFIDENTIEL

II.2. Etude *in vitro* (cellules C2C12, stade myoblaste)

II.2.1. Etude du pouvoir de défense anti-radicalaire de « X » : Test KRL et mesure du MDA (malondialdehyde).

Les dosages KRL et MDA ont été effectués sur les muscles de souris ayant reçu les 4 régimes différents pendant 90 jours. Le test KRL mise au point par M.Prost permet de mesurer la résistance globale vis-à-vis de l'agression des radicaux libres. Il a été également réalisé le dosage du MDA (par HPLC), un sous-produit de la peroxydation lipidique.

Les résultats présentés montrent qu'il n'y a aucune différence significative du potentiel global anti-radicalaire entre le régime SD et le régime SD + « X ». Cependant, une augmentation significative du potentiel global anti-radicalaire est observée dans le régime HFHS + « X » comparé au régime HFHS (**Figure 35**).

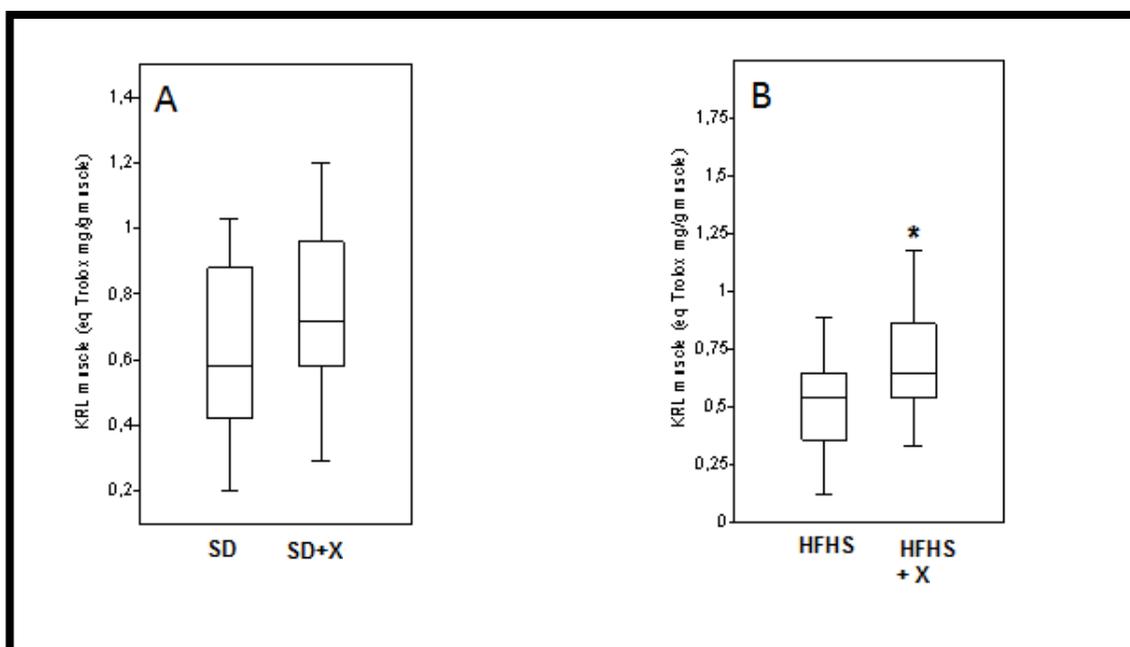


Figure 35. Dosage KRL sur les muscles gastrocnémiens de souris traitées ou non avec le produit « X » pendant 90 jours.

n=15, Test t de Student * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$

A/ Dosage KRL sur régime SD et SD+X

B/ Dosage KRL sur régime HFHS et HFHS+X

Représentation type « box plot », indique d'une part la médiane et d'autre par les valeurs minimum, maximum et atypiques

Les résultats présentés montrent qu'il n'y a pas de variation significative du taux de MDA entre le régime SD et le régime SD + « X ». Cependant nous observons une augmentation significative du taux de MDA dans le régime HFHS + « X » comparé au régime HFHS (**Figure 36**).

CONFIDENTIEL

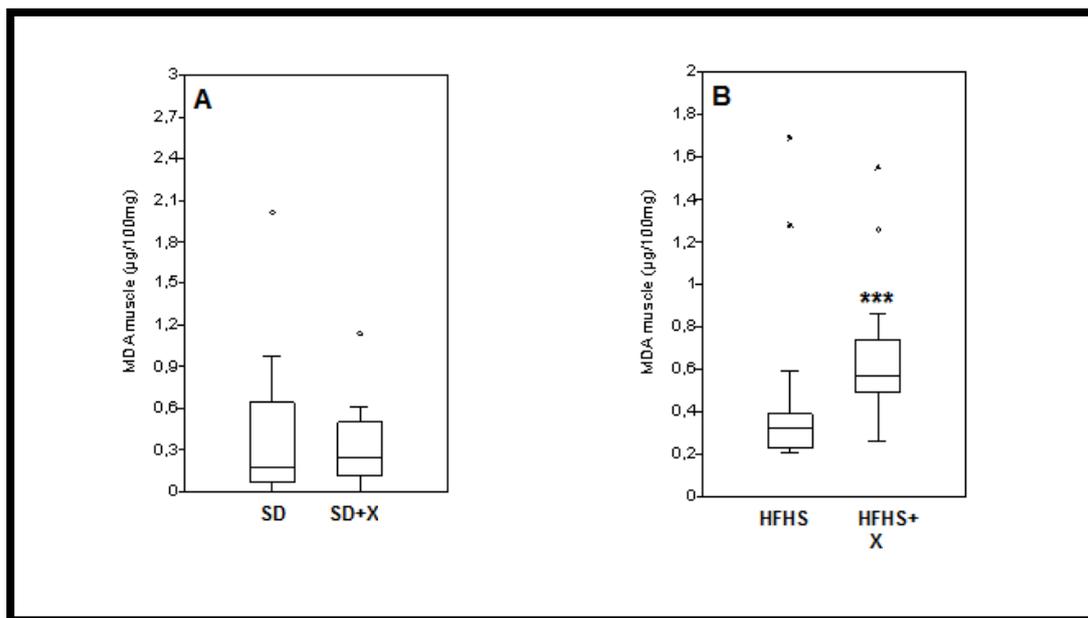


Figure 36. Dosage MDA sur les muscles gastrocnémiens de souris traitées ou non avec le produit X pendant 90 jours

n=15, Test t de Student * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$

A/ Dosage MDA sur régime SD et SD+X

B/ Dosage MDA sur régime HFHS et HFHS+X

Représentation type « box plot », indique d'une part la médiane et d'autre par les valeurs minimum, maximum et atypiques

II.2.2 Effet global de « X » sur les cellules C2C12 traitées avec un générateur KRL

(AAPH) en co-traitement ou pré-traitement

L'effet global de « X » sur cellules C2C12 a été réalisé après co-traitement de 24 h avec « X » (10 µg/ml et 50 µg/ml) avec le générateur de ROS (AAPH) (5 mM), ou après un pré-traitement de 24 h avec « X » (10 µg/ml et 50 µg/ml) suivi d'un traitement de 24h avec le générateur de ROS. Nous avons ensuite observé la morphologie des cellules C2C12 et réalisé un comptage cellulaire au bleu trypan. Les résultats présentés montrent que « X » semble protéger les cellules C2C12 seulement en co-traitement avec « X » 50 µg/ml + AAPH caractérisé par une morphologie des cellules proche du contrôle sans aucun traitement (**Figure 37**). Ce résultat est confirmé par le comptage au bleu trypan, où nous observons un plus grand nombre de cellules vivantes avec le contrôle AAPH + « X » 50 µg/ml par rapport au contrôle AAPH seul (**Figure 38**). En pré-traitement, aucune protection n'est observée. En effet, chaque pré-traitement montre une morphologie proche du contrôle AAPH seul qui est une morphologie de cellules mortes.

CONFIDENTIEL

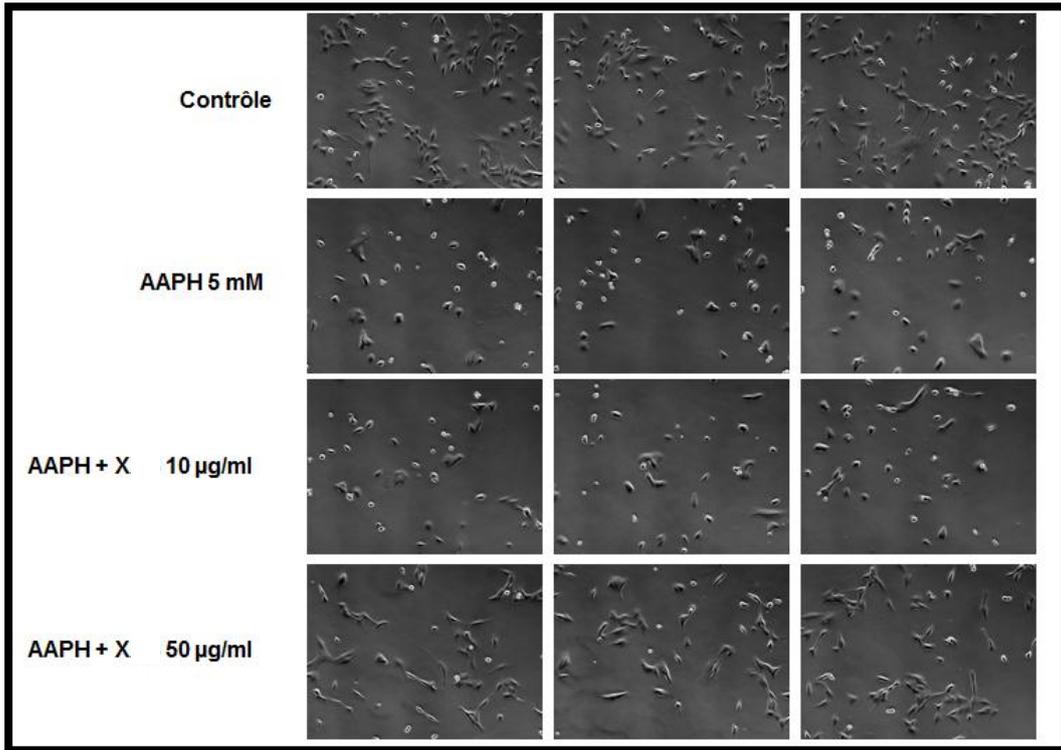


Figure 37. Morphologie des cellules C2C12 après 24h de co-traitement avec X et AAPH.
n=3

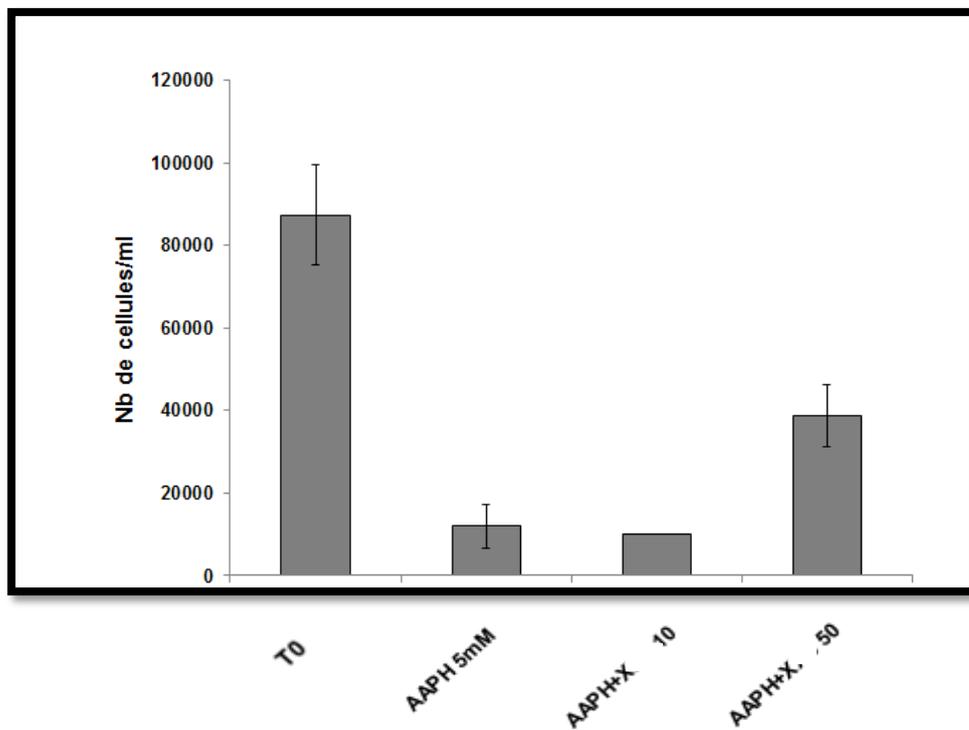


Figure 38. Comptage cellulaire au bleu trypan après 24h de co-traitement des cellules C2C12.
n=3, les barres d'erreur représentent les écarts-types

CONFIDENTIEL

II.2.3. Etude de l'expression de gènes impliqués dans les défenses anti-radicalaires

L'étude de l'expression de gènes impliqués dans les défenses anti-radicalaires a été effectuée sur les cellules C2C12 non différenciées (stade myoblaste). Après co-traitement des cellules C2C12 pendant 24 heures avec le générateur KRL (5 mM) et le produit « X » (10 µg/ml ou 50 µg/ml), nous avons réalisé la même étude de l'expression de gènes que pour les muscles gastrocnémiens. Les expressions des gènes ont été obtenues en comparant les CT des cellules traitées par rapport aux CT des cellules non traitées. Seuls les gènes dont l'expression a montré une variation significative ont été retenus. Enfin, nous avons réalisé une comparaison entre l'expression du générateur KRL et le contrôle et les expressions des co-traitements, générateur KRL + « X » aux différentes concentrations, afin de voir l'incidence du produit « X » dans un environnement de stress oxydant.

Les résultats présentés montrent que les expressions de PRDX1 en co-traitement diminuent de façon significative par rapport à l'expression obtenue avec le générateur KRL contre le contrôle. Cette diminution semble être dose. Le même résultat est observé pour PGC1α, mais la diminution n'est significative qu'avec le co-traitement à 50 µg/ml du produit « X ». Enfin, le profil d'expression de NRF2 suit celui de PRDX1 et PGC1α mais sans diminution significative (**Figure 39**). D'autres gènes (UCP2/3, NRF2, GPx, SOD1/2, PGC1α) ont été étudiés mais n'ont donné aucune variation significative.

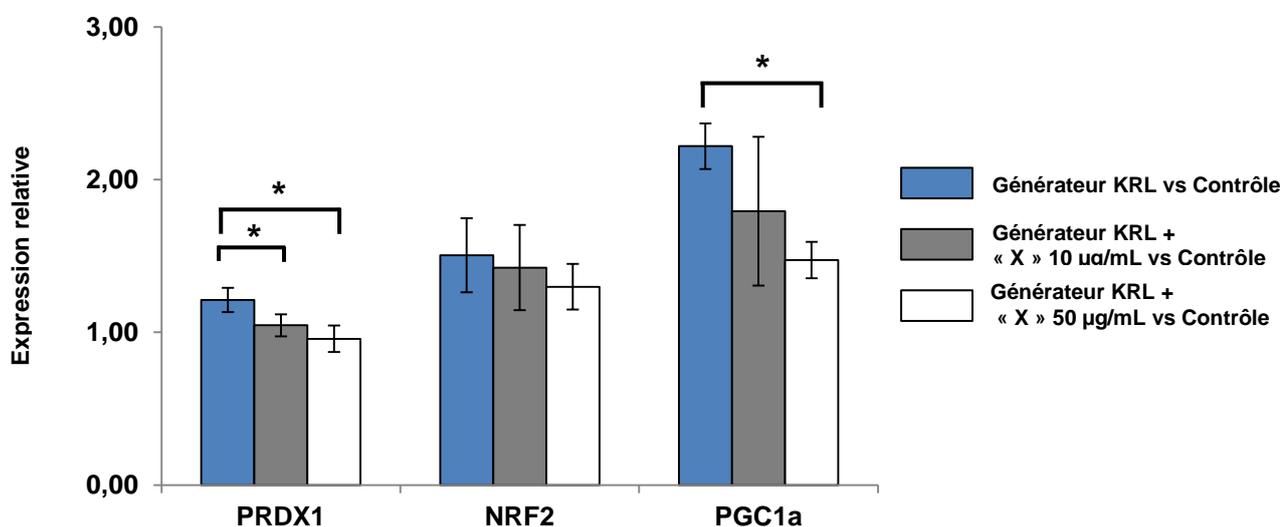


Figure 39. Expression de gènes impliqués dans les défenses anti-radicalaires après co-traitement avec le générateur KRL et le produit « X » sur cellules C2C12 (stade myoblaste).

n=3, les barres d'erreur représentent les écarts-types
Test de Mann-Whitney *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$

CONFIDENTIEL

II.2.4. Dosage de ROS intracellulaire avec sonde DHE (dihydroéthidine)

Le dosage de ROS intracellulaires avec sonde DHE (cf VII.2) a été réalisé sur cellules C2C12 (stade myoblaste). Le principe de ce dosage repose sur la transformation de la sonde DHE en bromure d'éthidium en présence d'anions superoxydes. Le bromure d'éthidium va émettre une fluorescence lorsqu'il sera excité à la bonne longueur d'onde. Par conséquent, la fluorescence sera dépendante du taux de ROS et permettra indirectement le dosage de ces derniers. Le dosage a été effectué après :

- Co-traitement avec générateur KRL (AAPH, 5 mM) + « X » (10 µg/ml et 50 µg/ml) pendant 24 h et 48 h.
- Pré-traitement avec « X » (10 µg/ml et 50 µg/ml) pendant 24h suivi d'un traitement avec générateur KRL (10 mM) pendant 24 h.
- Test d'un possible effet « scavenging », incubation pendant 24h du produit « X » seul (10 µg/ml et 50 µg/ml) ou avec AAPH (5 mM) dans un tube à 37°C, puis traitement sur cellules pendant 24 h.

Les résultats présentés montrent que la fluorescence a tendance à diminuer après 24h de co-traitement AAPH + « X » 50 comparé au témoin positif AAPH seul (**Figure 40 A**). Cette diminution devient significative après 48h de co-traitement avec le produit « X » 50 et l'AAPH à 5 mM, comparé au témoin positif AAPH seul (**Figure 40 B**).

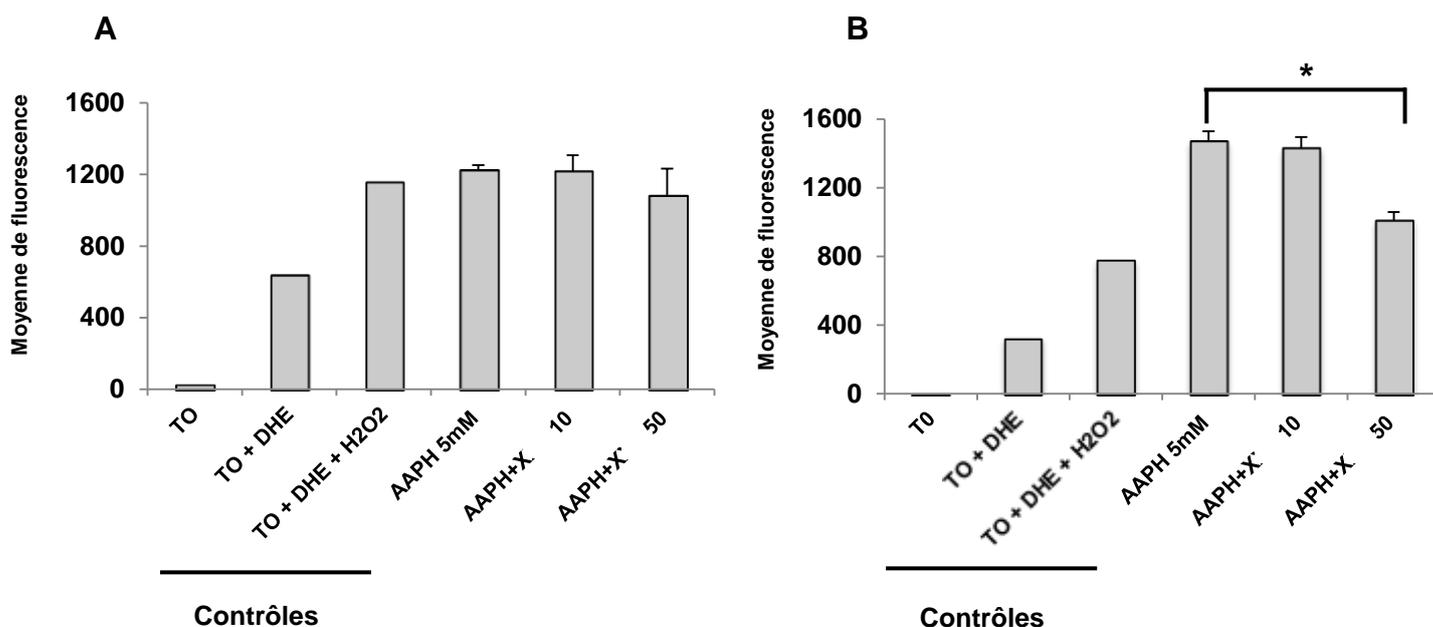


Figure 40. Intensité de fluorescence après co-traitement par activation de la sonde DHE.

A/Fluorescence obtenue après 24 h de co-traitement

B/Fluorescence obtenue après 48 h de co-traitement

n=3, les barres d'erreur représentent les écarts-types

Test de Mann-Whitney *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$

CONFIDENTIEL

Les résultats du test de « scavenging » sont très proches de ceux obtenus en co-traitement 48 h avec « X » 50 + AAPH. En effet, la fluorescence est diminuée de façon significative après traitement « X » 50 + AAPH par rapport au contrôle positif AAPH seul (**Figure 41**).

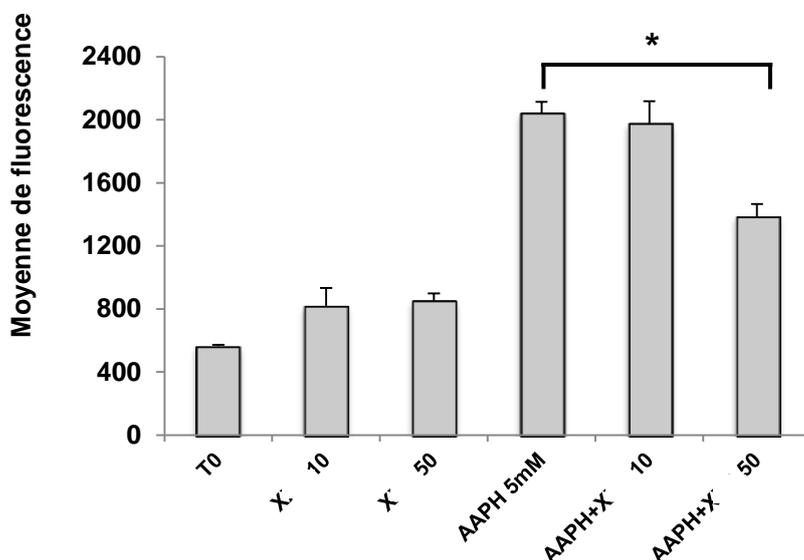


Figure 41. Intensité de fluorescence après test de « scavenging » par activation de la sonde DHE.
n=3, les barres d'erreur représentent les écarts-types
Test de Mann-Whitney *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$

Enfin, les résultats du pré-traitement montrent un profil différent de ceux obtenus avec le co-traitement et le test de « scavenging ». En effet, les cellules pré-traitées avec le produit « X » à 10 $\mu\text{g/ml}$ ou 50 $\mu\text{g/ml}$ ont leur fluorescence qui augmente par rapport au témoin positif AAPH seul. Cette augmentation devient significative lorsque les cellules sont pré-traitées avec le produit « X » à 50 $\mu\text{g/ml}$ (**Figure 42**).

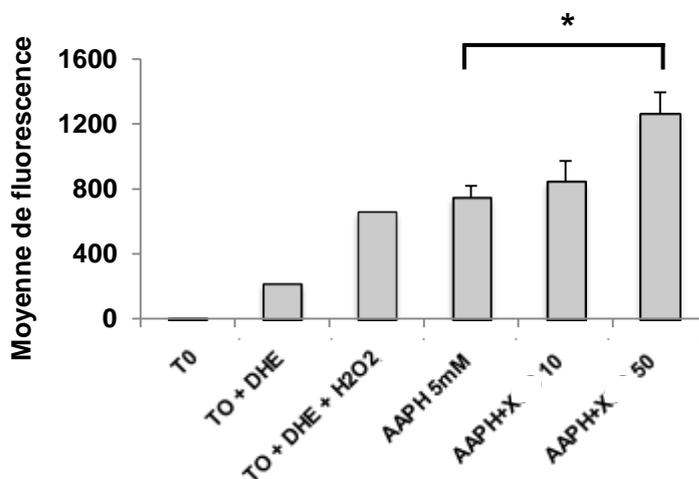


Figure 42. Intensité de fluorescence après pré-traitement par activation de la sonde DHE.
n=3, les barres d'erreur représentent les écarts-types
Test de Mann-Whitney *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$

CONFIDENTIEL

II.3. Conclusions

Le produit « X » semble induire *in vivo* l'expression de gènes participant à la défense anti-radicalaire après 90 jours de traitement sous régime HFHS (NRF1, SOD, SIRT1, UCP2).

Les résultats du dosage KRL sur les muscles gastrocnémiens ont montré à la fois une augmentation du potentiel global anti-radicalaire sous régime HFHS+ « X » comparé au régime HFHS, mais aussi une augmentation du taux de MDA dans ce même régime.

In vitro, le produit « X » semble moduler l'expression d'autres gènes participant à la défense anti-radicalaire (PRDX1, NRF2, PGC1 α).

Le produit « X » semble induire une protection *in vitro* après 24 h de co-traitement à 50 μ g/ml. Cette dernière se traduit par une diminution de fluorescence de la sonde DHE, donc une diminution de taux de ROS. Cette protection par le produit « X » est également caractérisée par une morphologie cellulaire proche du contrôle sans aucun traitement et une augmentation de la viabilité des cellules C2C12 au co-traitement (50 μ g/ml) (cf Figure 40). La diminution de fluorescence devient significative après 48 h de co-traitement à 50 μ g/ml du produit malgré une atteinte des cellules C12C12 au niveau morphologique caractérisée par une morphologie « dead-like ».

III.

*Effet de « γ » sur le
métabolisme des cellules du
muscle squelettique C2C12*

CONFIDENTIEL

III. Effet de « Y » sur le métabolisme des cellules du muscle squelettique C2C12

III.1. Etude de la cytotoxicité de « Y » par cytométrie en flux, double marquage IP et DIOC(6)₃

L'étude de cytotoxicité de « Y » a été effectuée par cytométrie en flux sur cellules C2C12 (stade myoblaste) après 24 h ou 48 h de traitement avec « Y » à des concentrations allant de 0,04 pg/ml à 40 pg/ml. Nous avons utilisé deux sondes fluorescentes, d'une part l'IP (Iodure de Propidium) qui sert à identifier les altérations membranaires, et d'autre part, le DIOC(6)₃ qui permet d'identifier la polarisation mitochondriale (cf VII.1). Grâce à cette technique de cytométrie en flux, les cellules seront aussi identifiées en fonction de leur granularité (SSC) et en fonction de leur taille (FSC). Enfin, nous avons choisi comme contrôle positif de cytotoxicité le 7-cétocholestérol (40 µg/ml), utilisé dans notre laboratoire et connu pour ses effets cytotoxiques.

Les résultats présentés montrent que le 7-cétocholestérol induit bien une mort cellulaire caractérisée par la présence de cellules IP+ (altération membranaire) et DIOC(6)₃- (mitochondries dépolarisées) (**Figure 43**). Les contrôles huile de soja (véhicule de « Y ») et le contrôle 0,1% EtOH présentent des cellules vivantes à marquage IP- et DIOC(6)₃+. Enfin, les différents traitements par « Y » montrent des cellules vivantes à marquage IP- et DIOC(6)₃+

L'étude de cytotoxicité de « Y » a été également réalisée par dosage de la LDH au plateau technique du Bocage (Hôpital de Dijon). Seuls les traitements des cellules par le 7-cétocholestérol ont montré une élévation de la concentration de la LDH dans le milieu de culture (données non montrées).

CONFIDENTIEL

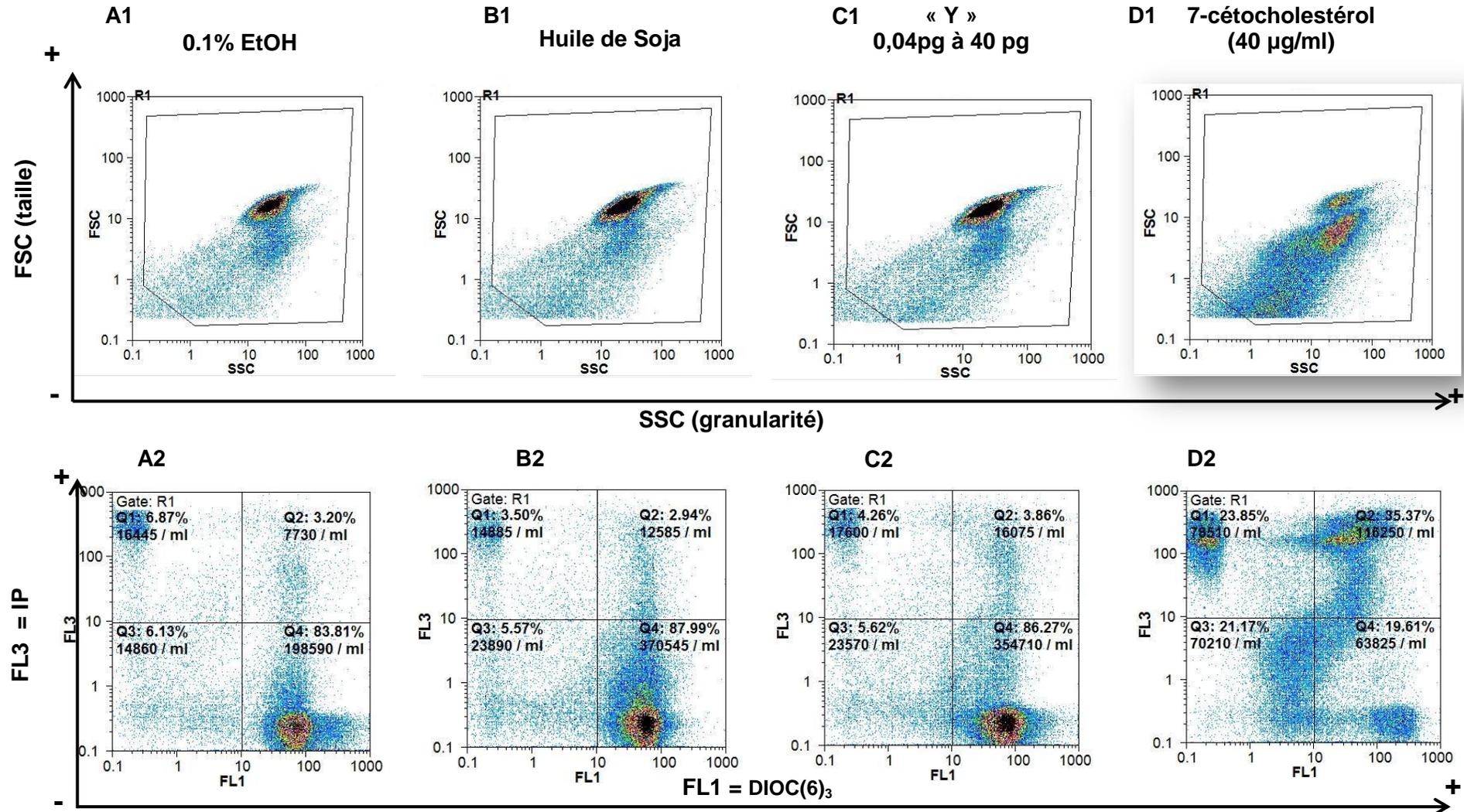


Figure 43. Histogramme de cytotoxicité des cellules C2C12 après double marquage IP/DIOC6 en cytométrie en flux (cf VII.1 pour interprétation)
 n=3, l'histogramme est représentatif d'une manipulation

- A1/A2 population de cellules après traitement avec 0,1% EtOH
- B1/B2 population de cellules après traitement avec Huile de Soja
- C1/C2 population de cellules après traitement avec « Y » (0,04 pg/ml à 40 pg/ml)
- D1/D2 population de cellules après traitement avec 7-cétocholestérol

A1 à D1 population de cellules en fonction de la taille et de la granularité
 A2 à D2 population de cellules en fonction du double marquage IP/DIOC(6)₃

CONFIDENTIEL

III.2. Etude de gènes cibles de « Y »

L'étude de l'expression de gènes cibles a été effectuée sur les cellules C2C12 (stade myoblaste) après 24 h ou 48 h de traitement avec « Y » aux concentrations de 0,04 pg/ml, 0,4 pg/ml, 4 pg/ml, 40 pg/ml. L'étude de l'expression de gènes a été effectuée par PCR quantitative et les résultats ont été analysés par le logiciel « REST ». Nous avons comparé chaque expression de gènes avec le produit « Y » par rapport au contrôle 0,1% EtOH. Nous obtenons ainsi le niveau d'induction du gène par rapport au contrôle.

Les résultats présentés montrent une variation modérée de l'expression de gènes des cellules traitées à la « Y » par rapport aux cellules non traitées. Cependant, nous pouvons remarquer que plus la concentration en « Y » devient importante, plus le nombre de gènes stimulés augmente de façon significative après 24 h de traitement (**Tableau 16**).

| Gènes | gs1 | Srebp1c | fabp3 | ppar β | vlcad | scap | srebp2 |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|--------------|----------|----------|---------|
| Traitements avec « Y » (en pg/ml) | | | | | | | |
| 0,04 | 1,332 * | 1,249 * | | | | | |
| 0,4 | 1,361 * | | 1,405 * | | | | |
| 4 | | | 1,448 * | 1,094 * | 1,256 * | | |
| 40 | 1,555** | | | 1,165 * | 1,387 ** | 1,397 ** | 1,24 ** |

Tableau 16. Expression de gènes après traitement des cellules C2C12 (myoblastes) pendant 24h par différentes concentrations de « Y »

n=6, Test de randomisation *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$

Après 48h de traitement par « Y », une très faible stimulation est observée pour srebp1c (1,325 *) à 4 pg/ml de « Y », ainsi que pour fabp3 (2,06 *) à 40 pg/ml de « Y ».

III.3. Evaluation de « Y » comme possible activateur de PPAR α ou PPAR γ .

Compte tenu de la présence dans la préparation de « Y » de composés lipidiques susceptibles d'être agonistes de PPAR α et ou PPAR γ , l'évaluation de « Y » comme activateur de PPAR α ou PPAR γ a été réalisée par transfection transitoire des cellules C2C12 avec des plasmides codant pour PPAR α et PPAR γ . Le plasmide contenant les séquences de PPAR α ou PPAR γ code une protéine de fusion contenant un domaine de fixation à l'ADN (Gal4 DBD). Cette protéine de fusion a la possibilité de se fixer sur le plasmide « pfr LUC » contenant des séquences d'appariement pour Gal4 DBD.

CONFIDENTIEL

Une fois le complexe formé, ce dernier va transcrire le gène de la luciférase, dont la séquence est également présente sur le plasmide « pfr Luc ».

Enfin, l'activité luciférase sera quantifiée par chimio-luminescence après ajout d'un substrat (luciférine) (**Figure 44**).

Dans notre étude, nous voulons savoir si « Y » peut être un agoniste possible de PPAR α ou PPAR γ en induisant l'activité luciférase via ces récepteurs. Les cellules C2C12 sont donc traitées pendant 24 h avec « Y » (0,04 pg/ml et 40 pg/ml) ou avec des ligands spécifiques de chaque PPAR (Wy ou Rosiglitazone) après transfection (6 h).

Les résultats présentés montrent que le Wy, ligand spécifique de PPAR α induit bien une activité luciférase lorsque les cellules sont transfectées avec le plasmide contenant PPAR α par rapport au contrôle transfecté avec un plasmide vide (\emptyset). Un résultat similaire est obtenu en utilisant la Rosiglitazone dans les cellules transfectées avec le plasmide contenant PPAR γ .

Cependant, aucune activité luciférase n'est observée avec les différents traitements avec « Y » dans les cellules transfectées avec PPAR α ou PPAR γ . Le même résultat négatif est obtenu après traitement de cellules avec un polyphénol connu, le resvératrol (**Figure 42**).

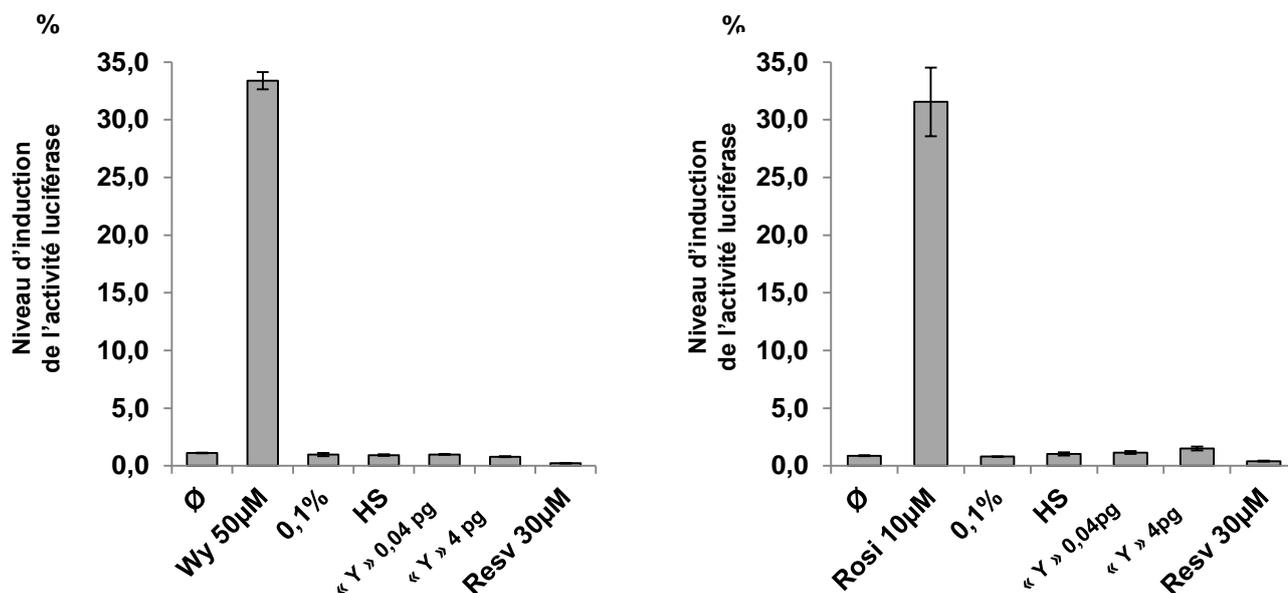


Figure 44. Activité luciférase après transfection avec le plasmide PPAR α (A) ou le plasmide PPAR γ (B).

n=3 Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

HS = Huile de Soja, 0,1%= 0,1 EtOH final, Resv 30 μ M= Resvératrol à 30 μ M final, \emptyset = plasmide vide
Rosi 10 μ M = Rosiglitazone à 10 μ M final, Wy 50 μ M= Wy à 50 μ M final

CONFIDENTIEL

III.4. Effet de « Y » sur l'activité de la glycogène synthase

L'activité glycogène synthase a été mesurée sur cellules C2C12 différenciées (myotubes) après 48 h de traitement avec « Y » 4 pg/ml et 40 pg/ml. Cette technique consiste à mesurer la quantité de glucose marqué au carbone ^{14}C ajoutée après les traitements et qui est incorporée dans la fraction glycogène des cellules. Cette synthèse *de novo* de glycogène représente indirectement le niveau d'activité de la glycogène synthase. Un témoin positif représenté par un pré-traitement insulinique (100 nM) a été ajouté. Le témoin négatif est représenté par la base huile de soja seule.

Les résultats présentés montrent que « Y » n'a aucun effet sur l'activité de la glycogène synthase quelle que soit la concentration utilisée. Seul le traitement à l'insuline semble augmenter la quantité de glucose marqué dans la fraction glycogène (**Figure 45**).

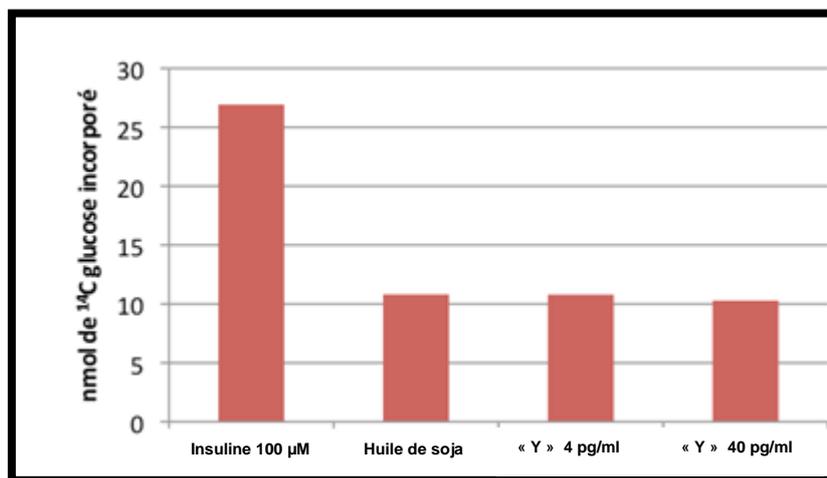


Figure 45. Incorporation de ^{14}C glucose dans la fraction glycogène de cellules C2C12 différenciées après 48 H de traitement

L'hypothèse d'un effet de « Y » sur la captation du glucose par les cellules C2C12 a également été vérifié par l'utilisation d'un analogue radiomarqué non-métabolisable du glucose, le 2-deoxy-D-[1- ^3H]-glucose. Cet analogue a été utilisé pour suivre le transport du glucose dans les myotubes après traitement ou non par « Y » 40 pg/mL durant 24 heures.

Les résultats préliminaires (données non montrées) montrent que « Y » n'a pas d'effet significatif sur le transport du glucose dans ces conditions.

CONFIDENTIEL

III.5. Numération sanguine

Compte tenu que des facteurs contribuant au syndrome métabolique créent un terrain pro-inflammatoire, nous avons étudié un possible effet anti-inflammatoire de « Y » par un comptage lymphocytaire sur frottis sanguin provenant de souris sous régimes SD, SD + « Y », HFHS ou HFHS + « Y ». Dans la littérature, des pathologies avec processus inflammatoire sont souvent associées à l'augmentation du nombre de lymphocytes (Shim *et al* 2006).

Les résultats présentés montrent que le régime HFHS augmente le nombre de lymphocytes par rapport au régime SD. De plus, « Y » diminue de façon significative le nombre de lymphocytes lorsque nous comparons le régime HFHS et le régime HFHS + « Y » (**Figure 43**).

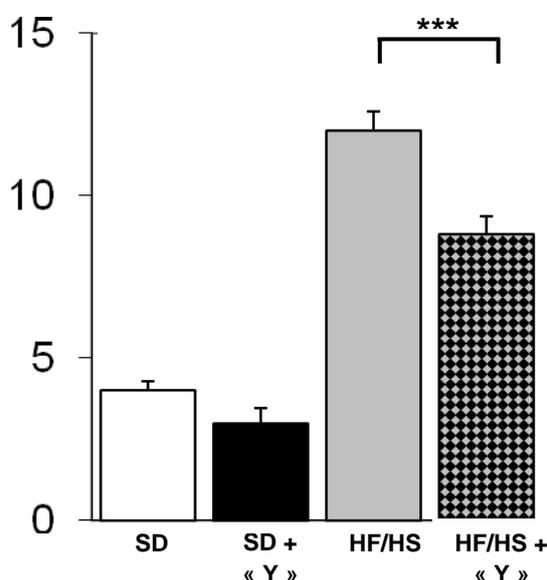


Figure 43. Comptage lymphocytaire sur frottis sanguin provenant de souris sous régime HFHS, HFHS+ « Y », SD et SD+ « Y »
n=10, les barres d'erreur représentent les écarts-types
Anova 1W *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$

Le produit « Y » semble induire l'expression de gènes du métabolisme lipidique mais de façon modérée après 24h de traitement sur cellules C2C12.

Le produit « Y » ne présente pas de cytotoxicité et ne semble pas être un agoniste de PPAR α et de PPAR γ caractérisé par une absence d'activité luciférase après traitement avec ce produit.

De même, « Y » ne semble pas induire une quelconque activité glycogène synthase.

Enfin, le produit « Y » semble induire un effet anti-inflammatoire caractérisé par une diminution du nombre de lymphocytes.

CONFIDENTIEL

Discussion

CONFIDENTIEL

La première partie de notre travail a été consacrée à l'étude des effets pro-différenciateurs du resvératrol et de son impact sur le métabolisme des cellules C2C12 (myoblastes). Les résultats ont montré tout d'abord que ce polyphénol est capable de moduler de façon significative l'expression de certains facteurs de la différenciation musculaire comme la myogénine ainsi que *csrcp3* (Janot *et al* 2009). Peu de données existent sur les effets pro-différenciateurs de ce polyphénol au niveau du muscle squelettique. Dans des conditions pathologiques types myopathies ou tout simplement en cas de vieillissement, le tissu musculaire est sujet à l'atrophie. Dans des conditions physiologiques normales, le muscle squelettique est un organe qui peut se régénérer (Mokalled *et al* 2012). En conditions pathologiques, améliorer cette capacité de régénération en stimulant la prolifération, puis la différenciation des cellules musculaires myoblastiques, apparaît comme une cible de choix pour le resvératrol afin de restaurer la fonctionnalité musculaire. De plus, les lésions musculaires sont accompagnées d'un syndrome inflammatoire caractérisé par la présence de cellules et de cytokines inflammatoires (Hunt *et al* 2012). Bien que non étudié ici, l'effet anti-inflammatoire du resvératrol est bien décrit dans la littérature et pourrait à la fois favoriser et potentialiser l'effet pro-différenciateur du muscle en diminuant l'état inflammatoire et en surexprimant l'utrophine, protéine qui pourrait remplacer la dystrophine dans la myopathie de Duchenne (Gordon *et al* 2012). Nos résultats montrent aussi que le resvératrol est capable d'augmenter la quantité de myosine. Cette protéine avec l'actine est responsable de la contractilité musculaire, par conséquent le resvératrol peut aussi avoir un impact sur la fonction contractile du muscle squelettique. Dans notre travail, nous nous sommes également intéressés à l'expression de certains gènes intervenant dans le métabolisme énergétique du muscle squelettique. Nos résultats montrent que le resvératrol augmente de façon significative l'expression de *Pgc1 α* et diminue de façon significative les expressions de *Glut4* et d'*Acads*. Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus dans la littérature, où le resvératrol induit, d'une part, le métabolisme énergétique par stimulation de la β -oxydation (Lagouge *et al* 2006) et d'autre part, la captation du glucose par GLUT4 mais au niveau des myotubes (Park *et al* 2007). Toutefois, nous n'avons que l'expression des ARNm, il serait judicieux de voir l'expression protéique de *Glut4*. De plus, le métabolisme des cellules C2C12 stade myoblaste est différent du stade myotube. Nous pouvons supposer que dans nos conditions (stade myoblaste), le resvératrol à 30 μ M ralentit seulement le métabolisme énergétique par rapport au stade myoblaste qui est plus proche du muscle mature et qui a un besoin énergétique important. Il faudrait alors réaliser un effet dose (5 à 30 μ M) et étudier de nouveau l'expression des mêmes gènes afin de conclure à cette diminution d'expression génique.

CONFIDENTIEL

Au niveau du muscle squelettique de nombreuses études décrivent le resvératrol comme inducteur de l'axe PGC1 α -SIRT1-AMPK (Timmers *et al* 2012) responsable de la régulation du métabolisme lipidique et du métabolisme glucidique. Cependant, SIRT1 et PGC1 α peuvent interagir directement avec des mrf (MyoD) et avec les membres de la famille Mef2 (Amat *et al* 2009), nous pouvons donc penser que le resvératrol est capable également de contrôler la myogenèse par l'axe PGC1 α -SIRT1-AMPK. Les derniers résultats de notre travail sur le resvératrol montrent que ce polyphénol est capable de moduler l'expression des microRNA. Dans la littérature, quatre mir essentiels (miR-1, miR-133, miR-206 et miR-208) sont impliqués dans la myogenèse normale du muscle squelettique (Huang *et al* 2012). Dans notre étude, seul le miR-133 est régulé de façon significative (diminution de 50%, données non montrées). Cependant, il est rapporté que ce miR est stimulé par la myogénine et qu'une boucle de rétro-contrôle existe entre ce mir et le facteur IGF-1 lors de la myogenèse du muscle squelettique (Huang *et al* 2011). Il apparaît donc que le resvératrol n'induirait pas la différenciation par ce miR. Néanmoins, nos résultats d'expressions des miR ont été obtenus après 24 h de traitement avec le resvératrol à 30 μ M. Il serait donc intéressant de suivre l'expression de ces miR pendant la cinétique de 24 h avec le resvératrol à 20 μ M. Bien entendu, nous avons obtenu de nombreux miR dont l'expression est régulée de façon significative avec le resvératrol. L'un d'eux est le miR-20b dont les gènes cibles sont MyoD et Myf5, des facteurs essentiels de la différenciation musculaire. Nous pouvons donc penser que le resvératrol peut moduler la myogenèse via des miR n'ayant pas encore été caractérisés comme impliqués dans la différenciation musculaire (voir publication « review » (Lancon *et al* 2012) en annexe). Quel serait alors l'intérêt d'une supplémentation en resvératrol ? Dans un premier temps, chez un adulte sain, le resvératrol pourrait jouer un rôle préventif. En effet, l'implication de ce polyphénol dans le métabolisme énergétique ainsi que ses effets pro-différenciateurs permettraient à un individu d'améliorer la résistance des muscles face aux efforts. De plus, induire la myogenèse lors du vieillissement caractérisé par une atrophie musculaire, permettrait également de sauvegarder à la fois le tonus et la mobilité des personnes âgées. Enfin, nous pouvons imaginer une supplémentation en resvératrol chez le sportif qui pourrait permettre une récupération de la masse musculaire après des lésions provoquées par un exercice, et ne dit-on pas : « mieux vaut prévenir que guérir »?

Cependant, avant de proposer une supplémentation en resvératrol, il reste de nombreuses réponses à apporter aux questions suivantes telles que:

1/ Y'a-t-il une toxicité de ce polyphénol à long terme chez l'Homme? On serait tenté de dire non au vu du concept du « French paradox », émis pour la première fois par le Dr Serge

CONFIDENTIEL

Renaud décédé cette année (28/10/2012). Des études à long terme sont donc indispensables pour répondre à cette question.

2/ Quelle est la dose préconisée en resvératrol ? Encore une question qui n'a pas de réponses précises. Les doses utilisées chez l'Homme varient en fonction des études menées et vont de quelques mg jusqu'à 2000 mg (Timmers *et al* 2012).

Une chose importante que l'on ne doit pas oublier est que l'une des sources du resvératrol est le vin. Par conséquent, inviter les personnes à consommer de l'alcool pour obtenir un effet bénéfique est un peu paradoxal. Toutefois, boire avec modération est peut-être l'une des clés du « French paradox ».

4/ Enfin, l'utilisation du resvératrol comme agent pro-différenciateur peut avoir des applications chez les personnes atteintes par des atrophies musculaires comme par exemple les myopathies. Les travaux sur souris *mdx* ont permis de mettre en évidence l'implication du resvératrol dans l'augmentation de la résistance face à la fatigue dans ce modèle de myopathie (Selsby *et al* 2012). Nous pouvons donc imaginer qu'une supplémentation en resvératrol chez l'Homme permettrait d'induire ce genre de résultats au niveau musculaire.

En conclusion, notre travail a permis de caractériser des effets pro-différenciateurs au niveau des cellules C2C12 (myoblastes). Cet effet est attesté par l'augmentation de l'expression de facteurs participant à la différenciation musculaire, par l'augmentation de la myosine et par la modulation de mir. Bien que cet effet ait été observé précocement (cinétique de 24 h), il apparaît évident que des études à long terme sont indispensables chez l'animal ainsi que chez l'Homme afin de pouvoir conclure sur les bienfaits préventifs et/ou pharmaceutiques de ce polyphénol.

CONFIDENTIEL

La seconde partie de notre travail a été consacrée à l'étude des mécanismes d'action d'une formulation naturelle que nous avons appelée « X » et dirigée contre le stress oxydant. Les effets antioxydants du produit « X » ont été caractérisés dans un premier temps par l'étude de l'expression des gènes impliqués dans les défenses anti-radicalaires. *In vivo*, l'étude de l'activité SOD totale réalisée sur les gastrocnémiens de souris traitées 90 jours avec le produit, a montré une diminution significative de l'activité SOD sous régime HFHS + « X » comparé au régime HFHS seul. Il est bien admis dans la littérature, que l'activité SOD est étroitement liée au taux de ROS (Iborra *et al* 2011). Une augmentation du taux de ROS s'accompagne d'une augmentation des défenses anti-radicalaires comme par exemple, l'augmentation de l'activité SOD et inversement. Dans notre étude, la diminution de l'activité SOD dans le régime HFHS + « X » peut s'expliquer par un piégeage des Ros par l'apport de « X ». Cette hypothèse peut être soutenue tout d'abord, par les résultats du dosage KRL où l'on observe une augmentation significative du potentiel global anti-radicalaire dans le régime HFHS+ « X » et qui pourrait être à l'origine d'une diminution du taux de ROS. De plus, les résultats *in vitro* de cytométrie en flux avec sonde DHE ont montré que le produit « X » est capable de diminuer le taux de ROS intracellulaire en co-traitement (24 h et 48 h) en présence d'un générateur de ROS. Cependant, le dosage MDA nous indique une augmentation de ce produit de la peroxydation lipidique dans les muscles gastrocnémiens de souris ayant reçu le régime HFHS+ « X » pendant 90 jours. En parallèle, l'étude avec la sonde DHE lors de pré-traitement avec le produit X seul, nous indique que celui-ci est capable d'induire un stress oxydant. Nous pouvons donc nous poser la question : le produit « X » ou l'un de ces composés pourrait-il induire un léger stress oxydant?

Les résultats de l'étude *in vivo* et *in vitro* de l'expression des gènes impliqués dans la défense anti-radicalaire montre que le produit X est capable de moduler significativement l'expression de certains d'entre eux. Cependant, la différence d'activation génique entre le modèle *in vivo* et le modèle *in vitro* peut s'expliquer, d'une part, par la complexité du muscle gastrocnémien vis-à-vis du modèle cellulaire (C2C12), et d'autre part, par les différences de concentration et d'absorption utilisées du produit X au niveau cellulaire et au niveau animal. Toutefois, l'augmentation de l'expression de NRF1 et NRF2 pourrait suggérer un mécanisme d'action via ces facteurs de transcription. En effet, dans la littérature, NRF1/NRF2 sont capables de se lier à des séquences nucléotidiques particulières appelées « ARE » pour « Antioxidant Response Element » localisées au niveau des promoteurs des gènes, entre autres des gènes antioxydants (Biswas & Chan 2010, Singh *et al* 2010).

CONFIDENTIEL

Une fois liés aux séquences ARE et sous l'influence d'un complexe protéique, NRF1/NRF2 vont pouvoir induire l'expression des gènes de défense anti-radicalaire. Dans la littérature il est décrit que les gènes de SOD ont une séquence ARE (Yao *et al* 2012), nous pouvons donc supposer que l'augmentation modérée de l'expression du gène de SOD1 en régime HFHS+ « X » à 90 jours de traitement dans les muscles gastrocnémiens pourrait être reliée à l'augmentation modérée de l'expression de NRF1 au même temps de traitement et régime.

In vitro, les résultats montrent que le profil de PRDX1 est semblable à celui de NRF2. Dans la littérature Prdx1 est un gène cible de Nrf2 (Kim *et al* 2007), nous pouvons donc supposer que le produit « X » pourrait augmenter l'expression de Nrf2 et ce dernier pourrait induire l'expression de Prdx1. Nous pouvons voir également que les expressions *in vitro* des gènes ont toutes le même profil. On observe une normalisation des expressions de Prdx1, Nrf2 et Pgc1 α en présence du produit « X » et qui ont été stimulées par le générateur KRL. Nous pouvons alors supposer que cette diminution d'expression de gènes est due peut-être à une diminution du stress oxydant. Enfin, bien que nous n'ayons pas obtenu de modulation significative des gènes UCP au niveau cellulaire, l'expression d'UCP2 en particulier au niveau des gastrocnémiens, semble être augmentée de façon significative à 3 mois de traitement lorsqu'on compare les régimes SD + « X » ou HFHS + « X » à leurs régimes respectifs sans le produit « X ». Dans la littérature, l'augmentation d'UCP2 est corrélée à une diminution de ROS (Teshima *et al* 2003), il apparaît donc que le produit « X » induirait un mécanisme de défense anti-radicalaire lié à UCP2 au niveau des gastrocnémiens.

En conclusion, notre travail a permis de caractériser quelques mécanismes d'action du produit « X » qui serait impliqué dans la défense anti-radicalaire. Comme sa composition reste confidentielle, il est difficile de trouver d'autres pistes à explorer en se rapportant à d'autres molécules ou produits décrits dans la littérature. Cependant d'autres pistes d'études sont envisagées comme l'influence de « X » sur les cellules musculaires différenciées ou la comparaison des effets antioxydants entre souris mâles ou femelles, ou encore des études à plus long terme, supérieur à 90 jours.

CONFIDENTIEL

La dernière partie de notre travail a été consacrée à l'étude des mécanismes d'action d'une formulation naturelle appelée « Y » et destinée à corriger les désordres de nature lipidique de sujets présentant un syndrome métabolique. L'une des idées principales développées dans ce projet, proposée par le Pr Walter Wahli, est qu'une formulation à base d'éléments naturels (minéraux, huiles, polyphénols) serait capable de moduler l'expression des gènes, ici du métabolisme énergétique afin de répondre à un état pathologique (syndrome métabolique). Cette approche a fait naître un nouveau concept, celui de la « nutriginomique », où un apport en éléments naturels serait à l'origine d'une activation génique. Nous avons pu vérifier, entre autres, si le produit « Y » était capable de moduler l'expression des gènes du métabolisme lipidique et glucidique et s'il pouvait jouer un rôle au niveau métabolique fonctionnel en réalisant des études de captation du glucose et de l'activité glycogène synthase. L'une des premières difficultés rencontrées dans notre projet, était la solubilisation du produit « Y ». En effet, le véhicule principal de « Y » était l'huile de soja. Ce dernier, nous a fortement limité dans le choix des concentrations de traitement. En effet, des solutions homogènes sans gouttelettes lipidiques étaient nécessaires pour les traitements en culture cellulaire. « Y » a alors été solubilisée dans l'éthanol et nous avons obtenu des solutions homogènes mais avec de très faibles concentrations en « Y » (entre 0,04 pg/ml à 40 pg/ml). La question posée alors était la suivante: est-ce que les très faibles concentrations en « Y » utilisées en culture cellulaire seraient suffisantes pour induire un quelconque effet biologique? Cependant, la publication de Walter Wahli indique une utilisation de « Y » à des concentrations finales entre 5 pg/ml à 17 pg/ml (El Kochairi *et al* 2011). Dans un premiers temps, nous nous sommes intéressés à un possible effet cytotoxique de « Y ». Les résultats en cytométrie en flux après double marquage IP+ DIOC(6)₃ (marqueurs de l'altération membranaire et de la polarisation mitochondriale) et dosage de la LDH (données non montrées) ont montré qu'il n'y a pas d'effet cytotoxique après 24 h ou 48 h de traitements avec « Y » aux concentrations utilisées (0,04 pg/ml à 40 pg/ml). Les résultats de l'étude de l'expression des gènes du métabolisme énergétique ont montré que « Y » est capable d'induire significativement l'expression de certains gènes comme *gs1*, *Srebp1c*, *fabp3*, *pparβ*, *vldl*, *scap* après 24 h de traitement aux différentes concentrations. De plus, nous pouvons observer que le nombre de gènes stimulés augmentent lorsqu'on augmente la concentration en « Y ». Cependant, « Y » module l'expression des gènes de façon modérée qui peut s'expliquer dans notre cas par le contexte de micro-nutrition. L'étude de l'expression des gènes au niveau musculaire chez la souris Ob/Ob réalisée au laboratoire du Professeur Walter Wahli a montré également une

CONFIDENTIEL

modulation modérée des gènes intervenant dans la trophicité et contraction musculaire (myogénine) ainsi que des gènes de l'oxydation lipidique (Acox1, Fabp3).

L'une des études effectuées par ce laboratoire était de voir si certains des constituants de « Y » pouvait être des agonistes de PPAR α , facteurs de transcription connus pour activer la β -oxydation et diminuer l'accumulation des graisses (Desvergne *et al* 2006, Kersten *et al* 2000). Nos résultats de transfection des cellules C2C12 avec des plasmides contenant les séquences de PPAR α et PPAR γ montrent que « Y » n'est pas un agoniste de ces deux PPAR dans nos conditions. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de l'équipe de Walter Wahli où il a montré que la préparation « Y » et certains de ses constituants sont capables d'induire une activité luciférase par l'intermédiaire de PPAR α dans des cellules NIH3T3 (fibroblastes) (El Kochairi *et al* 2011).

L'étude d'un effet anti-inflammatoire de « Y » a porté sur un comptage lymphocytaire sur frottis sanguin provenant de souris sous régime SD et HFHS \pm « Y ». Nous avons alors remarqué que « Y » avait induit une diminution significative du nombre de lymphocytes dans le régime HFHS + « Y » comparé au régime HFHS seul. Bien que préliminaire, ce premier résultat encourageant de l'état inflammatoire aurait pu être poursuivi par l'étude de cytokines inflammatoires, mais des conditions n'ont pas permis de continuer ce travail. De même, les premières études de l'activité glycogène synthase et de la captation du glucose n'ont pas pu être poursuivies et n'ont montré aucun effet sur ces paramètres.

L'ensemble des résultats obtenus a montré que « Y » était capable de moduler seulement l'expression de quelques gènes. L'arrivée tardive de « Y » micro-émulsionné ou reconstitué dans l'eau ne nous a pas permis d'effectuer d'autres études à des concentrations plus élevées en raison de problèmes de stabilité des préparations fournies.

CONFIDENTIEL

*Conclusions et
Perspectives*

CONFIDENTIEL

Les résultats encourageants obtenus au cours du travail avec le resvératrol sur les effets pro-différenciateurs de ce polyphénol sur les cellules musculaires squelettique demandent à être approfondis. Une étude d'expression de protéines de fusion membranaire telle que la caveolin 3, protéine nécessaire pour la fusion des myoblastes.

Un passage sur un modèle animal, par exemple sur souris *mdx*, pourrait apporter des renseignements supplémentaires. Nous pourrions alors vérifier à la fois l'expression des mêmes facteurs de différenciation qui ont été étudiés sur cellules C2C12 et le taux de myosine. Dans un premier temps, des lots de souris sans pathologie musculaire seraient utilisés comme témoins par rapport à un lot de souris *mdx*. Cette étude servirait à voir si le resvératrol est capable de restaurer (partiellement) la perte musculaire chez les souris *mdx* et ainsi améliorer leurs performances par rapport aux souris témoins. Nous pourrions imaginer également une étude entre souris *mdx* avec ou sans supplémentation en resvératrol et suivre l'évolution de la masse musculaire, l'expression des mrf, ainsi que le taux de phosphocréatine qui permet de voir la récupération musculaire après des efforts physiques. En parallèle, nous pourrions travailler également sur le métabolisme mitochondriale, voir si le resvératrol peut améliorer la biogenèse mitochondriale chez des souris myopathes. Différents facteurs pourraient être étudiés, comme le taux d'ADN mitochondrial (mtDNA), les enzymes de la chaîne respiratoire (citrate synthase, succinate déshydrogénase), l'expression de PGC1 α et Tfam qui sont liés directement à l'expansion mitochondriale. Enfin une étude morphologique des mitochondries pourrait être envisagée sur les muscles de souris (gastroncnémiens ou autres).

Cet nouvelle approche sur le muscle squelettique avec le resvératrol ouvre de nouvelles possibilités de recherche et pourrait déboucher un jour peut-être sur des thérapies à base de polyphénols.

Le travail avec le produit « X » nous a permis de caractériser quelques effets antioxydants au niveau musculaire. Comme nous nous trouvons dans un contexte de micro-nutrition, il est indispensable de réaliser des études à plus long terme. Par chance, l'équipe du Dr Lagrost dispose de lots de souris qui recevront le régime à base du produit « X » à plus de 200 jours. Il sera alors judicieux de refaire les mêmes analyses sur les muscles pour voir l'impact réel du produit « X ». Dans notre cas, nous disposons de lots de souris mâles et femelles qui ont reçu un régime HFHS avec ou sans produit « X ». Nous allons réaliser très bientôt l'étude de l'expression des mêmes gènes participant aux défenses anti-radicalaires présentés dans ce mémoire. Nous pourrions alors observer si le produit « X » a une incidence au niveau du sexe

CONFIDENTIEL

de souris. Seront également réalisés des dosages KRL et MDA sur les muscles des lots de souris mâles et femelles. Nous allons alors avoir plus d'informations sur l'état oxydant des animaux et ceci en fonction du sexe.

Annexes

Publication review

Control of MicroRNA Expression as a New Way for Resveratrol To Deliver Its
Beneficial Effects (Lancon *et al* 2012). J Agric Food Chem

Control of MicroRNA Expression as a New Way for Resveratrol To Deliver Its Beneficial Effects

Allan Lançon,[†] Jacques Kaminski,[†] Esmerina Tili,[§] Jean-Jacques Michaille,[†] and Norbert Latruffe^{*†}

[†]Laboratory of Biochemistry of Metabolism and Nutrition, INSERM U-866, University of Burgundy, 6 Boulevard Gabriel, F-21000 Dijon, France

[§]Department of Molecular Virology, Immunology and Medical Genetics, The Ohio State University, 460 West 12th Avenue, Columbus, Ohio 43210, United States

ABSTRACT: Grapes produce large amounts of polyphenols. Many of them accumulate in the skin, pulp, and seeds and are consequently found in wine. The health benefits of a moderate consumption of wine have been attributed at least in part to grape's polyphenols. Among them, resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a phytoalexin that stimulates plant cell defenses against infections and also plays protective roles in humans, where it delays cardiovascular alterations and exerts anticancer and anti-inflammatory effects. Despite numerous studies, the molecular mechanisms of resveratrol action are only partially understood. Given its pleiotropic effects, it was previously suggested that resveratrol protective properties may arise from its modulation of the expression of microRNAs. Therefore, this review will focus on the effects of resveratrol on microRNA populations in humans and human cell lines, especially emphasizing the microRNAs that have been implicated in resveratrol effects on inflammation, cancer, metabolism, and muscle differentiation

KEYWORDS: microRNAs, resveratrol, cancer, inflammation, metabolic disease, muscle, grape, wine

■ INTRODUCTION

Grape plants (*Vitis vinifera*) produce substantial amounts of a wide variety of polyphenols as secondary metabolites. Many of them accumulating in the skin, pulp, and seeds of grapes are subsequently found in grape juice or wine. The health benefits of a moderate consumption of wine have now been firmly established¹ and are due at least in part to their high content in polyphenols, especially resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene), the concentration of which is particularly elevated (3–5.5 mg/L) in wines prepared from Gamay and Pinot noir plants.² Resveratrol is a phytoalexin that stimulates plant defense against various biotic and abiotic stresses and also plays protective roles in animals. It is also found in other comestible berries and seeds (blueberries, peanuts, ...) as well as in several medicinal plants (*Polygonum cuspidatum*, *Yucca schidigera*, ...). In humans, resveratrol is believed to delay or limit cardiovascular alterations, cancer, inflammation, and related pathologies such as chronic inflammation.³ Despite a number of studies that investigated several signaling and transcriptional pathways, the mechanisms of the pleiotropic action of resveratrol remain poorly understood presently.⁴ However, several recent publications have established that one reason resveratrol can affect so many different regulatory pathways is due to its capability to modulate the expression, and consequently the regulatory effects, of a number of small noncoding RNAs, namely, microRNAs (miRNAs).⁵

Excellent reviews^{6,7} have recently described resveratrol effects in animal models. In contrast to "classical" coding transcripts, noncoding RNAs have been generally much less conserved during evolution. This review will focus on describing resveratrol effects on miRNA populations in humans and human cell lines. After exposing the principal results drawn from these studies, we will propose how, in our view,

resveratrol might be beneficial not only at high doses (i.e., at pharmaceutical doses or as a food supplement) but also at much lower doses such as those provided by a regular diet intake.

■ GENERAL PROPERTIES OF RESVERATROL

Polyphenols are important plant microcomponents in terms of both quantity and diversity. In particular, grape plants produce substantial amounts of a wide variety of polyphenols as secondary metabolites, with many of them accumulating in the skin, pulp, and seeds of grapes and being found in grape juice or wine following fermentation. The health benefits of a moderate consumption of wine have been attributed to grape's polyphenols: procyanidins, flavonoids, phenolic acids, and stilbenoids.⁸ However, the molecular bases of these benefits have not yet been fully elucidated. Resveratrol is a phytoalexin that stimulates cell defenses in plants.⁹ The *trans* (*E*) isomer of resveratrol is the most abundant and active form of resveratrol as compared to the *cis* (*Z*) isomer. In the grape, resveratrol mainly accumulates in a glycosylated conjugated state (piceid).¹⁰ Some dimethoxylated derivatives are also present (pterostilbene) as well as resveratrol oligomers (*e*-viniferin, a dimer, and hopeaphenol, a tetramer).¹¹ Resveratrol has been established as a powerful antioxidant with a direct impact on oxidative stress. Resveratrol has also been shown to exert a

Special Issue: 5th International Conference on Polyphenols and Health

Received: December 29, 2011

Revised: May 8, 2012

Accepted: May 10, 2012

Published: May 10, 2012

variety of anti-inflammatory effects through the inhibition of lipoxygenases and cyclo-oxygenases that synthesize pro-inflammatory mediators from arachidonic acid, protein kinases such as PKCs and PKD, receptor tyrosine kinases, and lipid kinases, as well as IKK α , an activator of the pro-inflammatory NF- κ B pathway.⁵ In addition, resveratrol regulates apoptosis¹² and cell cycle progression¹³ and down-regulates the MAP kinase signaling pathway, the NF- κ B pathway, and the activator protein-1 (AP-1) pathway. Due to its pleiotropic antiproliferative activities, resveratrol has been in recent past years at the stage of preclinical studies for cancer prevention^{6,7} and is presently at the onset on clinical studies.^{14–18}

The surprisingly great number of beneficial effects of resveratrol have led to the hypothesis that this compound should modulate the expression of some global regulators. Indeed, it has been recently established that resveratrol can modulate the expression of miRNAs⁵ (see below).

■ DIETARY RESVERATROL VERSUS RESVERATROL-ENRICHED NUTRIENTS: BIOAVAILABILITY AND BIOACTIVITY

With regard to resveratrol bioavailability, it is largely admitted that resveratrol is rapidly metabolized into a conjugated forms (glucurono- or sulfo-) or into a hydroxylated component (piceatannol) and is found only at low plasmatic levels. Its metabolites could possibly exhibit bioactivity (piceatannol) or be recycled (sulfoconjugated resveratrol). Interestingly, a recent study on resveratrol intake by volunteers showed resveratrol plasmatic levels in the micromolar range.¹⁵ This concentration was compatible with those required for resveratrol binding to and inhibition of enzymes such as cyclo-oxygenase 1 (COX1) and COX2¹⁹ or the integrin α V β 3 receptor.²⁰ It has also been suggested that resveratrol concentration in rat blood may not always reflect resveratrol levels in peripheral tissues because high resveratrol concentrations have, for example, been found in the liver.²¹ In addition, we have shown that resveratrol can accumulate in hepatic cells not only through diffusion but also through active carrier-mediated uptake.²² Accordingly, in colorectal cancer patients, resveratrol and resveratrol metabolites were found to accumulate in the colon at concentrations often exceeding those that have been widely reported as having activity in numerous preclinical systems.^{16,18} Of note, resveratrol and resveratrol metabolites were higher in the right side of the colon compared to the left.¹⁶ However, whereas high levels of resveratrol are achievable in the colon, resveratrol levels in other tissues are expected to match more closely the concentrations in plasma; that is, resveratrol effects in the other organs may be more dependent on the activity of resveratrol metabolites. Recent data showed that resveratrol monosulfate and bisulfate derivatives display biological activities compatible with antitumor effects, such as the inhibition of COX1, COX2, NO production, and *i*NOS expression, or the activation of SIRT1.^{19,23} Accordingly, new synthetic derivatives with improved anti-inflammatory and antitumor properties have been recently tested.²⁴

On the other hand, the recent discoveries (see hereafter) that some of resveratrol's beneficial effects are due to its regulation of miRNA expression⁵ and that miRNAs can travel from one cell to another through the blood²⁵ open the exciting possibility that the protective effects of resveratrol may be delivered to a large range of tissues through bloodborne miRNAs.

So far, epidemiological studies on the effects of dietary resveratrol in human populations have been rare because the

regular intake of resveratrol is often associated with the consumption of alcoholic drinks, which can result in harmful effects. Nevertheless, earlier studies showed that the regular consumption of wine polyphenols including resveratrol leads to a decreased mortality and morbidity by vascular diseases compared to the consumption of beer or spirits.²⁶ More recently, a case control study on the prevention of breast cancer showed epidemiological evidence that resveratrol from grape is inversely related to breast cancer risk.²⁷ These promising results warrant further studies, especially to determine the concentration of resveratrol that could exert protective effects when used as nutrient supplementation.

■ MICRO-RNAS AS NEW PLAYERS IN THE REGULATION OF CELL HOMEOSTASIS

MiRNA function in the cell is a tremendously expanding new research area. The first noncoding small regulatory RNA (*lin4*) was identified in 1993 as a developmental regulator in *Caenorhabditis elegans* by Dr. V. Ambros's team.²⁸ The seminal discovery by Dr. C. M. Croce's group that some miRNAs are deleted in cancer²⁹ and are therefore potential players in cancer induction or progression subsequently drew the attention of many scientists, and the area of miRNAs and cancer has blossomed ever since. MiRNAs were rapidly shown to be present not only in animals but also in plants and viruses. Since then, miRNAs have been implicated in the regulation of cell proliferation, differentiation, and homeostasis, as well as in the innate and adaptive immune responses. To date, some 1500 miRNAs have been identified in humans. MiRNAs are produced from long capped and polyadenylated primary transcripts (pri-miRNAs). In the nucleus pri-miRNAs are cleaved by the RNase III Drosha, and the resulting pre-miRNAs are subsequently exported to the cytoplasm by Exportin 5. Further maturation of pre-miRNAs to miRNAs occurs in the cytoplasm through the RNase III Dicer. Mature miRNAs are loaded onto a ribonucleoprotein complex known as the RISC (RNA-induced silencing complex) through their interaction with the Ago2 (Argonaute) protein, subsequently allowing them to target mRNAs by complementary base pairing. MiRNAs usually target the 3'-untranslated region (3'-UTR) of transcripts that contains their consensus sequence (i.e., a short sequence complementary to their so-called seed region). Their binding to mRNAs within the RISC triggers the target transcripts for either degradation or translation inhibition, consequently decreasing the levels of the encoded proteins. The consequences are multiple. For instance, miRNAs can modulate cell signaling by changing the level of kinases or phosphatases, regulate transcription by unbalancing the ratios of transcription factors, or modify epigenetic marks by targeting methyltransferases/demethylases and histone acetylases/deacetylases. As a consequence, the mutation of genes encoding some miRNAs or that of target sequences to tumor-suppressor miRNAs in the 3'-UTR of transcripts can initiate oncogenic processes.²⁹

Interestingly, miRNA misexpression has been linked with major pathologies such as cancer or cardiovascular, neurodegenerative, and autoimmune diseases.³⁰ Finally, miRNAs have recently been found in blood and other body fluids. They have been shown to be transported from cell to cell either through gap junction or through blood secretion and to exert their targeting capabilities in recipient cells. In blood, miRNAs have been found either in microvesicles, exosomes, HDLs (high density lipoproteins) or associated with RNA-binding proteins

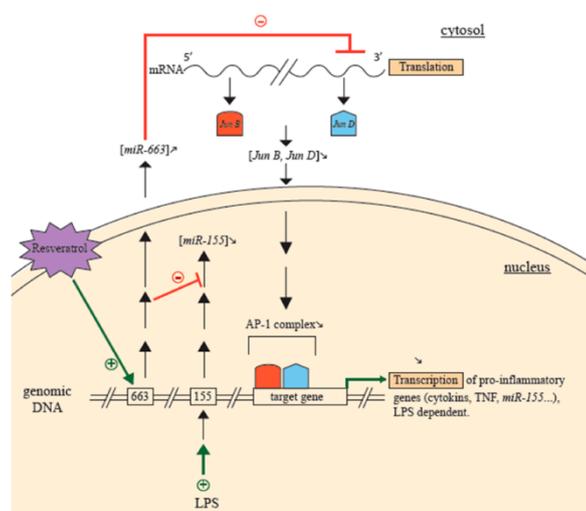


Figure 1. Resveratrol exhibits anti-inflammatory properties, at least in part by modulating the expression of *miR-663* and *miR-155* miRNAs (adapted from the results of Tili et al.³²). In THP-1 human monocytes, resveratrol down-regulates pro-inflammatory *miR-155* level through the up-regulation of *miR-663*, an anti-inflammatory miRNA targeting *JunB* and *JunD* transcripts. *JunB* and *JunD* are components of the pro-inflammatory and oncogenic transcription complex AP-1. LPS, bacterial lipopolysaccharides; 155, *Bic/MHG2* gene containing *miR-155* precursor; 663, *LO284801* locus containing *miR-663* precursor; *JunB*, *JunD*, proteins of the AP-1 complex (activating protein-1) stimulating the transcription of pro-inflammatory genes; target gene, pro-inflammatory and other genes.

such as Ago2 or nucleophosmin 1.²⁵ MiRNAs are now believed to act as proto-hormones capable of delivering an effect in distant cells, which could be responsible for the induction of metastases at a distant location from the original tumor.²⁵ In contrast, it is probable that some pharmaceutical compounds, including resveratrol, may possibly exert wide anti-inflammatory and antitumor effects in the body by inducing the secretion of anti-inflammatory and antitumor miRNAs in the blood.

MiRNAs can potentially target tens to hundreds of different transcripts. Given that many of those encode transcription factors or factors involved in different signal transduction pathways, miRNAs can also indirectly regulate the expression of a number of nontarget transcripts. Therefore, the comparison of miRNA signatures in normal and pathologic tissues is of tremendous interest because these molecules offer a higher potential than coding transcripts for diagnosis or prognosis purposes. Furthermore, the development of new treatments based on the targeted expression or inhibition of miRNAs of interest is conceivable. In this respect compounds capable of increasing the expression of "good", anti-inflammatory and tumor-suppressor, miRNAs and at the same time decreasing the expression of "bad", pro-inflammatory and oncogenic miRNAs, provide hope for the development of new treatments against a number of pathologies. Moreover, when molecules such as resveratrol are present in nutrients and can be absorbed at low dose on a regular daily basis, they offer the further prospect to be used as preventive agents.

■ MODULATION OF MICRO-RNA POPULATIONS BY RESVERATROL: BIOLOGICAL CONSEQUENCES

Resveratrol Regulates the Expression of MiRNAs Implicated in Inflammation. Inflammation is a complex

immune response to pathogens, allergens, damaged cells, tissue injury, or toxic molecules. This normally beneficial and self-contained inflammation may become chronic. Chronic inflammation has been linked to many pathologies such as vascular alterations, neurodegenerative diseases, rheumatoid arthritis, chronic asthma, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, and cancers. It has been established³¹ that inflammation is associated with the induction or the aggravation of $\geq 25\%$ of cancers, especially colorectal cancers. Interestingly, some polyphenols, including resveratrol, are known to exhibit anti-inflammatory properties, and we recently showed that resveratrol can regulate the expression of both pro- and anti-inflammatory miRNAs.³² Thus, in human THP-1 monocytic cells as well as in human blood monocytes, resveratrol up-regulates *miR-663*, an anti-inflammatory and tumor-suppressor miRNA that decreases AP-1 transcriptional activity and impairs its up-regulation by lipopolysaccharides (LPS) at least in part by targeting *JunB* and *JunD* transcripts. In contrast, resveratrol impairs the up-regulation of pro-inflammatory and oncogenic *miR-155* by LPS in a *miR-663*-dependent manner (Figure 1). These results open the perspective of manipulating *miR-663* levels to potentiate resveratrol anti-inflammatory and antitumor effects at least in malignancies associated with elevated levels of *miR-155*.

Resveratrol Impairs the Expression of Oncogenic miRNAs while Up-regulating Tumor-Suppressor miRNAs. The first study of resveratrol effects on endogenous miRNA populations was conducted in a human colon cancer cell line (SW480).³³ Resveratrol proved to decrease the levels of oncogenic miRNAs (*miR-17*, *21*, *23a*, *23b*, *25*, *29*, *92a-2*, *103-1*, *103-2*, *146a*, ...) that collectively target transcripts encoding Dicer1, the cytoplasmic RNase III producing mature

miRNAs from their immediate precursors, and tumor-suppressor factors such as PDCD4 or PTEN, as well as key effectors of the TGF β signaling pathway. In contrast, resveratrol increased the level of tumor-suppressor *miR-663*, one of the rare miRNAs that target TGF β 1 transcripts. On the basis of these paradoxical effects it has been suggested that resveratrol, known for both its anticancer and antimetastatic properties, might possibly increase the cytostatic activity of the canonical TGF β 1 pathway at the early stages of tumors but nevertheless decrease the pro-metastasis effects of TGF β 1 (and especially its induction of epithelium-to-mesenchyme transitions) at more advanced stages of tumors, possibly through the up-regulation of *miR-663*. This study further emphasized the potential interest of manipulating the levels of key miRNAs to increase the anticancer and antimetastatic effects of resveratrol. The anticancer effects of resveratrol mediated by miRNAs in colorectal tumor-derived cells are summarized in Figure 2.

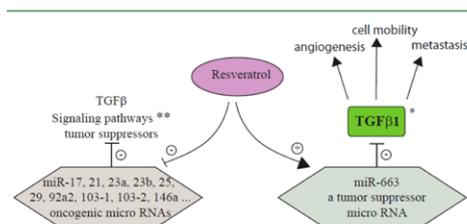


Figure 2. Resveratrol modulates the level of miRNAs targeting transcripts encoding tumor suppressors and effectors of the TGF β signaling pathway in SW480 human colorectal cancer cells (adapted from the results of Tili et al.³³). *, Cytostatic at the early stages of tumor, prometastatic at later stages; **, SMAD, similar to MAD in *Drosophila* (mother against Dpp), a transcription factor that transduces the canonical TGF β signaling following its phosphorylation by the TGF β receptor type I. PTEN, a tumor-suppressor factor that is a member of the protein tyrosine phosphatase family; PDCD4, programmed cell death 4, a nucleocytoplasmic protein known as a tumor suppressor.

It was subsequently demonstrated that resveratrol treatment alters miRNA expression in human A549 lung cancer cells with 71 miRNAs exhibiting >2-fold changes in resveratrol-treated cells.³⁴ Furthermore, resveratrol treatment of antibenzo[*a*]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-transformed human 16HBE-T bronchial epithelial cells induced the expression of *miR-622*, a miRNA that behaves as a tumor suppressor by targeting transcripts encoding K-Ras.³⁵ As a consequence *miR-622* strongly suppresses the ability of 16HBE-T cells to both form colonies in vitro and develop tumors in nude mice. On the other hand, resveratrol treatment of PCa prostate cancer cells³⁶ decreased the expression of 23 miRNAs, including oncogenic miRNAs of the *miR-17-92* and *miR-93-106b* clusters that target transcripts encoding phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN), a tumor-suppressor protein that is down-regulated in nearly all cancers. Another paper established that resveratrol promotes the expression and activity of Ago2, thereby inhibiting breast cancer stem-like cell characteristics by increasing the expression of a number of tumor-suppressor miRNAs, including *miR-16*, *miR-141*, *miR-143*, and *miR-200c*.³⁷ Finally, it was recently shown that resveratrol decreases the ability of CL1-5 and A549 lung cancer cells to migrate and invade in a dose-dependent manner. This

effect is due to resveratrol down-regulation of *miR-520h*, consequently leading to the inhibition of Akt and then to a down-regulation of FOXC2, a crucial transcription factor that favors epithelium to mesenchyme transitions, and thus enhances the invasiveness and metastasis ability of cancer cells.³⁸

Of note, whereas miRNAs such as *lin4* (aka *miR-125* in vertebrates) and *let-7* have been well conserved during evolution, other miRNAs such as *miR-155* or anti-inflammatory *miR-146a* and *miR-146b* are found only in vertebrates. Other miRNAs such as *miR-663* are primate-specific. Therefore, although a number of resveratrol effects have been demonstrated in rodents, only studies in human cell lines have the potential to show the precise effects of resveratrol on human endogenous miRNA populations. Rodents are close relatives to primates from an evolutionary point of view, but they have repeatedly been shown to respond in their own specific manner to the action of drugs such as thalidomide (a sedative that remained without apparent deleterious effects in pregnant rats but proved highly teratogenic in pregnant women) or to inflammation with anti-inflammatory *miR-146a* and *miR-146b* being highly up-regulated in humans but not in mice. Rodents might thus not represent an adequate system to predict the efficiency or toxicity of tested compounds, especially when it comes to their effects on endogenous miRNA populations. For example, *miR-146a* is specifically up-regulated in the brain of Alzheimer's patients, and this up-regulation is linked with the down-regulation of complement factor H (CFH), an important repressor of the inflammatory response in the brain.³⁹ Due to the lack of strong up-regulation of *miR-146a* in inflammatory conditions in mice, it appears that mouse models of Alzheimer's disease might not reflect all potential beneficiary effects of resveratrol on this type of pathology.

Resveratrol Modulates Heart and Skeletal Muscles Functions. Muscle physiology, both cardiac and skeletal, is absolutely essential to the organism, and tremendous efforts have been made in this research area for many years. The functions of these tissues are closely dependent on nutrition and the quality of food, that is, its composition in fatty acids, carbohydrates, amino acids, etc. Food also contains a wide variety of polyphenols that are able to modulate the cardiac pump, blood vessel circulation, and physical exercise, as well as the aging of muscles. Nevertheless, except for a study on mouse physiology⁴⁰ and cardiac cells,⁴¹ the effects of resveratrol on muscle cell metabolism have not been explored in depth.

MiRNAs have been shown to regulate and provide robustness to the myogenic transcriptional network⁴² and have been implicated in various cardiovascular functions and pathologies.⁴³ For example, during rat heart muscle tissue remodeling, over 25 miRNAs presented a differential expression. Among them, *miR-21* was shown to regulate the ERK/MAP kinase signaling pathway and was previously implicated in cardiac remodeling.⁴⁴ However, until very recently nothing was known about the role of resveratrol in the regulation of miRNAs in muscle cells. In 2010, Mukhopadhyay et al. reported a cardioprotective effect of resveratrol and proposed miRNA signatures in a rat ischemia/reperfusion (I/R) model.⁴⁵ They reported that *miR-20b*, which modulates VEGF signaling, was down-regulated 6-fold by resveratrol. This strong down-regulation of *miR-20b* was supposed to be linked with a powerful antiangiogenic action of resveratrol in the ischemic myocardium and synergic effects of resveratrol and γ -tocotrienol. The targets of miRNAs for

which expression was reported to be affected by resveratrol included transcripts encoding factors such as metal ion-binding proteins, sodium and potassium ion channels, and transcription factors that may potentially play key roles in reducing I/R injury.

More recently, we reported that in mouse C2C12 skeletal myoblasts 26 miRNAs are up-regulated 1.35–8.59-fold by resveratrol, whereas 20 other miRNAs are down-regulated 1.5–47-fold.⁴⁶ Among miRNAs having levels that changed significantly ($p < 0.05$) following resveratrol treatment of C2C12 cells, *miR-20b* (with >800 putative target transcripts) as well as *miR-133* (with >300 putative target transcripts), a muscle-specific miRNA known to target transcripts encoding the serum-controlled factor involved in myoblast differentiation,⁴⁷ were down-regulated, whereas *miR-21* (with >730 putative target transcripts) and *miR-27b* (with >730 putative target transcripts) were up-regulated. Finally, *miR-149* (with >180 putative target transcripts, some of them encoding factors playing important roles in skeletal muscle) was also down-regulated by resveratrol. A process of miRNA-dependent muscle cell differentiation and conversion under resveratrol treatment is presented in Figure 3.

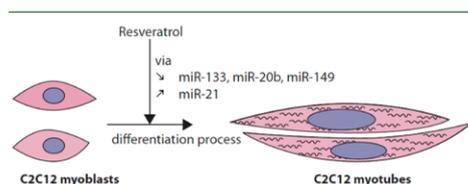


Figure 3. Resveratrol exerts pro-differentiation effects on C2C12 skeletal muscle cells via its modulation of the levels of noncoding miRNAs (adapted from the results of Kaminski et al.⁴⁶).

Additional Cell Processes Modulated by Resveratrol in a miRNA-Dependent Manner. Resveratrol has also been shown to behave as a potent activator of SIRT1 signaling.^{48,49} This protein deacetylase is known to control energy homeostasis, fiber strength, and regeneration from damage in skeletal muscle.⁵⁰ It is therefore worth noting that *SIRT1* transcripts themselves are targeted by *miR-155* (Tili et al., unpublished results), a pro-inflammatory miRNA down-regulated by resveratrol.³² On the other hand, *miR-30a* has been shown to target transcripts encoding Beclin 1, the mammalian homologue of the key yeast autophagy-promoting factor Atg6.⁵¹

■ POTENTIAL RESVERATROL BENEFICIAL EFFECTS

MiRNAs have recently been established as key regulators of development, cell differentiation, communication, adhesion and metabolism, cell interactions with their environment, including the response to stress or toxic compounds, and the mounting and regulation of the innate and adaptive immune responses. It is therefore not surprising that many resveratrol pleiotropic effects may implicate miRNAs. The precise mode of action of miRNAs in cells remains to be determined: especially how miRNA accessibility to its target transcripts is regulated, how different miRNAs collaborate to control the levels of the same transcripts, and in what range of miRNA and target transcript concentrations the inhibitory effects of miRNAs are effective. Nevertheless, it is already clear that miRNAs carry a higher potential than coding transcripts for diagnosis and prognosis

purposes. Furthermore, different strategies have already been proposed for the utilization of miRNAs as anticancer agents *in vivo*. Indeed, preliminary results have been obtained not only in mice but also in humans.

As >25% of cancers have been directly or indirectly associated with inflammation and as all types of tumors are now believed to be linked with the misexpression of oncogenic and/or tumor-suppressor miRNAs, the discovery that resveratrol regulates the expression of endogenous miRNA implicated in inflammation and cancer is of primary importance: it now seems logical to associate the use of resveratrol and other natural and synthetic products with miRNA mimics or miRNA inhibitors to potentiate the anticancer and anti-inflammatory effects of these different compounds. Of note, miRNAs and other noncoding RNAs have been less conserved than coding transcripts during evolution. Therefore, given the limited toxicity of resveratrol in humans even at the highest pharmaceutical doses, only studies in humans and human cell lines may possibly offer a precise account of actual protective effects of resveratrol. Furthermore, besides their use at pharmaceutical doses, natural products such as resveratrol have the additional potential to be used as preventive agents through the intake of natural resveratrol-containing nutrients or of nutraceutical food. It will therefore be of greatest interest to develop them in conditions where bloodborne miRNA concentrations would be monitored in parallel. The recent discoveries that miRNAs can affect cells located at a distance open the exciting possibility that resveratrol may possibly deliver beneficial effects in organs where its concentration may remain low through the increase of the secretion of anti-inflammatory or tumor-suppressor miRNAs.

Of note, mice are short-lived organisms and have shown many significant differences with humans in the epigenetic regulation of gene expression, the mechanisms of X-chromosome inactivation, the nature of imprinted genes, or certain modalities of the immune response. Mice may thus not be very well suited for the analysis of the protective effects of resveratrol against tumors that can sometimes take several tens of years to develop in humans. Also, it is still not clear whether increasing sharply the expression of tumor-suppressor miRNAs during a short period of time might be better than increasing slightly their levels over an extended period, which may be expected to occur following the regular intake of low doses of natural products such as resveratrol. In any case, the many protective effects of resveratrol offer the perspective of preventing or at least partially reversing muscular dysfunctions and pathologies linked to inflammation, cancer, and autoimmune diseases when used either at pharmaceutical doses or at diet doses.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: latruffe@u-bourgogne.fr. Phone: +33 380 39 62 36. Fax: + 33 380 39 62 50.

Funding

This work was funded by the Burgundy Vitagora cluster (taste, nutrition, health) and by the Regional Council of Burgundy.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Linda Northrup (English Solutions, Voiron, France) for editing the manuscript.

REFERENCES

- Rifer, J.-P.; Lorcery, F.; Delmas, D.; Prost, M.; Durand, P.; Riedinger, P.; D'Atis, P.; Hudelot, B.; Ragot, K.; Limagne, E.; Mazué, F.; Lizard, G.; Latruffe, N. Influence of red wine intake in secondary prevention of myocardial infarct patients. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 345–517.
- Goldberg, D. M.; Yan, J.; Ng, E.; Diamandis, E. P.; Karumanchiri, A.; Soleas, G.; Waterhouse, A. L. A global survey of *trans*-resveratrol concentrations in commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 159–165.
- Aggarwal, B. B.; Shishodia, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1397–1421.
- Delmas, D.; Solary, E.; Latruffe, N. Resveratrol: a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1100–1021.
- Tili, E.; Michaille, J. J. Resveratrol, microRNAs, inflammation, and cancer. *J. Nucleic Acids* **2011**, *2011*, 102431.
- Althar, M.; Back, J. H.; Tang, X.; Kim, K. H.; Kopelovich, L.; Bickers, D. R.; Kim, A. L. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *224*, 274–283.
- Bishayee, A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* **2009**, *2*, 409–418.
- Renaud, S.; de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **1992**, *339*, 1523–1526.
- Jeandet, P.; Douillet-Breuil, A. C.; Bessis, R.; Debord, S.; Sbaghi, M.; Adrian, M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2731–2741.
- Ribeiro de Lima, M. T.; Waffo-Tegui, P.; Teissedre, P.-L.; Pujolas, A.; Vercauteren, J.; Cabanis, J.-C.; Merillon, J.-M. Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-picicid and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2666–2670.
- Ohyama, M.; Tanaka, T.; Ito, T.; Iinuma, M.; Bastow, K. F.; Lee, K. H. Antitumor agents 200. Cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3057–3060.
- Colin, D.; Limagne, E.; Jeanningros, S.; Jacquet, A.; Lizard, G.; Athias, A.; Gambert, P.; Hichami, A.; Latruffe, N.; Solary, E.; Delmas, D. Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* **2011**, *4*, 1095–1106.
- Delmas, D.; Passilly-Degrace, P.; Jannin, B.; Malki, M. C.; Latruffe, N. Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorectal tumor cells. *Int. J. Mol. Med.* **2002**, *10*, 193–199.
- Timmers, S.; Konings, E.; Bilet, L.; Houtkooper, R. H.; van de Weijer, T.; Goossens, G. H.; Hoeks, J.; van der Krieken, S.; Ryu, D.; Kersten, S.; Moonen-Kornips, E.; Hesselink, M. K.; Kunz, L.; Schrauwen-Hinderling, V. B.; Blaak, E. E.; Auwerx, J.; Schrauwen, P. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab.* **2011**, *14*, 612–622.
- Brown, V. A.; Patel, K. R.; Viskaduraki, M.; Crowell, J. A.; Perloff, M.; Booth, T. D.; Vasilinin, G.; Sen, A.; Schinas, A. M.; Piccirilli, G.; Brown, K.; Steward, W. P.; Gescher, A. J.; Brenner, D. E. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9003–9011.
- Patel, K. R.; Brown, V. A.; Jones, D. J.; Britton, R. G.; Hemingway, D.; Miller, A. S.; West, K. P.; Booth, T. D.; Perloff, M.; Crowell, J. A.; Brenner, D. E.; Steward, W. P.; Gescher, A. J.; Brown, K. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7392–7399.
- Howells, L. M.; Berry, D. P.; Elliott, P. J.; Jacobson, E. W.; Hoffmann, E.; Hegarty, B.; Brown, K.; Steward, W. P.; Gescher, A. J. Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRTS01) in patients with hepatic metastases – safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* **2011**, *4*, 1419–1425.
- Patel, K. R.; Scott, E.; Brown, V. A.; Gescher, A. J.; Steward, W. P.; Brown, K. Clinical trials of resveratrol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2011**, *1215*, 161–169.
- Calamini, B.; Ratia, K.; Malkowski, M. G.; Cuendet, M.; Pezzuto, J. M.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A. D. Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem. J.* **2010**, *429*, 273–282.
- Lin, H. Y.; Lansing, L.; Merillon, J. M.; Davis, F. B.; Tang, H. Y.; Shih, A.; Vitrac, X.; Krisa, S.; Keating, T.; Cao, H. J.; Bergh, J.; Quackenbush, S.; Davis, P. J. Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a receptor site for resveratrol. *FASEB J.* **2006**, *10*, 1742–1744.
- Bertelli, A.; Bertelli, A. A.; Gozzini, A.; Giovannini, L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp. Clin. Res.* **1998**, *24*, 133–138.
- Lançon, A.; Delmas, D.; Osman, H.; Thenot, J. P.; Jannin, B.; Latruffe, N. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both carrier mediated and diffusion process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *316*, 1132–1137.
- Hoshino, J.; Park, E. J.; Kondratyuk, T. P.; Marler, L.; Pezzuto, J. M.; van Breemen, R. B.; Mo, S.; Li, Y.; Cushman, M. Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5033–5043.
- Kondratyuk, T. P.; Park, E. J.; Marler, L. E.; Ahn, S.; Yuan, Y.; Choi, Y.; Yu, R.; van Breemen, R. B.; Sun, B.; Hoshino, J.; Cushman, M.; Jermihov, K. C.; Mesecar, A. D.; Grubbs, C. J.; Pezzuto, J. M. Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1249–1265.
- Kosaka, N.; Ochiya, T. Unraveling the mystery of cancer by secretory microRNA: horizontal microRNA transfer between living cells. *Front. Genet.* **2012**, *2*, 97.
- Grønbaek, M.; Mortensen, E. L.; Mygind, K.; Andersen, A. T.; Becker, U.; Gluud, C.; Sørensen, T. I. Beer, wine, spirits and subjective health. *J. Epidemiol. Community Health* **1999**, *53*, 721–724.
- Levi, F.; Pasche, C.; Lucchini, F.; Ghidoni, R.; Ferraroni, M.; La Vecchia, C. Epidemiological evidence that resveratrol from grape is inversely related to breast cancer risk. Study on 369 cases vs 602 controls of Swiss women from 1993 to 2003. *Eur. J. Cancer Prev.* **2005**, *14*, 139–142.
- Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **1993**, *75*, 843–866.
- Calin, G. A.; Sevignani, C.; Dumitru, C. D.; Hyslop, T.; Noch, E.; Yendamuri, S.; Shimizu, M.; Rattan, S.; Bullrich, F.; Negrini, M.; Croce, C. M. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 2999–3004.
- Tili, E.; Michaille, J.-J.; Gandhi, V.; Plunkett, W.; Sampath, D.; Calin, G. A. MiRNAs and their potential for use against cancer and other diseases. *Future Oncol.* **2007**, *3*, 521–537.
- Colotta, F.; Allavena, P.; Sica, A.; Garlanda, C.; Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 1073–1081.
- Tili, E.; Michaille, J.-J.; Adair, B.; Alder, H.; Limagne, E.; Taccioli, C.; Volinia, S.; Delmas, D.; Latruffe, N.; Croce, C. M. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a new anti-inflammatory microRNA targeting JunB and JunD. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 1561–1566.

- (33) Tili, E.; Michaille, J. J.; Alder, H.; Volinia, S.; Delmas, D.; Latruffe, N.; Croce, C. M. Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor-suppressors and effectors of TGF β signaling pathway in SW480 cells. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 2057–2065.
- (34) Bae, S.; Lee, E. M.; Cha, H. J.; Kim, K.; Yoon, Y.; Lee, H.; Kim, J.; Kim, Y. J.; Lee, H. G.; Jeung, H. K.; Min, Y. H.; An, S. Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cells* **2011**, *32*, 243–249.
- (35) Han, Z.; Yang, Q.; Liu, B.; Wu, J.; Li, Y.; Yang, C.; Jiang, Y. MicroRNA-622 functions as a tumor suppressor by targeting K-Ras and enhancing the anticarcinogenic effect of resveratrol. *Carcinogenesis* **2011**, *33*, 131–139.
- (36) Dhar, S.; Hicks, C.; Levenson, A. S. Resveratrol and prostate cancer: promising role for microRNAs. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1219–1229.
- (37) Hagiwara, K.; Kosaka, N.; Yoshioka, Y.; Takahashi, R. U.; Takeshita, F.; Ochiya, T. Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 314.
- (38) Yu, Y. -H.; Chen, H.-A.; Chen, P.-S.; Cheng, Y.-J.; Hsu, W.-H.; Chang, Y.-W.; Chen, Y.-H.; Jan, Y.; Hsiao, M.; Chang, T.-Y.; Liu, Y.-H.; Jeng, Y.-M.; Wu, C.-H.; Huang, M.-T.; Su, Y.-H.; Hung, M.-C.; Chien, M.-H.; Chen, C.-Y.; Kuo, M.-L.; Su, J.-L. MiR-520b-mediated FOXC2 regulation is critical for inhibition of lung cancer progression by resveratrol. *Oncogene* **2012**, DOI: 10.1038/onc.2012.74.
- (39) Lukiw, W. J.; Zhao, Y.; Cui, J. G. An NF- κ B-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 31315–31322.
- (40) Park, S. J.; Ahmad, F.; Philp, A.; Baar, K.; Williams, T.; Luo, H.; Ke, H.; Rehmann, H.; Taussig, R.; Brown, A. L.; Kim, M. K.; Beaven, M. A.; Burgin, A. B.; Manganiello, V.; Chung, J. H. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* **2012**, *148*, 421–433.
- (41) Baarine, M.; Thandapilly, S.; Louis, X.; Mazué, F.; Yu, L.; Delmas, D.; Neticadan, T.; Lizard, G.; Latruffe, N. Pro-apoptotic vs anti-apoptotic properties and cell signaling of dietary resveratrol on normal and on tumour cells. *Genes Nutr.* **2011**, *6*, 161–169.
- (42) Gagan, J.; Dey, B. K.; Dutta, A. MicroRNAs regulate and provide robustness to the myogenic transcriptional network. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12*, 1–6.
- (43) Condorelli, G.; Latronico, M. V.; Dorn, G. W., 2nd. microRNAs in heart disease: putative novel therapeutic targets? *Eur. Heart J.* **2010**, *31*, 649–658.
- (44) Thum, T.; Gross, C.; Fiedler, J.; Fischer, T.; Kissler, S.; Bussen, M.; Galuppo, P.; Just, S.; Rottbauer, W.; Frantz, S.; Castoldi, M.; Soutschek, J.; Kotliansky, V.; Rosenwald, A.; Basson, M. A.; Licht, J. D.; Pena, J. T.; Rouhanifard, S. H.; Muckenthaler, M. U.; Tuschl, T.; Martin, G. R.; Bauersachs, J.; Engelhardt, S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* **2008**, *456*, 980–984.
- (45) Mukhopadhyay, P.; Mukherjee, S.; Ahsan, K.; Bagchi, A.; Pacher, P.; Das, D. K. Restoration of altered micro RNA expression in the ischemic heart with resveratrol. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15705.
- (46) Kaminski, J.; Lançon, A.; Tili, E.; Aires, V.; Demarquoy, J.; Lizard, G.; Michaille, J.-J.; Latruffe, N. Dietary resveratrol modulates metabolic functions in skeletal muscle cells. *J. Food Drug Anal.* **2012**, *20* (Suppl. 1), 398–401.
- (47) Chen, J. F.; Mandel, E. M.; Thomson, J. M.; Wu, Q.; Callis, T. E.; Hammond, S. M.; Conlon, F. L.; Wang, D.-Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 228–233.
- (48) Howitz, K. T.; Bitterman, K. J.; Cohen, H. Y.; Lamming, D. W.; Lavu, S.; Wood, J. G.; Zipkin, R. E.; Chung, P.; Kisilewski, A.; Zhang, L. L.; Scherer, B.; Sinclair, D. A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **2003**, *425*, 191–196.
- (49) Knutson, M. D.; Leeuwenburgh, C. Resveratrol and novel potent activators of SIRT1: effects on aging and age-related diseases. *Nutr. Rev.* **2008**, *66*, 591–596.
- (50) Tonkin, J.; Villarroya, F.; Puri, P. L.; Vinciguerra, M. SIRT1 signaling as potential modulator of skeletal muscle diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12*, 1–5.
- (51) Zhu, H.; Wu, H.; Liu, X.; Li, B.; Chen, Y.; Ren, X.; Liu, C. G.; Yang, J. M. Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy* **2009**, *5*, 816–823.

*Références
Bibliographiques*

- Adrian M, Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Tesson L, Bessis R. 2000. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 6103-5
- Al-Khalili L, Chibalin AV, Kannisto K, Zhang BB, Permert J, *et al.* 2003. Insulin action in cultured human skeletal muscle cells during differentiation: assessment of cell surface GLUT4 and GLUT1 content. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 991-8
- Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. 2009. SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD. *The Journal of biological chemistry* 284: 21872-80
- Antonenkov VD, Grunau S, Ohlmeier S, Hiltunen JK. 2010. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxidants & redox signaling* 13: 525-37
- Augustyniak A, Bartosz G, Cipak A, Duburs G, Horakova L, *et al.* 2010. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free radical research* 44: 1216-62
- Bakkar N, Guttridge DC. 2010. NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiol. Rev.* 90: 495-511
- Barbieri E, Sestili P. 2012. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *Journal of signal transduction* 2012: 982794
- Bastin J, Lopes-Costa A, Djouadi F. 2011. Exposure to resveratrol triggers pharmacological correction of fatty acid utilization in human fatty acid oxidation-deficient fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 20: 2048-57
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, *et al.* 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-42
- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. 2012. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4
- Bhardwaj A, Sethi G, Vadhan-Raj S, Bueso-Ramos C, Takada Y, *et al.* 2007. Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* 109: 2293-302
- Biswas M, Chan JY. 2010. Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244: 16-20
- Borska S, Chmielewska M, Wysocka T, Drag-Zalesinska M, Zabel M, Dziegiel P. 2012. In vitro effect of quercetin on human gastric carcinoma: Targeting cancer cells death and MDR. *Food Chem. Toxicol.* 50: 3375-83

- Braun T, Gautel M. 2011. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12: 349-61
- Buas MF, Kadesch T. 2010. Regulation of skeletal myogenesis by Notch. *Experimental cell research* 316: 3028-33
- Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3337-40
- Canto C, Auwerx J. 2009. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* 20: 98-105
- Canto C, Auwerx J. 2010. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 3407-23
- Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, *et al.* 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-60
- Carvajal JJ, Rigby PW. 2010. Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle. *Experimental cell research* 316: 3014-8
- Casanova F, Quarti J, da Costa DC, Ramos CA, da Silva JL, Fialho E. 2012. Resveratrol chemosensitizes breast cancer cells to melphalan by cell cycle arrest. *J. Cell. Biochem.* 113: 2586-96
- Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. 2012. Resveratrol: French Paradox Revisited. *Frontiers in pharmacology* 3: 141
- Chan JY, Phoo MS, Clement MV, Pervaiz S, Lee SC. 2008. Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis: the roles of caspase-6 and p53. *Cancer Biol Ther* 7: 1305-12
- Cianciulli A, Calvello R, Cavallo P, Dragone T, Carofiglio V, Panaro MA. 2012. Modulation of NF-kappaB activation by resveratrol in LPS treated human intestinal cells results in downregulation of PGE(2) production and COX-2 expression. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 26: 1122-8
- Cicha I, Regler M, Urschel K, Goppelt-Struebe M, Daniel WG, Garlich CD. 2011. Resveratrol inhibits monocytic cell chemotaxis to MCP-1 and prevents spontaneous endothelial cell migration through Rho kinase-dependent mechanism. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 18: 1031-42

- Colin D, Gimazane A, Lizard G, Izard JC, Solary E, *et al.* 2009. Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int. J. Cancer* 124: 2780-8
- Colin D, Limagne E, Jeanningros S, Jacquet A, Lizard G, *et al.* 2011. Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 4: 1095-106
- Crescente M, Jessen G, Momi S, Holtje HD, Gresele P, *et al.* 2009. Interactions of gallic acid, resveratrol, quercetin and aspirin at the platelet cyclooxygenase-1 level. Functional and modelling studies. *Thrombosis and haemostasis* 102: 336-46
- Csaki C, Mobasheri A, Shakibaei M. 2009. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1beta-induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Res Ther* 11: R165
- de Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N. 2004. Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 110: 2494-7
- Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. 2012. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of toxicology* 2012: 645460
- DeFronzo RA, Tripathy D. 2009. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes care* 32 Suppl 2: S157-63
- Delmas D, Rebe C, Micheau O, Athias A, Gambert P, *et al.* 2004. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 23: 8979-86
- Delmas D, Solary E, Latruffe N. 2011. Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Current medicinal chemistry* 18: 1100-21
- Despres JP, Lemieux I. 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444: 881-7
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 86: 465-514
- Detampel P, Beck M, Krahenbuhl S, Huwyler J. 2012. Drug interaction potential of resveratrol. *Drug Metab. Rev.* 44: 253-65
- Dolinsky VW, Dyck JR. 2011. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1812: 1477-89
- Echtay KS. 2007. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radical Biol. Med.* 43: 1351-71

- El Kochairi I, Montagner A, Rando G, Lohmann C, Matter CM, Wahli W. 2011. Beneficial effects of combinatorial micronutrition on body fat and atherosclerosis in mice. *Cardiovasc. Res.* 91: 732-41
- Fan M, Rhee J, St-Pierre J, Handschin C, Puigserver P, *et al.* 2004. Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes Dev.* 18: 278-89
- Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, *et al.* 2009. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radical Biol. Med.* 46: 624-32
- Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. 2011. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 93: 884S-90
- Finck BN, Kelly DP. 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of clinical investigation* 116: 615-22
- Friedrichsen M, Mortensen B, Pehmoller C, Birk JB, Wojtaszewski JF. 2012. Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: Role in glucose uptake and insulin sensitivity. *Mol. Cell. Endocrinol.*
- Fukai T, Ushio-Fukai M. 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling* 15: 1583-606
- Fulda S, Debatin KM. 2004. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene* 23: 6702-11
- Gatouillat G, Balasse E, Joseph-Pietras D, Morjani H, Madoulet C. 2010. Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma. *J. Cell. Biochem.* 110: 893-902
- Gautier A, Balkau B, Lange C, Tichet J, Bonnet F. 2010. Risk factors for incident type 2 diabetes in individuals with a BMI of <27 kg/m²: the role of gamma-glutamyltransferase. Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetologia* 53: 247-53
- Ge Y, Chen J. 2011. MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle* 10: 441-8
- Gordon BS, Delgado Diaz DC, Kostek MC. 2012. Resveratrol decreases inflammation and increases utrophin gene expression in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Clin. Nutr.*
- Gromak N. 2012. Intronic microRNAs: a crossroad in gene regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 40: 759-61

- Guerre-Millo M. 2006. [Adipose tissue secretory function: implication in metabolic and cardiovascular complications of obesity]. *Journal de la Societe de biologie* 200: 37-43
- Halls C, Yu O. 2008. Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. *Trends Biotechnol.* 26: 77-81
- Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Sethi G, Diagaradjane P, Anand P, *et al.* 2010. Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 127: 257-68
- Hasko G, Pacher P. 2010. Endothelial Nrf2 activation: a new target for resveratrol? *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299: H10-2
- Hoeks J, Schrauwen P. 2012. Muscle mitochondria and insulin resistance: a human perspective. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23: 444-50
- Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, *et al.* 2011. Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338: 784-94
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, *et al.* 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-6
- Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyorala K. 2004. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Archives of internal medicine* 164: 1066-76
- Huang MB, Xu H, Xie SJ, Zhou H, Qu LH. 2011. Insulin-like growth factor-1 receptor is regulated by microRNA-133 during skeletal myogenesis. *PLoS one* 6: e29173
- Huang ZP, Espinoza-Lewis R, Wang DZ. 2012. Determination of miRNA targets in skeletal muscle cells. *Methods Mol. Biol.* 798: 475-90
- Hue L, Taegtmeyer H. 2009. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 297: E578-91
- Hunt LC, Upadhyay A, Jazayeri JA, Tudor EM, White JD. 2012. An anti-inflammatory role for leukemia inhibitory factor receptor signaling in regenerating skeletal muscle. *Histochem. Cell Biol.*
- Iborra M, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, *et al.* 2011. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 39: 1102-6
- Jackson RS. 1994. *Wine Science New York*

- Janot M, Audfray A, Loriol C, Germot A, Maftah A, Dupuy F. 2009. Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. *BMC genomics* 10: 483
- Jazirehi AR, Bonavida B. 2004. Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 3: 71-84
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2731-41
- Jensen TE, Richter EA. 2012. Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *The Journal of physiology* 590: 1069-76
- Jordan SD, Lamia KA. 2012. AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.*
- Kaminski J, Lancon A, Aires V, Limagne E, Tili E, *et al.* 2012. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochemical pharmacology*
- Kaminski J, Lançon A, Tili E, Aires V, Demarquoy J, Lizard G, Michaille JJ, Latruffe N, 2012. Dietary Resveratrol Modulates Metabolic Functions in Skeletal Muscle Cells. *Journal of Food and Drug Analysis* 20: 398-401
- Kang JS, Krauss RS. 2010. Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13: 243-8
- Kang OH, Jang HJ, Chae HS, Oh YC, Choi JG, *et al.* 2009. Anti-inflammatory mechanisms of resveratrol in activated HMC-1 cells: pivotal roles of NF-kappaB and MAPK. *Pharmacol. Res.* 59: 330-7
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405: 421-4
- Kiens B, Alsted TJ, Jeppesen J. 2011. Factors regulating fat oxidation in human skeletal muscle. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 12: 852-8
- Kim YJ, Ahn JY, Liang P, Ip C, Zhang Y, Park YM. 2007. Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: implication to tumor biology. *Cancer Res.* 67: 546-54

- Kimura Y, Ohminami H, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. 1983. Effects of Stilbene Components of Roots of *Polygonum* ssp. on Liver Injury in Peroxidized Oil-fed Rats. *Planta Med.* 49: 51-4
- Koh HJ, Brandauer J, Goodyear LJ. 2008. LKB1 and AMPK and the regulation of skeletal muscle metabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 11: 227-32
- Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Cokkinos DV. 2005. Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome. *Postgraduate medical journal* 81: 358-66
- Koubassova NA, Tsaturyan AK. 2011. Molecular mechanism of actin-myosin motor in muscle. *Biochemistry (Mosc)*. 76: 1484-506
- Kousteni S. 2012. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone* 50: 437-43
- Kubo Y. 1991. Comparison of initial stages of muscle differentiation in rat and mouse myoblastic and mouse mesodermal stem cell lines. *The Journal of physiology* 442: 743-59
- Kubota T, Uemura Y, Kobayashi M, Taguchi H. 2003. Combined effects of resveratrol and paclitaxel on lung cancer cells. *Anticancer Res* 23: 4039-46
- Kweon SH, Song JH, Kim TS. 2010. Resveratrol-mediated reversal of doxorubicin resistance in acute myeloid leukemia cells via downregulation of MRP1 expression. *Biochemical and biophysical research communications* 395: 104-10
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, *et al.* 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127: 1109-22
- Lancon A, Kaminski J, Tili E, Michaille JJ, Latruffe N. 2012. Control of MicroRNA Expression as a New Way for Resveratrol To Deliver Its Beneficial Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 8783-9
- Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, *et al.* 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and biophysical research communications* 309: 1017-26
- Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine reviews* 23: 201-29
- Li H, Xia N, Forstermann U. 2012. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide* 26: 102-10

- Malik V, Rodino-Klapac LR, Mendell JR. 2012. Emerging drugs for Duchenne muscular dystrophy. *Expert opinion on emerging drugs* 17: 261-77
- Marambaud P, Zhao H, Davies P. 2005. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *The Journal of biological chemistry* 280: 37377-82
- Markus MA, Morris BJ. 2008. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clinical interventions in aging* 3: 331-9
- Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, *et al.* 2012. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids in health and disease* 11: 30
- Mokalled MH, Johnson AN, Creemers EE, Olson EN. 2012. MASTR directs MyoD-dependent satellite cell differentiation during skeletal muscle regeneration. *Genes Dev.* 26: 190-202
- Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Senese R, Cioffi F, *et al.* 2010. PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. *PPAR research* 2010
- Nakata R, Takahashi S, Inoue H. 2012. Recent advances in the study on resveratrol. *Biol. Pharm. Bull.* 35: 273-9
- O'Neill HM, Holloway GP, Steinberg GR. 2012. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: Implications for obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.*
- Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, *et al.* 2010. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *The Journal of biological chemistry* 285: 8340-51
- Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, *et al.* 2007. Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp. Mol. Med.* 39: 222-9
- Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, *et al.* 2012. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* 148: 421-33
- Peterson CM, Johannsen DL, Ravussin E. 2012. Skeletal muscle mitochondria and aging: a review. *Journal of aging research* 2012: 194821
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30: e36

- Prasad DS, Kabir Z, Dash AK, Das BC. 2011. Abdominal obesity, an independent cardiovascular risk factor in Indian subcontinent: A clinico epidemiological evidence summary. *Journal of cardiovascular disease research* 2: 199-205
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24: 981-90
- Reaven GM. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-607
- Reis-Sobreiro M, Gajate C, Mollinedo F. 2009. Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antimyeloma and antileukemia actions. *Oncogene* 28: 3221-34
- Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. 2012. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *The Journal of biological chemistry* 287: 4403-10
- Ricquier D. 2005. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc. Nutr. Soc.* 64: 47-52
- Rowland AF, Fazakerley DJ, James DE. 2011. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. *Traffic* 12: 672-81
- Russell ST, Wyke SM, Tisdale MJ. 2006. Mechanism of induction of muscle protein degradation by angiotensin II. *Cell. Signal.* 18: 1087-96
- Sanchez AM, Candau RB, Csibi A, Pagano AF, Raibon A, Bernardi H. 2012. The role of AMP-activated protein kinase in the coordination of skeletal muscle turnover and energy homeostasis. *American journal of physiology. Cell physiology* 303: C475-85
- Scarpulla RC. 2008. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147: 321-34
- Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* 91: 1447-531
- Sebastian D, Guitart M, Garcia-Martinez C, Mauvezin C, Orellana-Gavalda JM, *et al.* 2009. Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells. *Journal of lipid research* 50: 1789-99
- Selsby JT, Morine KJ, Pendrak K, Barton ER, Sweeney HL. 2012. Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1alpha involves a fast to slow fiber type shift in the mdx mouse. *PLoS one* 7: e30063

- Shim WS, Kim HJ, Kang ES, Ahn CW, Lim SK, *et al.* 2006. The association of total and differential white blood cell count with metabolic syndrome in type 2 diabetic patients. *Diabetes research and clinical practice* 73: 284-91
- Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P. 2010. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free radical research* 44: 1267-88
- Suzuki K, Koike T. 2007. Resveratrol abolishes resistance to axonal degeneration in slow Wallerian degeneration (Wlds) mice: activation of SIRT2, an NAD-dependent tubulin deacetylase. *Biochemical and biophysical research communications* 359: 665-71
- Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M. 1997. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89: 127-38
- Takaoka MJ. 1940. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University* 3: 1-16
- Teshima Y, Akao M, Jones SP, Marban E. 2003. Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circulation research* 93: 192-200
- Timmers S, Auwerx J, Schrauwen P. 2012. The journey of resveratrol from yeast to human. *Aging (Albany NY)* 4: 146-58
- Tufekci KU, Civi Bayin E, Genc S, Genc K. 2011. The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Parkinson's disease* 2011: 314082
- Ventura-Clapier R. 2012. Potentiating exercise training with resveratrol. *The Journal of physiology* 590: 3215-6
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, *et al.* 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* 360: 1518-25
- von Maltzahn J, Chang NC, Bentzinger CF, Rudnicki MA. 2012. Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol.*
- Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, *et al.* 2004. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2: e294
- Watt MJ, Hoy AJ. 2012. Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302: E1315-28

- Wyke SM, Russell ST, Tisdale MJ. 2004. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br. J. Cancer* 91: 1742-50
- Yaffe D, Saxel O. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725-7
- Yao JW, Liu J, Kong XZ, Zhang SG, Wang XH, *et al.* 2012. Induction of activation of the antioxidant response element and stabilization of Nrf2 by 3-(3-pyridylmethylidene)-2-indolinone (PMID) confers protection against oxidative stress-induced cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259: 227-35
- Yu W, Fu YC, Wang W. 2012. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *J. Cell. Biochem.* 113: 752-9
- Yuan Y, Shi XE, Liu YG, Yang GS. 2011. FoxO1 regulates muscle fiber-type specification and inhibits calcineurin signaling during C2C12 myoblast differentiation. *Molecular and cellular biochemistry* 348: 77-87
- Zhang Y, Zeng X, Jin S. 2012. Autophagy in adipose tissue biology. *Pharmacol. Res.*
- Zhao W, Bao P, Qi H, You H. 2010. Resveratrol down-regulates survivin and induces apoptosis in human multidrug-resistant SPC-A-1/CDDP cells. *Oncol. Rep.* 23: 279-86
- Zheng J, Chen LL, Zhang HH, Hu X, Kong W, Hu D. 2012. Resveratrol improves insulin resistance of catch-up growth by increasing mitochondrial complexes and antioxidant function in skeletal muscle. *Metabolism: clinical and experimental* 61: 954-65

Addendum

1) Publications

- Kaminski J, Lançon A, Aires V, Limagne E, Tili E, *et al.* 2012. Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochemical pharmacology*
- Lançon A, Kaminski J, Tili E, Michaille JJ, Latruffe N. 2012. Control of MicroRNA Expression as a New Way for Resveratrol To Deliver Its Beneficial Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 8783-9
- Kaminski J, Lançon A, Tili E, Aires V, Demarquoy J, Lizard G, Michaille JJ, Latruffe N, 2012. Dietary Resveratrol Modulates Metabolic Functions in Skeletal Muscle Cells. *Journal of Food and Drug Analysis* 20: 398-401

2) Communications

- **Congrès Red Cat**, Luxembourg (January 25-27 janvier 2012).

Redox and Inflammation signaling 2012 RedCat Meeting on Redox Catalysis from Chemistry to Biology

Présentation d'un poster:

“Regulation of metabolic genes in mouse skeletal muscle cells by resveratrol”

Jacques Kaminski, Allan Lançon, Esmerina Tili, Virginie Aires, Jean Demarquoy, Gérard Lizard, Jean-Jacques Michaille and Norbert Latruffe

- **Congrès NutriOX**, Saarbrücken (6-9 Septembre 2012)

Présentation d'un poster

“Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts”

Jacques Kaminski, Allan Lançon, Virginie Aires, Emeric Limagne, Esmerina Tili, Jean-Jacques Michaille, Norbert Latruffe.

- **Forum de jeunes chercheurs**, Besançon (6-7 septembre 2012)

Présentation d'un poster

“Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts”

Jacques Kaminski, Allan Lançon, Virginie Aires, Emeric Limagne, Esmerina Tili, Jean-Jacques Michaille, Norbert Latruffe.

- **17th World Congress on Advances in Oncology**, Crête (11-13 Octobre 2012)

Présentation d'un “abstract”

“Control of non-coding microRNAs expression by resveratrol as new pathways of regulation in cancer and non-cancer cells. Perspectives open in proliferation, inflammation and differentiation processes.”

Esmerina Tili, Allan Lançon, Jacques Kaminski, Virginie Aires, Emeric Limagne, Dominique Delmas, Jean-Jacques Michaille, Norbert Latruffe.