



HAL
open science

Régulation des fonctions musculaires par les glucocorticoïdes et les androgènes

Vanessa Ueberschlag-Pitiot

► **To cite this version:**

Vanessa Ueberschlag-Pitiot. Régulation des fonctions musculaires par les glucocorticoïdes et les androgènes. Biologie moléculaire. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ041 . tel-01775177

HAL Id: tel-01775177

<https://theses.hal.science/tel-01775177>

Submitted on 24 Apr 2018

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.

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

IGBMC - CNRS UMR 7104 - INSERM U964

THÈSE présentée par :

Vanessa UEBERSCHLAG-PITOT

soutenue le : 13 septembre 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Régulation des fonctions musculaires
par les glucocorticoïdes
et les androgènes**

THÈSE dirigée par :
Dr METZGER Daniel

Directeur de recherches - IGBMC - Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Dr DUEZ Hélène
Dr MAIRE Pascal

Chargé de recherches - Institut Pasteur de Lille - Université de Lille
Directeur de recherches - Institut Cochin - Université Paris Descartes

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr COWLING Belinda

Chargé de recherches - IGBMC - Université de Strasbourg

*A mes parents
A ma grand-mère*

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier sincèrement les membres de mon jury, le docteur Belinda Cowling, le docteur Hélène Duez et le docteur Pascal Maire d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude au docteur Daniel Metzger qui m'a accueillie dans son laboratoire en stage de Master 2 et m'a permis d'effectuer ma thèse dans son équipe. Je le remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet, ainsi que d'avoir toujours été disponible pour des discussions ou pour répondre à mes nombreuses questions. Ses conseils ont été précieux pour mener à bien mon projet et je le remercie de m'avoir fait confiance tout au long de ces années.

Merci également à nos collaborateurs, le Professeur Arnaud Ferry et le Professeur Bernard Geny, pour leurs conseils et leurs recommandations sur nos projets. Cela a été un plaisir d'interagir et de travailler ensemble. Je remercie l'Association Française contre les Myopathies pour avoir soutenu ce projet et la Fondation pour la Recherche Médicale pour m'avoir donné les moyens de finaliser cette thèse.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à tous les membres de l'équipe, anciens ou présents, qui ont tous contribué à l'aboutissement de ce travail et qui m'ont permis d'évoluer dans une ambiance agréable. Je pense notamment à tous les ingénieurs et techniciens (Esther, Jean Marc, Laetitia G., Laetitia P. et Pierre) qui m'ont permis de travailler dans de bonnes conditions. Merci à Jean-Marc, alias Tonton, qui a été un soutien précieux aussi bien technique que moral. Nos discussions m'ont permis d'apprendre un grand nombre de choses que ce soit sur la génération de lignée ou sur le triathlon. Merci à Esther, ce fût un plaisir d'avoir fait ce bout de chemin ensemble. Merci à Laetitia G. d'avoir partagé avec moi ses secrets en histologie. Merci à Laetitia P. d'avoir pu nous aider dans les moments de rush et merci à Pierre grâce à qui les après-midis passés à l'animalerie paraissaient moins longues.

Je souhaite également remercier nos Post-doc plus particulièrement Gilles, Maxime, Rocco et Salvatore. J'ai appris énormément en travaillant à leurs côtés. Merci à Rocco et Salvatore qui ont apporté leur bonne humeur au laboratoire. Merci à Maxime pour ses discussions stimulantes et ses suggestions même envoyées de l'autre côté de l'Atlantique qui m'ont aidé tout au long de ma thèse. Merci à Gilles de m'avoir permis d'évoluer de manière autonome, grâce à ses conseils scientifiques et techniques.

Je pense aussi à tous les étudiants (licence, master ou thèse) qui ont toujours cru en moi et m'ont continuellement encouragée et soutenue. Une pensée particulière à Doriane et Thanuja, qui ont été présentes lors de mes débuts. Merci à Julie, un sacré caractère qui l'emmènera loin. Merci également à Camille, mon coach personnel, qui a toujours eu les mots justes et qui m'a permis de garder le cap jusqu'à la fin de ma thèse. Merci à Elise, la relève du labo pour les moments que nous avons partagé ensemble. Je n'oublie pas les nouvelles recrues, Rana et Shuang pour leur grande sympathie et Annabelle, alias Greek Girl pour sa bonne humeur légendaire et pour ses conseils précieux en bio-informatique. Merci également aux étudiants du box d'à côté, en particulier Carole, pour nos discussions diverses et variées qui vont me manquer. Je souhaite sincèrement bon courage aux thésards en espérant qu'ils vivront une expérience aussi enrichissante que la mienne.

Parmi tous les gens exceptionnels que j'ai rencontré à l'IGBMC, je tiens à remercier en particulier Jérémy et Sébastien d'avoir égayé mes journées et supporté mes plaintes sur les

expériences infructueuses, à Ilaria, gardienne agréée de Croquette, pour son soutien, son aide et son optimisme, à Shilpy et Patrick d'avoir prêté une oreille attentive et de m'avoir aidé à trouver des solutions pour résoudre les problèmes techniques. Merci également à Maité, Carole H., Angélique Q., Muriel R., Aurélie E., Mélanie M., Sylvia U., Dominique K., Françoise P., Isabelle G., Nicolas L., Annabelle L., Dina A., Régis L., Pierre A., sans oublier les amis du RU Etienne, Olivier, Rémi et Aurélie.

Un grand merci à l'ensemble du personnel de l'IGBMC et plus particulièrement l'équipe de l'animalerie (Agouna, Martine, Rabia, Cindy, Natacha et Ludovic), les membres des services de séquençage (Bernard, Muriel et Serge), d'analyses bio-informatiques (Tao, Doulaye et Stéphanie), de métabolique (Marie-France, Stéphane et Laurent), d'histologie (Olivia, Hugues, Patrice et Bruno) et d'imagerie (Pascal et Yves) ainsi que ceux du service informatique.

Je tiens à remercier particulièrement Mélanie alias Madame Schuh, pour sa joie de vivre et sa disponibilité, pour son réconfort dans les moments difficiles et tout simplement pour son amitié qui m'est chère. Merci d'avoir toujours été présente même lorsque nos routes se sont séparées et n'oublions pas « Don't worry be happy ». Je lui souhaite tout le bonheur et tout le succès qu'elle mérite. Je remercie également Charles, un étudiant toujours désireux d'apprendre et sur qui on peut compter en toutes circonstances. J'espère que nos chemins se croiseront à nouveau un jour. En attendant, je lui souhaite sincèrement de réussir sa carrière et sa vie personnelle.

Je suis très reconnaissante envers ma famille, ma belle famille et mes amis, pour leur patience, leur compréhension et leur soutien. Je remercie particulièrement mes cousins, Stéphane, Léa, Virginie, Cyrille, Matthieu, Sandra, Yves, Franck et Corinne, et leurs enfants Adèle, Arthur, Lucie et Elian. Merci à ma Marraine d'avoir toujours répondu présent dans les moments délicats « Houston, on a un problème ». Merci à mes grands-parents pour leur gentillesse et leurs mots toujours encourageants. Merci à ma belle-famille, en particulier Nadine et Matthieu, qui ont toujours le mot pour rire et me changer les idées, ainsi qu'à Didier et Marie-Hélène d'avoir cru en moi. Je pense également à mes amis de la Vallée, JB, Fanny, Julien, Sandrine, Morgan, Elodie, Cyprien et les nouvelles venues, Emelyne et Elisa. Merci d'avoir essayé de suivre l'avancée de mes travaux, ce qui n'a pas toujours été évident. Je remercie Guillaume, Audrey, Marion et Benoit pour les moments inoubliables passés ensembles et qui ont été d'un soutien sans faille tout au long de mon parcours. Une pensée qui vient du cœur pour mes deux filleuls, Loïc et Noé, leur innocence et leurs sourires m'ont donné la force de continuer à avancer et permis de m'évader de temps en temps. Merci également à leurs parents, Christelle et Thierry et Caroline et Thierry, ainsi qu'à son frère Alexis, de si bien s'occuper d'eux. Je souhaite également remercier Alex, mon mari, qui a toujours été à mes côtés depuis ces 12 dernières années. Sa patience, son courage et son amour inconditionnel m'ont permis de m'épanouir et de me projeter dans des projets de vie remplis de bonheur.

Enfin un grand merci à mes parents de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes études. Leur confiance et leur amour m'ont permis d'atteindre tous mes objectifs en me donnant la force et l'épanouissement nécessaires. Je suis reconnaissante de tout ce qu'ils ont toujours fait pour moi et du bonheur qu'ils m'ont apporté. Je suis fière et chanceuse d'être leur fille.

RESUME

Les muscles représentent plus de 40 % de la masse corporelle chez les mammifères. Ces organes permettent grâce à leurs propriétés contractiles, le maintien de la posture, le déplacement et la respiration. Ils constituent également une réserve protéique importante. La masse et les fonctions musculaires sont contrôlées par divers facteurs, tels que la charge mécanique, la stimulation nerveuse, des hormones, des facteurs de croissance, le stress et l'état nutritionnel. L'inactivité musculaire, le jeûne, des maladies (notamment le SIDA, les cancers, des chocs septiques et le diabète), le vieillissement et certaines maladies génétiques (comme les myopathies) induisent une atrophie et une faiblesse musculaire. L'atrophie musculaire est fortement invalidante, pouvant conduire à une dépendance physique, à des chutes et des fractures osseuses, induisant un coût socio-économique important.

Les androgènes et les glucocorticoïdes (GC) sont deux hormones stéroïdiennes qui exercent des effets pléiotropes chez les mammifères. Les GC contrôlent le rythme circadien, ainsi que le métabolisme lipidique, glucidique et protéique. Ils possèdent de puissantes propriétés anti-inflammatoires, et sont utilisés pour traiter des infections et des maladies chroniques, telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'eczéma et l'asthme. Cependant leur utilisation prolongée est limitée, car ils induisent des effets secondaires importants, notamment le diabète, l'ostéoporose et l'atrophie musculaire. Les androgènes contrôlent la prolifération cellulaire, le développement et le maintien des organes reproducteurs masculins. Ils exercent également un effet anabolique sur certains tissus, comme les os et les muscles. Les effets anaboliques des androgènes sur le muscle squelettique sont particulièrement intéressants pour améliorer les fonctions musculaires chez les personnes âgées ou chez les patients atteints de sarcopénie, cachexie ou du SIDA. Cependant comme les androgènes stimulent également la prolifération des cellules épithéliales de la prostate, ils augmentent le risque de développer un cancer de la prostate. L'identification d'analogues avec une activité sélective et induisant moins d'effets secondaires est donc un enjeu majeur des industries pharmaceutiques. Les voies de signalisation contrôlées par ces deux hormones sont mal caractérisées, rendant leur identification difficile.

Les effets des GC et des androgènes sont principalement relayés par le récepteur des GC (GR) et le récepteur des androgènes (AR), deux membres de la famille multigénique des récepteurs nucléaires. Il est classiquement admis que GR et AR régulent l'expression de gènes cibles en se liant à des éléments de réponse appelé respectivement GRE et ARE. De plus, GR régule négativement l'expression de gène en se fixant sur des éléments de réponse appelés nGRE, ou encore en se liant aux facteurs de transcription AP1 et NF- κ B, bloquant ainsi leur activité.

L'objectif de mon projet de thèse est de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les GC et les androgènes régulent la masse et les fonctions musculaires, en utilisant des approches pharmacologiques et génétiques chez la souris.

L'étude de souris GR^{(i)skm-/-}, chez lesquelles GR est sélectivement invalidé dans les myofibres du muscle strié chez l'adulte à l'aide de techniques de mutagenèse somatique conditionnelle ciblée développées au laboratoire, m'a permis de montrer que GR dans les myofibres contrôle négativement la masse et la force musculaire. GR exerce un effet anti-anabolique en présence de niveaux physiologiques de GC en augmentant l'expression de *Redd1*, un régulateur négatif de la voie anabolique, tandis que la voie catabolique n'est pas affectée. Nos études ont également révélé que GR

dans les myofibres est essentiel à l'activation de l'expression de gènes impliqués dans les voies protéolytiques et autophagiques, après l'administration de doses supra-physiologiques de GC. Des études cinétiques ont montré que les GC ont un effet anti-anabolique rapide, afin de ne pas diminuer l'énergie disponible pour la production de force, ce qui est important dans des conditions de stress aigu par exemple. En revanche l'induction de l'expression des gènes cataboliques nécessite une exposition de plusieurs jours aux GC. Nous avons également observé que les niveaux de GR étaient régulés par les GC, à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel. Ce système dynamique permet ainsi de moduler la réponse des GC dans les muscles, en fonction de leur concentration et la durée d'exposition. L'immunoprécipitation la chromatine, à l'aide d'un anticorps dirigé contre GR, des tissus musculaires striés squelettiques de souris traitées à la dexaméthasone, nous a permis d'identifier près de 13 400 sites de liaison de GR. Des analyses bio-informatiques ont confirmé la présence des sites de liaison de GR déjà décrits, et montrent la présence de nouveaux sites de liaison de GR, notamment dans des gènes qui ne sont pas reportés comme étant des cibles des GC dans le muscle. Afin de préciser les voies de signalisation et les cibles directement régulées par GR, nous avons croisé les résultats du séquençage de la chromatine immunoprécipitée, avec les résultats d'un transcriptome réalisé dans le muscle strié squelettique de souris traitées à la dexaméthasone. Nos résultats révèlent que GR contrôle positivement l'expression de gènes impliqués dans le transport des acides aminés et du glucose, et la dégradation des lipides et régule négativement l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, le développement musculaire, ainsi que l'expression de facteurs de transcription. De plus, une recherche de motifs par analyse bio-informatique a mis en évidence un enrichissement de séquences consensus caractéristiques des éléments de réponse aux GC positifs (+GRE) dans plus de 7100 sites de liaison. Bien que beaucoup moins nombreux, nous avons également identifié environ 50 gènes régulés par GR dans les myofibres, contenant des sites de liaison des facteurs AP1 ou NF- κ B.

Ainsi, nos résultats ont permis d'identifier toutes les régions génomiques contrôlées par les GC dans les fibres musculaires *in vivo*. Ces données ont mis en évidence des réseaux de gènes contrôlés par ces hormones, et ont montré que GR stimule l'expression de nombreux gènes dans les myofibres via des GRE et en répriment certains en bloquant l'activité de AP1 et NF- κ B. Ces données sont extrêmement précieuses pour comprendre les effets tissu-spécifiques des GC, et des facteurs de transcription en général (Manuscrit 1 en préparation).

Bien que les GC induisent une atrophie musculaire, ils constituent les traitements les plus efficaces de la myopathie de Duchenne (MD), une maladie musculaire induite par la mutation du gène de la dystrophine, caractérisée par une faiblesse musculaire, une inflammation chronique précoce et des fibres musculaires à noyaux centraux. Ils induisent une restauration partielle de la force musculaire et retardent la progression de la maladie, mais ne sont pas curatifs. Alors que les traitements à long termes avec des GC contenant un groupement fluor (e.g. dexaméthasone) induisent des myopathies chroniques, les GC sans groupement fluor (e.g. la prédnisolone) présentent moins d'effets secondaires. Comme les GC induisent à la fois une atrophie musculaire chez les patients non dystrophiques et des effets bénéfiques sur les fonctions musculaires des patients atteints de MD, l'identification des événements moléculaires et cellulaires induits par ces composés dans les muscles striés est d'une importance majeure pour améliorer l'amélioration des traitements de MD. Une autre partie de mon projet de thèse consiste à comparer l'effet de la dexaméthasone et de la α -méthylprédnisolone, sur les muscles de souris de type sauvage et d'un modèle murin de MD, les souris mdx, et d'identifier les événements moléculaires et cellulaires contribuant à l'amélioration des signes cliniques de la MD, ainsi que ceux responsables des effets secondaires indésirables. Nos résultats indiquent qu'un traitement

prolongé aux GC permet une amélioration de l'architecture musculaire plus marquée après un traitement à la α -méthylprédnisolone qu'après un traitement à la dexaméthasone, en diminuant plus fortement le nombre de noyaux centraux, le niveau d'infiltration des cellules immunitaires, ainsi qu'en augmentant la taille des fibres. Nos résultats montrent également qu'un traitement chronique à la α -méthylprédnisolone n'induit pas l'expression des gènes codant pour des régulateurs négatifs de la voie anabolique ainsi que pour des protéines impliquées dans le système ubiquitine protéasome, contrairement à la dexaméthasone qui augmente l'expression de ces gènes. Ainsi nos résultats indiquent que l'expression de certains gènes cibles de GR est régulée de manière différentielle suivant le type d'analogues utilisés. L'identification des gènes induits sélectivement par la dexaméthasone, responsables des effets délétères, et ceux induits sélectivement par la α -méthylprédnisolone, responsables des effets bénéfiques, va permettre de développer de nouveaux cribles moléculaires afin de sélectionner des analogues induisant moins d'effets secondaires que ceux disponibles actuellement, et ainsi améliorer le traitement des patients atteints de la MD.

De plus en plus d'évidences suggèrent que les voies de signalisation des androgènes et des GC sont interconnectées. Des résultats obtenus dans le laboratoire montrent que les souris chez lesquelles le récepteur aux androgènes (AR) est sélectivement invalidé dans les myofibres de souris, sont protégées de l'atrophie induite par la dexaméthasone, ce qui indique qu'AR est impliqué dans la fonte musculaire induite par la dexaméthasone. Au cours de ma thèse, nous avons montré que l'induction de certains gènes cibles d'AR par la testostérone est abolie chez les souris GR^{(i)skm-/-}. De plus, nous avons révélé que les androgènes induisent non seulement la liaison d'AR, mais également la liaison de GR sur des éléments de réponse présent dans les gènes cibles d'AR. Inversement, GR se fixe sur des GRE suite à un traitement aux GC, mais également suite à un traitement à la testostérone, et ces deux composés permettent également la liaison d'AR sur ces promoteurs. Ces résultats suggèrent que les récepteurs des androgènes et des GC interagissent et interviennent simultanément dans la régulation de certains gènes.

Deux études réalisées en collaboration avec l'équipe du Pr. Arnaud Ferry et du Dr. Denis Furling de l'Institut de Myologie de Paris ont permis de démontrer que les facteurs produits par les gonades contribuent à l'augmentation de la performance musculaire pendant le développement post-natal chez les mâles et les femelles (Manuscrit 2 en révision) et de clarifier le rôle de la myostatine, un facteur de croissance impliqué dans la régulation de la masse musculaire, dans la performance musculaire (Manuscrit 3 en révision, présenté en annexe).

Finalement, une étude réalisée avec l'équipe du Pr. Bernard Geny et du Pr. Jean Sibia de l'Hôpital Civil de Strasbourg a permis de préciser les mécanismes moléculaires responsables des myopathies inflammatoires, caractérisées par des douleurs musculaires, une fatigabilité musculaire à l'effort, voire une diminution de la force musculaire. Nos résultats mettent en évidence un dysfonctionnement mitochondrial lié à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) induit par l'interféron β et un potentiel traitement à l'aide d'antioxydants tels que la N-acétylcystéine (Manuscrit 4 en révision, présenté en annexe).

Ainsi ces travaux ont permis de clarifier les mécanismes impliqués dans la régulation de la masse et des fonctions musculaires, et ouvrent de nouvelles perspectives dans le traitement de pathologies telles que l'atrophie musculaire, la cachexie, la sarcopénie ou les myopathies.

ABSTRACT

Muscles represent more than 40% of body weight in mammals. They allow the maintenance of posture, movement and respiration and serve as an important protein reserve. The muscle mass and functions are controlled by various factors, such as mechanical load, nerve stimulation, stress, nutritional status and hormones. Glucocorticoids (GCs) control development, circadian rhythm, glucose, lipid and protein metabolism, as well as inflammation and immune functions. Synthetic GCs are being prescribed for chronic inflammatory conditions, as well as for immunosuppression in patients undergoing organ transplantation. Moreover, GCs are beneficial for myopathies such as Duchenne muscular dystrophy even though it does not halt the progression of the disease. Almost 1% of the population in western countries is long term-user of oral GCs, even though such therapies induce diabetes, osteoporosis and muscle wasting. The activity of GCs is mainly mediated through the GCs receptor (GR), a member of the nuclear receptor superfamily. GR controls gene expression by binding to positive or negative GCs response elements (GRE and nGRE, respectively) and through the interaction with other transcriptions factors (e.g. NF- κ B and AP1).

As the cellular and molecular mechanisms by which GCs regulate muscle mass and function remain poorly understood, I aimed during my PhD research to characterize the signaling pathways controlled by GCs in skeletal muscle. To do so, I generated GR^{(i)skm^{-/-}} mice in which GR is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood, and performed phenotypic (muscle mass and strength) and molecular studies of wild-type or GR^{(i)skm^{-/-}} mice subjected to various physiological and pathophysiological conditions [e.g. synthetic GC treatment, fasting, ...]. Our results demonstrate that physiological levels of GCs exert an anti-anabolic effect via GR myofibers, by inducing the expression of a negative regulator of this pathway, REDD1, whereas the main catabolic pathways are unaffected. In contrast, induction of catabolic genes needs several expositions to GC. We also demonstrate that GCs regulate GR levels, both transcriptionally and translationally. Thus, GCs response in muscle depends on their concentration and their exposure time. To identify direct GR targets in skeletal muscles, we performed chromatin-immunoprecipitation (ChIP) from murine skeletal muscles followed by massive sequencing. The analysis of our ChIP seq dataset revealed the presence of more than 13 400 GR binding sites, including additional in genes previously shown to contain GREs as well as new one, in genes which were not reported to be GCs targets in skeletal muscle tissue. In addition, my transcriptomic analyses revealed that GR stimulates expression of genes involved in lipid transport and degradation, in amino acid transport and glucose transport. GR also inhibit the expression of transcription factor as well as genes involved in angiogenesis and muscle development. These genes include some that were known to be controlled by GR after GC treatment such as, MuRF1, Redd1, Myostatin and FoxO, as well as many which were not reported to be direct GCs targets in skeletal muscle tissue, or not known to be regulated by GCs. Bio-informatic analyses allowed the identification of pathways controlled by direct binding of GR to GREs and those controlled by indirect effects on expression of genes through the interaction of GR with other transcription factors (AP1 and NF- κ B). Thus, my studies identified all genomic regions bound by GR in myofibers and revealed new gene networks controlled by GCs in muscle fibers (Manuscript 1 in preparation). My project opens new avenues to develop screens based on promoter regions of genes controlled by GCs in skeletal muscle to select compounds with increased tissue selectivity, and identify new drug target to combat muscle diseases.

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal X-linked muscle disease, characterized by muscle weakness, early chronic inflammation and muscle fibers with centrally-located nuclei. GCs are the most potent treatment of DMD. They promote an increase in muscle strength and delay the progression of the disease, but unfortunately do not halt it. However, long-term treatments induce various side effects, including osteoporosis, hypertension, obesity and diabetes. Some GCs (e.g. Prednisolone) have a better benefit/risk balance than others (e.g. dexamethasone), but the mechanisms underlying their differential effects are unknown. As GCs have both a positive effect on DMD-patient muscle function and a muscle catabolic activity, identification of the molecular and cellular events induced by GCs in skeletal muscles is of major importance to further improve DMD treatment efficacy. Another part of my thesis project was to compare the effects of dexamethasone and α -methylprednisolone on skeletal muscles of wild-type mice, as well as on mdx mice (a mouse model of DMD), to unravel the molecular and cellular events induced selectively by these drugs, and to identify those contributing to DMD clinical improvement, and those inducing undesired side effects. Our results indicate that prolonged treatment with GCs improved in a more pronounced manner muscle architecture after treatment with α -methylprednisolone than with dexamethasone. In fact, GCs reduces the number of central nuclei and the extent of immune cells infiltration, as well as increases the size of the fibers. Our results also show that chronic treatment with α -methylprednisolone does not induce the expression of genes encoding for negative regulators of anabolic pathway as well as proteins involved in the ubiquitin-proteasome system unlike dexamethasone, which increases the expression of these genes. Thus, our results indicate that the expression of some GR target genes is regulated differentially depending on the type of analogs used. Thus, this study should allow to identify new drug targets and open new avenues to design potent screens aimed at the identification of drugs that improve DMD treatment.

More and more evidence suggests that the signaling pathways of androgens and GCs are interconnected. The results obtained in the laboratory showed that mice in which the androgen receptor (AR) is selectively ablated in mouse myofibres are protected from dexamethasone-induced atrophy, indicating that the AR is involved in the decrease of muscle mass induced by dexamethasone. During my thesis, we showed that the induction of some AR target genes upon testosterone treatment is abolished in mice $GR^{(i)skm-/-}$. In addition, we revealed that androgens induce not only the binding of AR, but also the binding of GR on response elements present in AR target genes. Conversely, GR binds to the GRE following treatment with GCs, but also following treatment with testosterone, and these compounds allow also binding of AR on these promoters. These results suggest that androgens and GCs receptors interact and occur simultaneously in the regulation of certain genes.

Two studies realized in collaboration with the team of Pr. Arnaud Ferry and Dr. Denis Furling in Institute of Myology in Paris have demonstrate that factors produced by the gonads contribute to the increase in muscle performance during postnatal development in males and females (Manuscript 2 under review), and clarified the role of myostatin, a growth factor involved in the regulation of muscle mass in muscle performance (Manuscript 3 under review, presented in appendix).

Finally, a study with the team of Pr. Bernard Geny and Pr. Jean Sibia from Civil Hospital in Strasbourg has clarified the molecular mechanisms of the inflammatory myopathies, characterized by muscle pain, muscle weakness during effort, or even a decrease in muscle strength. Our results highlight a mitochondrial dysfunction associated with the production of reactive oxygen species (ROS)

induced by interferon β and the potential treatment with antioxidants such as N-acetylcysteine (Manuscript 4 under review, presented in appendix).

Thus, this work has helped to clarify the mechanisms involved in the regulation of muscle mass and function, and open new perspectives in the treatment of pathologies such as muscle atrophy, cachexia, sarcopenia or myopathies.

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
I. Le muscle squelettique : structure et fonction	2
I.1 Organisation du muscle strié squelettique.....	2
I.1.1 ANATOMIE DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE	2
I.1.2 STRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE	2
I.1.2.1 Les myofibrilles.....	4
I.1.2.2 Les protéines de structure : cytosquelette non contractile	5
I.1.2.3 Les tubules T et le réticulum sarcoplasmique	6
I.1.3 HETEROGENEITE DU TISSU MUSCULAIRE : DIFFERENTS TYPES DE FIBRES.....	6
I.2 Fonction du muscle strié squelettique	7
I.2.1 PRODUCTION DE FORCE.....	7
I.2.1.1 La contraction musculaire : définition.....	7
I.2.1.2 Le mécanisme de contraction des fibres musculaires.....	8
I.2.2 PROPRIETES METABOLIQUES DU MUSCLE.....	9
I.2.2.1 Le métabolisme anaérobie	10
I.2.2.2 Le métabolisme aérobie	11
I.2.3 LE MUSCLE : UNE RESERVE DE SUBSTRATS.....	12
I.3 Deux propriétés essentielles du muscle : capacité régénérative et plasticité.....	13
I.3.1 REGENERATION VIA LES CELLULES SATELLITES	13
I.3.1.1 La dégénérescence	14
I.3.1.2 La régénération	14
I.3.2 REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE	14
I.3.2.1 Les effets de l'exercice	15
I.3.2.2 Les effets de l'âge	16
I.3.2.3 Les effets de la nutrition.....	17
I.3.2.4 Les effets de l'inflammation	17
I.4 Voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie musculaire	18
I.4.1 VOIE IGF-AKT-MTOR ET LE CONTROLE DE LA CROISSANCE MUSCULAIRE	18
I.4.1.1 Les facteurs de croissance IGF-I	18
I.4.1.2 La kinase AKT	19
I.4.1.3 La kinase mTOR	20
I.4.1.4 La kinase GS3K β	22
I.4.1.5 Les facteurs de transcription FoxO.....	22
I.4.2 SYSTEMES EFFECTEURS DE LA DEGRADATION DES PROTEINES	23
I.4.2.1 Les calpaïnes.....	24
I.4.2.2 Les caspases.....	25
I.4.2.3 Le système ubiquitine-protéasome.....	25
I.4.2.4 Le système autophagique-lysosomale	28
I.4.3 AUTRES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'HOMÉOSTASIE MUSCULAIRE	30

I.4.3.1	La voie myostatine.....	30
I.4.3.2	La voie des MAPK	32
I.4.3.3	La voie NF- κ B	34
I.4.3.4	Les cytokines pro-inflammatoires	36
I.4.3.5	Le stress oxydatif.....	36
I.4.3.6	La voie des récepteurs couplés aux protéines G	37
I.4.3.7	La voie AMPK.....	38
II.	Hormones stéroïdiennes dans la régulation de la masse musculaire	40
II.1	Glucocorticoïdes : action dans l'organisme	40
II.1.1	BIOSYNTHESE DES GLUCOCORTICOÏDES	40
II.1.1.1	L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	41
II.1.1.2	Régulation de la disponibilité en glucocorticoïdes.....	42
II.1.2	MODE D'ACTION DES GLUCOCORTICOÏDES	43
II.1.2.1	Les récepteurs intracellulaires aux glucocorticoïdes.....	43
II.1.2.2	Classification et organisation des récepteurs nucléaires	43
II.1.2.3	Le récepteur des glucocorticoïdes.....	44
II.1.2.4	Mécanismes d'action du récepteur aux glucocorticoïdes.....	46
II.1.2.5	Régulation de l'activité du récepteur aux glucocorticoïdes par des modifications post-traductionnelles	48
II.1.2.6	Corégulateurs du récepteurs aux glucocorticoïdes impliqués dans la transcription	49
II.1.2.7	Effets non-génomiques des glucocorticoïdes.....	51
II.1.3	EFFETS DES GLUCOCORTICOÏDES SUR LA MASSE MUSCULAIRE	51
II.1.3.1	L'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes.....	51
II.1.3.2	Action des glucocorticoïdes sur la synthèse protéique.....	52
II.1.3.3	Action des glucocorticoïdes sur la dégradation protéique	54
II.1.3.4	Mode d'action moléculaire des glucocorticoïdes dans le muscle squelettique.....	55
II.1.3.5	Interaction du récepteur aux glucocorticoïdes avec des protéines cytoplasmiques	58
II.1.3.6	Action non cellulaire autonome des glucocorticoïdes sur la structure et la fonction du muscle squelettique.	58
II.1.3.7	Glucocorticoïdes et myopathie de Duchenne	58
II.2	Les androgènes : action dans l'organisme	59
II.2.1	BIOSYNTHESE DES ANDROGENES ET MECANISMES D'ACTION	59
II.2.2	LES ANDROGENES DANS LA REGULATION DES FONCTIONS MUSCULAIRES	60
II.2.2.1	Effets bénéfiques des androgènes sur le muscle	60
II.2.2.2	Cellules cibles des androgènes dans le muscle	61
II.2.2.3	Action génomique des androgènes dans le muscle squelettique.....	62
II.2.2.4	Androgènes et les voies de signalisation dans le muscle	62
II.3	Interactions entre le récepteur aux glucocorticoïdes et le récepteur aux androgènes	63
II.4	Modèles murins.....	64
II.4.1	MODELES ANIMAUX D'INVALIDATION DU RECEPTEURS AUX GLUCOCORTICOÏDES	64
II.4.2	MODELES ANIMAUX D'INVALIDATION DU RECEPTEUR AUX ANDROGENES.	65

III. Objectifs de la thèse.....	66
RESULTATS.....	67
I. Le récepteur des glucocorticoïdes dans les myofibres contrôle l'expression d'un ensemble de gène résultant en une régulation dynamique de la voie anti-anabolique et catabolique dans les muscles de souris adultes.	68
I.1 Introduction	69
I.2 Results	70
I.3 Discussion	76
I.4 Materials and methods.....	82
I.5 Figure legends	86
I.6 Figures	89
II. Caractérisation des évènements moléculaires et cellulaires responsables de l'effet thérapeutique des glucocorticoïdes sur les fonctions musculaires des patients atteints de la myopathie de Duchenne	97
II.1 Introduction	97
II.2 Résultats	97
II.3 Discussion	102
II.4 Matériel et méthodes	105
III. IDENTIFICATION DES DETERMINANTS MOLECULAIRES DU DIALOGUE ENTRE HORMONES STEROÏDIENNES.....	108
III.1 Introduction	108
III.2 Résultats	108
III.3 Discussion	110
III.4 Matériel et méthodes	112
IV. Les facteurs reliés aux gonades induisent un gain de performance musculaire pendant la croissance post-natale chez les souris	114
IV.1 Introduction	116
IV.2 Results	117
IV.3 Discussion	121
IV.4 Conclusion.....	124
IV.5 Materials and methods.....	125
IV.6 Figure legends	128
IV.7 Figures	130

CONCLUSION GENERALE.....	137
REFERENCES.....	143
ANNEXES.....	178
I. L'effet de l'inactivation constitutive du gène de la myostatine sur le gain de performance musculaire lors de la croissance post-natale dans deux modèles murins. ...	179
II. Les dérivés réactifs de l'oxygène induits par l'ifn-β et les dommages mitochondriaux participent à la déficience musculaire et la maintenance de l'inflammation dans la dermatopolymyosite	209

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: ANATOMIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE ET STRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE.	3
FIGURE 2: STRUCTURE ET CONTRACTION DU SARCOMERE, L'UNITE FONCTIONNELLE DU MUSCLE.	4
FIGURE 3: ORGANISATION MOLECULAIRE DU SARCOMERE.	5
FIGURE 4: ETAPES DE LA CONTRACTION DES MUSCLES SQUELETTIQUES.	9
FIGURE 5: LA GLYCOLYSE ET DE LA GLYCOGENOLYSE.	11
FIGURE 6: METABOLISME ANAEROBIE ET AEROBIE DES GLUCIDES ET DES LIPIDES.	12
FIGURE 7: REGENERATION ET DE LA CROISSANCE MUSCULAIRE PAR LES CELLULES SATELLITES.	14
FIGURE 8: EFFETS DE L'EXERCICE, DE L'AGE, DE LA NUTRITION ET DE L'INFLAMMATION SUR LA MASSE MUSCULAIRE.	16
FIGURE 9: LA VOIE IGF-PI3K-AKT-FOXO DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE.	20
FIGURE 10: LES QUATRE SYSTEMES PROTEOLYTIQUES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE.	23
FIGURE 11: LE SYSTEME UBIQUITINE PROTEASOME.	26
FIGURE 12 : LE SYSTEME AUTOPHAGIQUE-LYSOSOMALE.	29
FIGURE 13: LA VOIE MYOSTATINE DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE.	30
FIGURE 14: LA VOIE BMP DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE.	32
FIGURE 15: LA VOIE MAPK DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE.	33
FIGURE 16: LA VOIE NF-KB DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE.	36
FIGURE 17: LA VOIE DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE.	38
FIGURE 18: LA VOIE AMPK DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE.	39
FIGURE 19: LES VOIES PRINCIPALES DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE.	40
FIGURE 20 : REGULATION NEUROENDOCRINIENNE DE LA SECRETION DES GC ET DE LEURS PRINCIPAUX ROLES PHYSIOLOGIQUES. ...	41
FIGURE 21 : SYNTHESE DES HORMONES STEROÏDIENNES A PARTIR DU CHOLESTEROL.	42
FIGURE 22: LOCALISATION GENOMIQUE ET ORGANISATION DE GR CHEZ L'HOMME.	44
FIGURE 23 : ORGANISATION STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE GR.	45
FIGURE 24 : LA VOIE D'ACTIVATION DE GR ET LES DIFFERENTES INTERACTIONS DE GR AVEC L'ADN.	47
FIGURE 25 : LES COREGULATEURS DE GR ET DE LEURS ROLES DANS LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION.	50
FIGURE 26 : EFFETS DES GC SUR LA VOIE DE SIGNALISATION IGF-AKT-PI3K.	54
FIGURE 27 : MECANISME CONDUISANT A L'ATROPHIE MUSCULAIRE INDUITE PAR LES GC.	57
FIGURE 28 : INTERACTION ENTRE LES ANDROGENES ET LES AUTRES VOIES DE SIGNALISATION DANS LE MUSCLE.	63
FIGURE 29 : ASPECT HISTOLOGIQUE DU MUSCLE GASTROCNEMIEN DE SOURIS MDX.	98
FIGURE 30 : ETUDE DE LA FORCE MUSCULAIRE DES SOURIS MDX.	98
FIGURE 31 : EFFET D'UN TRAITEMENT AIGU A LA DEXAMETHASONE ET A L' α -METHYLPREDNISOLONE SUR LES VOIES ANABOLIQUES ET CATABOLIQUES DANS LE MUSCLE GASTROCNEMIEN DE SOURIS CONTROLES ET MDX.	99
FIGURE 32 : EFFET D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE A LA DEXAMETHASONE ET DE L' α -METHYLPREDNISOLONE SUR LA FORCE MUSCULAIRE ET SUR LA STRUCTURE DU MUSCLE GASTROCNEMIEN DE SOURIS CONTROLES ET MDX.	100
FIGURE 33 : EFFET D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE A LA DEXAMETHASONE ET DE L' α -METHYLPREDNISOLONE SUR LES VOIES ANABOLIQUES ET CATABOLIQUES DANS LE MUSCLE GASTROCNEMIEN DE SOURIS CONTROLES ET MDX.	102
FIGURE 34: EFFETS D'UN TRAITEMENT A LA DHT SUR DES SOURIS GR ^{(i)SKM-/-}	109
FIGURE 35: EFFETS DES ANDROGENES SUR LE RECRUTEMENT D'AR ET DE GR SUR DES ARE ET GRE DANS LES MUSCLES SQUELETTIQUES DE SOURIS.	109
FIGURE 36: PROFIL DE LIAISON DE GR ET AR DANS DES REGIONS SPECIFIQUES DU GENOME RESPECTIVEMENT DANS LE MUSCLE GASTROCNEMIEN ET LA PROSTATE DE SOURIS.	110

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES, METABOLIQUES ET CONTRACTILES DES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES.....	7
TABLEAU 2 : SELECTION DE GENES REGULES PAR LES GC EN RELATION AVEC L'ATROPHIE MUSCULAIRE.	56
TABLEAU 3 : PRIMER TABLE.....	85
TABLEAU 4 : LISTE DES AMORCES UTILISEES POUR LE GENOTYPAGE ET LA PCR SEMI-QUANTITATIVE	107
TABLEAU 5 : LISTE DES AMORCES UTILISEES POUR LE GENOTYPAGE ET LA PCR SEMI-QUANTITATIVE	113

LISTE DES ABREVIATIONS

11 β HSD: 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase

4E-BP1: *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*

A

ABS: site de liaison aux androgènes

ADN: acide désoxyribonucléique

AF-1: fonction d'activation-1

Akt / PKB: protéine kinase B

AMPK: *adenosine monophosphate-activated protein kinase*

AP-1: *activator protein-1*

AR: récepteur aux androgènes

ARE: élément de réponse aux androgènes

ARN pol II: ARN polymérase II

ARNm: acide ribonucléique messenger

ARNt: acide ribonucléique de transfert

Atg: *autophagy related*

ATP: adénosine triphosphate

Atrogin-1/MAFbx: *muscle atrophy F-box*

B

BC: bulbo-caverneux

Bnip3: *BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein*

BMP: *bone morphogenetic protein*

C

C/EBP β : *CCAAT-enhancer-binding protein*

CoA: coactivateur

CoR: corepresseur

D

DBD: domaine de liaison à l'ADN

dex: dexaméthasone

DHT: dihydrotestostérone

E

eEF: facteur d'élongation eucaryotique

eIF: facteur d'initiation eucaryotique

ER: récepteur aux œstrogènes

eRF: facteur de terminaison eucaryotique

ERK: *extracellular signal-regulated kinase*

F

FBE: élément de réponse à FoxO

Fbxo: *F-box protein*

FoxO: *forkhead box protein O*

G

Gabarap1: *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*

GAP: *GTPase activating protein*

GBS : site de liaison aux GC

GC: glucocorticoïdes

Glut4: transporteur au glucose de type 4

GPCR: récepteurs couplés aux protéines G

GR: récepteur aux GC

GRE: élément de réponse aux GC

GSK3 β : *glycogen synthase kinase 3 β*

GTP: guanosine triphosphate

H

HDAC: histone désacétylase

HPA: axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien

HSP: Protéine de choc thermique

I

IGF-I: *insulin-like growth factor-I*

IGF-IR: récepteur à l'IGF-I

Ikb: inhibiteur de NF-κB

IKK: kinase Ikb

IL-6: interleukine-6

IRS: *insulin receptor substrate*

J

JNK: *c-Jun NH2-terminal kinase*

K

KLF15: *Krüppel-like factor 15*

L

LA : levator ani

LBD: domaine de liaison au ligand

LC3: *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

M

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MD : myopathie de Duchenne

MEF2: *myocyte enhancer factor-2*

MGRKO: Knockout de GR spécifiquement dans le muscle

MHC: chaîne lourde de myosine

miRNA : microARN

MR: récepteur aux minéralocorticoïdes

MRF: facteur de régulation myogénique

Mstn: myostatine

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

mTORC: complexe mTOR

MuRF1: *muscle ring finger 1*

MUSA1: *muscle ubiquitin ligase of SCF complexe in atrophy-1*

MyBP-C: *myosin binding protein C*

Myf5: facteur myogénique 5

MyoD1: différenciation myogénique 1

N

NF-κB: *nuclear factor-kappa B*

nGRE: élément de réponse négatif aux GC

NR: récepteur nucléaire

P

Pax7: *paired box7*

Pb: paires de base

Pdn: α-méthylprédnisolone

PGC1α: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α*

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase

R

Redd1: *regulated in development and DNA damage response 1*

ROS: dérivés réactifs de l'oxygène

RyR1: récepteur à la ryanodine

S

S6K1: kinase S6 beta-1

SIDA: syndrome de l'immunodéficience acquise

SIRT1: *silent mating type information regulation 2 homolog 1*

STAT: *signal transducers and activators of transcription*

T

TGF: *transforming growth factor*

TNF α : *tumor necrosis factor α*

TSC1/2: *tuberous sclerosis 1/2*

TSS : site d'initiation de la transcription

TRIM: *tripartite motif-containing*

U

UPS: système ubiquitine protéasome

INTRODUCTION

I. LE MUSCLE SQUELETTIQUE : STRUCTURE ET FONCTION

Le tissu musculaire est un des tissus les plus abondants chez les mammifères. Les muscles peuvent être classés en trois types de muscles, suivant leurs caractéristiques fonctionnelles et anatomiques : les muscles lisses, le muscle strié cardiaque et les muscles striés squelettiques.

Les muscles striés squelettiques, sujet central de notre étude, représentent en moyenne 40 % du poids corporel humain total. Grâce à la transformation de l'énergie chimique en énergie mécanique, les muscles striés squelettiques permettent le déplacement, le maintien de la stature, la thermorégulation et jouent un rôle métabolique important.

I.1 ORGANISATION DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

I.1.1 ANATOMIE DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

L'architecture du muscle squelettique est caractérisée par un arrangement en faisceaux de fibres musculaires, appelées également myofibrilles ou cellules musculaires. La taille du muscle est déterminée par le nombre et la taille des fibres musculaires. Plusieurs couches de tissus conjonctifs séparent et protègent les composants des muscles squelettiques. Chaque fibre est entourée par l'endomysium, composé essentiellement de fibroblastes et de vaisseaux sanguins, et sont regroupées en faisceau de 10 à 100 fibres, entourés par le périmysium. L'ensemble de ces faisceaux de fibres forment le muscle qui est recouvert d'un tissu conjonctif, l'épimysium. Les prolongements des nerfs gagnent le périmysium pour former les jonctions neuromusculaires. Les vaisseaux sanguins assurent la vascularisation du muscle grâce aux capillaires qui gagnent l'endomysium. Les cellules satellites sont situées entre la membrane plasmique et la lame basale, à la périphérie des fibres musculaires. Enfin, des cellules, telles que les adipocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules du système immunitaire, participent à l'organisation et à l'intégrité de ce tissu (Figure 1) (Frontera and Ochala, 2015; Light and Champion, 1984).

I.1.2 STRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE

La fibre musculaire est l'unité cellulaire élémentaire du muscle. C'est une cellule différenciée, cylindrique et plurinucléée. Une fibre musculaire mesure entre 10 et 100 μm de diamètre et peut atteindre plusieurs centimètres de long. Chaque fibre musculaire est entourée, comme toute cellule, d'une membrane plasmique (appelée sarcolemme), qui abrite le sarcoplasme contenant les noyaux cellulaires situés à la périphérie de la cellule, les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique, ainsi que les myofibrilles (Figure 1) (Frontera and Ochala, 2015; Tortora, 2014).

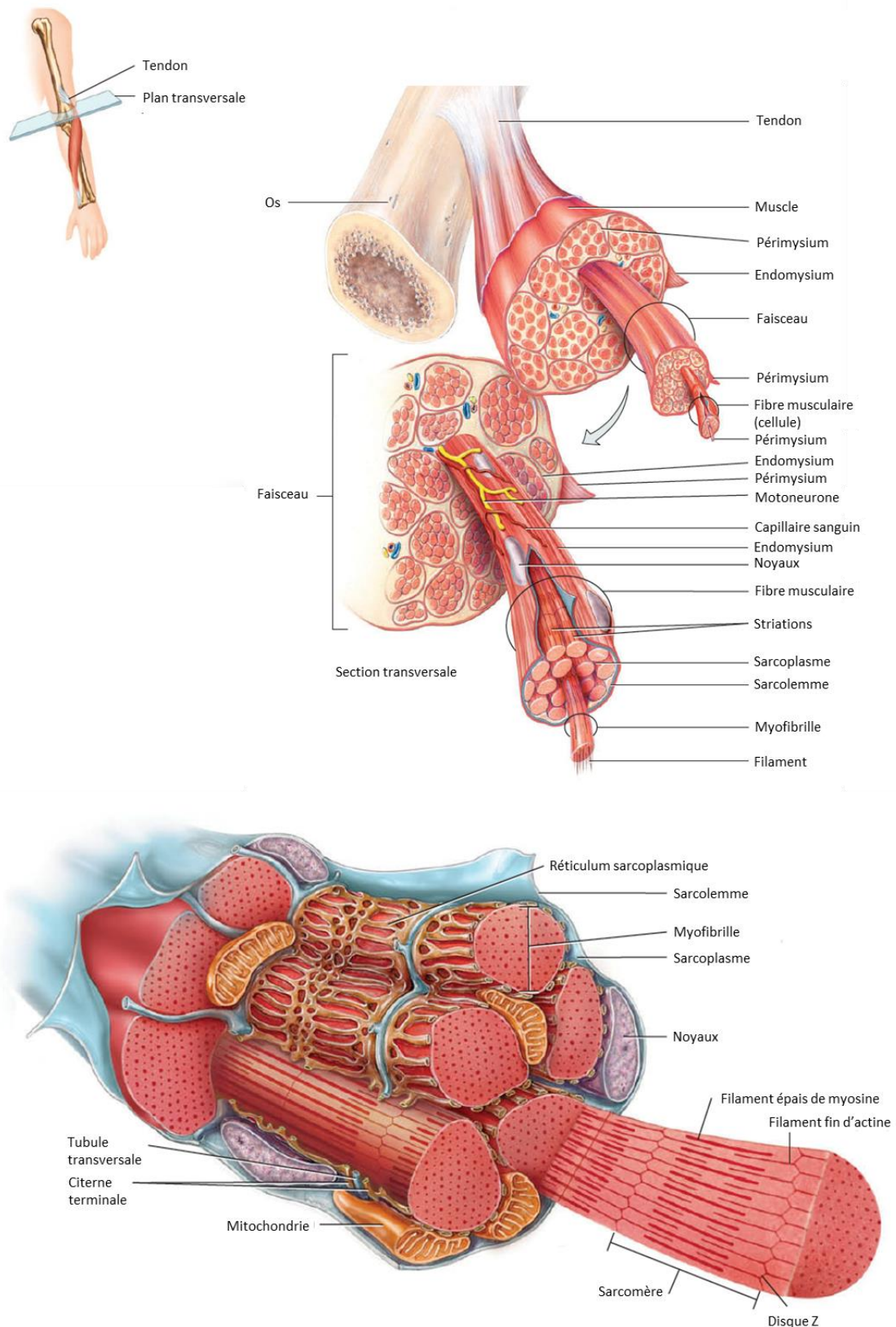


Figure 1: Anatomie du muscle squelettique et structure de la fibre musculaire.

Chaque muscle est rattaché sur l'os par l'intermédiaire de tendons. Un muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires. Chaque fibre musculaire a une forme cylindrique et contient de nombreuses myofibrilles constituant les éléments contractiles. Les sarcomères se caractérisent par l'association de filaments protéiques fins (actine) et épais (myosine). D'après (Tortora, 2014).

1.1.2.1 Les myofibrilles

Les myofibrilles sont les éléments contractiles de la fibre musculaire. Elles occupent 80 % du volume cellulaire, ont un diamètre d'environ 1-2 μm , et peuvent s'étendre sur toute la longueur de la fibre musculaire. Les myofibrilles ont une apparence striée due à l'alternance de bandes I claires, A sombres et de disques Z très foncées séparant en deux les bandes I. L'unité structurale, appelée sarcomère, est comprise entre deux disques Z (**Figure 1 et Figure 2**). Les sarcomères sont composés de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine. Ces deux filaments sont capables de glisser les uns sur les autres permettant de changer la conformation du sarcomère : relâché ou contracté (**Figure 2 et Figure 3**) (Frontera and Ochala, 2015; Tortora, 2014).

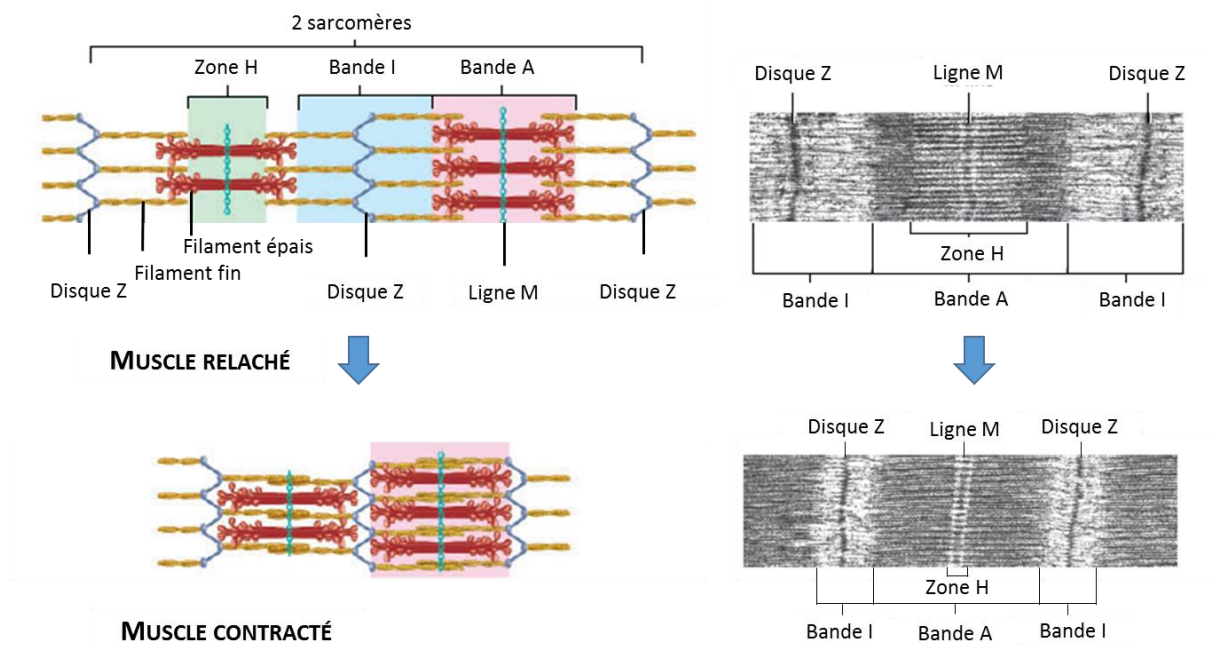


Figure 2: Structure et contraction du sarcomère, l'unité fonctionnelle du muscle.

Lors de la contraction, les filaments fins se déplacent vers la ligne M de chaque sarcomère. D'après (Tortora, 2014).

La bande I comprend les filaments d'actine, ancrés au niveau du disque Z, qui s'étendent jusqu'au centre du sarcomère A où ils se lient aux filaments de myosine (**Figure 2 et Figure 3**). Les filaments d'actine sont composés de monomères d'actine (actine G) qui polymérisent pour former des chaînes linéaires d'actine F s'enroulant par paires en double hélice. Les filaments d'actine sont associés aux tropomyosines, qui masquent les domaines de fixation à la myosine et aux troponines (**Figure 3**). Ces dernières sont composées de trois sous-unités : une qui se lie à l'actine, une autre à la tropomyosine et une dernière qui fixe le calcium nécessaire pour la contraction musculaire. Parmi les nombreuses autres molécules associées aux filaments d'actine, la tropomoduline se fixe et stabilise l'extrémité libre des filaments fins. L' α -actinine et la desmine permettent de relier l'extrémité des filaments fins de chaque sarcomère entre eux et de les relier aux filaments fins du sarcomère adjacent (Gordon et al., 2000; Tortora, 2014).

La bande A comprend les molécules de myosine (**Figure 2 et Figure 3**). Celles-ci sont composées de deux chaînes lourdes, enroulées en double hélice, et de quatre chaînes légères qui stabilisent l'hélice près du domaine N-terminal. La tête, constituée de l'extrémité N-terminale de la chaîne lourde et des chaînes légères, interagit avec l'actine. L'extrémité C-terminale des chaînes lourdes s'ancre au niveau

de la ligne M. Chez les mammifères, il existe quatre isoformes de chaînes lourdes de la myosine (MHC), MHC I, MHC IIa, MHC IIx ou MHC IIb, dont l'expression varie suivant le type de muscle (Craig and Woodhead, 2006; Gundersen, 2011). Les différents types de fibres seront détaillés dans la partie I.1.3.

Au sein des myofibrilles, de nombreuses autres protéines sont nécessaires au maintien de la structure fibrillaire et de la fonction contractile, notamment la titine et la nébuline. La titine s'étend du disque Z à la ligne M (**Figure 3**). Grâce à ses propriétés intrinsèques d'élasticité, la titine oppose une résistance à l'étirement excessif du sarcomère et participe également au maintien de l'alignement des filaments fins et épais. La titine est reliée à l'actine par l'intermédiaire de l' α -actinine au niveau du disque Z. Elle est également reliée à la myosine par l'intermédiaire de la myomesine et de la protéine M au niveau de la ligne M, et par interaction directe ou via les « myosin binding protein C » (MyBP-C) le long des filaments épais (**Figure 3**) (Monroy et al., 2012; Ottenheijm and Granzier, 2010b).

La nébuline se fixe au niveau du disque Z et s'étend jusqu'à l'extrémité des filaments d'actine (**Figure 3**). Elle joue un rôle de matrice pour la mise en place de la bande I et est aussi impliquée dans la transduction de signaux, la régulation de la contraction et la transmission de la force. La nébuline est capable de lier la myosine, l'actine et la calmoduline (McElhinny et al., 2003; Ottenheijm and Granzier, 2010a).

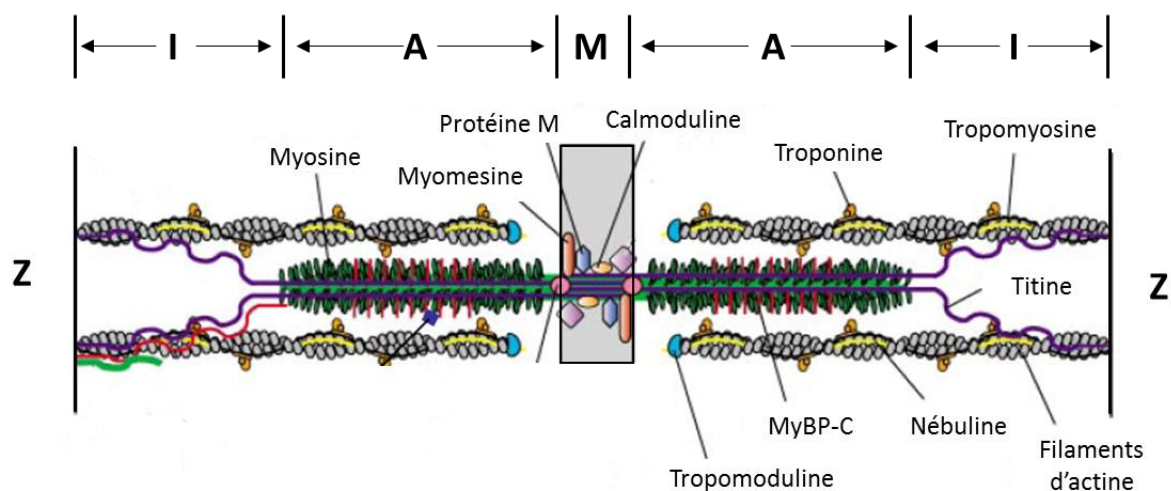


Figure 3: Organisation moléculaire du sarcomère.

Les filaments fins, composés d'actine, de tropomyosine, de troponines et de nébuline interagissent avec les filaments épais. Les filaments épais, composés de myosine, interagissent avec la titine grâce à la myomesine, MyBP-C et la protéine M. D'après (Clark et al., 2002).

Les fibres musculaires contiennent d'autres éléments importants à l'intégrité mécanique du muscle tels que le cytosquelette, le réseau de tubules transverses, le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries. Les mitochondries forment un réseau tridimensionnel à travers la cellule et génèrent l'énergie nécessaire pour le muscle lorsque l'oxygène est disponible (**Figure 1**).

I.1.2.2 Les protéines de structure : cytosquelette non contractile

Le muscle squelettique possède un cytosquelette cellulaire adapté à sa fonction de générateur et de transmetteur de force mécanique. Le cytosquelette non contractile peut être divisé en trois groupes : (i) le cytosquelette endosarcomérique, (ii) le cytosquelette exosarcomérique, qui permettent de

maintenir l'architecture des myofibrilles et de relier les myofibrilles adjacentes entre elles, et (iii) le cytosquelette sous-sarcolemmal, qui connecte l'appareil contractile au sarcolemme et de façon indirecte relie le cytosquelette à la matrice extracellulaire. Le cytosquelette sous-sarcolemmal va permettre la transmission de la force mécanique de l'intérieur vers l'extérieur de la fibre musculaire. Cette fonction est assurée par deux complexes multi-protéiques : les costamères et les jonctions myotendineuses, qui sont composés de trois réseaux distincts mais liés: le système intégrine, le complexe dystroglycane et le système spectrine (Clark et al., 2002; Tidball, 1991).

I.1.2.3 Les tubules T et le réticulum sarcoplasmique

Le réseau de tubules transverses, appelés tubules T, provient de l'invagination du sarcolemme (**Figure 1**). Il est responsable de la conduction des impulsions électriques délivrées par la plaque motrice de la surface de la fibre vers l'intérieur de la cellule musculaire. Le réticulum sarcoplasmique est un compartiment spécialisé dans le stockage et la libération du calcium. Le calcium est stocké dans des citernes terminales localisées à l'extrémité du réticulum sarcoplasmique. L'association de deux citernes terminales adjacentes avec un tubule T forme une structure caractéristique appelée triade (**Figure 1**) (Kerr et al., 2014).

I.1.3 HETEROGENEITE DU TISSU MUSCULAIRE : DIFFERENTS TYPES DE FIBRES

L'hétérogénéité du muscle squelettique est illustrée par les variabilités biochimiques, mécaniques, et métaboliques des fibres. Les fibres musculaires peuvent être classées selon différents critères incluant (i) la couleur (rouge ou blanche) qui corrèle avec la teneur en myoglobine, (ii) leurs propriétés contractiles suite à une stimulation électrique, (iii) la vitesse de contraction, (iv) le degré de fatigabilité pendant une activation prolongée, (v) leur propriété métabolique (oxydative ou glycolytique), (vi) leur activité enzymatique basée sur des colorations histochimiques, (vii) la capacité du réticulum sarcoplasmique à stocker le calcium, et (viii) l'expression des isoformes de MHC (Schiaffino and Reggiani, 2011).

Classiquement, les fibres musculaires des mammifères sont classées en quatre groupes: I, IIA, IIX et IIB (**Tableau 1**):

- Les fibres de type I sont des fibres lentes avec un métabolisme oxydatif permettant une résistance élevée à la fatigue, des contractions lentes et continues. Les capillaires, les myoglobines et les mitochondries, tous nécessaires à l'apport et l'utilisation de l'oxygène, sont abondamment représentés.
- Les fibres de type IIA sont des fibres intermédiaires avec un métabolisme oxydatif à contraction rapide et résistantes à la fatigue. Elles contiennent beaucoup de capillaires, de myoglobines et de mitochondries, mais se différencient des fibres de type I par la prépondérance de myosine à contraction rapide.
- Les fibres de type IIX sont des fibres oxydo-glycolitiques à contraction rapide et peu résistantes à la fatigue. Elles contiennent moins de capillaires et de mitochondries que les fibres de type IIA.
- Les fibres de type IIB sont des fibres glycolytiques à contraction rapide et sensibles à la fatigue. Elles contiennent peu de capillaires, de myoglobines et de mitochondries, mais possèdent en contrepartie une haute teneur en glycogène, forme de réserve glucidique.

Type de fibres	I	IIA	IIX	IIB
Contraction	Lente	Rapide		
MHC	I	Ila	Ilx	Ilb
Activité adénosine triphosphatase (ATPase)	Faible	Forte		
Métabolisme	Oxydatif	Oxydo-glycolytique		Glycolytique
Résistance à la fatigue	+++	++	+	+
Nombre de mitochondries	+++	++	+	+

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

Les muscles sont constitués de l'association de deux ou trois types de fibres. Le type de fibre prédominant confère alors les caractéristiques essentielles du muscle, reflétant l'adaptation aux différentes activités imposées au muscle. Lors de la contraction, les fibres sont recrutées préférentiellement en fonction du stimulus reçu. Un effort léger active essentiellement les fibres de type I, ce qui va permettre des contractions continues de faibles intensités (ex. maintien de la posture). Un effort soutenu nécessite l'intervention des fibres de type IIA, ce qui permet des contractions répétées d'intensité moyenne (ex. respiration, locomotion). En revanche, une activité musculaire plus intense sollicite les fibres de types IIB, ce qui génère des contractions rapides et d'intensité maximale (ex. saut, coup de pied) (Galpin et al., 2012).

La capacité d'adaptation des muscles squelettiques vient de la capacité des fibres musculaires à changer de types fibrillaires (Gundersen, 2011). La conversion des fibres suit généralement un ordre séquentiel I ↔ IIA ↔ IIX ↔ IIB, qui s'effectue sous l'influence de facteurs tels que l'activité motoneuronale, l'exercice physique, l'âge ou le régime alimentaire (Andersen, 2003; Pette and Staron, 2000).

I.2 FONCTION DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

Le muscle squelettique intervient dans deux fonctions physiologiques essentielles : (i) la production de force qui se traduit par la génération de mouvement et (ii) le contrôle du métabolisme en permettant le maintien de l'homéostasie glucidique et formant la principale réserve d'acides aminés.

I.2.1 PRODUCTION DE FORCE

I.2.1.1 La contraction musculaire : définition

L'activation du muscle dépend des conditions mécaniques dans lesquelles le muscle est placé. Le muscle adapte sa longueur en fonction des forces externes auxquelles il est soumis, résultant de cycles de raccourcissement/élongation des myofibrilles. Il existe trois types de contraction :

- Contraction statique, également appelée isométrique : caractérisée par la génération de la force en absence de mouvement des articulations ou des membres (ex. maintien de la posture). La tension interne et la force externe sont d'intensités égales, conduisant à un développement de force à longueur constante.

- Contraction dynamique concentrique également appelée isotonique : cette contraction résulte en un raccourcissement d'un muscle puisque l'origine et l'insertion du muscle se rapproche (ex. plier un coude). La force interne développée par le muscle est supérieure à la force externe.

- Contraction dynamique excentrique : cette contraction résulte en un allongement du muscle puisque l'origine et l'insertion du muscle s'éloignent (ex. déposer une charge à partir d'une position pliée du coude). La force exercée sur le muscle est supérieure à la tension musculaire maximale (Frontera and Ochala, 2015).

1.2.1.2 Le mécanisme de contraction des fibres musculaires

La contraction musculaire fait intervenir les motoneurones. Les motoneurones possèdent un axone qui se divise en plusieurs branches et forme la plaque motrice terminale ou jonction neuromusculaire. L'ensemble des fibres innervées par un même motoneurone forme une unité motrice. Bien qu'elles ne soient pas forcément proches les unes des autres, toutes les fibres d'une même unité motrice appartiennent au même type de fibre musculaire et fonctionnent simultanément (Wakeling et al., 2002).

La contraction d'une cellule musculaire s'effectue en quatre phases: (i) l'excitation (ou stimulation) correspond à l'arrivée du message nerveux sur la fibre musculaire, (ii) le couplage excitation-contraction regroupe l'ensemble des phénomènes biologiques permettant de transformer le signal nerveux en un signal intracellulaire transmis aux myofibrilles, (iii) la contraction représente la réponse de la cellule et se traduit par la génération d'une tension, et (iv) la relaxation correspond à la phase de retour à l'état de repos musculaire (**Figure 4**).

L'arrivée d'un potentiel d'action dans la terminaison axonale d'un motoneurone est l'évènement déclenchant de la contraction musculaire. En effet, l'acétylcholine est libérée et diffusée dans la fente synaptique. Elle se lie aux récepteurs de l'acétylcholine localisés sur la membrane musculaire, entraînant sa dépolarisation locale. Le potentiel d'action se propage le long du sarcolemme et pénètre dans les tubules transverses. Ce potentiel d'action entraîne alors l'ouverture des canaux sodiques et calciques voltages dépendants, permettant un influx de calcium extracellulaire (**Figure 4**).

D'autre part, la vague de dépolarisation est transmise au réticulum sarcoplasmique au niveau des triades. En association avec l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, cette dépolarisation entraîne la libération de calcium par la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique dans le cytosol. Le relargage des ions calcium (Ca^{2+}) dans le sarcoplasme est contrôlé par les récepteurs dihydropyridine (DHPR), qui permettent l'ouverture des canaux calciques formés par les récepteurs à la ryanodine (RyR1). Les ions Ca^{2+} entraînent, par liaison directe, un changement conformationnel de la troponine C. Ce changement de configuration tridimensionnelle pousse la tropomyosine à libérer les sites de liaison de l'actine destinée à la fixation des têtes de myosine. Les têtes de myosine s'attachent à ces sites de liaison et leurs mouvements sur les filaments fins permettent le glissement relatif des filaments d'actine et de myosine. Le raccourcissement du sarcomère est ainsi à l'origine de la contraction musculaire, et donc de la génération de force. Des cycles successifs d'attachements, de mouvements latéraux et de séparations des deux types de filaments se succèdent jusqu'à épuisement des réserves en calcium intra-sarcoplasmique. Ces cycles sont également dépendants de l'état énergétique puisque l'adénosine triphosphate (ATP) fournit l'énergie nécessaire au glissement des myofilaments (théorie de Hugh Huxley) (Gundersen, 2011; Huxley, 1969).

Lorsque le potentiel d'action a disparu, les ions Ca^{2+} se dissocient de la troponine, des pompes à calcium du réticulum endo/sarcoplasmique (SERCA) recapturent le calcium sarcoplasmique, qui est alors pris en charge par la calsequestrine dans la lumière du réticulum sarcoplasmique afin de réguler la concentration en calcium. La tropomyosine masque à nouveau les sites de liaison de l'actine. La contraction musculaire prend fin et la fibre musculaire se relâche (Figure 4) (Rossi and Dirksen, 2006; Tortora, 2014).

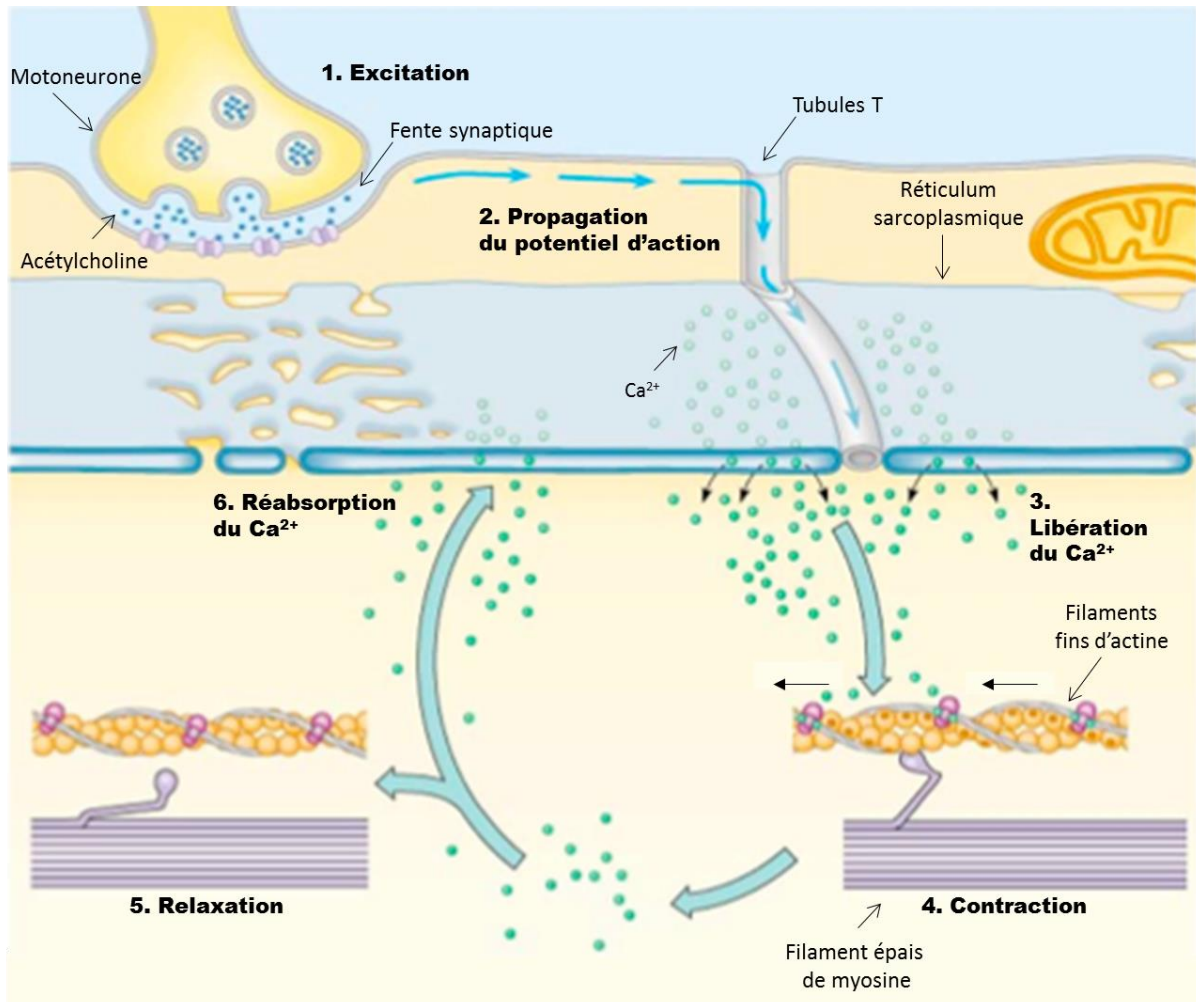


Figure 4: Etapes de la contraction des muscles squelettiques.

Le potentiel d'action musculaire se propage le long du tubule T ce qui libère les ions calcium (Ca^{2+}) à partir du réticulum sarcoplasmique permettant la contraction. Lors de la relaxation, les ions Ca^{2+} sont réabsorbés dans le réticulum sarcoplasmique. D'après (Campbell, 2004).

1.2.2 PROPRIETES METABOLIQUES DU MUSCLE

Le muscle squelettique, comme tout organe, a besoin d'énergie pour fonctionner. Les muscles métabolisent différents substrats afin d'assurer la formation d'ATP, unité énergétique nécessaire à leur fonctionnement. Les sources d'énergie utilisées par le muscle squelettique vont dépendre du type, de l'intensité et de la durée de l'effort musculaire ainsi que de la composition en fibres du muscle sollicité. Trois grands systèmes peuvent générer de l'énergie : (i) le métabolisme anaérobie alactique, (ii) le métabolisme anaérobie lactique et (iii) le métabolisme aérobie.

Le système anaérobique est utilisé pour des efforts courts et d'intensité haute ou modérée, qui nécessite une production d'ATP rapide. Au contraire, le système aérobie est utilisé pour des efforts de longue durée d'intensité faible ou modérée (Guzun and Saks, 2010; Howald, 1974; Schiaffino and Reggiani, 2011).

1.2.2.1 Le métabolisme anaérobique

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

Le métabolisme d'anaérobie alactique utilise directement l'ATP disponible en plus de celui formé par la créatine kinase. Cependant cette énergie est disponible pendant une durée limitée. La créatine circulante est absorbée par le muscle où elle sera phosphorylée par la créatine kinase dans la mitochondrie. Au repos, 80 % de la créatine est présente sous forme phosphorylée. En cas de besoin, elle peut être facilement convertie en ATP par la créatine kinase dans le sarcoplasme (**Figure 6**). (Soderlund and Hultman, 1991).

Le muscle des mammifères est le principal site de stockage du glucose sous forme de glycogène. La contenance en glycogène diffère suivant le type de fibre musculaire. L'absorption du glucose sanguin est médié par le transporteur au glucose de type 4 (Glut4) suite à la libération d'insuline en situation d'hyperglycémie. Le récepteur Glut4 est transloqué à la membrane à l'aide de vésicules intracytoplasmiques. La fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique expose Glut4 au glucose circulant, favorisant son absorption. Une fois dans le muscle, le glucose est métabolisé par l'hexokinase en glucose-6-phosphate. Le glucose-6-phosphate est soit dégradé via la glycolyse afin de former de l'ATP et du pyruvate, soit converti en glucose-1-phosphate, ensuite métabolisé pour la synthèse du glycogène (**Figure 5**). Lors d'un exercice court et intense, la glycogénolyse (dégradation du glycogène en glucose) permet un apport supplémentaire en glucose (**Figure 5**). En condition anaérobique, le pyruvate est transformé en acide lactique. Il s'accumule alors dans la cellule conduisant, à l'acidification de la fibre musculaire et limite la quantité d'énergie disponible pour le muscle (**Figure 5 et Figure 6**) (Tremblay et al., 2003).

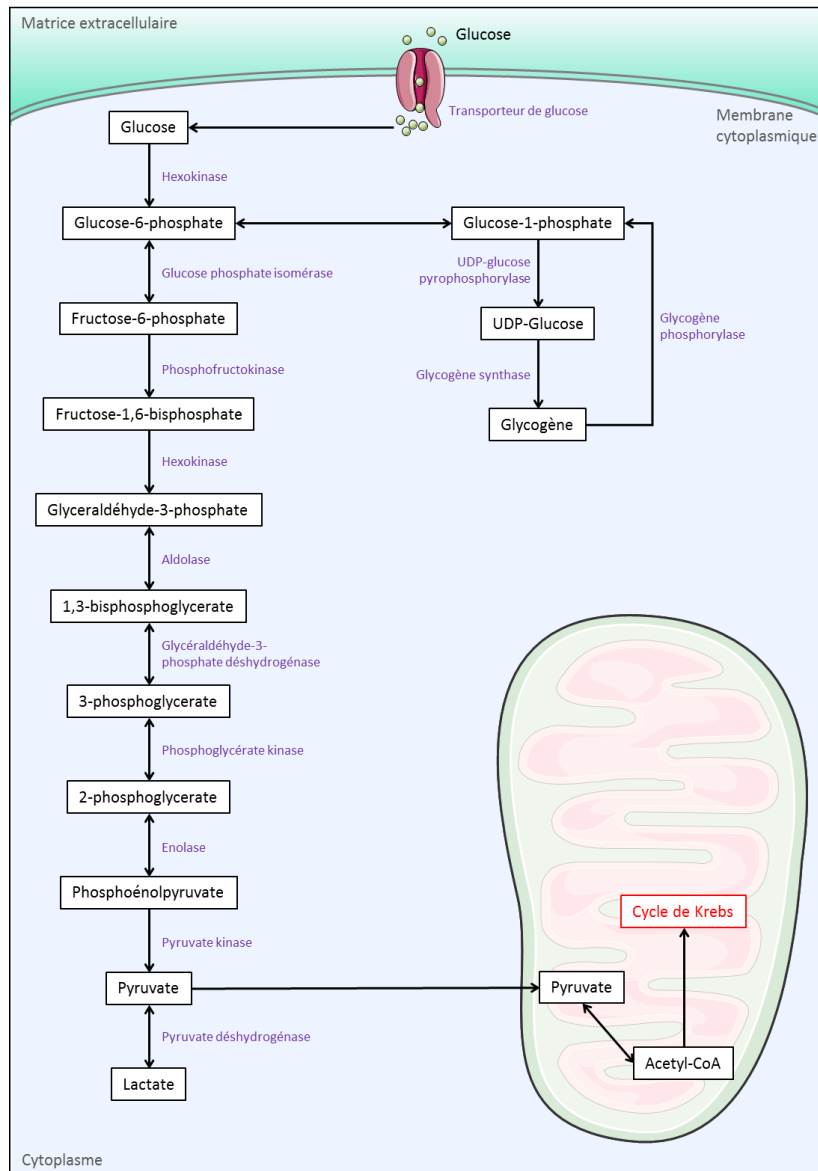


Figure 5: La glycolyse et de la glycogénolyse.

La voie de la glycolyse correspond à une série de réactions catalysées par des enzymes qui dégradent une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate permettant de régénération d'ATP sans présence d'oxygène. Le pyruvate peut soit être métabolisé en lactate par fermentation en condition anaérobie, soit entré dans le cycle de Krebs en condition aérobie. La glycogénolyse est la production de glucose à partir de glycogène. A l'inverse, la glycogénogenèse est la voie métabolique qui permet la synthèse de glycogène à partir du glucose. D'après (Campbell, 2004).

1.2.2.2 Le métabolisme aérobie

En condition aérobie, le pyruvate issu de la glycolyse entre dans la mitochondrie et sera decarboxylé sous l'action de la pyruvate déshydrogénase pour aboutir à la formation d'acétyl coenzymeA, point d'entrée des acides gras et acides aminés dans le cycle de Krebs (Figure 6).

Le muscle squelettique est le site principal d'oxydation des acides gras, provenant soit du stock de triglycérides intracellulaires soit du flux sanguin. Les acides gras sont stockés dans les tissus adipeux sous forme de triglycérides. Si les besoins énergétiques augmentent, les triglycérides sont hydrolysés

par la lipolyse. Ils sont ensuite transportés par voie sanguine jusqu'au muscle et traversent le sarcolemme grâce à des transporteurs tels que la translocase d'acides gras (FAT/CD36). Les acides gras libres forment un complexe avec l'acyl-coenzymeA, ce qui permet leur entrée dans la mitochondrie grâce à la carnitine transférase. La β -oxydation permet l'oxydation des acides gras, la formation d'acétyl-coenzymeA et de coenzymes réduits tels que la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et la flavine adénine dinucléotide ($FADH_2$). Les acétyl-coenzymeA entrent dans le cycle de Krebs, fournissent d'autres coenzymes réduits, et ces derniers seront utilisés dans la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale. La phosphorylation oxydative permet la synthèse d'ATP grâce à une cascade de réactions d'oxydoréduction qui transfère les électrons en provenance des coenzymes jusqu'à l'accepteur final, le dioxygène (Figure 6) (Jeukendrup, 2002).

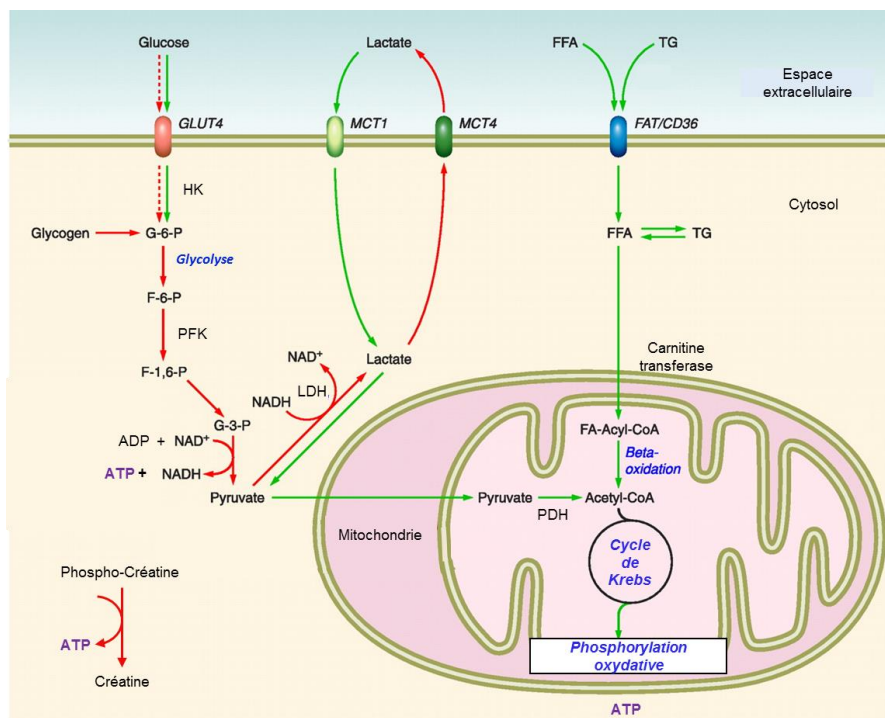


Figure 6: Métabolisme anaérobie et aérobie des glucides et des lipides.

Le métabolisme anaérobie (rouge) permet la dégradation via la glycolyse du glucose en pyruvate qui sera transformé en lactate, ainsi que l'hydrolyse de la créatine. Le métabolisme aérobie utilise les acides gras et le pyruvate issu de la glycolyse pour produire de l'énergie via la phosphorylation oxydative. GLUT4: transporteur au glucose 4; F-6-P: fructose-6-phosphate; FAT/CD36: translocase d'acides gras; FFA: acides gras libres; F-1,6-P: fructose-1,6-bisphosphate; G-3-P: glycéraldéhyde-3-phosphate; G-6-P: glucose-6-phosphate; HK: hexokinase; LDH: lactate déshydrogénase; MCT1: monocarboxylate transporteur 1; MCT4: monocarboxylate transporteur 4; PDH: pyruvate déshydrogénase; PFK: phosphofructokinase; TG: triglycérides. D'après (Schiaffino and Reggiani, 2011).

1.2.3 LE MUSCLE : UNE RESERVE DE SUBSTRATS

Le muscle est un organe de stockage énergétique essentiel. Il est considéré comme la principale réserve d'acides aminés de l'organisme. Lorsque les besoins énergétiques sont trop importants et les niveaux de glucose insuffisants, les muscles squelettiques sont capables de dégrader les protéines musculaires stockées. Ils vont libérer dans la circulation sanguine une grande quantité d'acides aminés, redistribués aux tissus vitaux. Les acides aminés ne vont pas seulement servir de précurseurs pour la

synthèse protéique mais vont également permettre le maintien de la glycémie par le biais de la néoglucogénèse hépatique, c'est-à-dire la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques. Ces mécanismes vont permettre le bon fonctionnement des organes vitaux tel que le cerveau et le cœur en condition de stress (ex. la mise à jeun) (Miller, 2007; Wolfe, 2006).

Le muscle sert également de réserve en hydrate de carbone, stockée essentiellement sous forme de glycogène et utilisés *in situ* (Adeva-Andany et al., 2016), et de réserve lipidique stockée sous forme de vacuoles lipidiques intercalées entre les fibres musculaires (Saltiel, 2016).

I.3 DEUX PROPRIETES ESSENTIELLES DU MUSCLE : CAPACITE REGENERATIVE ET PLASTICITE

Le muscle est un organe dynamique qui est capable d'ajuster sa taille en fonction de nombreux signaux extérieurs, tels que la charge mécanique, la stimulation nerveuse, des hormones, des facteurs de croissance, le stress et l'état nutritionnel. Afin de maintenir son intégrité et de s'adapter aux variations des conditions physiologiques, le muscle possède deux propriétés essentielles : la régénération et la régulation de la masse musculaire. Lors de la croissance musculaire ou en cas de lésion, le muscle est capable d'augmenter sa taille et de se régénérer grâce aux cellules satellites. D'autre part, le muscle peut réguler positivement ou négativement sa masse en fonction des situations physiologiques (âge, nutrition, exercice, environnement) ou pathologiques [cancer, anorexie, immobilisation, syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), maladie auto-immune].

I.3.1 REGENERATION VIA LES CELLULES SATELLITES

Les cellules satellites, cellules souches musculaires pluripotentes, sont considérées comme les éléments majeurs de la régénération musculaire et contribuent à la croissance des fibres musculaires post-natales. Les cellules satellites quiescentes représentent environ 5 % des noyaux présents dans une fibre musculaire, et expriment des marqueurs caractéristiques, tels que le facteur de transcription « paired box 7 » (Pax7). Une fois activés, des marqueurs appartenant à la famille de facteurs de régulation myogénique (MRF) incluant MRF4, la myogénine, le facteur de différenciation myogénique 1 (MyoD1) et le facteur myogénique 5 (Myf5) sont exprimés à différents moments de la différenciation myogénique (Almeida et al., 2016). L'auto-renouvellement des cellules satellites est indispensable pour maintenir la capacité régénérative du muscle. L'auto-renouvellement résulte d'une division asymétrique générant deux cellules sœurs, une destinée à la prolifération et éventuellement à la différenciation et une deuxième qui garde les caractéristiques d'une cellule souche (**Figure 7**) (Shinin et al., 2006; Troy et al., 2012).

En cas de lésion, provenant à la suite d'un étirement excessif, d'une exposition à des températures extrêmes ou à des agents myotoxiques, d'un traumatisme tranchant ou lors de pathologies telles que les myopathies, le processus de réparation se déroule en deux phases : la dégénérescence et la régénération.

I.3.1.1 La dégénérescence

Bien que les processus de réparation soient similaires après différents dommages, la cinétique et l'amplitude de chacune des deux phases dépend du type de dommage. Initialement, les myofibres subissent une nécrose caractérisée par la disruption du sarcolemme, une augmentation de la perméabilité et une augmentation plasmatique de protéines musculaires comme la créatine kinase ou des marqueurs de dommage de l'appareil contractile, les MHC et la troponine. La zone lésée est rapidement envahie par de nombreuses cellules inflammatoires, qui éliminent par phagocytose les débris cellulaires et les structures endommagées (Bossola et al., 2016; van de Vyver and Myburgh, 2012).

I.3.1.2 La régénération

Les cellules satellites sont à l'origine de la phase de régénération. Elles sont activées et commencent à proliférer suite à l'arrivée de signaux provenant des fibres endommagées ou des cellules inflammatoires (Jacobs et al., 1995; Saini et al., 2016). La morphologie des cellules est alors modifiée. Elles prolifèrent sous le contrôle de deux facteurs de transcription myogéniques MyoD1 et Myf5 pour former des myoblastes, qui sont des cellules en prolifération. Ces derniers s'alignent puis fusionnent avec les fibres endommagées ou existantes pour former des myotubes multinucléés. Les myotubes deviennent après maturation, les fibres musculaires fonctionnelles, remplaçant les fibres nécrotiques (Figure 7). Ces fibres nouvellement formées ont une forte synthèse protéique et expriment des isoformes embryonnaires et néonatales de certaines protéines structurales, telles que les chaînes lourdes de myosine (Bossola et al., 2016; Salvatore et al., 2014; Whalen et al., 1990; Yin et al., 2013).

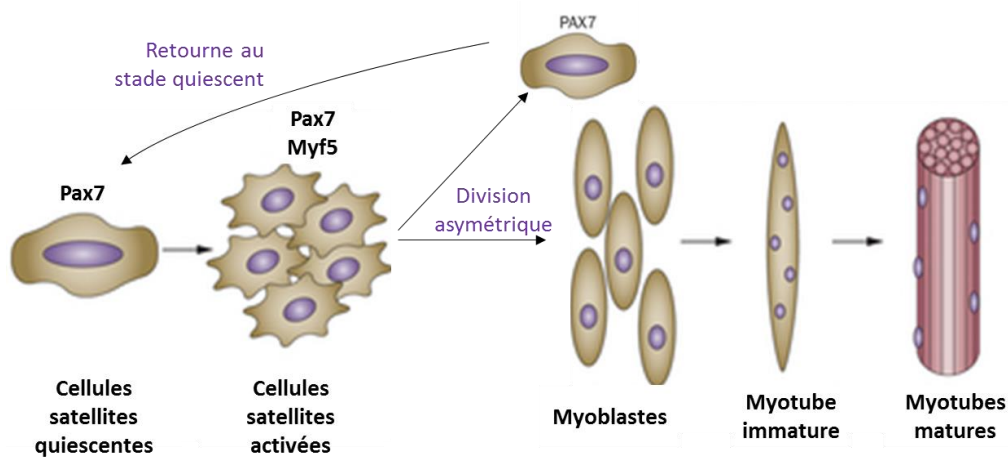


Figure 7: Régénération et de la croissance musculaire par les cellules satellites.

Les cellules satellites quiescentes sont activées par des facteurs myogéniques et entrent dans le cycle cellulaire afin de permettre la régénération ou la croissance musculaire. D'après (Salvatore et al., 2014).

I.3.2 REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE

Suivant la situation physiologique, le volume et la masse musculaire peuvent varier. Toutes les conditions modifiant l'équilibre entre la synthèse et la dégradation protéique entraînent un gain ou une perte de masse musculaire.

L'hypertrophie résulte d'une forte induction de la synthèse protéique, associé à une diminution de la dégradation protéique, aboutissant à l'augmentation de la masse musculaire notamment lors de la croissance ou l'entraînement. L'hypertrophie est caractérisée par une augmentation de la taille des fibres, en opposition à l'hyperplasie, qui correspond à une augmentation du nombre de fibres. Les cellules satellites participent au processus hyperplasique en fusionnant avec des fibres matures afin de les rendre plus solides et plus résistantes lors de sollicitations mécaniques importantes notamment au cours de la croissance ou en réponse à l'exercice (Adams, 2006; Roy et al., 1999). L'augmentation de la masse musculaire en réponse à l'exercice résulte principalement d'une hypertrophie, plutôt que d'une hyperplasie (McCall et al., 1996).

Au contraire, l'atrophie musculaire résulte d'une diminution de la synthèse protéique et d'une augmentation marquée de la dégradation des myofibrilles et des protéines solubles. Cela aboutit à une diminution de la masse musculaire et du poids corporel, entraînant une diminution de la qualité de vie et augmentant la mortalité. L'atrophie se développe par exemple lors du jeûne, d'une immobilisation prolongée, ou au cours de pathologies chroniques associées à un état de cachexie telles que le cancer, le SIDA, la septicémie ou des insuffisances pulmonaires, hépatiques, rénales ou cardiaques chroniques (Bowen et al., 2015; Sandri, 2008; Schiaffino et al., 2007; von Haehling and Anker, 2014). Les voies de signalisation responsables des modulations de la masse musculaire seront détaillées dans la partie I.4.

I.3.2.1 Les effets de l'exercice

L'exercice induit des changements structuraux et métaboliques spécifiques des muscles sollicités, de la durée, de l'intensité et de l'exercice considéré. Le mécanisme et les voies de signalisation contribuant à l'augmentation de la masse et/ou à l'adaptation du muscle sont nombreux, et varient en fonction du type d'activités réalisées (**Figure 8**) (Lamon et al., 2014; Mahoney et al., 2004; Mahoney et al., 2005; Mahoney et al., 2008).

L'exercice d'endurance implique l'activation d'un nombre important de muscles à une intensité qui permet d'effectuer l'activité sur une période prolongée sans fatigue. Cela comprend principalement la marche, la course à pied, la natation, mais également la course cycliste et certains types de danse. Le muscle a besoin d'un apport important en oxygène et va engendrer un remaniement de ses fibres, notamment la modification progressive des fibres glycolytiques IIB en fibres oxydatives IIA. Bien que la masse musculaire ou la capacité à générer de la force ne varient pas forcément lors de ce type d'exercice, la capacité métabolique augmente (**Figure 8**). En effet, la capillarité musculaire est stimulée, le nombre et la taille des mitochondries peut augmenter jusqu'à 40 %, et les réserves en graisse et glycogène sont augmentées pour alimenter la production aérobie d'ATP (Bishop-Bailey, 2013; Seene et al., 2011).

Les exercices de force ou de résistance, qui nécessitent un effort intense mais de courte durée, résultent en une augmentation de la génération de force liée à l'hypertrophie musculaire (**Figure 8**). Cela comprend principalement la musculation, l'aviron, l'athlétisme, les sports de combats et les sports d'équipes tels que le basketball, le rugby ou le hockey. L'exercice de force augmente spécifiquement la synthèse protéique, notamment *via* l'activation de la voie de signalisation de l'« insulin-like growth factor » (IGF). De plus, il inhibe l'activité d'un régulateur négatif de la masse musculaire, la myostatine (Mstn), favorisant ainsi l'hypertrophie musculaire. L'exercice physique régule négativement la dégradation protéique dans les fibres musculaires (Russell, 2010; Sandri et al., 2013; Schiaffino et al., 2013).

L'inactivité physique chronique est la quatrième cause de décès selon l'organisation mondiale de la santé (Bishop-Bailey, 2013). L'inactivité physique diminue la capacité à générer de la force et de la puissance musculaire, et induit des désordres métaboliques (Figure 8). Elle entraîne un remaniement des fibres IIA en fibres I, ainsi qu'une réduction du nombre ou de la taille des fibres musculaires lentes oxydatives (fibres de type I) (Trappe et al., 2004).

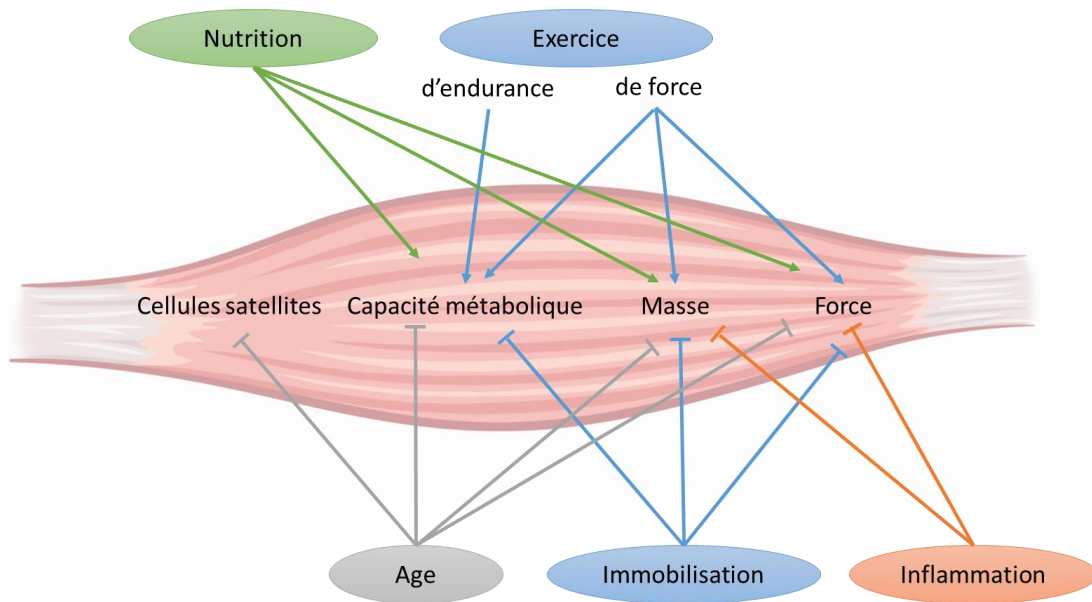


Figure 8: Effets de l'exercice, de l'âge, de la nutrition et de l'inflammation sur la masse musculaire.

L'exercice et la nutrition induisent une augmentation des fonctions musculaires tandis que l'immobilisation, l'inflammation ou la vieillesse provoquent une diminution des fonctions musculaires.

1.3.2.2 Les effets de l'âge

Chez les personnes âgées ne présentant pas de maladie déclarée, la sarcopénie est caractérisée par une perte de la masse corporelle, une diminution de la masse musculaire, une faiblesse musculaire et une performance musculaire réduite (Figure 8) (Cruz-Jentoft et al., 2010; Muscaritoli et al., 2010). La perte de la masse musculaire apparaît progressivement et touche plus de 15 % de la population âgée de plus de 65 ans (Cosqueric et al., 2006). La sarcopénie varie en fonction du sexe et du pays. Certaines personnes âgées avec de bonnes conditions physiques ne sont pas affectées par la sarcopénie. Identifier les mécanismes responsables de cette maladie reste difficile car les personnes âgées présentent d'autres maladies qui peuvent participer à l'atrophie musculaire telles que l'immobilisation, la diminution des niveaux d'hormones telles que la testostérone (Vermeulen, 1991) ou l'IGF circulant (Hermann and Berger, 2001).

Le nombre de cellules satellites diminue avec l'âge et leur activation est atténuée, empêchant la régénération musculaire (Figure 8) (Verdijk et al., 2007). De plus, les fibres musculaires sarcopéniques présentent une altération de leur réticulum sarcoplasmique rendant la contraction difficile et une réduction de la propriété élastique des fibres et du muscle. Elles présentent également une diminution du nombre de mitochondries associée à une augmentation des dysfonctionnements mitochondriaux,

(Broskey et al., 2014; Ochala et al., 2007; Weisleder and Ma, 2006). Bien que les fibres musculaires soient plus petites chez les personnes âgées, il semblerait que la qualité des fibres joue un rôle tout aussi important (Frontera et al., 2000).

Au niveau moléculaire, les patients sarcopéniques présentent une augmentation des niveaux de la Mstn (Baccarelli et al., 2001; Shan et al., 2013) et des composants du système impliqué dans la dégradation des protéines (Combaret et al., 2009; Ibebunjo et al., 2013). Actuellement, l'exercice est le seul traitement efficace pour réduire la sarcopénie chez les personnes âgées, mais ne peut s'appliquer à toutes les personnes (Adams et al., 2007).

1.3.2.3 Les effets de la nutrition

Le muscle squelettique adapte ses fonctions métaboliques et sa masse selon le statut nutritionnel de l'organisme (Hawley et al., 2011). Des modifications dans l'apport et la disponibilité des nutriments altèrent la concentration des métabolites et des hormones, déclenchant des perturbations majeures dans le profil de stockage et d'utilisation de l'énergie par les muscles squelettiques et autres tissus sensibles à l'insuline. Ces modifications impactent directement l'expression de nombreux gènes (Yang et al., 2005) et voies de signalisation (Creer et al., 2005; Wojtaszewski et al., 2003).

Une prise alimentaire d'acides aminés essentiels et de protéines, supérieure à l'apport calorique quotidien recommandé, a un effet bénéfique sur la masse et les fonctions musculaires (**Figure 8**) (Katsanos et al., 2016; Rondanelli et al., 2016). En revanche, un jeûne prolongé conduit à une diminution de la masse et des faiblesses musculaires (Cohen et al., 2012).

Suite à une prise alimentaire, la quantité de nutriments, d'insuline ou encore d'IGF-I augmente, stimulant la synthèse protéique dans le muscle squelettique grâce à l'activation de voies spécifiques (Goodman, 2014). Au contraire, lors d'un jeûne ou d'une restriction calorique, la disponibilité des sources énergétiques du muscle est faible, réprimant la synthèse protéique et stimulant la dégradation protéique (Kunkel et al., 2011).

Ainsi en intégrant l'état énergétique de l'organisme, le muscle est capable d'adapter son métabolisme. Cette adaptation est possible par la présence au sein de la cellule de protéines médiatrices de l'état nutritionnel, telles que l'« AMP-actives protein kinase » (AMPK), la désacétylase « silent mating type information regulation 2 homolog » (SIRT1) et la kinase « mammalian target of rapamycin » (mTOR).

1.3.2.4 Les effets de l'inflammation

Des inflammations systémiques telles que la septicémie (Bolton et al., 1986) ou des pathologies caractérisées par la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que le cancer, la sarcopénie, le SIDA causent une fonte de la masse musculaire (**Figure 8**). L'accélération de la dégradation protéique et la diminution de la synthèse protéique observées chez ces patients, sont certainement liées à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-6 (IL-6), la « tumor necrosis factor α » (TNF α) et IL-1. Cependant leur rôle dans la fonte de la masse musculaire reste controversé et mal élucidé (Baracos et al., 1995; Bossola et al., 2003; Dodson et al., 2011). La majorité des études concerne IL-6 et son rôle pour une réponse immunitaire adaptée et pour la croissance et régénération musculaire en condition basal (Hunter and Jones, 2015).

I.4 VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'HOMEOSTASIE MUSCULAIRE

Le renouvellement protéique joue un rôle majeur dans la régulation de la masse musculaire, mais aussi dans le maintien des capacités fonctionnelles du muscle squelettique.

Le contenu protéique est finement régulé par la modulation des taux de synthèse et de dégradation protéique. Dans des conditions normales, la balance entre les voies anaboliques permettant la synthèse des protéines et les voies cataboliques initiant le processus de dégradation des protéines sont à l'équilibre. La modification de cet équilibre par la nutrition, l'activité physique ou par des situations pathologiques comme la cachexie, va conduire à une augmentation ou à une diminution de la masse musculaire (Hoffman and Nader, 2004).

I.4.1 VOIE IGF-AKT-MTOR ET LE CONTROLE DE LA CROISSANCE MUSCULAIRE

Dans des cellules non différenciées, la voie IGF-PI3K-Akt-mTOR contrôle la division cellulaire. En revanche, dans des cellules différenciées comme les cellules musculaires, cette voie contrôle la synthèse protéique, activée dans des conditions hypertrophiques. La synthèse protéique est le processus par lequel l'acide ribonucléique messager (ARNm) est traduit en protéines par le ribosome. La traduction est un mécanisme cyclique, subdivisé en trois étapes : (i) initiation, (ii) élongation et (iii) terminaison. La synthèse protéique chez les eucaryotes fait intervenir des facteurs d'initiations (eIF), des facteurs d'élongations (eEF) et des facteurs de terminaison (eRF), l'ARNm et des aminoacyl-ARN de transfert (aa-ARNt). L'initiation de la traduction est l'étape limitante. Elle correspond à l'assemblage du ribosome 80S fonctionnel sur l'ARNm et est subdivisée en deux étapes : (i) la formation du complexe d'initiation 48S et (ii) l'association de la sous-unité 60S au complexe 48S formant le ribosome 80S fonctionnel. L'association du complexe ternaire composé de eIF2- guanosine triphosphate (GTP)-ARNt initiateur chargé avec la méthionine (Met-ARNt_{iMet}) à la sous-unité 40S permet la formation du complexe de pré-initiation 43S. La reconnaissance du codon d'initiation (AUG) présent sur l'ARN par le complexe de pré-initiation permet la formation du complexe 48S. L'élongation de la traduction correspond à l'ajout d'acides aminés à l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique naissante. La terminaison de la traduction a lieu lorsque le ribosome rencontre l'un des trois codons stop (UAA, UAG, UGA), permettant le relargage du peptide néo-synthétisé. La régulation de ces étapes d'initiation et d'élongation est contrôlée en partie par la voie IGF-PI3K-Akt (Hershey et al., 2012). De plus, l'atrophie musculaire est associée à une diminution précoce de la synthèse protéique, empêchant l'activation de cette voie (Schiaffino and Mammucari, 2011). Cependant, l'inhibition de la synthèse protéique n'est pas suffisante pour induire la dégradation musculaire chez les rongeurs et les hommes (Raffaello et al., 2010).

I.4.1.1 Les facteurs de croissance IGF-I

Les facteurs de croissance IGF-I sont très étudiés dans le muscle pour leurs effets hypertrophiants en augmentant la synthèse et diminuant la dégradation protéique. La surexpression d'IGF-I est suffisante pour réduire la perte de la masse musculaire induite par l'atrophie musculaire, et induire une augmentation de la masse et de la force musculaire (Alzghoul et al., 2004; Musaro et al., 2001; Sackey et al., 2004; Schulze et al., 2005). IGF-I favorise avec d'autres facteurs de croissance, la prolifération et

la différenciation des myoblastes, et ainsi la formation des fibres pendant la croissance et la phase de régénération (Philippou and Barton, 2014).

L'épissage alternatif du gène *IGFI* produit trois isoformes, IGF-IEa, IGF-IEb et IGF-IEc, composés de la même protéine mature IGF-I, mais qui diffèrent par leur extension carboxy-terminale appelée E-peptide (Barton, 2006). Chez la souris, il n'existe que deux isoformes, IGF-IEa et IGF-IEb correspondant respectivement à IGF-IEa et IGF-IEc chez l'Homme. Il est classiquement admis que le peptide mature d'IGF-I est le médiateur principal des actions d'IGF-I. Les E-peptides semblent préciser la localisation, augmenter le potentiel d'IGF-I ou encore leur conférer une activité indépendante (Brisson and Barton, 2013).

La majorité de l'IGF-I circulant est sécrétée par le foie après fixation d'hormones de croissance (GH) sur les récepteurs hépatiques à hormone de croissance (GHR) (Sjogren et al., 1999). Il circule principalement sous forme complexée aux « IGF-binding protein » (IGFBP) (Ohlsson et al., 2009). Le muscle squelettique, comme de nombreux autres tissus, produisent de l'IGF-I. Lorsque les productions hépatiques d'IGF-I sont limitées, la croissance des tissus produisant leur propre IGF-I tels que les muscles squelettiques, continue. Ces résultats suggèrent que la production locale d'IGF-I est suffisante pour une croissance normale de ces tissus (Yakar et al., 1999). L'expression d'IGF-I est régulée par de nombreux signaux (testostérone, exercice, hormone de croissance) et inhibée par les glucocorticoïdes (GC) et les cytokines pro-inflammatoires.

IGF-I se fixe majoritairement sur le récepteur à IGF-I (IGF-IR), une protéine transmembranaire contenant deux domaines extracellulaires avec un site de fixation à l'IGF-I, ainsi que deux domaines transmembranaires avec des résidus tyrosines capable d'être phosphorylés et de s'activer suite à la liaison d'IGF-I. La liaison d'IGF-I sur son récepteur IGF-IR induit le recrutement et l'activation d'un membre de la famille des « insulin receptor substrate » (IRS), IRS-1 (**Figure 9**) (Bodine et al., 2001a; Bohni et al., 1999). Dans le muscle, IRS-1 se lie à l'IGF-IR et médie l'effet hypertrophique de l'IGF-I puisqu'en son absence, l'augmentation de la masse musculaire par IGF-I est abolie, tandis que l'effet hypertrophique est présent dans les autres tissus comme le cerveau, l'intestin ou le cœur (Pete et al., 1999). Comme la phosphorylation d'IRS-1 est requise pour activer de nombreux signaux, des facteurs ciblent spécifiquement la stabilité d'IRS-1 afin d'altérer l'efficacité de la signalisation d'IGF-I. Ces processus seront détaillés dans la partie I.4.2.3.

I.4.1.2 La kinase AKT

La phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), activée en réponse à la fixation d'IGF-I sur son récepteur, phosphoryle le phospholipide membranaire phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 3, 4,5-triphosphate (PIP3). Les activités de la « phosphatase and tensin homolog » (PTEN) et de « SH2-containing 5'-inositol phosphatase 2 » (SHIP2) s'opposent à l'activité de la PI3K, en déphosphorylant PIP3 en PIP2. PIP3 se lie au domaine homologue de la pleckstrine de la sérine/thréonine kinase d'Akt, aussi connue sous le nom de « protein kinase B » (PKB), et permettre son recrutement à la membrane (**Figure 9**).

Suite à sa translocation à la membrane, Akt active par phosphorylation dans le domaine catalytique (Thr₃₀₈) et le domaine hydrophobique carboxy-terminal (Ser₄₇₃) deux kinases, respectivement, la protéine kinase D1 (PKD1) et le complexe mTOR 2 (mTORC2) (détaillé dans la partie I.4.1.3).

L'activation d'Akt conduit à la phosphorylation de ses nombreuses cibles impliquées dans la croissance cellulaire et le métabolisme (Figure 9) (Gonzalez and McGraw, 2009; Lamming et al., 2012).

La surexpression d'une forme constitutivement active d'Akt dans le muscle squelettique à l'âge adulte (Bodine et al., 2001b; Pallafacchina et al., 2002), ainsi que la génération de souris transgéniques chez lesquelles Akt est exprimé dans le muscle squelettique à l'âge adulte sont suffisantes pour induire l'augmentation de la masse et de la force musculaire (Izumiya et al., 2008; Lai et al., 2004).

Les effecteurs principaux des effets hypertrophiques de la voie PI3K-Akt sont la kinase mTOR, la protéine « glycogen synthase kinase 3 beta » (GSK3 β) et les facteurs de transcription appartenant à la famille « forkhead box protein O » (FoxO) (Figure 9). Les kinases mTOR et GSK3 β contrôlent la synthèse protéique, tandis que FoxO contrôle la dégradation protéique.

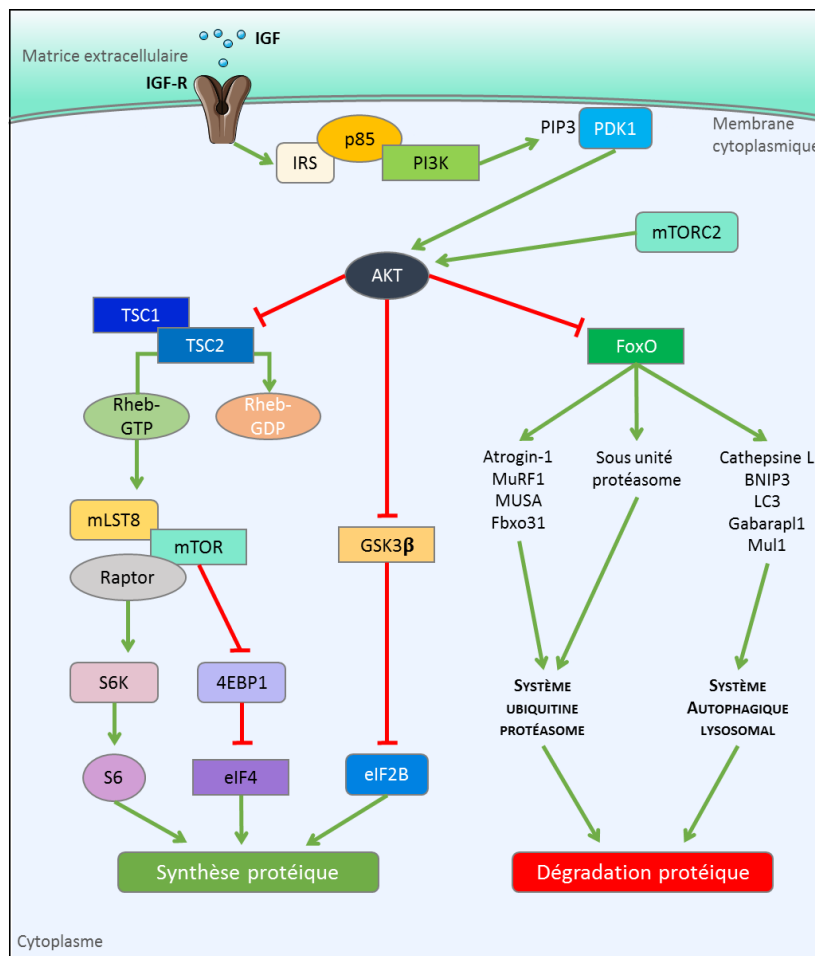


Figure 9: La voie IGF-PI3K-Akt-FoxO dans la régulation de la masse musculaire.

Suite à la liaison de l'IGF-I sur son récepteur, la voie PI3K-Akt va être activée. Cela conduit à une augmentation de la synthèse protéique via les kinases mTOR et GSK3 β , ainsi qu'à la diminution de la dégradation protéique en empêchant l'action de FoxO sur ses cibles. D'après (Judge et al., 2014; Saltiel, 2016).

1.4.1.3 La kinase mTOR

La protéine serine/thréonine kinase mTOR est un régulateur clé de la croissance cellulaire, du métabolisme et de l'homéostasie cellulaire. La kinase mTOR contrôle la synthèse protéique en

intégrant différents signaux tels que des facteurs de croissance ou encore les états nutritionnels et énergétiques de la cellule (Albert and Hall, 2015; Cornu et al., 2013).

La kinase mTOR forme deux complexes structurellement et fonctionnellement distincts, appelés le mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1 est caractérisé par la présence de la protéine « regulatory associated protein of mTOR » (Raptor), de la « mammalian lethal with sec-13 protein 8 » (mLST8), et de la « prolin rich Akt substrat-40 » (Pras), répresseur connu de la signalisation mTOR (**Figure 9**) (Dibble and Manning, 2013; Kim et al., 2002). Le complexe mTORC1 régule positivement les processus anaboliques tels que la synthèse protéique, la biogenèse des ribosomes, la transcription, la synthèse lipidique, la biosynthèse des nucléotides et l'absorption des nutriments. De plus, mTORC1 inhibe les processus cataboliques tels que l'autophagie (Shimobayashi and Hall, 2014). Le complexe mTORC2 est caractérisé par la présence de « rapamycin-insensitive companion of mTOR » (Rictor), de mLST8 et de la « mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1 » (mSIN1) (Guertin et al., 2006). Le complexe mTORC2, grâce à une boucle de rétrocontrôle positif, permet l'activation maximale d'Akt en phosphorylant son résidu Ser₄₇₃ (**Figure 9**) (Cybulski and Hall, 2009; Sarbassov and Sabatini, 2005).

Le rôle de mTOR dans la croissance du muscle a été démontré par des études dans des modèles murins montrant que la rapamycine inhibe la croissance du muscle suite à l'hypertrophie due à une surexpression d'Akt (Bodine et al., 2001b; Izumiya et al., 2008). De plus, les souris déficientes pour Raptor spécifiquement dans le muscle présentent une perte de la masse musculaire, mais également une diminution du tissu adipeux, ainsi qu'une intolérance au glucose, suggérant que les voies de signalisation contrôlées par mTORC1 dans le muscle exercent un effet sur le métabolisme de l'organisme entier (Bentzinger et al., 2008). De manière surprenante, une surexpression de mTORC1 induit une atrophie musculaire, liée à un rétrocontrôle négatif qui implique l'inhibition d'IRS-1 par la « S6 kinase beta-1 » (S6K1), une cible de mTOR. L'inhibition de IRS-1 empêche l'activation d'Akt et donc la synthèse protéique (Bentzinger et al., 2013; Tremblay and Marette, 2001). Ainsi, bien qu'étant une cible de la voie IGF-PI3K-Akt, mTORC1 et mTORC2 exercent respectivement un rétrocontrôle négatif ou positif sur cette voie, permettant une régulation fine du renouvellement protéique.

La kinase mTORC1 propage le signal de la voie PI3K/Akt en activant ses cibles : la protéine ribosomique S6K1 et la « eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 » (4E-BP1) (Ma and Blenis, 2009). Le complexe mTORC1 phosphoryle et inhibe 4E-BP1 (Gingras et al., 1998) induisant la libération du facteur d'initiation de la traduction, eIF4E (**Figure 9**) (Brunn et al., 1997; Hara et al., 1997). Après dissociation, eIF4E interagit avec notamment eIF4G et eIF4A formant ainsi le complexe eIF4F. Ce complexe permet la reconnaissance et l'association de l'ARNm avec le complexe de pré-initiation 43S, initiant la traduction (Jackson et al., 2010). Il existe une corrélation entre la stimulation de la synthèse protéique musculaire et l'augmentation de la phosphorylation de 4E-BP1 (Yoshizawa et al., 1998). D'autre part, la phosphorylation de S6K1 par mTOR permet son activation (**Figure 9**). Une variété d'autres protéines impliquées dans la traduction, telles que eIF4A, eIF4B, le facteur d'élongation eEF2K, ou encore la protéine « programmed cell death 4 » (PDCD4) sont les cibles de S6K1 (Mazelin et al., 2016; Wang et al., 2001; Weigl, 2012).

L'activation de mTOR par Akt est indirecte et implique la phosphorylation des résidus Ser₉₃₉ and Thr₁₄₆₂ de la protéine « tuberous sclerosis 2 » (TSC2), qui contient un domaine « GTPase activating protein » (GAP). Cette phosphorylation inhibe les fonctions du complexe TSC1-TSC2. Le domaine GAP de TSC2 stimule l'activité GTPase de la protéine G « Ras homologue enriched in brain » (Rheb), qui, lorsqu'elle

est liée à la GTP, active mTOR. TSC1 n'a pas de domaine GAP mais son action stabilise TSC2 et empêche sa dégradation (**Figure 9**) (Huang and Manning, 2008).

1.4.1.4 La kinase GSK3 β

La protéine sérine/thréonine kinase GSK3 β a été identifiée initialement dans le muscle squelettique comme une kinase qui phosphoryle et inactive la glycogène synthase, lui conférant dans un premier temps un rôle métabolique. Cependant il a été montré que GSK3 β est capable de moduler l'hypertrophie musculaire en contrôlant le facteur d'initiation de la traduction eIF2B. La phosphorylation d'eIF2B sur le résidu Ser₅₄₀ par GSK3 β inhibe son activité « guanine exchange factor » (GEF) empêchant la formation du complexe ternaire impliquant eIF2, nécessaire à l'élongation de la traduction (Gordon et al., 2013; Welsh et al., 1998).

Bien que GSK3 β puisse être régulé par de nombreuses voies dans les différents types cellulaires, la voie de signalisation de l'insuline cause l'inactivation de GSK3 β dans le muscle. En effet, Akt phosphoryle GSK3 β sur le résidu Ser₉, conduisant à son inactivation (Alessi et al., 1996; Rommel et al., 2001), permettant en retour l'activation de eIF2B et la synthèse protéique (**Figure 9**) (Hardt et al., 2004).

L'inhibition de GSK3 β est indispensable pour la croissance et la différenciation musculaire. En effet l'expression d'un dominant négatif ou d'une forme inactive de la kinase GSK3 β , ainsi que son inhibition pharmacologique induisent une hypertrophie marquée (Cohen and Goedert, 2004; Rommel et al., 2001; Welsh et al., 1998). De plus, l'expression de GSK3 β est suffisante pour provoquer la différenciation myogénique et l'hypertrophie des cellules musculaires (van der Velden et al., 2007; van der Velden et al., 2006). Par ailleurs, la contribution de GSK3 β dans le renouvellement protéique n'est pas limitée à la régulation de la synthèse protéique. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de GSK3 β réduit la dégradation protéique de manière similaire à l'IGF-I, en bloquant l'induction de gènes clés (Evenson et al., 2005; Fang et al., 2005; Verhees et al., 2011).

1.4.1.5 Les facteurs de transcription FoxO

La famille de facteurs de transcription FoxO est constituée de trois membres : FoxO1, FoxO3a, et FoxO4. Ils sont impliqués notamment dans l'atrophie musculaire et le métabolisme glucidique. Sous forme phosphorylée, les facteurs de transcription FoxO sont localisés dans le cytoplasme et inactifs. Lorsqu'ils ne sont pas phosphorylés, ils sont localisés dans le noyau et activent l'expression de leurs gènes cibles (**Figure 9**) (Sanchez et al., 2014). Les facteurs de transcription FoxO contrôlent l'expression de gènes en se liant sur des éléments de réponse à FoxO (FRE) localisés dans le promoteur de certains gènes (Glass, 2010; Palus et al., 2014; Waddell et al., 2008).

De nombreuses modifications post-traductionnelles ont été identifiées. La phosphorylation par la kinase « mammalien sterile20-like kinase 1 » (MST1) (Wei et al., 2013) ou par AMPK (Greer et al., 2007) active FoxO3a. En revanche, la phosphorylation de FoxO3a par (i) Akt (Glass, 2010), (ii) sa désacétylation par SIRT1 (Lee and Goldberg, 2013), (iii) sa mono- ou poly-ubiquitination par l'E3 ubiquitine ligase « murine double minute 2 » (Mdm2) (Bertaglia et al., 2012), (iv) son interaction avec le facteur de transcription « activator protein 1 » (AP-1) (Raffaello et al., 2010) ou (v) avec le corégulateur « peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α » (PGC1 α) (Brault et al., 2010) inhibe son activité transcriptionnelle.

Dans le muscle squelettique, les études se focalisent sur FoxO1 et FoxO3a, puisque leur expression est induite dans de nombreuses formes d'atrophie musculaire (Waddell et al., 2008). De plus, les souris qui surexpriment FoxO1 présentent une masse musculaire nettement réduite, ainsi que des fibres atrophiées (Kamei et al., 2004; Southgate et al., 2007). A l'opposé, lorsque l'expression de FoxO1 est abolie, aucune atrophie musculaire n'est observée (Liu et al., 2007; Sandri et al., 2004). En effet, les membres de la famille FoxO augmentent l'expression des gènes impliqués dans le système ubiquitine protéasome (UPS) (Sandri et al., 2004) et dans le processus autophagique (Figure 9) (Mammucari et al., 2007). Ces systèmes seront détaillés dans la partie I.4.2. De plus, une augmentation de l'expression de FoxO1 est associée à une augmentation de l'expression de 4E-BP1 et une diminution de la voie de signalisation mTORC1 (Southgate et al., 2007). Ces résultats soutiennent l'idée que FoxO est suffisant pour induire la fonte musculaire.

I.4.2 SYSTEMES EFFECTEURS DE LA DEGRADATION DES PROTEINES

La protéolyse, ou dégradation des protéines cellulaires, est un processus essentiel pour la survie cellulaire, impliquant la perte drastique de protéines, d'organelles et du cytoplasme.

Elle est réalisée selon quatre mécanismes différents mais complémentaires (Figure 10) :

- le système calcium-dépendant
- les caspases
- l'UPS
- la voie autophagique-lysosomale

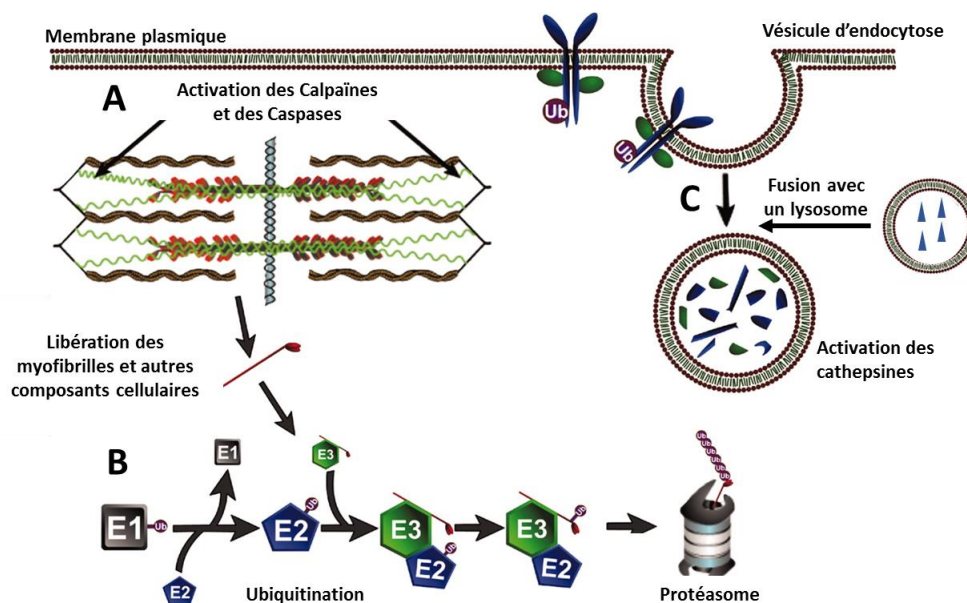


Figure 10: Les quatre systèmes protéolytiques impliqués dans la régulation de la masse musculaire.

Le système des calpaïnes et les systèmes de caspases (A) clivent les myofibrilles afin qu'elles soient ubiquitinées (Ub) puis dégradées par le système ubiquitine protéasome (B). Les lysosomes fusionnent avec des vésicules d'endocytose afin de dégrader les protéines contenues dans ces vésicules (C). D'après (Jackman and Kandarian, 2004).

La dégradation protéique est corrélée à la destruction de protéines contribuant à l'atrophie et la faiblesse musculaire observée dans de nombreuses pathologies. De nombreuses études ont montré une augmentation de la dégradation protéique via l'UPS et le système autophagique-lysosomale lors

d'une atrophie musculaire. Les composants myofibrillaires de la machinerie contractile, constituant 70 % des protéines musculaires sont perdus, entraînant la réduction de la masse et la fatigue musculaire. De même, les mitochondries sont également dégradées, ce qui explique la perte de la capacité d'endurance du muscle atrophie (Pellegrino and Franzini, 1963). Plus de 120 gènes ont été identifiés par des études transcriptomiques à grande échelle comme étant des atrogènes, favorisant l'atrophie du muscle squelettique (Gomes et al., 2001; Jagoe et al., 2002; Lecker et al., 2004; Satchek et al., 2007).

Afin d'assurer un fonctionnement optimal, la dégradation protéique est également nécessaire dans un muscle sain, compte tenu des stress mécaniques, thermiques et oxydatifs, exercés sur le muscle.

Les quatre systèmes protéolytiques agissent de concert pour réguler la dégradation protéique en réponse aux variations physiologiques auxquelles le muscle doit faire face. Ces mécanismes permettent notamment la libération des acides aminés indispensables pour la néoglucogenèse et donc la survie de l'organisme dans des conditions extrêmes (Bell et al., 2016; Pasiakos and Carbone, 2014; Sandri, 2016).

1.4.2.1 Les calpaïnes

La voie protéolytique calcium-dépendante implique deux grands types de cystéine protéases : les calpaïnes ubiquitaires telles que calpaïnes μ et m et les calpaïnes tissu-spécifiques telles que la calpaïne 3, spécifique du muscle (Beckmann and Spencer, 2008; Neuhof and Neuhof, 2014).

Même si l'activité enzymatique des calpaïnes se caractérise par une protéolyse limitée de leurs substrats, elle est augmentée en réponse à des stress protéolytiques tels que l'endurance ou des immobilisations (Costelli et al., 2005; Enns et al., 2007).

Les calpaïnes sont inactives en l'absence de stimuli cataboliques. La fixation du calcium sur les calpaïnes entraîne un changement de conformation permettant son activation. Les calpaïnes peuvent également être régulées positivement par phosphorylation (Goll et al., 2003) ou par le phosphatidylinositol (Shao et al., 2006), et négativement par la calpastatine (Goll et al., 2003).

L'activité protéolytique de la calpaïne-3 dans la fibre musculaire est dirigée contre certaines protéines du sarcomère et des costamères comme la titine, ce qui entraîne une rupture du cytosquelette d'actine et la désorganisation des adhérences focales (Goll et al., 2003). Les myofibrilles intactes ne peuvent être dégradées par l'UPS en raison de leur trop grande taille. Ainsi, le clivage médié par les calpaïnes augmente l'accessibilité du protéasome à ses substrats (**Figure 10**) (Costelli et al., 2005). Cependant, elles ne sont pas directement responsables de la dégradation des protéines contractiles majeures telles que l'actine et la myosine (Attaix et al., 1998).

De plus, les calpaïnes contribuent à l'activation du protéasome 26S et à la dégradation de facteurs de transcription tels que « nuclear Factor-kappa B » (NF- κ B), ou AP-1, ou du corégulateur p300 (Smith et al., 2008). Les calpaïnes favorisent l'inhibition de l'activité d'Akt (Smith and Dodd, 2007) permettant l'activation de FoxO et l'arrêt de la synthèse protéique via l'activation de GSK3 β et l'inhibition de mTOR.

1.4.2.2 Les caspases

Les caspases sont des cystéine protéases, divisées en caspases initiatrices (caspase-2, caspase-8, caspase-9, caspase-10) ou effectrices (caspase-3, caspase-6, caspase-7). Les caspases, et plus particulièrement la caspase-3, sont impliquées dans l'apoptose et la dégradation des protéines dans le muscle squelettique en conditions atrophiques. En effet, l'activité de la caspase 3 est augmentée dans le muscle de rongeurs cachectiques, diabétiques ou souffrant d'hypertension cardiaque. La présence d'un inhibiteur de la caspase 3 réduit la dégradation protéique (Belizario et al., 2001; Du et al., 2004; McMillan et al., 2015; Silva et al., 2015). L'implication des caspases dans la dégradation protéique positive de la fibre squelettique adulte, notamment après un exercice, n'a pas été démontrée (Bell et al., 2016). Les caspases seraient également impliquées dans la régulation de l'auto-renouvellement des cellules satellites (Dick et al., 2015) et dans la différenciation des myoblastes (Fernando et al., 2002). Elles sont activées après un clivage par la caspase-9, initiant la dégradation en petits fragments de protéines myofibrillaires, plus particulièrement de l'actomyosine, qui seront dégradés par le système ubiquitine protéasome (Du et al., 2004; Workeneh et al., 2006). D'autre part, la caspase-3 peut cliver la sous-unité 19S du protéasome stimulant la dégradation protéique par le protéasome 26S (**Figure 10**) (Wang et al., 2010).

Ainsi, les caspases agissent de façon semblable aux calpaïnes, en rendant les protéines myofibrillaires disponibles pour l'ubiquitination et potentiellement dégradables par l'UPS (**Figure 10**).

1.4.2.3 Le système ubiquitine-protéasome

L'UPS est responsable de 80 % de la dégradation protéique musculaire (Attaix et al., 1998). Il permet de cibler des protéines musculaires afin de les dégrader par le protéasome 26S à travers la liaison d'une chaîne de molécule d'ubiquitine. Le processus d'ubiquitination du substrat implique l'interaction coopérative d'au moins trois classes de protéines appelées enzymes E1 (active l'ubiquitine en faisant intervenir l'utilisation d'une molécule d'ATP), E2 (conjugue l'ubiquitine en créant une liaison avec l'ubiquitine) et E3 (permet la fixation du résidu ubiquitine sur la protéine à dégrader). Une fois que la protéine est ubiquitinée, elle sera dirigée vers le protéasome pour être dégradée. La chaîne de poly-ubiquitine peut être éliminée par des enzymes de désubiquitination, empêchant la dégradation de la protéine. Le protéasome 26S est composé d'un noyau cylindrique 20S lié au complexe 19S qui régule l'entrée des protéines ubiquitinées. Les sites catalytiques impliqués dans l'hydrolyse des liaisons peptidiques sont à l'intérieur de la sous-unité 20S (**Figure 11**) (Murton et al., 2008).

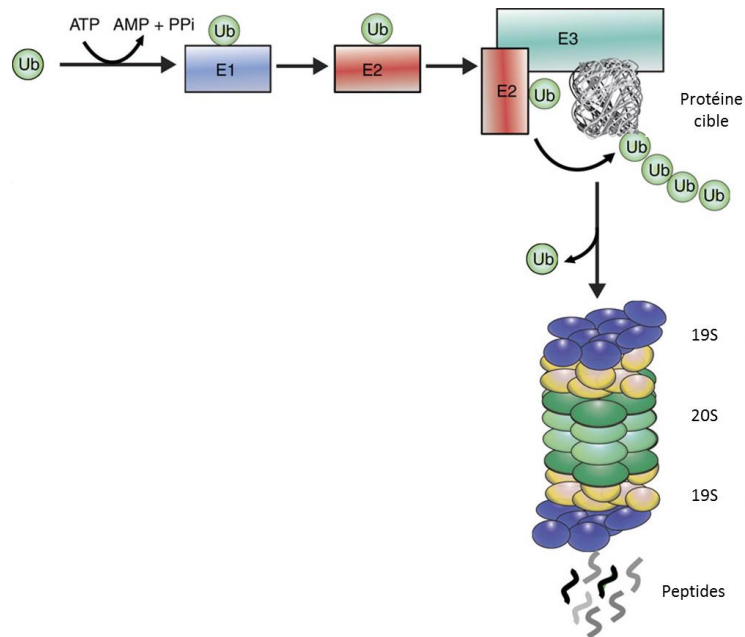


Figure 11: Le système ubiquitine protéasome.

L'UPS implique 3 enzymes (E1, E2, E3) qui catalysent l'addition d'une chaîne d'ubiquitine (Ub) sur la protéine. La protéine polyubiquitinée est reconnue et dégradée par le protéasome. D'après (Vilchez et al., 2014).

Chez les mammifères, il existe plus d'une centaine de type d'enzyme E2 et plus d'un millier de type d'enzyme E3. La présence des différents E2 et E3 varie en fonction des tissus et des conditions physiologiques. Toutes les E2 et E3 spécifiques du muscle n'ont pas encore été identifiées.

Les premières E3 ubiquitine ligases à avoir été identifiées en raison de leur implication dans l'atrophie musculaire sont l'Atrogin-1 (ou « muscle atrophy F-box », MAFbx) et « muscle ring finger 1 » (MuRF1 ou « tripartite motif-containing 63 », TRIM63). Ces deux E3 ubiquitine ligases sont fortement induites dans des modèles d'atrophies musculaires comme la dénervation, la cachexie, la septicémie ou le diabète et sont considérées comme des régulateurs clés de l'atrophie musculaire (Bodine et al., 2001a; Lecker et al., 2004).

MuRF1 est une protéine possédant un domaine « ring finger » requis pour l'activité ubiquitine ligase (Gregorio et al., 2005; Joazeiro et al., 1999; Mrosek et al., 2008). MuRF1 est localisé près du sarcomère et participe à la dégradation des protéines régulatrices qui stabilisent les filaments épais de myosine telles que les protéines MyBP-C ou encore la nébuline, ainsi que la troponine I et la titine. MuRF1 participe également à la dégradation des chaînes lourdes et légères de myosine (Clarke et al., 2007; Cohen et al., 2009; Eddins et al., 2011). Les souris n'exprimant plus MuRF1 sont protégées de l'atrophie induite par la dénervation (Baehr et al., 2011; Bodine et al., 2001a).

Atrogin-1 contient un domaine « F-box », un motif observé dans la famille d'E3 ubiquitine ligase appelés SCFs, pour « SKP1, Cullin et Fbox » (Kamura et al., 1999). Les substrats d'Atrogin-1 ne sont pas connus mais la MyoD1, précurseur myogénique (Lagrand-Cantaloube et al., 2009), la calcineurine, protéine phosphatase dépendante du calcium (Li et al., 2004) et eIF3-F (Li et al., 2007) sont ubiquitinés par Atrogin-1. Ces résultats suggèrent que l'Atrogin-1 dégrade des protéines impliquées dans la régulation de la synthèse protéique (Csibi et al., 2009). Les souris n'exprimant pas l'Atrogin-1 sont protégées de l'atrophie musculaire induite par la dénervation (Bodine et al., 2001a).

Hormis Atrogin-1 et MurF1, d'autres E3 ubiquitine ligases semblent jouer un rôle dans l'atrophie musculaire. Par exemple, TRIM32, une E3 ubiquitine ligase non spécifique du muscle, dégrade les filaments d'actine, la tropomyosine et la desmine (Cohen et al., 2012; Kudryashova et al., 2005). La perte de TRIM32 cause des défauts neurologiques considérables et des dystrophies musculaires qui peuvent être liées à la perte de la desmine (Frosk et al., 2002; Kudryashova et al., 2012; Kudryashova et al., 2005). Bien que l'expression de TRIM32 n'est pas induite après une mise à jeun (Cohen et al., 2012), cette E3 ubiquitine ligase permettrait de réduire la voie PI3K-Akt-FoxO diminuant la synthèse et augmentant la dégradation protéique (Cohen et al., 2014; Sandri, 2008). Une autre E3 ubiquitine ligase, nommée « thyroid hormone receptor interactor 12 » (Trip12), est connue pour polyubiquitiner Sox6, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation. L'ubiquitination de Sox6 empêchant l'expression des gènes associés aux fibres lentes, suggérant que Trip12 est important pour le changement de type de fibre observé lors de l'atrophie musculaire (An et al., 2013; Roberts et al., 2013). Récemment, la protéine « muscle ubiquitin ligase of SCF complexe in atrophy-1 » (MUSA1 ou « F-box protein 30 », Fbxo-30) a été identifiée comme étant un acteur dans l'atrophie musculaire suite à une dénervation (Sartori et al., 2013). La protéine « TNF receptor-associated factor 6 » (TRAF6) est également une autre E3 ubiquitine ligase impliquée dans l'atrophie en contrôlant la dégradation des protéines (Paul et al., 2012).

Un autre mécanisme spécifique de l'atrophie musculaire est l'inhibition de la voie IGF par des E3 ubiquitine ligases ciblant directement IRS-1. Il s'agit notamment des protéines « suppressor of cytokine signaling 1/3 » (SOCS1 et SOCS3) qui ciblent IRS-1 lors de la résistance à l'insuline induite par l'inflammation (Rui et al., 2002), la « Cbl proto-oncogene B » (Cbl-b) qui empêche la signalisation d'IGF-I dans des situations d'immobilisation musculaire (Nakao et al., 2009) et la protéine « F-box/wd repeat-containing protein 8 » (Fbxw8) qui est activé par une boucle de rétrocontrôle négatif dépendant de mTOR (Xu et al., 2008). Fbxo-40, dont l'expression est spécifiquement musculaire, a également été décrite comme un nouveau type d'E3 ubiquitine ligase. Elle cible directement IRS-1, même en conditions physiologiques, et donc limite la croissance musculaire après une stimulation des cellules musculaires avec l'IGF-I (Shi et al., 2011). Ce mécanisme semble être un point limitant permettant d'arrêter la voie de signalisation d'IGF-I lorsque le muscle est incapable de répondre à un signal anabolique, dû à un manque de protéine. Enfin, une dernière protéine ciblant IRS-1 lorsqu'il est lié à l'IR et non pas à l'IGFR a été mise en évidence. Il s'agit de la protéine « mitsugumin53 » (MG53 ou TRIM72), spécifique du muscle et qui semble plutôt cibler le complexe IRS-1/IR permettant d'inhiber la myogenèse (Song et al., 2013).

Les voies de l'UPS sont principalement contrôlées par les facteurs FoxO. L'expression de MurF1 et d'Atrogin-1 est directement contrôlée par FoxO. En effet, des études démontrent la présence d'un FBE dans leur promoteur (Figure 9) (Sandri et al., 2004; Waddell et al., 2008). De plus, de nouvelles cibles directes de FoxO dans un modèle d'atrophie musculaire induite par le cancer ont été mises en évidence, notamment plusieurs sous-unités du protéasome, ainsi que d'autres E3 ubiquitine ligases telles que MUSA et FbxO31 (Figure 9) (Judge et al., 2014).

L'UPS a été considéré comme la voie de signalisation majoritaire du catabolisme. Cependant l'induction de FoxO est également lié à des dysfonctionnements mitochondriaux ainsi qu'à une perte des mitochondries dans les muscles squelettiques (Han et al., 2013; Romanello and Sandri, 2010). L'E3 ubiquitine ligase mitochondriale Mul1, dont l'expression est régulée par FoxO, induit la fragmentation, la dépolarisation et la clairance mitochondriale à travers la voie autophagique-lysosomale appelée

mitophagie (**Figure 9**) (Lokireddy et al., 2012). Les mitochondries et les protéines solubles sont dégradées par autophagie.

L'importance de l'UPS, et plus particulièrement des E3 ubiquitine ligases, dans l'atrophie musculaire ne fait plus aucun doute. Cependant de nouvelles voies d'investigations suggèrent un rôle tout aussi important des enzymes de désubiquitination spécifiques de l'UPS et des différentes sous-unités du protéasome dans le processus régulant la masse musculaire (Sandri, 2016).

1.4.2.4 Le système autophagique-lysosomal

Le système autophagique-lysosomal est un processus catabolique qui permet la dégradation et le recyclage des organelles endommagées et des macromolécules. Il existe 3 différents types d'autophagie : (i) la microautophagie, (ii) l'autophagie réalisée par des protéines chaperonnes et (iii) la macroautophagie représentant la forme principale (Bonaldo and Sandri, 2013).

La microautophagie consiste en l'invagination des protéines cytosoliques directement dans les lysosomes. L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes, permet l'entrée directe dans le lysosome, via un complexe de translocation, des substrats possédant un motif spécifique qui leur permet d'être reconnus et acheminés par les chaperonnes. La micro-autophagie et l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes sont réservées aux protéines solubles, excluant les organites tels que les mitochondries (Bonaldo and Sandri, 2013).

La macroautophagie, appelée par la suite « autophagie », permet de dégrader les macromolécules et des organites, comme par exemple les mitochondries ou les peroxysomes. Bien que l'autophagie fût considérée comme une voie de dégradation non sélective, il semblerait que l'autophagie peut déclencher le recyclage spécifique de certains agrégats de protéines ou organelles, par exemple la dégradation de la mitochondrie par la mitophagie (Sandri, 2016).

L'autophagie se divise en plusieurs étapes comprenant (i) l'induction de l'autophagie, (ii) la formation du phagophore, (iii) l'élongation de la membrane, (iv) la formation de l'autophagosome, (v) la fusion de l'autophagosome avec le lysosome et (vi) la dégradation des substrats. Chacune de ces étapes implique la régulation transcriptionnelle d'un nombre important de gènes notamment ceux liés à l'autophagie appelés « autophagy related » (Atg).

Les complexes régulateurs faisant intervenir entre autre Beclin1, la kinase « unc-51 like autophagy activating kinase » (ULK1) et Vps34, activent la formation de l'autophagosome à partir des invaginations de doubles membranes formées de molécules intracellulaires préexistantes ou d'autres structures membranaires, comme le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie. Les facteurs Atg12 et Atg5 sont recrutés à la membrane formant l'autophagosome, alors nommée phagophore. Le recrutement de la « microtubule-associated protein 1 light chain 3 » (LC3) permet l'élongation de la membrane pour séquestrer des composants cellulaires et la formation de l'autophagosome. En fusionnant avec les lysosomes, les autophagosomes vont former les "autophagolysosomes". Le matériel séquestré dans le lumen est libéré, dégradé par hydrolyse et recyclé en acides aminés, lipides et glucose réutilisables par la cellule. Les autolysosomes vont régénérer de nouveaux lysosomes pour d'autres cycles de dégradation (**Figure 12**). La biogenèse de nouveaux lysosomes est médiée par la voie du réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi et les endosomes tardifs (Lapierre et al., 2015; Sandri, 2016).

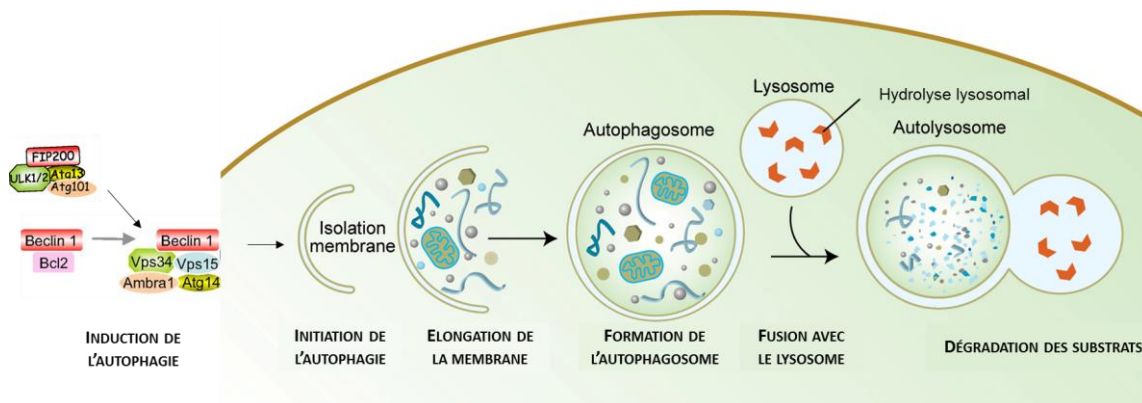


Figure 12 : Le système autophagique-lysosomal.

Le schéma représente les différentes phases de l'autophagie à savoir l'induction, la formation du phagophore, l'élongation de la membrane, la formation de l'autophagosome et la fusion avec le lysosome aboutissant à la dégradation des protéines. D'après (Melendez and Levine, 2009; Sandri, 2016)

La dégradation par la machinerie lysosomale fait intervenir les cathepsines. Les cathepsines majeures dans le muscle squelettique sont les cathepsines L, B, H et D. Les cathepsines sont capables de dégrader des protéines musculaires avec une spécificité pour les protéines membranaires et les substrats myofibrillaires particuliers, tels que la troponine, les chaînes lourdes de myosine ou la tropomyosine (Bechet et al., 2005). L'expression de la cathepsine L est augmentée dans des modèles d'atrophie musculaire (Komamura et al., 2003).

Dans les muscles squelettiques, l'autophagie est activée dans de nombreuses situations de stress, comme la mise à jeun (Sandri, 2010), la cachexie (Penna et al., 2013), la septicémie (Mofarrahi et al., 2012), l'immobilisation (Brocca et al., 2012) et la dénervation (O'Leary et al., 2012). De plus, une accumulation d'autophagosome a été observée dans presque toutes les myopathies (Malicdan et al., 2008). Cependant, bien que souvent associées à un effet négatif conduisant à l'atrophie musculaire, des études proposent que l'autophagie basale est nécessaire pour maintenir la masse musculaire et empêche l'atrophie. Un dysfonctionnement dans le système autophagique basal conduit à une diminution de la taille des fibres, associée à une diminution de la capacité à générer de la force (Masiero et al., 2009). L'autophagie est également augmentée par un exercice d'endurance ou de résistance en induisant des effets bénéfiques notamment sur l'homéostasie glucidique (Grumati et al., 2011; Jamart et al., 2012) et en activant beclin-1, un régulateur important de la formation de l'autophagosome.

L'absence de nutriments est un des principaux activateurs de l'autophagie. Cette induction est médiée par l'axe Akt/FoxO3a. L'absence de signalisation liée aux facteurs de croissance ou à l'insuline conduit à la suppression de l'activité d'Akt, et donc à la translocation de FoxO3a dans le noyau. FoxO3a initie alors la transcription de gènes liés à l'autophagie tels que ceux essentiels à la formation de l'autophagosome [Atg12], Atg4b, « gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein » (Gabarap1), LC3] et à la régulation de l'autophagie [Vps34, « BCL2/adenovirus E1B protein-interacting protein » (Bnip3), and Bnip3] (Figure 9) (Judge et al., 2014; Mammucari et al., 2007; Zhao et al., 2007).

De plus, AMPK serait impliqué dans la régulation de l'autophagie en phosphorylant et favorisant la translocation de FoxO3 dans le noyau ainsi qu'en phosphorylant et activant ULK1 (Sanchez et al., 2012). AMPK inhibe l'activité de mTOR qui peut réguler négativement l'autophagie via ULK1 (Kim et al., 2012).

I.4.3 AUTRES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'HOMÉOSTASIE MUSCULAIRE

I.4.3.1 La voie myostatine

La Mstn (ou « growth differentiation factor 8 », GDF8) est un membre de la superfamille des « transforming growth factor » (TGF β) qui régule négativement la croissance musculaire (Lee and McPherron, 2001). Chez les personnes saines, la croissance musculaire est limitée par plusieurs membres de la famille TGF β tels que la Mstn, l'Activine A, GDF11 ou le TGF β . Mstn se fixe sur le récepteur à l'activine de type I ou II (ActRIIA ou ActRIIB), le récepteur « activin-like kinase » 4 ou 5 (ALK-4 ou 5) ou encore sur le récepteur à TGF β (Busquets et al., 2012; Zhou et al., 2010). L'activation d'un de ces récepteurs induit la phosphorylation et l'activation des facteurs de transcription Smad 2/3, entraînant leur translocation dans le noyau et régulant l'expression de gènes cibles (McCroskery et al., 2003). L'activation de Smad 2/3 conduit à l'inhibition de la voie Akt et stimule la protéolyse (Figure 13) (Schiaffino and Mammucari, 2011; Zhou et al., 2010).

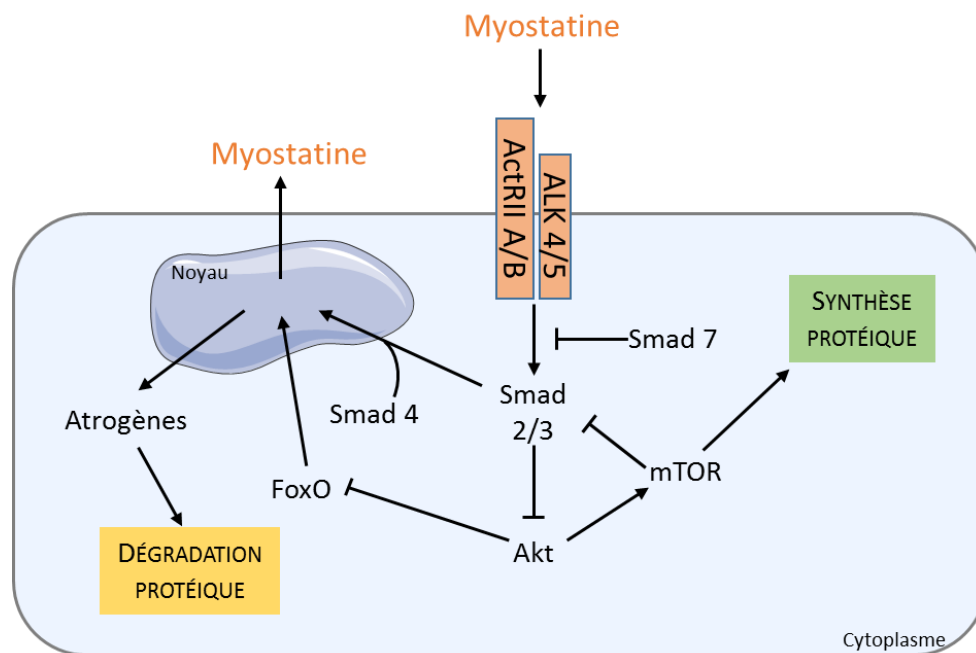


Figure 13: La voie myostatine dans la régulation de la masse musculaire.

Lorsque la Mstn se lie sur son récepteur, cela active le facteur de transcription Smad 2/3 qui va induire l'expression d'atrogènes et inhiber la synthèse protéique via Akt. D'après (Sartori et al., 2014).

La mutation génétique de la Mstn, ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs de la Mstn conduisent à une augmentation de la masse musculaire, un phénotype similaire chez plusieurs espèces telles que les souris, le bétail et les hommes (Amthor et al., 2007; Grobet et al., 1997; Lee, 2007; McPherron and Lee, 1997). La voie Mstn/Activine A est activée chez les patients présentant une atrophie musculaire (ex. une sarcopénie) et les niveaux de Mstn/Activine A sont augmentés chez les patients âgés (Baccarelli et al., 2001; Lach-Trifilieff et al., 2014; Shan et al., 2013).

Cependant les mécanismes mis en jeu sont mal connus pour le moment. Il semble néanmoins que l'IGF-I peut contrecarrer l'effet de la Mstn sur Akt lorsque ces derniers sont administrés simultanément (Trendelenburg et al., 2009). Cependant, il est difficile de déterminer si la Mstn régule directement les signaux atrophiques. En effet, certaines études indiquent que la Mstn réduit l'expression des atrogènes (Trendelenburg et al., 2012) tandis que d'autres études indiquent qu'elle induit l'expression de ces gènes (Lokireddy et al., 2012). Il semblerait également que mTORC1 exerce un contrôle négatif sur la voie Mstn puisque les niveaux de phosphorylation de Smad 2 sont augmentés lorsque mTOR est inhibé (Trendelenburg et al., 2012). L'inhibition de mTOR n'est pas suffisante pour empêcher l'augmentation de la synthèse protéique et l'hypertrophie associées à une inhibition de la Mstn (Sartori et al., 2009), suggérant l'implication d'autres mécanismes (Figure 13). L'activation de la Mstn peut conduire à une inhibition de la prolifération des cellules satellites et la différenciation des myoblastes en influençant l'expression de Pax7, MyoD1 et de la myogénine (Iezzi et al., 2004; McCroskery et al., 2003; McFarlane et al., 2008; Wagner et al., 2005).

Les mécanismes régulant la sécrétion de la Mstn sont peu connus. Les GC (Lang et al., 2001; Schakman et al., 2008a), FoxO1 et NF-KB (Sriram et al., 2011) ainsi que Smad 2/3 peuvent induire l'expression de la Mstn, et sa libération peut se faire de manière autocrine ou via la circulation (Figure 13).

Etant donné que l'expression de la Mstn et de son analogue l'Activine A est induite dans de nombreuses formes d'atrophie, de nombreux agents antagonistes ont été développés afin de déterminer leur effet sur la masse et force musculaire. La follistatine, un inhibiteur naturel de la Mstn, peut conduire à une augmentation de la masse musculaire et empêcher l'atrophie musculaire (Lee and McPherron, 2001) via une activation de la voie PI3K-Akt (Glass, 2005), des protéines « bone morphogenetic protein » (BMP) (Sartori et al., 2013), de PGC1 α et d'AMPK (Shan et al., 2013). D'autres inhibiteurs sont actuellement sur le marché, tels qu'un inhibiteur pharmacologique d'ActRIIB (Zhou et al., 2010), des anticorps liant la Mstn ou bloquant son récepteur (Bogdanovich et al., 2002; Lach-Trifilieff et al., 2014) ou encore le peptide recombinant de la Mstn qui agit comme un dominant négatif (Hamrick et al., 2010).

Les BMP sont des cytokines appartenant à la famille TGF β , qui se lient sur les récepteurs dédiés aux BMP (ex. ALK3). L'activation de ce récepteur va permettre la phosphorylation des protéines Smad sensibles aux BMP telles que Smad 1, 5 et 9 (Yu et al., 2008). De manière similaire à Smad 2/3, les protéines Smad dépendantes de BMP forment un complexe transcriptionnel avec Smad 4, induisant sa translocation dans le noyau et régulant la transcription des gènes cibles (Massague et al., 2005) (Miyazono and Miyazawa, 2002; Walsh et al., 2010). La voie BMP est négativement régulée par Smad 6 et 7, empêchant l'activation médiée par le récepteur de Smad 1/5/9 (Figure 14) (Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997). La voie BMP régule le développement musculaire embryonnaire (Amthor et al., 2007; Pourquie et al., 1996) ou la régénération du muscle squelettique (Ruschke et al., 2012). Deux études ont permis de déterminer l'implication de BMP dans la régulation de la masse musculaire chez l'adulte (Sartori et al., 2013; Winbanks et al., 2013).

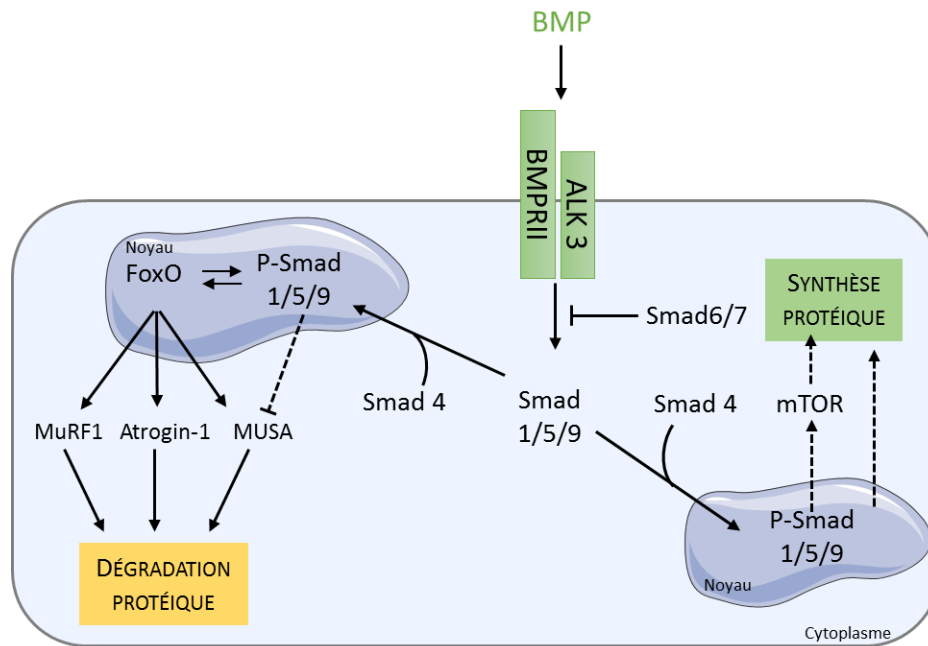


Figure 14: La voie BMP dans la régulation de la masse musculaire.

La voie BMP active Smad 1/5/9 qui inhibe l'expression de MUSA1 et ainsi diminue la dégradation protéique. L'activation de la voie BMP est suffisante pour induire la croissance musculaire en augmentant la synthèse protéique. D'après (Sartori et al., 2014).

Contrairement à la voie Mstn/Activine A - Smad 2/3, la voie BMP - Smad 1/5/9 est un régulateur positif de la masse musculaire, et protège de la fonte de la masse musculaire. Une balance entre les voies Mstn et BMP doit exister notamment en régulant la disponibilité de Smad 4. Lorsque la voie Mstn est augmentée, Smad 4 s'associe à Smad 2/3, conduisant à une réponse atrophique. Par contre, lorsque la voie Mstn est inhibée, Smad 4 va s'associer avec Smad 1/5/9, cela va induire une hypertrophie et/ou contrecarre l'atrophie musculaire. L'action anti-atrophique de BMP peut s'expliquer par l'effet négatif qu'il exerce sur MUSA1 (Sartori et al., 2013).

La complexité de la voie TGF β vient des régulations croisées entre la Mstn/Activine A - Smad 2/3 et BMP - SMAD 1/5/9. Certains ligands peuvent entrer en compétition pour un récepteur commun, ce qui favorise la formation de Smad mixtes telles que Smad 1/3/5 dont la fonction est encore inconnue (Donaldson et al., 1992; Gronroos et al., 2012; Sako et al., 2010).

1.4.3.2 La voie des MAPK

La famille des « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) est composée d'au moins 4 membres distincts dans le muscle squelettique : « extracellular signal-regulated kinase 1/2 » (ERK1/2), p38 MAPK, « c-Jun NH2-terminal kinase » (JNK) et ERK5 (Lu et al., 2009). Ces sont des serine/thréonine kinases activées par des facteurs de croissance (Force and Bonventre, 1998), le stress cellulaire, des cytokines inflammatoires (Kyriakis and Avruch, 2001) ou suivant les concentrations en glucose (Srinivasan et al., 2004) ou en acides gras libres (Collins et al., 2006).

L'exercice, étant lui-même une forme de stress cellulaire, active les voies de ERK1/2, p38, et de JNK dans le muscle squelettique dépendamment du type, du temps et de l'intensité de l'exercice (Figure 15). Bien qu'ERK5 est abondamment exprimé dans le muscle, son activité après un exercice n'a pas été

étudié (Goodyear et al., 1996; Widegren et al., 2001). La voie ERK1/2 est rapidement activée suite à un exercice d'endurance ou de résistance, aussi bien chez les rongeurs que chez l'Homme. Son niveau de phosphorylation corrèle avec l'intensité de l'exercice pour revenir à son niveau basal après l'arrêt de l'exercice (Nader and Esser, 2001; Widegren et al., 1998; Widegren et al., 2000; Williamson et al., 2003). L'expression d'ERK1/2 est également augmentée dans le muscle squelettique de souris soumises à un régime enrichi en lipides (Fatani et al., 2012).

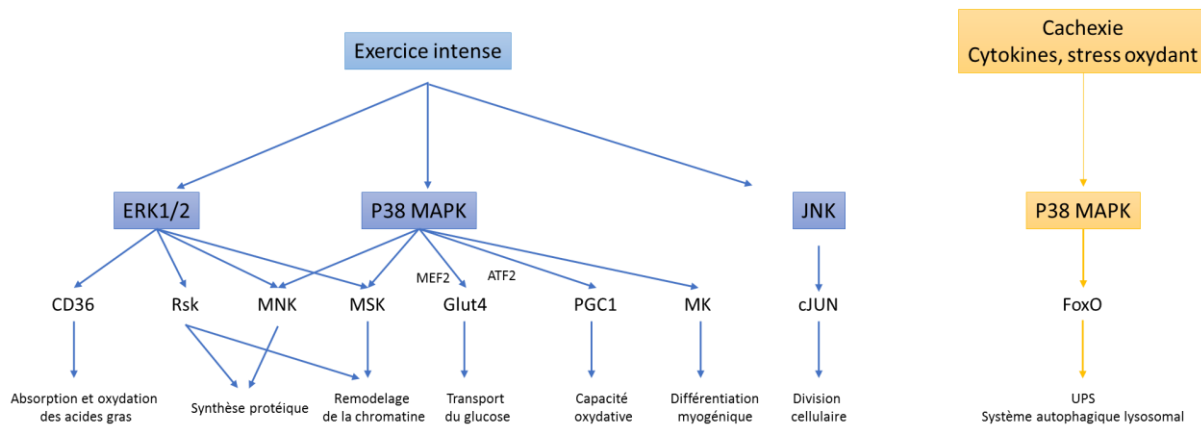


Figure 15: La voie MAPK dans la régulation de la masse musculaire.

Les voies MAPK contrôlent à la fois les métabolismes protidique, lipidique et glucidique, ainsi que la capacité oxydative, la différenciation myogénique et la division cellulaire après un exercice. La cachexie ou un stress active le système autophagique lysosomal. D'après (Kramer and Goodyear, 2007).

Certains types d'exercice, en particulier des exercices d'endurance tels que le marathon, mais également certains exercices de résistance, augmentent la phosphorylation de différentes isoformes de p38 (p38 α , p38 β , p38 δ , and p38 γ), chez l'Homme et les rongeurs. Des études suggèrent que l'activation des différentes isoformes de p38 par un exercice s'effectue d'une manière tissu-spécifique. Le rôle spécifique de ces isoformes dans le muscle est actuellement inconnu (Boppart et al., 2000; Nader and Esser, 2001; Wretman et al., 2001). Des protocoles d'exercice intense pouvant conduire à des dommages stimulent la voie JNK. La phosphorylation de JNK augmente proportionnellement à la force de contraction musculaire, suggérant que la tension musculaire totale plutôt que la durée de contraction influence l'activité de JNK (Martineau and Gardiner, 2001; Russ and Lovering, 2006).

Les MAPK phosphorylent de nombreux substrats impliqués notamment dans l'apoptose, la production de cytokine, le métabolisme, la prolifération cellulaire, l'hypertrophie, ou encore la régulation de la transcription. Les MAPK permettent au muscle squelettique de s'adapter à l'exercice en contrôlant notamment le statut redox, le métabolisme ou la régulation de l'expression de certains gènes dans le muscle.

Les MAPK, plus particulièrement p38, semblent être activées par l'augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) dans le muscle suite à un exercice (Figure 15) (Kim et al., 2006). Le rôle de p38 dans le contrôle du transport du glucose reste controversé. En effet, des études utilisant un antagoniste de p38 α et β indiquent qu'ils peuvent partiellement réguler le transport du glucose (Somwar et al., 2002), tandis que l'utilisation d'un dominant négatif de p38 dans le muscle squelettique montre que le transport du glucose n'est pas affecté (Antonescu et al., 2005). Il semble qu'ERK1/2 ainsi que JNK ne contrôlent pas les mécanismes responsables du transport du glucose ou de la synthèse du glycogène dans le muscle suite à l'exercice (Fujii et al., 2004; Hayashi et al., 1999). De plus, ERK1/2 régule *in vivo*

l'absorption d'acides gras dans le muscle suite à l'exercice, notamment via le recrutement de CD36, protéine liant les acides gras (**Figure 15**) (Raney and Turcotte, 2006).

Les MAPK peuvent moduler l'expression de nombreux gènes à travers deux mécanismes distincts, la phosphorylation de facteurs de transcription et le remodelage de la chromatine. L'activation par la contraction de JNK est associée à l'augmentation rapide du niveau d'ARNm de c-jun et c-fos, (Aronson et al., 1998), deux facteurs de transcription qui semblent permettre la régénération musculaire après l'exercice (**Figure 15**) (Karin and Gallagher, 2005). ERK phosphoryle directement les membres de la famille des kinases S6 ribosomales (Rsk), tandis que p38 phosphoryle les membres de la famille de « MAPK-activated protein kinase » (MK). ERK et p38 activent à la fois les « mitogen- and stress-activated kinase 1/2 » (MSK1/2) et les « MAP kinase-interacting kinase 1/2 » (MNK1) qui activent les facteurs de l'initiation de la traduction tels que eIF4E (**Figure 15**) (Ueda et al., 2004; Waskiewicz et al., 1997).

Il faut noter que le facteur « myocyte enhancer factor-2 » (MEF2), participant notamment à l'amélioration du transport du glucose via Glut4 après un exercice (McGee and Hargreaves, 2006), est activé par p38 (Yang et al., 1999). De plus, p38 via le facteur « activating transcription factor 2 » (ATF-2) peut induire, en réponse à l'exercice, l'expression du gène codant pour PGC-1 α impliqué notamment dans la régulation des capacités oxydatives du muscle (Akimoto et al., 2005). PGC-1 α contrôle la transcription des gènes impliqués dans le phénotype des fibres de type lentes en co-activant le facteur de transcription MEF2. PGC-1 α stimule également la biogenèse mitochondriale en co-activant les facteurs de respiration nucléaire (NRF-1 et NRF-2) (Puigserver and Spiegelman, 2003). Enfin, les MAPK peuvent également contribuer au remodelage de la chromatine en phosphorylant les résidus serine de l'histone H3, via l'activation de p90 Rsk et MSK1 après un exercice (Merienne et al., 2001).

D'autre part, dans des conditions atrophiques associées à un stress oxydant telles que la cachexie, l'activation de la voie p38 *in vivo* et *in vitro* augmente également l'expression des gènes de l'autophagie tels que Atg 6/7/12 et des atrogènes MuRF1 et Atrogin-1, via FoxO3a (**Figure 15**) (Li et al., 2005; McClung et al., 2010).

La voie p38 est également un régulateur important de la myogenèse et donc de la régénération musculaire. Lorsque p38 est activé dans le muscle, il phosphoryle par l'intermédiaire des MKs, une variété de substrat contribuant au processus myogénique (**Figure 15**), permettant *in fine* de réguler l'expression de gènes à un moment spécifique du développement myogénique. La voie p38 affecte l'activité des facteurs de transcription MEF2, MyoD1 et MRF4 et participe au remodelage de la chromatine (Keren et al., 2006; Lluís et al., 2006).

1.4.3.3 La voie NF- κ B

Les NF- κ B représentent une famille de cinq facteurs de transcription, composé de p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p52 et p50, tous étant exprimés dans le muscle squelettique.

Avant activation, les dimères de différents membres de la famille NF- κ B sont retenus dans le cytoplasme par les inhibiteurs de NF- κ B (I κ B). La voie NF- κ B est activée par de nombreux stimuli tels que des infections virales et bactériennes, des cytokines, des mitogènes, des facteurs de croissance ou encore des stress oxydatifs et biomécaniques. La phosphorylation des inhibiteurs I κ B par les protéines kinase I κ B α , β et γ (IKK α , β et γ) induit l'ubiquitination et la dégradation de la protéine inhibitrice I κ B.

Cela permet l'activation et la translocation des hétérodimères de NF- κ B dans le noyau (**Figure 16**) (Hayden and Ghosh, 2012).

La voie NF- κ B est requise dans l'atrophie musculaire induite par une immobilisation ou la cachexie mais ne semble pas impliquées dans la sarcopénie (Sakuma and Yamaguchi, 2012). En effet, l'inhibition de la voie de NF- κ B, en utilisant des dominants négatifs d'un acteur de la voie, abolit l'atrophie induite par la cachexie ou l'immobilisation (Cai et al., 2004; Mourkioti et al., 2006; Van Gammeren et al., 2009). Cependant les acteurs moléculaires intervenant dans ces deux types d'atrophie sont distincts. Lors d'une atrophie musculaire induite par la cachexie, les stimuli extérieurs impliquent des cytokines cataboliques, telles que TNF α , qui activent la voie classique de NF- κ B (Bonetto et al., 2012; Yamaki et al., 2012). Ceux responsables de l'atrophie musculaire induite par une immobilisation n'ont pas été identifiés mais ne semblent pas faire partie de modulateurs immunitaires (Hunter et al., 2002). De plus, la voie activée lors d'une immobilisation fait intervenir un complexe non classique impliquant p50 et Bcl-3, un coactivateur (CoA) transcriptionnel. L'activation de la voie NF- κ B par ces stimuli conduit à une atrophie musculaire en augmentant l'expression de plusieurs composants de l'UPS ou du système autophagique (Cai et al., 2004; Mourkioti et al., 2006; Salminen et al., 2012) et de protéines pro-inflammatoires (Kumar et al., 2004). La voie NF- κ B, en interférant avec le processus de myogenèse, empêche aussi la régénération des muscles atrophiés (**Figure 16**) (Mourkioti et al., 2006). Cependant, il faut noter que tous les gènes cibles de NF- κ B lors des deux types d'atrophies ne sont pas encore identifiés et il semblerait que certains processus soient indépendants de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Jackman et al., 2013).

De nombreuses études ont suggéré que l'exercice augmente les activités de NF- κ B en agissant à différents niveaux, notamment sur la phosphorylation de IKK α/β et la phosphorylation de I κ B α pendant l'exercice et sur la liaison de NF- κ B à l'ADN après l'exercice (Ho et al., 2005; Ji et al., 2004). Cependant les fonctions qu'exerce NF- κ B pendant l'exercice restent inconnues. Il semble néanmoins que NF- κ B peut contrecarrer les effets du stress oxydatif induit par l'exercice en augmentant la transcription de gènes anti-oxydant tels que la manganese superoxide dismutase (MnSOD), l'oxyde nitrique synthase (NOS) et la glutamate cystéine ligase (GCL) (Hollander et al., 2001; Ji et al., 2006). NF- κ B peut également induire une brève réponse inflammatoire indispensable à la régénération musculaire à la suite de l'exercice (Evans and Cannon, 1991). Une dernière possibilité consiste en la régulation par NF- κ B du transport du glucose, de la réserve en glycogène et de l'oxydation des lipides après exercice via l'induction du gène IL-6. (Ostrowski et al., 1998; Petersen and Pedersen, 2005; Spangenburg et al., 2006).

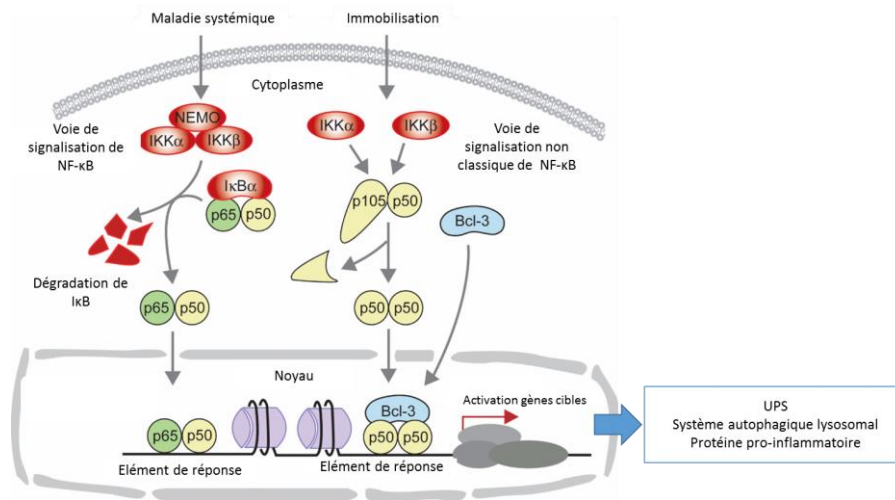


Figure 16: La voie NF-κB dans la régulation de la masse musculaire.

Les signaux extracellulaires permettent l'activation du facteur de transcription NF-κB qui transloque dans le noyau et se lie sur des éléments de réponse à NF-κB afin d'induire l'expression de gènes cibles. D'après (Jackman et al., 2013).

1.4.3.4 Les cytokines pro-inflammatoires

De nombreuses cytokines pro-inflammatoires, telles qu'IL-6, TNF α , IL-1 et interféron γ (IFN γ) sont également induites dans des conditions cataboliques, et peuvent participer à l'atrophie musculaire probablement en stimulant l'action de NF-κB et FoxO (De Larichaudy et al., 2012; Yamaki et al., 2012) et en régulant les gènes MuRF1 et Atrogin-1 (Baracos et al., 1995; Bossola et al., 2003; Mittal et al., 2010). Cependant leur rôle dans la fonte de la masse musculaire reste controversé et mal élucidé. L'une des cytokines inflammatoires appartenant à la famille TNF, « TNF-like weak inducer of apoptosis » (TWEAK), semble être fortement impliquée dans l'atrophie musculaire, causant l'activation de NF-κB en se fixant au récepteur de surface FN14 (Lang et al., 2001).

1.4.3.5 Le stress oxydatif

L'homéostasie redox apparait également comme étant un régulateur clé dans la plasticité musculaire suite à un exercice ou dans des maladies métaboliques. Plusieurs voies de signalisation essentielles pour la contraction ou l'adaptation du muscle sont activées suite à l'augmentation de la production de ROS ou de dérivés réactifs du nitrogène (RNS). Le muscle squelettique possède un équilibre redox entre la génération de ROS/RNS et les défenses antioxydantes qui peuvent être modifiées en fonction des conditions physiologiques du muscle (Espinosa et al., 2016). Une dérégulation de cet équilibre a été observée dans de nombreux désordres métaboliques, tels que les cancers, la neurodégénérescence, l'obésité ou le diabète. De nombreuses protéines ou facteurs de transcription sont directement ou indirectement régulés par la concentration de ROS/RNS comme NF-κB, SERCA ou encore RyR1 (Goljanek-Whysall et al., 2016).

L'exercice induit à la fois une augmentation de la production de ROS et la synthèse d'enzymes antioxydantes telles que MnSOD, aboutissant à l'activation de nombreuses voies nécessaires à l'adaptation du muscle à l'exercice. L'action de ces enzymes sera néanmoins contrecarrée par la production massive de ROS (Merry and Ristow, 2015; Powers et al., 2011). Les ROS participent notamment à la biogenèse mitochondriale observée en augmentant l'expression de PGC-1 α (Kang et

al., 2009). Lors des dernières décennies, des études ont démontré que les ROS sont induits en réponse à un stimulus physiologique tel que l'insuline et semblent nécessaires à l'absorption du glucose (Higaki et al., 2008) et à la translocation de Glut4 (Contreras-Ferrat et al., 2014) dans les muscles squelettiques.

L'inactivité induit également la production de ROS, conduisant à l'atrophie musculaire observée dans des situations de cachexie ou de sarcopénie. Le niveau des ROS est augmenté au cours d'une atrophie musculaire, tandis que le niveau des enzymes antioxydantes est diminué (Bowen et al., 2015). Les ROS stimulent la mort cellulaire apoptotique après avoir endommagé les lipides cellulaires, les protéines et l'ADN (Siu et al., 2009). L'effet des ROS est médié principalement par le facteur de transcription NF- κ B. Les ROS ont la capacité d'augmenter l'expression des gènes impliqués dans l'UPS, notamment l'expression d'E3 ubiquitine ligases qui corrélient avec une augmentation de l'activité du protéasome et une diminution du niveau de myosine présent dans la cellule (Li et al., 2003). Ainsi les ROS sont impliqués dans l'adaptation du muscle squelettique en conditions physiologiques et pathologiques.

1.4.3.6 La voie des récepteurs couplés aux protéines G

Indépendamment de l'activation de mTOR via la signalisation d'IGF-I, une voie émergente dans la régulation de la masse musculaire est la voie qui implique les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Jean-Baptiste et al., 2005). Après la liaison d'un ligand, les récepteurs GPCR changent de conformation, permettant le recrutement d'une protéine G hétéro-trimérique intracellulaire et l'activation de la voie de signalisation. Certains de ces GPCR activent l'adénylyl cyclase, qui produit de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP). Ce dernier va permettre la dissociation de la sous unité catalytique de la protéine kinase A (PKA) dépendante du cAMP, diffusant dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles (Berdeaux and Stewart, 2012). L'activation de certains GPCR, tels que le récepteur « corticotropin releasing hormone receptor 2 » (CRFR2), « β -2 adrenergic receptor-Gs protein » (B2AR), « frizzled class receptor 7 » (FZD7) et le récepteur à l'acide lysophosphatidique (LPA), conduit à une hypertrophie du muscle squelettique (Berdeaux and Stewart, 2012). L'équipe de Minetti *et al.* a démontré que la protéine Gai2 est essentielle pour l'hypertrophie médiée par le récepteur au LPA, puisque la surexpression de Gai2 est suffisante à induire une hypertrophie (Minetti et al., 2011).

Les protéines G exprimées dans de nombreux tissus sont constituées d'une sous unité alpha ($G\alpha$) et d'un hétérodimère composé d'une sous-unité beta et d'une sous-unité gamma ($G\beta\gamma$). Une fois activée, la sous- unité α lie un GTP, libérant l'hétérodimère $G\beta\gamma$ et permettant la transduction du signal. Parmi les 4 classes de sous-unités $G\alpha$, seul les Gai (Gai1, Gai2 et Gai3) sont capables de réguler des médiateurs de signalisation clés tels que la phospholipase C (PLC) et la protéine kinase C (PKC) (Wettschureck and Offermanns, 2005). L'activation de Gai2 est suffisante pour activer la phosphorylation des cibles de mTOR telles que S6K1 et GSK3 β , alors que la voie PI3K/Akt, n'est pas affecté (Minetti et al., 2011). Ainsi, ces résultats proposent l'existence d'un nouveau mécanisme pour les voies de signalisation de l'hypertrophie, médié par Gai, indépendant de PI3K et Akt (**Figure 17**).

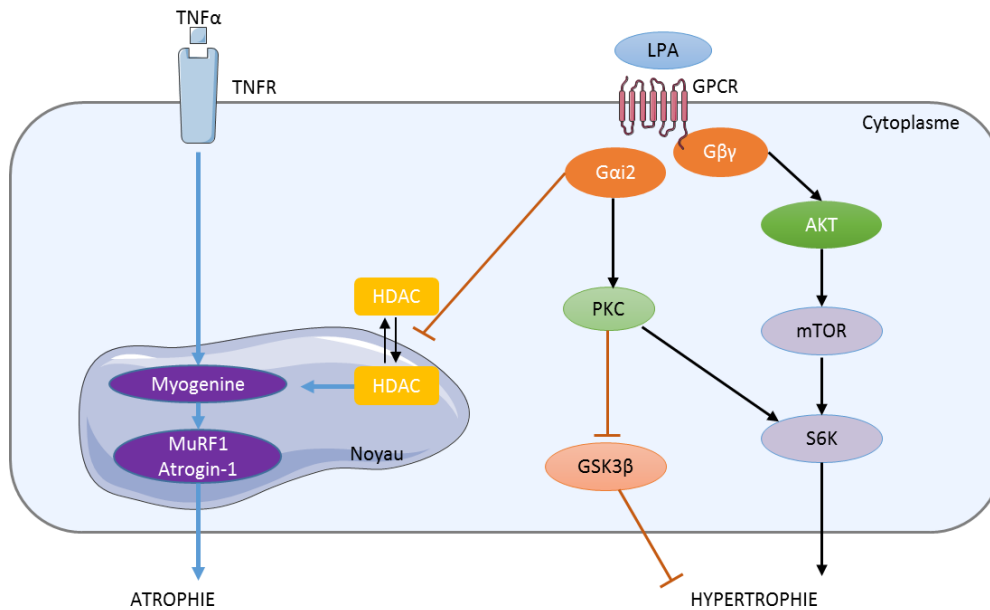


Figure 17: La voie des récepteurs couplés aux protéines G dans la régulation de la masse musculaire.

L'activation de la signalisation médiée par les protéines G permet une croissance musculaire en augmentant la synthèse protéique et en diminuant la dégradation protéique dans certains types d'atrophie musculaire. D'après (Minetti et al., 2011).

En plus de son rôle dans l'hypertrophie, la voie des GPCR peut avoir un effet direct sur les voies cataboliques. En effet, des études suggèrent que les ligands de GPCR permettent la résistance à l'atrophie dans plusieurs modèles d'atrophie musculaire, tels que l'immobilisation et la sarcopénie (Carter 1994, Kline 2007). La surexpression de Gαi2 peut bloquer l'augmentation de l'expression des deux atrogènes MuRF1 et l'Atrogin-1 dans le cas d'une atrophie musculaire induite par les voies TNFα. Bien que l'activité de PKC ne soit pas altérée dans cette situation, Gαi2 favorise la localisation cytoplasmique des histones désacétylases (HDAC), empêchant leur activité nucléaire (Figure 17). Enfin, Gαi2 favorise la différenciation et la fusion des myotubes (Minetti et al., 2011).

1.4.3.7 La voie AMPK

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase capable de déterminer le niveau énergétique cellulaire, et son activité est régulée par le ratio AMP/ATP. AMPK coordonne la balance entre la disponibilité en nutriment et la demande énergétique. L'activation d'AMPK agit rapidement sur des processus métaboliques clés dans le muscle squelettique en augmentant l'absorption du glucose et l'oxydation des acides gras, ainsi qu'en diminuant la synthèse protéique. De plus, AMPK est impliqué dans des changements métaboliques à plus long terme en intervenant notamment dans la biogenèse mitochondriale (Mounier et al., 2015).

Au cours de l'exercice ou en réponse à une déplétion en énergie, l'activité de l'AMPK est augmentée afin de favoriser notamment l'absorption du glucose sanguin en stimulant la translocation de Glut4 à la membrane dans le muscle et en augmentant l'expression de Glut4 en phosphorylant HDAC5 (Fujii et al., 2000; Lai et al., 2014; Mounier et al., 2015). AMPK favorise également l'oxydation des acides gras en phosphorylant et réduisant l'activité de l'acétyl-coenzymeA carboxylase (ACC), une enzyme clé dans la régulation de l'oxydation des acides gras (Figure 18) (O'Neill et al., 2014).

AMPK peut également réguler négativement mTOR grâce à plusieurs mécanismes. AMPK, en phosphorylant les résidus Thr₁₂₂₇ et Ser₁₃₄₅ de TSC2, permet l'activation de TSC2, inhibant l'activité de mTOR (Bolster et al., 2002; Inoki et al., 2002). De plus AMPK peut phosphoryler directement Raptor sur le résidu Ser₇₉₂ (Gwinn et al., 2008), empêchant la liaison et la phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1. L'activation d'AMPK réduit la synthèse protéique en bloquant l'activité de mTOR (**Figure 18**).

AMPK intervient dans la biogenèse mitochondriale en phosphorylant et activant PGC-1 α (Wu et al., 1999). De plus, AMPK active le facteur de désacétylation SIRT-1, un senseur énergétique dont une des cibles est PGC-1 α (Gurd, 2011). AMPK via l'activation de FoxO3a (Greer et al., 2007) favorise la transcription d'atrogènes tels que MuRF1 et Atrogin-1 (Nakashima and Yakabe, 2007), ainsi que de LC3, Gabarap1, et Beclin1 (**Figure 18**) (Sanchez et al., 2012).

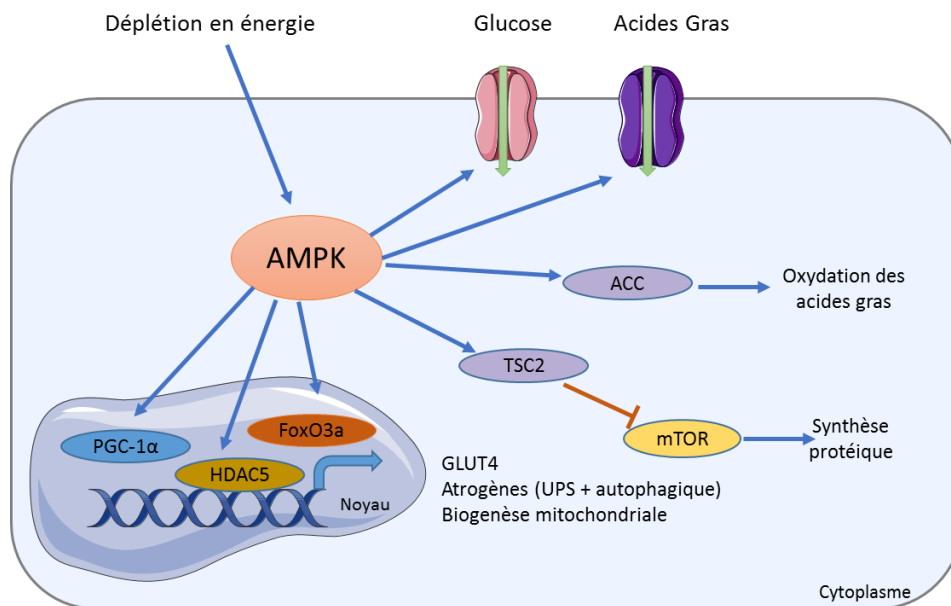


Figure 18: La voie AMPK dans la régulation de la masse musculaire.

Après une déplétion en énergie notamment lors d'un exercice, AMPK est activé ce qui favorise l'assimilation de glucose et d'acides gras, ainsi que l'expression de GLUT4 via HDAC5 et l'oxydation des acides gras. De plus AMPK régule négativement la synthèse protéique et contrôle l'expression de gènes impliqués dans la dégradation protéique ainsi que dans la biogenèse mitochondriale via FoxO3a et PGC-1 α respectivement. D'après (Mounier et al., 2015).

Ainsi l'intégration de toutes ces voies de signalisation permet une régulation de la masse musculaire. Un schéma récapitulatif est présenté en (**Figure 19**). L'activation par l'IGF-I de la voie PI3K-Akt-mTOR conduit à la synthèse protéique et diminue l'expression d'E3 ubiquitine ligases, ainsi que de gènes impliqués dans le système autophagique-lysosomal. La voie des GPCR induit la synthèse protéique sans passer par Akt. La voie BMP favorise également la synthèse protéique et contrebalance l'effet de la voie de la Mstn qui régule négativement la masse musculaire via Smad 2/3. La voie NF- κ B active les gènes protéolytiques dans des conditions d'inflammation de même que la voie des MAPK. En revanche, la voie des MAPK peut également favoriser la synthèse protéique, notamment via les MNK.

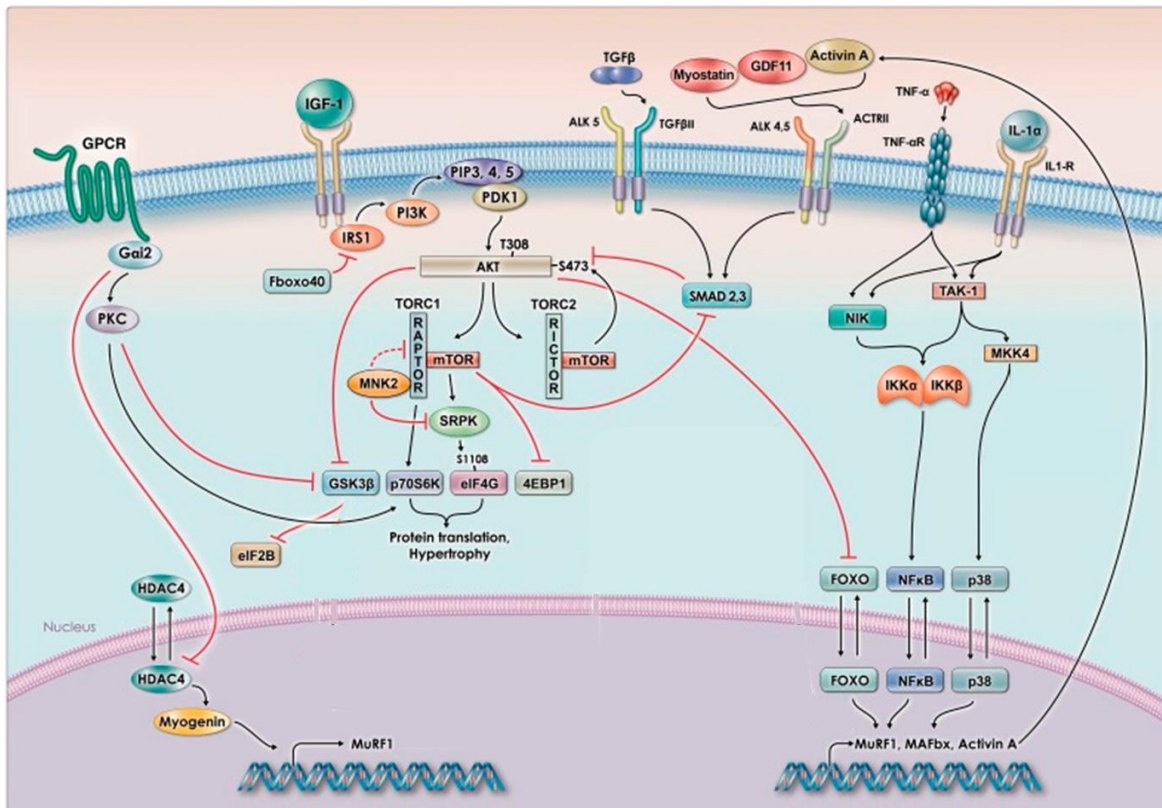


Figure 19: Les voies principales dans la régulation de la masse musculaire.

En fonction des signaux extérieurs, les voies IGF-PI3K-Akt, des protéines G, de la myostatine, de NF- κ B et des MAPK participe à la régulation de la masse musculaire. D'après (Egerman and Glass, 2014).

Ces voies de régulations traduisent la complexité des mécanismes nécessaires au maintien de la masse musculaire. L'intégration des signaux extracellulaire permet une régulation spécifique des voies décrites ci-dessus afin d'aboutir à une réponse musculaire adéquate.

II. HORMONES STÉROÏDIENNES DANS LA REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE

II.1 GLUCOCORTICOÏDES : ACTION DANS L'ORGANISME

II.1.1 BIOSYNTHESE DES GLUCOCORTICOÏDES

Les GC sont des hormones stéroïdiennes exerçant un rôle pléiotropique en contrôlant plusieurs processus physiologiques et biochimiques et plus particulièrement le maintien de l'homéostasie. Les GC augmentent la production de glucose en favorisant la libération d'acides aminés des tissus périphériques et en stimulant la néoglucogenèse hépatique. Les GC inhibent également l'absorption du glucose dans les tissus à l'exception du cœur et du cerveau, et favorisent la lipolyse et la protéolyse. Les GC possèdent de puissantes propriétés anti-inflammatoires en supprimant la réponse immunitaire. Ils jouent également un rôle dans la synchronisation du rythme circadien, dans le développement, et dans le maintien du tonus cardiovasculaire (Figure 20) (Granner et al., 2015).

II.1.1.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Les GC (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez le rongeur) sont sécrétés par le cortex surrénalien suite à l'activation de l'axe corticotrope ou axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA). L'axe HPA se compose de trois structures principales: l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales. L'activation de cet axe est permise en réponse à des facteurs tels que le rythme circadien, la prise alimentaire, le système immunitaire et les réponses allostatiques, permettant le retour à l'homéostasie. Les GC sont sécrétés en réponse à un stress ou en fonction du rythme circadien. L'axe HPA exerce une activité circadienne sur la production de GC, stimulant la sécrétion de GC lors de la période active et l'inhibant pendant la période d'inactivité. Ainsi la sécrétion de GC atteint un niveau maximum le matin chez l'Homme ou le soir chez le rongeur (Lightman and Conway-Campbell, 2010).

L'activation de l'HPA est initiée par l'hypothalamus qui reçoit des informations du système limbique. Le noyau paraventriculaire sécrète de la corticolibérine et de l'arginine-vasopressine, stimulant la libération d'hormones adrénocorticotropes (ACTH) par l'antéhypophyse. L'ACTH circulant se lie sur son récepteur dans le cortex des glandes surrénales stimulant la biosynthèse et la libération de cortisol dans la circulation sanguine (Figure 20) (Chung et al., 2011; Lupien et al., 2009; Watts, 2005).

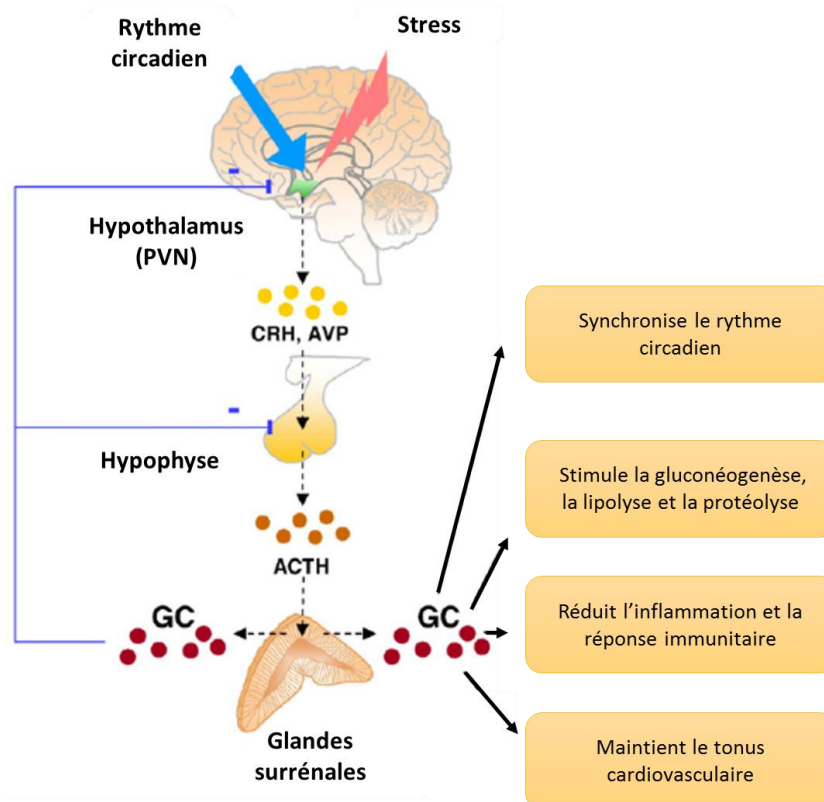


Figure 20 : Régulation neuroendocrinienne de la sécrétion des GC et de leurs principaux rôles physiologiques.

La synthèse des GC est régulée par l'axe HPA. Lorsque certains signaux neurochimiques arrivent à l'hypothalamus, le noyau paraventriculaire (PVN) libère de la corticolibérine (CRH) et de l'arginine-vasopressine (AVP). L'ACTH produite par l'hypothalamus induit la production de GC par le cortex des glandes surrénales. D'après (Chung et al., 2011).

Les glandes surrénales sont composées de deux parties :

- (i) la médullosurrénale qui sécrète l'adrénaline et la noradrénaline
- (ii) la corticosurrénale qui contribue à la synthèse des hormones stéroïdiennes.

La corticosurrénale est divisée en 3 zones comprenant la zone fasciculée qui synthétise les GC, la zone glomérulée qui synthétise les minéralocorticoïdes (aldostérone) et la zone réticulée qui synthétise les déhydroépiandrostérone (DHEA) et les hormones sexuelles (testostérone chez l'Homme, et oestrogène et progestérone chez la femme) (Smith and Vale, 2006).

Le cholestérol est converti en prégnénolone qui est ensuite métabolisée en progestérone ou en 17-hydroxyprogestérone. La 21-hydroxylase forme la 11-désoxycorticostérone chez le rongeur et la 11-désoxycortisol chez l'Homme, formes inactives de GC (Taves et al., 2011). En effet, les rongeurs ne possèdent pas la 17-hydroxylase, nécessaire à la formation du 11-désoxycortisol (**Figure 21**).

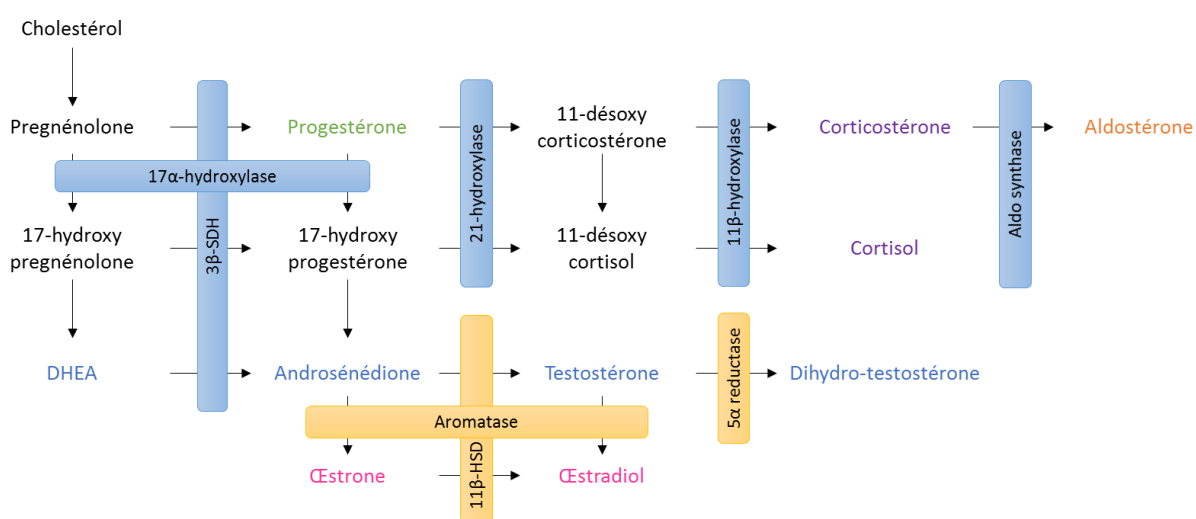


Figure 21 : Synthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol.

Le cholestérol est clivé pour former des GC (violet), des minéralocorticoïdes (orange), des progestatifs (vert) grâce à l'action d'enzymes spécifiques des glandes surrénales (rectangle bleu). Il produit également du DHEA permettant la formation d'androgènes (bleu) et d'œstrogènes (rose). Les enzymes nécessaires à la formation d'hormones sexuelles ne sont pas présentes dans les glandes surrénales (rectangle orange).

II.1.1.2 Régulation de la disponibilité en glucocorticoïdes.

Une fois relargués dans la circulation systémique, les GC, hormones lipophiles, se retrouvent à 95% sous leur forme inactive et liés principalement à une protéine de transport, la « corticosteroid binding globulin » (CBG). Une faible fraction se retrouve sous forme active et libre, ayant directement accès aux tissus cibles (Klieber et al., 2007).

L'action des GC est régulée au niveau intracellulaire par les deux isoenzymes 11β-hydroxystéroïde déshydrogénases (11βHSD) de type 1 et 2 qui catalysent les réactions d'interconversion entre les formes actives (cortisol ou corticostérone) et inactives (11-désoxycortisol ou 11-désoxycorticostérone, respectivement). La 11βHSD de type 1, est présente dans de nombreux tissus cibles de GC, tels que le foie, le tissu adipeux et le système nerveux central. Elle possède une action réductase prédominante, catalysant principalement la conversion de la forme inactive de GC en forme active. La 11βHSD de type 2, est présente dans les tissus périphériques cibles de l'aldostérone et elle possède une activité

déshydrogénase, inactivant le cortisol ou la corticostérone afin de favoriser l'action de l'aldostérone dans ces tissus (Wyrwoll et al., 2011).

II.1.2 MODE D'ACTION DES GLUCOCORTICOÏDES

II.1.2.1 Les récepteurs intracellulaires aux glucocorticoïdes.

Les actions des GC sur les cellules cibles sont médiées par des récepteurs de deux types : les récepteurs de type 1 aux minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs de type 2 aux GC (GR), régulant notamment la balance électrolytique et la néoglucogenèse, respectivement. Les récepteurs MR sont exprimés dans les tissus cibles de l'aldostérone tels que le côlon, les reins, les glandes sudoripares et salivaires, mais aussi au niveau du système nerveux central (hippocampe) et des structures cardiovasculaires (Hawkins et al., 2012; Martinerie et al., 2013). L'expression des GR est ubiquitaire, mais leur densité varie considérablement entre les types cellulaires (Bamberger et al., 1996; Kadmiel and Cidlowski, 2013). Ces deux récepteurs appartiennent à la famille multigénique des récepteurs nucléaires (NR).

L'affinité de MR et GR pour les GC est différente. Bien que MR lie principalement l'aldostérone, il fixe également avec une forte affinité les GC (constante de dissociation $K_d = 0,1-0,3$ nM). Le GR présente une forte affinité pour les GC de synthèse (dexaméthasone), mais lie les GC endogènes avec une affinité dix fois moins forte que celle des MR ($K_d = 2-5$ nM) (Pearce, 1994; Reul and de Kloet, 1985). Ces différences de localisation et d'affinités entre les deux types de récepteurs leur confèrent un rôle distinct. En raison de leur forte affinité aux GC, les MR sont occupés à 80 %, même avec de faibles concentrations de GC endogènes. En opposition au MR, la saturation des GR ne peut avoir lieu qu'en cas d'hypersécrétion de GC, lors des pics quotidiens ou après un stress. Ainsi, les MR réguleraient le tonus basal de l'activité de l'axe HPA, tandis que la plupart des effets biologiques périphériques des GC impliquent leur interaction avec GR (Baker et al., 2013; Devenport et al., 1989; Reul and de Kloet, 1985).

II.1.2.2 Classification et organisation des récepteurs nucléaires

Les NR sont des membres de la famille multigénique des facteurs de transcription présents chez tous les métazoaires. Les NR régulent la transcription de nombreux gènes, et sont impliqués dans de nombreux processus biologiques, tels que le développement, la reproduction et le métabolisme. Les NR sont regroupés en plusieurs sous-familles, classées suivant l'affinité de liaison au ligand (Chawla et al., 2001), ou suivant l'alignement des séquences et leur relation évolutionnelle (Germain et al., 2006). Depuis 2006, une nouvelle classification a été proposée, basée sur leur rôle physiologique (Bookout et al., 2006).

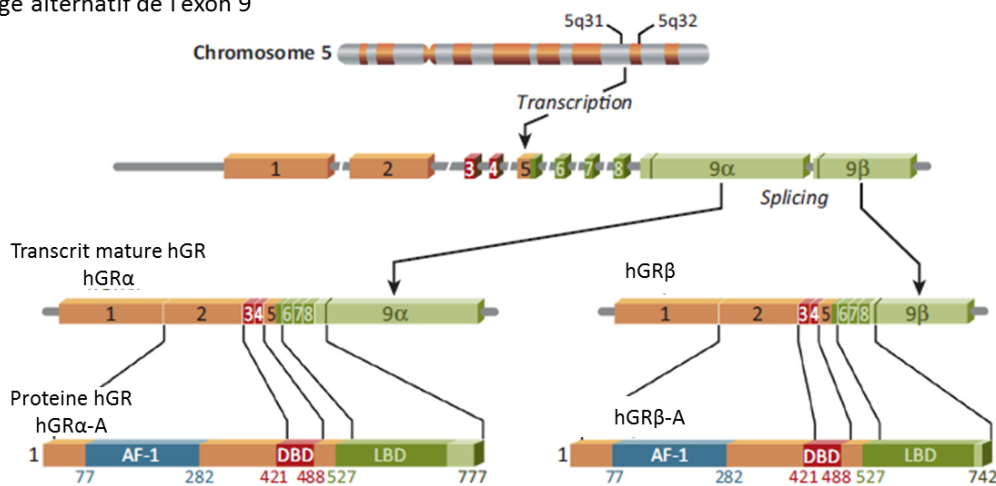
Les NR partagent une structure modulaire commune agencée en 5 ou 6 domaines, définis d'après leur homologie de séquence et leurs fonctions, détaillées dans la partie II.1.2.3. Les NR stéroïdiens, tels que MR, GR, le récepteur à la progestérone (PR), le récepteur aux œstrogènes (ER) et le récepteur aux androgènes (AR) forment des homodimères. Cependant, de nombreux NR forment des hétérodimères avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR), permettant une régulation plus fine. Les NR sont d'importantes cibles pharmacologiques pour le traitement de pathologies majeures (cancer, diabète, obésité, syndrome de résistance hormonale, etc.). L'utilisation de « selective nuclear receptor modulators » (SNuRMs) permet de moduler sélectivement l'activité des NR, en fonction de l'action souhaitée et du tissu cible. Bien que, pour plusieurs de ces récepteurs, une interaction avec un ligand

soit nécessaire à leur activation, il existe des récepteurs définis comme orphelins, pour lesquels aucun ligand n'a été identifié (Evans and Mangelsdorf, 2014; Germain et al., 2006; Gronemeyer et al., 2004).

II.1.2.3 Le récepteur des glucocorticoïdes

Le gène codant pour GR est situé sur le bras long du chromosome 5 (5p31), et est composé de 9 à 11 exons. L'épissage alternatif de l'exon 9 de GR produit majoritairement les isoformes GR α et GR β . L'isoforme GR α est la forme majoritaire de GR et effectue la navette entre le cytoplasme et le noyau. L'isoforme GR β réside constamment dans le noyau et agit comme un dominant négatif inhibiteur du GR α . Il peut également réguler la transcription de gènes cibles qui ne sont pas régulés par le GR α . D'autres isoformes peuvent être générées. Toutes ces isoformes lient les GC avec des affinités similaires mais possèdent des activités transcriptionnelles différentes (Figure 22) (Kadmiel and Cidlowski, 2013).

Epissage alternatif de l'exon 9



Initiation alternative de la traduction

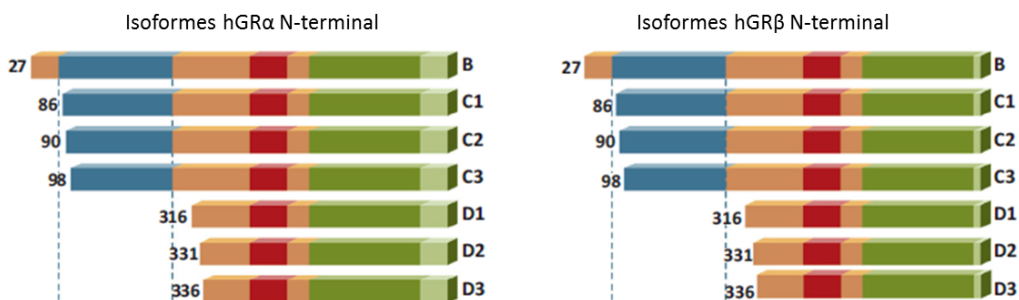


Figure 22: Localisation génomique et organisation de GR chez l'Homme.

GR humain (hGR) est localisé sur le chromosome 5. GR subit un épissage alternatif de l'exon 9 afin de générer les isoformes hGR α et hGR β . Chaque isoforme peut également subir une initiation alternative de la traduction de l'exon 2 pour générer d'autres isoformes avec des formes tronquées de la partie N-terminale du récepteur. D'après (Kadmiel and Cidlowski, 2013).

GR comprend 6 domaines désignés de A à F (Figure 23) (Encio and Detera-Wadleigh, 1991; Panek et al., 2013).

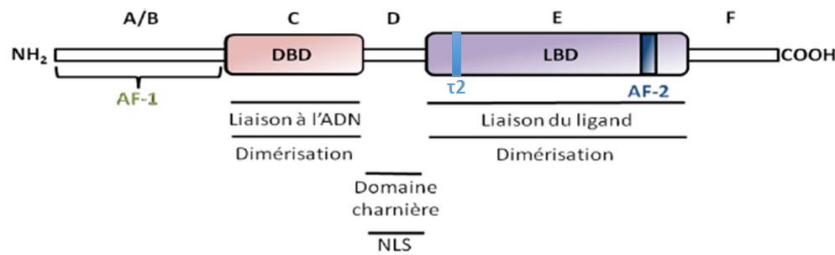


Figure 23 : Organisation structurale et fonctionnelle de GR.

Les domaines A/B contiennent la fonction de transactivation AF-1. Le domaine C ou domaine de liaison à l'ADN (DBD) va reconnaître des éléments de réponse aux hormones, via des structures à doigt de zinc. Ce domaine permet également la dimérisation des récepteurs. Le domaine D ou région charnière relie les domaines N-terminaux et C-terminaux et contient le signal de localisation nucléaire. Le domaine E ou le domaine de liaison au ligand (LBD) est une poche hydrophobe qui assure la liaison du ligand sur le récepteur et la dimérisation du récepteur. Il possède également une fonction de transactivation AF-2. La fonction du domaine F reste mal connue. D'après (Granner et al., 2015; Gronemeyer et al., 2004).

Le domaine A/B ou région N-terminale contient des sites antigéniques et une fonction de transactivation AF-1 qui, lorsqu'il est délété, conduit à une diminution de l'activité de GR. Cette région contient de nombreux sites de phosphorylation permettant la régulation de l'activité du récepteur grâce à des modifications post-traductionnelles (voir II.1.2.5). Le domaine AF-1 est particulièrement important pour le recrutement de CoA impliqués dans l'activation de la machinerie transcriptionnelle. D'autres domaines impliqués dans l'activation de la transcription sont localisés dans le domaine E (ex. AF-2 et $\tau 2$) et dans le domaine C (Gallagher-Beckley and Cidlowski, 2009).

Le domaine C ou domaine de liaison à l'ADN (DBD) est un segment d'environ 75 acides aminés très conservés. Il est formé de deux structures en doigt de zinc. Le premier doigt de zinc permet la liaison à l'ADN tandis que la deuxième permet de stabiliser cette interaction. La reconnaissance aux sites de liaison aux GC (GBS) présents sur l'ADN est permise grâce à un segment de trois acides aminés (Glycine-Sérine-Valine) appelé « P-box ». Le DBD est présent dans tous les NR, et est essentiel pour la reconnaissance spécifique des éléments de réponse aux NR sur l'ADN. Le DBD contient également une région appelée « D-box », localisée à la base du deuxième doigt de zinc permettant la dimérisation et la liaison coopérative de deux GR sur un GBS. Une mutation du domaine de dimérisation empêche la liaison coordonnée de GR sur les deux demi-sites qui composent le GBS et réduit l'activité de GR (Luisi et al., 1991).

Le domaine D ou région charnière relie les domaines N-terminaux et C-terminaux et contient un signal de localisation nucléaire.

Le domaine E/F ou domaine de liaison au ligand (LBD) présente des différences de structure entre les NR permettant la fixation sélective du ligand. Outre sa fonction de liaison au ligand, le LBD est également responsable de la localisation nucléaire, de la liaison à la protéine de choc thermique, (HSP90), de la dimérisation et d'une fonction de transactivation via la présence d'AF-2 et $\tau 2$ (Picard et al., 1988). Les LBD sont composés de 12 hélices α et deux brins β antiparallèles. Lorsqu'un ligand se fixe, l'hélice H12 se replie et ferme le site de fixation au ligand, entraînant la compaction générale du LBD. Ces réarrangements conformationnels rendent le domaine de transactivation AF-2 accessible pour fixer des CoA transcriptionnels (Wurtz et al., 1996).

II.1.2.4 Mécanismes d'action du récepteur aux glucocorticoïdes

En l'absence de ligand, GR est présent dans le cytoplasme de la cellule sous forme de monomère, et est lié à des cofacteurs tels que les intégrines, les immunophilines « FK506 binding protein 5 » (FKBP51) et des protéines appartenant à la famille HSP90. Ce complexe de protéines chaperonnes stabilise et maintient GR dans une conformation de haute affinité pour les GC et réprime son activité transcriptionnelle (**Figure 24**) (Jaaskelainen et al., 2011; Pratt and Toft, 1997).

La liaison des GC à leur récepteur induit un changement conformationnel et une hyperphosphorylation de GR. Cela provoque la dissociation du complexe récepteur-protéines chaperonnes et permet une exposition du signal de localisation nucléaire (Vandevyver et al., 2012). GR est transloqué dans le noyau où il interagit avec l'ADN généralement sous forme d'homodimère, au niveau des GBS. Il va moduler la transcription de gènes cibles soit positivement en se fixant sur des éléments de réponse positifs (GRE), soit négativement selon deux mécanismes distincts : GR peut se fixer à des éléments de réponse négatifs (nGRE) ou interagir avec d'autres facteurs de transcription sous forme de monomère (John et al., 2011; Reddy et al., 2009). Classiquement, on divise les GBS en trois groupes, les GRE simples, les GRE combinés et les éléments « tethering » (**Figure 24**) (Newton and Holden, 2007).

Les GRE simples sont les premiers à avoir été décrits. Ce sont des éléments de réponse palindromiques inversés composés de deux séquences nucléotidiques hexamériques séparées par 3 paires de base appelés « inverted repeat 3 » (IR3). La séquence consensus est définie comme une séquence canonique de 15 paires de base (pb) : 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' et est associée typiquement à l'activation de la transcription (Beato, 1991; Meijsing et al., 2009; Strahle et al., 1987). De plus, la liaison de GR à ces sites canoniques requiert un espacement de 3 pb entre deux molécules de GR afin de permettre la dimérisation du récepteur (Luisi et al., 1991). Historiquement, et principalement pour des raisons techniques, l'identification des GBS était centrée sur les régions promotrices des gènes et ont ainsi permis d'identifier de nombreux GBS dans la partie proximale du promoteur (Jantzen et al., 1987). Cependant, des études de séquençage massif de la chromatine ont montré que la majorité des GBS sont localisés dans la partie distale du promoteur, notamment à plus de 10 kb du site d'initiation de la transcription (TSS) des gènes dont l'expression est augmentée en présence de GC et plus de 100 kb du TSS des gènes dont l'expression est diminuée en présence de GC (Reddy et al., 2009). Des analyses bio-informatiques des GBS ont révélé que 58 % des régions liées par GR présentaient la séquence consensus classique de 15 pb indiquant que les 42 % restants présentaient des séquences alternatives (Polman et al., 2012).

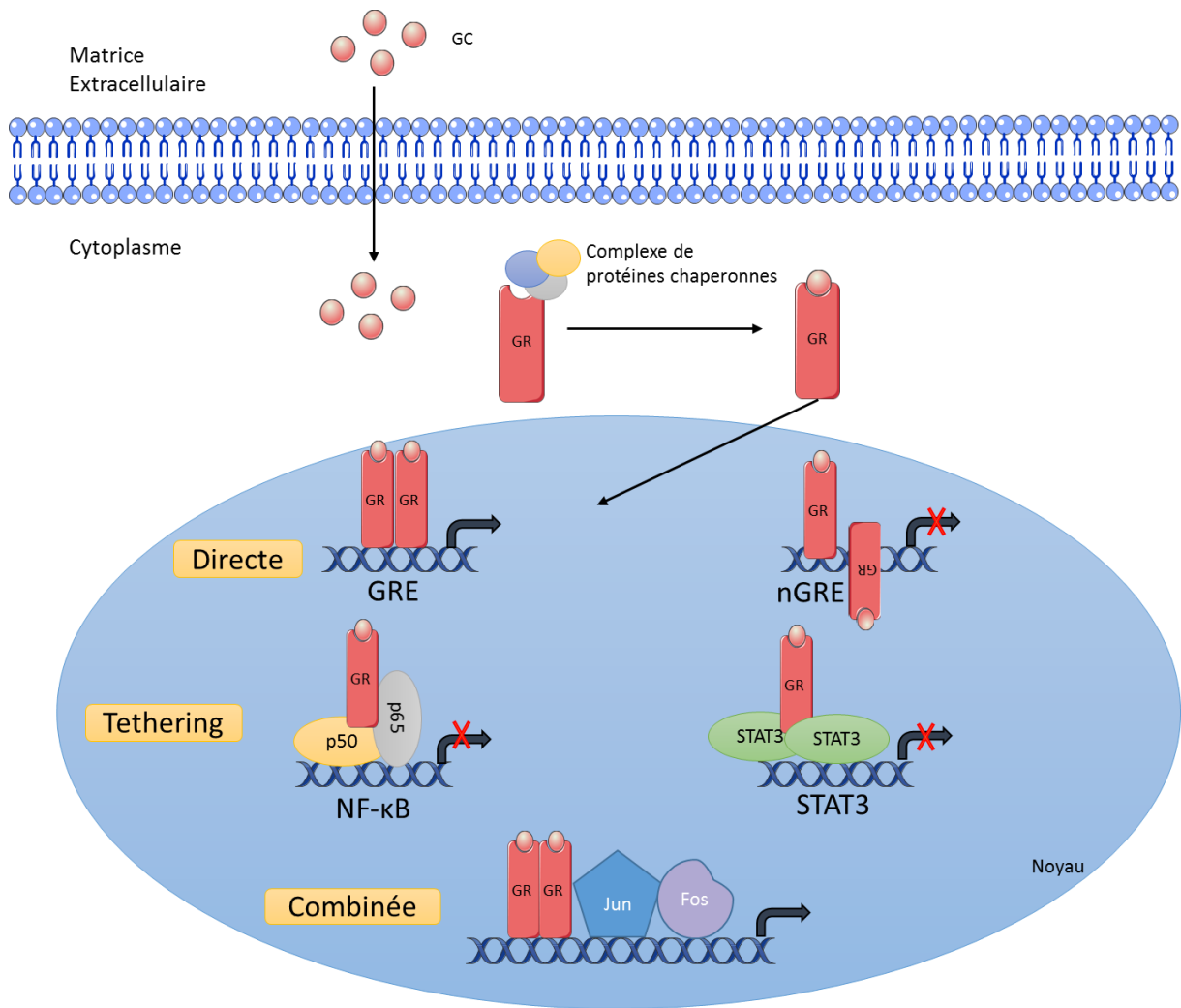


Figure 24 : La voie d'activation de GR et les différentes interactions de GR avec l'ADN.

Après fixation des GC sur le GR, le GR ligandé transloque dans le noyau et interagit avec des séquences spécifiques de l'ADN pour contrôler l'expression des gènes associés. GR activé par les GC, peut interagir soit de manière directe, soit indirecte via l'interaction avec d'autres protéines. GR peut également se lier avec d'autres facteurs de transcription, sur des éléments composés. D'après (Meijsing, 2015).

GR peut également se fixer sur une séquence répétée inverse de CTCC espacée de 0, 1 ou 2 pb, nommée IR nGRE, mise en évidence par notre équipe, qui permet la répression des gènes cibles de GR (Figure 24) (Surjit et al., 2011). L'espace variable entre ces séquences suggère que la dimérisation n'est pas requise et des études structurales suggèrent que GR se lie sous forme de monomère à chaque demi-site répété retourné (Hudson et al., 2013).

Les éléments « tethering » possèdent des séquences de liaison à des régulateurs transcriptionnels, mais n'ont pas de GRE. Ils sont principalement liés à la répression transcriptionnelle via des interactions protéine-protéine. Ainsi, GR régule par ce type d'interaction l'activité des complexes NF-κB (Ray and Prefontaine, 1994), AP-1 (Schule et al., 1990) et le facteur « signal transducers and activators of transcription 3 » (STAT3) (Langlais et al., 2012) (Figure 24).

Les sites de liaison de GR dans le génome sont situés à côté de sites de liaison à d'autres facteurs de transcription. GR peut interagir fonctionnellement ou physiquement avec ces facteurs de transcription. Des études soulignent l'importance de ces liaisons combinées dans la régulation

transcriptionnelle par les facteurs de transcription (Siersbaek et al., 2011; Thurman et al., 2012). Les liaisons combinées de GR avec d'autres facteurs de transcription sont notamment importantes pour la régulation synergique de certains gènes en favorisant par exemple l'accessibilité chromatinienne du site génomique. Cela peut expliquer les interactions synergiques de GR avec d'autres facteurs de transcription tels que « CCAAT-enhancer-binding proteins » (C/EBP β), STAT3 ou AP-1 (Figure 24) (Biddie et al., 2011; Strahle et al., 1988). La perte de l'expression de C/EBP β résulte en une réduction du recrutement de GR uniquement sur les sites de liaison qu'il co-occupe avec C/EBP β (Siersbaek et al., 2011). L'interaction de GR avec d'autres facteurs de transcription peut avoir un effet antagoniste. En effet, le chevauchement de sites de liaison de GR et de la boîte TATA empêche le recrutement de facteurs d'initiation de la transcription, lorsque GR est fixé sur ce site (Stromstedt et al., 1991). Il existe également des cas où GR agit soit comme un synergiste, soit comme un antagoniste suivant le recrutement des protéines sur les sites de fixation. De plus en plus d'études génomiques suggèrent que la plupart des GRE fonctionnels sont des éléments combinés, composés de sites de liaison de GR ainsi que de sites de liaison à des facteurs de transcription particuliers pour chaque GRE (Diamond et al., 1990). De tels éléments combinés peuvent expliquer la régulation tissu-spécifique de GR.

Cependant la présence de GBS est insuffisante pour déterminer les liaisons effectives de GR. D'autres signaux liés à l'architecture chromatinienne sont nécessaires. Des études montrent que la majorité des liaisons de GR s'effectue dans des régions génomiques accessibles à la DNase-I, indiquant une chromatine ouverte, et facilitant l'interaction avec GR. Il apparaît que des facteurs d'accessibilité à la chromatine, spécifiques du type cellulaire, déterminent les régions auxquelles GR peut se lier et quels gènes il peut réguler (John et al., 2011). Ces facteurs peuvent être par exemple AP-1, qui co-localise à 50 % avec GR (Biddie et al., 2011), ou « forkhead box A1 » (FoxA1) qui induit une hypersensibilité à la DNase-I (Belikov et al., 2009). La présence de nucléosomes et de modifications post-traductionnelles d'histones peuvent être des caractéristiques contrôlant la liaison de GR (Grontved et al., 2013). Ainsi, ces observations suggèrent qu'une coopération doit exister pour maintenir ces régions de la chromatine ouvertes et permettent en partie d'expliquer la spécificité cellulaire.

Le GR régule également une suite de gène en absence de ligand, différents des gènes cibles de GR lié à un ligand, même si une partie peut se chevaucher, pouvant contribuer à la réponse tissu-spécifique (Davey and Grossmann, 2016).

II.1.2.5 Régulation de l'activité du récepteur aux glucocorticoïdes par des modifications post-traductionnelles

En présence du ligand, GR est phosphorylé sur de nombreux résidus sérine ou thréonine principalement dans le domaine N-terminal. Cependant, peu d'entre eux ont été caractérisés fonctionnellement. Pour l'instant, les phosphorylations dépendantes des GC sur des résidus conservés chez l'Homme sont présentes sur les résidus 203 (Ser₂₀₃), 211 (Ser₂₁₁), 226 (Ser₂₂₆), and 404 (Ser₄₀₄), impactant les capacités transcriptionnelles de gènes cibles spécifiques (Wang et al., 2002). Ces sites présentent un faible niveau de phosphorylation en absence de GC tant que la protéine phosphatase (PP5) et le complexe chaperon HSP90 restent associés à GR (Wang et al., 2007). Après la liaison du ligand sur GR, les résidus Ser₂₁₁ and Ser₂₂₆ sont phosphorylés respectivement par ERK ou JNK. Une phosphorylation du résidu Ser₂₁₁ sert de marqueur de substitution pour l'activité de GR ligandé et favorise la liaison de GR à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de GR. En revanche, la phosphorylation du résidu Ser₂₂₆ augmente l'export nucléaire et réduit l'activité transcriptionnelle de GR (Chen et al.,

2008). Le résidu Ser₄₀₄, un substrat de GSK3 β empêche notamment la transrepression de NF- κ B médiée par GR (Gallagher-Beckley et al., 2008). Bien que les kinases responsables de la phosphorylation de la majorité des sites aient été identifiées, la signalisation qui permet leur activation suite à l'augmentation des GC n'est pas caractérisée.

D'autres modifications post-traductionnelles sont dépendantes de la phosphorylation du GR. Par exemple, la phosphorylation du résidu Ser₂₄₆ permet la sumoylation des résidus Lys₂₉₃ et Lys₂₇₇, importants pour la transactivation du GR sur de nombreux GRE. Une étude récente du laboratoire a démontré que la sumoylation du résidu Lys₂₉₃ localisé dans le domaine N-terminal est requise pour la formation d'un complexe répressif nécessaire à l'inhibition par GR via les IR nGRE et la transrepression « tethered » de GR sur NF- κ B/AP-1, mais n'est pas nécessaire pour la transactivation (Hua et al., 2016a; Hua et al., 2016b). De plus, la dégradation de GR médiée par le protéasome nécessite l'ubiquitination du résidu Lys₄₁₉ qui dépend de la phosphorylation de GR (Beck et al., 2011).

II.1.2.6 Corégulateurs du récepteurs aux glucocorticoïdes impliqués dans la transcription

Le processus de transcription est initié par le recrutement d'ARN polymérases au niveau du TSS par le complexe de pré-initiation, s'en suit les étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison. Les ARN polymérases sont des complexes multi-protéiques qui changent de composition protéique en fonction de l'étape de transcription (Buratowski, 2009). L'activation de la transcription dépend de l'action de facteurs tels que GR, qui peut utiliser un large spectre de mécanismes afin d'influencer les niveaux d'expression des gènes sans forcément interagir avec l'ADN ou la machinerie transcriptionnelle (Ing, 2005; Ratman et al., 2013). GR peut moduler directement ou indirectement l'activité de l'ARN polymérase II (ARN pol II), en recrutant des corégulateurs impliqués dans l'activation et la répression de gènes cibles. On parle alors respectivement de CoA et de corépresseurs (CoR). Ces facteurs affectent la structure de la chromatine ou encore la stabilité de la machinerie transcriptionnelle au niveau du TSS (Wright and Gustafsson, 1991). Les CoA se lient majoritairement sur le domaine AF-2 mais également sur le domaine AF-1 de GR (McInerney et al., 1998).

GR peut favoriser le recrutement du facteur de transcription (TFIID), un composant du complexe de pré-initiation, via son domaine AF-1, sur le promoteur de ses gènes cibles (Ford et al., 1997). GR interagit également avec deux composants du complexe médiateur MED14 et MED1. Le complexe médiateur lie les facteurs de transcription et l'ARN pol II affectant ainsi l'initiation de la transcription et l'élongation (Chen et al., 2006). GR peut également contrôler l'élongation de la transcription en interagissant soit avec une protéine qui stimule l'élongation, « elongation factor RNA polymerase » (ELL) permettant une stimulation de la transcription (Pascual-Le Tallec et al., 2005) soit avec un suppresseur d'élongation, « negative elongation factor » (NELF) empêchant l'élongation (**Figure 25**) (Gupte et al., 2013).

Chez les eucaryotes, l'accessibilité à l'ADN et la structure de la chromatine jouent un rôle important dans l'expression des gènes. L'ADN est rendu accessible grâce à des complexes de remodelage de la chromatine qui désorganisent les nucléosomes. Les nucléosomes sont formés d'un octamère d'histone contenant 2 exemplaires de chaque histone (H2A, H2B, H3 et H4) (Richmond and Davey, 2003). Par son interaction avec des corégulateurs, GR modifie la structure de la chromatine.

GR interagit avec le complexe SWI/SNF permettant un remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP, en repositionnant les nucléosomes. Cela permet le recrutement d'autres facteurs de transcription et de la « tata binding protein » (TBP) afin de faciliter l'assemblage du complexe de pré-initiation (**Figure 25**) (Yoshinaga et al., 1992).

GR peut interagir avec des enzymes induisant la modification post traductionnelle des histones. En effet, il se lie à des histones acétyltransferases (HAT) telles que p300/CBP. Ces complexes, en modifiant les histones, relâchent la structure des nucléosomes et rendent les gènes plus accessibles à la transcription (Westin et al., 2000). De plus, GR peut interagir avec des CoR tels que « nuclear receptor co-repressor 1 » (NCoR), « silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor » (SMRT or NcoR2) qui exercent leur activité répressive via le recrutement d'un complexe HDAC (Surjit et al., 2011). Cela conduit à la condensation de la chromatine, inhibant le recrutement des facteurs de transcription et du complexe ARN pol II. GR peut également interagir avec la « coactivator-associated arginine methyl transferase » (CARM-1) qui possède une activité histone méthyltransférase (HMT) (Chen et al., 2000).

De plus, certains corégulateurs peuvent à la fois induire l'expression de certains gènes et réduire l'expression d'autres gènes. La famille CoA p160 incluant SRC-1, SRC-2/ « glucocorticoid receptor interacting protein 1 » (GRIP1)/ « transcriptional intermediary factor 2 » (TIF2) et SRC-3 augmentent principalement l'activité transcriptionnelle de GR mais TIF2 agit à la fois comme un CoA et un CoR via des domaines intrinsèques d'activation ou de répression. En effet, TIF2 est impliqué dans la transrépression d'AP-1 et NF- κ B par GR (Chinenov et al., 2012). GR interagit également avec de nombreuses HDAC telles que HDAC1 et HDAC6 qui agissent comme un CoA et HDAC2 qui agit à la fois comme un CoA et un CoR (**Figure 25**) (Govindan, 2010). Lorsque GR n'est pas lié directement à l'ADN, ce sont des co-facteurs tels qu'AP-1, CREB, NF- κ B qui vont spécifier les gènes cibles des GC. La liaison de GR à AP-1 ou NF- κ B altère l'assemblage de CoA et recrute des CoR (Glass and Saijo, 2010).

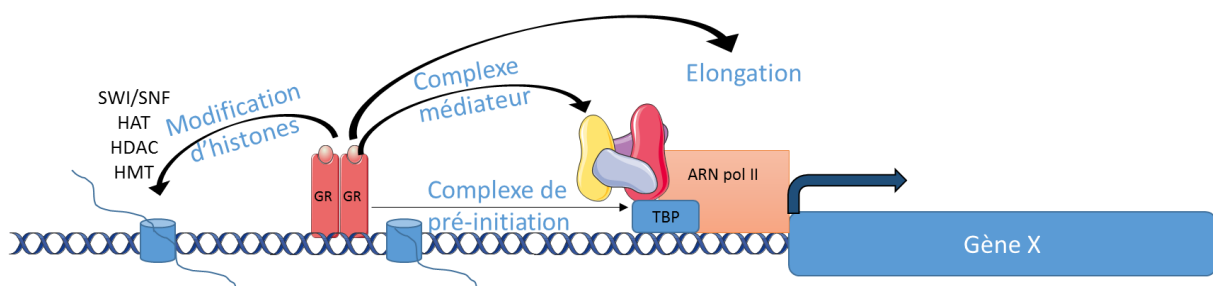


Figure 25 : Les corégulateurs de GR et de leurs rôles dans la régulation de la transcription.

GR peut influencer directement ou indirectement le recrutement et l'activité de l'ARN pol II et ainsi l'activité transcriptionnelle. D'après (Meijsing, 2015).

Ainsi, la liaison de GR sur le génome coordonne le recrutement d'une large variété de protéines co-régulatrices. Ces corégulateurs spécifient l'activité transcriptionnelle en réponse aux GC pour chaque gène cible. De plus, les sites de liaison à l'ADN responsables du recrutement de GR semblent jouer un rôle important, puisque les sites « tethering » et les GBS non canoniques favorisent la répression et le recrutement de CoR, tandis que les GRE permettent le recrutement de CoA favorisant la transcription.

II.1.2.7 Effets non-génomiques des glucocorticoïdes

Bien que nous concentrons notre étude sur les mécanismes génomiques, il faut savoir que GR exerce également des effets non génomiques se produisant sans modifier l'expression des gènes et survenant plus rapidement que les effets génomiques (Makara and Haller, 2001). Les effets non génomiques des GC sont médiés par (i) l'interaction physicochimique non spécifique des GC à la membrane, (ii) l'interaction des GC sur les récepteurs membranaires de GR (mGR), et (iii) l'interaction des GC sur le récepteur cytosolique qui ne médie par d'effet génomique (Borski, 2000; Buttgerit et al., 1998; Mitre-Aguilar et al., 2015; Stahn and Buttgerit, 2008). Les actions non génomiques sont importantes dans de nombreux organes comme le cerveau, les systèmes nerveux central et périphérique, le système cardiovasculaire mais également dans les cellules immunitaires, puisque l'action non génomique de GR peut avoir un effet anti-inflammatoire, immunosuppresseur et anti-allergique (Jiang et al., 2015; Lee et al., 2012; Song and Buttgerit, 2006). Les GC exercent un effet bénéfique dans le muscle squelettique médié par le récepteur membranaire aux GC sur la force des fibres (Perez et al., 2013).

II.1.3 EFFETS DES GLUCOCORTICOÏDES SUR LA MASSE MUSCULAIRE

Une augmentation du taux des GC circulants induit au niveau du muscle squelettique une diminution de la synthèse protéine et une augmentation de la protéolyse, afin de générer des acides aminés libres qui vont servir de substrat pour la néoglucogénèse dans le foie et aider au maintien de la glycémie. Ainsi une augmentation aiguë de GC est bénéfique notamment pour maintenir les fonctions vitales telles que le fonctionnement du cerveau en condition de stress. Cependant lorsque les niveaux de GC circulants sont élevés de manière chronique dans des conditions pathologiques ou suite à un traitement médical, les effets sur le muscle squelettique sont néfastes, causant une perte de la masse et des faiblesses musculaires, ainsi qu'une résistance à l'insuline (Braun and Marks, 2015; Schakman et al., 2013). Dans cette partie, nous nous concentrerons sur les effets d'un niveau élevé de GC sur la masse et les fonctions musculaires

II.1.3.1 L'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes

L'augmentation du niveau de GC peut provenir soit d'une libération hormonale endocrinienne soit d'un apport exogène. En réponse à un stress tel qu'une restriction calorique, une mise à jeun, ou lors de pathologies systémiques telles que le syndrome de Cushing, la septicémie ou la cachexie, le niveau endogène de GC augmente. Lorsque la production de GC endogènes chez les rongeurs est empêchée par une surrénalectomie, l'atrophie musculaire induite par une mise à jeun n'est plus observée (Wing and Goldberg, 1993). Les GC possèdent également de puissantes propriétés anti-inflammatoires, et sont largement utilisés pour traiter des infections et des maladies aiguës ou chroniques, telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'eczéma et l'asthme. Ils sont également prescrits dans la lutte contre le rejet de greffes étant donné leurs propriétés immunosuppressives. De manière paradoxale et détaillée dans la partie II.1.3.7, les GC forment le traitement le plus prescrit aux patients atteints de la myopathie de Duchenne (MD) (Braun and Marks, 2015; Pereira and Freire de Carvalho, 2011; Schakman et al., 2013). Les GC exogènes peuvent induire une atrophie musculaire dans la phase aiguë ou chronique du traitement. Les myopathies induites par les GC sont principalement associées aux GC de synthèse qui contiennent un groupement fluor, mais peuvent apparaître avec tous les GC synthétiques en fonction du temps de traitement et des maladies sous-jacentes. Le risque de développer une myopathie, touchant principalement les muscles des membres, est augmenté chez les personnes âgées et/ou

inactives et les patients atteints d'un cancer. L'atrophie musculaire aiguë affectant les muscles respiratoires et les muscles des membres, apparaît lorsque des patients déjà affaiblis par la maladie (ex personnes immobilisées, sous assistance respiratoire) reçoivent de très fortes doses de GC (Levin et al., 2014; Vecht, 1998). Les mécanismes régulant l'atrophie musculaire suite à une augmentation de GC endogènes et ceux régulant l'atrophie musculaire suite à un apport exogène de GC se chevauchent, mais ne sont pas identiques. Nous centrerons notre étude principalement sur les effets de GC exogènes sur le muscle.

Afin de démontrer l'effet catabolique sur le muscle, de nombreuses études ont utilisé de jeunes adultes sains ou des rongeurs traités avec de nombreux GC de synthèse (ex. dexaméthasone, methylprednisolone, prednisolone, et triamcinolone actéonidé) à de fortes concentrations, et pendant une durée variant de quelques jours à quelques semaines.

L'effet d'un excès de GC sur la masse musculaire est bien caractérisé, et affecte principalement les muscles majoritairement composés de fibres rapides, de types II. Par contre, les muscles de type I et le muscle cardiaque sont protégés de l'atrophie, en raison certainement de leur rôle essentiel dans la posture, et les fonctions vitales telles que la respiration et la circulation sanguine (Sandri et al., 2006; Shimizu et al., 2011). Au sein d'un muscle, la diminution de la taille des fibres de type IIb et IIx est plus importante que celle des fibres de types I (Dekhuijzen et al., 1995). Les GC diminuent également la force musculaire. En effet, les patients atteints du syndrome de Cushing, et ceux atteints d'arthrite rhumatoïde ou d'une maladie pulmonaire obstructive chronique, traités avec des GC présentent une diminution de la force musculaire (Horber et al., 1985). De plus, une diminution de la force et de l'endurance a été observé dans les modèles animaux, associée à une augmentation du taux endogène ou exogène de GC (Alamdari et al., 2012; Gardiner et al., 1978; Shimizu et al., 2015).

Cependant, suivant les modèles d'étude, le type de GC utilisé et les doses prescrites, l'effet des GC exogènes sur la masse et la force musculaire varie. Les GC de synthèses possédant un groupement fluor tel que la dexaméthasone et la triamcinolone acétonide sont des agents atrophiques plus puissant que les molécules ne possédant pas de groupement fluor, comme la prednisolone (Bullock et al., 1972; Pereira and Freire de Carvalho, 2011). Ainsi l'ampleur des effets sur la synthèse et la dégradation protéique dépend du type et des doses de GC donnés. Les effets des GC peuvent différer suivant le sexe et l'espèce animale utilisée. En général, les rats sont plus sensibles à l'atrophie musculaire que les souris. Il semblerait également que les femelles soient plus sensibles aux GC que les mâles (Baehr et al., 2011). La testostérone, hormone principalement présente chez le mâle, peut contrecarrer les effets cataboliques des GC (Zhao et al., 2008b). L'interaction entre ces hormones stéroïdiennes sera décrite dans la partie II.3.

II.1.3.2 Action des glucocorticoïdes sur la synthèse protéique

Les premiers changements observés dans le métabolisme musculaire après une administration de GC semblent être principalement reliés à une diminution de la synthèse protéique plutôt qu'à une augmentation de la dégradation protéique (Goldberg, 1969). En réponse à des doses modérées à élevées de GC, la synthèse de protéines musculaires est significativement réduite aussi bien chez les rongeurs que chez l'Homme (Schakman et al., 2013). De faibles doses de GC ne diminuent pas la synthèse protéique basale (Liu et al., 2004).

De nombreux mécanismes sont responsables de la diminution de la synthèse protéique en réponse aux GC. Tout d'abord, les GC inhibent le transport des acides aminés en particulier dans les muscles de types II (**Figure 26**) (Kostyo and Redmond, 1966). Un traitement de plusieurs jours de GC induit une diminution de plus de 50 % de la synthèse protéique en raison de la diminution de la teneur en ribosomes et ARNm (Rannels et al., 1980). Cependant un traitement de quelques heures induit une diminution rapide de la synthèse protéique indépendamment de ces mécanismes. Cela implique la déphosphorylation de 4E-BP1 et S6K1, et donc la stabilisation des complexes inhibiteurs de la synthèse protéique. Cependant, le niveau d'eIF2 nécessaire pour la formation du complexe tertiaire ne varie pas (Shah et al., 2000). La diminution de la phosphorylation de 4E-BP1 et S6K1 suggère que les GC inhibent la synthèse protéique via mTORC1.

En réponse à un excès de GC, les niveaux circulants et musculaires d'IGF-I sont souvent réduits (**Figure 26**) (Inder et al., 2010), diminuant en retour la phosphorylation et donc l'activation d'Akt, de mTOR et de leurs cibles (Schakman et al., 2005). Un niveau élevé d'IGF-I dans des systèmes *in vitro* (Sacheck et al., 2004; Stitt et al., 2004) ou *in vivo* (Fournier et al., 2003; Schakman et al., 2005) suite à une administration systémique ou une surexpression dans le muscle d'IGF-I, atténue l'atrophie musculaire induite par les GC. Cette diminution de l'atrophie musculaire est associée à une augmentation de la signalisation de mTOR, une diminution de la translocation nucléaire de FoxO1/3a et donc une diminution de l'expression de MuRF1 et d'Atrogin-1. De plus, l'expression de la β -caténine est augmentée, suite à l'inactivation de GSK3 β (**Figure 26**). En effet, la β -caténine, cible de GSK3 β , est un facteur de transcription impliqué dans l'hypertrophie, et est dégradée par l'UPS lorsqu'elle est phosphorylée par GSK3 β . (Armstrong and Esser, 2005; Schakman et al., 2008b).

Les GC peuvent également diminuer l'activation de la PI3K indépendamment de la disponibilité en facteur de croissance. Les GC sont capables d'induire une diminution de la quantité ou d'inactiver IRS-1 suite à sa phosphorylation sur le résidu Ser₃₀₇ (**Figure 26**). La dégradation de IRS-1 peut provenir de l'augmentation de la tyrosine phosphatase C1-Ten ou de l'E3 ubiquitine ligase Cbl-b, bien que l'implication des GC dans ces mécanismes restt à clarifier (Koh et al., 2013; Nakao et al., 2009). Les GC induisent également une augmentation du niveau protéique de la sous-unité régulatrice de PI3K, p85 α aussi connu sous le nom Pik3r1. Sans augmentation concomitante de la sous-unité catalytique p110, l'augmentation de p85 contribue à l'inhibition de l'activité de PI3K (**Figure 26**). L'augmentation de p85 α est un régulateur majeur de l'atrophie musculaire induite par les GC. En effet, l'inhibition de l'expression de p85 α est suffisante pour induire une diminution de la synthèse protéique et l'atrophie musculaire (Kuo et al., 2012).

La suppression de l'activité de mTOR en réponse à un traitement aux GC est reliée à la diminution de l'activité de la PI3K/Akt, mais également à d'autres mécanismes (**Figure 26**). La suppression de l'activation de mTOR est liée à l'augmentation de gènes tels que « regulated in development and DNA damage response 1 » (Redd1) qui favorise l'assemblage du complexe TSC1/2. La surexpression de Redd1 est associée à une diminution de la phosphorylation des cibles de mTOR et de la synthèse protéique. De plus les souris présentant une délétion de Redd1 sont résistantes à l'atrophie musculaire induite par les GC (Kumari et al., 2011; Wang et al., 2006). D'autres gènes tels que sestrin1 (Sesn1) inhibe également mTOR. Sesn1 active AMPK, qui en retour phosphoryle et active le complexe TSC1/2, pour augmenter son activité GAP (Braun and Gautel, 2011; Budanov and Karin, 2008; Kuo et al., 2012).

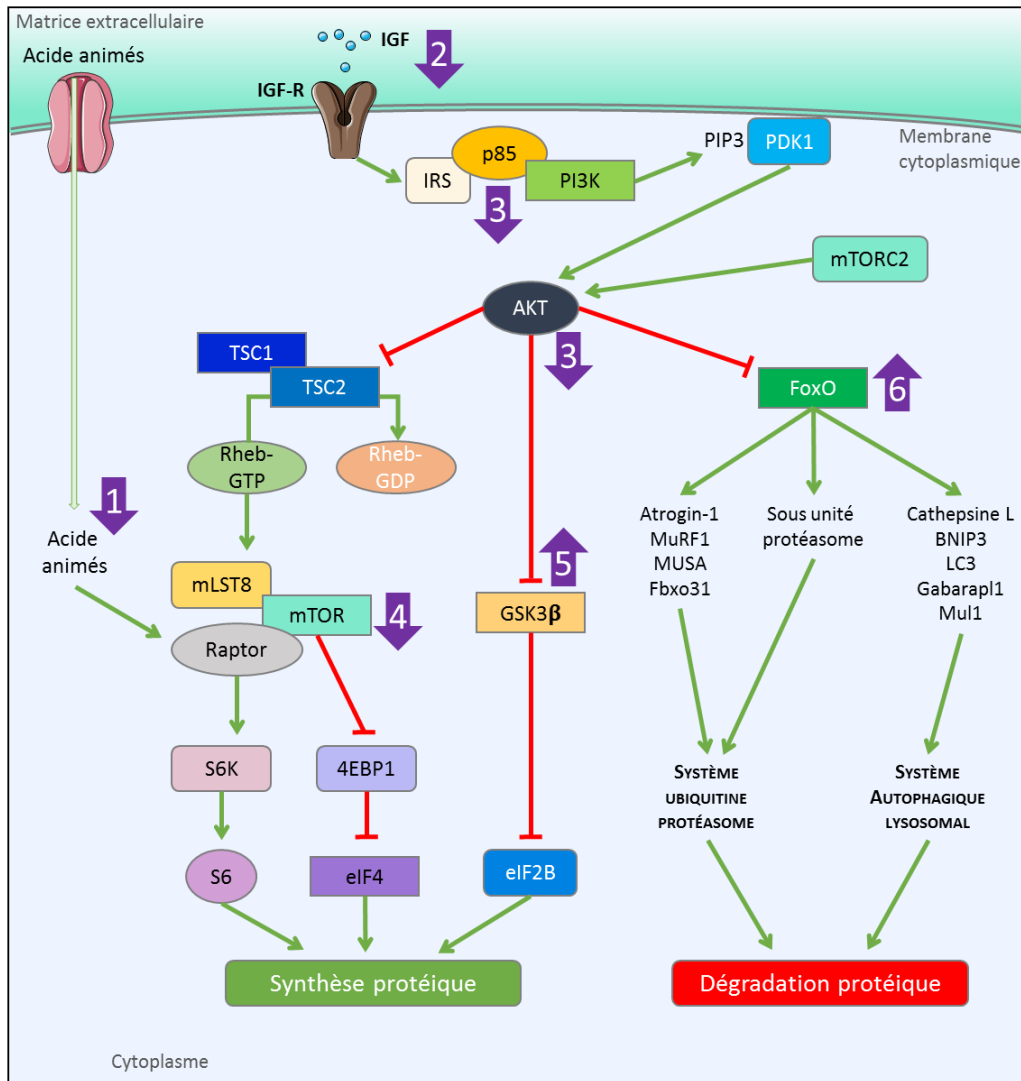


Figure 26 : Effets des GC sur la voie de signalisation IGF-Akt-PI3K.

Les GC inhibent la synthèse protéique à travers plusieurs mécanismes tels que (1) une diminution de l'absorption d'acides aminés, (2) une diminution du niveau d'IGF-I, (3) une diminution de l'activité d'IRS-1 et de la PI3K, conduisant à une diminution de l'activité d'Akt, (4) une diminution de l'activité de mTORC1 menant à une diminution de la phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1, (5) une augmentation de l'activité de GSK3 β permettant une diminution de la β -caténine, ainsi qu'à (6) une activation de FoxO et des systèmes de dégradation protéique. D'après (Bodine and Furlow, 2015).

II.1.3.3 Action des glucocorticoïdes sur la dégradation protéique

La capacité des GC à induire la protéolyse était sujette à débat pendant des années. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence une différence des effets des GC en fonction du statut nutritionnel. En condition de nutrition normale, les GC induisent une dégradation des protéines uniquement lorsqu'ils sont administrés à de très fortes doses, étant donné le niveau élevé d'insuline. Cependant lors d'une restriction alimentaire, des niveaux élevés de GC et faibles d'insuline augmentent la dégradation des protéines (Mitch et al., 1985; Mitch and Goldberg, 1996).

L'effet stimulant des GC sur la protéolyse musculaire résulte de l'activation des principaux systèmes protéolytiques cellulaires (Hasselgren, 1999; Price and Mitch, 1998; Schakman et al., 2008a) à savoir

l'UPS, le système lysosomal (cathepsines) et le système dépendant du calcium (calpaïnes) (**Figure 26**). La dégradation des protéines causée par les GC affecte principalement les protéines myofibrillaires, illustré par l'augmentation du taux de la 3-méthyl histidine, un marqueur urinaire de la dégradation myofibrillaire (Nagasawa and Funabiki, 1981).

Pour activer la dégradation des protéines, les GC stimulent l'expression de plusieurs composants de l'UPS, soit impliqués dans la conjugaison de l'ubiquitine à la protéine, soit directement responsables de la dégradation des protéines par le protéasome. L'augmentation de la dégradation médiée par le protéasome a été observée dans des conditions pathologiques associées à une augmentation du taux endogène de GC telles que la mise à jeun, l'acidose métabolique, la septicémie, le diabète ou le cancer. Bien que les GC induisent une augmentation de l'activité du protéasome dans des systèmes cellulaires (Combaret et al., 2004), aucune augmentation de l'activité du protéasome 20S ou 26S n'est observée dans les muscles des membres de souris sauvages traitées aux GC (Britto et al., 2014). L'augmentation de l'activité du protéasome est associée à une augmentation des niveaux d'ubiquitine et de l'expression de l'ARNm de protéines impliquées dans le processus d'ubiquitination, plus particulièrement des E3 ubiquitine ligases (**Figure 26**) (Cohen et al., 2015). L'atrophie musculaire induite par un apport exogène de GC est atténuée chez des souris qui n'expriment plus la ligase E3, MuRF1, mais pas chez celles qui n'expriment plus l'Atrogin-1. En revanche, suite à une mise à jeun, aucun de ces deux modèles de souris n'est protégé de l'atrophie musculaire, suggérant que la mise à jeun induit des mécanismes additionnels indépendants des GC contribuant à l'atrophie musculaire (Baehr et al., 2011).

D'autres voies peuvent également conduire à l'atrophie musculaire après un excès de GC. L'activité inflammatoire peut également être un des mécanismes d'induction de l'atrophie musculaire notamment via TRAF6 qui serait augmenté en présence de GC (Braun and Gautel, 2011; Braun et al., 2013; Braun and Marks, 2010; Cai et al., 2004). Les GC augmentent l'expression de la Mstn (Allen and Loh, 2011) et les souris n'exprimant plus la Mstn ne présentent pas d'atrophie musculaire suite à l'administration de GC (Gilson et al., 2007). Les microARN miR-1, miR-147, miR-322, miR-351, miR-503 and miR-708 sont augmentés en présence de GC (Shen et al., 2013). Une des principales cibles de miR-1 est HSP70 dont l'expression est diminuée sous GC, empêchant GR d'être maintenu dans le cytoplasme (Kukreti et al., 2013). D'autres miRNA ont un rôle protecteur contre l'atrophie musculaire. Le microRNA miR-23a interagit avec l'ARN d'Atrogin-1 et MuRF1 inhibant leur expression (Wada et al., 2011). Les miRNA 27 a et b interagissent avec l'ARN de Mstn, diminuant sa stabilité et sa demi-vie (Allen and Loh, 2011). En présence de GC, les niveaux de miRNA 27 a et b diminuent.

II.1.3.4 Mode d'action moléculaire des glucocorticoïdes dans le muscle squelettique

L'action des GC dans le muscle, comme dans les autres tissus, est médiée par GR, fortement exprimé dans le muscle squelettique. Il est plus particulièrement exprimé dans les fibres de types II par rapport aux fibres de type I, en accord avec la plus forte sensibilité des fibres de type II dans l'atrophie musculaire induite par les GC (Shimizu et al., 2011). L'expression de GR dans le muscle de rongeurs n'est pas statique, mais est diminuée par son propre ligand et varie en fonction du rythme circadien avec une forte expression le matin lorsque les niveaux endogènes de GC sont bas (Oakley and Cidlowski, 1993; Ramamoorthy and Cidlowski, 2013a; Yao et al., 2006).

L'activation de GR conduit à une régulation d'une centaine de gènes différents en fonction du type de GC, de la dose et du temps de traitement, ainsi que du modèle utilisé. Les gènes cibles identifiés incluent (i) ceux connus comme étant des gènes cibles de GR dans d'autres tissus ainsi que (ii) de nombreux autres gènes impliqués dans le métabolisme, la signalisation de l'insuline, l'inflammation et l'angiogenèse (**Figure 27**) (Almon et al., 2007; Carraro et al., 2009; Furlow et al., 2013; Kuo et al., 2012; Lecker et al., 2004).

Une partie de ces gènes est répertoriée dans le **Tableau 2** en raison de leur importance particulière dans la régulation de la synthèse ou dégradation protéique.

Gène	Mode de régulation	Rôle	Références
MuRF1/TRIM63	GRE/FOXO1/KLF15	E3 ubiquitine ligase	(Bodine et al., 2001a) (Shimizu et al., 2011) (Waddell et al., 2008)
MAFbx/Atrogin-1/Fbxo32	FOXOs	E3 ubiquitine ligase	(Gomes et al., 2001) (Bodine et al., 2001a) (Sandri et al., 2004)
PI3kr1/p85 α	GRE	Sous-unité de PI3K	(Kuo et al., 2012)
REDD1/Ddit4	GRE	Inhibiteur de mTOR	(Kuo et al., 2012) (Wang et al., 2006)
KLF15	GRE	Facteur de transcription	(Shimizu et al., 2011)
FOXOs (FOXO1 et FoxO3a)	GRE	Facteurs de transcription	(Cho et al., 2010) (Qin et al., 2014) (Lutzner et al., 2012)
Myostatine	GRE	Inhibiteur de croissance musculaire	(Ma et al., 2003) (Levin et al., 2014)

Tableau 2 : Sélection de gènes régulés par les GC en relation avec l'atrophie musculaire.

Une expérience récente d'immunoprécipitation de la chromatine a permis d'identifier les cibles directes de GR dans le génome dans un système cellulaire de myotubes C2C12. La séquence GRE classique de 15pb a été observée dans la région promotrice de gènes dont l'expression était augmentée et une séquence similaire a été retrouvée pour les gènes dont l'expression était diminuée. De plus, la majorité des GBS était localisée à plus de 25 Kb du promoteur, en aval des gènes cibles, ou encore dans des introns (Kuo et al., 2012).

Tandis que les GC régulent directement un nombre important de gènes impliqués dans le renouvellement protéique et le métabolisme lipidique/glucidique, l'expression de multiples facteurs de transcription est également induite par les GC, et permet d'accentuer leurs effets.

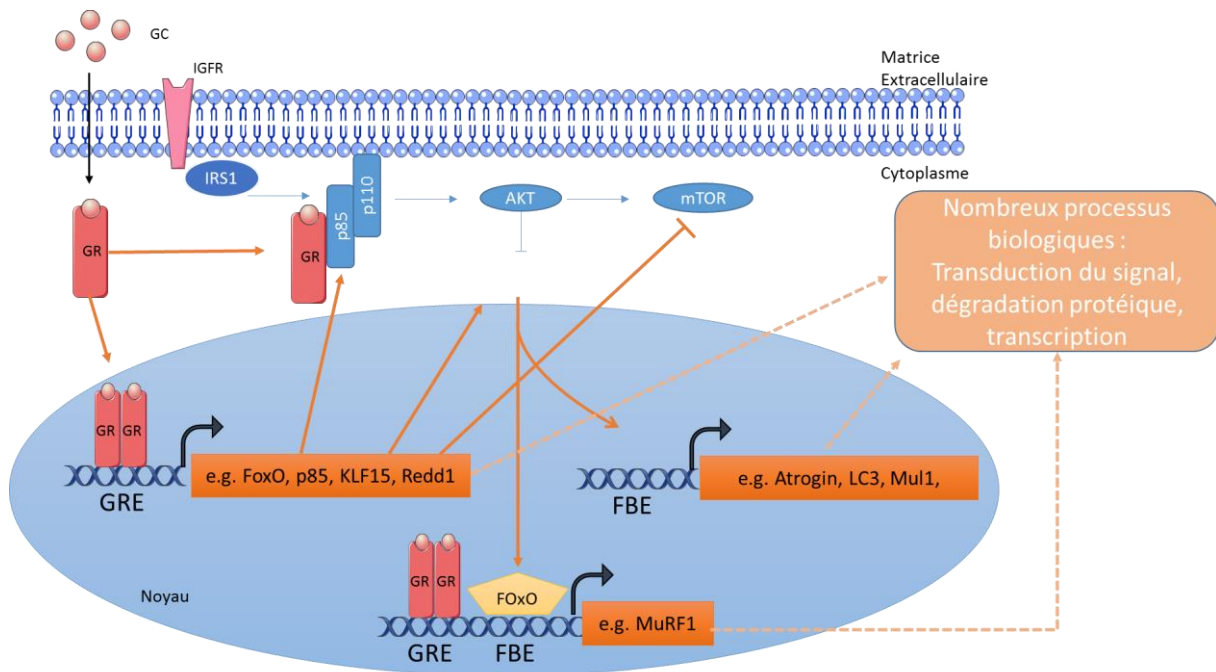


Figure 27 : Mécanisme conduisant à l'atrophie musculaire induite par les GC.

Les GC induisent une diminution de la voie PI3K-Akt-mTOR en contrôlant l'expression de plusieurs gènes soit directement, soit indirectement, conduisant *in fine* à la mise en place de l'atrophie musculaire. En bleu, les étapes ou protéines dont l'expression ou l'activité sont réduites par les GC, en rouge, les étapes ou les protéines dont l'expression ou l'activité sont augmentées par les GC. D'après (Bodine and Furlow, 2015).

Une classe importante de facteurs de transcription est constituée des membres de la famille FoxO. L'expression de tous les membres de cette famille, à savoir FoxO1, FoxO3a et FoxO4 est induite par les GC (Cho et al., 2010; Imae et al., 2003). Un GRE fonctionnel a été retrouvé dans le promoteur de FoxO3a (Lutzner et al., 2012) et FoxO1 (Figure 27) (Qin et al., 2014). La surexpression d'un dominant négatif de FoxO3a empêche l'atrophie des cellules musculaires et l'induction de l'atrogin-1, provoquées par les GC *in vitro* (Sandri et al., 2004). De nombreux sites de liaison de FoxO ont été retrouvés dans des gènes associés à l'atrophie musculaire tels que MuRF1 et Atrogin-1 (tableau 2) (Gross et al., 2009; Judge et al., 2014). De plus, FoxO3a induit l'expression de Bnip3, Gabarap1 et de LC3, augmentant l'assemblage des autophagosomes et la fusion lysosomale (Mammucari et al., 2007). Un site de liaison de FoxO a été retrouvé dans le promoteur de LC3. De plus, l'autophagie mitochondriale peut également contribuer à l'atrophie musculaire grâce à la ligase E3 MuRF1, dont l'expression est régulée par FoxO (Lokireddy et al., 2012). Ces données indiquent que l'augmentation de l'expression des FoxOs est un médiateur clé de l'atrophie musculaire induite par les GC.

Hormis FoxO, GR augmente également l'expression de C/EBP β et C/EBP γ en réponse aux GC, nécessaire mais pas suffisante pour la mise en place de l'atrophie (Gonnella et al., 2011). Un autre facteur particulièrement induit par les GC et possédant un GRE dans son promoteur (Figure 27 et Tableau 2) est « Kruppel-like factor 15 » (KLF15). Il participe à la régulation de gènes associés à l'atrophie tels que MuRF1 et Atrogin-1 mais il peut également inhiber mTOR en régulant la transcription de « branched chain amino acid transaminase 2 » (BCAT2) qui dégrade les « branch chain amino acid » (BCAA), conduisant à l'inhibition de la synthèse protéique (Shimizu et al., 2011). Enfin, la surexpression de « glucocorticoid-induced leucine zipper » (GILZ), un gène cible de GR conduit à une inhibition de la

différenciation des myoblastes en myotubes, soulignant une autre voie par laquelle les GC affectent la masse musculaire (Bruscoli et al., 2010).

Comme nous l'avons vu dans la partie II.1.2.6, GR recrute des CoA pour permettre la transcription de gènes. Dans le muscle squelettique en condition atrophique, GR augmente la transcription et s'associe physiquement à p300/CBP, ainsi qu'à Cited2, une protéine interagissant avec p300/CBP (Yang et al., 2007). L'inhibition de l'acétylation réduit l'atrophie musculaire dans les myotubes en culture (Alamdari et al., 2013). GR peut également augmenter la transcription et interagir avec des méthyltransférases lors de l'atrophie musculaire en particulier avec « set and mynd domain-containing protein 3 » SMYD3 (Proserpio et al., 2013).

II.1.3.5 Interaction du récepteur aux glucocorticoïdes avec des protéines cytoplasmiques

GR exerce des effets via des interactions spécifiques avec la machinerie de transduction de signal dans le cytoplasme (Revollo and Cidlowski, 2009). Il peut notamment interagir directement avec MAPK, IκB et PI3K afin d'inhiber leurs activités. De plus, GR peut se lier à p85, inhibant l'interaction de la sous unité catalytique p110 avec IRS-1, diminuant la synthèse protéique et permettant l'activation de FoxO et de la voie catabolique (Hu et al., 2009). La production de ROS peut induire une atrophie musculaire suite à une inflammation car l'activation des MAPK induit l'expression d'Atrogin-1, MurF1 et du système autophagique lysosomal (Doyle et al., 2011; Li et al., 2005; McClung et al., 2010). Cependant, malgré la large documentation dans d'autres tissus (Almeida et al., 2011; You et al., 2009), l'activation et la production des ROS par les GC dans le muscle sont mal caractérisées.

II.1.3.6 Action non cellulaire autonome des glucocorticoïdes sur la structure et la fonction du muscle squelettique.

L'exposition systémique aux GC peut agir sur d'autres types cellulaires composant le muscle squelettique, en particulier les vaisseaux sanguins. Les GC peuvent réduire la circulation sanguine dans le muscle, corrélant avec une diminution de l'absorption de glucose et l'hypertension artérielle observée lors de traitements prolongés aux GC (Short et al., 2009). De plus, l'augmentation systémique de GC altère le niveau d'autres hormones, telles que les catécholamines, des cytokines inflammatoires et d'autres facteurs circulant pouvant affecter la structure et les fonctions du muscle (Mazziotti and Giustina, 2013; Patel et al., 2015). De plus, des doses supra-physiologiques de GC peuvent diminuer la prise alimentaire notamment chez le rat (la Fleur, 2006).

II.1.3.7 Glucocorticoïdes et myopathie de Duchenne

La myopathie de Duchenne (MD) est une maladie musculaire induite par la mutation du gène de la dystrophine, situé sur le chromosome X, codant pour une protéine subsarcolémale essentielle pour l'intégrité de la membrane des cellules musculaires. La maladie a une prévalence de 1 garçon sur 3500, et est caractérisée par une faiblesse musculaire, une inflammation chronique précoce et des fibres musculaires à noyaux centraux. Les patients vont présenter des troubles de la démarche vers l'âge de 3 à 6 ans, conduisant à la perte de la marche avant l'âge de 13 ans, et à un décès des patients vers l'âge de 20 ans, dû à des problèmes respiratoires ou défaillances cardiaques (Gumerson and Michele, 2011; Le Rumeur et al., 2010).

Il n'existe pas de thérapie curative de la MD. Les études précliniques basées sur la thérapie cellulaire avec l'injection de cellules souches, ou sur les thérapies géniques basées sur le saut d'exon (Cirak et al., 2011), la translecture du codon stop prématuré (Malik et al., 2010) ou encore sur l'expression d'une micro-dystrophine délivrée par vecteur viral (Watchko et al., 2002) sont toutes prometteuses (Nakamura and Takeda, 2011). Cependant ces thérapies lourdes présentent également de nombreuses limitations, telles que la taille du gène de la dystrophine et les différents types de mutations responsables de la pathologie, impliquant la mise en place d'une médecine personnalisée. De plus, le moyen d'administration du traitement nécessite dans la plupart des cas une hospitalisation. L'utilisation d'un vecteur viral peut provoquer l'induction d'une réponse immunitaire. Ainsi ces types de thérapie induisent des coûts très élevés. Actuellement, les GC de synthèse (prednisolone, prednisone, deflazacort) constituent les traitements les plus efficaces de la MD. Ils induisent une augmentation de la force musculaire et retardent la progression de la maladie, mais ne l'arrêtent pas (Manzur et al., 2008).

Les souris Mdx, mutées pour le gène de la dystrophine, reproduisent certains aspects de la maladie chez l'Homme, et constituent un modèle murin de MD. Un traitement de ces souris à la prednisolone augmente leur force musculaire, et leur coordination motrice, et diminue le pourcentage de fibres à noyaux centraux (Escolar et al., 2011). Cependant un traitement d'une centaine de jours à la prednisolone n'induit plus d'effets bénéfiques et provoque une détérioration du muscle cardiaque associée à une fibrose (Janssen et al., 2014; Sali et al., 2012).

L'amélioration clinique observée chez les patients atteints de la MD et les souris Mdx traitées est probablement liée à l'effet des GC sur différentes voies, dont l'inflammation, le stress oxydatif (Cozzoli et al., 2011; Kissel et al., 1993; Manzur et al., 2008), la régénération et la différenciation des fibres (St-Pierre et al., 2004) et la réduction de la nécrose (Cozzoli et al., 2011; Vandebrouck et al., 1999). Certaines études ont suggéré que les bénéfices de la prednisolone proviennent essentiellement de son effet immunosuppresseur sur les cellules T qui infiltraient les muscles, notamment via une action anti-NF- κ B (Heier et al., 2013; Morrison et al., 2000; Wissink et al., 1997). De plus, l'administration de molécules ciblant directement NF- κ B, permet une réduction des caractéristiques de la pathologie, ainsi qu'un rétablissement partiel de la fonction contractile dans des modèles animaux (Grounds and Torrisi, 2004; Peterson et al., 2011). Cependant, bien que diverses molécules immunosuppressives non stéroïdiennes diminuent l'inflammation chez les patients atteints de la MD (Griggs et al., 1993; Kissel et al., 1993), ils n'induisent pas l'amélioration des fonctions musculaires observées avec les GC. Ces résultats indiquent que les mécanismes primaires de l'amélioration clinique induite par la prednisolone ne résultent pas seulement d'effets immunosuppresseurs des GC.

II.2 LES ANDROGENES : ACTION DANS L'ORGANISME

II.2.1 BIOSYNTHESE DES ANDROGENES ET MECANISMES D'ACTION

Les androgènes sont également des hormones stéroïdiennes qui dérivent du cholestérol. La testostérone est l'androgène circulant majeur chez l'Homme. Les cellules de Leydig du testicule synthétisent 95% de la testostérone, en réponse à l'hormone lutéinisante (LH) produite par l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les androgènes circulants sont principalement complexés avec la

protéine de transport des hormones stéroïdiennes sexuelles « sex hormone-binding globulin » (SHBG) et peuvent diffuser dans les organes cible à travers la membrane. L'effet de la testostérone est médié par AR. La testostérone peut être convertie par la 5 α -réductase en dihydrotestostérone (DHT), métabolite plus actif. Cependant le muscle est dépourvu de 5 α -réductase, donc les effets sont médiés par la testostérone (Auchus, 2016; Chao and Page, 2016; Yarrow et al., 2012). La testostérone joue un rôle critique dans de nombreux processus biologiques, tels que la production de spermatozoïdes, le maintien des caractères sexuels mâles, le comportement, le métabolisme graisseux et la régulation de la force et de la masse musculaire (**Figure 21**) (McBride et al., 2016).

L'AR appartient également à la famille multigénique des NR et la voie classique d'activation d'AR est similaire à celle des autres NR. AR, sous forme de monomère, est séquestré dans le cytoplasme par liaison aux protéines HSP. Les androgènes diffusent à travers la membrane cellulaire et se lient à AR, provoquant la dissociation des protéines HSP. Le récepteur ligandé est transloqué dans le noyau sous forme d'homodimères et se lie à des éléments de réponse spécifique à AR (ARE) présents sur l'ADN. Il s'agit de répétitions directes de deux demi-sites hexamériques espacés de trois nucléotides, 5'- TGTTCNnnTGTTC-3' (Davey and Grossmann, 2016). Le recrutement d'AR sur ces ARE contenus dans les promoteurs de gènes cibles activent ou répriment leur transcription après recrutement de corégulateurs (CoA ou CoR, respectivement). Ces corégulateurs modifient l'expression de ces gènes à travers un remodelage de la chromatine et des modifications post-traductionnelles d'histones (Eder et al., 2001; van de Wijngaart et al., 2012). Il existe également des voies d'activation des androgènes ne nécessitant pas la liaison à l'ADN ou du ligand à AR, dites non génomiques ou non classiques. AR peut exercer des effets non génomiques notamment via (i) son interaction avec la protéine c-Src, induisant la voie MAPK, (ii) son interaction avec le récepteur au SHBG, augmentant l'activité de la PKA ou (iii) en modifiant le niveau de Ca²⁺ en s'associant directement avec la membrane. (Davey and Grossmann, 2016). Ces effets notamment sur le muscle sont mal caractérisés et ne seront pas abordés.

II.2.2 LES ANDROGENES DANS LA REGULATION DES FONCTIONS MUSCULAIRES

II.2.2.1 Effets bénéfiques des androgènes sur le muscle

Les androgènes exercent des effets anabolisants sur le muscle. Ils induisent une augmentation de la masse musculaire liée à une hypertrophie des fibres musculaires, reflétée par une augmentation du nombre de noyaux et de la taille des fibres de type I et II (Sinha-Hikim et al., 2002). Ainsi, en raison de leur effet sur les muscles squelettiques les androgènes représentent un potentiel thérapeutique majeur pour contrecarrer les effets de l'atrophie musculaire observés lors de certaines pathologies comme la cachexie, le SIDA ou les maladies chroniques rénales ou pulmonaires. De plus, étant donné que le niveau de testostérone diminue avec l'âge, une complémentation en testostérone pourrait permettre d'éviter la perte des fonctions musculaires avec la sarcopénie (MacLean and Handelsman, 2009). Chez des hommes jeunes atteints d'hypogonadisme (désignant une perte des fonctions de l'appareil reproducteur), un traitement androgénique induit une augmentation de la masse, de la taille et de la force musculaire (Watson et al., 2014). Les fonctions musculaires chez des hommes âgés ou infectés par le VIH après un traitement à la testostérone sont également améliorées (Basaria, 2013; Bhasin et al., 2001). De plus, l'administration d'androgènes chez des sportifs ou personnes normales pour augmenter les capacités musculaires est couramment utilisée mais les évidences d'un effet bénéfique sur la masse et la force du muscle sont peu nombreuses (Bhasin et al., 1996). Ces études

présentent des limites comme le choix du patient, le type d'androgènes utilisé, les doses et les temps de traitements, ainsi que les paramètres de mesure de la force.

Au niveau moléculaire, il a été proposé que l'administration de testostérone augmente la synthèse protéique et améliore le recyclage des acides aminés intracellulaires. L'effet sur la dégradation protéique est moins clair et semble dépendre de la durée du traitement (Ferrando et al., 1998). Les androgènes induisent également des changements dans la composition corporelle qui ne résultent pas de la balance entre synthèse et dégradation protéique, tels qu'une augmentation de la masse maigre accompagnée d'une diminution de la masse grasseuse (Wittert et al., 2003)

II.2.2.2 Cellules cibles des androgènes dans le muscle

AR est exprimé dans différentes cellules musculaires : les cellules souches mésenchymateuses, les fibroblastes, les cellules satellites et les myofibres.

Les muscles squelettiques présentent des différences de sensibilité aux androgènes probablement liées à la teneur en protéine d'AR. Par exemple, les muscles du périnée tels que le muscle élévateur de l'anus (LA) ou le muscle bulbocaverneux (BC) sont fortement sensibles aux androgènes et présentent un niveau protéique d'AR élevé (Johansen et al., 2007). Suite à une castration chez les souris et les rats, les muscles BC/LA sont atrophiés. En revanche leur taille augmente après un traitement androgénique. Les effets anaboliques des androgènes sur ces muscles entraînent des changements de la taille des fibres sans changer le nombre de fibres musculaires (Axell et al., 2006; Balice-Gordon et al., 1990). Cependant les muscles des membres tel que l'extensor digitorum longus (EDL) et le plantaris sont beaucoup moins sensibles, voir insensibles aux androgènes (Antonio et al., 1999; Tingus and Carlsen, 1993). Notre équipe a montré notamment que AR exprimé dans les myofibres contrôle la force, mais pas la masse musculaire des muscles des membres, tandis qu'il contrôle la masse du BC (Chambon et al., 2010).

Plusieurs études montrent que les traitements androgéniques permettent d'augmenter le nombre de cellules satellites chez l'Homme et les rongeurs. Les cellules satellites expriment fortement AR, et son expression peut être augmentée après un traitement androgénique, supportant le fait que les androgènes peuvent agir via la stimulation des cellules satellites pour maintenir la masse musculaire (Doumit et al., 1996; Sinha-Hikim et al., 2004). Certaines études suggèrent que les androgènes augmentent le nombre de cellules satellites et favorisent la croissance musculaire en maintenant les myoblastes dans un état de prolifération (Joubert and Tobin, 1995; MacLean et al., 2008). Cependant d'autres études suggèrent que les androgènes ne ciblent ni la prolifération ni la différenciation, mais d'autres fonctions des cellules satellites (Diel et al., 2008; Kamanga-Sollo et al., 2011).

L'effet des androgènes peut également être médié par les motoneurones. Ils expriment fortement AR et suite à une administration d'androgènes, le nombre et la taille des motoneurones, ainsi que les niveaux d'expression d'AR augmentent (Matsumoto et al., 1996; Park et al., 2002). De plus, l'augmentation de la masse musculaire suite à une administration de testostérone est associée à une diminution de la masse grasseuse. Ainsi, les androgènes pourraient favoriser la différenciation des précurseurs mésenchymateux pluripotents dans la lignée myogénique et inhiber leur différenciation dans la lignée adipogénique (Dubois et al., 2012; Herbst and Bhasin, 2004).

II.2.2.3 Action génomique des androgènes dans le muscle squelettique

Une étude récente a permis d'identifier 30 000 sites de liaison à AR (ABS) dans la chromatine de myoblastes suite à un traitement à la DHT. La majorité de ces sites présentent des ARE consensus indiquant que la régulation des gènes médiée par AR est principalement liée au recrutement de corégulateurs. Ces sites de liaison ont notamment été identifiés près de gènes codant pour des micro-ARN et du gène MEF2 qui contrôle la différenciation musculaire. Des ABS ont également été retrouvés dans des gènes impliqués dans l'intégrité du sarcomère, tels que la myomesine, la myotiline et la myozenine. Cependant peu de ces gènes cibles nouvellement identifiés n'ont été vérifiés et validés (Wyce et al., 2010).

Les androgènes régulent également la synthèse de polyamines, via l'augmentation de l'expression des enzymes limitantes pour leur biosynthèse de polyamine : ornithine décarboxylase (ODC1) et s- adénylméthionine décarboxylase (AMD1). Les souris castrées présentent une diminution de l'expression d'ODC1 et AMD1 (MacLean et al., 2008) et les modèles d'atrophie musculaire sont souvent associés à une diminution de polyamines, putrescine, spermidine, et spermine (Bardocz et al., 1992). Un ARE putatif a été mis en évidence dans le promoteur d'ODC1, mais il n'a pas été validé, ni retrouvé par l'équipe de Wyce (Crozat et al., 1992).

II.2.2.4 Androgènes et les voies de signalisation dans le muscle

Les androgènes peuvent également interagir avec d'autres voies de signalisation impliquées dans la régulation de la masse musculaire (Dubois et al., 2012).

Un traitement à la testostérone induit une augmentation de la phosphorylation d'Akt et mTOR (Allemand et al., 2009), tandis qu'une castration diminue le niveau de phosphorylation d'Akt et augmente le niveau de transcrits de MuRF-1 et Atrogin-1 (Ibebunjo et al., 2013). L'activation d'Akt serait médiée par l'interaction directe d'AR avec p85 permettant son activation (**Figure 28**) (Baron et al., 2004).

Des études sur des souris surexprimant ou n'exprimant plus la Mstn montrent des effets plus prononcés chez les mâles que les femelles suggérant une interaction entre les androgènes et la Mstn (McPherron et al., 1997). Il semble que les androgènes contrecarrent les effets de la Mstn via l'induction de β -caténine (Reisz-Porszasz et al., 2003; Singh et al., 2009). AR en se fixant sur un ARE, contrôle négativement l'expression de la Mstn (**Figure 28**) (Ma et al., 2001).

Les traitements à la testostérone induisent une augmentation du niveau circulant d'IGF-1, pas forcément nécessaire à leur effet anabolique (Bhasin et al., 2001). L'administration de fortes doses de DHT à des souris castrées ne modifie pas les niveaux d'IGF-I, alors que la masse du LA est augmentée (Xu et al., 2004). En revanche, la production locale d'IGF-I est un médiateur important des actions des androgènes dans le muscle (Chambon et al., 2010). Des ARE ont été mis en évidence dans le promoteur d'IGF-I (Wu et al., 2007). L'induction de l'expression d'IGF favorise l'expression et l'activation d'AR dans le muscle, permettant la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positif (Lee, 2009). De plus, un traitement androgénique à la DHT augmente les niveaux de phosphorylation de S6K1, favorisant la synthèse protéique (Xu et al., 2004). Ainsi, les androgènes interfèrent avec la voie d'IGF-I (**Figure 28**).

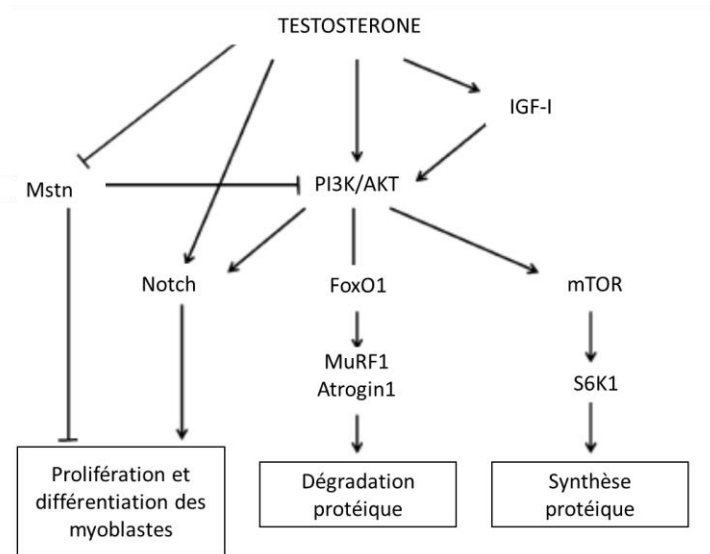


Figure 28 : Interaction entre les androgènes et les autres voies de signalisation dans le muscle.

La testostérone active la voie PI3K-Akt, aboutissant à la synthèse protéique. De plus, l'activation d'Akt diminue l'activation de FoxO et donc la dégradation protéique. La testostérone inhibe l'expression de la Mstn, réprimant la synthèse protéique et régulant négativement la différenciation et la prolifération des myoblastes. D'après (Dubois et al., 2012).

II.3 INTERACTIONS ENTRE LE RECEPTEUR AUX GLUCOCORTICOÏDES ET LE RECEPTEUR AUX ANDROGENES

De plus en plus d'évidences indiquent que les voies de signalisation des androgènes et des GC sont fortement interconnectées. Les androgènes réduisent l'expression du GR dans de nombreuses lignées cellulaires (Arora et al., 2013; Davies and Rushmere, 1990; Isikbay et al., 2014; Xie et al., 2015) et AR pourrait exercer un effet dominant négatif sur la fonction de GR (Yen et al., 1997). De plus, les GC diminuent la synthèse des androgènes via un mécanisme inhibant l'axe hypothalamo-hypophysaire (Hardy et al., 2005; Ing et al., 2014; Welsh et al., 1982).

Les mécanismes d'actions de GR et AR sont semblables. Bien que les deux récepteurs se fixent sur des éléments de réponses spécifiques afin de moduler l'expression de gènes cibles, GR réprime l'expression de certains gènes cibles en se liant à des nGRE (Surjit et al., 2011), et il semble qu'AR inhibe l'expression de certains gènes en se liant à des nARE mal caractérisés (Gast et al., 1998; Qi et al., 2012). Les GC peuvent inhiber la signalisation médiée par les androgènes, en favorisant la liaison de GR à AR. AR et GR peuvent s'associer via leur DBD pour former un hétérodimère *in vitro*, inhibant l'activité de chaque récepteur au niveau transcriptionnel (Chen et al., 1997). De plus, Zhao *et al.* propose que l'administration d'un stéroïde anabolisant induit la formation de cet hétérodimère, réprimant la transcription de gènes cibles en recrutant des CoR (Zhao et al., 2004)

Plusieurs études ont montré que l'atrophie musculaire induite par les GC peut être compensée en partie par les androgènes (Qin et al., 2010; Van Balkom et al., 1998; Wu et al., 2010; Zhao et al., 2008b). Il a été proposé que la testostérone protège de l'atrophie musculaire en induisant l'expression de PGC1 α , inhibant ainsi l'activité de FoxO1 et FoxO3a (Qin et al., 2010; Zhao et al., 2008a). La

testostérone peut également inhiber l'expression du gène *Redd1* induite par un traitement aux GC (Wu et al., 2010).

Une analyse génomique a montré que les séquences de liaison de AR et GR sont des séquences répétées inversées imparfaites, avec des séquences du premier demi-site plus conservé que l'espaceur et le second demi-site. GR et AR partagent 25 à 45% de leur cistrome suivant le type cellulaire. La transcription de 50% des gènes liés par AR et GR est régulée par les deux récepteurs (Arora et al., 2013; Sahu et al., 2013).

II.4 MODELES MURINS

II.4.1 MODELES ANIMAUX D'INVALIDATION DU RECEPTEURS AUX GLUCOCORTICOÏDES

L'approche classique pour étudier le rôle des GC était d'utiliser des animaux surrénalectomisés ou traités avec l'antagoniste de GR, le RU486. Cependant, ces approches ne sont pas été assez spécifiques pour déterminer le rôle de GR dans le muscle. De plus, les souris homozygotes pour une invalidation ciblée du gène de GR (*GR^{-/-}*) meurent dans les heures après leurs naissances, en raison d'une insuffisance respiratoire résultant d'un défaut sévère de développement des poumons (Cole et al., 1995).

De nombreux modèles d'invalidation spécifique de GR dans les tissus cibles ont été générés. Ainsi cela a permis dans le muscle squelettique d'analyser l'effet des GC sur l'atrophie musculaire et d'identifier les gènes cibles de GR dans différents modèles d'atrophie musculaire.

Quatre groupes ont développé des souris n'exprimant plus GR dans le muscle (MGRKO) qu'ils ont soumis à différents modèles d'atrophie musculaire.

(i) Hu *et al.* a créé un modèle MGRKO en utilisant la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase spécifique du muscle (MCK-Cre) pour exciser l'exon 2 de GR (Hu et al., 2009). Ils ont démontré que les souris MGRKO sont protégées de l'atrophie musculaire induite par le diabète et la mise à jeun en empêchant la diminution d'IRS-1 et de l'activité de PI3K.

(ii) Watson *et al.* a créé un modèle MGRKO en utilisant également la MCK-Cre pour exciser l'exon 3 de GR (Watson et al., 2012). Ils ont montré que GR est essentiel dans la mise en place de l'atrophie musculaire induite par un excès de GC, mais, il n'est qu'en partie requis dans l'atrophie musculaire induite par la mise à jeun et n'est pas impliqué dans les mécanismes conduisant à l'atrophie musculaire induite par la dénervation.

(iii) L'équipe de Braun a utilisé la même stratégie que Hu *et al.* (Hu et al., 2009). Ils ont montré que l'atrophie musculaire induite par l'inflammation ou la cachexie (Braun et al., 2013) ou par des agents cytotoxiques thérapeutiques (Braun et al., 2014) est fortement réduite chez ces souris. Ces résultats suggèrent que les cytokines inflammatoires, au lieu d'agir directement sur le muscle, induisent l'expression de GR dans le muscle.

(iv) Récemment, l'équipe de Shimizu a créé un modèle MGRKO en utilisant la cre recombinase sous le contrôle du promoteur « skeletal muscle actin 1 » (*ACTA1*) pour exciser l'exon 3 de GR. Il a mis en évidence un axe de signalisation entre le muscle, le foie et la graisse, via le facteur « fibroblast growth factor 21 » (*FGF21*) (Shimizu et al., 2015).

Ainsi ces études ont démontré que GR joue un rôle central dans l'atrophie musculaire induite par le diabète, un excès de GC, la mise à jeun, l'inflammation et la cachexie, ainsi que dans la régulation du métabolisme à l'état basal. De plus, l'effet des GC via la présence de GR dans les fibres n'est pas limité au muscle mais peut s'étendre à d'autres organes via une voie de signalisation entre le muscle, le foie et la graisse.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de GR, une lignée de souris transgéniques, nommées GR^{dim/dim}, a été créée dans laquelle GR est incapable de former un homodimère. Ainsi GR ne peut ni se lier à l'ADN ni activer la transcription des sites GRE classiques, tandis que la transrépression via les facteurs AP-1 et NF-κB n'est pas affectée (Reichardt et al., 1998). Le degré d'atrophie musculaire relevé chez les souris contrôles est similaire à celui des souris GR^{dim/dim}, montrant que la dimérisation de GR n'est pas nécessaire pour médier l'atrophie musculaire. MuRF1, une ubiquitine ligase possédant un GRE au niveau de son promoteur, est fortement induite chez les souris contrôles après traitement à la dexaméthasone, ce qui n'est pas le cas chez les souris GR^{dim/dim}. La même observation fut faite pour FoxO1 et FoxO3a, indiquant que la dimérisation est nécessaire à l'induction de ces deux facteurs, et donc que l'atrophie chez ces animaux résulte de l'activation d'autres voies de signalisation (Waddell et al., 2008). Cependant, une étude récente a remis en cause les conclusions tirées de l'étude initiale sur les GR^{dim/dim}, en suggérant que les mutants GR^{dim} activent non seulement la transcription de gènes, mais en contradiction avec les travaux initiaux, sont capables de former des homodimères (Nixon et al., 2013).

II.4.2 MODELES ANIMAUX D'INVALIDATION DU RECEPTEUR AUX ANDROGENES.

Plusieurs modèles de souris chez lesquelles AR a été invalidé dans la lignée germinale ont été générés (Notini et al., 2005; Sato et al., 2003; Yeh et al., 2002). Ces souris présentent un aspect externe de femelle, sans prostate, vésicules séminales et avec des testicules fortement atrophiés. Ces animaux présentent également des problèmes métaboliques et deviennent obèses. MacLean *et al.* a étudié les fonctions musculaires de souris chez lesquelles AR est invalidé (MacLean et al., 2008). Il a montré que l'absence de AR entraîne une absence du muscle LA et une diminution de la masse des muscles des membres. De plus, chez ces souris KO, la force générée est plus faible dans les muscles rapides et cette diminution est liée à la diminution de la masse musculaire. Mais ces études ne permettent pas de caractériser le rôle des androgènes dans le muscle squelettique, car AR est invalidé dans toutes les cellules de l'organisme. C'est pourquoi le laboratoire a développé un modèle murin chez lequel AR est sélectivement invalidé dans les myofibres du muscle squelettique de souris. Les résultats ont mis en évidence qu'AR est nécessaire à la structuration des sarcomères afin de générer une force musculaire optimale. Ce mécanisme peut se faire par une régulation de l'autophagie via AR dans les myofibres. De plus, lors d'une surcharge mécanique, AR dans les myofibres est indispensable à la croissance musculaire (Chambon et al., 2010; Ferry et al., 2014).

III. OBJECTIFS DE LA THESE

Les androgènes et les GC exercent des effets pléiotropiques chez les mammifères, notamment sur le muscle. Les muscles représentent plus de 40 % de la masse corporelle, permettent le maintien de la posture, le déplacement et la respiration, et constituent une réserve protéique importante. L'atrophie musculaire est fortement invalidante, pouvant conduire à une dépendance physique, à des chutes et des fractures osseuses, induisant notamment un coût socio-économique important.

Les GCs possèdent de puissantes propriétés anti-inflammatoires, et sont utilisés pour traiter des infections et des maladies chroniques, telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'eczéma et l'asthme. Cependant leur utilisation prolongée est limitée, car ils induisent des effets secondaires importants, notamment l'atrophie musculaire. Bien que les GC induisent une atrophie musculaire, ils constituent le traitement le plus efficace de la MD. Ainsi, les GC induisent à la fois une atrophie musculaire chez les patients non dystrophiques et des effets bénéfiques sur les fonctions musculaires des patients atteints de MD. Les androgènes exercent un effet anabolique sur les muscles, particulièrement intéressant pour améliorer les fonctions musculaires chez les personnes âgées ou chez les patients atteints de sarcopénie, cachexie ou du SIDA. De plus, plusieurs études ont montré que l'atrophie musculaire induite par les GC peut être compensée en partie par les androgènes. Cependant comme les androgènes stimulent également la prolifération des cellules épithéliales de la prostate, ils augmentent le risque de développer un cancer de la prostate. L'identification d'analogues de ces deux molécules avec une activité sélective et induisant moins d'effets secondaires est donc un enjeu majeur des industries pharmaceutiques. Cependant, les voies de signalisation contrôlées par ces deux hormones sont mal caractérisées, rendant cette identification difficile.

L'objectif principal de mon projet de thèse est de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les GC et les androgènes régulent la masse et les fonctions musculaires.

Pour atteindre ce but :

(i) Nous avons soumis des souris $GR^{(i)skm-/-}$, chez lesquelles GR est sélectivement invalidé dans les myofibres du muscle strié à l'âge adulte, à diverses situations physiologiques et physio-pathologiques, afin d'étudier les mécanismes contrôlés par les GC dans le muscle.

(ii) Nous avons comparé l'effet de deux analogues aux GC sur les muscles de souris sauvage et d'un modèle murin de MD, afin d'identifier les événements contribuant à l'amélioration des signes cliniques observés dans la MD, ainsi que ceux responsables des effets secondaires indésirables.

(iii) Nous avons étudié l'effet de la testostérone sur les voies de signalisation contrôlées par les GC afin d'identifier les mécanismes responsables de l'interaction entre ces deux voies de signalisation dans le muscle squelettique.

(iv) Nous avons étudié l'effet de la castration sur le gain de fonction et de performance musculaire durant le développement post-natal afin de déterminer le rôle des facteurs produits par les gonades mâles et femelles dans ces mécanismes.

RESULTATS

I. LE RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOÏDES DANS LES MYOFIBRES CONTROLE L'EXPRESSION D'UN ENSEMBLE DE GENE RESULTANT EN UNE REGULATION DYNAMIQUE DE LA VOIE ANTI-ANABOLIQUE ET CATABOLIQUE DANS LES MUSCLES DE SOURIS ADULTES.

Les GC sont des hormones stéroïdiennes qui contrôlent le métabolisme lipidique et glucidique dans de nombreux types cellulaires. De plus, des niveaux élevés de GC induisent une dégradation des protéines musculaires en acides aminés afin de servir de substrat à la néoglucogenèse hépatique. Grâce à leurs puissantes activités anti-inflammatoires, ils sont utilisés pour traiter des maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'eczéma ou l'asthme. Cependant leur utilisation systémique chronique est limitée par leurs effets secondaires, notamment la fonte musculaire.

L'activité des GC est médié par GR, un membre de la famille multigénique des récepteurs nucléaires. Pour caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les GC régulent la masse et les fonctions musculaires, nous avons généré des souris GR^{(i)skm^{-/-}}, dans lesquelles GR est sélectivement invalidé dans les fibres des muscles squelettiques à l'âge adulte.

Nos résultats démontrent que GR régule négativement la masse musculaire en présence de concentrations physiologiques de GC, en exerçant un effet anti-anabolique aboutissant à une diminution de la synthèse protéique. Des analyses transcriptomiques ont également montré que GR régule négativement l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogenèse, la dégradation d'acides aminés, et dans l'inhibition des protéases.

Une étude des voies de signalisation conduisant à l'atrophie musculaire suite à un traitement chronique à la dexaméthasone a été réalisé chez des souris contrôles GR^{L2/L2} et des souris GR^{(i)skm^{-/-}}. Nos études ont révélé que GR dans les myofibres est essentiel à l'activation de l'expression de gènes impliqués dans les voies protéolytiques et autophagiques après l'administration de doses supra-physiologiques de GC. Pour préciser les mécanismes moléculaires contrôlés par les GC dans les myofibres, nous avons effectué des analyses transcriptomiques et une immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage massif après un traitement aigu aux GC. Nos données ont révélé que l'expression de gènes impliqués dans l'absorption du glucose, dans la dégradation des lipides et dans la régulation négative de synthèse protéique était augmentée en présence de GC via la liaison de GR sur le promoteur de ces gènes. En revanche, un traitement aigu aux GC n'induit pas l'expression de tous les gènes codant pour des facteurs clés impliqués dans les systèmes protéolytiques et autophagiques, mais nécessite une exposition de plusieurs jours aux GC.

Nos résultats ont permis d'identifier toutes les régions génomiques contrôlées GR dans les fibres musculaires et ont mis en évidence les réseaux de gènes contrôlés par ces hormones. De plus, nos résultats suggèrent que la mise en place de l'atrophie musculaire est un mécanisme dynamique qui permet de moduler la réponse des GC dans le muscle en fonction de leur concentration et de la durée d'exposition.

MANUSCRIPT IN PREPARATION

MYOFIBER GLUCOCORTICOID RECEPTOR CISTROME REVEALS THAT GR CONTROLS THE EXPRESSION OF AN ARRAY OF GENES RESULTING IN DYNAMIC REGULATION OF ANTI-ANABOLIC AND CATABOLIC EFFECTS ON MOUSE SKELETAL MUSCLES.

I.1 INTRODUCTION

Skeletal muscle is a dynamic tissue that has the capacity to regulate its size in response to a variety of external cues, including mechanical load, neural activity, hormones/growth factors, stress and nutritional status. It serves as the most important repository of protein in the body to provide a pool of amino acids for tissue repair and hepatic gluconeogenesis during starvation (Lecker et al., 2004). Muscle atrophy is induced in diverse conditions including aging, immobilization, metabolic diseases, cancer and neurodegenerative diseases. Muscle weakness results from inhibition of anabolic and activation of catabolic pathways. The growth factor IGF-I, which activates Akt kinase by phosphorylation on Thr₃₀₈ residue, induces muscle hypertrophy (Sacheck et al., 2004). Activated Akt phosphorylates mTOR, an evolutionary conserved nutrient sensing protein kinase that regulates cell growth and metabolism. mTOR resides in two structurally and functionally distinct signaling complexes: mTOR complex 1 (mTORC1) and mTORC2. The raptor-containing complex mTORC1 regulates a large range of cellular activities, including transcription, translation, ribosome biogenesis and autophagy. The ribosomal S6 Kinase (S6K1) and the translation repressor 4E-BP1 are two key cellular substrates for mTORC1 (Gingras et al., 1998; Rommel et al., 2001). The rictor-containing complex mTORC2 is proposed to regulate actin organization. The mTORC2 complex phosphorylates Akt on Ser₄₇₃, which lead to full activation of Akt (Bentzinger et al., 2013). Regulated in development and DNA damage response 1 (REDD1) has been proposed to inhibit mTOR in response to several catabolic stresses (Britto et al., 2014). An increase in the regulatory subunit of PI3K (p85 α), without a concomitant increase in the catalytic subunit (p110) and contribute to the inhibition of PI3K activity (Kuo et al., 2012). Muscle catabolism involves three main pathways: (i) the cytosolic calcium-dependent calpain system (Smith et al., 2008), (ii) the ubiquitin-proteasome system (UPS) through which proteins are ubiquitinated and degraded by the ATP-dependent 26S-proteasome (Clarke et al., 2007), and (iii) the autophagy-lysosomal protease system (Mammucari et al., 2007). The E3 ubiquitins (E3 ligases) Atrogin1 and MuRF1 are upregulated by various conditions leading to muscle atrophy (Clarke et al., 2007; Lecker et al., 2004). Autophagy-induced protein degradation is mediated by autolysosomes formed by the fusion of autophagosomes containing Beclin1, LC3 and ATG proteins, and lysosomes, vesicles filled with cathepsin proteases (Southgate et al., 2007; Zhao et al., 2007). FoxO transcription factor family members control many genes involved in catabolic pathways, such as Atrogin1, MuRF1, Cathepsin-L, and LC3 (Schakman et al., 2013).

Natural glucocorticoids (GC) such as cortisol and corticosterone control development, circadian rhythm, glucose, lipid and protein metabolism as well as inflammation and immune functions. Synthetic GC such as dexamethasone and prednisolone are potent anti-inflammatory agents but also induce skeletal muscle atrophy at high concentrations. They exert their biological effects predominantly via the GC receptor (GR), a member of the nuclear receptor superfamily, which acts as

a ligand dependent transcription factor. In the absence of ligand, GR is maintained in the cytoplasm by molecular chaperones (Schakman et al., 2008). Upon ligand binding, GR translocates to the nucleus and binds DNA onto GC response elements to activate (GRE) or repress (nGRE) target genes. In addition, GR negatively influences transcription in a GRE- and homodimer-independent manner, via interaction with promoter-bound STAT5, AP-1 or NF- κ B transcription factors (Bodine and Furlow, 2015).

A number of studies have analyzed GC action in cultured myotubes, and recently, the central role of GR in skeletal muscle atrophy has been highlighted by analyzes of signaling pathways controlled by GR in mouse skeletal muscles (Hu et al., 2009; Shimizu et al., 2015; Watson et al., 2012). However, the molecular mechanisms by which GC regulate muscle mass and function remain poorly understood. We thus generated GR^{(i)skm-/-} mice, in which GR is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood. Our results demonstrate that physiological levels of GC exert an anti-anabolic effect via GR myofibers reducing skeletal muscle mass and strength. To identify direct GR targets in skeletal muscles upon acute GC exposure, we performed chromatin-immunoprecipitation from murine skeletal muscles followed by high sequencing. We determined that GR directly controls expression of 13 400 genes. These results revealed new genes networks controlled by acute GC exposure in myofiber. Moreover, we showed that GR is essential for GC-induced muscle atrophy, however GC response in muscle depends on their concentration and their exposure time.

1.2 RESULTS

Myofiber GR exerts anti-anabolic effects in mouse skeletal muscles.

To determine the effect of physiological GC levels on mature skeletal muscles, we generated GR^{(i)skm-/-} mice, in which GR is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at 2 months of age, by Tamoxifen administration to mice expressing the CreER^{T2} recombinase in myofibers and bearing two LoxP-flanked GR alleles (**Supplemental Figure Supplemental 1**). The body weight of 2 to 6 month-old GR^{(i)skm-/-} males and age- and sex-matched control littermates was similar (**Figure 1A**). The mass of gastrocnemius, quadriceps and tibialis increased however more with time in GR^{(i)skm-/-} mice than in control mice (**Figure 1B**), and at 4 months, it was 10-20% higher in GR^{(i)skm-/-} than in control mice. Moreover, grip strength was 6 and 10 % higher in GR^{(i)skm-/-} mice than in control mice at 4 and 6 months of age, respectively (**Figure 1C**), and tibialis maximal tetanic force was 24% higher in GR^{(i)skm-/-} mice than in control mice at 4 months of age (**Figure 1D**). Tibialis specific force was however similar in control and GR^{(i)skm-/-} mice (**Figure 1E**).

Histological analysis of gastrocnemius revealed that the number of muscle fibers was similar in 4 month-old control and GR^{(i)skm-/-} mice (**Figure 1F**). However, whereas the fiber cross sectional area (CSA) distribution was centered around 2000 μm^2 in control mice, it was shifted to 2500 μm^2 in GR^{(i)skm-/-} mice (**Figure 1G**), resulting in a \sim 15 % increase of average fiber CSA (**Figure 1H**). Similar results were observed in tibialis (**Figure 1I-J**).

Together, these results show that physiological GC levels exert a negative effect on hind limb muscle mass in adult mice via myofiber GR, mainly by decreasing fiber size.

To further characterize skeletal muscles of GR^{(i)skm-/-} mice, we analyzed the IGF/PI3K/mTOR anabolic pathway in gastrocnemius muscle. Whereas mTOR levels were similar in gastrocnemius muscle of 4

month-old control and GR^{(i)skm^{-/-}} mice, p-mTOR levels were increased, and mTORC1 activity was enhanced, as revealed by increased phosphorylation of its downstream target 4E-BP1 (**Figure 2A and B**). Interestingly, the transcript and protein levels of REDD1, a negative regulator of mTOR phosphorylation, were reduced by 75% in GR^{(i)skm^{-/-}} mice (**Figure 2A and B, and Supplemental Figure 2A**). In contrast the transcript levels of IGF and of p85a, a regulatory subunit of PI3K, were similar in gastrocnemius muscle of 4 month-old GR^{(i)skm^{-/-}} mice and control mice (**Supplemental Figure 2A**). Moreover, protein levels of AKT and of its phosphorylated form on Thr₃₀₈, were similar in control and mutant mice (**Figure 2A and B**). Thus, these results show that myofiber GR inhibits the anabolic pathway under physiological GC levels, at least in part by enhancing Redd1 expression.

As reduced muscle protein catabolism might also contribute to increased muscle fiber size (Mammucari et al., 2007; Mammucari et al., 2008; Sandri et al., 2004), we determined the levels of FoxO1 and FoxO3a, two key regulators of muscle proteolytic pathways in gastrocnemius muscle of 4 month-old control and GR^{(i)skm^{-/-}} mice. The transcript levels of FoxO1 and FoxO3a, as well as the protein level of FoxO1 and phosphorylated forms of FoxO1 Ser₂₅₆ were similar (**Figure 2A and 2B, and supplemental Figure 2B**). Moreover, transcript levels of genes involved in the ubiquitin proteasome system (e.g. MuRF1, Atrogin1), autophagy (Cathepsin-L) and calpain system (calpain) were similar in GR^{(i)skm^{-/-}} and control mice (**Supplemental Figure 2C**).

Taken together, these results show that physiological GC levels down-regulate the anabolic mTOR pathway and decrease muscle mass, via myofiber GR, but do not stimulate classical catabolic pathways.

To identify additional pathways that might be controlled by GR in skeletal muscles under basal GC levels, transcriptomic analyzes of tibialis from 14-week-old control and GR^{(i)skm^{-/-}} mice were performed. Statistical analyzes identified 560 differentially expressed genes. The transcript levels of 88 genes were increased with a fold change higher or equal to 1.5 in tibialis of GR^{(i)skm^{-/-}} mice compared to controls. Gene ontology analysis using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 (Huang da et al., 2009a; Huang da et al., 2009b) revealed that 13 genes encode peptidase inhibitors (e.g. SERPINA3N, SERPINF2, SERPINA1C) (Huntington, 2011), 5 genes involved in cholesterol metabolism (e.g. HMGCS2, APOC3, APOC1), 4 genes encoding key enzymes that promote gluconeogenesis (e.g. ALDOB, FBP1, PCK1) and 3 of them involved in amine catabolic processes (e.g. TDO2, AASS, CDO1). In addition, more 56 % of differentially expressed genes were not classified in specific pathways (**Figure 2C**). Finally, 32 genes were less expressed in tibialis of GR^{(i)skm^{-/-}} mice than of controls with a fold change lower or equal at 0.7, but gene ontology analysis did not reveal any specific pathway.

Blood glucose clearance at basal level and after intraperitoneal injection of a bolus of glucose was similar in control and GR^{(i)skm^{-/-}} mice at 4 and 12 months (**Supplemental Figure 2D**).

Thus, our results demonstrate that physiological levels of GC exert an anti-anabolic effect via GR myofibers, by inducing the expression of Redd1 whereas the main catabolic pathways are unaffected. Moreover, these results show that physiological GC levels via myofiber GR negatively control the expression of genes involved in gluconeogenesis, triglycerides uptake, amino acid degradation, KB formation and encoding for peptidase inhibitor.

Mice lacking GR in myofibers are resistant to dexamethasone-induced muscle atrophy.

To analyze the role of myofiber GR in dexamethasone (dex)-induced muscle atrophy, dex was intraperitoneally administered at 10 mg/kg/day for 3 days to 2-3 month-old control and GR^{(i)skm^{-/-}} mice. Dex administration to control mice induced an atrophy of the spleen and a body weight reduction (**Supplemental Figure 3A and B**), as well as ~ 15-20 % weight loss of gastrocnemius, tibialis and quadriceps, but not of soleus (**Figure 3A**). Gastrocnemius CSA was 20 % lower in dex-treated than in oil-treated control mice (**Figure 3B and C**). Similar results were obtained in tibialis muscle (**Supplemental Figure 3C**). Dex administration to GR^{(i)skm^{-/-}} mice also induced atrophy of their spleen and decreased their body weight (**Supplemental Figure 3A and B**), but gastrocnemius, tibialis, quadriceps and soleus muscle mass, as well as gastrocnemius and tibialis CSA, were similar to those of vehicle-treated mice (**Figure 3A to C and Supplemental Figure 3C**), demonstrating that myofiber GR mediates dex-induced skeletal muscle atrophy.

To characterize the molecular pathways involved in dex-induced muscular atrophy, the transcript levels of genes involved in protein degradation were analyzed by qPCR in gastrocnemius muscle. Those of FoxO3a, MuRF1 and Atrogin1 were induced in dex-treated control mice by 5-, 4.5- and 8-fold, respectively. Myostatin expression, which is stimulated during muscle atrophy, was more than 3-fold induced by dex in control mice (**Figure 3D**). In addition, dex increased the transcript levels of the autophagy-related genes Cathepsin-L, ATG7, LC3 and BNIP in controls by 2.5-, 2-, 1.5- and 2.5-fold, respectively (**Supplemental Figure 3D**). In contrast, none of these gene were induced in GR^{(i)skm^{-/-}}. Moreover, the transcript level of genes encoding catabolic transcription factors, E3 ubiquitin ligases, autophagy and inhibitors of anabolic pathways were similar in soleus of vehicle and dex-treated control mice (**Supplemental Figure 3F**), in agreement with unaffected soleus mass after dex treatment.

As ATF4 and Gadd45a have been shown to be required for skeletal muscle atrophy induced by stresses such as fasting, muscle immobilization and muscle denervation, we analyzed their expression. Dex treatment induced ATF4 and Gadd45 transcript levels in control mice (**Figure 3D**), but not in mutant mice, showing that GC induce ATF4/Gadd45 signaling via myofibers GR.

Whereas the transcript levels of IGF, IRS, mTOR and 4EBP1 remained unaffected upon dex treatment in control and mutant mice (**Supplemental Figure 3E**), the transcript levels of p85 and Redd1, two negative regulators of the anabolic pathway, were induced in control mice upon dex treatment, but not in mutants (**Figure 3D**).

Thus, myofiber GR plays a key role in inducing in fast muscles, muscle atrophy by high GC levels GR. GR is essential to induce the expression of genes involved in proteolytic and autophagic pathways, as well as in negative regulation of anabolic pathway.

An acute dex treatment induces an array of genes in skeletal muscle controlling glucose absorption and lipid degradation.

To characterize events of acute GC treatment in skeletal muscle myofibers, GR^{(i)skm^{-/-}} mice and control mice were intraperitoneally injected with 10mg/kg dex, and gastrocnemius muscle was analyzed 6 hrs later.

Transcript and protein level of p85 and Redd1 were increased in control mice treated with dex, but not in mutants (**Figure 4A to 4C**). Protein levels of total 4EBP1 were increased, whereas phosphorylated forms on Thr_{36/37} were reduced in dex-treated control mice, thus leading to reduced protein synthesis,

whereas in dex-treated mutant mice total and phosphorylated 4EBP1 protein levels were not modified (**Figure 4A and 4B**).

Moreover, acute GC treatment induced transcript and total protein levels of FoxO1 in control mice, but not in mutants. The phosphorylated form of FoxO1 (Ser₂₅₆) was not affected by this treatment in control and mutant mice (**Figure 4A to C**). Transcript levels of FoxO3a and MuRF1 were increased in control mice, whereas their levels were unchanged in mutant mice (**Figure 4C**). However, such an acute exposure to dex did not alter the transcript levels of genes known to be increased in GC-induced atrophy, such as Atrogin1, Bnip and Cathepsin-L in control mice (**Figure 4C**).

These results show that an acute dex treatment negatively controls the anabolic pathways in skeletal muscle via and myofibers GR, but is not sufficient to fully induce the catabolic pathways.

Transcript levels of Redd1 were induced in quadriceps, tibialis and soleus by 6 hrs dex treatment (**Supplemental Figure 4A to C**). In contrast, FoxO1 and MuRF1 transcript levels were induced in quadriceps and tibialis, but not in soleus muscle, in agreement with resistance to dex-induced atrophy of soleus muscle (**Supplemental Figure 4A to C**).

To further characterize genes induced by an acute dex treatment, RNA extracted from tibialis of mice treated for 6 hrs (3 control mice with vehicle; 3 control mice with dexe and 3 GR^{(i)skm-/-} with dex at 10 mg/kg) was analyzed by microarray. 1115 genes were differentially expressed between vehicle- and dex-treated control mice, but not between vehicle- and dex-treated GR^{(i)skm-/-} mice. About 330 genes were selectively up-regulated upon dex treatment with a fold change higher or equal to 1.5, and 339 genes were down-regulated with a fold change lower or equal to 0.7 specifically. These genes include some that were known to be controlled by GR after dex treatment, such as MuRF1, Redd1, Mstn and FoxO, as well as many not known to be regulated by GC (e.g. ITGα6, SLC30a2, Stxbp4, ...) or not reported to be GC targets in skeletal muscle tissue (e.g. Glul, Fkbp5, Serpina3n, Txnip...).

To identify direct GR targets in skeletal muscles, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) with muscles of control and GR^{(i)skm-/-} mice treated for 1h30 with dex at 10 mg/kg.

13 400 GR binding site (GBS) were identified genome wide in gastrocnemius of dex-treated control mice, this number falling to about 2500 GBS in dex-treated GR^{(i)skm-/-} mice. Some of the GBS identified in control but not in GR^{(i)skm-/-} mice were located in genes previously shown to contain GREs (e.g. Redd1), as well as in genes that were not reported to be GC targets in skeletal muscle tissue (e.g. Glul). Importantly GR recruitment to most GBS identified in dex-treated control mice is almost abolished in dex-treated GR^{(i)skm-/-} mice, showing that the effect of GC mainly occur in myofiber and not other cell types, such as satellite cells, or vascular cells. We found GBS already identified in previous reports (Qin et al., 2014; Shimizu et al., 2011; Waddell, 2008 #70; Waddell et al., 2008), such as in promoter region (e.g. Redd1, MuRF1 and FoxO1) (**Figure 5A**).

GR-occupied site were localized both in inter-and intragenic regions, at +/- 50 kb to 500 kb from TSS (**Figure 5B and C**).

Gene ontology analyzes of genes having a GR-occupied site revealed that many biological, metabolic and cellular process (e.g. transcription, post transcription, cell cycle, and catabolic regulation, transport and metabolism of amino-acid) are potentially regulated by GC (**Figure 6A**).

By integrating the data of the transcriptome performed at 6 hrs after dex and ChIP-seq performed at 1h30 after dex, we identified 136 GBS-containing up-regulated genes and 133 GBS-containing down-regulated, whereas more than 6800 were unaffected (**Figure 6B**).

Gene ontology revealed that among the upregulated genes, 12 are involved in regulation of apoptosis (e.g. HIPK1, BCL2L1, DAPK1, CDKN1A), 6 in lipid transport (e.g. LDLR, OSBPL10, ABCA1), 5 in ubiquitin-dependent protein catabolic process (e.g. USP54, TBL1XR1, SIAH1A, MuRF1), 4 in amino acid transport (e.g. SCL7A8, XK, SCL7A5), 4 in amine biosynthetic process (ODC1, GLUL, PNMT), 4 in carbohydrate process (PPP1R3C, ALDOB, CHST15), and 3 of them in insulin pathway (EIF4EBP1 (4EBP1), FOXO1, PTPN1) (**Figure 6C**). In addition, 70% of them are unclassified using biological process clustering.

Downregulated genes include 9 involved in angiogenesis (e.g. EGFL7, VEGFA, CXCL12), 8 in positive regulation of transcription regulation (e.g. Ets1, PPARG, NFATC2, PPARGC1A), 4 in regulation of cyclic nucleotide biosynthetic process (e.g. NPR1, GUCY1A3), 4 in striated muscle development (e.g. MYOD1, MEOX2) and 3 of them in lipid metabolic process (INSIG1, GR (NR3C1), IRS1) (**Figure 6D**).

This shows that liganded-GR directly stimulates genes involved in lipid transport and degradation, in amino acid transport but also in ubiquitin-dependent protein catabolism, and inhibits transcription factors and genes involved in angiogenesis and muscle development.

A *de novo* motif search in GBS-containing genes that are up-regulated upon dex treatment revealed a marked enrichment of the classical GRE (NR3C1) motif (**Figure 7A**). In addition, other motifs were found in GBS (e.g. EGR2 and Ets1), but are not centrally enriched and represent less than 8 % of total GBS (**Figure 7A**). The *de novo* motif search in GBS-containing genes that are downregulated upon dex did not reveal any enriched motif (data not shown). Additional bio-informatics analyzes were performed in order to identify the subset of gene regulated by myofibres GR through GRE, NF-κB or AP1 (cJun) binding sites (**Figure 7B**). We identified among the GBS-containing up-regulated genes, 100 genes with a GRE motif (e.g. ODF3L2, Serpina, Lcn2, Doc2B, Tiparp). Interestingly, we also identified 4 and 5 genes containing either a cJun (e.g. SIAH1A) or NFKB (e.g. TIRAP) motif, respectively. We performed a similar analysis on down-regulated GBS-containing genes (**Figure 7C**), and identified 16 genes with a NF-κB motif (Fscn1, Myod1, Spry4) and 3 genes with a cJun motif (e.g. Timp4). Surprisingly, we also found 43 of them with a GRE motif (Ccnd1, Ddit4l, PPARγ). Interestingly, some genes have several GBS in their promoter region of different type, such as Redd1, Sesn1, Pfkfb3, Itga6, and PGC-1α. We also performed a FoxO supervised research motif and identified GBS with a FoxO motif under their promoter in 36 up-regulated and 32 down-regulated genes. Interestingly, the GBS in the promoter region of GR is predicted to be a NF-κB motif.

In addition, we identified only few genes regulated by GR under physiological and high level of GC (ODF3L2, Slc30a2, Glul, Csrp3 and CCND1). These results show that physiological and high level of GC regulate different sets of genes.

Together this results show that GR control a complex gene network in myofiber and regulates gene expression through complex interactions with the genome.

GC-induced muscle atrophy is a dynamic process and required a signaling cascade.

Interestingly, 24 hrs after dex treatment, the transcript levels of Redd1 and p85, as well as those of FoxO1, FoxO3a and MuRF1, returned to baseline levels in control mice (**Figure 8A**). A second exposure to dex 24 hrs after the first administration strongly increased these transcript levels within 12 hrs,

which remained elevated for at least 24 additional hrs after a third injection of dex performed 48 hrs following the first administration. Transcript levels of FoxO1, MuRF1 and Redd1 are induced by 8-, 7- and 5 fold, respectively, after acute (6 hrs) and two dex administrations. Transcript levels of FoxO1 remain stable after the third exposition, but transcript level of MuRF1 and Redd1 continue to increase. The transcript levels of FoxO3a are induced by 5-fold upon acute dex exposure and upon three dex administrations, but two dex administrations lead to a 3.5-fold increase compared to vehicle-treated mice. Transcript level of p85 are induced by 7-fold upon acute GC treatment and by 13-fold upon three dex administrations. In contrast, the transcript levels of Atrogin1 was not induced upon acute dex exposure, but induced by 3.5 fold 24 hrs after dex treatment and by 12 fold after three dex administrations (**Figure 8A**).

The protein and mRNA levels of myofiber GR is strongly decreased 2 hrs after dex treatment and remain low 6 hrs after GC exposure. However, they return to baseline levels 18 hrs later, and GR transcript levels are similar to vehicle treated mice after two and three GC exposure (**Figure 8B**).

Taken together, these results show that kinetics of atrophy-related gene induction is variable. The transcriptional response of skeletal muscle to chronic GC exposure and to single dose of GC is strongly different. Our results suggest that the downregulation of GR reduce the effect of a single GC exposure on genes expression.

Mice lacking GR in myofibers are partially resistant to starvation-induced muscle atrophy.

To determine the contribution of myofiber GR to muscle atrophy induced by starvation, a physiological condition associated with elevated GC levels, control and GR^{(i)skm-/-} mice were food deprived.

A 72 h starvation of 9 week-old control mice induced a ~30 % body weight reduction (**Supplemental Figure 5A**). Overall hind limb muscle size appeared markedly decreased, and gastrocnemius and quadriceps muscle mass was reduced whereas soleus muscle mass was unaffected (**Figure 9A**). Gastrocnemius and tibialis CSA was decreased by 30 % and 25%, respectively (**Figure 9B and Supplemental Figure 5B**). Even though starvation induced a similar body weight reduction in GR^{(i)skm-/-} mice and in control mice (**Supplemental Figure 5A**), gastrocnemius and quadriceps muscle mass was less reduced (15 % versus 22 %) (**Figure 9A**). Moreover, gastrocnemius and tibialis CSA in GR^{(i)skm-/-} mice was only reduced by 20 % and 16%, respectively (**Figure 9B and Supplemental Figure 5B**).

Electron microscopy (EM) of control mice gastrocnemius revealed disruptions of myofibrils in more than 2 / 3 of the sarcomeres after starvation, with loss of myofilaments, rupture of Z lines and enlarged sarcoplasm. In contrast, less than 20 % of the sarcomeres from gastrocnemius muscle of GR^{(i)skm-/-} mice showed disruptions, and damages were less pronounced (data not shown).

Together, these results show that GR^{(i)skm-/-} mice are only partially protected from starvation-induced muscle atrophy.

Starvation induced FOXO3a transcript level by 18-fold in control mice and 3-fold in mutants (**Figure 9C**). The transcript level of MuRF1, Atrogin1 and Myostatin were increased by 45-, 20- and 5-fold in starved control mice, respectively (**Figure 9C**). Transcript level of MuRF1 and Atrogin1 increased by 7- and 10 - fold, respectively in mutant mice upon starvation, and those of Myostatin were not induced. Moreover, Cathepsin-L, LC3 and BNIP3 transcript levels were strongly increased by starvation in gastrocnemius of control mice (8-, 2.5- and 8-fold, respectively), but not of GR^{(i)skm-/-} mice (**Figure 9C and Supplemental Figure 5C**).

Starvation induced a 4- and 3-fold decrease of IGF-I gastrocnemius transcript levels in control and GR^{(i)skm-/-} mice, respectively (**Supplemental Figure 5C**). Moreover, transcript level of Redd1, p85 and KLF15, three negative regulator of anabolic pathway, as well as ATF4, were induced by 17-, 10-, 9- and 7- fold in control mice upon starvation. In starved GR^{(i)skm-/-} mice, the transcript level of Redd1, p85 were unaffected and those of KLF15 and ATF4 were induced only by 5- and 3-fold, respectively (**Figure 9C and Supplemental Figure 5C**). However, transcript level of Gadd45a were induced by 8 fold in starved control and mutant mice (**Figure 9C**).

These results show that myofiber GR partially contributes to the induction of UPS and lysosomal activation and to the negative regulation of anabolic pathway in fasting-induced muscle atrophy.

I.3 DISCUSSION

High GC levels are known to induce skeletal muscle atrophy in various pathophysiological conditions. However, the molecular and cellular mechanisms through which they control muscle physiology *in vivo* remained poorly characterized. To better define the role of GC in skeletal muscles, we used a pharmacological and genetic approach.

Physiological GC levels downregulate in skeletal muscles, the mTOR pathway as well as genes involved in gluconeogenesis, ketone bodies formation and amino-acid degradation and negatively regulate muscle mass via myofiber GR.

Our results show that myofiber GR negatively regulates muscle mass in adult mice. The implication of GR in the control of muscle mass was previously proposed by two independent studies. Indeed, muscle hypertrophy was observed in myofiber-deficient GR mice (Shimizu et al., 2015; Watson et al., 2012). Nevertheless, as GR was ablated during embryonic development in these models, growth defects could not be excluded, and the underlying molecular mechanisms were unknown. We show here that the mTOR signaling pathway is induced in skeletal muscles of GR^{(i)skm-/-} mice, evidenced by increased mTOR and 4EBP1 phosphorylation levels, known to enhance protein synthesis (Gingras et al., 1998). Thus, we provide evidence that muscle hypertrophy observed in GR^{(i)skm-/-} mice results from increased protein synthesis. As the levels of IGF-I and p85 transcripts, as well as of the phosphorylated and total forms of Akt protein were similar in control and GR^{(i)skm-/-} mice, muscle hypertrophy is likely to be IGF-I/AKT independent. Interestingly, the transcript and protein levels of REDD1, a negative regulator of mTOR pathway (Wang et al., 2006), which contains a GRE in its promoter (Shimizu et al., 2011), is decreased in GR^{(i)skm-/-} mice. Thus, our results show that physiological GC levels negatively control the mTORC1 pathway, by stimulating REDD1 expression in myofibers. It was previously shown in undifferentiated C2C12 muscular cells, that knockdown of GR reduces the expression of Atrogin1 and MuRF1 (Zhao et al., 2009). However, the expression of Atrogin1 and MuRF1, 2 key genes of ubiquitin proteasome system, were similar in muscle of GR^{(i)skm-/-} mice and of controls. In addition, the levels of FoxO3a phosphorylated and total forms, as well as the transcript levels of key genes involved in autophagy and calpain systems were similar in muscle of mutant and control mice. Thus, our results show that physiological GC levels exert an anti-anabolic effect that decreases muscle mass of adult mice, via myofiber GR, but do not modulate the catabolic pathways.

To further characterize the role of myofiber GR at physiological GC levels, we performed transcriptomic analyzes of tibialis muscle, and identified 88 upregulated genes in GR^{(i)skm-/-} mice. Among those, several

encode enzymes that stimulate gluconeogenesis (e.g. ALDOB, FBP1, PCK1). GC are well known to promote gluconeogenesis in liver, mainly through activation of the transcription of genes encoding enzymes in the gluconeogenic pathway, such as PC, PCK1, FBP1, PFKFB1, G6PC and G6P transporter (SLC37A4) (Kuo et al., 2015). Thus, under physiological GC levels, myofiber GR negatively controls the expression of genes that promote glucose synthesis from non-carbohydrate substrates.

We also found increased expression of genes encoding protein controlling lipid metabolism (e.g. HMGCS2, APOC3, APOC1) in GR^{(i)skm-/-} mice. HMGCS2 which encodes HMG-CoA synthase, is known to convert acetyl-CoA in ketone bodies (KB) in liver, as a result of intense gluconeogenesis, and reduced processing capacity of the TCA cycle for acetyl-CoA (Nakamura et al., 2014).

APOC1 and APOC3 are lipoprotein lipase (LPL) inhibitors, that inhibit plasma TG elimination, weaken the protective effect of HDL, and promote the synthesis of VLDL and LDL (Jin et al., 2016; Kersten, 2014). APOC1 binds to free fatty acids and prevents their uptake by cells in adipocytes (Westerterp et al., 2007).

The expression of genes promoting cellular amino acid catabolism (e.g. TDO2, AASS, CDO1) are increased in GR^{(i)skm-/-} mice. TDO2 is the rate-limiting enzyme in tryptophan degradation via the kynurenine pathway in liver (Soichot et al., 2013). The enzyme α -amino adipate semialdehyde synthase (AASS) is required to catabolize lysine (Praphanphoj et al., 2001). Cysteine catabolism in mammals is dependent upon cysteine dioxygenase (CDO) (Stipanuk et al., 2009). These results provide evidence that GC inhibit the expression of genes that promote KB formation and amino acid degradation and prevent free fatty acid uptake.

The expression of genes encoding for serine protease inhibitors (e.g. SERPINA3N, SERPINF2, SERPINA1C) that belong to the serpin family are also increased in GR^{(i)skm-/-} mice. Some studies suggest that serpins contribute to muscle differentiation, remodeling and regeneration processes (Businaro et al., 2001; Festoff et al., 1994). The direct targets of each serpins are not yet identified. Even if most serpin family members inhibit serine proteases, some also inhibit cysteine protease family members, such as the caspases and cathepsins (Huntington, 2011). Our results show that GC negatively controls expression of genes encoding for serine protease inhibitors.

Together, our data reveal that physiological GC levels negatively regulate muscle mass in mature adult fibers by downregulating protein synthesis via myofiber GR. Moreover, GC inhibits the expression of gene involved in gluconeogenesis, in ketone body formation, amino acid degradation and peptidase inhibition.

Myofiber GR plays is mandatory to induce skeletal muscle atrophy by high GC levels in adult mice.

The role of myofiber GR in mediating atrophy induced by supraphysiological doses of synthetic GC was examined in GR^{(i)skm-/-} mice and control mice daily intraperitoneal injected with dex (10 mg/kg) for 3 days. Whereas such a treatment induced muscle atrophy in control mice, GR^{(i)skm-/-} mice are protected from dex-induced atrophy. Key genes involved in the ubiquitin-proteasome system (e.g. MuRF1 or Atrogin1), and in autophagy-lysosomal system (e.g. LC3, Cathepsin-L, ATG7) were induced in skeletal muscle of control but not in GR^{(i)skm-/-} mice. Moreover, the transcript levels of FoxO family members, Myostatin, a negative regulator of muscle mass, as well as of negative regulators of the anabolic pathway (p85 and Redd1) are induced in skeletal muscles of control but not in GR^{(i)skm-/-} mice. These

results, showing that myofibers GR is essential for the activation of genes involved in proteolytic and autophagic pathway, are in agreement with previous reports (Shimizu et al., 2015; Watson et al., 2012).

As fasting induces muscle atrophy and is associated with increased circulating GC levels (Schakman et al., 2008a), we investigated the role of myofibers GR in mice under a nutritional deprivation regimen. Muscle atrophy in GR^{(i)skm-/-} mice was less pronounced than in controls, but not completely prevented, as observed upon dex treatment. Upregulation of atrophy-associated genes such as FoxO family and MuRF-1 was attenuated in GR^{(i)skm-/-} mice compared to control, but not completely blocked. Interestingly, our results show that Atrogin1 is similarly up-regulated in muscles of control and GR^{(i)skm-/-} mice upon fasting. Previous studies reported an attenuation in Atrogin1 upregulation of upon starvation in mice with a selective ablation of GR in muscle (Shimizu et al., 2015; Watson et al., 2012). This discrepancy might be explained by a more drastic and longer starvation in our experiment than in those of Watson *et al.* and Shimizu *et al.*, respectively. Finally, Redd1, p85 and Myostatin are not induced by fasting in GR^{(i)skm-/-} mice in contrast to control mice. Thus, myofiber GR only partially contributes to the induction of these genes during nutritional deprivation, in agreement with the previous studies (Shimizu et al., 2015; Watson et al., 2012). Moreover, it was shown that fasting, muscle disuse and sarcopenia, stimulate ATF4 expression, which contributes to the induction of Gadd45a expression (Ebert et al., 2015; Ebert et al., 2012). Whereas Gadd45 transcripts are similarly induced upon fasting in both control and mutant mice, those of ATF4 transcripts are induced in control, but not in GR^{(i)skm-/-} mice. In contrast, ATF4 and Gadd45 are both induced by high dex levels, but 5 times less than upon fasting, and this induction is completely abolished in GR^{(i)skm-/-} mice. Thus, GR is essential for the activation of ATF4/Gadd45 signaling in dex-induced muscle atrophy. Moreover, our results show that GR is required for ATF4, but not Gadd45 induction upon fasting, suggesting that Gadd45 induction is not only ATF4 dependent in fasting conditions.

We show that GR is essential for dex-induced muscle atrophy, whereas under food deprivation, GR is partially responsible for muscle atrophy, suggesting that other additional signaling pathways are involved during fasting.

An acute dex administration induces anti-anabolic processes and lipid degradation, and prevents angiogenesis and myogenic differentiation via myofiber GR.

In order to identify the gene networks controlled by dex, control and GR^{(i)skm-/-} mice were treated for 6 hrs with dex at 10 mg/kg. Acute dex exposure induces Redd1 and p85 transcript and protein levels, and decreases the phosphorylated form of 4EBP1 in skeletal muscle of control mice, thereby downregulating the anabolic pathway. FoxO1, FOXO3a and MurF1 transcript levels are also induced upon acute dex exposure in control mice but not in GR^{(i)skm-/-} mice, as upon chronic treatment. In contrast to multiple dex administration, transcript level of other genes involved in atrophy, such as Atrogin1, Cathepsin-L, BNIP, LC3, ATF4 and Gadd45 α remain unchanged in control mice. Thus, these results indicate that anabolic pathway is efficiently downregulated, whereas most of the catabolic genes tested are not yet induced.

In order to determine the set of genes that are dysregulated by acute GC exposure, we performed transcriptomic analyzes in tibialis muscle upon 6 hrs dex treatment. We determined the transcriptional changes that occurred upon acute GC exposure in muscles of control but not of GR^{(i)skm-/-} mice.

To identify direct GR targets in skeletal muscles, we localized GBS genome wide in gastrocnemius muscle upon 1.5 hr dex treatment by chromatin immunoprecipitation using antibodies directed

against GR. Among them, we identified more than 7000 genes bound by GR in dex-treated control mice but not in dex-treated GR^{(i)skm-/-} mice, corresponding to genes regulated by GR in myofiber. 15% of the GBS are localized at +/- 50 kb to 500 kb from TSS-promoter region. A similar GBS distribution was previously found in genomic regions of differentiated C2C12 cells (Kuo et al., 2012).

Combination of transcriptomic and ChIP seq analyzes defined a set of 136 GBS-containing upregulated and 133 GBS-containing downregulated genes upon acute GC exposure. We observe in dex-treated control mice an induction of Doc2B, which induces insulin-stimulated GLUT4 accumulation at plasma membrane to promote glucose uptake (Ramalingam et al., 2014) and a reduction of Stxbp4 transcript, which prevents Glut4 fusion at plasma membrane and glucose uptake. Our results also revealed that GR upregulates the expression of genes encoding proteins involved in lipid metabolism (e.g. PPAR δ). PPAR δ is the most common PPAR subtype in skeletal muscle and regulates genes that stimulate fatty acid uptake and enzyme involved in β -oxidation and Krebs cycle (Castillero et al., 2013; Kleiner et al., 2009; Schuler et al., 2006). In addition, previous transcriptomic results showed an up-regulation of genes related to protein or amino-acid metabolism upon methylprednisolone treatment (Almon et al., 2007). Taken together, these results show that acute high GC levels stimulate glucose uptake, lipid oxydation and amino-acid degradation.

Genes encode proteins known to regulate insulin/insulin-like growth factor 1 pathways (e.g. EIF4EBP1 (4EBP1), FOXO1, PTPN1) are up-regulated upon acute GC exposure. Many studies report that IRS-1 protein level or activity is decreased upon excess of GC (Schakman et al., 2013). The sustained upregulation of Eif4ebp1 and downregulation of IRS-1 is consistent with corticosteroids inhibiting protein synthesis. PGC-1 α is a transcriptional co-regulator known to inhibit FoxO activity (Brault et al., 2010). The upregulation of both MURF1 and FoxO1 and downregulation of PGC-1 α is consistent with increased protein degradation. To our knowledge, this is the first evidence that Eif4ebp1, IRS-1 and PGC-1 α are direct GR target gene in skeletal muscle.

We also identified genes involved in the amine biosynthetic process such as Glul. Glul encodes glutamine synthetase that converts ammonium and glutamate in glutamine during muscle protein breakdown. Glutamine is among the most abundant free amino acids in mammals (He et al., 2010). It was shown that GC upregulate Glul mRNA expression, whereas on the other hand, insulin suppresses GC-induced Glul mRNA level in cells, including C2C12 (Wang and Watford, 2007). These results show that GR directly up-regulates the expression of genes involved in glutamine synthesis.

Moreover, we observed an induction of genes encoding for zinc transporter SLC39A14 (ZIP14) and Slc30a2 (ZnT2) following an acute dex exposure. ZnT reduce Zn²⁺ availability by mediating Zn²⁺ efflux from cell or uptake into vesicle. Zip (*Zinc-regulated transporters Iron-regulated transporter-like protein*) promote the uptake of Zn²⁺ from extracellular matrix and the release from vesicular Zn²⁺ into cytosol (Coyle et al., 2002). It was shown that Zn²⁺ is required for proper contraction in cardiomyocyte, in shaping intracellular calcium dynamics important in excitation coupling contraction, by modulating cardiac RyR-mediated calcium release (Woodier et al., 2015). Thus, these results show that dex stimulates SLC39A14 and Slc30a2 via myofiber GR, and suggest that GR regulates Zn²⁺ homeostasis in order to improve muscle contraction.

The expression of genes involved in angiogenesis, muscle development and focal adhesion were also downregulated in dex-treated control mice. Angiogenesis is important in modulating skeletal health, and many studies suggest that GC inhibit new vessel formation. We show that two major angiogenic

factors, vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor-like domains Protein 7 (EGFL7) are downregulated by dex via myofibers GR. We observed a decrease in transcript level of several integrins such as Itg α 6, Itg β 6 and Itg α 1 upon dex treatment in control mice. Integrins function as receptors required for the adhesion of cells to extracellular matrix (ECM) proteins or to other cells. In particular, Itg α 6 integrin mediates cell differentiation (Wilschut et al., 2011). Moreover, we observed a downregulation of MyoD1 in control mice treated with dex. This transcription factor is important for expressing a muscle phenotype. Thus, these results indicate that GC via myofiber GR regulates negatively angiogenesis and muscle differentiation. As the expression of other transcription factors is also down-regulated upon GC treatment via myofiber GR, we suggest that in addition to the decreased protein synthesis, GC by controlling the expression of transcription factor prevents expression of many genes.

Together these analyzes show that during acute exposure to dex, GR in myofibers exert an anti-anabolic effect in order to prevent protein synthesis, and induced the expression of some components of the catabolic pathway. Moreover, our results suggest that GR controls directly expressions of key genes involved in glucose absorption as well as lipid oxydation. On the other hand, we suggest that GR by regulating negatively key genes expression, blunts the regenerative capacity, and the myogenic regulation in order to prevent the use of energy in differentiation process. As most of the genes involved in proteolytic pathways are strongly induced upon chronic dex treatment, but are not affected upon acute Dex exposure, the induction of protein breakdown is a secondary events occurring only when other energy sources are unavailable.

Transcriptional regulation of GR target genes in skeletal muscle is complex.

Although we identified 13 400 GBS that can potentially regulate 8000 genes, only 5 % of them are transcriptionally regulated upon acute dex treatment. In agreement with our observation, all atrophy-associated genes are not induced upon acute GC exposure, indicating that liganded GR is not sufficient to mediate GC-induced muscle wasting.

Motif analysis of GBS revealed that classical GRE were highly represented. Even if motif analyzes of GBS in C2C12 revealed also that classical GRE were highly enriched in up-regulated genes, they identified other binding motif (e.g. AP1 and HNF3 α). No motifs, not even IR3 nGRE motif, were statistically represented in down-regulated genes. However, the GBS of 44 genes repressed by dex is the classical GRE sequence. This was also observed in C2C12 cells, but the underlying mechanism is unclear (Kuo et al., 2012). These results show that GR regulates positively and negatively the expression of genes via mainly classical GRE, both in C2C12 and muscle.

GR associates at tethering GBS through protein-protein interactions with one or more of the bound factor instead of binding to DNA. Tethered GR binding has predominantly been linked to transcriptional repression, and has been proposed for several transcriptional regulatory factors including NF- κ B (Ray and Prefontaine, 1994) and cJun, a subunit of AP1 (Schule et al., 1990). We thus performed supervised motif search for cJun and NF- κ B motifs. We found NF- κ B or cJun motifs in 19 genes down-regulated upon acute GC treatment, including GR, but also in 10 genes induced upon GC treatment. GC-mediated downregulation of GR transcripts in adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells is mediated by transcriptional repression by promoting the assembly of a *cis*-acting GR-NCoR1-HDAC3 repression complex via an IR1 nGRE in exons 6 of the GR genes (Ramamoorthy and Cidlowski, 2013). Interestingly, our chromatin immunoprecipitation analysis shows that a GBS containing NF- κ B motif is localized in

promoter region of the GR gene, but not binding at IR1nGRE identified by Ramamoorthy *et al.* is found. However, as only 13% of downregulated genes by liganded GR contain NF- κ B or cJun motifs in their promoter, it is unlikely that tethered regulation is the major mechanism responsible for gene repression in skeletal muscle upon acute dex treatment.

Moreover, GR can bind to one or more GBS together with binding sites for transcriptional regulatory factors producing functional crosstalk between the different classes of factors that affects the regulatory outcome (So *et al.*, 2008). In skeletal muscle, we identified genes containing GRE, cJun and/or NF- κ B motifs in their promoter region upon acute dex treatment. This highlights the complexity of the transcriptional regulatory mechanisms by GR, which allow fine-tuned regulations and can explain the tissue specificity regulation. These results suggest that the mechanism leading to transcriptional regulation upon binding of GR to GRE is highly complex.

GC response in muscle depends on their concentration and their exposure time

Interestingly, 24 hrs after a single dex exposure, the transcripts of catabolic genes such as FoxO family, MurF1, as well as of anti-anabolic genes such as p85 and Redd1 are similar than in untreated mice, whereas several exposures to dex lead to a fully activated atrophic program and muscle atrophy. Our results show that all transcript levels do not have the same kinetic of induction. This variation in mRNA level between acute and chronic GC treatment was also highlighted in rat treated with methylprednisolone, another GC analogue (Almon *et al.*, 2007). These results suggest that the induction of genes involved in the initiation of the atrophic process is downregulated after a single GC exposure, preventing excess of protein degradation in normal situation, and that a chronic GC exposure is required to induce an atrophic phenotype.

As the expression of genes reported to have a GRE in their promoter and to be stimulated by pharmacological GC levels in myofiber via GR, such as p85 and FoxO (Kuo *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2014), is not reduced in GR^{(i)skm-/-} mice under physiological level of GC, whereas others such as Redd1 are reduced in those mice, suggesting that GR regulates different sets of genes under physiological and high level of GC.

We show that acute dex exposure leads to a decrease of GR transcript and protein levels in muscle of control mice within 6 hrs. However, 24 hrs after a single dex exposure, GR transcript levels were similar to untreated mice, and remained stable upon several GC exposure. The reduced GR levels might account for the interruption of the atrophic initiation program after a single GC exposure. We suggest that GR control the expression of GR target genes, by producing an initial enhanced expression followed by a return to baseline despite the continuous presence of GC. The decrease of GR levels was previously shown in other tissues such as lung, heart, kidney and liver (Ramamoorthy and Cidlowski, 2013b) or in gastrocnemius from rat upon methylprednisolone treatment after (Almon *et al.*, 2007; McKay *et al.*, 1997). Taken together, our results show that induction of atrophy is a dynamic process in muscle. During acute GC exposure, GR in myofiber exert an anti-anabolic effect in order to prevent protein synthesis, before activating all components of the catabolic pathway. The length of dex exposure might play a key role in the biological outcome and regulation of GR could be a key step in this process.

Interestingly all FoxO member family are induced by high levels of synthetic GC in skeletal muscle, as well as under a variety of conditions that elevate endogenous GC (e.g. GC-exposure, fasting, denervation) (Bodine and Furlow, 2015). Moreover FoxO overexpression causes muscle cell atrophy

and overexpression of a dominant negative form of FoxO3a prevents muscle cell atrophy caused by GC *in vitro* (Sandri et al., 2004). We did not observe induction of FoxO transcript levels after acute or chronic GC exposure in soleus muscle, resistant to dex induced muscle atrophy. In addition, both FOXO and GR are required to regulate transcript levels of MuRF1 (Waddell et al., 2008). Moreover, FoxO1 (Qin et al., 2014), FoxO3 (Lutzner et al., 2012), Redd1 (Shimizu et al., 2011), and p85 (Kuo et al., 2012) have a GRE in their promoter and are induced upon acute GC exposure. In contrast, Atrogin1, which has another expression profile, has no GRE but a FBE (FoxO binding element) in his promoter (Sandri et al., 2004).

This synergic regulation by both transcription factors can be proposed for other target genes. We identify in the glutamine synthetase (Glul) promoter a GRE and a NF- κ B motif, and it was shown that FoxO1 is required to activate Glul in skeletal muscle (Kamei et al., 2014). Redd1 promoter contains GRE motif but also a putative consensus FoxO regulatory elements within its proximal promoter (Furuyama et al., 2000). Moreover, we identified 28 GBS-containing genes induced upon GC treatment harboring a GRE and a FoxO motif, but we also identified 17 genes reduced upon GC treatment harboring both motif.

The synergic action of GR and FoxO appears to be crucial to activate the muscle atrophic program upon chronic GC exposure. However, further studies are required to have a clear picture on gene transcription regulation, and on GC action in skeletal muscle physiology.

In summary, our results highlight the complexity of GC signaling pathway in skeletal muscles. Our results demonstrate that physiological levels of GC exert an anti-anabolic effect via GR myofibers, by inducing the expression of a negative regulators of this pathway, Redd1, whereas the main catabolic pathways are unaffected. In contrast, induction of catabolic genes needs several expositions to GC. We also demonstrate that GC regulates GR levels, both transcriptionally and translationally. Thus, GC response in muscle depends on their concentration and their exposure time. This studies also identified all genomic regions bound by GR in myofibers and revealed new gene networks controlled by GC in muscle fibers. To demonstrate the importance of newly identified GR targets in the regulation of muscle mass, it would be of interest to perform functional studies using gain and/or loss of function experiment *in vivo*. In addition, we better characterized the architecture of the promoter regions of direct GR targets in muscle and identified binding sites of other transcriptional regulators. This will be extremely valuable to understand the effects of GC in muscle mass regulation and might open new avenues to develop screens based on promoter regions of genes controlled by GC in skeletal muscle to select compounds with increased tissue selectivity.

I.4 MATERIALS AND METHODS

Mice

Mice are maintained in a temperature and humidity controlled animal facility, with a 12 hours light/dark cycle. Standard rodent chow (2800 kcal/kg, Usine d'Alimentation Rationnelle, Villemoisson-sur-Orge, France) and water are provided *ad libitum*. Breeding and maintenance of mice are performed according to institutional guidelines. Animals are killed by cervical dislocation and tissues are immediately collected, weighed, and frozen in liquid nitrogen or processed for biochemical and histological analysis. All experiments have been done in an accredited animal house, in compliance with French and EU regulations on the use of laboratory animals for research. Indeed, the GIE-CERBM

(IGBMC) complies with the following French and European laws and regulations relating to the transport, housing and use of animals in research:

- i. French law N° 76-629 of July 10th 1976 concerning the protection of wildlife and natural reserves. A corresponding text of application of November 23rd 1988 (published in the Official Journal of the French Republic December 16th 1988) concerns the inspection of animal facilities.
- ii. European directive 86/609/CEE of November 26th 1986, unifying CEE regulations concerning the protection of animals used for scientific purposes, incorporated into French law by the decrees N° 87-848 of October 19th 1987 and N° 2001-464 published on May 29th 2001.
- iii. French law N° 2013-118 of February 1st 2013 being the official French publication of the European Convention concerning the protection of vertebrates used in experiments or for other scientific purposes. The ICS/IGBMC animal facility is approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries' veterinary services (A67-218-37 notification of 16/10/2013).

The work will be performed under the supervision of Dr. Daniel Metzger who holds animal experimentation authorizations from the French Ministry of agriculture and Fisheries (N°67-209 and A 67-227, respectively). Prior to the commencement of any animal experimentation, the intended manipulations are submitted to the Ethical committee Com'Eth (Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale, Strasbourg, France) for approval. Moreover, following the new 2010/63/EU directive, all the projects will be submitted to French Research Ministry (MESR) for ethical evaluation and authorization.

Generation of GR^{(i)skm-/-} mice in which GR is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood.

GR^{L2/L2} mice bear GR L2 alleles, in which exons 3 and 4 encoding the DNA binding domain is flanked with 2 LoxP sites. Cre-mediated recombination between the two LoxP sites induces a frame shift in the GR sequence, and thus results in a GR-null allele. To selectively ablate GR in skeletal muscle myofibers of adult mice, GR^{L2/L2} mice are intercrossed with HSA-Cre-ER^{T2} mice that express the Cre-ER^{T2} recombinase selectively in skeletal muscle myofibers [36]. Seven week-old GR^{L2/L2} mice and HSA-Cre-ER^{T2}/GR^{L2/L2} mice are intraperitoneally injected with Tamoxifen (Tam, 1 mg/mouse/day) to generate control (GR^{L2/L2}) mice and GR^{(i)skm-/-} mutant mice, respectively. The laboratory has already generated GR^{(i)skm-/-} mice, and breeding pairs of GR^{L2/L2} mice and HSA-Cre-ERT2/ GR^{L2/L2} mice are available to generate further cohorts.

Dexamethasone treatment

Mice were treated with 10 mg/kg of Dexamethasone (31381, Fluka). Dex was first resuspended in 100% EtOH to make a 10mg/mL stock solution, and then dissolved in oil to be I.P. injected each day during the time indicated in figure legend. Experiment controls were injected with oil. Body weight and strength were determined before and after treatment.

Starvation

Mice were maintained in a temperature and humidity controlled animal facility, with a 12 hours light/dark cycle and free access to water without chow for 72h.

Grip strength

A Grip Strength Meter (Bioseb) was used to measure forelimb and hindlimb grip strength. The grip strength meter was positioned horizontally, and mice were held by the tail and lowered toward the apparatus. Mice were allowed to grasp the smooth metal pull bar with both their hindlimbs and forelimbs and then were pulled in the horizontal plane. The force applied to the bar at the moment

the grasp was released was recorded as the peak tension (g). The test was repeated 3 consecutive times within the same session, and the mean value was recorded as the grip strength for each mouse.

Contractile measurements

In situ isometric tibialis anterior muscle contraction in response to nerve stimulation was performed as described (Lahoute et al., 2008). Mice were anaesthetized using a pentobarbital solution (ip, 60 mg/kg) and supplemental doses were given as required to maintain deep anesthesia during experiments. Feet were fixed with clamps to a platform and knees were immobilized using stainless steel pins. The distal tendons of muscles were attached to an isometric transducer (Harvard Bioscience) using a silk ligature. The sciatic nerves were proximally crushed and distally stimulated by a bipolar silver electrode using supramaximal square wave pulses of 0.1 ms duration. All data provided by the isometric transducer were recorded and analyzed on a microcomputer, using a PowerLab system (4SP, AD Instruments). All isometric measurements were made at an initial length L_0 (length at which maximal tension was obtained during the twitch). Responses to tetanic stimulation (pulse frequency from 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 143 Hz) were successively recorded. Maximal tetanic force was determined. Muscle masses (m) were measured to calculate specific force. Finally, the fatigue resistance was assessed. The fatigue protocol consists of repeated contractions (75 hz for 500 ms, evoked once every second for 100s). The time to reach half of the maximal force was then calculated (FR). After contractile measurements, mice were sacrificed with an overdose of anesthetic solution.

Histology and histochemistry

Muscles were quickly frozen in dry ice-cooled isopentane. For H&E staining, 10- μ m cryosections were stained with Harris hematoxylin (VWR International S.A.S.), washed in running tap water, decolorized in acid alcohol for 2 s, stained in eosin (VWR International S.A.S.), washed in running tap water, dehydrated, cleared, and mounted.

Fiber cross-sectional area measurements

Gastrocnemius, soleus and tibialis muscle cross-sections from control and mutant mice will be stained for caveolin to mark the sarcolemma. The cross-sectional area were quantified by an automated method using the imageprocessing software, FIJI. Individual fibers were identified based on the intensity and continuity of the lamin-stained sarcolemma surrounding each fiber by segmentation. The area were measured after background subtraction, automated thresholding and by using the analyze particles function of FIJI. The calculated area and number of fibers were converted to a text file format and the results expressed as percentage of fibers distributed over a different range of fiber area.

Electron Microscopy

Skeletal muscle samples were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), washed in cacodylate buffer for 30 min, and kept at 4 °C. Postfixation was performed with 1 % osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer for 1 h at 4 °C, and dehydration was performed with graded alcohol (50, 70, 90, and 100%) and propylene oxide for 30 min each. Samples were oriented longitudinally and embedded in Epon 812 (Sigma Chimie). Ultrathin sections were cut at 70 nm, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined at 70 kV.

RNA preparation and analysis

RNA was isolated using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen). 5 μ g of RNA were converted to cDNA with SuperScript[™] II reverse transcriptase (Invitrogen[™] life technologies) and dT24 primers according to the supplier's protocol. Quantitative RT-PCR was performed by using the QuantiTect[™] SYBR[®] Green PCR

kit (Roche) according to the supplier's protocol. 18S was used as an internal control. Primer sequences are available in [Tableau 3](#).

Name	Sequence	
18S	5'-TCGTCTTCGAAACTCCGACT-3'	5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'
FoxO1	5'-TGTCATGGACGACGCTCTT-3'	5'-TCAAGGATAAGGGCGACAGC-3'
FoxO3a	5'-AACCAAAGCTTCCACACAG-3'	5'-TGGACTGCTCCTCAGTTCCT-3'
MuRF	5'-TGAGGTGCCTACTTGCTCCT-3'	5'-GTGGACTTTTCCAGCTGCTC-3'
Atrogin	5'-TCACAGTCCACATCCCTGAG-3'	5'-TCAGCCTCTGCATGATGTTT-3'
Mstn	5'-GCTACCACGGAAACAATCAT-3'	5'-CAATACTCTGCCAAATACCA-3'
Redd1	5'-TAGTGCCACCTTTTCAAGTTG-3'	5'-GTCAGGGACTGGCTGTAACC-3'
p85	5'-CAAAGCGGAGAACCTATTGC-3'	5'-ATAGCAGCCCTGCTTACTGC-3'
Atf4	5'-ATGATGGCTTGGCCAGTG-3'	5'-CCATTTTCTCCAACATCCAAT-3'
Gadd45	5'-GCTGCCAAGCTGCTCAAC-3'	5'-TCGTCGTCTTCGTAGCA-3'
Bnip	5'-TTGGGGCATTCTACTAACCTTG-3'	5'-TGCAGGTGACTGGTGGTACTAA-3'
CathepsinL	5'-GTGGACTGTTCTCACGCTCAAG-3'	5'-TCCGTCCTTCGCTTCATAGG-3'
GR	5'-CGCTGCCAATTCTGACTGGAGTTT-3'	5'-ACACCTGGATGACCAAATGACCCT-3'
IGF	5'-AGCAGCCTTCCAACCTCAATTAT-3'	5'-GAAGACGACATGATGTGTATCTTTATC-3'
UbiC	5'-TCTTCGTGAAGACCCTGACC-3'	5'-CAGGTGCAGGGTTGACTCTT-3'
Calpain	5'-CCCTCCAACCTGTTCAAG-3'	5'-GCCTCCAGTCCCATCCA-3'
Atg7	5'-CCACTGAGGTTCAACATCCT-3'	5'-TCCGTTGAAGTCTCTGCTT-3'
LC3	5'-CATGAGCGAGTTGGTCAAGA-3'	5'-TTGACTCAGAAGCCGAAGGT-3'
IRS1	5'-AGCCCTTAGGCAGCAATGAG-3'	5'-CTTCATTCTGCTGTGATGTCCA-3'
PKD1	5'-GTTGAAACGTCCCGTGCT-3'	5'-GCGTGATATGGGCAATCC-3'
mtOR	5'-TCGTCTCCATCAAGCTGTTAGC-3'	5'-CAATCGGAGGCAACAACAAGT-3'
KLF15	5'-ACTGGTACGGCTTACACCCGAG-3'	5'-CTCAAGGCCACCTGCGTCGG-3'

Tableau 3 : Primer table

Microarray analysis

Gene expression profiling was performed on total RNA isolated from muscle from control and mutant mice. Biotinylated single strand cDNA targets were prepared, using the Ambion WT Expression Kit and the Affymetrix GeneChip® WT Terminal Labeling Kit according to Affymetrix recommendations. Following fragmentation and end-labeling, cDNA was hybridized on GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST arrays (Affymetrix). The chips were washed, stained and scanned with the GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) Raw data CEL files were processed with Affymetrix Expression Console to calculate probe set signal intensities using Robust Multi-array Average (RMA) algorithms with default settings.

Chromatin-immunoprecipitation

Muscle was crushed in cytosolic lysis buffer, treated with 1% formaldehyde in PBS for 10 min, incubated in 125 mM glycine and resuspended in nuclear lysis buffer. Samples were sonicated using the Bioruptor (Diagenode). Sonicated samples were incubated with the home-made GR antibody and then Protein A and G were added. The beads were washed extensively, and DNA fragments were eluted, reverse-crosslinked, and purified. The amount of DNA fragments in the eluates was quantified with PCR using LightCycler DNA Master SYBR Green I and LightCycler ST300 System (Roche). Sequencing data were generated at the IGBMC platform using a Illumina Hiseq 2500. Data from the sequencing experiments were analyzed using various software that have been deployed by the

platform. The pipeline provided by Illumina extracts the raw image and sequencing data using RTA and CASAVA programmes and aligns them to the reference genome using Bowtie. The resulting Bowtie file contains the localisation and sequences of all the reads that were mapped to unique sites in the genome. Peak detection were performed using MACS (model based analysis for ChIP-seq) software. MACS generates a table of comprising the genomic localisation of each peak, the number of reads per peak, peak width, local enrichment and false discovery rate (FDR). Genomic annotation and expression data were added to this using the GREAT programme version. Bowtie and MACS output files were transformed into .Bedgraph and .Wig formats for visualisation in the UCSC browser or Affymetrix IGB. Further binding site and clustering analyzes were performed using the MEME Suite also on line and seqMINER softwares available at IGBMC.

Protein preparation and analysis

Proteins were isolated using a RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 1 % Nonident p40, 0.5 % Sodium Deoxycholate, 0.1 % SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF and containing a cocktail of protease inhibitors (45 µg/mL). Homogenates (100 µg of protein) were electrophoresed in 6 % to 12 % Bis-acrylamid gels. Proteins were electroblotted to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences), and proteins of interest were immunodetected using primary antibodies for antibodies directed against GR (M20, Santa Cruz, 1/500), Tubuline (homemade, 1/5000), phospho-mTOR (Ser2448, Cell Signaling, 1/1000), phospho-4E-BP1 (Thr37/46, Cell Signaling, 1/1500), phospho-FOXO3a (Ser318/321, Cell Signaling, 1/1000), phospho-Akt (Ser473, Cell Signaling, 1/1000), phospho-Akt (Thr308, Cell Signaling, 1/1000), mTOR (Cell Signaling, 1/500), 4E-BP1 (53H11, Cell Signaling, 1/1500), FOXO3a (Cell Signaling, 1/1000), Akt1 (2H10, 1/500). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Amersham Biosciences) were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce, Rockford, IL, 1/10000).

Data analysis

Differences analyzed by a two-tailed Student's t test are considered statistically significant at $p < 0.05$ and are indicated by an asterisk (*) in figures.

I.5 FIGURE LEGENDS

Figure 1:

Body weight (A), gastrocnemius (Gastro), tibialis and quadriceps (Quadri) muscle mass (B) and grip strength (C) of 2 to 6 month-old GRL2/L2 and GR(i)skm^{-/-} mice. $n = 7-10$ mice / group. *In vivo* absolute maximal isometric tetanic force (D) and specific maximal isometric force (E) of tibialis anterior muscle from GRL2/L2 and GR(i)skm^{-/-} mice at 4 months. $n = 5-7$ mice / group. Number of fibers (F), distribution of fibers CSA (G), and mean CSA (H) in gastrocnemius muscles and fiber number (I) and mean CSA (J) in tibialis muscle from 4 month-old control and GR(i)skm^{-/-} mice. $n = 4-5$ mice / group. Bars represent the Mean \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$. ns, not significant.

Figure 2:

(A) Representative western blot analysis of GR, Akt, Akt Thr308, Redd1, mTOR, pmTOR Ser2448, 4EBP1, p4EBP1 Thr37/46, FoxO1 and pFoxO1 Ser256 in gastrocnemius muscle of 4-month old GRL2/L2 and GR(i)skm^{-/-} mice. Tubuline is used as an internal control. (B) Quantification of GR, Akt, AKT Thr308, Redd1, mTOR, pmTOR Ser2448, 4EBP1, p4EBP1 Thr37/46, FoxO1 and pFoxO1 Ser256 protein levels. $n=6$ mice/groupe. (C) Gene ontology (GO) term are presented for biological process (BP) and molecular function (MF) of genes with a fold change higher or equal to 1.5 in tibialis of 14-week-old GR(i)skm^{-/-} mice relative to controls. $n=3$ mice / group. Bars represent the Mean \pm SEM. * $p < 0,05$. ns, not significant.

Figure 3:

(A) Quadriceps (Quadri), gastrocnemius (Gastro), tibialis and soleus muscle weight of three days oil- and dex-treated (10mg/kg) control and GR(i)skm^{-/-} mice. Distribution (B) and mean (C) of gastrocnemius fibers CSA from oil or 3 days dex-treated control and GR(i)skm^{-/-} mice. (D) Relative transcript levels of FoxO3a, MuRF1, Atrogin1, Myostatin, Redd1, p85, ATF4 and Gadd45 in gastrocnemius muscle of 3 days oil- or dex-treated (10mg/kg) control and GR(i)skm^{-/-} mice. 18S is used as an internal control. n=6 mice / group. Bars represent the Mean ± SEM. *p<0,05; **p<0,01 ; ***p < 0.001. #, not significant.

Figure 4:

Representative western blot (A) and quantification (B) of GR, p85, Redd1, 4EBP1, p4EBP1 Thr37/46, FoxO1 and pFoxO1Ser254 in gastrocnemius muscle of 6 hours oil- and dex-treated (10mg/kg) control and GR(i)skm^{-/-} mice. Tubuline is used as an internal control. n = 6 mice / group. (C) Relative transcript levels of p85, Redd1, FoxO1, FoxO3a, MuRF1, Atrogin1, Bnip and Cathepsin-L in gastrocnemius muscle of 6 hours oil- or dex-treated (10mg/kg) control and GR(i)skm^{-/-} mice. 18S is used as an internal control. n=6 mice / group. Bars represent the Mean ± SEM. *p<0,05; **p<0,01 ; ***p < 0.001. ns, not significant.

Figure 5:

(A) University of California at Santa Cruz genome browser screenshots of the indicated loci illustrating representative GR-binding sites in Redd1 (DDIT4) promoter. (B) Pie-chart showing the genomic distribution of GR-bound sites and their enrichment in the promoter region. (C) Distribution of the frequency of GR-occupied sites versus the distance to TSS.

Figure 6:

(A) Table of gene ontology (GO) term presented for biological process (BP) of genes with a GR occupied site. (B) Pie-chart showing number of genes associated with GR-occupied sites and altered expression. Table of gene ontology (GO) presented for biological process (BP) of GBS-containing genes with a fold change higher or equal than 1.5 (C) or lower or equal than 0.7 (D) in dex-treated (10mg/kg) compared to vehicle from tibialis of 14-week-old control mice.

Figure 7:

(A) Analysis of the sequences at GR-binding sites in induced gene using MEME-Suite. Pie chart showing the number of genes induced (B) or reduced (C) upon dex treatment with a GRE, cJun or NfκB motifs in their GBS.

Figure 8:

(A) Transcript levels of FoxO1, FoxO3a, MuRF, Atrogin, Redd1 and p85 of 0 to 72 hrs oil- and dex-treated (10mg/kg) control mice (B) Transcript and protein level of protein levels of 0 to 6 hrs dex treated control mice. 18S is used as an internal control n=3 mice / group. Bars represent the Mean ± SEM.

Figure 9:

(A) Quadriceps (Quadri), gastrocnemius (Gastro), tibialis and soleus muscle weight of control or three days fasted control and GR(i)skm^{-/-}-mice. Distribution (B) and mean of gastrocnemius fibers CSA from three days fed or starved control and GR(i)skm^{-/-} mice. (C) Relative transcript levels of FoxO3a, MuRF1, Atrogin1, Myostatin, Redd1, p85, ATF4 and Gadd45 in gastrocnemius muscle of control or three days fasted control and GR(i)skm^{-/-}-mice. 18S is used as an internal control. n=6 mice / group. Bars represent the Mean ± SEM. *p<0,05; **p<0,01 ; ***p < 0.001. ns, not significant.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Supplemental Figure 1:

(A) Schematic representation of the HSA-CreERT2 transgene and of the wild type GR (WT allele, upper panel), floxed GR L2 (middle panel) and the Cre-mediated DBD encoding exon deleted GR L- (lower panel) alleles. Primers used to characterized the various alleles are materialized with arrows. LoxP sites are shown by arrowheads. (B) Detection of the GR L- alleles in control and GR(i)skm^{-/-} mice by PCR (G: gastrocnemius, S: soleus, T: tibialis, E: extensor digitorum longus, Q: quadriceps, B: bulbocavernous, D: diaphragm, H: hearth, Li: liver, K: kidney, Sp: spleen, I: intestine), 3 week after GR ablation. Myogenin is used as an internal control (IC) for DNA loading. n = 4 mice / group. (C) GR transcript levels of control and GR(i)skm^{-/-} mice on gastrocnemius (Gastro), tibialis, quadriceps (Quadri), and soleus muscles, 3 weeks after GR ablation. n = 4 mice / group. (D) Western blot analysis of GR protein levels in gastrocnemius (Gastro), tibialis and quadriceps muscle of control and GR(i)skm^{-/-} mice, 3

weeks after GR ablation. Tubuline is used as an internal control. n=4 mice / group (E) Immunofluorescence analysis of GR in gastrocnemius muscle of control and GR(i)skm^{-/-} mice, 3 weeks after GR ablation. n = 4 mice / group

Supplemental Figure 2:

Analysis of relative IGF1eA, p85 and REdd1 (A), FOxO1 and FoxO3a (B), MurF1, Atrogin1, UbiC, Cathepsin-L and Calpain (C) on gastrocnemius muscles of 4 month-old control and GR(i)skm^{-/-} mice. 18S is used as an internal control. n=6 mice / group. (D) Glucose tolerance test and the corresponded area under the curve (A.U.C.) at 15 weeks-old in control and GR(i)skm^{-/-}. n = 6-8 mice / group. Bars represent the Mean ± SEM.

Supplemental Figure 3:

Spleen weight (A) and body weight (B) of 3 days oil and dex treated control and GR(i)skm^{-/-} mice. (C) Distribution and mean of tibialis fibers CSA from 3 days oil- or dex- treated (10mg/kg) control and GR(i)skm^{-/-} mice. Relative transcript levels of Cathepsin-L, Atg7, LC3 and BNIP3 (D) and IGF1eA, IRS1, PDK1 and mTOR (E) in gastrocnemius muscle of 3 days oil- or dex- treated (10mg/kg) control and GR(i)skm^{-/-} mice. Relative transcript levels of FoxO3a, MurF1, Atrogin1, Atg7, LC3 and Redd1 (F) in soleus muscle from control and GR(i)skm^{-/-} mice treated either for 3 days with oil or dex (10mg/kg). 18S is used as an internal control. n = 6 mice / group Bars represent the Mean ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p < 0.001. ns, not significant.

Supplemental Figure 4:

Relative transcript levels of FoxO1, MuRF1, and Redd1 in quadriceps (A), Tibialis (B) and Soleus (C) muscle of 6H oil- or dex-treated control and GR(i)skm^{-/-} mice. 18S is used as an internal control. n=6 mice / group. Bars represent the Mean ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p < 0.001. ns, not significant.

Supplemental Figure 5:

(A) Body weight of control or three days fasted control and GR(i)skm^{-/-} mice. Distribution and mean (B) of tibialis fibers CSA from control and three days fasted control and GR(i)skm^{-/-} mice. Relative transcript levels of Cathepsin-L, LC3 and BNIP3, IGF1eA, and KLF15 (C) in gastrocnemius muscle control and three days fasted control and GR(i)skm^{-/-} mice. 18S is used as an internal control. n=6 mice / group. Bars represent the Mean ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p < 0.001. ns, not significant.

I.6 FIGURES

FIGURE 1:

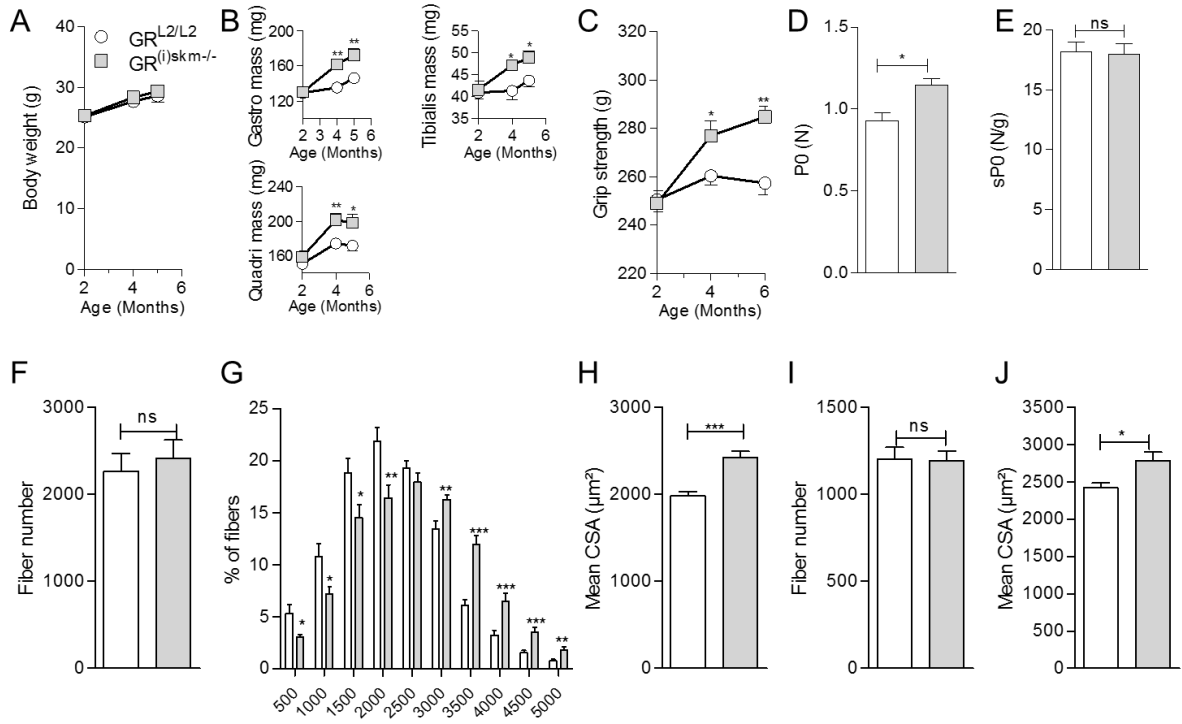
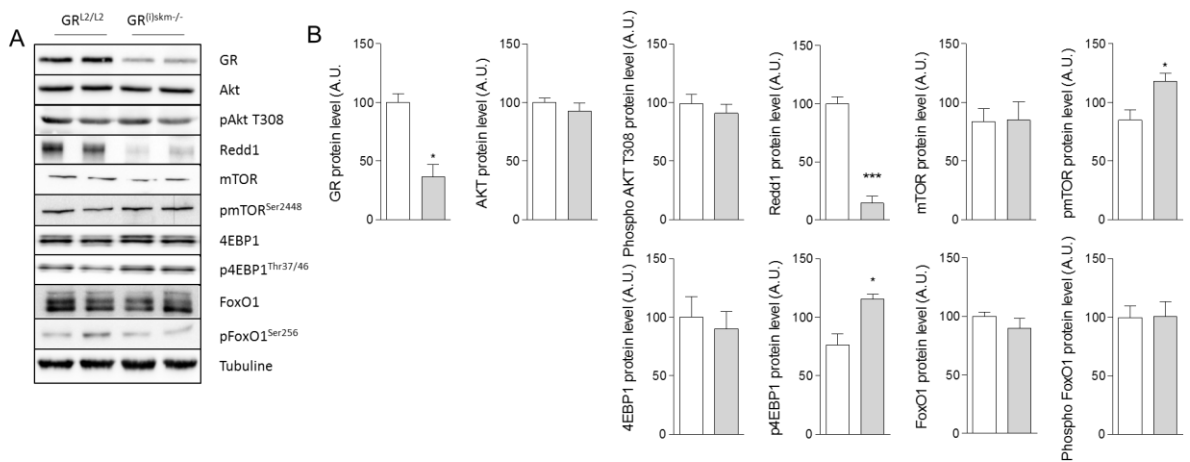


FIGURE 2:



Ontology	GO Term name	Nb of genes	p-value
Go BP	GO:0006952~defense response	10	1,23E-04
	GO:0008202~steroid metabolic process	5	5,21E-03
	GO:0006094~gluconeogenesis	4	8,41E-05
	GO:0009310~amine catabolic process	3	3,24E-02
Go MF	GO:0004866~endopeptidase inhibitor activity	13	6,91E-12
	GO:0005506~iron ion binding	8	9,46E-04
	GO:0005179~hormone activity	4	1,51E-02
	unclassified	47	

FIGURE 3:

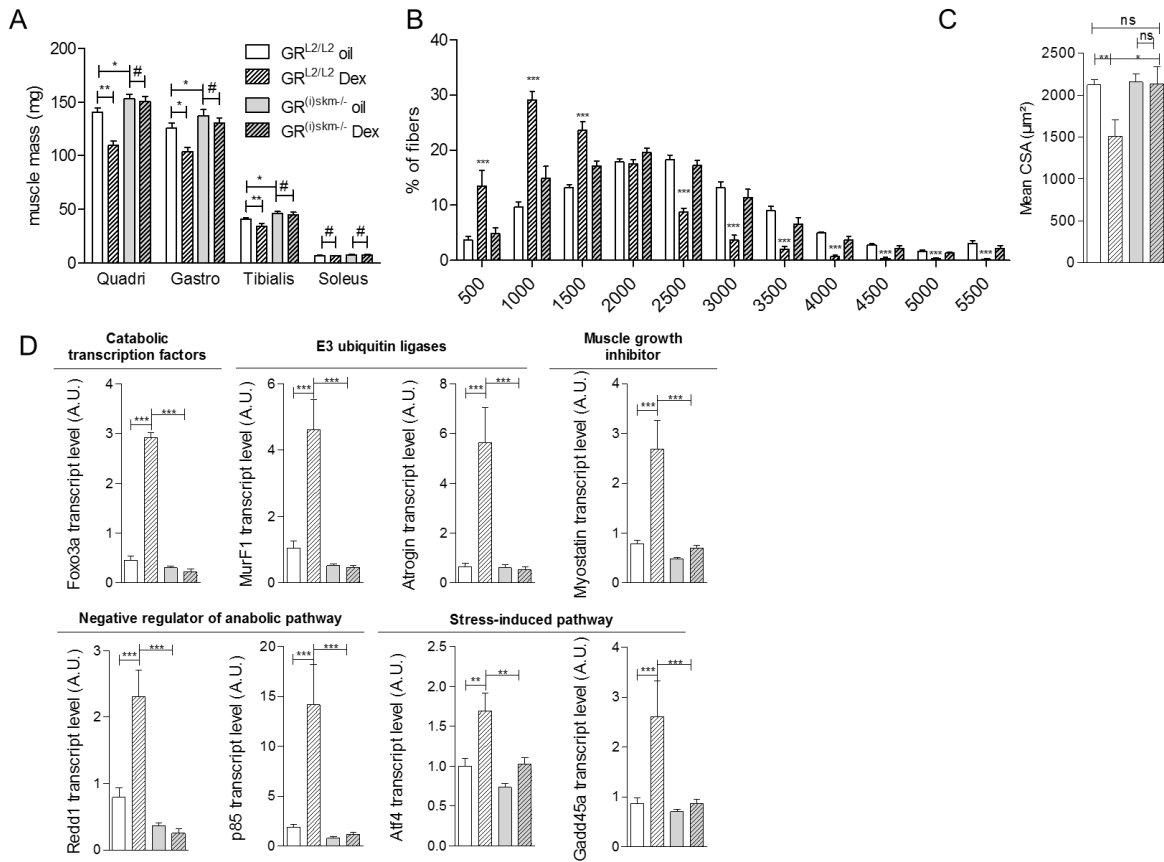


FIGURE 4:

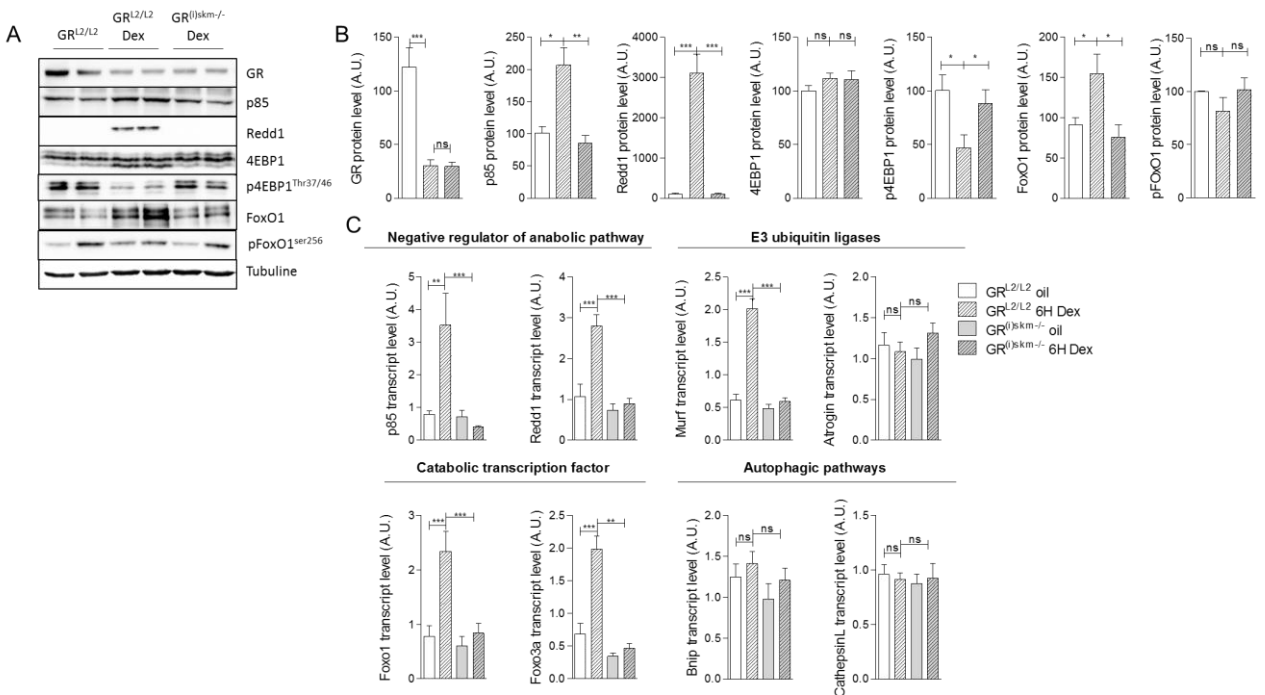


FIGURE 5:

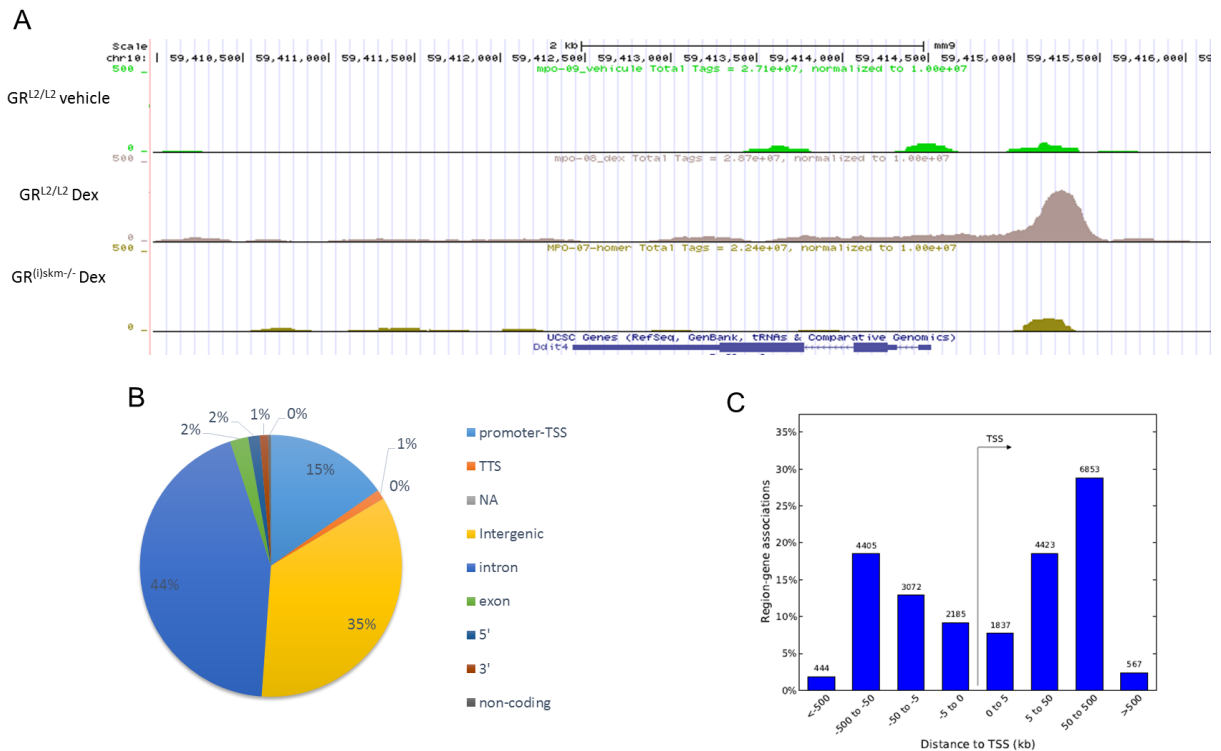


FIGURE 6:

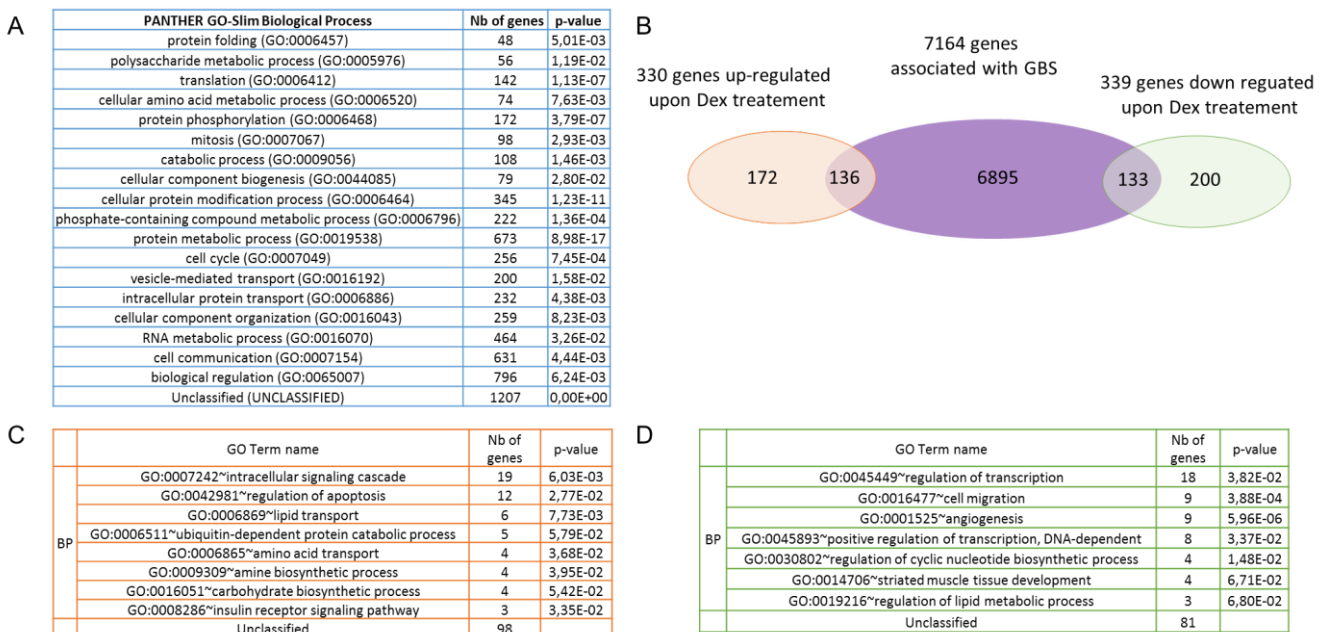


FIGURE 7:

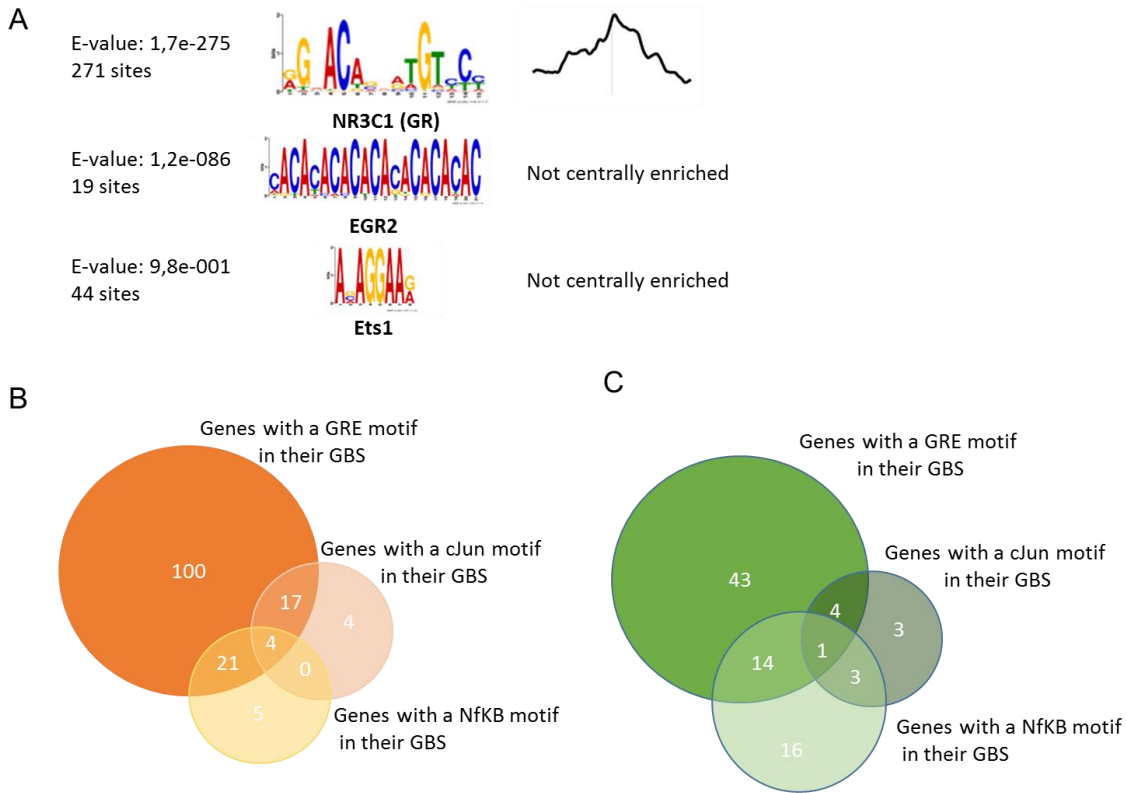


FIGURE 8:

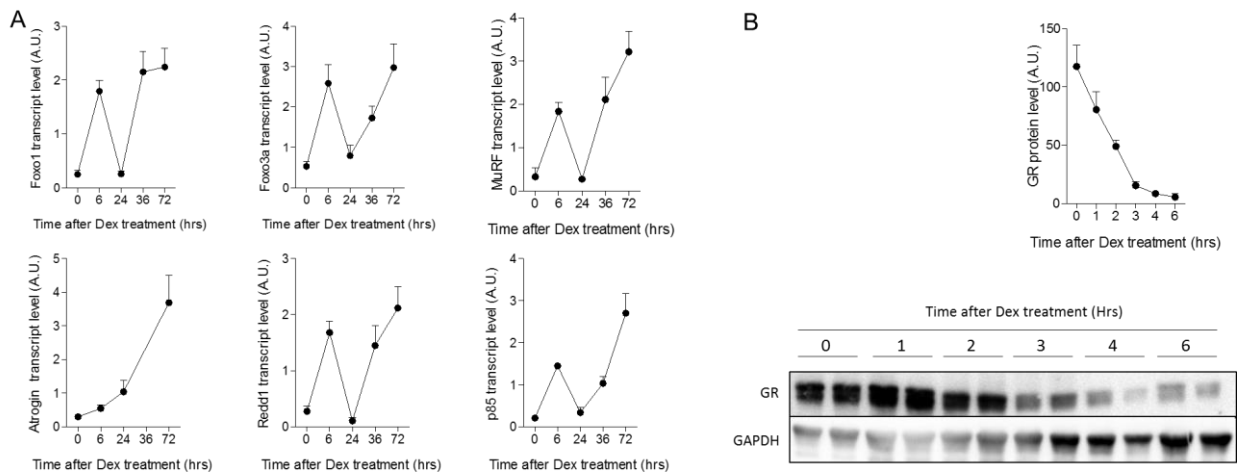
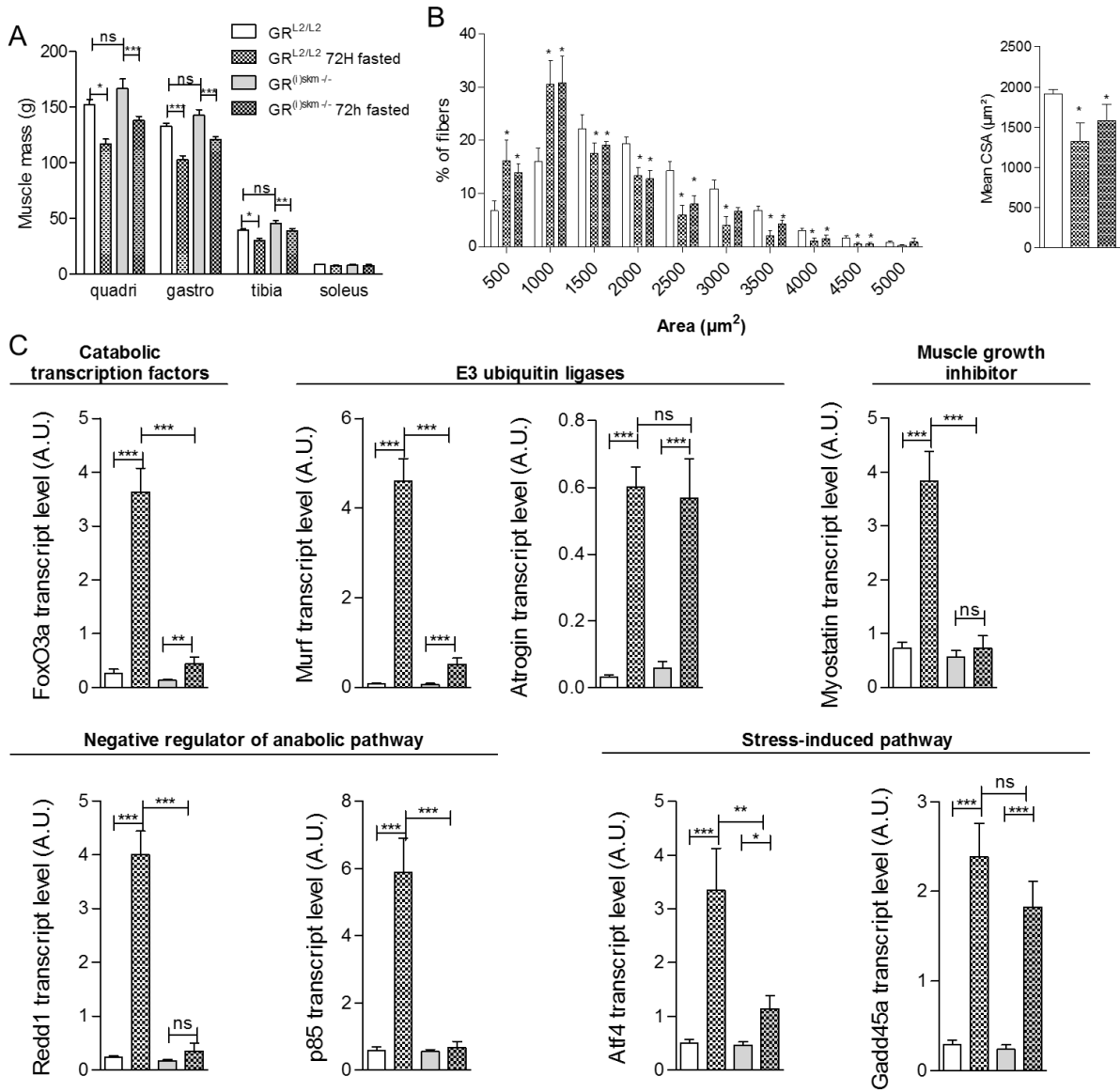
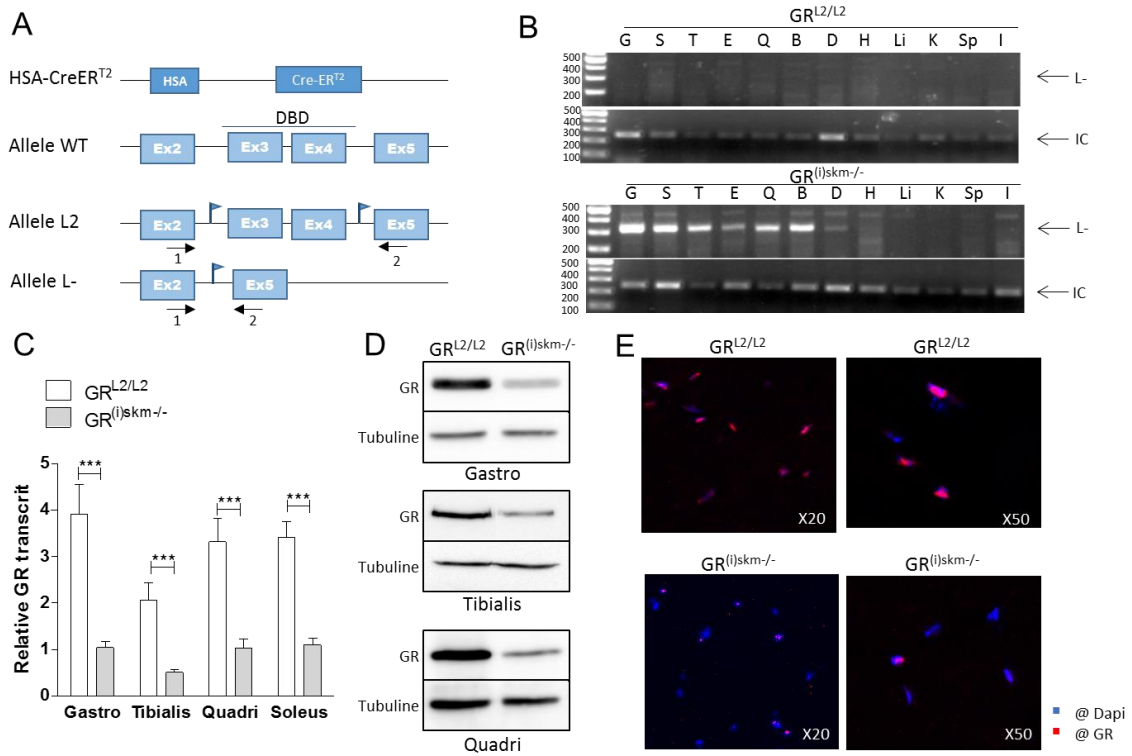


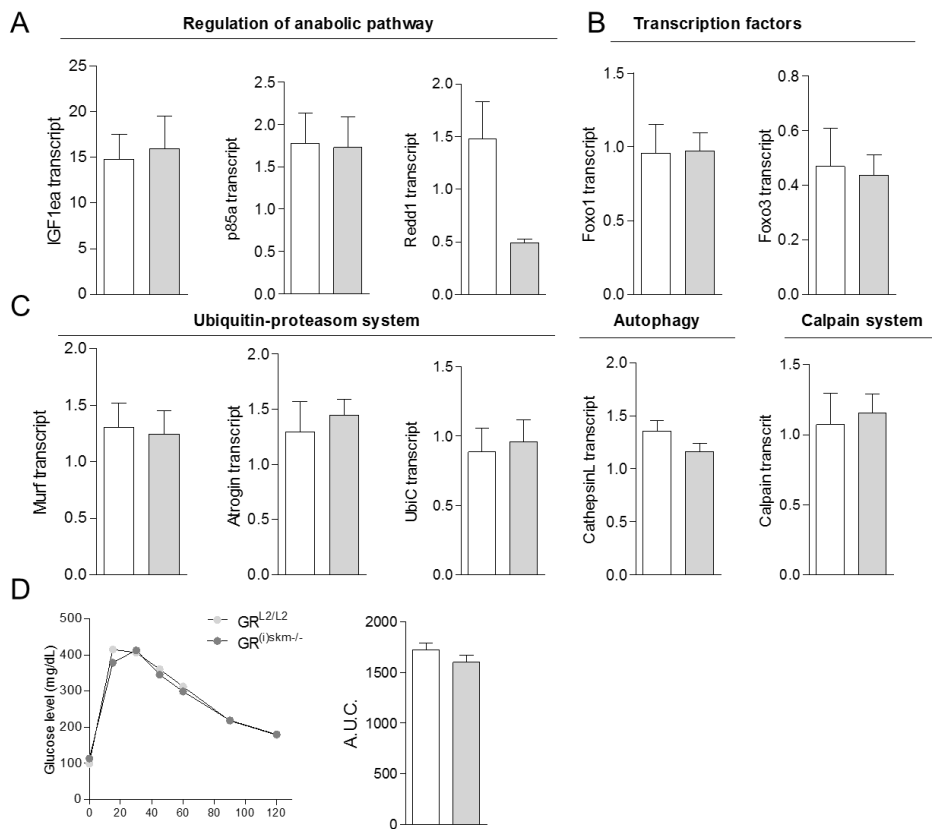
FIGURE 9:



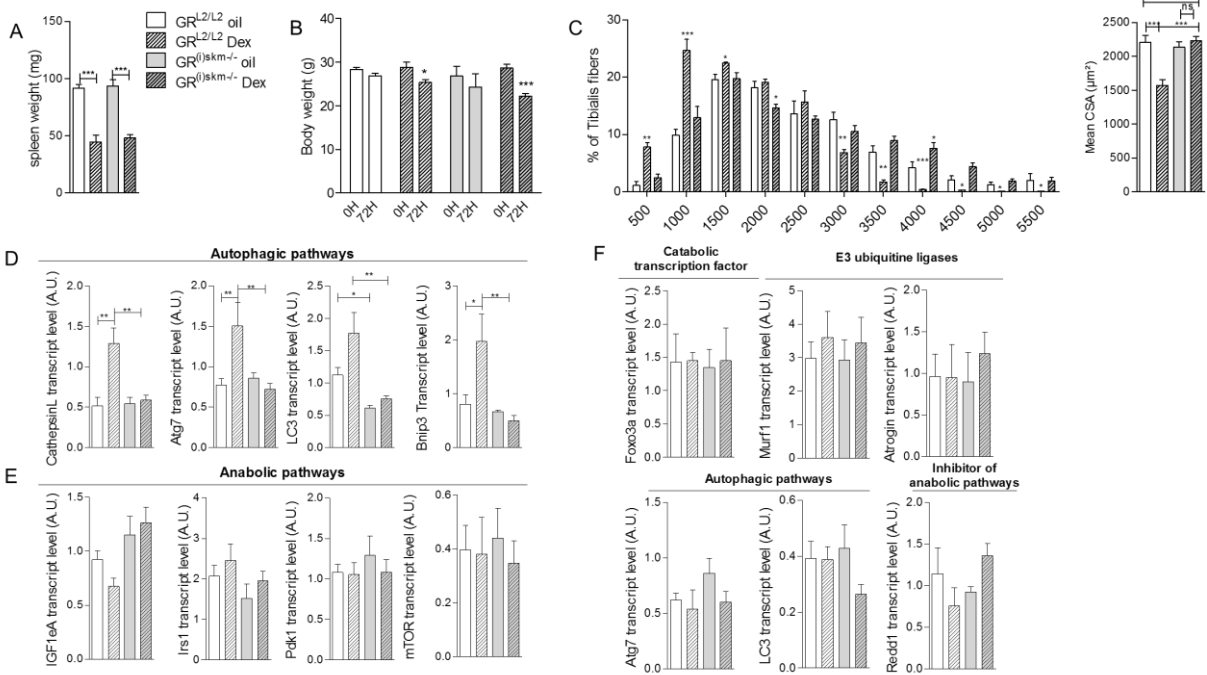
SUPPLEMENTAL FIGURE 1:



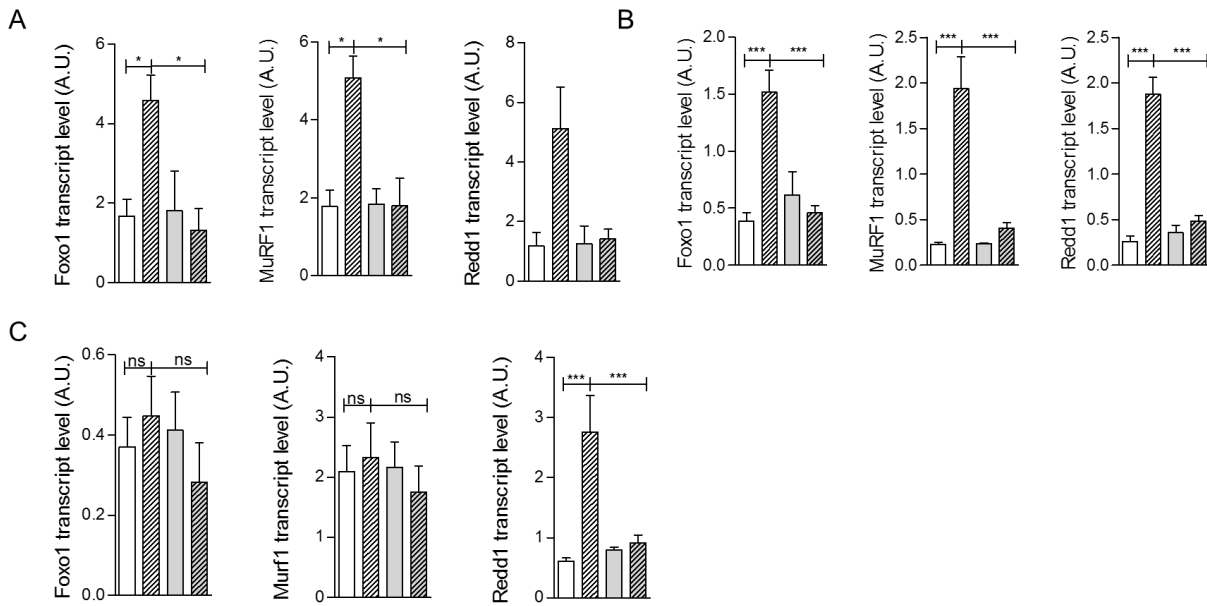
SUPPLEMENTAL FIGURE 2:



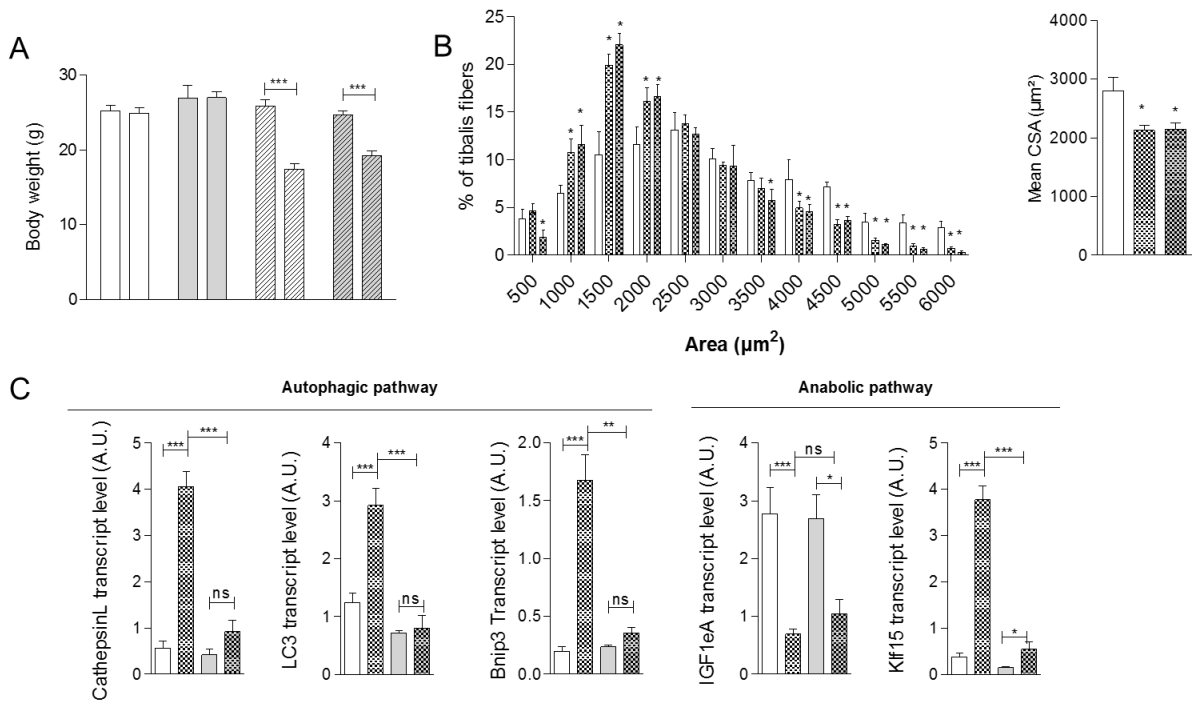
SUPPLEMENTAL FIGURE 3:



SUPPLEMENTAL FIGURE 4:



SUPPLEMENTAL FIGURE 5:



II. CARACTERISATION DES EVENEMENTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES RESPONSABLES DE L'EFFET THERAPEUTIQUE DES GLUCOCORTICOÏDES SUR LES FONCTIONS MUSCULAIRES DES PATIENTS ATTEINTS DE LA MYOPATHIE DE DUCHENNE

II.1 INTRODUCTION

La MD, une maladie musculaire induite par la mutation du gène de la dystrophine, est caractérisée par une faiblesse musculaire, une inflammation chronique précoce et des fibres musculaires à noyaux centraux. Les GC de synthèse (Prednisolone, Prednisone, Deflazacort) constituent les traitements les plus efficaces de la MD (Manzur et al., 2008). Ils induisent une augmentation de la force musculaire et retardent la progression de la maladie, mais ne sont pas curatifs. Des études cliniques indépendantes ont montré que l'utilisation de GC fluorés, tels que la dexaméthasone et la triamcinolone acétonide, est fréquemment associée à une atrophie musculaire. C'est pourquoi il est recommandé de privilégier l'utilisation de GC non fluorés (Pereira and Freire de Carvalho, 2011). Ainsi, les GC induisent paradoxalement à la fois une atrophie musculaire chez les patients non dystrophiques et des effets bénéfiques sur les fonctions musculaires des patients MD. Comme nous avons caractérisé l'atrophie musculaire induite par la dexaméthasone (dex), nous avons étudié l'effet de l' α -méthylprednisolone (pdn) sur les muscles striés d'un modèle murin de MD, afin d'identifier les voies régulées sélectivement par cet analogue et potentiellement responsables de l'amélioration des fonctions musculaires.

II.2 RESULTATS

Validation du phénotype des souris Mdx.

Nous avons utilisé des souris Mdx âgées de 8 semaines comme modèle murin de la MD. En accord avec la littérature, un marquage immuno-histochimique nous a permis d'observer une altération de l'architecture du muscle gastrocnémien et un déficit complet en dystrophine chez ces souris. Les souris Mdx présentent une augmentation du nombre de fibres à noyau centraux par rapport aux souris sauvages ainsi que de zones d'infiltration (**Figure 29**).

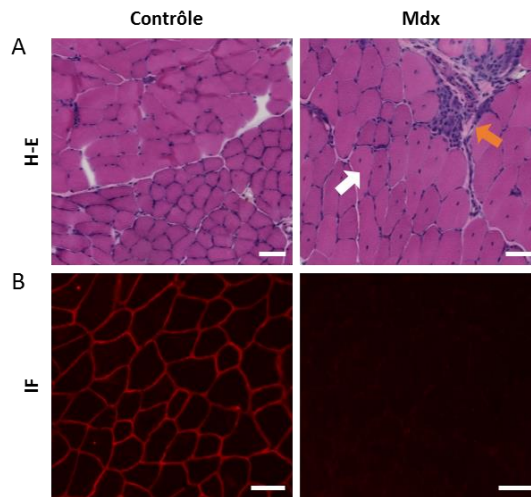


Figure 29 : Aspect histologique du muscle gastrocnémien de souris Mdx.

(A) Marquage à l'hématoxyline-éosine (H - E) sur des coupes du muscle gastrocnémien de souris contrôle et Mdx, âgées de 8 semaines. La flèche blanche indique une fibre à noyaux centraux. La flèche orange indique une zone d'infiltration. (B) Marquage par immunofluorescence (IF) de la dystrophine sur des coupes du muscle gastrocnémien de souris contrôle et Mdx. L'échelle représente 50 µm.

De plus, les souris Mdx présentent une diminution musculaire de 50 % de leur force d'agrippement, ainsi qu'une diminution de 50 % du temps de latence entre le moment où la souris est suspendue à une grille et le moment où elle se laisse tomber au sol (**Figure 30**).

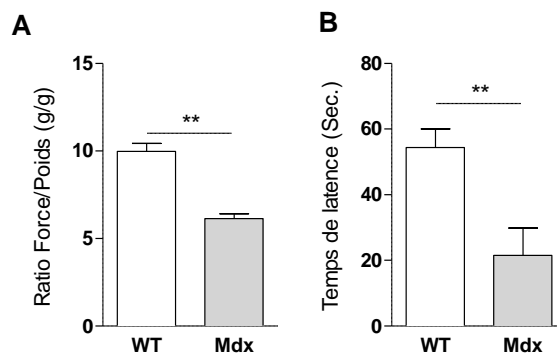


Figure 30 : Etude de la force musculaire des souris Mdx.

(A) La force musculaire des souris Mdx à 8 semaines est mesurée à l'aide d'un test de force et comparée à celle des souris contrôles (WT) âgées de 8 semaines. Les forces en grammes sont normalisées par rapport au poids des souris et représentent la moyenne +/- SEM avec n=5 par groupe. (B) La coordination motrice est quantifiée à 8 semaines en mesurant le temps mis par les souris pour lâcher la grille à laquelle elles ont été agrippées. Les barres représentent la moyenne +/- SEM, n=7 par groupe. P < 0,01 (**).

Etude de l'effet d'un traitement aigu à la dexaméthasone et à l' α -méthylprédnisolone sur les voies anaboliques et cataboliques dans le muscle gastrocnémien de souris contrôles et Mdx.

Afin de déterminer l'effet de la dex et de la pdn sur les voies contrôlant la masse musculaire, des souris contrôles et des souris mâles Mdx de 8 semaines ont été traitées soit avec le véhicule, soit avec 10 mg/kg de dex ou 10 mg/kg de pdn. En accord avec l'étude précédente, la dex induit chez les souris contrôles l'expression de gènes codants pour des régulateurs négatifs de la voie anabolique, tels que p85, Redd1, Sesn1 et KLF15, ainsi que de gènes impliqués dans le catabolisme, tels que FoxO1 et

MuRF1. En revanche, bien que la pdn induise également l'expression des gènes codant pour p85, FoxO1 et MuRF1, l'expression des gènes codant pour Redd1, Sesn1 et KLF15 est similaire à celle des souris traitées avec le véhicule. Chez les souris Mdx, tandis que la dex induit l'expression des gènes codant pour p85, Redd1, Sesn1, KLF15, FoxO1 et MuRF1, la Pdn induit uniquement l'expression du gène codant pour p85. Les deux composés ne modifient pas le niveau de transcrite codant pour IGF-1ea chez les souris contrôles et les souris Mdx (**Figure 31**).

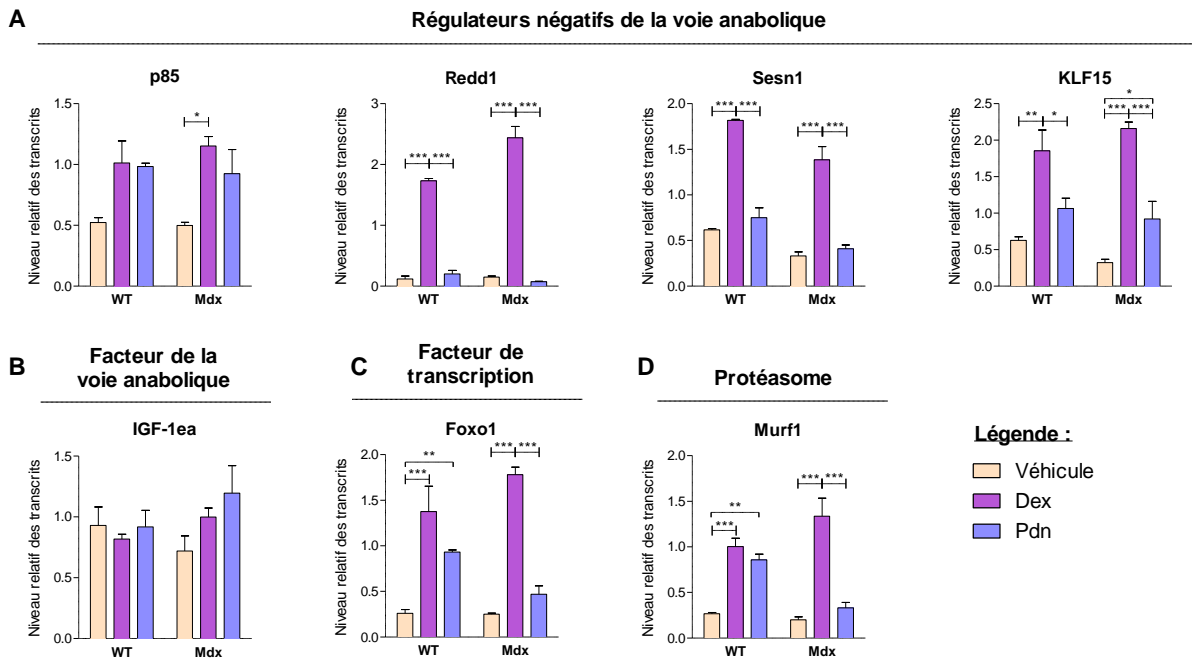


Figure 31 : Effet d'un traitement aigu à la dexaméthasone et à l'α-méthylprédnisolone sur les voies anaboliques et cataboliques dans le muscle gastrocnémien de souris contrôles et Mdx.

Niveaux de transcrits de régulateurs négatifs de la voie anabolique (A), de facteurs de la voie anabolique (B), de protéines impliquées dans le système protéolytique (C) et de facteurs de transcriptions impliqués dans le catabolisme (D), mesurés par RT-qPCR après 6 heures de traitement avec 10 mg/kg de dex, de pdn ou le véhicule sur des souris contrôles (WT) et Mdx de 8 semaines. Les niveaux de transcrits sont normalisés par rapport au gène de ménage 18S et représentent la moyenne +/- SEM, n=3 par groupes de souris WT et n=5 par groupes de souris Mdx. P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***)

En résumé, ces résultats indiquent chez les souris contrôles, que la dex induit à la fois l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'effet anti-anabolique et catabolique tandis que la pdn induit principalement l'expression de gènes impliqués dans la voie catabolique. De plus, la dex contrôle de manière similaire l'expression des gènes chez les souris contrôles et chez les souris Mdx. En revanche, la Pdn n'induit pas l'expression des gènes impliqués dans la régulation catabolique chez les souris Mdx.

Etude de l'effet d'un traitement chronique à la dexaméthasone et à l'α-méthylprédnisolone sur des souris contrôles et Mdx.

Afin de déterminer si un traitement chronique à la dex et à la pdn a des impacts moléculaires et physiologiques différents, des souris mâles contrôles et Mdx de 8 semaines ont été traitées avec le véhicule, ou avec 10 mg/kg de dex ou de pdn, pendant 1 mois à raison de 3 injections par semaine.

Analyse phénotypique des souris contrôles et Mdx traitées 1 mois à la dexaméthasone et de l' α -méthylprédnisolone.

Afin de déterminer si un mois de traitement permet une amélioration des capacités motrices notamment chez les souris Mdx, des mesures de force ont été réalisées une fois par semaine au cours du traitement.

Nous observons une augmentation de la force des souris Mdx jusqu'à atteindre une force similaire à celle mesurée chez les souris contrôles à 11 semaines. Par contre aucun effet significatif des traitements à la dex et à la pdn n'a été observé sur la force des souris Mdx, ni sur celle des souris contrôles (Figure 32A).

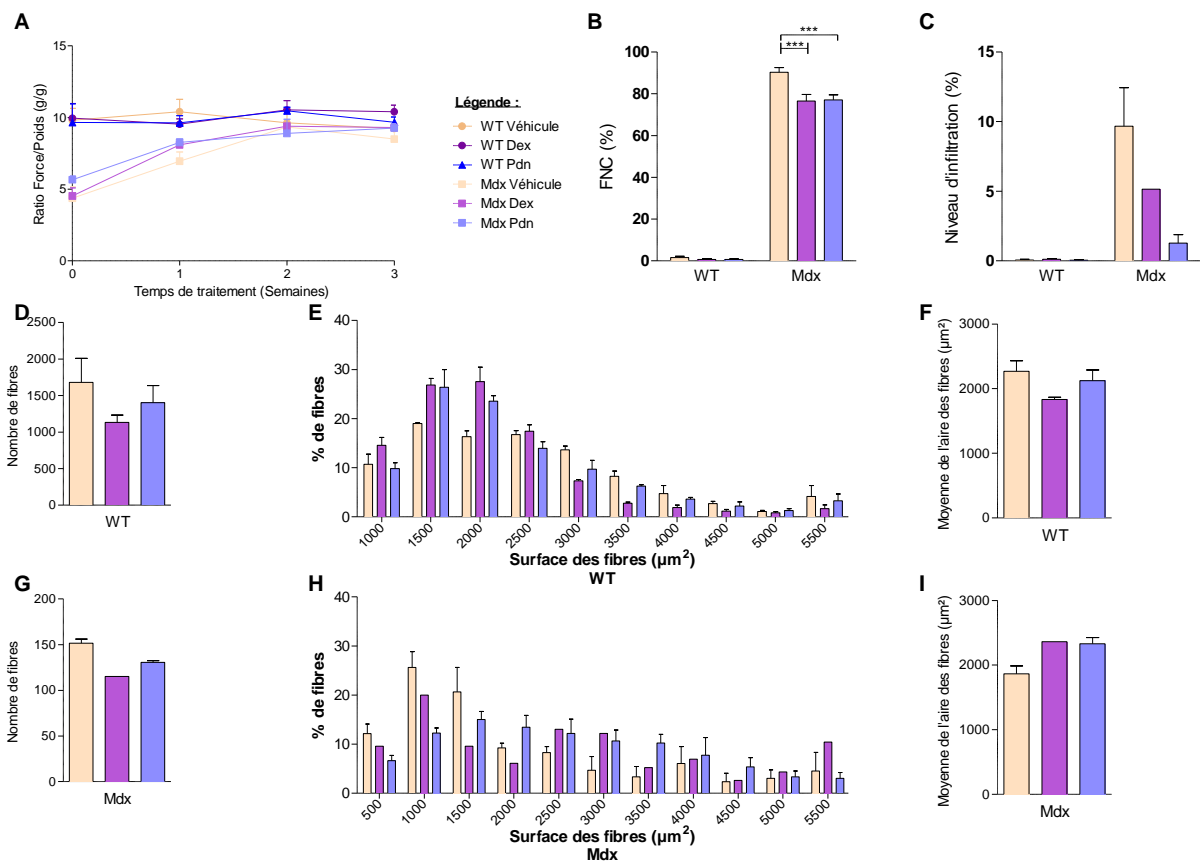


Figure 32 : Effet d'un traitement chronique à la dexaméthasone et de l' α -méthylprédnisolone sur la force musculaire et sur la structure du muscle gastrocnémien de souris contrôles et Mdx.

(A) Mesure de force des souris durant le traitement. Les forces en grammes sont normalisées par rapport au poids des souris. (B) Quantification du pourcentage de fibres à noyaux centraux calculé sur 5 champs à raison de 40 cellules par champs. (C) Niveau d'infiltration calculé sur l'ensemble des coupes de muscle. Nombres de fibres, répartition des fibres en fonction de leur taille et taille moyenne des fibres par coupes du muscle gastrocnémien de souris contrôles (WT) (D, E et F) ou Mdx (G, H, I) traitées pendant 1 mois de traitement, à raison de 3 fois 10 mg/kg de dex, pdn ou avec du sérum physiologique (véhicule) par semaine sur des souris WT et Mdx de 8 semaines. Les barres représentent la moyenne +/- SEM avec n=3 par groupes pour les souris WT, n=2 pour les souris Mdx traitées avec le véhicule, n=1 pour la dex et n=3 pour la pdn. P < 0,001 (***)

Afin de déterminer si les composés ont un effet sur l'architecture du muscle à l'échelle microscopique, des coupes histologiques du muscle gastrocnémien de souris contrôles et Mdx ont été réalisées.

Le traitement prolongé avec la dex et la pdn diminue d'environ 15% le nombre de fibres à noyaux centraux chez les souris Mdx (**Figure 32B**), et l'infiltration semble réduire plus fortement chez les souris Mdx traitées à la Pdn comparé à celles traitées à la dex (**Figure 32C**). Le traitement à la dex induit une diminution du nombre de fibres associée à une diminution de la taille des fibres chez les souris contrôles (**Figure 32D, E et F**). Le traitement à la pdn induit également une diminution de la taille des fibres chez les souris contrôles, mais moins importante qu'après un traitement à la Dex (**Figure 32D, E et F**). En revanche, bien que les traitements à la dex et à la pdn induisent une diminution du nombre de fibres chez les souris Mdx, ces traitements induisent une augmentation de la taille des fibres chez les souris Mdx (**Figure 32G, H et I**).

Ainsi, ces résultats indiquent qu'un traitement prolongé à la dex et à la pdn entraîne des effets physiologiques différents suivant le génotype de l'animal et le composé utilisé. En effet, ces composés induisent une atrophie musculaire chez les souris contrôles et une amélioration de l'architecture musculaire accompagnée d'une amélioration de l'état des fibres et d'une diminution de l'infiltration chez les souris Mdx. De plus, la pdn conduit à une atrophie musculaire moins sévère chez les souris contrôles que la dex et à des effets bénéfiques plus marqués chez les souris Mdx, notamment la diminution de l'infiltration.

Analyses moléculaires des muscles de souris contrôles et Mdx traitées 1 mois à la dexaméthasone et de l' α -méthylprédnisolone.

Afin de comprendre les effets de ces deux composés au niveau moléculaire, les transcrits codant pour des protéines de la voie catabolique ou des régulateurs négatifs de la voie anabolique ont été analysés.

Chez les souris contrôles, l'expression des gènes codants pour Redd1, Sesn1, KLF15, FoxO1 et MuRF1 est augmentée de 3 à 7 fois après un traitement d'un mois à la dex. En revanche, l'expression de ces gènes après un traitement à la pdn est similaire à celle observée chez les contrôles (**Figure 33A et C**). De la même manière, chez les souris Mdx, l'expression des transcrits codant pour Redd1, Sesn1, KLF15, FoxO1 et MuRF1 est augmentée après un traitement à la dex, mais pas après un traitement à la pdn (**Figure 33A, C et D**). Chez les souris Mdx, nous observons une augmentation du niveau de transcrit codant pour p85 avec le traitement à la dex, mais pas avec le traitement à la pdn (**Figure 33A**). De plus, chez ces souris, la dex et la pdn induisent une nette augmentation du niveau de transcrits codants pour IGF-1 α , alors que son expression reste inchangée chez les souris contrôles après traitement (**Figure 33B**).

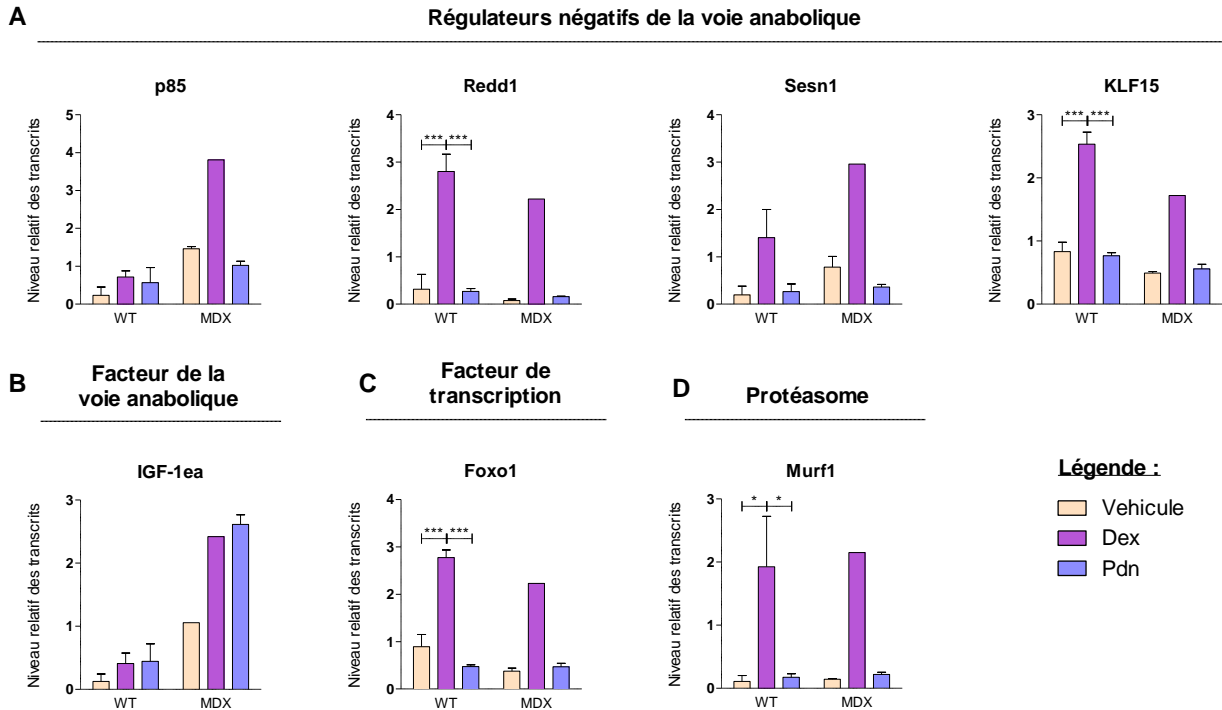


Figure 33 : Effet d'un traitement chronique à la dexaméthasone et de l' α -méthylprédnisolone sur les voies anaboliques et cataboliques dans le muscle gastrocnémien de souris contrôles et Mdx.

Niveaux de transcrits de régulateurs négatifs de la voie anabolique (A), de facteurs de la voie anabolique (B), de protéines impliquées dans le système protéolytique (C) et de facteurs de transcription impliqués dans le catabolisme (D), mesurés par RT-qPCR après 1 mois de traitement, à raison de 3 fois 10 mg/kg de dex, de pdn ou avec le véhicule par semaine sur des souris contrôles (WT) et Mdx de 8 semaines. Les niveaux de transcrits sont normalisés par rapport au gène de ménage 18S et représentent la moyenne \pm SEM, n=3 par groupes pour les souris WT, n=2 pour les souris Mdx traitées avec le véhicule, n=1 pour la Dex et n=3 pour la Pdn. P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***)

Ces résultats indiquent qu'un traitement prolongé à la dex induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la voie anti-anabolique et catabolique aussi bien chez les souris contrôles que les souris Mdx. Par contre, la pdn induit l'expression d'aucun de ces gènes chez les souris contrôles et les souris Mdx. De manière intéressante, les deux composés induisent l'expression d'IGF-1ea chez les souris Mdx.

II.3 DISCUSSION

Cette étude a permis de mettre en évidence des différences phénotypiques après un traitement à la dex et un traitement à la pdn chez des souris sauvages et Mdx. Nous avons observé qu'un traitement à la dex mais pas à la pdn, induit une atrophie musculaire chez les souris sauvages, alors que les souris mdx traitées à la dexaméthasone ou à l' α -méthylprédnisolone présentent une augmentation de la taille des fibres. Nos résultats indiquent qu'un traitement prolongé aux GC permet une amélioration de l'architecture musculaire plus marquée après un traitement à la pdn qu'après un traitement à la dex, en diminuant le nombre de noyaux centraux et le niveau d'infiltration des cellules immunitaires chez les souris Mdx. Ces résultats sont en accord avec les études montrant que les traitement chroniques avec des GC (e.g. prednisone, deflazacort) sont des standards dans le traitement des

patients atteints de MD (Beenakker et al., 2005) et que les GC fluorés sont bien connus pour induire une atrophie musculaire (Pereira and Freire de Carvalho, 2011). Au niveau moléculaire, nos résultats montrent qu'un traitement chronique à la pdn n'induit pas l'expression des gènes codant pour des régulateurs négatifs de la voie anabolique, ainsi que pour des protéines impliquées dans le système ubiquitine protéasome, contrairement à la dex qui augmente l'expression de ces gènes, aussi bien chez les souris contrôles que les souris Mdx. Ainsi nos résultats indiquent que l'expression de certains gènes cibles de GR est régulée de manière différentielle suivant le type d'analogues utilisés.

Malgré le nombre limité de souris utilisées, ces résultats préliminaires indiquent que la pdn améliore les conditions musculaires des souris Mdx en diminuant la proportion de fibres à noyaux centraux et le niveau d'infiltration. De plus, la pdn n'induit pas l'expression des gènes impliqués dans la régulation négative de la voie anabolique et dans le catabolisme chez les souris sauvages, évitant la mise en place d'une atrophie musculaire et favorisant l'effet bénéfique chez les souris Mdx. Ainsi, nos résultats expliquent en partie pourquoi la pdn donne de meilleurs résultats que la dex dans le traitement de la MD.

Comme les GC peuvent agir à travers de nombreux mécanismes, les voies de signalisation responsables de l'efficacité des GC dans le traitement de la MD et ceux responsables des effets délétères restent à être mieux caractérisés. Plusieurs études ont suggéré que les bénéfices de la prednisolone proviennent essentiellement de son effet immunosuppresseur sur les cellules T qui infiltrent les muscles, notamment via une action anti-NF- κ B (Heier et al., 2013; Morrison et al., 2000; Wissink et al., 1997). L'administration de molécules ciblant directement NF- κ B, permet une réduction des caractéristiques de la pathologie, ainsi qu'un rétablissement partiel de la fonction contractile dans des modèles animaux (Grounds and Torrisi, 2004; Peterson et al., 2011). En revanche, des immunosuppresseurs plus généraux réduisent l'inflammation, mais n'augmentent par la force des patients de la même manière que les GC (Griggs et al., 1993). Une étude a récemment démontré que VBP15, un composé de la famille Δ -9,11 (Baudy et al., 2012), augmente la force et diminue l'inflammation musculaire chez des souris Mdx sans induire d'effets secondaires notamment sur la croissance des souris ou sur la fibrose du muscle cardiaque (Heier et al., 2013). Ils ont montré que VBP15 protège et favorise la réparation des membranes plasmiques lors des dommages, et qu'il exerce une activité anti-inflammatoire en inhibant NF- κ B sans effets immunosuppresseurs, à travers des interactions protéine-protéine, indépendamment de la liaison à l'ADN et de l'activation des GRE. Des découvertes récentes ont également démontré que l'atrophie musculaire observée chez les souris Mdx n'est pas uniquement causée par des fragilités au niveau des myofibres, mais également par une dysfonction des cellules satellites conduisant à un défaut de régénération. En effet, les cellules satellites chez les souris Mdx présentent des incapacités à établir leur polarité, se diviser ou à entrer dans le programme myogénique (Chang et al., 2016). De plus, les niveaux des marqueurs de stress oxydatif et d'enzymes antioxydantes, sont augmentés dans les muscles squelettiques de souris Mdx (Haycock et al., 1996) et un traitement avec un antioxydant, la N-acétylcystéine, restaure partiellement les fonctions musculaires (Whitehead et al., 2008). La concentration de calcium intracellulaire est également augmentée chez les souris Mdx (Altamirano et al., 2013), suggérant que le calcium et les réactifs dérivés du nitrogène et de l'oxygène jouent un rôle dans la progression de la pathologie.

Ainsi, il serait également intéressant d'étudier l'influence de la dex et de la pdn sur les composants du système immunitaire, mais également leur capacité à induire la régénération des myofibres à partir des cellules satellites, la stabilisation des membranes cytoplasmiques ou la régulation du taux de calcium intracellulaire.

Les gènes régulés par des GRE ont été fréquemment impliqués dans les effets secondaires des GC (Meijsing et al., 2009; Schakman et al., 2013). Heier *et al.* démontre qu'un traitement au VBP15 présente une diminution de l'activité des gènes contrôlés par des GRE par rapport à la prednisolone, pouvant être associée à l'absence d'effets secondaires. Cette étude confirme néanmoins que l'activité du récepteur ligandé est essentielle à l'effet anti-inflammatoire de VBP15 lié à l'interaction protéine-protéine (Heier et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la transactivation des GRE est inutile dans l'effet bénéfique des GC chez les patients atteints de MD, mais nécessite la présence du récepteur ligandé. Cependant, l'effet bénéfique observé sur l'inflammation et sur la force n'est pas forcément lié à l'activation du récepteur dans les cellules musculaires, mais peut s'expliquer par l'implication dans d'autres cellules, telles que les cellules immunitaires. Il serait donc intéressant de clarifier le rôle de GR dans les myofibres dans l'amélioration des signes cliniques des patients atteints de la MD. Pour cela, nous avons généré une lignée de souris Mdx/GR^{(i)skm^{-/-}}, chez lesquelles GR peut être sélectivement invalidé dans les muscles striés squelettiques des souris Mdx, avec un contrôle temporel grâce au système de recombinaison Cre-ER^{T2}/LoxP développé par le laboratoire. Un tel modèle va permettre de déterminer si GR dans les myofibres contribue ou non à l'amélioration des signes cliniques des souris Mdx suite à un traitement à la pdn et d'identifier les voies de signalisation sous-jacentes.

Il serait également intéressant d'étudier la liaison entre la pdn ou la dex et GR par des études biophysiques et structurales. En effet, la différence d'affinité, et donc la stabilité de l'interaction ligand/récepteur peut être un facteur clef dans les effets différentiels entre ces deux composés que nous avons mis en évidence. De plus, l'étude comparative de la structure du récepteur lié à la pdn et celle du récepteur lié à la dex, pourrait permettre de déterminer les changements de conformation entre les deux complexes pouvant expliquer les effets différentiels observés. En effet, ces changements pourraient influencer la capacité du récepteur ligandé à recruter des coactivateurs nécessaires à la régulation de la transcription de ces gènes, mais également sa capacité à se lier à l'ADN. Nous avons identifié par immunoprécipitation de la chromatine et analyses transcriptomiques, des gènes cibles de GR après un traitement à la dex dans le muscle de souris et déterminé si l'expression des gènes était contrôlée par la liaison à des GRE ou des nGRE, ou encore via des interactions à d'autres facteurs de transcription (cf. Le récepteur des glucocorticoïdes dans les myofibres contrôle l'expression d'un ensemble de gènes résultant en une régulation dynamique de la voie anti-anabolique et catabolique dans les muscles de souris adultes. I). En utilisant des approches similaires, nous pourrions déterminer les cibles de GR après un traitement à l' α -méthylprednisolone et identifier les mécanismes responsables de l'activité sélective de ces deux ligands. De plus, étant donnée ces propriétés particulière, VBP15 possède une excellente activité anti-inflammatoire via l'inhibition de NF- κ B, mais élimine largement la transcription médiée par les GRE. Il serait intéressant d'effectuer des analyses comparatives entre la pdn, la dex et VBP15 pour comprendre les mécanismes moléculaires différentiels induits par ces composés dans les muscles squelettiques.

Ainsi, ces connaissances ouvrent des perspectives pour développer des GC de synthèse ayant un meilleur index thérapeutique en séparant les voies de signalisation responsables des effets bénéfiques et celles responsables des effets secondaires observés chez les patients. De tels composés pourront alors permettre une avancée majeure dans les traitements de la MD de par leur capacité à améliorer les conditions de vie des patients, leur facilité d'utilisation et leur coût et pourront de manière plus large être prescrits dans le traitement d'autres maladies musculaires telles que la sarcopénie.

II.4 MATERIEL ET METHODES

Elevage des souris

Les souris sont élevées au sein de l'animalerie de l'Institut à une température et un taux d'humidité constants, une alternance jour/nuit de 12 h et un accès libre à l'eau et à la nourriture standard pour rongeur (2800 kcal/kg, usine d'alimentation rationnelle). Les croisements et le maintien des souris ont été réalisés en suivant les règles de l'Institut (N° agrément : 67.109). Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le comité d'éthique de l'IGBMC (N° 2015-026). Les souris C56BL/6J (WT, Jackson Laboratory n°000664) et les souris C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J portant la mutation ponctuelle C en T à la position 3185 (Mdx, Jackson Laboratory n° 001801) ont été utilisées.

Génotypage des souris

L'ADN génomique est isolé à partir de biopsies de queue. La digestion des tissus s'effectue pendant une nuit à 55°C dans 100 µl du tampon de lyse (Direct PCR lysis reagent, Viagen Biotech. Inc.), supplémenté de 1 mg/ml de protéinase K (Sigma chimie). Le lendemain, la protéinase K est dénaturée pendant 45 minutes à 85°C au bain marie. L'ADN est amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) (0.3 mM oligonucléotides sens, 0.3 mM oligonucléotides anti-sens, 5 U/ml Taq polymérase, 10 mM dNTP dans du tampon contenant 0.3 M KCl, 0.1 M MgCl₂, 0.2 M Tris pH8.8). L'ADN est dénaturé pendant 5 minutes à 94°C, puis amplifié sur 30 cycles (dénaturation pendant 15 secondes à 92°C, hybridation pendant 30 secondes à 61°C, élongation pendant 30 secondes à 72°C) à l'aide du thermocycleur 9800 Fast ThermoCycler (Applied Biosystem). Les oligonucléotides utilisés pour amplifier le fragment contenant la mutation du gène codant pour la dystrophine sont listés dans le [Tableau 4](#). Les fragments amplifiés sont séquencés par GATC-Biotech par la méthode de Sanger à l'aide du primer Dmd anti-sens. Les souris sont Mdx T/T (pour les femelles hétérozygotes) ou Mdx T/y (pour les mâles).

Traitement des souris à la dexaméthasone et à l'α-méthylprédnisolone

Les souris mâles sont injectées par voie intra-péritonéale avec 5 mg/kg de Dexaméthasone (Dexazone, Virbac) ou de α-méthylprédnisolone (Solumedrol, Zoetis) dans un volume maximum de 150 µL. Les souris contrôles sont injectées avec le même volume de sérum physiologique (véhicule). Les souris reçoivent soit une seule injection et sont sacrifiées 6 heures plus tard, soit 3 injections par semaine pendant 1 mois et sont sacrifiées 6 heures après la dernière injection.

Mesure de la force

Un dynamomètre isométrique (BioSeb) est utilisé pour mesurer la force des membres antérieurs et postérieurs. Les souris sont posées sur la grille et tirées par la queue jusqu'à lâcher prise. La force maximale d'agrippement est mesurée par le dynamomètre en g. Pour chaque animal, trois mesures sont prises pour obtenir une valeur moyenne de leur force en grammes.

Mesure de la coordination motrice

Les souris sont déposées sur une grille, puis la grille est retournée. Le temps de latence mis par les souris pour lâcher prise est déterminée en seconde jusqu'à un maximum de 60 secondes. Pour chaque animal, trois mesures sont effectuées pour obtenir une valeur moyenne de leur capacité à se maintenir sur la grille en secondes.

Coloration hématoxyline-éosine

Les coupes de tissus sont fixées dans de l'acétone, séchées à l'air libre 30 minutes, puis colorées 3 minutes dans l'hématoxyline de Harris filtrée (Merck), lavées à l'eau courante 3 minutes, décolorées

2 secondes dans l'alcool acide (1 mL HCl 37 % dans 100 mL éthanol 70 %), lavées à l'eau courante 3 minutes, colorées 30 secondes dans de l'éosine Y aqueuse 0.1% (Merck), rincées 30 secondes à l'eau distillée, puis déshydratées deux fois 2 minutes dans de l'éthanol 70 %, deux fois 2 minutes dans de l'éthanol 95 %, puis deux fois 2 minutes dans de l'éthanol 100%, lavées deux fois 2 minutes dans de l'Histosol® (CML) et montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage à base de xylènes (Pertex Mounting Medium, CellPath).

Immunofluorescence

Les tissus sont perméabilisés dans du phosphate buffer saline (PBS) Triton 0.3% pendant 5 minutes, puis fixés dans du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes, et re-perméabilisés dans du PBS Triton 0.1 % trois fois 5 minutes. Les sites aspécifiques sont bloqués pendant 1 h 30 min dans une solution PBS/Normal Goat Serum (NGS) 5%, puis les lames sont rincées au PBS et les anticorps primaires de lapin dirigés contre la dystrophine (ab15277, Abcam) dilués (1/200) dans du PBS sont incubés à 4°C durant la nuit. Le lendemain, les lames sont lavées dans du PBS-tween 0.05 % trois fois 5 minutes, puis dans du PBS 5 minutes. Les anticorps secondaires de chèvre anti-lapin couplés au marqueur fluorescent cyanine3 (Interchim SA) dilués (1/400) dans du PBS sont incubés 2 heures à température ambiante. Les lames sont lavées dans du PBS, trois fois 5 minutes, puis montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage (80% Glycérol pur, 10% PBS 1x, 5% propylgalate). Les lames sont digitalisées au scanner de lames Hamamatsu NanoZoomer 2.0HT. Les analyses histologiques (nombre de fibres, taille des fibres, pourcentage de fibre à noyaux centraux, niveau d'infiltration) sont réalisées à l'aide du logiciel ImageJ. Pour la taille des fibres, chaque fibre est identifiée grâce à l'intensité et à la continuité du marquage du sarcolemme par segmentation. L'aire est mesurée après une soustraction du bruit de fond, en utilisant l'analyse de particules d'ImageJ. L'aire calculée et le nombre de fibres sont convertis en un fichier test et les résultats sont exprimés en pourcentage de fibres distribuées en fonction de leurs aires.

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

L'ARN total est isolé en broyant le muscle gastrocnémien dans du TRIzol (Invitrogen) conformément aux instructions des fournisseurs. 2 µg d'ARNm sont retrotranscrits en utilisant l'ADN polymérase contenue dans le kit Superscript II (Invitrogen) ainsi que des hexamères comme amorce conformément aux instructions du fournisseur. Les RT-PCR quantitatives sont effectuées par une PCR en présence de 10 µM d'oligonucléotides spécifiques des gènes d'intérêt ([Tableau 4](#)). Le Syber green I master (Roche) est utilisé comme marqueur fluorescent. La fluorescence émise lors des cycles d'amplification est détectée par un Light Cycler 4800 équipé d'une plaque 384 puits (Roche). Les niveaux des transcrits sont normalisés par rapport à un gène référent, le 18S.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées via un test de Student en bilatéral pour déterminer la significativité des données. Elles sont jugées significativement différentes et représentées par des astérisques (*). P < 0,05 (*), P < 0.01 (**), P < 0,001 (***)

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
Dmd	5'- TGC GTGTTAGTGTAATGAACTTCT -3'	5'- GCCCCTCAATCTCTTCAAATTC -3'
18S	5'- TCGTCTTCGAAACTCCGACT -3'	5'- CGCGGTTCTATTTTGTGGT -3'
p85	5'- CAAAGCGGAGAACCTATTGC -3'	5'- ATAGCAGCCCTGCTTACTGC -3'
Redd1	5'- TAGTGCCACCTTTCAGTTG -3'	5'- GTCAGGGACTGGCTGTAACC -3'
Sesn1	5'- TATGGCCATGCACAAAGATG -3'	5'- TTCCAAACATGCAGTGGATA -3'
KLF15	5'- ACTGGTACGGCTTCACACCCGAG -3'	5'- CTCAAGGCCACCTGCGTCGG -3'
IGF-1ea	5'- AGCAGCCTTCCA ACTCAATTAT -3'	5'- GAAGACGACATGATGTGTATCTTTATC -3'
Murf1	5'- TGAGGTGCCTACTTGCTCCT -3'	5'- GTGGACTTTTCCAGCTGCTC -3'
Foxo1	5'- TGTCCATGGACGCAGCTCTT -3'	5'- TCAAGGATAAGGGCGACAGC -3'

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées pour le géotypage et la PCR semi-quantitative

III. IDENTIFICATION DES DETERMINANTS MOLECULAIRES DU DIALOGUE ENTRE HORMONES STEROÏDIENNES

III.1 INTRODUCTION

De plus en plus d'évidences suggèrent que les voies de signalisation des androgènes et des GC sont interconnectées. Les androgènes réduisent l'expression de GR dans de nombreuses lignées cellulaires (Arora et al., 2013; Davies and Rushmere, 1990; Isikbay et al., 2014; Xie et al., 2015) et AR pourrait exercer un effet dominant négatif sur la fonction de GR (Yen et al., 1997). De plus, les GC diminuent la synthèse des androgènes via un mécanisme inhibant l'axe hypothalamo-hypophysaire (Hardy et al., 2005; Ing et al., 2014; Welsh et al., 1982). De manière intéressante, plusieurs études ont montré que l'atrophie musculaire induite par les GC peut être compensée en partie par les androgènes (Qin et al., 2010; Van Balkom et al., 1998; Wu et al., 2010; Zhao et al., 2008b). Il a été proposé que la testostérone protège de l'atrophie musculaire en inhibant l'activité de FoxO1 et FoxO3a via l'activation de PGC-1 α (Qin et al., 2010; Zhao et al., 2008a). De plus, il a été montré que la testostérone inhibe l'expression du gène *Redd1*, diminue l'augmentation de l'expression de *4EBP1*, *FoxO1* et *p85* et empêche la diminution des niveaux d'*IRS-1* induite par la Dex (Wu et al., 2010).

Des résultats obtenus précédemment dans le laboratoire ont montré que les souris *AR^{skm-/y}* chez lesquelles AR est sélectivement invalidé dans les myofibres, sont protégées de l'atrophie musculaire induite par la dexaméthasone. L'expression d'*Atrogin-1* et des facteurs de transcriptions FoxO est augmentée chez les souris contrôles traitées à la dex, mais pas chez les souris *AR^{skm-/y}* (Thèse de Mélanie Schuh). Ces résultats indiquent qu'AR dans les myofibres est nécessaire à la diminution de la masse musculaire induite par les GC, suggérant qu'AR et GR coopèrent au cours de l'atrophie musculaire.

III.2 RESULTATS

Afin de compléter l'étude initiée dans le laboratoire et de mieux caractériser l'interaction de ces deux récepteurs spécifiquement dans la myofibre, des souris *GR^{(i)skm-/-}*, présentant une invalidation de GR dans les myofibres à l'âge adulte, ont été traitées pendant 3 jours avec 10 mg/kg de DHT à raison d'une injection par jour. Ce traitement induit l'expression de gènes cibles d'AR, tels que *AMD*, *ODC* et *Smox*, chez les souris contrôles. En revanche, aucune induction n'est observée chez les souris *GR^{(i)skm-/-}* (Figure 34). Ces résultats démontrent que l'induction de *AMD*, *ODC* et *Smox1*, suite à un traitement à la testostérone est abolie chez les souris *GR^{(i)skm-/-}*, indiquant une coopérativité d'AR et GR dans la régulation de certains gènes.

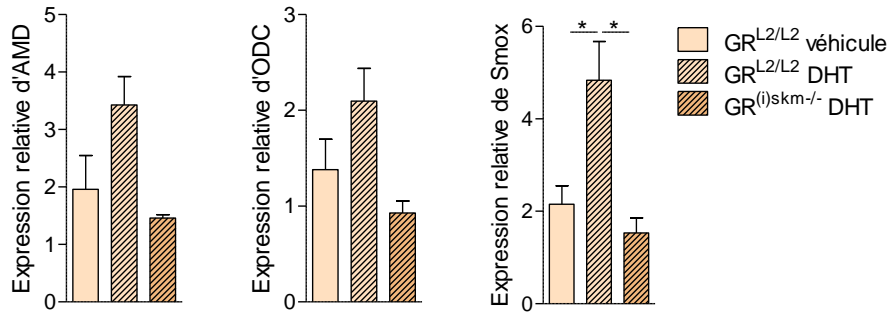


Figure 34: Effets d'un traitement à la DHT sur des souris GR^{(l)skm^{-/-}}.

Niveaux de transcrits AMD, ODC et Smox mesurés par RT-qPCR après 3 jours de traitement avec le véhicule ou à la DHT, à raison d'une administration de 10 mg/kg de DHT par jour, dans le muscle gastrocnémien de souris contrôles ou GR^{(l)skm^{-/-}}. Les niveaux de transcrits sont normalisés par rapport au gène de ménage 18S et représentent la moyenne +/- SEM, n=4 par groupes.

Afin de déterminer si AR et GR régulent conjointement l'activité transcriptionnelle de ces gènes, une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine dans le muscle quadriceps de souris contrôles traitées à la DHT a été réalisée. Nos résultats montrent qu'AR et GR sont liés à un ARE en réponse à un traitement aux androgènes, présent dans le promoteur de Smox, un gène cible d'AR (Figure 35A). De plus, un traitement à la DHT augmente la liaison d'AR et de GR sur le promoteur de Redd1, un gène cible de GR (Figure 35B).

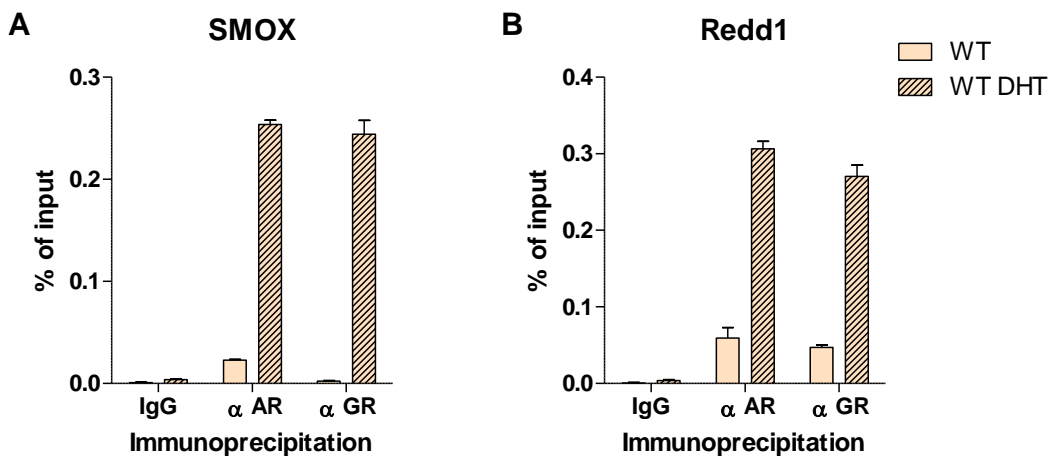


Figure 35: Effets des androgènes sur le recrutement d'AR et de GR sur des ARE et GRE dans les muscles squelettiques de souris.

PCR quantitative de régions génomiques correspondant à l'ARE de Smox (A) et le GRE de Redd1 (B) après une immunoprécipitation de la chromatine du quadriceps de souris contrôles (WT) traitées 4 h à la DHT avec des anticorps contrôles (IgG), un anti-AR (AR) ou anti-GR (GR).

Ainsi, ces résultats révèlent que les androgènes ne permettent pas uniquement la liaison d'AR sur les éléments de réponse présents dans les gènes cibles d'AR, mais également le recrutement de GR. Inversement, la liaison de GR sur des éléments de réponse à GR présents dans le promoteur de Redd1 est augmentée en présence de testostérone.

Une comparaison a été réalisée avec la plateforme bio-informatique, entre les résultats issus du séquençage de la chromatine immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre GR dans le muscle squelettique (cf. résultats I) et les résultats issus d'une immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps dirigé contre AR dans la prostate (Chen et al., 2013). Ces résultats indiquent que 650 sites sont liés sélectivement par AR et GR (Figure 36). Ainsi, GR et AR peuvent être recrutés sur des sites communs dans le génome et réguler l'expression de certains gènes.

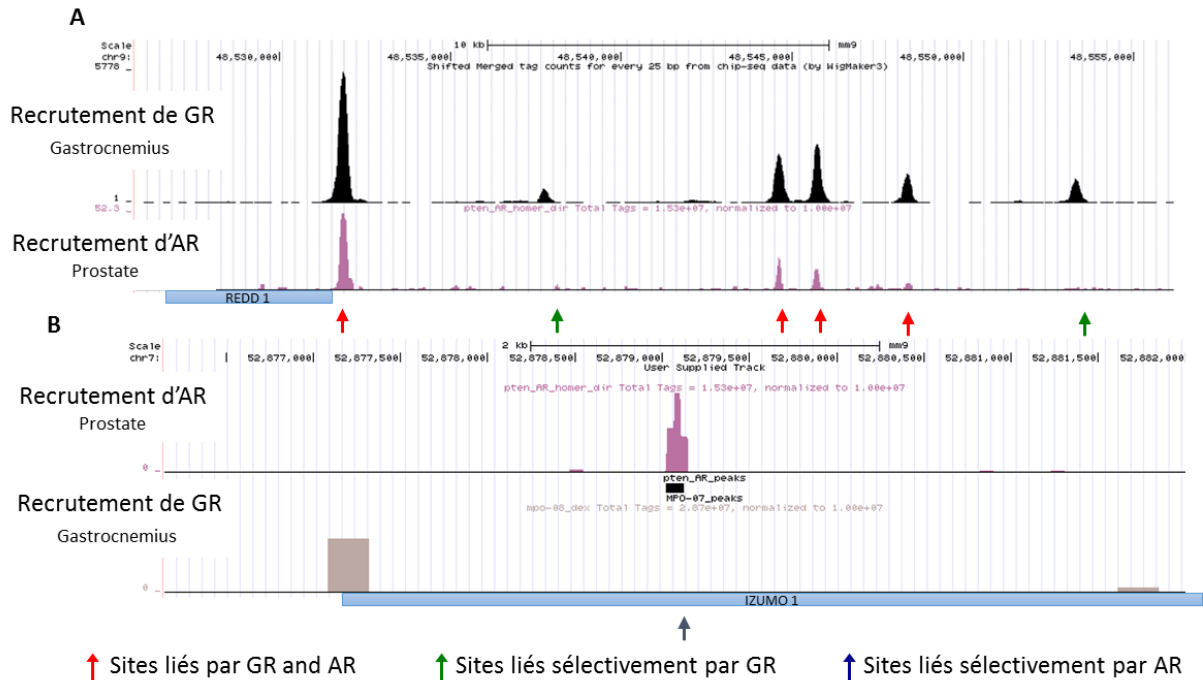


Figure 36: Profil de liaison de GR et AR dans des régions spécifiques du génome respectivement dans le muscle gastrocnémien et la prostate de souris.

(A) Exemple de colocalisation de sites de liaison de GR dans le muscle et d'AR dans la prostate en amont du gène cible des GC, Redd1 (Résultats visualisés grâce au site « UCSC genome Browser »). (B) Exemple d'un site de liaison spécifique d'AR dans la prostate identifié dans le gène Izumo1, par rapport aux sites de liaison de GR dans le muscle.

III.3 DISCUSSION

Ainsi, ces résultats indiquent qu'AR dans les myofibres est impliqué dans la fonte musculaire induite par la dex et que GR dans les myofibres est requis pour l'induction des gènes cibles d'AR en réponse à un traitement à la testostérone. Ceci suggère qu'AR et GR dans les myofibres sont tous deux requis pour médier l'effet des GC et des androgènes au niveau moléculaire sur certains gènes. De manière surprenante, la majorité des études suggèrent que les GC et les androgènes exercent des rôles opposés. Une étude récente menée par Mackrell *et al.*, a démontré que la transcription de GR est négativement régulé par l'action des androgènes dans les cellules satellites (MacKrell et al., 2015). Ces résultats suggèrent que l'effet bénéfique des androgènes dans le muscle squelettique peut être médié par les cellules satellites et que les mécanismes d'interaction entre ces deux récepteurs dans la fibre peuvent être différents.

Nos résultats indiquent également qu'AR et GR peuvent se fixer sur les mêmes sites de liaison. Une équipe suggère qu'AR et GR peuvent s'associer via leur DBD pour former un hétérodimère *in vitro* inhibant réciproquement l'activité de chaque récepteur au niveau transcriptionnel (Chen et al., 1997). Le modèle classique d'action de GR et AR propose que la fixation du ligand favorise la liaison du récepteur sur des GRE et ARE, respectivement, pour induire l'expression des gènes cibles. Ces éléments s'organisent en répétitions inversées de demi-sites hexamériques espacés de trois nucléotides au niveau de l'ADN, nommé IR3 (5'-AGAACAnnTGTCT-3') (Germain et al., 2006). D'après ce modèle, les DBD peuvent se lier en tant qu'homodimère à des éléments de liaison IR3 consensus. Des études structurales du DBD de GR et AR lié à des segment d'ADN consensus (c'est-à-dire idéalisé et non naturel), supportent l'idée que ces récepteurs s'associent à ce type d'éléments de réponse sous forme d'homodimères (Baumann et al., 1993; Hard et al., 1990; Luisi et al., 1991; Meijnsing et al., 2009; Shaffer et al., 2004; van Tilborg et al., 1995; Verrijdt et al., 2003; Watson et al., 2013). Comme les autres facteurs de transcription, AR et GR modulent l'expression des gènes en recrutant des protéines co-régulatrices et la liaison du ligand à ces récepteurs nucléaires induit des changements conformationnels qui impactent le recrutement des co-régulateurs (Dasgupta et al., 2014; Malovannaya et al., 2011; McKenna et al., 2009). GR réprime l'expression de certains gènes cibles en se liant à des nGRE (Surjit et al., 2011), et il semble qu'AR inhibe l'expression de certains gènes en se liant à des nARE mal caractérisés (Gast et al., 1998; Qi et al., 2012). De plus, une analyse génomique a récemment montré que les séquences de liaison de AR et GR sont des séquences répétées inversées imparfaites, avec des séquences du premier demi site plus conservé que l'espacement et le second demi-site (Hudson et al., 2013). GR et AR partagent 25 à 45% de leur cistrome en fonction du type cellulaire, et la transcription de 50% des gènes liés par AR et GR sont régulés par les deux récepteurs (Arora et al., 2013; Sahu et al., 2013). Il faut également noter que les propriétés de dimérisation sont bien établies au niveau du LBD pour certains NR. C'est le cas pour le récepteur de la vitamine D (VDR) et le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), qui se lient à leur partenaire commun, le récepteur X des rétinoïdes (RXR) pour former des hétérodimères, ainsi que pour certains récepteurs stéroïdiens, tels que le récepteur des œstrogènes (ER) qui forment des homodimères. De tel hétéro- et homodimères comprennent une interface conservée entre les deux fragments des LBD, constituant le cœur de l'interface entre ces LBD. Cependant, pour AR et GR, le comportement de dimérisation n'est pas encore bien caractérisé. Des données de séquences et de structures indiquent que les LBD de AR et de GR n'ont pas l'interface de dimérisation canonique des récepteurs homodimériques classique (Billas and Moras, 2013). Ainsi les observations contradictoires du DBD et du LBD suggèrent fortement qu'AR et GR contrôlent la transcription de gènes via des modes d'actions alternatifs, possiblement via un hétérodimère AR/GR. Ces résultats soulignent l'importance d'élucider l'architecture complète de ces récepteurs pour une meilleure compréhension fonctionnelle. De plus, les cistromes d'AR dans les muscles squelettiques pourront être identifiés par des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine en utilisant des anticorps dirigés contre ce récepteur et comparés aux résultats obtenus dans la partie résultat I. Afin de déterminer la manière dont AR et GR se lient sur les sites mixtes AR/GR, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine dans des régions identifiées comme permettant à la fois la liaison d'AR et de GR seront effectuées. La chromatine immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps dirigé contre AR sera de nouveau immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre GR et *vice versa*. Cela permettra d'identifier les régions génomiques liées soit par AR, soit par GR dans les myofibrilles, soit par les deux AR et GR et de déterminer s'ils se fixent de manière compétitive ou sous forme d'hétérodimère. De plus, nous pourrions identifier des facteurs transcriptionnels additionnels qui contribuent à la liaison de l'un ou l'autre des récepteurs.

En conclusion, tous ces résultats indiquent que les récepteurs des androgènes et des GC interagissent et interviennent simultanément dans la régulation de certains gènes. Cependant les mécanismes moléculaires mis en jeu nécessitent d'être clarifiés.

III.4 MATERIEL ET METHODES

Culture cellulaire et traitement à la Dexaméthasone et à la dihydrotestostérone

Les cellules C2C12 (ATCC® CRL-1772™) sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) contenant 20% (vol/vol) de sérum de foetus de veau (FCS), incubées à 37°C avec 5 % CO₂. Elles sont réensemencées tous les 3 jours à une confluence de 80%, après dilution au 1/20. La différenciation des myoblastes C2C12 en myotubes se fait dans du milieu DMEM contenant 2 % (vol/vol) de sérum de cheval, apportant moins de facteurs mitogènes, durant 7 jours. Les cellules sont traitées avec 1 µM de dex (D1756, Sigma Aldrich), avec 1µM de DHT (A8380, Sigma Aldrich) ou un volume équivalent d'éthanol comme contrôle négatif (véhicule).

Elevage des souris et génotypage des souris

Les conditions d'élevages et de génotypage sont similaires à celles présentées dans la partie résultats 2. Les oligonucléotides utilisés pour le génotypage sont listés dans le tableau 2.

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

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

Traitement des souris à la testostérone et à la Dexaméthasone

La dex (D1756, Sigma Aldrich) et la DHT (A8380, Sigma Aldrich) sont resuspendues à 10 mg/ml dans de l'éthanol absolu. Les souris sont injectées par voie intra-péritonéale avec 10 mg/kg de dex ou de DHT dans 100 µL d'huile végétale. Les souris sont injectées puis sacrifiées 4 h après, soit injectées une fois par jour pendant 3 jours, puis sacrifiées 24 h après la dernière injection. Les souris contrôles sont injectées avec de l'huile (véhicule) contenant la même concentration d'éthanol.

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

Les conditions d'extraction, de synthèse d'ADNc et de RT-PCR quantitative sont similaires à celles présentées dans la partie résultats II. Les oligonucléotides utilisés pour les RT-PCR sont listés dans le [Tableau 5](#).

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
18S	5'-TCGTCTTCGAAACTCCGACT-3'	5'-CGCGGTTCTATTTGTTGGT-3'
ODC1	5'-CATCCAAAGGCAAAGTTGGA-3'	5'-CATGGAAGCTCACACCAATG-3'
AMD	5'-TCATGAAGCCTTCTCACCAAGGGT-3'	5'-TCGGCTCTCTGGGAAATCCAAAGT-3'
SMOX	5'-TCTGCACAGAGATGCTTCGACAGT-3'	5'-TTGAGCCCACCTGTGTGTAGGAAT-3'
Redd1 GRE	5'-AGAGGGACAAGGATTTGGCG-3'	5'-CATCTTGTCGGGGAGTGACC-3'
Smox ARE	5'-CCAGAGCAAGAAGGCAAGTG-3'	5'-TGCACAGGAGAAACAGAACG-3'
GR	5'-GACTGACAAAATCAGTGACCCTGGG-3'	5'-GTCAACACATGATCACCTTGCAGTC-3'
AR	5'-CTGCCTCCGAAGTGTGGTAT-3'	5'-GCCAGAAGCTTCATCTCCAC-3'
Cre	5'-TTCCCGCAGAACCTGAAGATGTTCCG-3'	5'-GGGTGTTATAAGCAATCCCCAGAAATGC-3'
Myogénine	5'-CCTTAAAGCAGAGAGCATCC-3'	5'-GGAATTCGAGGCATATTATGA-3'

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour le génotypage et la PCR semi-quantitative

Immunoprécipitation de la chromatine

L'immunoprécipitation de la chromatine est réalisée suivant le protocole de Shimitzu (Shimizu et al., 2011). Les muscles sont broyés dans du tampon cytosolique contenant 1% de formaldéhyde pendant 10 min, puis ils sont incubés dans 125 mM de glycine et resuspendus dans du tampon de lyse nucléaire. Les échantillons sont soniqués avec le Bioruptor (Diagenode). La chromatine est immunoprécipitée avec des anticorps anti-GR (IGBMC, 1µg), anti-AR (IGBMC, 1µg), ou IgG (3900S, Cell signaling, 1µg). Les protéines sépharose A et G sont ajoutées pendant 1 heure. Les billes sont lavées et les fragments d'ADN sont élués et purifiés. Les PCR quantitatives sont effectuées par PCR en présence de 10 µM d'oligonucléotides spécifiques aux régions d'intérêt (tableau 1). Les résultats sont normalisés par rapport au pourcentage du contrôle négatif.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées via un test de Student en bilatéral pour déterminer la significativité des données. Elles sont jugées significativement différentes et représentées par des astérisques (*). P < 0,05 (*), P < 0.01 (**), P < 0,001 (***)

IV. LES FACTEURS RELIÉS AUX GONADES INDUISENT UN GAIN DE PERFORMANCE MUSCULAIRE PENDANT LA CROISSANCE POST-NATALE CHEZ LES SOURIS

Afin de déterminer le rôle des facteurs reliés aux gonades mâles et femelles sur la performance musculaire pendant la croissance, nous avons analysé l'effet de la castration effectuée avant la puberté chez les souris mâles et femelles. Nous avons montré que la castration empêche en partie l'augmentation de la performance, ainsi que l'augmentation de la masse musculaire chez le mâle, suggérant un rôle important des facteurs liés aux gonades dans ces mécanismes. Cependant d'autres facteurs y participent, puisque le phénomène est transitoire. De plus, nos résultats ont montré que les voies BMP, FoxO ou IGF ne semblent pas affectées par la castration suggérant que ces voies n'interviennent pas dans la régulation des performances musculaires durant la puberté. Enfin, nous avons montré que la castration réduit le dimorphisme sexuel entre les mâles et les femelles.

MANUSCRIPT IN REVISION

GONAD-RELATED FACTORS PROMOTE MUSCLE PERFORMANCE GAIN DURING POSTNATAL DEVELOPMENT IN MICE OF BOTH SEXES.

Ueberschlag-Pitiot Vanessa¹, Stantzou Amalia², Messéant Julien², Megane Lemaitre², Daniel J. Owens², Thomasson Remi^{3,4}, Noirez Philippe^{3,4}, Pauline Roy², Onnik Agbulut⁵, Furling Denis², Metzger Daniel¹, Ferry Arnaud^{2,4}

1- Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, CNRS UMR7104/INSERM U964, Illkirch, France

2- Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie-Paris6, Myology Research Center, UM76 and INSERM U974 and CNRS FRE 3617 and Institut de Myologie, Paris, France

3- Institut de Recherche biomédicale et d'épidémiologie du Sport, EA 7329, Institut National du Sport de l'Expertise et de la Performance, Laboratory of Excellence GR-Ex, Paris, France

4- Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Paris, France.

5- Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie-Paris6, Institut de Biologie Paris-Seine, UMR CNRS 8256, Biological Adaptation and Ageing, Paris, France

Correspondance :

A. Ferry

G.H. Pitié-Salpêtrière, 47, bld de l'Hôpital, Bâtiment Babinski

INSERM U974

75651 Paris cedex 13,

France.

arnaud.ferry@upmc.fr

ABSTRACT

In order to better define the role of male and female gonad-related factors (MGRF and FGRF respectively) on mouse hindlimb muscle performance/function gain during postnatal development, we analysed the effect of castration initiated before puberty in male and female mice. We found that absolute maximal force was decreased in 6-month old male and female castrated mice, as compared to age- and sex-matched intact mice ($p < 0.05$), without alteration in neuromuscular transmission. Moreover, castration decreased absolute maximal power, another important aspect of muscle performance, in 6-month old males ($p < 0.05$), but not in females. Absolute maximal muscle force was similarly reduced by castration in 3-month old fibre-deficient androgen receptor (AR) and wild-type male mice, indicating that the effect of MGRF was muscle fibre AR independent. It should be noted that castration only marginally reduced the muscle weight gain in 6-month females. We also found that BMP signaling through Smad1/5/8 and the ubiquitin proteasome system were not markedly altered by castration in muscle of 3-month old mice of both sexes. Moreover, castration decreased the sexual dimorphism regarding muscle performance. Together these results demonstrated that in the long-term MGRF and FGRF promote muscle performance gain in mice during postnatal development, largely independently of muscle hypertrophy. MGRF and FGRF also contribute to sexual dimorphism. However, the mechanisms underlying MGRF and FGRF actions remain to be determined.

KEYWORDS

Skeletal muscle; postnatal development; androgen deficiency; estrogen deficiency; maximal force; maximal power, muscle fibre androgen receptor.

IV.1 INTRODUCTION

The postnatal growth of skeletal muscle is due to muscle fibre hypertrophy (White et al., 2010) resulting from a high protein synthesis rate (Fiorotto et al., 2014). After 4 weeks of age, the increase in fibre diameter in mice occurs without addition of myonuclei provided by satellite cells (White et al., 2010). Male gonad-related factors (MGRF), in particular androgens, are thought to play an important role in the postnatal development and maintenance of skeletal muscle mass, and sexual dimorphism of skeletal muscle. It is thought that the actions of androgens are mainly exerted through binding to the androgen receptor (AR), which directly modulates the transcription of target genes. In skeletal muscle, AR has been reported in satellite cells, muscle fibres and other cell lineages. In humans, circulating androgens decrease in males during ageing and that this is a factor contributing to the loss of muscle mass that accompanies ageing. Several animal studies reported that androgen deficiency resulting from castration of adult male animals causes variable levels of muscle atrophy (Axell et al., 2006; Chambon et al., 2010; De Naeyer et al., 2014; Hourde et al., 2009; Ibebunjo et al., 2011; Jiao et al., 2009; Serra et al., 2011), indicating that MGRF play a role in the maintenance of muscle size. Less is known about the role of endogenous androgens, whose blood levels increase at puberty, on muscle performance (function) gain during the postnatal stage. Since muscle size is an important determinant of muscle performance, i.e. absolute maximal force and power, it is hypothesized that endogenous androgens contribute to the increase in muscle performance after puberty, but the target cells are unknown.

Several recent studies concluded that female gonad-related factors (FGRF), in particular estrogens, positively regulate absolute maximal force in adult female mice (Bunratsami et al., 2015; Greising et al., 2011a; Lai et al., 2016; Lowe et al., 2010; Moran et al., 2007). Three estrogen receptors, ER α , ER β , and the G-protein coupled receptor (Gper), has been identified in skeletal muscles. Moreover, it was reported that some beneficial effects of estrogens on muscle contractility can be very rapid (within 30 min), suggesting a non-genomic mechanism in adult female mice (Lai et al., 2016). However, the roles of FGRF on postnatal muscle performance gain during the postnatal stage are not well established in female mice. Indeed, it has been reported that during female rat postnatal development, estrogens decrease absolute maximal force (Suzuki and Yamamuro, 1985) or have no (McCormick et al., 2004). Moreover, despite recent developments, there is a tremendous lack of understanding of sex-based differences in muscle performance. Overall, evidence to date suggests that muscle performance is sex-dependent (Ferry et al., 2015a; Glenmark et al., 2004; Haizlip et al., 2015; Hourde et al., 2013a; Hourd  et al., 2013; Hunter, 2009; Schirwis et al., 2013). Indeed, several studies reported that absolute maximal force and power are greater in adult male mice as compared to adult female mice (Ferry et al., 2015a; Hourd  et al., 2013; Schirwis et al., 2013), whilst others have not found such differences (Glenmark et al., 2004; Hakim and Duan, 2012). It is postulated that FGRF and MGRF contribute to the sexual dimorphism regarding muscle performance, however this remains to be firmly established.

In order to further characterize the role of MGRF and FGRF on postnatal development of muscle performance (absolute maximal force and absolute maximal power), we analyzed in adult male and female mice the effects of castration initiated before puberty. Our general hypothesis was that MGRF and FGRF play important roles in performance gain in male and female mice respectively, between the age of 4 weeks and 6 months. We also tested the hypothesis that castration before puberty decreases sexual dimorphism regarding muscle performance in the adult stage. Moreover, we analyzed the effect of castration before puberty in the absence of muscle fibre AR in order to determine whether AR mediates the potential role of MGRF in this cell type. To address this objective, we used male mice with loss of muscle fibre AR (AR^{skm-/y} mice) that were castrated before puberty or not. If it is the case, the effect of castration before puberty should be reduced in the absence of muscle fibre AR as compared with the presence of AR. Finally, we analysed the effect of castration on several functional, cellular and molecular determinants of muscle performance that include neuromuscular transmission, fibre atrophy, fibre type composition, and signaling pathways involved in muscle growth.

IV.2 RESULTS

1-Effect of castration on muscle performance in male mice.

We measured the absolute maximal force of the TA muscle in response to nerve stimulation, an important aspect of muscle performance. Castration performed at 4 weeks of age reduced the gain in absolute maximal force between 4 weeks and 6 months. Indeed, absolute maximal force was decreased in 3- and 6-month old male castrated mice (-18% and -17% respectively), as compared to age-matched intact male mice ($p < 0.05$) (Figure 1A). The absolute maximal force was related to the specific maximal force and the muscle weight (see below). We found that the increase in specific maximal force between 4 weeks and 6 months was reduced by castration. Specifically, reduction in specific maximal force was observed specific maximal force was reduced in castrated male mice at 6 months of age, as compared to age-matched intact male mice (Figure 1B) ($p < 0.05$).

Absolute maximal power, another important aspect of muscle performance, was also measured. The gain in absolute maximal power between 4 weeks and 3 or 6 months observed in intact male mice was reduced by castration. Absolute maximal power was decreased by 30% and 18% in 3- and 6-month old castrated male mice, respectively ($p < 0.05$), as compared to age-matched male intact mice (Figure 1C). Absolute maximal power was related to specific maximal power and muscle weight (see below). We found that specific maximal power was reduced in 3- and 6 month old castrated male mice, as compared to age-matched male intact mice (Figure 1D) ($p < 0.05$).

We also measured muscle weight, because absolute maximal force and power are proportional to muscle size (muscle cross-section area and volume/weight). The gain in muscle weight observed between 4 weeks and 3 months in intact male mice was reduced by castration in male mice. Muscle weight was decreased by -16% in male castrated mice at 3 months of age ($p < 0.05$), as compared to age-matched male intact mice (Figure 1E). However, at 6 months of age, muscle weight was similar in castrated and age-matched intact male mice (Figure 1E).

Together, our results indicate that castration before puberty decreased the gains in absolute maximal force and power between 4 weeks and 6 months in male mice. This was due to reduced gain in specific maximal force and power and a delayed muscle growth (increase in muscle weight) in male mice.

2-Effect of castration on muscle performance in female mice.

Castration reduced the gain in absolute maximal force between 4 weeks and 3 or 6 months in female mice such that values were decreased in 3- and 6 month old female castrated mice by -17% and -11% respectively, as compared to age-matched female intact mice ($p < 0.05$) (Figure 1F). Moreover, the gain in specific maximal force between 4 weeks and 6 months was reduced by castration since specific maximal force was lower in castrated female mice, at 3 and 6 months of age, as compared to age-matched intact female mice (Figure 1G) ($p < 0.05$).

Castration did not affect the gain in absolute maximal power between 4 weeks and 3 or 6 months in female mice. Indeed, absolute maximal power was not different in 3- and 6-month old female between castrated and intact mice (Figure 1H). Similarly, castration did not affect specific maximal power since specific maximal power did not significantly increase in 3- and 6 month old castrated female mice, as compared to age-matched female intact mice ($p = 0.07$) (Figure 1I).

Castration reduced the gain in muscle weight between 4 weeks and 3 or 6 months in female mice. Indeed, female castrated mice demonstrated a reduction of 11 and 5% in muscle weight at 3 and 6 months of age, respectively, as compared to age-matched intact female mice (Figure 1J) ($p < 0.05$).

Taken together, our results indicate that castration before puberty decreases absolute maximal force in female mice, but not absolute maximal power. The reduced absolute maximal force results from the decrease of both specific maximal force and muscle weight.

3-Sexual dimorphism regarding muscle performance.

Sexual dimorphism was studied in both intact and castrated mice. We found a sexual dimorphism concerning absolute maximal force in intact mice. The absolute maximal force of female intact mice was reduced (-10%) as compared to male intact mice (compare Figure 1F to Figure 1A) ($p < 0.05$). In contrast, absolute maximal force of female and male castrated mice did not differ (compare Figure 1F to Figure 1A). Moreover, there was no sexual dimorphism regarding specific maximal force in intact and castrated mice. Indeed, specific maximal force of intact and castrated female mice were similar as compared to intact and castrated age-matched male mice (compare Figure 1G to Figure 1B).

Absolute maximal power also differed between sexes in intact mice. Absolute maximal power of intact female mice was decreased (-18%), as compared to intact age-matched male mice (compare Figure 1H to Figure 1C) ($p < 0.05$). In contrast, the absolute power of 3-month old female castrated mice was increased as compared to age-matched male castrated mice (compare Figure 1H to Figure 1C) ($p < 0.05$). We also found a sexual dimorphism concerning specific maximal power, since female intact mice had a lower specific maximal power, as compared to age-matched male intact mice (compare Figure 1I to Figure 1D). In contrast, the specific maximal power of female castrated mice was increased, as compared to age-matched male castrated mice (compare Figure 1I to Figure 1D) ($p < 0.05$).

Finally, there was a sexual dimorphism concerning muscle weight in intact mice. Muscle weight of 3- and 6- month old female intact mice was reduced (-6%), as compared to age-matched male intact mice (compare Figure 1J to Figure 1E) ($p < 0.05$). Similarly, the muscle weight of 6-month old castrated female castrated mice, but not 3-month old castrated female, was decreased as compared to age-matched male castrated mice (compare Figure 5E to Figure 1E) ($p < 0.05$).

Together, these results indicated that in intact mice there was a sexual dimorphism concerning both absolute maximal force and power. The reduced muscle performance in female mice was due to a decreased specific maximal force and power, and a lower muscle weight. Moreover, castration in both sexes reduced the sexual dimorphism regarding absolute maximal force and power.

4-Effect of castration on muscle performance in 3-month old male mice deficient in muscle fibre AR.

To determine if muscle fibre AR mediates MGRF-induced performance gain, male ARskm-/y mice, in which muscle fibre AR is selectively ablated, as well as male ARL2/y (control) littermates, were castrated at 4 weeks of age, and analysed at 3 months of age. In agreement with previous results (Chambon et al., 2010), absolute maximal force was lower in intact ARskm-/y mice than in ARL2/y mice (Figure 2A)($p < 0.05$). Moreover, absolute maximal force was similarly decreased in castrated male mice, as compared to genotype-matched intact male mice, in both genotypes (-29% for ARskm-/y mice and -28% for ARL2/y mice)(Figure 2A)($p < 0.05$). Specific maximal force was unchanged by castration in both genotypes (Figure 2B). Moreover, muscle weight was similarly reduced in castrated male mice (-33% for ARskm-/y mice and -29% for ARL2/y mice), as compared to genotype-matched intact male mice (Figure 2C)($p < 0.05$).

Together, our results indicated that muscle fibre AR deficiency did not alter the effect of castration on muscle performance.

5-Neuromuscular transmission and neuromuscular junction in 3-month old mice.

To determine whether neuromuscular transmission failure contributes to the reduced absolute maximal force in castrated mice, we also performed electrical stimulation of the TA muscle stimulation that can directly initiate muscle action potentials, without the need of neuromuscular transmission (Cairns et al., 2009; Mouisel et al., 2006). In this supplemental experiment, we found that absolute maximal force in response to nerve stimulation was decreased by castration in 3-month old mice of both sexes (Figures 3A and B)($p < 0.05$), confirming our previous results (Figures 1A and G). Interestingly, direct TA muscle stimulation with a high strength voltage did not improve absolute maximal force in 3-month old castrated mice of both sexes since there was no difference between nerve and muscle stimulations (Figures 3A and B). These results indicate that neuromuscular transmission failure did not account for the reduced performance in castrated mice of both sexes. In addition, we also found that the half-relaxation time ($p < 0.05$)(Figure 3C), but not the contraction time (Figure 3D), was increased in castrated male mice as compared to intact male mice, indicating that the twitch kinetic was slowed by castration in 3-month old castrated male mice. In contrast, the twitch kinetic was not different between castrated and intact female mice (Figures 3C and D).

To determine whether the effect of castration varies with the studied muscle, we also measured the plantaris muscle performance in 3-month old castrated male mice. Absolute maximal force and weight were decreased in 3-month-old male castrated mice, as compared to age-matched intact male mice ($p < 0.05$)(Figure 4A). In contrast, specific maximal force was unchanged by castration (Figure 4A). Together these results indicate that the effects of castration on muscle performance were similar in plantaris and TA muscles, at least in 3-month old male mice.

In addition to the analysis of neuromuscular transmission (Figure 4A), we checked that castration does not alter neuromuscular junction morphology. Plantaris muscle fibers isolated from 3-month-old castrated male mice were stained with BTX to detect AChR clusters and with a mixture of antibodies

against neurofilament (NF) and synaptophysin (Syn) to label axonal branches and nerves terminals, respectively. The structure of the synapse in castrated mice was indistinguishable from intact ones. Indeed, all endplates analyzed formed a continuous branched postnatal topology and exhibited a typical and « pretzel-like » morphology (Figures 4B and C). The fact that AChR-rich endplate area per NMJ was reduced by 30% in castrated mice ($p < 0.05$) (Figure 4D) could be explained by the decreased fiber size as shown below. Moreover, both in castrated and intact mice, axonal branches properly innervated the postsynaptic counterpart and nerve terminals were in perfect registry with AChR clusters. Quantitative analysis revealed that the synaptophysin area per NMJ (Figure 4E) as well as the overlap area between pre- and postsynaptic elements (Figure 4F) were unchanged in castrated mice compared to intact ones. Taken together, these observations demonstrate that castration does not disturb NMJ structure, in agreement with the observations that 3-month old castrated male mice exhibit normal neuromuscular transmission.

6-Systemic exercise performance in 3-month old mice.

Given that we detected muscle performance reductions in castrated mice, we hypothesized that the performance impairments could negatively effect in toto exercise performance. Peak oxygen consumption (VO_{2peak}) and maximal speed (S_{max}) were determined during an incremental running exercise test in 3-month old mice. We found that both VO_{2peak} (-7%) and S_{max} (-10%) were reduced by castration in both sexes ($p < 0.05$) (Table 2), indicating that reduced muscle performance had an impact on systemic exercise performance.

7. Muscle and fibre atrophy in 3-month old mice.

We then further analysed the reduced TA muscle weight in 3-month castrated mice of both sexes (Figure 5A), as previously shown (Figures 1E and J), and found that it was not related to significantly reduced bone growth. Indeed, the length of the tibia was not changed by castration in both 3-month old males (17.8 ± 0.3 mm in castrated versus 18.2 ± 0.3 mm in intact mice) and females (18.0 ± 0.1 mm in castrated versus 18.3 ± 0.2 mm in intact mice). In line with the reduced muscle weight, absolute lean mass (Figure 5B) was reduced in 3-month old castrated mice of both sexes ($p < 0.05$), as assessed by nuclear magnetic resonance. Moreover, the percentage of fat mass was increased by castration in both male and female mice (Figure 5C) ($p < 0.05$). Moreover, the reduced muscle weight in castrated mice was related to muscle fibre atrophy since immunohistological analyses revealed a left shift in the fibre diameter distribution in both castrated male and female mice (Figures 5D-G), especially for the fibres expressing MHC-2a (Figures 5D and F). In line with these results, there was an increase in fibrosis in 3-month old castrated mice of both sexes (14.2 ± 0.9 % in castrated versus 11.7 ± 2.0 % in intact mice) ($p < 0.05$) (Figure 5H). We also determined whether fibre atrophy was accompanied by a fibre type transition. We found that the percentage of fibres expressing MHC-2a was not modified by castration in both sexes (Figure 5I).

8-Atrophic signaling pathway in 3-month old mice.

Bone morphogenetic protein (BMP) signaling, an important emergent pathway controlling muscle size and performance (Sartori et al., 2013; Winbanks et al., 2013). Indeed, it has been suggested that BMP signaling participates in postnatal muscle development, since the phosphorylation of Smad1/5/8 is lower in 6-month old (adult) mice as compared to younger mice (Winbanks et al., 2013). BMP are proteins of the TGF-beta superfamily that bind to BMP receptor, such as activin-like kinase 3 (ALK3), that in turn phosphorylates Smad1/5/8 proteins, promoting with Smad4, the regulation of target

genes, in particular the inhibitor of DNA binding (Id1) and various processes regulating muscle size (Sartori and Sandri, 2015). We therefore investigated whether castration before puberty influences the BMP signalling axis in skeletal muscle. Castration in 3 month-old male mice altered neither the amount of phosphorylated Smad1/5/8 (Figures 6A and B), nor ALK3 transcript levels (Figure 6C). Smad4 transcript levels were decreased by castration (Figure 6D)($p < 0.05$), but those of the downstream factor Id1 were unaffected in castrated male mice (Figure 6E). Moreover, castration in 3-month-old female mice did not alter ALK3 (Figure 6C), Smad4 (Figure 6D), and Id1 (Figure 6E) transcript levels ($p < 0.05$). Together, these results suggested no major change in Smad1/5/8 signaling with 3-month castration in both male and female mice.

We then determined the effect of castration on the ubiquitin proteasome system that plays an important role in muscle physiology and atrophic process (Bodine and Baehr, 2014). Castration in 3-month old male mice decreased the levels of the protein phosphorylated (inactivated) form of Foxo3a (Figures 7A and B), without changing that of phosphorylated Foxo1 (Figures 7A and C), two transcription factors important for the regulation of E3 ubiquitin ligases. Moreover, we found that the transcript levels of Murf1 (Figure 7D) and FbxO30 (Figure 7E) were reduced in 3-month old castrated male mice, as compared to age-matched intact male mice ($p < 0.05$), whereas that of atrogen 1 was unchanged (Figure 7F). In contrast, castration did not affect the transcript levels of Murf1, FbxO30 and atrogen 1 in 3-month-old female mice (Figures 7D-F). Together, these results suggest that 3-month after castration E3 ubiquitin ligases (atrogin 1, Murf1, and FbxO30) might be less active in males and unchanged in females.

In addition, we measured the transcript levels of IGF-1 and MSTN (myostatin), encoding proteins regulating positively and negatively muscle growth respectively. In 3-month-old mice, castration increased the transcript level of MSTN in males, but did not affect it in females (Figures 7H and I). In contrast, the transcript level of IGF-1 was unchanged in castrated males and increased in castrated females (Figure 7H and I).

IV.3 DISCUSSION

MGRF promotes absolute maximal force and power gains during postnatal development in male mice.

Our results show that castration initiated before puberty decreased muscle performance in 6-month old male mice. Indeed, MGRF, between the age of 4 weeks and 6 months, contribute to 29% and 38% of absolute maximal force and power gains, respectively (Table 3). The reduced absolute maximal force and power in 6-month old castrated male mice was due to a lower specific maximal force and power, but not a decreased muscle weight (Table 3). Therefore, our results support the original and important notion that endogenous androgens promote postnatal performance gain in male mice via the improvement/maintenance in “muscle quality”, i.e. specific maximal force and power, but not enhanced muscle growth. Concerning muscle mass development, it is noteworthy that the increase in muscle weight is delayed by castration. Myostatin also improves muscle quality in regard to high force contraction during postnatal development, but together with an inhibition of muscle growth (Stantzou et al., 2016).

Our results indicate that increased fibrosis, but not neuromuscular transmission failure, could explain, in part, the reduced specific maximal force and power. Another explanation is that the reduced muscle quality force can be linked to alterations in sarcoplasmic reticulum function, since we observed an increased half-relaxation time (slower relaxation) (Fitts and Widrick, 1996). Even though acute androgen treatment does not affect calcium transient in response to stimulation (Frayssé et al., 2014), chronic suppression of androgen by castration may impair calcium handling by the sarcoplasmic reticulum. In agreement, castration alters both cardiac relaxation and calcium handling in adult male rats (Witayavanitkul et al., 2013). Our results did not however, relate to fibre type transition since we reported no notable increase in the percentage of less powerful fibre expressing MHC-2a (Fitts and Widrick, 1996) in castrated male mice. These data are in line with those of previous studies analyzing hypogonadal male mice (Sciote et al., 2001) and male mice with ablation of myocyte AR (Ophoff et al., 2009). Decreased phosphorylation of the myosin light chains could also contribute to the reduced specific maximal force, since it has been reported that acute androgen (dihydrotestosterone) administration increases both specific maximal force and phosphorylation of the myosin light chains (Hamdi and Mutungi, 2010).

It is important to note that the contribution of MGRF to performance gain is not predominant since 62 to 71% of the performance gains are due to other factors. Other endocrine factors affecting muscle quality during muscle development may be considered. Deficiency in thyroid hormones alters fibre transition that occurs during postnatal development (Agbulut et al., 2003; Haddad et al., 1997), and potentially affects specific maximal power since fast type fibres are more powerful than slow type fibres. In mice expressing dominant negative mutant IGF-1 receptors in skeletal muscle, there is a prevalence of fast type fibres (Vaitheesvaran et al., 2010), suggesting a possible effect of endocrine or local IGF-1 on specific maximal power. However, it is noteworthy that IGF-1 transcript levels were not modified in male castrated mice. Concerning growth hormone, its direct effect on muscle is unlikely since muscle growth hormone receptor deficiency does not affect fibre type composition in postnatal muscle (Vijayakumar et al., 2013) and it has been reported that growth hormone does not alter specific maximal force (Chikani and Ho, 2014).

Another major finding of the present study is that the effect of castration before puberty on absolute maximal force gain is not abolished in the absence of muscle fibre AR in 3-month old male mice. At this age, the reduced absolute maximal force in castrated male mice resulted from a lower muscle weight. These results suggested that the action of endogenous androgens on muscle performance gain and growth is not mediated by muscle fibre AR, at least in 3-month old male mice. These findings extend those of a previous study showing that 1 month-castration performed in the adult stage similarly decreased muscle weight in deficient or non-deficient muscle fibre AR male mice (Chambon et al., 2010). In accordance, it has been reported that the postnatal development of hindlimb muscle is independent from fibre AR signaling in mice (Chambon et al., 2010; Dubois et al., 2014; Ophoff et al., 2009). Many other cells express AR, in particular satellite cells. However, in the present study, the possibility that androgen effects were mediated via the AR of satellite cells is unlikely since satellite cells do not contribute to muscle growth after the age of 3 weeks. Indeed, there is no further myonuclei addition at this postnatal stage in mice (White et al., 2010). A possibility is that androgen effects on muscle can be mediated via AR localized in the brain. This hypothesis is supported by the facts that: (i) the level of voluntary exercise in male animals is negatively and positively modulated by castration and androgen administration, respectively (Ferreira et al., 2012; Ibebunjo et al., 2011) and (ii) reduced activity alters muscle performance and size (Hourde et al., 2013b). Another possibility is that other

endocrine factors mediate the effect of androgens. Indeed, testosterone can be converted to estrogens by aromatase. GH and IGF-1 are unlikely since it has been reported that the circulating GH and IGF-1 are not mandatory for mediating the effect of androgens, at least in highly androgen responsible muscle from adult male mice (Serra et al., 2011). Finally, recent studies reported that MSTN is an androgen target in skeletal muscle (Braga et al., 2013; Dubois et al., 2013; Mendler et al., 2007). In line, we found that MSTN transcript level was increased by castration in 3-month-old male mice. Future studies are needed to better dissect the mechanisms of action of androgens on muscle performance and growth, but our data provide initial insights that such mechanisms are not likely to be related to changes in BMP signaling through Smad1/5/8 phosphorylation and the ubiquitin proteasome system, at least in 3-month old male mice.

FGRF promotes absolute maximal force gain during postnatal development in female mice.

Another novel finding of our study, is that, in contrast to MGRF in male mice, FGRF did not contribute to maximal power gain between 4 weeks and 6 months in female mice (Table 3). However FGRF contributed to 20% of maximal force gain in 6-month old female mice (Table 3), similarly to MGFR in male mice, and its action was irrespective of any change in neurotransmission. These results differ, for yet unknown reasons, from those of previous studies showing that castration increased or had no effect on absolute maximal force in growing female rats (McCormick et al., 2004; Suzuki and Yamamuro, 1985). However, in line with our results, it has been shown that estrogens positively modulate absolute maximal force in adult female mice (Greising et al., 2011b; Moran et al., 2006, 2007). Indeed, castration reduces specific maximal force and maximal calcium activated force of permeabilized fibers in adult female mice, and this effect is explained by a lower fraction of myosin heads strongly bound to actin (Moran et al., 2006, 2007). Together with the reduced specific maximal force, a lower muscle weight explained the effect of castration on the absolute maximal force in female mice. Thus, in contrast to MGRF, we found that FGRF also contributes to the increase in muscle weight, even though its contribution is rather small (12%)(Table 3). Our results also imply that FGRF promotes the growth of muscle fibres. However, this fibre growth was not related to changes in BMP signaling through Smad1/5/8 phosphorylation and the ubiquitin proteasome system, at least in 3-month old female mice.

It remains to be confirmed whether the action of putative endogenous estrogens on absolute maximal force is mediated via estrogen receptor (ER) that exhibits different subtypes, ER α , ER β and Gper. It was reported that estrogen effects on muscle are mediated in part via muscle ER α in mice (Brown et al., 2009; Ogawa et al., 2015). In accordance, ER β deficiency does not lead to significant change in absolute maximal force (Glenmark et al., 2004). However, a recent study demonstrated that estrogens have a rapid effect on muscle contractility via both ER β and Gper (Lai et al., 2016), e.g., the potentiated force was increased. There is a possibility that estrogen effects can be mediated by brain ER since estrogens increase the level of voluntary exercise (Ferreira et al., 2012; Fonseca et al., 2012) which is known to modulate muscle performance and growth. In agreement, a recent study suggest that castration-induced muscle atrophy could result from the reduced level of motor activity in adult female mice (Fonseca et al., 2012). However, a study indicated that the benefits of estrogens is independent of physical activity, e.g. can be observed in inactive muscle (Greising et al., 2011b). In summary, we demonstrate that FGRF are important for maximal force gain and muscle mass development. However, the signaling axis through which these effects are mediated is still not well defined.

Sexual dimorphism is reduced by castration

We reported several differences between sexes concerning muscle performance at 6 months of age. The reduced absolute maximal force in 6-month female mice is explained by a lower muscle weight, in line with previous studies, without difference in specific maximal force (Schirwis et al., 2013). Our results suggest that the lower muscle weight is related to sex-based difference in IGF-1 gene expression but not BMP signaling, ubiquitin proteasome system and MSTN gene expression in 3-month old females. The lowered absolute maximal power in 6-month old female mice results from both reductions in specific maximal power and muscle weight, as previously shown (Schirwis et al., 2013). We report here that the reduced specific maximal power is not related to an increased percentage of less powerful fibres expressing MHC-2a. It is possible that the increased fibrosis in female mice contributes, at least in part, to the reduced specific maximal power.

A final novel finding of our study was that castration before puberty reduces the sexual dimorphism concerning both absolute maximal force and power in 6-month old mice, indicating that MGRF and FGRF contribute to the sex-based differences. Concerning the lower muscle weight in intact female mice, we found that castration did not fully eliminate this sex difference, suggesting that both endogenous sexual hormones and other additional factors can contribute to this aspect, such as MSTN (McMahon et al., 2003) or IGF-1. In line, we found a reduced IGF-1 mRNA level in female mice. In addition, it appears that neither BMP signaling nor ubiquitin proteasome system can explain this sex-based difference in muscle weight. Intriguingly, the lower specific maximal power in intact female mice is reversed by castration (increased specific maximal power in castrated females versus castrated males), suggesting that MGRF and FGRF have beneficial and detrimental action on specific maximal power, respectively. Our results indicate that these effects can not be attributed to a change in fibre type specification, a finding that adds to an equivocal body of evidence regarding the respective effects of androgens and estrogens on muscle fibre type specification is rather elusive (Axell et al., 2006; Haizlip et al., 2015; Noirez and Ferry, 2000; Piccone et al., 2005).

IV.4 CONCLUSION

In summary, our study indicates that MGRF promotes absolute maximal force and power gains between 4 weeks and 6 months in male mice, mainly via promoting muscle quality, and without affecting neuromuscular transmission. Moreover, in 3-month old male mice, the effects of MGRF are not mediated by muscle fibre AR. In female mice, FGRF promotes absolute maximal force gain between 4 weeks and 6 months but not absolute maximal power gain. Both MGRF and FGRF play a beneficial role in systemic exercise performance, likely due to the positive influence of these factors on muscle performance. Protracted efforts are needed to define the signaling cascades responsible for the effects of sex related hormones, however here we provide preliminary insights that demonstrate that the effects of MGRF and FGRF in 3-month old mice are not related to alterations in BMP signaling through Smad1/5/8 and ubiquitin proteasome system. We also show that MGRF and FGRF only marginally contribute to muscle performance gain between 4 weeks and 6 months of age in both sexes, indicating the existence of additional factors, endocrine or not. Finally, we found that MGRF and FGRF contribute to the sexual dimorphism regarding muscle performance in adult mice. Thus, we provide evidence demonstrating that both MGRF and FGRF are required for the normal development of muscle performance in mice.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Antoine Espagnol, Arthur Cetaire, Juliette Breuil and Saad Idrissi-Zougari (Université Pierre et Marie Curie) for assistance during the experiments. We also thank Stéphanie Bauché and Laure Stochlic (Université Pierre et Marie Curie) for synaptophysin antibody and technical advice.

FUNDING

Financial support has been provided by Université Pierre et Marie Curie (UPMC), CNRS, INSERM, ANR AndroGlucO, FRM (FDT20150532221) University Paris Descartes, Université de Strasbourg, IGBMC, the Association Française contre les Myopathies (AFM). and by French state through the Agence Nationale de la Recherche ANR-10-LABX-0030-INRT under the frame programme Investissements d’Avenir labelled ANR-10-IDEX-0002-02. V.U-P was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

IV.5 MATERIALS AND METHODS

Mice

All procedures were performed in accordance with national and European legislations. Male and female wild type mice (C57BL/6 background) were analyzed at the age of 4 weeks, 6 weeks, 3 months and 6 months. We also used muscle fibre AR deficient male mice (referred to below as ARskm-/y)(on a C57BL/6 background). ARskm-/y mice were generated by breeding female ARL2/L2 mice carrying “floxed” AR L2 alleles with male HSA-Cre transgenic mice, as described (Chambon et al., 2010). Sex matched wild-type littermates (ARL2/y mice) were used as controls. Male and female mice were castrated (orchidectomized) at 4 weeks of age, before the onset of puberty (Pinter et al., 2007).

Muscle performance

Absolute maximal force and power of tibialis anterior (TA) muscle was evaluated by measuring the in situ muscle contractions in response to nerve stimulation, as described previously (Frayssé et al., 2014; Schirwis et al., 2013). Some plantaris muscles were also measured (Ferry et al., 2014a). Mice were anesthetized using pentobarbital (60 mg/kg intraperitoneally). Body temperature was maintained at 37°C using radiant heat. The knee and foot were fixed with pins and clamps, and the distal tendon of the muscle was attached to a lever arm of a servomotor system (305B, Dual-Mode Lever, Aurora Scientific) using a silk ligature. The sciatic nerve was proximally crushed and distally stimulated by a bipolar silver electrode using supramaximal square wave pulses of 0.1 ms duration. Muscle was also directly stimulated after nerve stimulation at the frequency corresponding to maximal force in order to directly initiate muscle contraction in the case of neurotransmission failure (Ferry et al., 2014b). Stimulating electrodes were positioned on the midbelly of the muscle and the muscle was stimulated with a high strength voltage (80V). We measured the absolute maximal force that was generated during isometric contractions in response to electrical stimulation (frequency of 75–150 Hz, train of stimulation of 500 ms). Absolute maximal force was determined at L0 (length at which maximal tension

was obtained during the tetanus). Absolute maximal force was normalized to the muscle mass as an estimate of specific maximal force, i.e. force-generating capacity.

Force-velocity data were then obtained by eliciting contractions in response to sciatic nerve stimulation (500 ms, 125 Hz) at 6 different afterloads (over a range of approximately 10-50% absolute maximal force). The sciatic nerve was stimulated for 700 ms (125 Hz). A maximal isometric contraction of the muscle was initiated during the first 200 ms. Then, the muscle shortened during the last 300 ms against the load. Each contraction was separated by a 1 min rest period. The shortening velocity was measured during the first 20 ms of the shortening period. Absolute power was calculated (power = afterload x shortening velocity) and absolute maximal power was reported (mW). Specific maximal power (mW/g) was calculated by dividing maximal power by muscle weight. After contractile measurements, the animals were killed by cervical dislocation and muscles were dissected and weighted before being processed for downstream analyses.

Body composition and systemic exercise performance

Lean and fat masses of mice were measured by nuclear magnetic resonance (MinispecPlus LF90, Bruker, Stuttgart, Germany) for their. Exercise performance evaluation of each mouse proceeded on a one-way treadmill, equipped with a calorimetric system (TSE, Frankfurt, Germany). Mice were first acclimated to the treadmill with 3 sessions of running (0.01 m.s⁻¹ increment every 15s, 5 min) with 24 hours recovery between session. Then, mice performed an incremental treadmill speed test until exhaustion (0.01 m.s⁻¹ increment every 15s). Oxygen consumption (VO₂) was measured during running. VO₂peak was determined as the highest value of VO₂ achieved over 15s and expressed relatively to body weight. Maximal speed (S_{max}) was the highest speed until exhaustion. Exhaustion (endpoint for treadmill cessation) was defined as the point at which mice maintained continuous contact with the shock grid for 5 seconds

Neuromuscular junction morphology

Neuromuscular junction (NMJ) analysis was performed on isolated muscle fibres as previously described (Messéant et al., 2015a). Briefly, plantaris muscles were dissected and fixed in 4%PFA/PBS for 30 min and rinsed with PBS at room temperature. Isolated muscle fibres were washed three times for 15 min in PBS, incubated for 30 min with 100 mM glycine in PBS and rinsed in PBS. Samples were permeabilized and blocked in blocking buffer (3% BSA/5% goat serum/0.5% Triton X-100 in PBS) for 4 hours at room temperature. They were then incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibodies against 68 kDa neurofilament (NF, Millipore Bioscience Research Reagents, 1:1000) and synaptophysin (Syn, Zymed, 1:200) in blocking buffer. After four 1-hour washes in PBS, muscles were incubated overnight at 4°C with Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories, 1:500) and Alexa Fluor 488-conjugated α -bungarotoxin (α -BTX, Life Technologies, 1:1000) in blocking buffer. After four 1-hour washes in PBS, isolated muscle fibres were then flat-mounted in Vectashield (Vector Laboratories) mounting medium. Confocal images were acquired using Leica SPE confocal microscope with a Plan Apo 63x NA 1.4 oil objective (HCX; Leica). Confocal software (LAS AF; Leica) was used for acquisition of Z serial images, with a Plan Apo 63x NA 1.4 oil objective (HCX; Leica). Confocal images presented are single-projected image derived from image stacks. For all imaging, exposure settings were identical between compared samples and groups. Quantifications were done as previously (Messéant et al., 2015b), using ImageJ software (version 1.46m). AChR rich-endplate area per neuromuscular junction corresponds to the occupied area of α -BTX fluorescent signal. More than 20 fibres from at least five different mice of each group were analysed.

Fibre size and type

Transverse serial sections (8 µm) of TA muscles were obtained using a cryostat, in the mid-belly region. Some of sections were processed for histological analysis according to standard protocols (stained for Sirius red). Others were used for immunohistochemistry as described (Ferry et al., 2015b; Joanne et al., 2012). For determination of muscle fibre diameter and MHC analysis, frozen unfixed sections were blocked 1h in PBS plus 2% BSA, 2% sheep serum. Sections were then incubated overnight with primary antibodies against laminin (rabbit polyclonal, 1:300, Dako, Les Ulis, France) and myosin heavy chain (MHC) isoforms (Developmental Studies Hybridoma bank, University of Iowa, USA). After washes in PBS, sections were incubated 1 h with secondary antibodies (alexa fluor, Life Technologies, Saint Aubin, France). For morphometric analyses images were captured using a motorized confocal laser-scanning microscope (LSM 700, Carl Zeiss SAS, Le Pecq, France). Morphometric analyses were made using ImageJ software and a homemade macro. The smallest diameter (min Ferret) of all the muscle fibres of the whole muscle section was measured. For muscle fibre diameter and fibre typing analyses all of the muscle fibres of the muscle section were measured. The extent of fibrosis was assessed by Sirius red staining.

Signaling pathways: protein

TA muscle was lysed in RIPA buffer [50 mM Tris pH 7.5, 1 % Nonident P40, 0.5 % Sodium Deoxycholate, 0.1 % SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (45 µg/mL, 11 873 580 001, Roche)] with a potter at 4°C. Homogenates (100 µg of protein) were electrophoresed on 10 % polyacrylamid gels. Proteins were electroblotted to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) and immunodetected using primary antibodies directed against Phospho-Smad1 (Ser463/465)/ Smad5 (Ser463/465)/ Smad8 (Ser465/467) (#13820, Cell signaling, 1/1000), FoxO1 (#2880, cell signaling, 1/1000) Smad1/Smad 9 (#ab108965, abcam, 1/1000), phospho-FoxO1 (Ser256) (#9461, cell signaling, 1/1000), FoxO3a (#12829, cell signaling, 1/1000), phospho-FoxO3a (Ser318/321) (#9465, cell signaling, 1/1000) and tubuline (IGBMC). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Amersham Biosciences) were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce, Rockford, IL, 1/10000).

Signaling pathways: mRNA

Total RNA from the TA muscle was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen). A total of 2 µg of RNA was reverse transcribed to cDNA with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) and random hexamer primers according to the supplier's protocol. Quantitative RT-PCR was performed by using the SYBR Green 1 marker PCR kit (Roche) according to the supplier's protocol (Ferry et al., 2014a). The 18S ribosomal RNA was used as an internal control. Primers were shown in Table 1.

Statistical analysis

Groups were generally compared using 2 way-variance analysis (castration x age, sex x age, castration x genotype). If necessary, Bonferroni post-tests were also performed. For groups that did not pass tests of normality and equal variance, non-parametric tests were used (Kruskal Wallis and Wilcoxon). Values are means ± SEM. Significance was set at $p < 0.05$.

IV.6 FIGURE LEGENDS

Figure 1. Muscle performance in castrated male and female mice (TA muscle).

A: Absolute maximal force in male mice. B: Specific maximal force in male mice. C: Absolute maximal power in male mice. D: Specific maximal power in male mice. E: Muscle weight in male mice. F: Absolute maximal force in female mice. G: Specific maximal force in female mice. H: Absolute maximal power in female mice. I: Specific maximal power in female mice. J: Muscle weight in female mice. P0: absolute maximal force ; sP0 specific maximal force ; Pmax absolute maximal power ; sPmax : specific maximal power. c: Castrated mice different from corresponding intact mice ($p < 0.05$). s: Female mice different from corresponding male mice ($p < 0.05$). n=8-16/group

Figure 2. Muscle performance in 3-month old castrated male mice with deficiency in muscle fibre AR (TA muscle).

A: Absolute maximal force. B: Specific maximal force. C: Muscle weight. AR^{L2/y}: Wild-type mice. AR^{skm/y}: Mice with muscle fibre AR deficiency. P0: absolute maximal force ; sP0 specific maximal force. c: Castrated mice different from corresponding intact mice ($p < 0.05$). n=6-8/group.

Figure 3. Muscle performance in response to muscle versus nerve stimulation and kinetic of the twitch in 3 month-old castrated male and female mice (TA muscle).

A: Absolute maximal force in response to nerve or muscle stimulation in male mice. B: Absolute maximal force in response to nerve or muscle stimulation in female mice. C: Half relaxation time of the twitch (in response to nerve stimulation). D: Contraction time of the twitch (in response to nerve stimulation). c: Castrated mice different from corresponding intact mice ($p < 0.05$). s: Female mice different from corresponding male mice ($p < 0.05$). n=9-14/group.

Figure 4. Plantaris muscle performance and neuromuscular junction morphology in 3-month old male castrated mice.

A: Absolute and specific maximal forces and weight of plantaris muscle. B: Representative images of neuromuscular junction in castrated mice. Scale bar = 20 μ m. C: Representative images of neuromuscular junction in intact mice. D: AChR-rich endplate area. E: pre/post overlap. F: Synaptophysin area. c: Castrated mice different from corresponding intact mice ($p < 0.05$). n=10/14 per group for A; n=20 per group for DG.

Figure 5: Muscle and fibre atrophy and fibre type composition in 3-month old male and female castrated mice (TA muscle).

A: Muscle weight. B: Lean mass, as assessed with MNR. C: Fat mass. D: Distribution of diameter (min ferret) of fibres expressing MHC-2a in castrated male mice, using histological analysis. E: Distribution of diameter (min ferret) of fibres expressing not MHC-2a in castrated male mice. F: Distribution of diameter (min ferret) of fibre expressing MHC-2a in castrated female mice. G: Distribution of diameter (min ferret) of fibre expressing not MHC-2a in castrated female mice. H: Fibrosis using histological red Sirius staining. I: Percentage of fibres expressing MHC-2a, using immunohistological staining. c: Castrated mice different from corresponding intact mice ($p < 0.05$). s: Female mice different from corresponding male mice ($p < 0.05$). n=10/14 per group for A; n=5-8 per group for BC; n=3-4 for D-I.

Figure 6. Markers of the BMP signaling through Smad1/5/8 in 3-month old castrated male and female mice (TA muscle).

A: Representative images of blots. B: Protein levels of phosphorylated Smad1/5/8. C: mRNA levels of ALK3. D: mRNA levels of SMAD4. E: mRNA levels of ID1. s: Female mice different from corresponding male mice ($p < 0.05$). n=4-5/group for protein expression. n=3-4/group for mRNA expression.

Figure 7. Markers of the ubiquitin proteasome system and IGF-1 and MSTN transcript levels in TA muscle of 3 month-old castrated male and female mice.

A: Representative Western blots. B: Protein levels of phosphorylated Foxo3a. C: Protein level of phosphorylated Foxo1. D: mRNA levels of Foxo1. E: mRNA levels of Murf1. F: mRNA levels of FbxO30. G: mRNA levels of atrogin 1. H: mRNA levels of MSTN. I: mRNA levels of IGF-1. IGF-1: insulin growth factor 1 ; MSTN : myostatin. c: Castrated mice different from corresponding intact mice ($p < 0.05$). s : Female mice different from corresponding male mice ($p < 0.05$). n=4-5/group for protein expression. n=3-4/group for mRNA expression.

Table 1. Primers used.

Name	Sequence
18S	5'-TCGTCTTCGAAACTCCGACT-3' 5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'
ID1	5'-CTCGGAGTCTGAAGTCGGGA-3' 5'-GAACACATGCCGCCTCGG-3'
ALK3	5'-CTCTGAGAATTCTGAAGAAAGCAGC-3' 5'-TCCTGCTGTCTCACTGGTGT-3'
Smad4	5'-GAATAGCTCCAGCCATCAGTCT-3' 5'-GAATGCACAATCGCCGGAGG-3'
FoxO1	5'-TGTCCATGGACGCAGCTCTT-3' 5'-TCAAGGATAAGGGCGACAGC-3'
IGF	5'-AGCAGCCTTCCAACCTCAATTAT-3' 5'-GAAGACGACATGATGTGTATCTTTATC-3'
MuRF	5'-TGAGGTGCCTACTTGCTCCT-3' 5'-GTGGACTTTTCCAGCTGCTC-3'
MSTN	5'-GCTACCACGGAAACAATCAT-3' 5'-CAATACTCTGCCAAATACCA-3'
Atrogin	5'-TCACAGCTCACATCCCTGAG-3' 5'-TCAGCCTCTGCATGATGTTTC-3'
FbxO30s	5'-AGGGACGTTTGTGGCAGTTT-3' 5'-ACTGAATCGCCATACCTTCTC-3'

Table 2. Systemic exercise performance.

	Castrated	Intact
VO2peak (ml/g/h)		
Male	6.4±0.1c	7.1±0.2
Female	6.9±0.2c	7.2±0.2
Smax (m/s)		
Male	0.49±0.01c	0.56±0.01
Female	0.53±0.01c	0.57±0.02

VO2peak: maximal oxygen uptake during incremental exercise. Smax: maximal speed during incremental exercise. c: significantly different from intact ($p < 0.05$). n=5-7/group

Table 3. Contribution of male (MGRF) and female (FGRF) gonad-related factors to TA muscle performance gains and growth (weight) between 4 weeks and 6 months of age.

	Sex	Age	PO	Pmax	Weight
Contribution of MGRF	Male	3 m	26%	58%	31%
	Male	6 m	29%	38%	0%
Contribution of FGRF	Female	3 m	32%	0%	23%
	Female	6 m	20%	0%	12%

The contribution of MGRF and FGRF to muscle performance gain was calculated as follow. For example, muscle PO gain in castrated and intact 6-month old male mice was 142.2% and 101.3% respectively. Therefore, the contribution of MGF (%) to muscle PO gain in 6-month old male mice was $=100 - (101.3/142.2) * 100 = 28.8\%$. PO: absolute maximal force. Pmax: absolute maximal power.

IV.7 FIGURES

FIGURE 1:

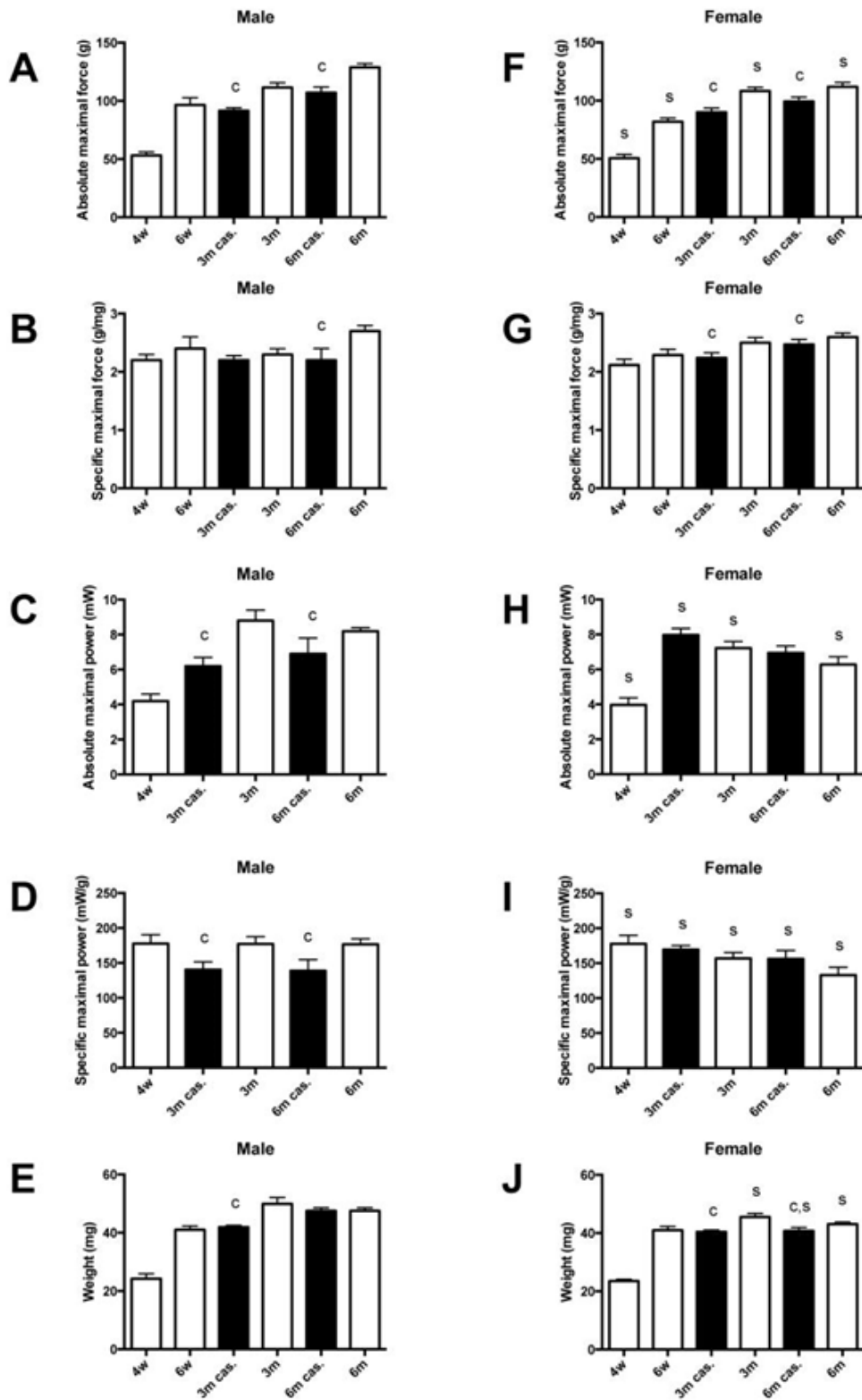


FIGURE 2:

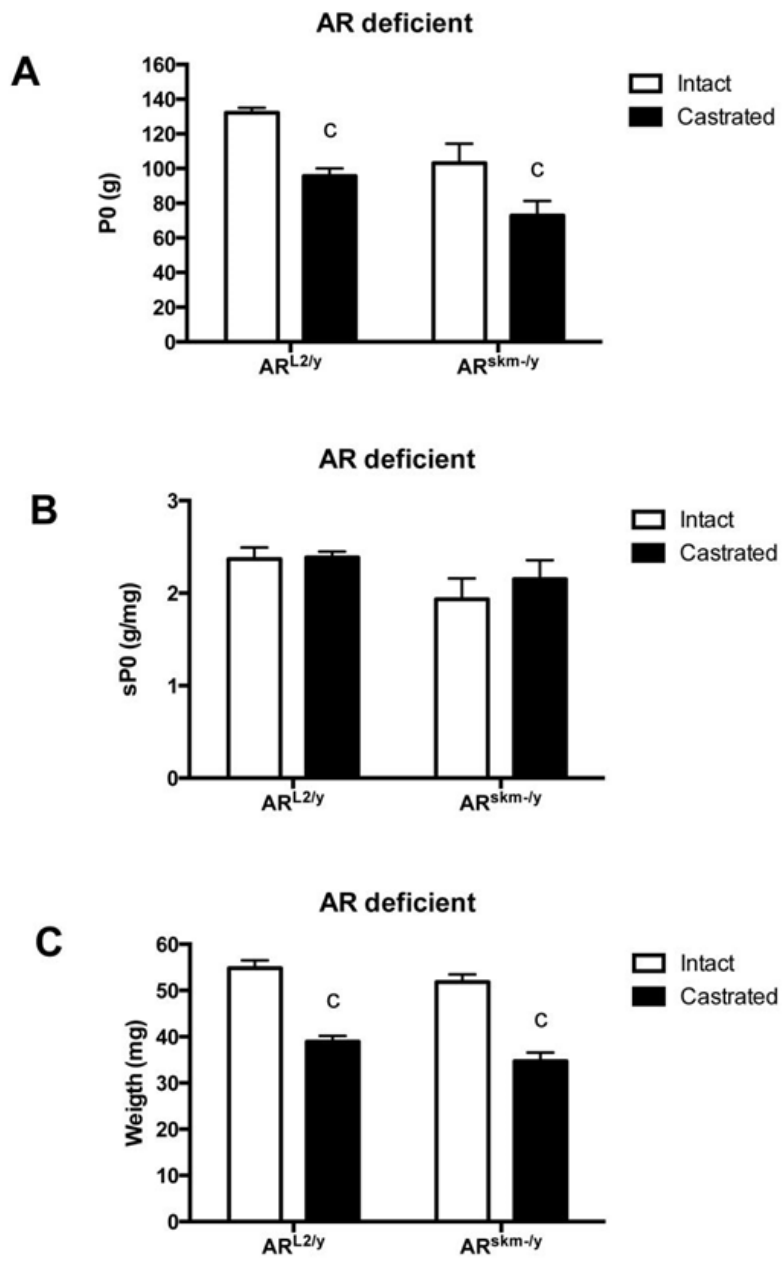


FIGURE 3:

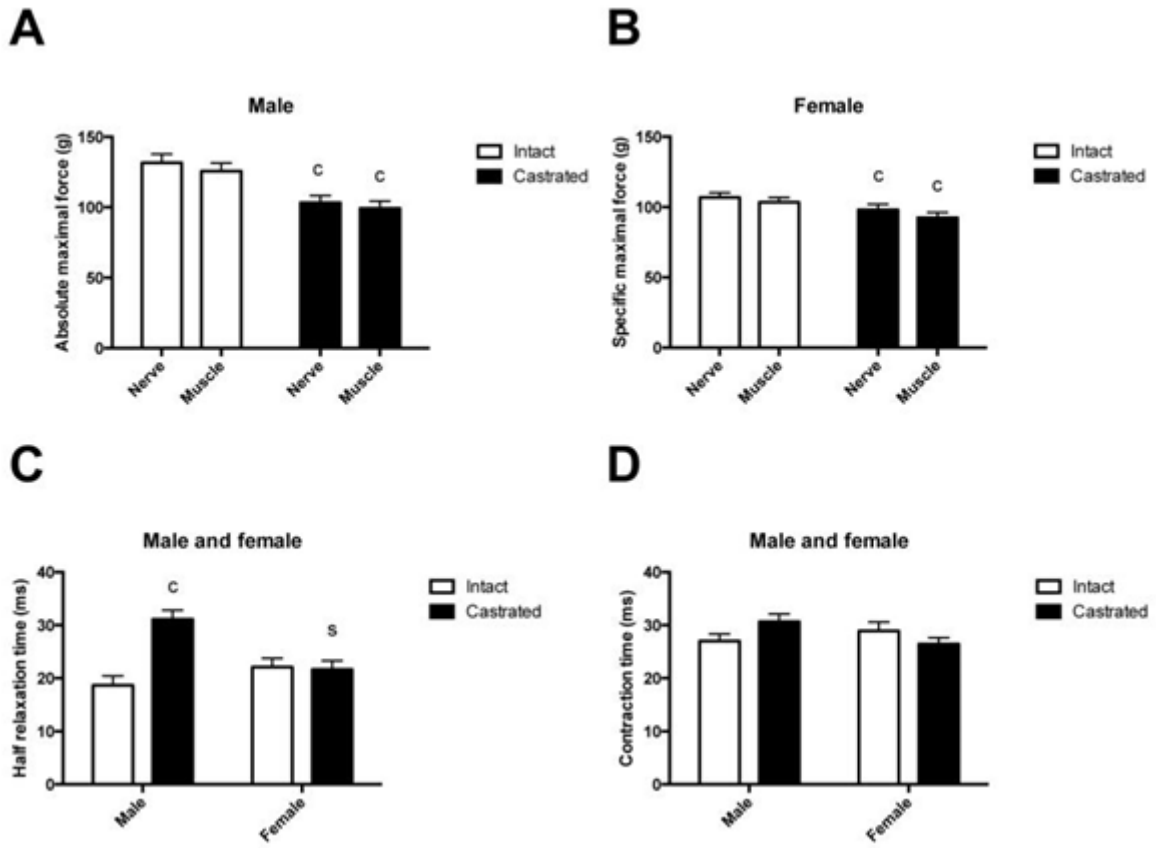


FIGURE 4:

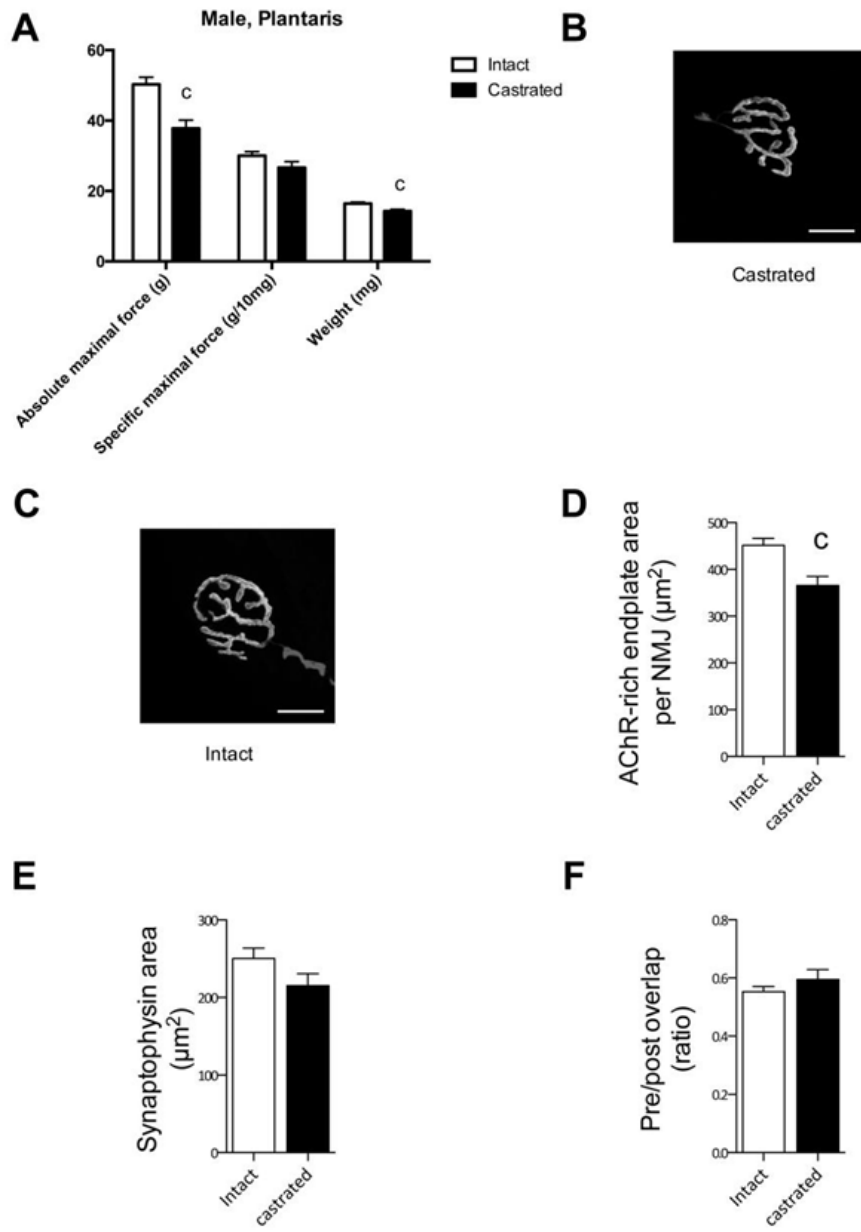


FIGURE 5:

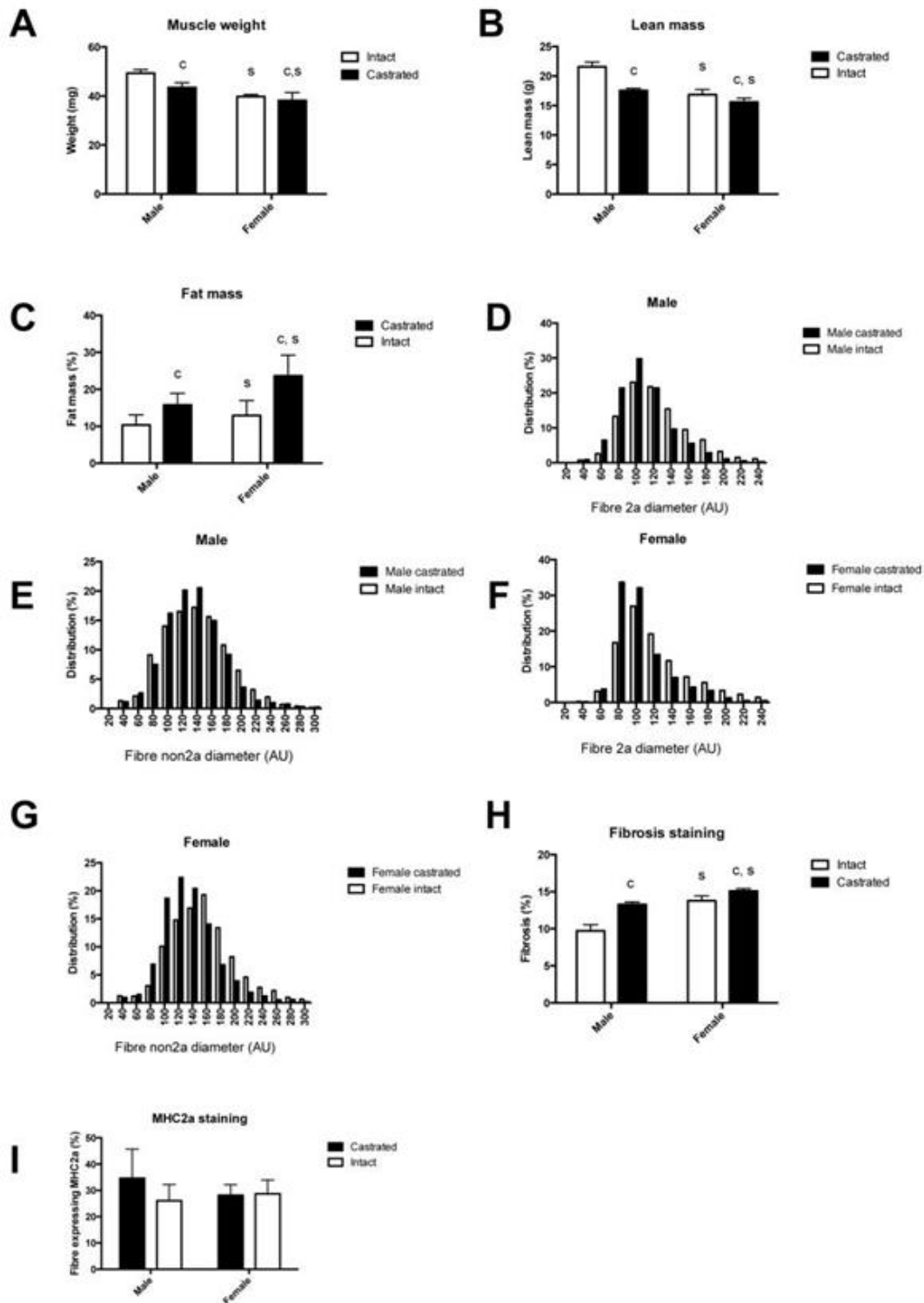


FIGURE 6:

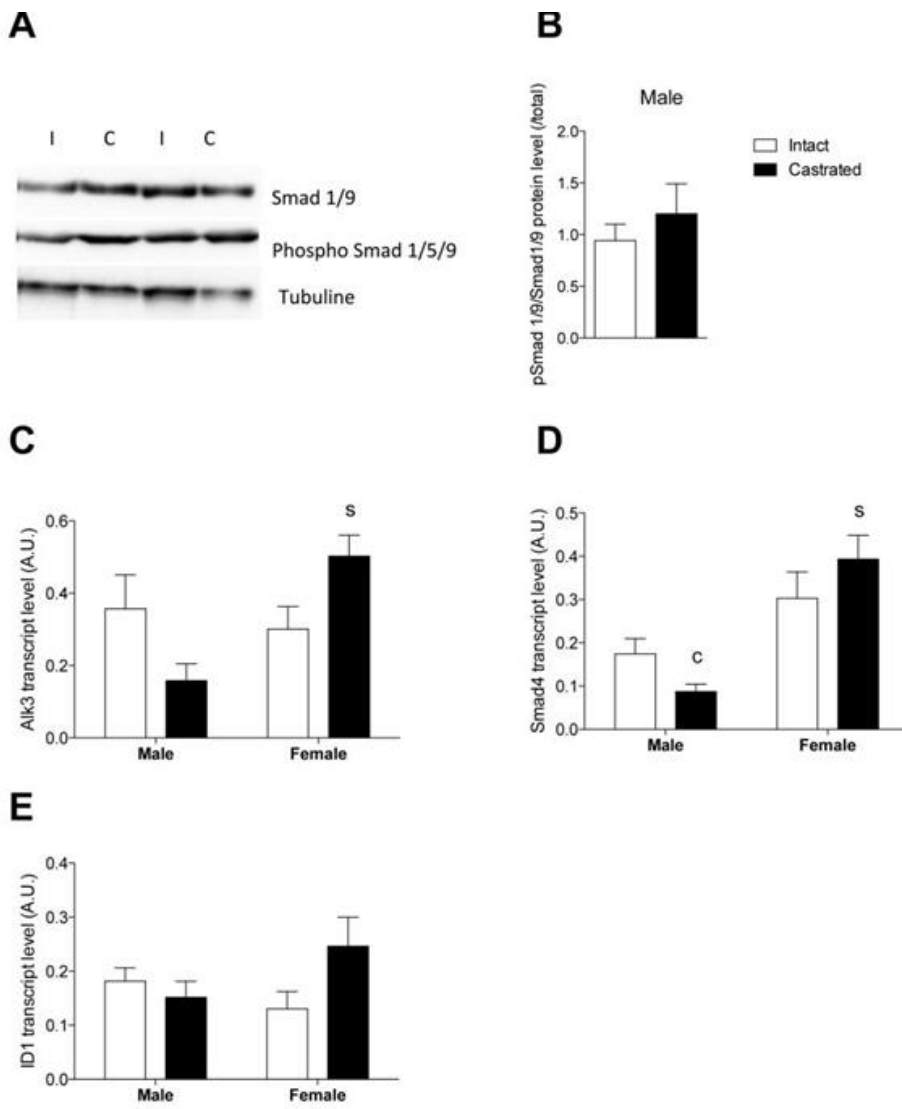
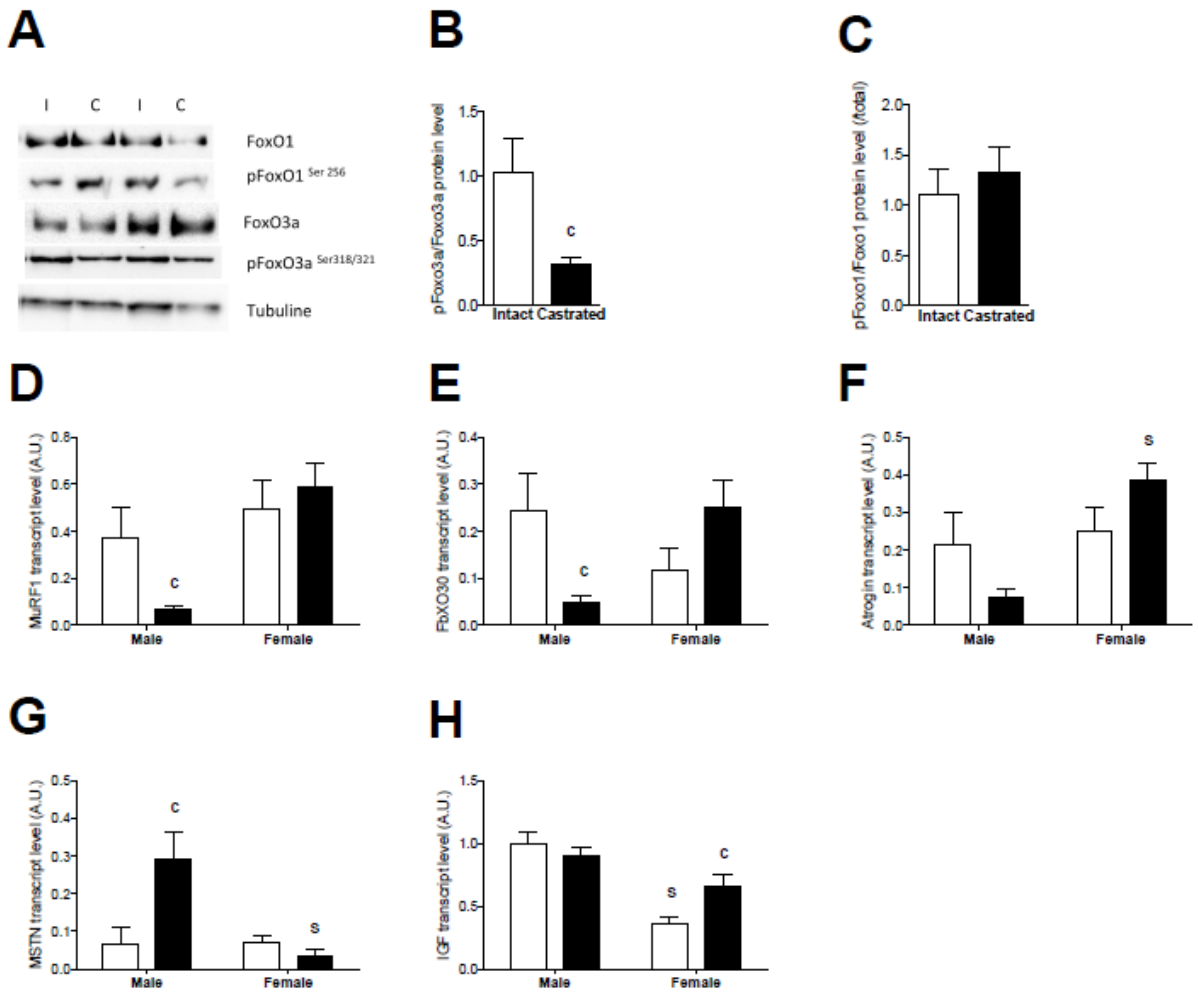


FIGURE 7:



CONCLUSION GENERALE

Les GC et les androgènes sont deux hormones stéroïdiennes exerçant des effets pléiotropiques chez les mammifères. Les GC contrôlent le rythme circadien, ainsi que les métabolismes lipidique, glucidique et protéique, tandis que les androgènes contrôlent la prolifération cellulaire, le développement et le maintien des organes reproducteurs masculins, et exercent un effet anabolique notamment sur les muscles. Les GC possèdent de puissantes propriétés anti-inflammatoires, et sont utilisés pour traiter des infections et des maladies chroniques, telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'eczéma et l'asthme. Cependant leur utilisation prolongée est limitée, car ils induisent des effets secondaires importants, notamment le diabète, l'ostéoporose et l'atrophie musculaire. Les GC constituent également le traitement le plus efficace de la MD. Ils induisent une augmentation de la force musculaire et retardent la progression de la maladie, mais ne sont pas curatifs. Des études cliniques indépendantes ont montré que l'utilisation de GC fluorés, tels que la dex, est fréquemment associée à une atrophie musculaire. C'est pourquoi il est recommandé de privilégier l'utilisation de GC non fluorés. Ainsi, les GC induisent paradoxalement à la fois une atrophie musculaire chez les patients non dystrophiques et des effets bénéfiques sur les fonctions musculaires des patients atteints de MD. D'autre part, les effets anaboliques des androgènes sur le muscle squelettique sont particulièrement intéressants pour améliorer les fonctions musculaires chez les personnes âgées ou chez les patients atteints de sarcopénie, cachexie ou du SIDA. Comme les androgènes stimulent également la prolifération des cellules épithéliales de la prostate, ils augmentent le risque de développer un cancer de la prostate. L'identification d'analogues avec une activité sélective et induisant moins d'effets secondaires est donc un enjeu majeur des industries pharmaceutiques. Cependant, les voies de signalisation contrôlées par ces deux hormones sont mal caractérisées, rendant cette identification difficile.

L'objectif principal de ce travail de thèse était de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les GC et les androgènes régulent la masse et les fonctions musculaires.

Pour y parvenir, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux rôles de GR dans le muscle squelettique en utilisant des approches pharmacologiques et génétiques. Nous avons également comparé les effets de la dex et de la pdn dans un modèle de MD afin d'identifier les événements moléculaires et cellulaires différentiels induits par ces composés dans les muscles striés. De plus, nous avons étudié l'interaction entre les GC et les androgènes, puisque des études suggèrent que l'atrophie musculaire induite par les GC peut être compensée en partie par les androgènes. Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle des facteurs produits par les gonades mâles et femelles dans le gain de performance musculaire lors du développement post natal.

Les glucocorticoïdes et les androgènes exercent des rôles opposés dans la régulation de la masse et des fonctions musculaires en présence de concentrations physiologiques.

Nos résultats démontrent que GR régule négativement la masse musculaire en présence de concentrations physiologiques de GC chez l'adulte, en exerçant un effet anti-anabolique conduisant à une diminution de la synthèse protéique, sans moduler la voie catabolique. Des analyses transcriptomiques ont également montré que des concentrations physiologiques de GC régulent négativement l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogenèse, la dégradation d'acides aminés et dans l'inhibition des protéases dans le muscle. Cependant, comme les GC favorisent la néoglucogenèse dans le foie principalement en activant la transcription de gènes codant pour des enzymes clés, ces résultats suggèrent que les GC régulent l'expression d'un ensemble de gènes de

manière opposée dans le muscle et dans le foie. Il serait intéressant d'identifier les mécanismes responsables de cette sélectivité tissulaire.

Nous avons également démontré que les androgènes endogènes favorisent le gain de performance via l'amélioration et l'entretien de la force spécifique maximale et de la puissance, sans affecter la transmission neuromusculaire. Cependant, nos études ont révélé que la contribution des MGRF n'est pas prédominante puisque 65% des effets de gain de performance sont médiés par d'autres facteurs. Les mécanismes responsables de ce gain de performance restent à être identifiés mais semblent indépendants de la voie d'IGF-I, la voie des BMP et du système ubiquitine-protéasome. Il serait également intéressant d'identifier les autres facteurs responsables de ce gain de performance pendant le développement post-natal.

L'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes varie en fonction des analogues synthétiques et du modèle d'atrophie utilisés.

Nous avons montré que GR dans les myofibres joue un rôle important dans l'atrophie musculaire induite par l'administration de GC de synthèse, la dex. En effet, GR est essentiel à l'induction des gènes impliqués dans les voies autophagiques et protéolytiques ainsi que dans la régulation négative de la voie anabolique. En revanche, un traitement chronique avec un autre GC de synthèse, la Pdn, n'induit pas d'atrophie musculaire et n'augmente pas l'expression de gènes impliqués dans la dégradation protéique ou dans la régulation négative de la voie anabolique. De plus, nos études ont montré que GR est partiellement responsable de l'atrophie musculaire induite par une mise à jeun, associée à une augmentation du taux circulant de GC, suggérant que des voies de signalisation additionnelles sont impliquées lors d'un jeûne. Nos résultats montrent aussi que les réseaux de gènes contrôlés par des concentrations physiologiques de GC diffèrent des réseaux de gènes contrôlés en présence de fortes concentrations de GC.

Ces résultats soulignent la complexité des mécanismes impliqués dans la mise en place de l'atrophie musculaire et démontrent que suivant le type de GC synthétiques utilisés et suivant le modèle d'atrophie musculaire étudié, l'étendue des réponses physiologiques diffèrent. Il serait intéressant de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de ces effets différentiels entre les modèles d'atrophie ou analogues utilisés.

De plus, nos résultats indiquent qu'un traitement prolongé aux GC permet une amélioration de l'architecture musculaire plus marquée après un traitement à la pdn qu'après un traitement à la dex, en diminuant le nombre de noyaux centraux et le niveau d'infiltration des cellules immunitaires chez les souris Mdx. Une étude plus détaillée des effets de ces analogues sur les souris contrôles et Mdx permettra d'identifier les voies responsables de l'amélioration des fonctions musculaires et celles responsables des effets secondaires observés chez les patients.

Un traitement aigu aux glucocorticoïdes diminue la synthèse protéique et favorise le métabolisme énergétique

L'analyse transcriptomique couplée à une immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage massif après un traitement aigu à la dex nous a permis d'identifier toutes les régions génomiques potentiellement contrôlées par GR dans les fibres musculaires et a mis en évidence les réseaux de gènes contrôlés par ces hormones. Nous avons montré qu'un traitement aigu à la dex contrôle négativement la voie anabolique mais n'est pas suffisant pour activer complètement la voie

catabolique. Nous avons montré que GR stimule l'expression des gènes impliqués dans le transport des acides aminés et du glucose, ainsi que dans la dégradation des lipides. D'autre part, GR inhibe l'expression de facteurs de transcription, ainsi que de gènes impliqués dans l'angiogenèse et le développement musculaire. GR induit également l'expression de la Mstn ainsi que des gènes impliqués dans la voie des MAPK, bien que le rôle des MAPK dans le muscle reste à clarifier. Les autres voies connues pour être impliquées dans la régulation de la masse musculaire comme la voie des récepteurs couplés aux protéines G ou la voie des BMP, ne semblent pas être contrôlées par un traitement aigu à la dex.

Ainsi ces résultats suggèrent qu'un traitement aigu à la dex via GR dans les myofibres, diminue la synthèse protéique et limite la transcription, ainsi que les capacités régénératives et la régulation myogénique afin de limiter l'utilisation d'énergie. D'autre part, un traitement aigu aux GC favorise l'entrée de glucose et l'oxydation des acides gras. Cette énergie pourra être directement utilisée par le muscle. Comme la majorité des gènes impliqués dans la voie protéolytique sont fortement induits après un traitement chronique à la dex, mais pas après un traitement aigu, nos résultats suggèrent que la dégradation protéique est un événement secondaire qui apparaît uniquement lorsque les autres sources d'énergie sont épuisées. Ayant identifié de nombreux gènes comme étant des cibles primaires de GR, il serait à présent intéressant de valider l'importance de ces cibles dans le muscle, en réalisant des expériences de gain et/ou de perte de fonction.

La régulation transcriptionnelle des gènes cibles du récepteur aux glucocorticoïdes est complexe

Nous avons identifié plus de 13 400 sites de liaison à GR pouvant réguler potentiellement 8000 gènes, mais seulement 5% de ces gènes sont régulés transcriptionnellement après un traitement aigu à la dex. Une recherche de motifs par analyse bio-informatique a mis en évidence un enrichissement de séquences consensus caractéristiques des éléments de réponse aux glucocorticoïdes positifs (+GRE), aussi bien chez les gènes surexprimés que sous exprimés. Nous avons également identifié environ 50 gènes régulés par GR dans les myofibres, contenant des sites de liaison aux facteurs AP1 ou NF- κ B. De plus, nous avons identifié des gènes contenant à la fois des motifs GRE, cJun et/ou NF- κ B dans leur région promotrice. Ces résultats soulignent la complexité des mécanismes de transcription par GR permettant une régulation fine de l'expression des gènes.

La mise en place de l'atrophie musculaire est un mécanisme dynamique

Nos études cinétiques ont montré que la réponse transcriptionnelle à une exposition chronique aux GCs et celle à une exposition aiguë sont différentes. La dex exerce un effet anti-anabolique rapide, afin de ne pas diminuer l'énergie disponible pour la production de force, ce qui est important dans des conditions de stress aigu par exemple. En revanche, l'induction de l'expression des gènes cataboliques nécessite une exposition à la dex de plusieurs jours. De plus, nos résultats démontrent que l'augmentation de la majorité des transcrits est abolie 24 h après l'administration de dex. Nos résultats ont également montré que les niveaux de GR sont fortement réduits 6 h après une administration de dex, pour revenir à un niveau basal 18 h plus tard. Ces résultats suggèrent qu'un mécanisme de rétrocontrôle médié par GR se met en place afin d'empêcher l'excès de dégradation protéique dans des situations normales. La diminution des niveaux de GR permettrait de réduire l'effet sur l'expression génique d'une administration aiguë de dex.

Nous avons constaté que les gènes classiquement étudiés dans l'atrophie musculaire et possédant un GRE dans leurs promoteurs (e.g. Redd1, MuRF1, p85) sont fortement induits 6 h après l'administration

de dex. En revanche l'induction des gènes ne possédant pas de GRE dans leur promoteur, mais un élément de réponse à FoxO (e.g. Atrogin1, LC3, Bnip), nécessite une exposition de plusieurs jours aux GC. Ce système dynamique permet ainsi de moduler la réponse des GC dans les muscles, en fonction de leur concentration et la durée d'exposition.

De manière intéressante, GR et FoxO régulent de manière synergique l'expression de certains gènes tels que MuRF1. De plus, nous avons identifié 28 gènes induits après une exposition aiguë à la dex, possédant à la fois un motif GRE et FoxO dans leur promoteur. Ainsi, nous proposons que GR régule dans un premier temps l'expression de certains gènes dont FoxO1 en se liant sur des GRE. Dans un second temps, GR et FoxO régulent ensemble l'expression d'autres gènes possédant à la fois des GRE et des FBE dans leur promoteur. Enfin, FoxO régule l'expression des gènes ne possédant pas de GRE, mais un FBE dans leur promoteur, principalement impliqués dans la voie catabolique. Tous ces événements devraient conduire à la mise en place de l'atrophie musculaire.

Une cinétique d'immunoprécipitation des régions de chromatine de muscle sur lesquelles GR est fixé, associée à une comparaison des sites de liaison de GR identifiés après un traitement aigu ou chronique permettra de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels GR régule de manière différentielle l'expression de gènes responsables de l'atrophie musculaire. Des analyses bio-informatiques des sites de liaison de GR et des régions promotrices des gènes permettront de définir la structure des sites de liaison de GR et déterminer la présence de sites de fixation d'autres facteurs de transcription (e.g. Foxo1) à proximité, suggérant une interaction entre GR et ceux-ci.

Les récepteurs des androgènes et le récepteur aux glucocorticoïdes interagissent dans les muscles squelettiques

Bien qu'il soit classiquement admis qu'AR et GR exercent des effets opposés sur le muscle, notre étude a démontré qu'AR dans les myofibres est nécessaire à la fonte de la masse musculaire induite par la dex et que GR est requis pour induire l'expression des gènes cibles d'AR. Ces résultats suggèrent que les deux récepteurs dans les myofibres sont nécessaires pour médier l'effet des GC et des androgènes dans le muscle. De plus, nous avons démontré qu'AR et GR se fixent sur les mêmes sites de liaison. Des données structurales suggèrent que GR et AR pourraient former des hétérodimères pour réguler l'expression de certains gènes spécifiques.

Il serait intéressant de déterminer les gènes régulés spécifiquement par AR, ceux spécifiquement par GR et ceux par les deux, grâce à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Ainsi une meilleure caractérisation des sites de liaison ainsi que des régions promotrices des gènes spécifiques de GR, spécifiques d'AR, ou liant à la fois AR et GR, permettra d'avoir une vue étendue de l'architecture des régions promotrices des cibles directes de GR, d'AR ou des deux (Ex. sites de liaison de GR et d'AR, présence de sites de liaison à d'autres facteurs de transcription dans la région du promoteur, présence de co-régulateurs particuliers,...). Ceci permettrait de mieux comprendre le fonctionnement des récepteurs nucléaires et permettrait d'ouvrir de nouvelles voies pour identifier des analogues avec des effets secondaires réduits.

Etudes annexes sur la myostatine et les myopathies inflammatoires

D'autre part, grâce à l'expertise technique acquise au cours de ce projet, une étude réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Arnaud Ferry et du Dr. Denis Furling de l'Institut de Myologie de Paris a permis de montrer que la Mstn endogène, en limitant le gain de force maximale absolue et de la

puissance, et en améliorant la qualité musculaire, joue un rôle important au cours du développement post-natal du muscle squelettique chez la souris (Annexe 1).

Au cours de la deuxième étude réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Bernard Geny et du Pr. Jean Sibilis de l'Hôpital Civil de Strasbourg, nous avons montré que le dysfonctionnement mitochondrial musculaire est une caractéristique de la pathogenèse des dermatopolymyosites, et que les ROS représentent une cible thérapeutique intéressante pour cette maladie (Annexe 2).

Conclusions et perspectives

Au final, ce projet a permis de clarifier certains des mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les GC et les androgènes régulent spécifiquement la masse et les fonctions musculaires. Néanmoins des études complémentaires sont requises pour comprendre et identifier les mécanismes par lesquels ces hormones interagissent. De plus, l'identification des partenaires de GR dans la mise en place de l'atrophie musculaire offrira des pistes originales pour développer de nouvelles thérapies afin de stimuler la masse et la force musculaire, et ouvre des perspectives prometteuses pour obtenir des analogues induisant moins d'effets secondaires.

REFERENCES

- Adams, G.R. (2006). Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et métabolisme* 31, 782-790.
- Adams, G.R., Haddad, F., Bodell, P.W., Tran, P.D., and Baldwin, K.M. (2007). Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. *Journal of applied physiology* 103, 1644-1654.
- Adeva-Andany, M.M., Gonzalez-Lucan, M., Donapetry-Garcia, C., Fernandez-Fernandez, C., and Ameneiros-Rodriguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. *BBA clinical* 5, 85-100.
- Akimoto, T., Pohnert, S.C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P.B., Williams, R.S., and Yan, Z. (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *The Journal of biological chemistry* 280, 19587-19593.
- Alamdari, N., Aversa, Z., Castellero, E., and Hasselgren, P.O. (2013). Acetylation and deacetylation--novel factors in muscle wasting. *Metabolism* 62, 1-11.
- Alamdari, N., Toraldo, G., Aversa, Z., Smith, I., Castellero, E., Renaud, G., Qaisar, R., Larsson, L., Jasuja, R., and Hasselgren, P.O. (2012). Loss of muscle strength during sepsis is in part regulated by glucocorticoids and is associated with reduced muscle fiber stiffness. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 303, R1090-1099.
- Albert, V., and Hall, M.N. (2015). mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Current opinion in cell biology* 33, 55-66.
- Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., and Cohen, P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS letters* 399, 333-338.
- Allemand, M.C., Irving, B.A., Asmann, Y.W., Klaus, K.A., Tatpati, L., Coddington, C.C., and Nair, K.S. (2009). Effect of testosterone on insulin stimulated IRS1 Ser phosphorylation in primary rat myotubes--a potential model for PCOS-related insulin resistance. *PloS one* 4, e4274.
- Allen, D.L., and Loh, A.S. (2011). Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C124-137.
- Almeida, C.F., Fernandes, S.A., Ribeiro Junior, A.F., Keith Okamoto, O., and Vainzof, M. (2016). Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. *Stem cells international* 2016, 1078686.
- Almeida, M., Han, L., Ambrogini, E., Weinstein, R.S., and Manolagas, S.C. (2011). Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* 286, 44326-44335.
- Almon, R.R., DuBois, D.C., Yao, Z., Hoffman, E.P., Ghimbovski, S., and Jusko, W.J. (2007). Microarray analysis of the temporal response of skeletal muscle to methylprednisolone: comparative analysis of two dosing regimens. *Physiological genomics* 30, 282-299.
- Altamirano, F., Valladares, D., Henriquez-Olguin, C., Casas, M., Lopez, J.R., Allen, P.D., and Jaimovich, E. (2013). Nifedipine treatment reduces resting calcium concentration, oxidative and apoptotic gene expression, and improves muscle function in dystrophic mdx mice. *PloS one* 8, e81222.
- Alzghoul, M.B., Gerrard, D., Watkins, B.A., and Hannon, K. (2004). Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 221-223.
- Amthor, H., Macharia, R., Navarrete, R., Schuelke, M., Brown, S.C., Otto, A., Voit, T., Muntoni, F., Vrbova, G., Partridge, T., *et al.* (2007). Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 1835-1840.
- An, C.I., Ganio, E., and Hagiwara, N. (2013). Trip12, a HECT domain E3 ubiquitin ligase, targets Sox6 for proteasomal degradation and affects fiber type-specific gene expression in muscle cells. *Skelet Muscle* 3, 11.
- Andersen, J.L. (2003). Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 13, 40-47.

- Antonescu, C.N., Huang, C., Niu, W., Liu, Z., Evers, P.A., Heidenreich, K.A., Bilan, P.J., and Klip, A. (2005). Reduction of insulin-stimulated glucose uptake in L6 myotubes by the protein kinase inhibitor SB203580 is independent of p38MAPK activity. *Endocrinology* *146*, 3773-3781.
- Antonio, J., Wilson, J.D., and George, F.W. (1999). Effects of castration and androgen treatment on androgen-receptor levels in rat skeletal muscles. *Journal of applied physiology* *87*, 2016-2019.
- Armstrong, D.D., and Esser, K.A. (2005). Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* *289*, C853-859.
- Aronson, D., Boppart, M.D., Dufresne, S.D., Fielding, R.A., and Goodyear, L.J. (1998). Exercise stimulates c-Jun NH2 kinase activity and c-Jun transcriptional activity in human skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications* *251*, 106-110.
- Arora, V.K., Schenkein, E., Murali, R., Subudhi, S.K., Wongvipat, J., Balbas, M.D., Shah, N., Cai, L., Efsthathiou, E., Logothetis, C., *et al.* (2013). Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell* *155*, 1309-1322.
- Attaix, D., Arousseau, E., Combaret, L., Kee, A., Larbaud, D., Ralliere, C., Souweine, B., Taillandier, D., and Tilignac, T. (1998). Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle. *Reproduction, nutrition, development* *38*, 153-165.
- Auchus, R.J. (2016). Steroid 17-hydroxylase and 17,20-lyase deficiencies, genetic and pharmacologic. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.
- Axell, A.M., MacLean, H.E., Plant, D.R., Harcourt, L.J., Davis, J.A., Jimenez, M., Handelsman, D.J., Lynch, G.S., and Zajac, J.D. (2006). Continuous testosterone administration prevents skeletal muscle atrophy and enhances resistance to fatigue in orchidectomized male mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *291*, E506-516.
- Baccarelli, A., Morpurgo, P.S., Corsi, A., Vaghi, I., Fanelli, M., Cremonesi, G., Vaninetti, S., Beck-Peccoz, P., and Spada, A. (2001). Activin A serum levels and aging of the pituitary-gonadal axis: a cross-sectional study in middle-aged and elderly healthy subjects. *Experimental gerontology* *36*, 1403-1412.
- Baehr, L.M., Furlow, J.D., and Bodine, S.C. (2011). Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *The Journal of physiology* *589*, 4759-4776.
- Baker, M.E., Funder, J.W., and Kattoula, S.R. (2013). Evolution of hormone selectivity in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *137*, 57-70.
- Balice-Gordon, R.J., Breedlove, S.M., Bernstein, S., and Lichtman, J.W. (1990). Neuromuscular junctions shrink and expand as muscle fiber size is manipulated: in vivo observations in the androgen-sensitive bulbocavernosus muscle of mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *10*, 2660-2671.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M., and Chrousos, G.P. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* *17*, 245-261.
- Baracos, V.E., DeVivo, C., Hoyle, D.H., and Goldberg, A.L. (1995). Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *Am J Physiol* *268*, E996-1006.
- Bardocz, S., Brown, D.S., Grant, G., Pusztai, A., Stewart, J.C., and Palmer, R.M. (1992). Effect of the beta-adrenoceptor agonist clenbuterol and phytohaemagglutinin on growth, protein synthesis and polyamine metabolism of tissues of the rat. *British journal of pharmacology* *106*, 476-482.
- Baron, S., Manin, M., Beaudoin, C., Leotoing, L., Communal, Y., Veyssiere, G., and Morel, L. (2004). Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* *279*, 14579-14586.
- Barton, E.R. (2006). The ABCs of IGF-I isoforms: impact on muscle hypertrophy and implications for repair. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* *31*, 791-797.
- Basaria, S. (2013). Testosterone therapy in older men with late-onset hypogonadism: a counter-rationale. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* *19*, 853-863.

- Baudy, A.R., Reeves, E.K., Damsker, J.M., Heier, C., Garvin, L.M., Dillingham, B.C., McCall, J., Rayavarapu, S., Wang, Z., Vandermeulen, J.H., *et al.* (2012). Delta-9,11 modification of glucocorticoids dissociates nuclear factor-kappaB inhibitory efficacy from glucocorticoid response element-associated side effects. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **343**, 225-232.
- Baumann, H., Paulsen, K., Kovacs, H., Berglund, H., Wright, A.P., Gustafsson, J.A., and Hard, T. (1993). Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Biochemistry* **32**, 13463-13471.
- Beato, M. (1991). Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **5**, 2044-2051.
- Bechet, D., Tassa, A., Taillandier, D., Combaret, L., and Attaix, D. (2005). Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**, 2098-2114.
- Beck, I.M., De Bosscher, K., and Haegeman, G. (2011). Glucocorticoid receptor mutants: man-made tools for functional research. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **22**, 295-310.
- Beckmann, J.S., and Spencer, M. (2008). Calpain 3, the "gatekeeper" of proper sarcomere assembly, turnover and maintenance. *Neuromuscular disorders : NMD* **18**, 913-921.
- Beenakker, E.A., Fock, J.M., Van Tol, M.J., Maurits, N.M., Koopman, H.M., Brouwer, O.F., and Van der Hoeven, J.H. (2005). Intermittent prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy: a randomized controlled trial. *Archives of neurology* **62**, 128-132.
- Belikov, S., Astrand, C., and Wrangé, O. (2009). FoxA1 binding directs chromatin structure and the functional response of a glucocorticoid receptor-regulated promoter. *Molecular and cellular biology* **29**, 5413-5425.
- Belizario, J.E., Lorite, M.J., and Tisdale, M.J. (2001). Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia. *British journal of cancer* **84**, 1135-1140.
- Bell, R.A., Al-Khalaf, M., and Megeney, L.A. (2016). The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. *Skelet Muscle* **6**, 16.
- Bentzinger, C.F., Lin, S., Romanino, K., Castets, P., Guridi, M., Summermatter, S., Handschin, C., Tintignac, L.A., Hall, M.N., and Rugg, M.A. (2013). Differential response of skeletal muscles to mTORC1 signaling during atrophy and hypertrophy. *Skelet Muscle* **3**, 6.
- Bentzinger, C.F., Romanino, K., Cloetta, D., Lin, S., Mascarenhas, J.B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C.F., Brink, M., *et al.* (2008). Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell metabolism* **8**, 411-424.
- Berdeaux, R., and Stewart, R. (2012). cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **303**, E1-17.
- Bertaggia, E., Coletto, L., and Sandri, M. (2012). Posttranslational modifications control FoxO3 activity during denervation. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**, C587-596.
- Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Callegari, C., Clevenger, B., Phillips, J., Bunnell, T.J., Tricker, R., Shirazi, A., and Casaburi, R. (1996). The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med* **335**, 1-7.
- Bhasin, S., Woodhouse, L., and Storer, T.W. (2001). Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *The Journal of endocrinology* **170**, 27-38.
- Biddie, S.C., John, S., Sabo, P.J., Thurman, R.E., Johnson, T.A., Schiltz, R.L., Miranda, T.B., Sung, M.H., Trump, S., Lightman, S.L., *et al.* (2011). Transcription factor AP1 potentiates chromatin accessibility and glucocorticoid receptor binding. *Molecular cell* **43**, 145-155.
- Billas, I., and Moras, D. (2013). Allosteric controls of nuclear receptor function in the regulation of transcription. *Journal of molecular biology* **425**, 2317-2329.
- Bishop-Bailey, D. (2013). Mechanisms governing the health and performance benefits of exercise. *British journal of pharmacology* **170**, 1153-1166.
- Bodine, S.C., and Furlow, J.D. (2015). Glucocorticoids and Skeletal Muscle. *Advances in experimental medicine and biology* **872**, 145-176.

- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., *et al.* (2001a). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704-1708.
- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., *et al.* (2001b). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology* 3, 1014-1019.
- Bogdanovich, S., Krag, T.O., Barton, E.R., Morris, L.D., Whittemore, L.A., Ahima, R.S., and Khurana, T.S. (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420, 418-421.
- Bohni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B.F., Beckingham, K., and Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a Drosophila homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97, 865-875.
- Bolster, D.R., Crozier, S.J., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2002). AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *The Journal of biological chemistry* 277, 23977-23980.
- Bolton, C.F., Laverty, D.A., Brown, J.D., Witt, N.J., Hahn, A.F., and Sibbald, W.J. (1986). Critically ill polyneuropathy: electrophysiological studies and differentiation from Guillain-Barre syndrome. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 49, 563-573.
- Bonaldo, P., and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models & mechanisms* 6, 25-39.
- Bonetto, A., Aydogdu, T., Jin, X., Zhang, Z., Zhan, R., Puzis, L., Koniaris, L.G., and Zimmers, T.A. (2012). JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 303, E410-421.
- Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789-799.
- Boppart, M.D., Asp, S., Wojtaszewski, J.F., Fielding, R.A., Mohr, T., and Goodyear, L.J. (2000). Marathon running transiently increases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 activities in human skeletal muscle. *The Journal of physiology* 526 Pt 3, 663-669.
- Borski, R.J. (2000). Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 11, 427-436.
- Bossola, M., Marzetti, E., Rosa, F., and Pacelli, F. (2016). Skeletal muscle regeneration in cancer cachexia. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 43, 522-527.
- Bossola, M., Muscaritoli, M., Costelli, P., Grieco, G., Bonelli, G., Pacelli, F., Rossi Fanelli, F., Doglietto, G.B., and Baccino, F.M. (2003). Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. *Annals of surgery* 237, 384-389.
- Bowen, T.S., Schuler, G., and Adams, V. (2015). Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 6, 197-207.
- Brault, J.J., Jespersen, J.G., and Goldberg, A.L. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *The Journal of biological chemistry* 285, 19460-19471.
- Braun, T., and Gautel, M. (2011). Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 349-361.
- Braun, T.P., Grossberg, A.J., Krasnow, S.M., Levasseur, P.R., Szumowski, M., Zhu, X.X., Maxson, J.E., Knoll, J.G., Barnes, A.P., and Marks, D.L. (2013). Cancer- and endotoxin-induced cachexia require intact glucocorticoid signaling in skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 3572-3582.
- Braun, T.P., and Marks, D.L. (2010). Pathophysiology and treatment of inflammatory anorexia in chronic disease. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 1, 135-145.
- Braun, T.P., and Marks, D.L. (2015). The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. *Frontiers in physiology* 6, 12.

- Braun, T.P., Szumowski, M., Levasseur, P.R., Grossberg, A.J., Zhu, X., Agarwal, A., and Marks, D.L. (2014). Muscle atrophy in response to cytotoxic chemotherapy is dependent on intact glucocorticoid signaling in skeletal muscle. *PLoS one* *9*, e106489.
- Brisson, B.K., and Barton, E.R. (2013). New Modulators for IGF-I Activity within IGF-I Processing Products. *Frontiers in endocrinology* *4*, 42.
- Britto, F.A., Begue, G., Rossano, B., Docquier, A., Vernus, B., Sar, C., Ferry, A., Bonnieu, A., Ollendorff, V., and Favier, F.B. (2014). REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *307*, E983-993.
- Brocca, L., Cannavino, J., Coletto, L., Biolo, G., Sandri, M., Bottinelli, R., and Pellegrino, M.A. (2012). The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *The Journal of physiology* *590*, 5211-5230.
- Broskey, N.T., Greggio, C., Boss, A., Boutant, M., Dwyer, A., Schlueter, L., Hans, D., Gremion, G., Kreis, R., Boesch, C., *et al.* (2014). Skeletal muscle mitochondria in the elderly: effects of physical fitness and exercise training. *J Clin Endocrinol Metab* *99*, 1852-1861.
- Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulic, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C., Jr., and Abraham, R.T. (1997). Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* *277*, 99-101.
- Bruscoli, S., Donato, V., Velardi, E., Di Sante, M., Migliorati, G., Donato, R., and Riccardi, C. (2010). Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry* *285*, 10385-10396.
- Budanov, A.V., and Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* *134*, 451-460.
- Bullock, G.R., Carter, E.E., Elliott, P., Peters, R.F., Simpson, P., and White, A.M. (1972). Relative changes in the function of muscle ribosomes and mitochondria during the early phase of steroid-induced catabolism. *The Biochemical journal* *127*, 881-892.
- Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Molecular cell* *36*, 541-546.
- Businaro, R., Nori, S.L., Toesca, A., Evangelisti, E., De Renzis, G., and Fumagalli, L. (2001). Altered balance of proteinase inhibitors in atrophic muscle after denervation. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia* *106*, 159-165.
- Busquets, S., Toledo, M., Orpi, M., Massa, D., Porta, M., Capdevila, E., Padilla, N., Frailis, V., Lopez-Soriano, F.J., Han, H.Q., *et al.* (2012). Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* *3*, 37-43.
- Buttgereit, F., Wehling, M., and Burmester, G.R. (1998). A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis and rheumatism* *41*, 761-767.
- Cai, D., Frantz, J.D., Tawa, N.E., Jr., Melendez, P.A., Oh, B.C., Lidov, H.G., Hasselgren, P.O., Frontera, W.R., Lee, J., Glass, D.J., *et al.* (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* *119*, 285-298.
- Campbell, N. (2004). *Biology*.
- Carraro, L., Ferraresso, S., Cardazzo, B., Romualdi, C., Montesissa, C., Gottardo, F., Patarnello, T., Castagnaro, M., and Bargelloni, L. (2009). Expression profiling of skeletal muscle in young bulls treated with steroidal growth promoters. *Physiological genomics* *38*, 138-148.
- Castillero, E., Alamdari, N., Aversa, Z., Gurav, A., and Hasselgren, P.O. (2013). PPARbeta/delta regulates glucocorticoid- and sepsis-induced FOXO1 activation and muscle wasting. *PLoS one* *8*, e59726.
- Chambon, C., Duteil, D., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., Malivindi, R., Kato, S., Chambon, P., and Metzger, D. (2010). Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 14327-14332.
- Chang, N.C., Chevalier, F.P., and Rudnicki, M.A. (2016). Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity. *Trends Mol Med* *22*, 479-496.

- Chao, J.H., and Page, S.T. (2016). The current state of male hormonal contraception. *Pharmacology & therapeutics* 163, 109-117.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866-1870.
- Chen, D., Huang, S.M., and Stallcup, M.R. (2000). Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *The Journal of biological chemistry* 275, 40810-40816.
- Chen, S., Wang, J., Yu, G., Liu, W., and Pearce, D. (1997). Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry* 272, 14087-14092.
- Chen, W., Dang, T., Blind, R.D., Wang, Z., Cavasotto, C.N., Hittelman, A.B., Rogatsky, I., Logan, S.K., and Garabedian, M.J. (2008). Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Molecular endocrinology* 22, 1754-1766.
- Chen, W., Rogatsky, I., and Garabedian, M.J. (2006). MED14 and MED1 differentially regulate target-specific gene activation by the glucocorticoid receptor. *Molecular endocrinology* 20, 560-572.
- Chen, Y., Chi, P., Rockowitz, S., Iaquinta, P.J., Shamu, T., Shukla, S., Gao, D., Sirota, I., Carver, B.S., Wongvipat, J., *et al.* (2013). ETS factors reprogram the androgen receptor cistrome and prime prostate tumorigenesis in response to PTEN loss. *Nature medicine* 19, 1023-1029.
- Chinenov, Y., Gupte, R., Dobrovolna, J., Flammer, J.R., Liu, B., Michelassi, F.E., and Rogatsky, I. (2012). Role of transcriptional coregulator GRIP1 in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 11776-11781.
- Cho, J.E., Fournier, M., Da, X., and Lewis, M.I. (2010). Time course expression of Foxo transcription factors in skeletal muscle following corticosteroid administration. *Journal of applied physiology* 108, 137-145.
- Chung, S., Son, G.H., and Kim, K. (2011). Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochimica et biophysica acta* 1812, 581-591.
- Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garralda, M.E., Bourke, J., Wells, D.J., *et al.* (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 378, 595-605.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., and Gregorio, C.C. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annual review of cell and developmental biology* 18, 637-706.
- Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., Rakhilin, S.V., Stitt, T.N., Patterson, C., Latres, E., *et al.* (2007). The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell metabolism* 6, 376-385.
- Cohen, P., and Goedert, M. (2004). GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nature reviews Drug discovery* 3, 479-487.
- Cohen, S., Brault, J.J., Gygi, S.P., Glass, D.J., Valenzuela, D.M., Gartner, C., Latres, E., and Goldberg, A.L. (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *The Journal of cell biology* 185, 1083-1095.
- Cohen, S., Lee, D., Zhai, B., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L. (2014). Trim32 reduces PI3K-Akt-FoxO signaling in muscle atrophy by promoting plakoglobin-PI3K dissociation. *The Journal of cell biology* 204, 747-758.
- Cohen, S., Nathan, J.A., and Goldberg, A.L. (2015). Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nature reviews Drug discovery* 14, 58-74.
- Cohen, S., Zhai, B., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L. (2012). Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *The Journal of cell biology* 198, 575-589.
- Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Kriegstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K., and Schutz, G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes & development* 9, 1608-1621.

- Collins, Q.F., Xiong, Y., Lupo, E.G., Jr., Liu, H.Y., and Cao, W. (2006). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* *281*, 24336-24344.
- Combaret, L., Dardevet, D., Bechet, D., Taillandier, D., Mosoni, L., and Attaix, D. (2009). Skeletal muscle proteolysis in aging. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* *12*, 37-41.
- Combaret, L., Taillandier, D., Dardevet, D., Bechet, D., Ralliere, C., Claustre, A., Grizard, J., and Attaix, D. (2004). Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles. *The Biochemical journal* *378*, 239-246.
- Contreras-Ferrat, A., Llanos, P., Vasquez, C., Espinosa, A., Osorio-Fuentealba, C., Arias-Calderon, M., Lavandero, S., Klip, A., Hidalgo, C., and Jaimovich, E. (2014). Insulin elicits a ROS-activated and an IP(3)-dependent Ca(2)(+) release, which both impinge on GLUT4 translocation. *Journal of cell science* *127*, 1911-1923.
- Cornu, M., Albert, V., and Hall, M.N. (2013). mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Current opinion in genetics & development* *23*, 53-62.
- Cosqueric, G., Sebag, A., Ducolombier, C., Thomas, C., Piette, F., and Weill-Engerer, S. (2006). Sarcopenia is predictive of nosocomial infection in care of the elderly. *The British journal of nutrition* *96*, 895-901.
- Costelli, P., Reffo, P., Penna, F., Autelli, R., Bonelli, G., and Baccino, F.M. (2005). Ca(2+)-dependent proteolysis in muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology* *37*, 2134-2146.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., and Rofe, A.M. (2002). Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* *59*, 627-647.
- Cozzoli, A., Rolland, J.F., Capogrosso, R.F., Sblendorio, V.T., Longo, V., Simonetti, S., Nico, B., and De Luca, A. (2011). Evaluation of potential synergistic action of a combined treatment with alpha-methyl-prednisolone and taurine on the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* *37*, 243-256.
- Craig, R., and Woodhead, J.L. (2006). Structure and function of myosin filaments. *Current opinion in structural biology* *16*, 204-212.
- Creer, A., Gallagher, P., Slivka, D., Jemiolo, B., Fink, W., and Trappe, S. (2005). Influence of muscle glycogen availability on ERK1/2 and Akt signaling after resistance exercise in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology* *99*, 950-956.
- Crozat, A., Palvimo, J.J., Julkunen, M., and Janne, O.A. (1992). Comparison of androgen regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression in rodent kidney and accessory sex organs. *Endocrinology* *130*, 1131-1144.
- Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J.P., Bauer, J.M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F.C., Michel, J.P., Rolland, Y., Schneider, S.M., *et al.* (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and ageing* *39*, 412-423.
- Csibi, A., Leibovitch, M.P., Cornille, K., Tintignac, L.A., and Leibovitch, S.A. (2009). MAFbx/Atrogin-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. *The Journal of biological chemistry* *284*, 4413-4421.
- Cybulski, N., and Hall, M.N. (2009). TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends in biochemical sciences* *34*, 620-627.
- Dasgupta, S., Lonard, D.M., and O'Malley, B.W. (2014). Nuclear receptor coactivators: master regulators of human health and disease. *Annual review of medicine* *65*, 279-292.
- Davey, R.A., and Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* *37*, 3-15.
- Davies, P., and Rushmere, N.K. (1990). Association of glucocorticoid receptors with prostate nuclear sites for androgen receptors and with androgen response elements. *Journal of molecular endocrinology* *5*, 117-127.

- De Larichaudy, J., Zufferli, A., Serra, F., Isidori, A.M., Naro, F., Dessalle, K., Desgeorges, M., Piraud, M., Cheillan, D., Vidal, H., *et al.* (2012). TNF-alpha- and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skelet Muscle* 2, 2.
- Dekhuijzen, P.N., Gayan-Ramirez, G., Bisschop, A., De Bock, V., Dom, R., and Decramer, M. (1995). Corticosteroid treatment and nutritional deprivation cause a different pattern of atrophy in rat diaphragm. *Journal of applied physiology* 78, 629-637.
- Devenport, L., Knehans, A., Sundstrom, A., and Thomas, T. (1989). Corticosterone's dual metabolic actions. *Life sciences* 45, 1389-1396.
- Diamond, M.I., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K., and Yamamoto, K.R. (1990). Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249, 1266-1272.
- Dibble, C.C., and Manning, B.D. (2013). Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nature cell biology* 15, 555-564.
- Dick, S.A., Chang, N.C., Dumont, N.A., Bell, R.A., Putinski, C., Kawabe, Y., Litchfield, D.W., Rudnicki, M.A., and Megeney, L.A. (2015). Caspase 3 cleavage of Pax7 inhibits self-renewal of satellite cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E5246-5252.
- Diel, P., Baadners, D., Schlupmann, K., Velders, M., and Schwarz, J.P. (2008). C2C12 myoblastoma cell differentiation and proliferation is stimulated by androgens and associated with a modulation of myostatin and Pax7 expression. *J Mol Endocrinol* 40, 231-241.
- Dodson, S., Baracos, V.E., Jatoi, A., Evans, W.J., Cella, D., Dalton, J.T., and Steiner, M.S. (2011). Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. *Annual review of medicine* 62, 265-279.
- Donaldson, C.J., Mathews, L.S., and Vale, W.W. (1992). Molecular cloning and binding properties of the human type II activin receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 184, 310-316.
- Doumit, M.E., Cook, D.R., and Merkel, R.A. (1996). Testosterone up-regulates androgen receptors and decreases differentiation of porcine myogenic satellite cells in vitro. *Endocrinology* 137, 1385-1394.
- Doyle, A., Zhang, G., Abdel Fattah, E.A., Eissa, N.T., and Li, Y.P. (2011). Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced muscle catabolism via coordinate activation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 99-110.
- Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J.L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S.R., and Mitch, W.E. (2004). Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *The Journal of clinical investigation* 113, 115-123.
- Dubois, V., Laurent, M., Boonen, S., Vanderschueren, D., and Claessens, F. (2012). Androgens and skeletal muscle: cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic actions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 1651-1667.
- Ebert, S.M., Dyle, M.C., Bullard, S.A., Dierdorff, J.M., Murry, D.J., Fox, D.K., Bongers, K.S., Lira, V.A., Meyerholz, D.K., Talley, J.J., *et al.* (2015). Identification and Small Molecule Inhibition of an Activating Transcription Factor 4 (ATF4)-dependent Pathway to Age-related Skeletal Muscle Weakness and Atrophy. *The Journal of biological chemistry* 290, 25497-25511.
- Ebert, S.M., Dyle, M.C., Kunkel, S.D., Bullard, S.A., Bongers, K.S., Fox, D.K., Dierdorff, J.M., Foster, E.D., and Adams, C.M. (2012). Stress-induced skeletal muscle Gadd45a expression reprograms myonuclei and causes muscle atrophy. *The Journal of biological chemistry* 287, 27290-27301.
- Eddins, M.J., Marblestone, J.G., Suresh Kumar, K.G., Leach, C.A., Sterner, D.E., Mattern, M.R., and Nicholson, B. (2011). Targeting the ubiquitin E3 ligase MuRF1 to inhibit muscle atrophy. *Cell biochemistry and biophysics* 60, 113-118.
- Eder, I.E., Culig, Z., Putz, T., Nessler-Menardi, C., Bartsch, G., and Klocker, H. (2001). Molecular biology of the androgen receptor: from molecular understanding to the clinic. *European urology* 40, 241-251.
- Egerman, M.A., and Glass, D.J. (2014). Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 49, 59-68.

- Encio, I.J., and Detera-Wadleigh, S.D. (1991). The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *The Journal of biological chemistry* 266, 7182-7188.
- Enns, D.L., Raastad, T., Ugelstad, I., and Belcastro, A.N. (2007). Calpain/calpastatin activities and substrate depletion patterns during hindlimb unweighting and reweighting in skeletal muscle. *European journal of applied physiology* 100, 445-455.
- Escolar, D.M., Hache, L.P., Clemens, P.R., Cnaan, A., McDonald, C.M., Viswanathan, V., Kornberg, A.J., Bertorini, T.E., Nevo, Y., Lotze, T., *et al.* (2011). Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 77, 444-452.
- Espinosa, A., Henriquez-Olguin, C., and Jaimovich, E. (2016). Reactive oxygen species and calcium signals in skeletal muscle: A crosstalk involved in both normal signaling and disease. *Cell calcium*.
- Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* 157, 255-266.
- Evans, W.J., and Cannon, J.G. (1991). The metabolic effects of exercise-induced muscle damage. *Exercise and sport sciences reviews* 19, 99-125.
- Evenson, A.R., Fareed, M.U., Menconi, M.J., Mitchell, J.C., and Hasselgren, P.O. (2005). GSK-3beta inhibitors reduce protein degradation in muscles from septic rats and in dexamethasone-treated myotubes. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 2226-2238.
- Fang, C.H., Li, B.G., James, J.H., King, J.K., Evenson, A.R., Warden, G.D., and Hasselgren, P.O. (2005). Protein breakdown in muscle from burned rats is blocked by insulin-like growth factor I and glycogen synthase kinase-3beta inhibitors. *Endocrinology* 146, 3141-3149.
- Fatani, S., Abubakari, A.R., Itua, I., Wong, C., Thomas, C., and Naderali, E.K. (2012). Effects of diet-induced obesity on protein expression in insulin signaling pathways of skeletal muscle in male Wistar rats. *International journal of general medicine* 5, 573-582.
- Fernando, P., Kelly, J.F., Balazsi, K., Slack, R.S., and Megeney, L.A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11025-11030.
- Ferrando, A.A., Tipton, K.D., Doyle, D., Phillips, S.M., Cortiella, J., and Wolfe, R.R. (1998). Testosterone injection stimulates net protein synthesis but not tissue amino acid transport. *Am J Physiol* 275, E864-871.
- Ferry, A., Schuh, M., Parlakian, A., Mgrditchian, T., Valnaud, N., Joanne, P., Butler-Browne, G., Agbulut, O., and Metzger, D. (2014). Myofiber androgen receptor promotes maximal mechanical overload-induced muscle hypertrophy and fiber type transition in male mice. *Endocrinology* 155, 4739-4748.
- Festoff, B.W., Reddy, R.B., VanBecelaere, M., Smirnova, I., and Chao, J. (1994). Activation of serpins and their cognate proteases in muscle after crush injury. *Journal of cellular physiology* 159, 11-18.
- Fitts, R.H., and Widrick, J.J. (1996). Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. *Exercise and sport sciences reviews* 24, 427-473.
- Force, T., and Bonventre, J.V. (1998). Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 31, 152-161.
- Ford, J., McEwan, I.J., Wright, A.P., and Gustafsson, J.A. (1997). Involvement of the transcription factor IID protein complex in gene activation by the N-terminal transactivation domain of the glucocorticoid receptor in vitro. *Molecular endocrinology* 11, 1467-1475.
- Fournier, M., Huang, Z.S., Li, H., Da, X., Cercek, B., and Lewis, M.I. (2003). Insulin-like growth factor I prevents corticosteroid-induced diaphragm muscle atrophy in emphysematous hamsters. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 285, R34-43.
- Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international* 96, 183-195.
- Frontera, W.R., Suh, D., Krivickas, L.S., Hughes, V.A., Goldstein, R., and Roubenoff, R. (2000). Skeletal muscle fiber quality in older men and women. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C611-618.
- Frosk, P., Weiler, T., Nysten, E., Sudha, T., Greenberg, C.R., Morgan, K., Fujiwara, T.M., and Wrogemann, K. (2002). Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *American journal of human genetics* 70, 663-672.

- Fujii, N., Boppart, M.D., Dufresne, S.D., Crowley, P.F., Jozsi, A.C., Sakamoto, K., Yu, H.Y., Aschenbach, W.G., Kim, S., Miyazaki, H., *et al.* (2004). Overexpression or ablation of JNK in skeletal muscle has no effect on glycogen synthase activity. *Am J Physiol-Cell Ph* 287, C200-C208.
- Fujii, N., Hayashi, T., Hirshman, M.F., Smith, J.T., Habinowski, S.A., Kaijser, L., Mu, J., Ljungqvist, O., Birnbaum, M.J., Witters, L.A., *et al.* (2000). Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications* 273, 1150-1155.
- Furlow, J.D., Watson, M.L., Waddell, D.S., Neff, E.S., Baehr, L.M., Ross, A.P., and Bodine, S.C. (2013). Altered gene expression patterns in muscle ring finger 1 null mice during denervation- and dexamethasone-induced muscle atrophy. *Physiological genomics* 45, 1168-1185.
- Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., and Mori, N. (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *The Biochemical journal* 349, 629-634.
- Gallagher-Beckley, A.J., and Cidlowski, J.A. (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB life* 61, 979-986.
- Gallagher-Beckley, A.J., Williams, J.G., Collins, J.B., and Cidlowski, J.A. (2008). Glycogen synthase kinase 3 β -mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Molecular and cellular biology* 28, 7309-7322.
- Galpin, A.J., Raue, U., Jemiolo, B., Trappe, T.A., Harber, M.P., Minchev, K., and Trappe, S. (2012). Human skeletal muscle fiber type specific protein content. *Anal Biochem* 425, 175-182.
- Gardiner, P.F., Botterman, B.R., Eldred, E., Simpson, D.R., and Edgerton, V.R. (1978). Metabolic and contractile changes in fast and slow muscles of the cat after glucocorticoid-induced atrophy. *Experimental neurology* 62, 241-255.
- Gast, A., Schneikert, J., and Cato, A.C. (1998). N-terminal sequences of the human androgen receptor in DNA binding and transrepressing functions. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 65, 117-123.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological reviews* 58, 685-704.
- Gilson, H., Schakman, O., Combaret, L., Lause, P., Grobet, L., Attaix, D., Ketelslegers, J.M., and Thissen, J.P. (2007). Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 148, 452-460.
- Gingras, A.C., Kennedy, S.G., O'Leary, M.A., Sonenberg, N., and Hay, N. (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes & development* 12, 502-513.
- Glass, C.K., and Saijo, K. (2010). Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nature reviews Immunology* 10, 365-376.
- Glass, D.J. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 1974-1984.
- Glass, D.J. (2010). PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Current topics in microbiology and immunology* 346, 267-278.
- Goldberg, A.L. (1969). Protein turnover in skeletal muscle. II. Effects of denervation and cortisone on protein catabolism in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* 244, 3223-3229.
- Goljanek-Whysall, K., Iwanejko, L.A., Vasilaki, A., Pekovic-Vaughan, V., and McDonagh, B. (2016). Ageing in relation to skeletal muscle dysfunction: redox homeostasis to regulation of gene expression. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological reviews* 83, 731-801.
- Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A., and Goldberg, A.L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14440-14445.

- Gonnella, P., Alamdari, N., Tizio, S., Aversa, Z., Petkova, V., and Hasselgren, P.O. (2011). C/EBPbeta regulates dexamethasone-induced muscle cell atrophy and expression of atrogin-1 and MuRF1. *Journal of cellular biochemistry* 112, 1737-1748.
- Gonzalez, E., and McGraw, T.E. (2009). Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 7004-7009.
- Goodman, C.A. (2014). The role of mTORC1 in regulating protein synthesis and skeletal muscle mass in response to various mechanical stimuli. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 166, 43-95.
- Goodyear, L.J., Chang, P.Y., Sherwood, D.J., Dufresne, S.D., and Moller, D.E. (1996). Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 271, E403-408.
- Gordon, A.M., Homsher, E., and Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological reviews* 80, 853-924.
- Gordon, B.S., Kelleher, A.R., and Kimball, S.R. (2013). Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 2147-2157.
- Govindan, M.V. (2010). Recruitment of cAMP-response element-binding protein and histone deacetylase has opposite effects on glucocorticoid receptor gene transcription. *The Journal of biological chemistry* 285, 4489-4510.
- Granner, D.K., Wang, J.C., and Yamamoto, K.R. (2015). Regulatory Actions of Glucocorticoid Hormones: From Organisms to Mechanisms. *Advances in experimental medicine and biology* 872, 3-31.
- Greer, E.L., Dowlatshahi, D., Banko, M.R., Villen, J., Hoang, K., Blanchard, D., Gygi, S.P., and Brunet, A. (2007). An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Current biology : CB* 17, 1646-1656.
- Gregorio, C.C., Perry, C.N., and McElhinny, A.S. (2005). Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *Journal of muscle research and cell motility* 26, 389-400.
- Griggs, R.C., Moxley, R.T., 3rd, Mendell, J.R., Fenichel, G.M., Brooke, M.H., Pestronk, A., Miller, J.P., Cwik, V.A., Pandya, S., Robison, J., *et al.* (1993). Duchenne dystrophy: randomized, controlled trial of prednisone (18 months) and azathioprine (12 months). *Neurology* 43, 520-527.
- Grobet, L., Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., *et al.* (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature genetics* 17, 71-74.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature reviews Drug discovery* 3, 950-964.
- Gronroos, E., Kingston, I.J., Ramachandran, A., Randall, R.A., Vizan, P., and Hill, C.S. (2012). Transforming growth factor beta inhibits bone morphogenetic protein-induced transcription through novel phosphorylated Smad1/5-Smad3 complexes. *Molecular and cellular biology* 32, 2904-2916.
- Grontved, L., John, S., Baek, S., Liu, Y., Buckley, J.R., Vinson, C., Aguilera, G., and Hager, G.L. (2013). C/EBP maintains chromatin accessibility in liver and facilitates glucocorticoid receptor recruitment to steroid response elements. *The EMBO journal* 32, 1568-1583.
- Gross, D.N., Wan, M., and Birnbaum, M.J. (2009). The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Current diabetes reports* 9, 208-214.
- Grounds, M.D., and Torrisi, J. (2004). Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J* 18, 676-682.
- Grumati, P., Coletto, L., Schiavinato, A., Castagnaro, S., Bertaggia, E., Sandri, M., and Bonaldo, P. (2011). Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. *Autophagy* 7, 1415-1423.
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Developmental cell* 11, 859-871.

- Gumerson, J.D., and Michele, D.E. (2011). The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 210797.
- Gundersen, K. (2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 86, 564-600.
- Gupte, R., Muse, G.W., Chinenov, Y., Adelman, K., and Rogatsky, I. (2013). Glucocorticoid receptor represses proinflammatory genes at distinct steps of the transcription cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 14616-14621.
- Gurd, B.J. (2011). Deacetylation of PGC-1alpha by SIRT1: importance for skeletal muscle function and exercise-induced mitochondrial biogenesis. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 36, 589-597.
- Guzun, R., and Saks, V. (2010). Application of the principles of systems biology and Wiener's cybernetics for analysis of regulation of energy fluxes in muscle cells in vivo. *International journal of molecular sciences* 11, 982-1019.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* 30, 214-226.
- Hamrick, M.W., Arounleut, P., Kellum, E., Cain, M., Immel, D., and Liang, L.F. (2010). Recombinant myostatin (GDF-8) propeptide enhances the repair and regeneration of both muscle and bone in a model of deep penetrant musculoskeletal injury. *J Trauma* 69, 579-583.
- Han, H.Q., Zhou, X., Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (2013). Myostatin/activin pathway antagonism: molecular basis and therapeutic potential. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 2333-2347.
- Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M.T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q.P., Kasuga, M., Nishimoto, I., and Avruch, J. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *The Journal of biological chemistry* 272, 26457-26463.
- Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlman, K., Freedman, L.P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K.R., Gustafsson, J.A., and Kaptein, R. (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 249, 157-160.
- Hardt, S.E., Tomita, H., Katus, H.A., and Sadoshima, J. (2004). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2Bepsilon by glycogen synthase kinase-3beta regulates beta-adrenergic cardiac myocyte hypertrophy. *Circulation research* 94, 926-935.
- Hardy, M.P., Gao, H.B., Dong, Q., Ge, R., Wang, Q., Chai, W.R., Feng, X., and Sottas, C. (2005). Stress hormone and male reproductive function. *Cell and tissue research* 322, 147-153.
- Hasselgren, P.O. (1999). Glucocorticoids and muscle catabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2, 201-205.
- Hawkins, U.A., Gomez-Sanchez, E.P., Gomez-Sanchez, C.M., and Gomez-Sanchez, C.E. (2012). The ubiquitous mineralocorticoid receptor: clinical implications. *Current hypertension reports* 14, 573-580.
- Hawley, J.A., Burke, L.M., Phillips, S.M., and Spriet, L.L. (2011). Nutritional modulation of training-induced skeletal muscle adaptations. *Journal of applied physiology* 110, 834-845.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L., *et al.* (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89, 1165-1173.
- Hayashi, T., Hirshman, M.F., Dufresne, S.D., and Goodyear, L.J. (1999). Skeletal muscle contractile activity in vitro stimulates mitogen-activated protein kinase signaling. *Am J Physiol-Cell Ph* 277, C701-C707.
- Haycock, J.W., MacNeil, S., Jones, P., Harris, J.B., and Mantle, D. (1996). Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *Neuroreport* 8, 357-361.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* 26, 203-234.
- He, Y.J., Hakvoort, T.B.M., Kohler, S.E., Vermeulen, J.L.M., de Waart, D.R., de Theije, C., ten Have, G.A.M., van Eijk, H.M.H., Kunne, C., Labruyere, W.T., *et al.* (2010). Glutamine Synthetase in Muscle Is

- Required for Glutamine Production during Fasting and Extrahepatic Ammonia Detoxification. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 9516-9524.
- Heier, C.R., Damsker, J.M., Yu, Q., Dillingham, B.C., Huynh, T., Van der Meulen, J.H., Sali, A., Miller, B.K., Phadke, A., Scheffer, L., *et al.* (2013). VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. *EMBO molecular medicine* **5**, 1569-1585.
- Herbst, K.L., and Bhasin, S. (2004). Testosterone action on skeletal muscle. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **7**, 271-277.
- Hermann, M., and Berger, P. (2001). Hormonal changes in aging men: a therapeutic indication? *Experimental gerontology* **36**, 1075-1082.
- Hershey, J.W., Sonenberg, N., and Mathews, M.B. (2012). Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**.
- Higaki, Y., Mikami, T., Fujii, N., Hirshman, M.F., Koyama, K., Seino, T., Tanaka, K., and Goodyear, L.J. (2008). Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **294**, E889-897.
- Ho, R.C., Hirshman, M.F., Li, Y., Cai, D., Farmer, J.R., Aschenbach, W.G., Witczak, C.A., Shoelson, S.E., and Goodyear, L.J. (2005). Regulation of I κ B kinase and NF- κ B in contracting adult rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C794-801.
- Hoffman, E.P., and Nader, G.A. (2004). Balancing muscle hypertrophy and atrophy. *Nature medicine* **10**, 584-585.
- Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Ookawara, T., Ohno, H., and Ji, L.L. (2001). Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **442**, 426-434.
- Horber, F.F., Scheidegger, J.R., Grunig, B.E., and Frey, F.J. (1985). Thigh muscle mass and function in patients treated with glucocorticoids. *European journal of clinical investigation* **15**, 302-307.
- Howald, H. (1974). [Effects of sport activities on the metabolism]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* **104**, 1535-1538.
- Hu, Z., Wang, H., Lee, I.H., Du, J., and Mitch, W.E. (2009). Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 3059-3069.
- Hua, G., Ganti, K.P., and Chambon, P. (2016a). Glucocorticoid-induced tethered transrepression requires SUMOylation of GR and formation of a SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E635-643.
- Hua, G., Paulen, L., and Chambon, P. (2016b). GR SUMOylation and formation of an SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex is mandatory for GC-induced IR nGRE-mediated transrepression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E626-634.
- Huang, J., and Manning, B.D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *The Biochemical journal* **412**, 179-190.
- Hudson, W.H., Youn, C., and Ortlund, E.A. (2013). The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nature structural & molecular biology* **20**, 53-58.
- Hunter, C.A., and Jones, S.A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology* **16**, 448-457.
- Hunter, R.B., Stevenson, E., Koncarevic, A., Mitchell-Felton, H., Essig, D.A., and Kandarian, S.C. (2002). Activation of an alternative NF- κ B pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 529-538.
- Huntington, J.A. (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH 9 Suppl 1*, 26-34.
- Huxley, H.E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science* **164**, 1356-1365.

- Ibebunjo, C., Chick, J.M., Kendall, T., Eash, J.K., Li, C., Zhang, Y., Vickers, C., Wu, Z., Clarke, B.A., Shi, J., *et al.* (2013). Genomic and proteomic profiling reveals reduced mitochondrial function and disruption of the neuromuscular junction driving rat sarcopenia. *Molecular and cellular biology* 33, 194-212.
- Iezzi, S., Di Padova, M., Serra, C., Caretti, G., Simone, C., Maklan, E., Minetti, G., Zhao, P., Hoffman, E.P., Puri, P.L., *et al.* (2004). Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Developmental cell* 6, 673-684.
- Imae, M., Fu, Z., Yoshida, A., Noguchi, T., and Kato, H. (2003). Nutritional and hormonal factors control the gene expression of FoxOs, the mammalian homologues of DAF-16. *J Mol Endocrinol* 30, 253-262.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389, 622-626.
- Inder, W.J., Jang, C., Obeyesekere, V.R., and Alford, F.P. (2010). Dexamethasone administration inhibits skeletal muscle expression of the androgen receptor and IGF-1--implications for steroid-induced myopathy. *Clinical endocrinology* 73, 126-132.
- Ing, N.H. (2005). Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biology of reproduction* 72, 1290-1296.
- Ing, N.H., Forrest, D.W., Riggs, P.K., Loux, S., Love, C.C., Brinsko, S.P., Varner, D.D., and Welsh, T.H., Jr. (2014). Dexamethasone acutely down-regulates genes involved in steroidogenesis in stallion testes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 143, 451-459.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* 4, 648-657.
- Isikbay, M., Otto, K., Kregel, S., Kach, J., Cai, Y., Vander Griend, D.J., Conzen, S.D., and Szmulewitz, R.Z. (2014). Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer. *Hormones & cancer* 5, 72-89.
- Izumiya, Y., Bina, H.A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., and Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS letters* 582, 3805-3810.
- Jaaskelainen, T., Makkonen, H., and Palvimo, J.J. (2011). Steroid up-regulation of FKBP51 and its role in hormone signaling. *Curr Opin Pharmacol* 11, 326-331.
- Jackman, R.W., Cornwell, E.W., Wu, C.L., and Kandarian, S.C. (2013). Nuclear factor-kappaB signalling and transcriptional regulation in skeletal muscle atrophy. *Experimental physiology* 98, 19-24.
- Jackman, R.W., and Kandarian, S.C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C834-843.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 113-127.
- Jacobs, S.C., Wokke, J.H., Bar, P.R., and Bootsma, A.L. (1995). Satellite cell activation after muscle damage in young and adult rats. *The Anatomical record* 242, 329-336.
- Jagoe, R.T., Lecker, S.H., Gomes, M., and Goldberg, A.L. (2002). Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, 1697-1712.
- Jamart, C., Benoit, N., Raymackers, J.M., Kim, H.J., Kim, C.K., and Francaux, M. (2012). Autophagy-related and autophagy-regulatory genes are induced in human muscle after ultraendurance exercise. *European journal of applied physiology* 112, 3173-3177.
- Janssen, P.M., Murray, J.D., Schill, K.E., Rastogi, N., Schultz, E.J., Tran, T., Raman, S.V., and Rafael-Fortney, J.A. (2014). Prednisolone attenuates improvement of cardiac and skeletal contractile function and histopathology by lisinopril and spironolactone in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *PloS one* 9, e88360.
- Jantzen, H.M., Strahle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicsek, R., and Schutz, G. (1987). Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 49, 29-38.
- Jean-Baptiste, G., Yang, Z., Khoury, C., Gaudio, S., and Greenwood, M.T. (2005). Peptide and non-peptide G-protein coupled receptors (GPCRs) in skeletal muscle. *Peptides* 26, 1528-1536.
- Jeukendrup, A.E. (2002). Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci* 967, 217-235.

- Ji, L.L., Gomez-Cabrera, M.C., Steinhafel, N., and Vina, J. (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1499-1506.
- Ji, L.L., Gomez-Cabrera, M.C., and Vina, J. (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 425-435.
- Jiang, C.L., Liu, L., Li, Z., and Buttgerit, F. (2015). The novel strategy of glucocorticoid drug development via targeting nongenomic mechanisms. *Steroids* 102, 27-31.
- Jin, J.L., Guo, Y.L., and Li, J.J. (2016). Apoprotein C-III: A review of its clinical implications. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 460, 50-54.
- Joazeiro, C.A., Wing, S.S., Huang, H., Leverson, J.D., Hunter, T., and Liu, Y.C. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286, 309-312.
- Johansen, J.A., Breedlove, S.M., and Jordan, C.L. (2007). Androgen receptor expression in the levator ani muscle of male mice. *Journal of neuroendocrinology* 19, 823-826.
- John, S., Sabo, P.J., Thurman, R.E., Sung, M.H., Biddie, S.C., Johnson, T.A., Hager, G.L., and Stamatoyannopoulos, J.A. (2011). Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nature genetics* 43, 264-268.
- Joubert, Y., and Tobin, C. (1995). Testosterone treatment results in quiescent satellite cells being activated and recruited into cell cycle in rat levator ani muscle. *Developmental biology* 169, 286-294.
- Judge, S.M., Wu, C.L., Beharry, A.W., Roberts, B.M., Ferreira, L.F., Kandarian, S.C., and Judge, A.R. (2014). Genome-wide identification of FoxO-dependent gene networks in skeletal muscle during C26 cancer cachexia. *BMC cancer* 14, 997.
- Kadmiel, M., and Cidlowski, J.A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in pharmacological sciences* 34, 518-530.
- Kamanga-Sollo, E., White, M.E., Hathaway, M.R., Weber, W.J., and Dayton, W.R. (2011). Effect of trenbolone acetate on protein synthesis and degradation rates in fused bovine satellite cell cultures. *Domestic animal endocrinology* 40, 60-66.
- Kamei, Y., Hattori, M., Hatazawa, Y., Kasahara, T., Kanou, M., Kanai, S., Yuan, X., Suganami, T., Lamers, W.H., Kitamura, T., *et al.* (2014). FOXO1 activates glutamine synthetase gene in mouse skeletal muscles through a region downstream of 3'-UTR: possible contribution to ammonia detoxification. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 307, E485-493.
- Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., *et al.* (2004). Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *The Journal of biological chemistry* 279, 41114-41123.
- Kamura, T., Koepf, D.M., Conrad, M.N., Skowrya, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Jr., Elledge, S.J., Conaway, R.C., *et al.* (1999). Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 284, 657-661.
- Kang, C., O'Moore, K.M., Dickman, J.R., and Ji, L.L. (2009). Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha signaling is redox sensitive. *Free radical biology & medicine* 47, 1394-1400.
- Karin, M., and Gallagher, E. (2005). From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB life* 57, 283-295.
- Katsanos, C.S., Madura, J.A., 2nd, and Roust, L.R. (2016). Essential amino acid ingestion as an efficient nutritional strategy for the preservation of muscle mass following gastric bypass surgery. *Nutrition* 32, 9-13.
- Keren, A., Tamir, Y., and Bengal, E. (2006). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Molecular and cellular endocrinology* 252, 224-230.
- Kerr, J.P., Ward, C.W., and Bloch, R.J. (2014). Dysferlin at transverse tubules regulates Ca(2+) homeostasis in skeletal muscle. *Frontiers in physiology* 5, 89.
- Kersten, S. (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica et biophysica acta* 1841, 919-933.

- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* *110*, 163-175.
- Kim, J.S., Saengsirisuwan, V., Sloniger, J.A., Teachey, M.K., and Henriksen, E.J. (2006). Oxidant stress and skeletal muscle glucose transport: Roles of insulin signaling and p38 MAPK. *Free Radical Bio Med* *41*, 818-824.
- Kim, Y.A., Kim, Y.S., and Song, W. (2012). Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. *Journal of physiology and biochemistry* *68*, 229-235.
- Kissel, J.T., Lynn, D.J., Rammohan, K.W., Klein, J.P., Griggs, R.C., Moxley, R.T., 3rd, Cwik, V.A., Brooke, M.H., and Mendell, J.R. (1993). Mononuclear cell analysis of muscle biopsies in prednisone- and azathioprine-treated Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* *43*, 532-536.
- Kleiner, S., Nguyen-Tran, V., Bare, O., Huang, X., Spiegelman, B., and Wu, Z. (2009). PPAR δ agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1 α but does not increase mitochondrial gene expression and function. *The Journal of biological chemistry* *284*, 18624-18633.
- Klieber, M.A., Underhill, C., Hammond, G.L., and Muller, Y.A. (2007). Corticosteroid-binding globulin, a structural basis for steroid transport and proteinase-triggered release. *The Journal of biological chemistry* *282*, 29594-29603.
- Koh, A., Lee, M.N., Yang, Y.R., Jeong, H., Ghim, J., Noh, J., Kim, J., Ryu, D., Park, S., Song, P., *et al.* (2013). C1-Ten is a protein tyrosine phosphatase of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), regulating IRS-1 stability and muscle atrophy. *Molecular and cellular biology* *33*, 1608-1620.
- Komamura, K., Shirotani-Ikejima, H., Tatsumi, R., Tsujita-Kuroda, Y., Kitakaze, M., Miyatake, K., Sunagawa, K., and Miyata, T. (2003). Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovasc Drugs Ther* *17*, 303-310.
- Kostyo, J.L., and Redmond, A.F. (1966). Role of protein synthesis in the inhibitory action of adrenal steroid hormones on amino acid transport by muscle. *Endocrinology* *79*, 531-540.
- Kramer, H.F., and Goodyear, L.J. (2007). Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *Journal of applied physiology* *103*, 388-395.
- Kudryashova, E., Kramerova, I., and Spencer, M.J. (2012). Satellite cell senescence underlies myopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2H. *The Journal of clinical investigation* *122*, 1764-1776.
- Kudryashova, E., Kudryashov, D., Kramerova, I., and Spencer, M.J. (2005). Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. *J Mol Biol* *354*, 413-424.
- Kukreti, H., Amuthavalli, K., Harikumar, A., Sathiyamoorthy, S., Feng, P.Z., Anantharaj, R., Tan, S.L., Lokireddy, S., Bonala, S., Sriram, S., *et al.* (2013). Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. *The Journal of biological chemistry* *288*, 6663-6678.
- Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A.M., and Aggarwal, B.B. (2004). Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *Journal of molecular medicine* *82*, 434-448.
- Kumari, R., Willing, L.B., Jefferson, L.S., Simpson, I.A., and Kimball, S.R. (2011). REDD1 (regulated in development and DNA damage response 1) expression in skeletal muscle as a surrogate biomarker of the efficiency of glucocorticoid receptor blockade. *Biochemical and biophysical research communications* *412*, 644-647.
- Kunkel, S.D., Suneja, M., Ebert, S.M., Bongers, K.S., Fox, D.K., Malmberg, S.E., Alipour, F., Shields, R.K., and Adams, C.M. (2011). mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell metabolism* *13*, 627-638.
- Kuo, T., Lew, M.J., Mayba, O., Harris, C.A., Speed, T.P., and Wang, J.C. (2012). Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 11160-11165.
- Kuo, T., McQueen, A., Chen, T.C., and Wang, J.C. (2015). Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Advances in experimental medicine and biology* *872*, 99-126.

- Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews* *81*, 807-869.
- la Fleur, S.E. (2006). The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. *Physiology & behavior* *89*, 110-114.
- Lach-Trifilieff, E., Minetti, G.C., Sheppard, K., Ibebunjo, C., Feige, J.N., Hartmann, S., Brachat, S., Rivet, H., Koelbing, C., Morvan, F., *et al.* (2014). An antibody blocking activin type II receptors induces strong skeletal muscle hypertrophy and protects from atrophy. *Molecular and cellular biology* *34*, 606-618.
- Lagirand-Cantaloube, J., Cornille, K., Csibi, A., Batonnet-Pichon, S., Leibovitch, M.P., and Leibovitch, S.A. (2009). Inhibition of atrogen-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. *PLoS one* *4*, e4973.
- Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D., and Daegelen, D. (2008). Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS One* *3*, e3910.
- Lai, K.M., Gonzalez, M., Poueymirou, W.T., Kline, W.O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T.N., Economides, A.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2004). Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Molecular and cellular biology* *24*, 9295-9304.
- Lai, Y.C., Kviklyte, S., Vertommen, D., Lantier, L., Foretz, M., Viollet, B., Hallen, S., and Rider, M.H. (2014). A small-molecule benzimidazole derivative that potently activates AMPK to increase glucose transport in skeletal muscle: comparison with effects of contraction and other AMPK activators. *The Biochemical journal* *460*, 363-375.
- Lamming, D.W., Ye, L., Katajisto, P., Goncalves, M.D., Saitoh, M., Stevens, D.M., Davis, J.G., Salmon, A.B., Richardson, A., Ahima, R.S., *et al.* (2012). Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* *335*, 1638-1643.
- Lamon, S., Wallace, M.A., and Russell, A.P. (2014). The STARS signaling pathway: a key regulator of skeletal muscle function. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* *466*, 1659-1671.
- Lang, C.H., Silvis, C., Nystrom, G., and Frost, R.A. (2001). Regulation of myostatin by glucocorticoids after thermal injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *15*, 1807-1809.
- Langlais, D., Couture, C., Balsalobre, A., and Drouin, J. (2012). The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome. *Molecular cell* *47*, 38-49.
- Lapierre, L.R., Kumsta, C., Sandri, M., Ballabio, A., and Hansen, M. (2015). Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy* *11*, 867-880.
- Le Rumeur, E., Winder, S.J., and Hubert, J.F. (2010). Dystrophin: more than just the sum of its parts. *Biochimica et biophysica acta* *1804*, 1713-1722.
- Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S.R., Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *18*, 39-51.
- Lee, D., and Goldberg, A.L. (2013). SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. *The Journal of biological chemistry* *288*, 30515-30526.
- Lee, S.J. (2007). Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS one* *2*, e789.
- Lee, S.J., and McPherron, A.C. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 9306-9311.
- Lee, S.R., Kim, H.K., Youm, J.B., Dizon, L.A., Song, I.S., Jeong, S.H., Seo, D.Y., Ko, K.S., Rhee, B.D., Kim, N., *et al.* (2012). Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* *464*, 549-559.
- Lee, W.J. (2009). Insulin-like growth factor-I-induced androgen receptor activation is mediated by the PI3K/Akt pathway in C2C12 skeletal muscle cells. *Molecules and cells* *28*, 495-499.
- Levin, O.S., Polunina, A.G., Demyanova, M.A., and Isaev, F.V. (2014). Steroid myopathy in patients with chronic respiratory diseases. *Journal of the neurological sciences* *338*, 96-101.

- Li, H.H., Kedar, V., Zhang, C., McDonough, H., Arya, R., Wang, D.Z., and Patterson, C. (2004). Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *The Journal of clinical investigation* *114*, 1058-1071.
- Li, H.H., Willis, M.S., Lockyer, P., Miller, N., McDonough, H., Glass, D.J., and Patterson, C. (2007). Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins. *The Journal of clinical investigation* *117*, 3211-3223.
- Li, Y.P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D.L., and Reid, M.B. (2005). TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *19*, 362-370.
- Li, Y.P., Chen, Y., Li, A.S., and Reid, M.B. (2003). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* *285*, C806-812.
- Light, N., and Champion, A.E. (1984). Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *The Biochemical journal* *219*, 1017-1026.
- Lightman, S.L., and Conway-Campbell, B.L. (2010). The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nature reviews Neuroscience* *11*, 710-718.
- Liu, C.M., Yang, Z., Liu, C.W., Wang, R., Tien, P., Dale, R., and Sun, L.Q. (2007). Effect of RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Cancer gene therapy* *14*, 945-952.
- Liu, Z., Li, G., Kimball, S.R., Jahn, L.A., and Barrett, E.J. (2004). Glucocorticoids modulate amino acid-induced translation initiation in human skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *287*, E275-281.
- Lluis, F., Perdiguero, E., Nebreda, A.R., and Munoz-Canoves, P. (2006). Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. *Trends in cell biology* *16*, 36-44.
- Lokireddy, S., Wijesoma, I.W., Teng, S., Bonala, S., Gluckman, P.D., McFarlane, C., Sharma, M., and Kambadur, R. (2012). The ubiquitin ligase Mul1 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli. *Cell metabolism* *16*, 613-624.
- Lu, T., Huang, C.C., Lu, Y.C., Lin, K.L., Liu, S.I., Wang, B.W., Chang, P.M., Chen, I.S., Chen, S.S., Tsai, J.Y., *et al.* (2009). Desipramine-induced Ca-independent apoptosis in Mg63 human osteosarcoma cells: dependence on P38 mitogen-activated protein kinase-regulated activation of caspase 3. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* *36*, 297-303.
- Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., and Sigler, P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* *352*, 497-505.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., and Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature reviews Neuroscience* *10*, 434-445.
- Lutzner, N., Kalbacher, H., Krones-Herzig, A., and Rosl, F. (2012). FOXO3 is a glucocorticoid receptor target and regulates LKB1 and its own expression based on cellular AMP levels via a positive autoregulatory loop. *PloS one* *7*, e42166.
- Ma, K., Mallidis, C., Artaza, J., Taylor, W., Gonzalez-Cadavid, N., and Bhasin, S. (2001). Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *281*, E1128-1136.
- Ma, K., Mallidis, C., Bhasin, S., Mahabadi, V., Artaza, J., Gonzalez-Cadavid, N., Arias, J., and Salehian, B. (2003). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *285*, E363-371.
- Ma, X.M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews Molecular cell biology* *10*, 307-318.
- Mackrell, J.G., Yaden, B.C., Bullock, H., Chen, K., Shetler, P., Bryant, H.U., and Krishnan, V. (2015). Molecular targets of androgen signaling that characterize skeletal muscle recovery and regeneration. *Nucl Recept Signal* *13*, e005.
- MacLean, H.E., Chiu, W.S., Notini, A.J., Axell, A.M., Davey, R.A., McManus, J.F., Ma, C., Plant, D.R., Lynch, G.S., and Zajac, J.D. (2008). Impaired skeletal muscle development and function in male, but not

- female, genomic androgen receptor knockout mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**, 2676-2689.
- MacLean, H.E., and Handelsman, D.J. (2009). Unraveling androgen action in muscle: genetic tools probing cellular mechanisms. *Endocrinology* **150**, 3437-3439.
- Mahoney, D.J., Carey, K., Fu, M.H., Snow, R., Cameron-Smith, D., Parise, G., and Tarnopolsky, M.A. (2004). Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiological genomics* **18**, 226-231.
- Mahoney, D.J., Parise, G., Melov, S., Safdar, A., and Tarnopolsky, M.A. (2005). Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 1498-1500.
- Mahoney, D.J., Safdar, A., Parise, G., Melov, S., Fu, M., MacNeil, L., Kaczor, J., Payne, E.T., and Tarnopolsky, M.A. (2008). Gene expression profiling in human skeletal muscle during recovery from eccentric exercise. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* **294**, R1901-1910.
- Makara, G.B., and Haller, J. (2001). Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Progress in neurobiology* **65**, 367-390.
- Malicdan, M.C., Noguchi, S., Nonaka, I., Saftig, P., and Nishino, I. (2008). Lysosomal myopathies: an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle. *Neuromuscular disorders : NMD* **18**, 521-529.
- Malik, V., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., Wall, C., King, W., Al-Dahhak, R., Lewis, S., Shilling, C.J., Kota, J., Serrano-Munuera, C., *et al.* (2010). Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of neurology* **67**, 771-780.
- Malovannaya, A., Lanz, R.B., Jung, S.Y., Bulynko, Y., Le, N.T., Chan, D.W., Ding, C., Shi, Y., Yucer, N., Krenciute, G., *et al.* (2011). Analysis of the human endogenous coregulator complexome. *Cell* **145**, 787-799.
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., *et al.* (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* **6**, 458-471.
- Manzur, A.Y., Kuntzer, T., Pike, M., and Swan, A. (2008). Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD003725.
- Martineau, L.C., and Gardiner, P.F. (2001). Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. *Journal of applied physiology* **91**, 693-702.
- Martinerie, L., Munier, M., Le Menuet, D., Meduri, G., Viengchareun, S., and Lombes, M. (2013). The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: expression, regulation and pathophysiological implications. *Biochimie* **95**, 148-157.
- Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S., and Sandri, M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell metabolism* **10**, 507-515.
- Massague, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes & development* **19**, 2783-2810.
- Matsumoto, A., Arai, Y., and Prins, G.S. (1996). Androgenic regulation of androgen receptor immunoreactivity in motoneurons of the spinal nucleus of the bulbocavernosus of male rats. *Journal of neuroendocrinology* **8**, 553-559.
- Mazelin, L., Panthu, B., Nicot, A.S., Belotti, E., Tintignac, L., Teixeira, G., Zhang, Q., Risson, V., Baas, D., Delaune, E., *et al.* (2016). mTOR inactivation in myocardium from infant mice rapidly leads to dilated cardiomyopathy due to translation defects and p53/JNK-mediated apoptosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*.
- Mazziotti, G., and Giustina, A. (2013). Glucocorticoids and the regulation of growth hormone secretion. *Nat Rev Endocrinol* **9**, 265-276.
- McBride, J.A., Carson, C.C., 3rd, and Coward, R.M. (2016). Testosterone deficiency in the aging male. *Therapeutic advances in urology* **8**, 47-60.

- McCall, G.E., Byrnes, W.C., Dickinson, A., Pattany, P.M., and Fleck, S.J. (1996). Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. *Journal of applied physiology* *81*, 2004-2012.
- McClung, J.M., Judge, A.R., Powers, S.K., and Yan, Z. (2010). p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol* *298*, C542-549.
- McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M., and Kambadur, R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of cell biology* *162*, 1135-1147.
- McElhinny, A.S., Kazmierski, S.T., Labeit, S., and Gregorio, C.C. (2003). Nebulin: the nebulous, multifunctional giant of striated muscle. *Trends in cardiovascular medicine* *13*, 195-201.
- McFarlane, C., Hennebry, A., Thomas, M., Plummer, E., Ling, N., Sharma, M., and Kambadur, R. (2008). Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Experimental cell research* *314*, 317-329.
- McGee, S.L., and Hargreaves, M. (2006). Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanisms. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* *33*, 395-399.
- McInerney, E.M., Rose, D.W., Flynn, S.E., Westin, S., Mullen, T.M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R.T., Assa-Munt, N., *et al.* (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes & development* *12*, 3357-3368.
- McKay, L.I., DuBois, D.C., Sun, Y.N., Almon, R.R., and Jusko, W.J. (1997). Corticosteroid effects in skeletal muscle: gene induction/receptor autoregulation. *Muscle & nerve* *20*, 1318-1320.
- McKenna, N.J., Cooney, A.J., DeMayo, F.J., Downes, M., Glass, C.K., Lanz, R.B., Lazar, M.A., Mangelsdorf, D.J., Moore, D.D., Qin, J., *et al.* (2009). Minireview: Evolution of NURSA, the Nuclear Receptor Signaling Atlas. *Molecular endocrinology* *23*, 740-746.
- McMillan, E.M., Pare, M.F., Baechler, B.L., Graham, D.A., Rush, J.W., and Quadrilatero, J. (2015). Autophagic signaling and proteolytic enzyme activity in cardiac and skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats following chronic aerobic exercise. *PLoS one* *10*, e0119382.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* *387*, 83-90.
- McPherron, A.C., and Lee, S.J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 12457-12461.
- Meijsing, S.H. (2015). Mechanisms of Glucocorticoid-Regulated Gene Transcription. *Advances in experimental medicine and biology* *872*, 59-81.
- Meijsing, S.H., Pufall, M.A., So, A.Y., Bates, D.L., Chen, L., and Yamamoto, K.R. (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* *324*, 407-410.
- Merienne, K., Pannetier, S., Harel-Bellan, A., and Sassone-Corsi, P. (2001). Mitogen-regulated RSK2-CBP interaction controls their kinase and acetylase activities. *Molecular and cellular biology* *21*, 7089-7096.
- Merry, T.L., and Ristow, M. (2015). Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training? *The Journal of physiology*.
- Miller, B.F. (2007). Human muscle protein synthesis after physical activity and feeding. *Exercise and sport sciences reviews* *35*, 50-55.
- Minetti, G.C., Feige, J.N., Rosenstiel, A., Bombard, F., Meier, V., Werner, A., Bassilana, F., Sailer, A.W., Kahle, P., Lambert, C., *et al.* (2011). Galphai2 signaling promotes skeletal muscle hypertrophy, myoblast differentiation, and muscle regeneration. *Science signaling* *4*, ra80.
- Mitch, W.E., Clark, A.S., and May, R.C. (1985). Relationships between protein degradation and glucose metabolism in skeletal muscle. *Progress in clinical and biological research* *180*, 623-625.
- Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (1996). Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med* *335*, 1897-1905.
- Mitre-Aguilar, I.B., Cabrera-Quintero, A.J., and Zentella-Dehesa, A. (2015). Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* *8*, 1-10.

- Mittal, A., Bhatnagar, S., Kumar, A., Lach-Trifilieff, E., Wauters, S., Li, H., Makonchuk, D.Y., Glass, D.J., and Kumar, A. (2010). The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *The Journal of cell biology* 188, 833-849.
- Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2002). Id: a target of BMP signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2002, pe40.
- Mofarrah, M., Sigala, I., Guo, Y., Godin, R., Davis, E.C., Petrof, B., Sandri, M., Buelle, Y., and Hussain, S.N. (2012). Autophagy and skeletal muscles in sepsis. *PloS one* 7, e47265.
- Monroy, J.A., Powers, K.L., Gilmore, L.A., Uyeno, T.A., Lindstedt, S.L., and Nishikawa, K.C. (2012). What is the role of titin in active muscle? *Exercise and sport sciences reviews* 40, 73-78.
- Morrison, J., Lu, Q.L., Pastoret, C., Partridge, T., and Bou-Gharios, G. (2000). T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. *Lab Invest* 80, 881-891.
- Mounier, R., Theret, M., Lantier, L., Foretz, M., and Viollet, B. (2015). Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 26, 275-286.
- Mourkioti, F., Kratsios, P., Luedde, T., Song, Y.H., Delafontaine, P., Adami, R., Parente, V., Bottinelli, R., Pasparakis, M., and Rosenthal, N. (2006). Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *The Journal of clinical investigation* 116, 2945-2954.
- Mrosek, M., Meier, S., Ucurum-Fotiadis, Z., von Castelmur, E., Hedbom, E., Lustig, A., Grzesiek, S., Labeit, D., Labeit, S., and Mayans, O. (2008). Structural analysis of B-Box 2 from MuRF1: identification of a novel self-association pattern in a RING-like fold. *Biochemistry* 47, 10722-10730.
- Murton, A.J., Constantin, D., and Greenhaff, P.L. (2008). The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochimica et biophysica acta* 1782, 730-743.
- Musaro, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Rosenthal, N. (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature genetics* 27, 195-200.
- Muscaritoli, M., Anker, S.D., Argiles, J., Aversa, Z., Bauer, J.M., Biolo, G., Boirie, Y., Bosaeus, I., Cederholm, T., Costelli, P., *et al.* (2010). Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". *Clinical nutrition* 29, 154-159.
- Nader, G.A., and Esser, K.A. (2001). Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *Journal of applied physiology* 90, 1936-1942.
- Nagasawa, T., and Funabiki, R. (1981). Quantitative determination of urinary N-tau-methylhistidine output as an index of myofibrillar protein degradation. *Journal of biochemistry* 89, 1155-1161.
- Nakamura, A., and Takeda, S. (2011). Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 184393.
- Nakamura, M.T., Yudell, B.E., and Loor, J.J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in lipid research* 53, 124-144.
- Nakao, R., Hirasaka, K., Goto, J., Ishidoh, K., Yamada, C., Ohno, A., Okumura, Y., Nonaka, I., Yasutomo, K., Baldwin, K.M., *et al.* (2009). Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol* 29, 4798-4811.
- Nakashima, K., and Yakabe, Y. (2007). AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1650-1656.
- Neuhof, C., and Neuhof, H. (2014). Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World journal of cardiology* 6, 638-652.
- Newton, R., and Holden, N.S. (2007). Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? *Mol Pharmacol* 72, 799-809.
- Nixon, M., Andrew, R., and Chapman, K.E. (2013). It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions. *Steroids* 78, 59-68.

- Notini, A.J., Davey, R.A., McManus, J.F., Bate, K.L., and Zajac, J.D. (2005). Genomic actions of the androgen receptor are required for normal male sexual differentiation in a mouse model. *J Mol Endocrinol* 35, 547-555.
- O'Leary, M.F., Vainshtein, A., Carter, H.N., Zhang, Y., and Hood, D.A. (2012). Denervation-induced mitochondrial dysfunction and autophagy in skeletal muscle of apoptosis-deficient animals. *Am J Physiol Cell Physiol* 303, C447-454.
- O'Neill, H.M., Lally, J.S., Galic, S., Thomas, M., Azizi, P.D., Fullerton, M.D., Smith, B.K., Pulinilkunnil, T., Chen, Z., Samaan, M.C., *et al.* (2014). AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 57, 1693-1702.
- Oakley, R.H., and Cidlowski, J.A. (1993). Homologous down regulation of the glucocorticoid receptor: the molecular machinery. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 3, 63-88.
- Ochala, J., Frontera, W.R., Dorer, D.J., Van Hoecke, J., and Krivickas, L.S. (2007). Single skeletal muscle fiber elastic and contractile characteristics in young and older men. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 62, 375-381.
- Ohlsson, C., Mohan, S., Sjogren, K., Tivesten, A., Isgaard, J., Isaksson, O., Jansson, J.O., and Svensson, J. (2009). The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev* 30, 494-535.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S., and Pedersen, B.K. (1998). Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *The Journal of physiology* 508 (Pt 3), 949-953.
- Ottenheijm, C.A., and Granzier, H. (2010a). New insights into the structural roles of nebulin in skeletal muscle. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 968139.
- Ottenheijm, C.A., and Granzier, H. (2010b). Role of titin in skeletal muscle function and disease. *Advances in experimental medicine and biology* 682, 105-122.
- Pallafacchina, G., Calabria, E., Serrano, A.L., Kalhovde, J.M., and Schiaffino, S. (2002). A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9213-9218.
- Palus, S., von Haehling, S., and Springer, J. (2014). Muscle wasting: an overview of recent developments in basic research. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 5, 193-198.
- Panek, M., Pietras, T., Fabijan, A., Milanowski, M., Wieteska, L., Gorski, P., Kuna, P., and Szemraj, J. (2013). Effect of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on asthma phenotypes. *Experimental and therapeutic medicine* 5, 572-580.
- Park, J.J., Zup, S.L., Verhovshek, T., Sengelaub, D.R., and Forger, N.G. (2002). Castration reduces motoneuron soma size but not dendritic length in the spinal nucleus of the bulbocavernosus of wild-type and BCL-2 overexpressing mice. *Journal of neurobiology* 53, 403-412.
- Pascual-Le Tallec, L., Simone, F., Viengchareun, S., Meduri, G., Thirman, M.J., and Lombes, M. (2005). The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Molecular endocrinology* 19, 1158-1169.
- Pasiakos, S.M., and Carbone, J.W. (2014). Assessment of skeletal muscle proteolysis and the regulatory response to nutrition and exercise. *IUBMB life* 66, 478-484.
- Patel, R., Bookout, A.L., Magomedova, L., Owen, B.M., Consiglio, G.P., Shimizu, M., Zhang, Y., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., and Cummins, C.L. (2015). Glucocorticoids regulate the metabolic hormone FGF21 in a feed-forward loop. *Molecular endocrinology* 29, 213-223.
- Paul, P.K., Bhatnagar, S., Mishra, V., Srivastava, S., Darnay, B.G., Choi, Y., and Kumar, A. (2012). The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Molecular and cellular biology* 32, 1248-1259.
- Pearce, D. (1994). A mechanistic basis for distinct mineralocorticoid and glucocorticoid receptor transcriptional specificities. *Steroids* 59, 153-159.
- Pellegrino, C., and Franzini, C. (1963). An Electron Microscope Study of Denervation Atrophy in Red and White Skeletal Muscle Fibers. *The Journal of cell biology* 17, 327-349.

- Penna, F., Costamagna, D., Pin, F., Camperi, A., Fanzani, A., Chiarpotto, E.M., Cavallini, G., Bonelli, G., Baccino, F.M., and Costelli, P. (2013). Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. *Am J Pathol* 182, 1367-1378.
- Pereira, R.M., and Freire de Carvalho, J. (2011). Glucocorticoid-induced myopathy. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 78, 41-44.
- Perez, M.H., Cormack, J., Mallinson, D., and Mutungi, G. (2013). A membrane glucocorticoid receptor mediates the rapid/non-genomic actions of glucocorticoids in mammalian skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology* 591, 5171-5185.
- Pete, G., Fuller, C.R., Oldham, J.M., Smith, D.R., D'Ercole, A.J., Kahn, C.R., and Lund, P.K. (1999). Postnatal growth responses to insulin-like growth factor I in insulin receptor substrate-1-deficient mice. *Endocrinology* 140, 5478-5487.
- Petersen, A.M., and Pedersen, B.K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology* 98, 1154-1162.
- Peterson, J.M., Kline, W., Canan, B.D., Ricca, D.J., Kaspar, B., Delfin, D.A., DiRienzo, K., Clemens, P.R., Robbins, P.D., Baldwin, A.S., *et al.* (2011). Peptide-based inhibition of NF-kappaB rescues diaphragm muscle contractile dysfunction in a murine model of Duchenne muscular dystrophy. *Molecular medicine* 17, 508-515.
- Pette, D., and Staron, R.S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and technique* 50, 500-509.
- Philippou, A., and Barton, E.R. (2014). Optimizing IGF-I for skeletal muscle therapeutics. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 24, 157-163.
- Picard, D., Salser, S.J., and Yamamoto, K.R. (1988). A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* 54, 1073-1080.
- Polman, J.A., Welten, J.E., Bosch, D.S., de Jonge, R.T., Balog, J., van der Maarel, S.M., de Kloet, E.R., and Datson, N.A. (2012). A genome-wide signature of glucocorticoid receptor binding in neuronal PC12 cells. *BMC neuroscience* 13, 118.
- Pourquie, O., Fan, C.M., Coltey, M., Hirsinger, E., Watanabe, Y., Breant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M., and Le Douarin, N.M. (1996). Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell* 84, 461-471.
- Powers, S.K., Ji, L.L., Kavazis, A.N., and Jackson, M.J. (2011). Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology* 1, 941-969.
- Praphanphoj, V., Sacksteder, K.A., Gould, S.J., Thomas, G.H., and Geraghty, M.T. (2001). Identification of the alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase gene, the human ortholog of the yeast LYS5 gene. *Molecular genetics and metabolism* 72, 336-342.
- Pratt, W.B., and Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-360.
- Price, S.R., and Mitch, W.E. (1998). Mechanisms stimulating protein degradation to cause muscle atrophy. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 1, 79-83.
- Proserpio, V., Fittipaldi, R., Ryall, J.G., Sartorelli, V., and Caretti, G. (2013). The methyltransferase SMYD3 mediates the recruitment of transcriptional cofactors at the myostatin and c-Met genes and regulates skeletal muscle atrophy. *Genes & development* 27, 1299-1312.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24, 78-90.
- Qi, W., Gao, S., Chu, J., Zhou, L., and Wang, Z. (2012). Negative androgen-response elements mediate androgen-dependent transcriptional inhibition of TGF-beta1 and CDK2 promoters in the prostate gland. *Journal of andrology* 33, 27-36.
- Qin, W., Pan, J., Qin, Y., Lee, D.N., Bauman, W.A., and Cardozo, C. (2014). Identification of functional glucocorticoid response elements in the mouse FoxO1 promoter. *Biochemical and biophysical research communications* 450, 979-983.

- Qin, W., Pan, J., Wu, Y., Bauman, W.A., and Cardozo, C. (2010). Protection against dexamethasone-induced muscle atrophy is related to modulation by testosterone of FOXO1 and PGC-1alpha. *Biochemical and biophysical research communications* *403*, 473-478.
- Raffaello, A., Milan, G., Masiero, E., Carnio, S., Lee, D., Lanfranchi, G., Goldberg, A.L., and Sandri, M. (2010). JunB transcription factor maintains skeletal muscle mass and promotes hypertrophy. *The Journal of cell biology* *191*, 101-113.
- Ramalingam, L., Oh, E., and Thurmond, D.C. (2014). Doc2b enrichment enhances glucose homeostasis in mice via potentiation of insulin secretion and peripheral insulin sensitivity. *Diabetologia* *57*, 1476-1484.
- Ramamoorthy, S., and Cidlowski, J.A. (2013a). Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements. *Molecular and cellular biology* *33*, 1711-1722.
- Ramamoorthy, S., and Cidlowski, J.A. (2013b). Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements. *Molecular and cellular biology* *33*, 1711-1722.
- Raney, M.A., and Turcotte, L.P. (2006). Regulation of contraction-induced FA uptake and oxidation by AMPK and ERK1/2 is intensity dependent in rodent muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *291*, E1220-1227.
- Rannels, D.E., Rannels, S.R., Li, J.B., Pegg, A.E., Morgan, H.E., and Jefferson, L.S. (1980). Effects of glucocorticoids on peptide chain initiation in heart and skeletal muscle. *Advances in myocardiology* *1*, 493-501.
- Ratman, D., Vanden Berghe, W., Dejager, L., Libert, C., Tavernier, J., Beck, I.M., and De Bosscher, K. (2013). How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Molecular and cellular endocrinology* *380*, 41-54.
- Ray, A., and Prefontaine, K.E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 752-756.
- Reddy, T.E., Pauli, F., Sprouse, R.O., Neff, N.F., Newberry, K.M., Garabedian, M.J., and Myers, R.M. (2009). Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome research* *19*, 2163-2171.
- Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P., *et al.* (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* *93*, 531-541.
- Reisz-Porszasz, S., Bhasin, S., Artaza, J.N., Shen, R., Sinha-Hikim, I., Hogue, A., Fielder, T.J., and Gonzalez-Cadavid, N.F. (2003). Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *285*, E876-888.
- Reul, J.M., and de Kloet, E.R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* *117*, 2505-2511.
- Revollo, J.R., and Cidlowski, J.A. (2009). Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* *1179*, 167-178.
- Richmond, T.J., and Davey, C.A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* *423*, 145-150.
- Roberts, B.M., Ahn, B., Smuder, A.J., Al-Rajhi, M., Gill, L.C., Beharry, A.W., Powers, S.K., Fuller, D.D., Ferreira, L.F., and Judge, A.R. (2013). Diaphragm and ventilatory dysfunction during cancer cachexia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *27*, 2600-2610.
- Romanello, V., and Sandri, M. (2010). Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of muscle protein degradation. *Current hypertension reports* *12*, 433-439.

- Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology* 3, 1009-1013.
- Rondanelli, M., Klersy, C., Terracol, G., Talluri, J., Maugeri, R., Guido, D., Faliva, M.A., Solerte, B.S., Fioravanti, M., Lukaski, H., *et al.* (2016). Whey protein, amino acids, and vitamin D supplementation with physical activity increases fat-free mass and strength, functionality, and quality of life and decreases inflammation in sarcopenic elderly. *The American journal of clinical nutrition* 103, 830-840.
- Rossi, A.E., and Dirksen, R.T. (2006). Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle & nerve* 33, 715-731.
- Roy, R.R., Monke, S.R., Allen, D.L., and Edgerton, V.R. (1999). Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *Journal of applied physiology* 87, 634-642.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M.F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *The Journal of biological chemistry* 277, 42394-42398.
- Ruschke, K., Hiepen, C., Becker, J., and Knaus, P. (2012). BMPs are mediators in tissue crosstalk of the regenerating musculoskeletal system. *Cell and tissue research* 347, 521-544.
- Russ, D.W., and Lovering, R.M. (2006). Influence of activation frequency on cellular signalling pathways during fatiguing contractions in rat skeletal muscle. *Experimental physiology* 91, 957-966.
- Russell, A.P. (2010). Molecular regulation of skeletal muscle mass. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 37, 378-384.
- Sacheck, J.M., Hyatt, J.P., Raffaello, A., Jagoe, R.T., Roy, R.R., Edgerton, V.R., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2007). Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 140-155.
- Sacheck, J.M., Ohtsuka, A., McLary, S.C., and Goldberg, A.L. (2004). IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogenin-1 and MuRF1. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 287, E591-601.
- Sahu, B., Laakso, M., Pihlajamaa, P., Ovaska, K., Sinielnikov, I., Hautaniemi, S., and Janne, O.A. (2013). FoxA1 specifies unique androgen and glucocorticoid receptor binding events in prostate cancer cells. *Cancer research* 73, 1570-1580.
- Saini, J., McPhee, J.S., Al-Dabbagh, S., Stewart, C.E., and Al-Shanti, N. (2016). Regenerative function of immune system: Modulation of muscle stem cells. *Ageing research reviews* 27, 67-76.
- Sako, D., Grinberg, A.V., Liu, J., Davies, M.V., Castonguay, R., Maniatis, S., Andreucci, A.J., Pobre, E.G., Tomkinson, K.N., Monnell, T.E., *et al.* (2010). Characterization of the ligand binding functionality of the extracellular domain of activin receptor type IIb. *The Journal of biological chemistry* 285, 21037-21048.
- Sakuma, K., and Yamaguchi, A. (2012). Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 3, 77-94.
- Sali, A., Gueron, A.D., Gordish-Dressman, H., Spurney, C.F., Iantorno, M., Hoffman, E.P., and Nagaraju, K. (2012). Glucocorticoid-treated mice are an inappropriate positive control for long-term preclinical studies in the mdx mouse. *PLoS one* 7, e34204.
- Salminen, A., Hyttinen, J.M., Kauppinen, A., and Kaarniranta, K. (2012). Context-Dependent Regulation of Autophagy by IKK-NF-kappaB Signaling: Impact on the Aging Process. *International journal of cell biology* 2012, 849541.
- Saltiel, A.R. (2016). Insulin Signaling in the Control of Glucose and Lipid Homeostasis. *Handbook of experimental pharmacology* 233, 51-71.
- Salvatore, D., Simonides, W.S., Dentice, M., Zavacki, A.M., and Larsen, P.R. (2014). Thyroid hormones and skeletal muscle--new insights and potential implications. *Nat Rev Endocrinol* 10, 206-214.
- Sanchez, A.M., Candau, R.B., and Bernardi, H. (2014). FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 1657-1671.

- Sanchez, A.M., Csibi, A., Raibon, A., Cornille, K., Gay, S., Bernardi, H., and Candau, R. (2012). AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *Journal of cellular biochemistry* *113*, 695-710.
- Sandri, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)* *23*, 160-170.
- Sandri, M. (2010). Autophagy in skeletal muscle. *FEBS letters* *584*, 1411-1416.
- Sandri, M. (2016). Protein breakdown in cancer cachexia. *Seminars in cell & developmental biology* *54*, 11-19.
- Sandri, M., Barberi, L., Bijlsma, A.Y., Blaauw, B., Dyar, K.A., Milan, G., Mammucari, C., Meskers, C.G., Pallafacchina, G., Paoli, A., *et al.* (2013). Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle: the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology* *14*, 303-323.
- Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z.P., Lecker, S.H., Goldberg, A.L., and Spiegelman, B.M. (2006). PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 16260-16265.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* *117*, 399-412.
- Sarbassov, D.D., and Sabatini, D.M. (2005). Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *The Journal of biological chemistry* *280*, 39505-39509.
- Sartori, R., Gregorevic, P., and Sandri, M. (2014). TGFbeta and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* *25*, 464-471.
- Sartori, R., Milan, G., Patron, M., Mammucari, C., Blaauw, B., Abraham, R., and Sandri, M. (2009). Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol* *296*, C1248-1257.
- Sartori, R., Schirwis, E., Blaauw, B., Bortolanza, S., Zhao, J., Enzo, E., Stantzou, A., Mouisel, E., Toniolo, L., Ferry, A., *et al.* (2013). BMP signaling controls muscle mass. *Nature genetics* *45*, 1309-1318.
- Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H., and Kato, S. (2003). Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. *Biochemical and biophysical research communications* *300*, 167-171.
- Schakman, O., Gilson, H., de Coninck, V., Lause, P., Verniers, J., Havaux, X., Ketelslegers, J.M., and Thissen, J.P. (2005). Insulin-like growth factor-I gene transfer by electroporation prevents skeletal muscle atrophy in glucocorticoid-treated rats. *Endocrinology* *146*, 1789-1797.
- Schakman, O., Gilson, H., and Thissen, J.P. (2008a). Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *The Journal of endocrinology* *197*, 1-10.
- Schakman, O., Kalista, S., Barbe, C., Loumaye, A., and Thissen, J.P. (2013). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology* *45*, 2163-2172.
- Schakman, O., Kalista, S., Bertrand, L., Lause, P., Verniers, J., Ketelslegers, J.M., and Thissen, J.P. (2008b). Role of Akt/GSK-3beta/beta-catenin transduction pathway in the muscle anti-atrophy action of insulin-like growth factor-I in glucocorticoid-treated rats. *Endocrinology* *149*, 3900-3908.
- Schiaffino, S., Dyar, K.A., Ciciliot, S., Blaauw, B., and Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS journal* *280*, 4294-4314.
- Schiaffino, S., and Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle* *1*, 4.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews* *91*, 1447-1531.
- Schiaffino, S., Sandri, M., and Murgia, M. (2007). Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)* *22*, 269-278.
- Schule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M., and Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* *62*, 1217-1226.

- Schuler, M., Ali, F., Chambon, C., Duteil, D., Bornert, J.M., Tardivel, A., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., and Metzger, D. (2006). PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell metabolism* 4, 407-414.
- Schulze, P.C., Fang, J., Kassik, K.A., Gannon, J., Cupesi, M., MacGillivray, C., Lee, R.T., and Rosenthal, N. (2005). Transgenic overexpression of locally acting insulin-like growth factor-1 inhibits ubiquitin-mediated muscle atrophy in chronic left-ventricular dysfunction. *Circulation research* 97, 418-426.
- Seene, T., Kaasik, P., and Alev, K. (2011). Muscle protein turnover in endurance training: a review. *International journal of sports medicine* 32, 905-911.
- Shaffer, P.L., Jivan, A., Dollins, D.E., Claessens, F., and Gewirth, D.T. (2004). Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4758-4763.
- Shah, O.J., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2000). Acute attenuation of translation initiation and protein synthesis by glucocorticoids in skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 278, E76-82.
- Shan, T., Liang, X., Bi, P., and Kuang, S. (2013). Myostatin knockout drives browning of white adipose tissue through activating the AMPK-PGC1alpha-Fndc5 pathway in muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 1981-1989.
- Shao, H., Chou, J., Baty, C.J., Burke, N.A., Watkins, S.C., Stolz, D.B., and Wells, A. (2006). Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. *Molecular and cellular biology* 26, 5481-5496.
- Shen, H., Liu, T., Fu, L., Zhao, S., Fan, B., Cao, J., and Li, X. (2013). Identification of microRNAs involved in dexamethasone-induced muscle atrophy. *Molecular and cellular biochemistry* 381, 105-113.
- Shi, J., Luo, L., Eash, J., Ibebunjo, C., and Glass, D.J. (2011). The SCF-Fbxo40 complex induces IRS1 ubiquitination in skeletal muscle, limiting IGF1 signaling. *Developmental cell* 21, 835-847.
- Shimizu, N., Maruyama, T., Yoshikawa, N., Matsumiya, R., Ma, Y., Ito, N., Tasaka, Y., Kuribara-Souta, A., Miyata, K., Oike, Y., *et al.* (2015). A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. *Nature communications* 6, 6693.
- Shimizu, N., Yoshikawa, N., Ito, N., Maruyama, T., Suzuki, Y., Takeda, S., Nakae, J., Tagata, Y., Nishitani, S., Takehana, K., *et al.* (2011). Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell metabolism* 13, 170-182.
- Shimobayashi, M., and Hall, M.N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 155-162.
- Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., and Tajbakhsh, S. (2006). Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nature cell biology* 8, 677-687.
- Short, K.R., Bigelow, M.L., and Nair, K.S. (2009). Short-term prednisone use antagonizes insulin's anabolic effect on muscle protein and glucose metabolism in young healthy people. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 297, E1260-1268.
- Siersbaek, R., Nielsen, R., John, S., Sung, M.H., Baek, S., Loft, A., Hager, G.L., and Mandrup, S. (2011). Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *The EMBO journal* 30, 1459-1472.
- Silva, K.A., Dong, J., Dong, Y., Dong, Y., Schor, N., Twardy, D.J., Zhang, L., and Mitch, W.E. (2015). Inhibition of Stat3 activation suppresses caspase-3 and the ubiquitin-proteasome system, leading to preservation of muscle mass in cancer cachexia. *The Journal of biological chemistry* 290, 11177-11187.
- Singh, R., Bhasin, S., Braga, M., Artaza, J.N., Pervin, S., Taylor, W.E., Krishnan, V., Sinha, S.K., Rajavashisth, T.B., and Jasuja, R. (2009). Regulation of myogenic differentiation by androgens: cross talk between androgen receptor/ beta-catenin and follistatin/transforming growth factor-beta signaling pathways. *Endocrinology* 150, 1259-1268.
- Sinha-Hikim, I., Artaza, J., Woodhouse, L., Gonzalez-Cadavid, N., Singh, A.B., Lee, M.I., Storer, T.W., Casaburi, R., Shen, R., and Bhasin, S. (2002). Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 283, E154-164.

- Sinha-Hikim, I., Taylor, W.E., Gonzalez-Cadavid, N.F., Zheng, W., and Bhasin, S. (2004). Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *J Clin Endocrinol Metab* *89*, 5245-5255.
- Siu, P.M., Wang, Y., and Alway, S.E. (2009). Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life sciences* *84*, 468-481.
- Sjogren, K., Liu, J.L., Blad, K., Skrtic, S., Vidal, O., Wallenius, V., LeRoith, D., Tornell, J., Isaksson, O.G., Jansson, J.O., *et al.* (1999). Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 7088-7092.
- Smith, I.J., and Dodd, S.L. (2007). Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle. *Experimental physiology* *92*, 561-573.
- Smith, I.J., Lecker, S.H., and Hasselgren, P.O. (2008). Calpain activity and muscle wasting in sepsis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* *295*, E762-771.
- Smith, S.M., and Vale, W.W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience* *8*, 383-395.
- So, A.Y., Cooper, S.B., Feldman, B.J., Manuchehri, M., and Yamamoto, K.R. (2008). Conservation analysis predicts in vivo occupancy of glucocorticoid receptor-binding sequences at glucocorticoid-induced genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 5745-5749.
- Soderlund, K., and Hultman, E. (1991). ATP and phosphocreatine changes in single human muscle fibers after intense electrical stimulation. *Am J Physiol* *261*, E737-741.
- Soichot, M., Vaast, A., Vignau, J., Guillemin, G.J., Lhermitte, M., Broly, F., and Allorge, D. (2013). Characterization of functional polymorphisms and glucocorticoid-responsive elements in the promoter of TDO2, a candidate gene for ethanol-induced behavioural disorders. *Alcohol and alcoholism* *48*, 415-425.
- Somwar, R., Koterski, S., Sweeney, G., Sciotti, R., Djuric, S., Berg, C., Trevillyan, J., Scherer, P.E., Rondinone, C.M., and Klip, A. (2002). A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 50386-50395.
- Song, I.H., and Buttgerit, F. (2006). Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Molecular and cellular endocrinology* *246*, 142-146.
- Song, R., Peng, W., Zhang, Y., Lv, F., Wu, H.K., Guo, J., Cao, Y., Pi, Y., Zhang, X., Jin, L., *et al.* (2013). Central role of E3 ubiquitin ligase MG53 in insulin resistance and metabolic disorders. *Nature* *494*, 375-379.
- Southgate, R.J., Neill, B., Prelovsek, O., El-Osta, A., Kamei, Y., Miura, S., Ezaki, O., McLoughlin, T.J., Zhang, W., Unterman, T.G., *et al.* (2007). FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* *282*, 21176-21186.
- Spangenburg, E.E., Brown, D.A., Johnson, M.S., and Moore, R.L. (2006). Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. *The Journal of physiology* *572*, 839-848.
- Srinivasan, S., Bolick, D.T., Hatley, M.E., Natarajan, R., Reilly, K.B., Yeh, M., Chrestensen, C., Sturgill, T.W., and Hedrick, C.C. (2004). Glucose regulates interleukin-8 production in aortic endothelial cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in diabetes. *The Journal of biological chemistry* *279*, 31930-31936.
- Sriram, S., Subramanian, S., Sathiakumar, D., Venkatesh, R., Salerno, M.S., McFarlane, C.D., Kambadur, R., and Sharma, M. (2011). Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF-kappaB. *Aging cell* *10*, 931-948.
- St-Pierre, S.J., Chakkalakal, J.V., Kolodziejczyk, S.M., Knudson, J.C., Jasmin, B.J., and Megeney, L.A. (2004). Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. *FASEB J* *18*, 1937-1939.

- Stahn, C., and Buttgerit, F. (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4, 525-533.
- Stipanuk, M.H., Ueki, I., Dominy, J.E., Jr., Simmons, C.R., and Hirschberger, L.L. (2009). Cysteine dioxygenase: a robust system for regulation of cellular cysteine levels. *Amino acids* 37, 55-63.
- Stitt, T.N., Drujan, D., Clarke, B.A., Panaro, F., Timofeyeva, Y., Kline, W.O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular cell* 14, 395-403.
- Strahle, U., Klock, G., and Schutz, G. (1987). A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7871-7875.
- Strahle, U., Schmid, W., and Schutz, G. (1988). Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *The EMBO journal* 7, 3389-3395.
- Stromstedt, P.E., Poellinger, L., Gustafsson, J.A., and Carlstedt-Duke, J. (1991). The glucocorticoid receptor binds to a sequence overlapping the TATA box of the human osteocalcin promoter: a potential mechanism for negative regulation. *Molecular and cellular biology* 11, 3379-3383.
- Surjit, M., Ganti, K.P., Mukherji, A., Ye, T., Hua, G., Metzger, D., Li, M., and Chambon, P. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 145, 224-241.
- Taves, M.D., Gomez-Sanchez, C.E., and Soma, K.K. (2011). Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 301, E11-24.
- Thurman, R.E., Rynes, E., Humbert, R., Vierstra, J., Maurano, M.T., Haugen, E., Sheffield, N.C., Stergachis, A.B., Wang, H., Vernot, B., *et al.* (2012). The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* 489, 75-82.
- Tidball, J.G. (1991). Force transmission across muscle cell membranes. *Journal of biomechanics* 24 *Suppl 1*, 43-52.
- Tingus, S.J., and Carlsen, R.C. (1993). Effect of continuous infusion of an anabolic steroid on murine skeletal muscle. *Medicine and science in sports and exercise* 25, 485-494.
- Tortora, G.J., S. R. Grabowski, *et al.* (2014). Principles of anatomy and physiology. In Principles of anatomy and physiology, J.W. Wiley, ed.
- Trappe, S., Trappe, T., Gallagher, P., Harber, M., Alkner, B., and Tesch, P. (2004). Human single muscle fibre function with 84 day bed-rest and resistance exercise. *The Journal of physiology* 557, 501-513.
- Tremblay, F., Dubois, M.J., and Marette, A. (2003). Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8, d1072-1084.
- Tremblay, F., and Marette, A. (2001). Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 38052-38060.
- Trendelenburg, A.U., Meyer, A., Jacobi, C., Feige, J.N., and Glass, D.J. (2012). TAK-1/p38/nNFkappaB signaling inhibits myoblast differentiation by increasing levels of Activin A. *Skelet Muscle* 2, 3.
- Trendelenburg, A.U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S., and Glass, D.J. (2009). Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C1258-1270.
- Troy, A., Cadwallader, A.B., Fedorov, Y., Tyner, K., Tanaka, K.K., and Olwin, B.B. (2012). Coordination of satellite cell activation and self-renewal by Par-complex-dependent asymmetric activation of p38alpha/beta MAPK. *Cell stem cell* 11, 541-553.
- Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Nagata, S., and Fukunaga, R. (2004). Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Molecular and cellular biology* 24, 6539-6549.
- Van Balkom, R.H., Dekhuijzen, P.N., Folgering, H.T., Veerkamp, J.H., Van Moerkerk, H.T., Franssen, J.A., and Van Herwaarden, C.L. (1998). Anabolic steroids in part reverse glucocorticoid-induced alterations in rat diaphragm. *Journal of applied physiology* 84, 1492-1499.

- van de Vyver, M., and Myburgh, K.H. (2012). Cytokine and satellite cell responses to muscle damage: interpretation and possible confounding factors in human studies. *Journal of muscle research and cell motility* 33, 177-185.
- van de Wijngaert, D.J., Dubbink, H.J., van Royen, M.E., Trapman, J., and Jenster, G. (2012). Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. *Molecular and cellular endocrinology* 352, 57-69.
- van der Velden, J.L., Langen, R.C., Kelders, M.C., Willems, J., Wouters, E.F., Janssen-Heininger, Y.M., and Schols, A.M. (2007). Myogenic differentiation during regrowth of atrophied skeletal muscle is associated with inactivation of GSK-3beta. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1636-1644.
- van der Velden, J.L., Langen, R.C., Kelders, M.C., Wouters, E.F., Janssen-Heininger, Y.M., and Schols, A.M. (2006). Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C453-462.
- Van Gammeren, D., Damrauer, J.S., Jackman, R.W., and Kandarian, S.C. (2009). The IkkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta are necessary and sufficient for skeletal muscle atrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 362-370.
- van Tilborg, M.A., Bonvin, A.M., Hard, K., Davis, A.L., Maler, B., Boelens, R., Yamamoto, K.R., and Kaptein, R. (1995). Structure refinement of the glucocorticoid receptor-DNA binding domain from NMR data by relaxation matrix calculations. *Journal of molecular biology* 247, 689-700.
- Vandebrouck, C., Imbert, N., Duport, G., Cognard, C., and Raymond, G. (1999). The effect of methylprednisolone on intracellular calcium of normal and dystrophic human skeletal muscle cells. *Neurosci Lett* 269, 110-114.
- Vandevyver, S., Dejager, L., and Libert, C. (2012). On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic* 13, 364-374.
- Vecht, C.J. (1998). Steroid myopathy in cancer patients. *Neurology* 51, 918.
- Verdijk, L.B., Koopman, R., Schaart, G., Meijer, K., Savelberg, H.H., and van Loon, L.J. (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 292, E151-157.
- Verhees, K.J., Schols, A.M., Kelders, M.C., Op den Kamp, C.M., van der Velden, J.L., and Langen, R.C. (2011). Glycogen synthase kinase-3beta is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C995-C1007.
- Vermeulen, A. (1991). Clinical review 24: Androgens in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab* 73, 221-224.
- Verrijdt, G., Haelens, A., and Claessens, F. (2003). Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Molecular genetics and metabolism* 78, 175-185.
- Vilchez, D., Saez, I., and Dillin, A. (2014). The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nature communications* 5, 5659.
- von Haehling, S., and Anker, S.D. (2014). Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 5, 261-263.
- Wada, S., Kato, Y., Okutsu, M., Miyaki, S., Suzuki, K., Yan, Z., Schiaffino, S., Asahara, H., Ushida, T., and Akimoto, T. (2011). Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. *The Journal of biological chemistry* 286, 38456-38465.
- Waddell, D.S., Baehr, L.M., van den Brandt, J., Johnsen, S.A., Reichardt, H.M., Furlow, J.D., and Bodine, S.C. (2008). The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 295, E785-797.
- Wagner, K.R., Liu, X., Chang, X., and Allen, R.E. (2005). Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2519-2524.
- Wakeling, J.M., Kaya, M., Temple, G.K., Johnston, I.A., and Herzog, W. (2002). Determining patterns of motor recruitment during locomotion. *The Journal of experimental biology* 205, 359-369.

- Walsh, D.W., Godson, C., Brazil, D.P., and Martin, F. (2010). Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends in cell biology* 20, 244-256.
- Wang, H., Kubica, N., Ellisen, L.W., Jefferson, L.S., and Kimball, S.R. (2006). Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *The Journal of biological chemistry* 281, 39128-39134.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., and Proud, C.G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO journal* 20, 4370-4379.
- Wang, X.H., Zhang, L., Mitch, W.E., LeDoux, J.M., Hu, J., and Du, J. (2010). Caspase-3 cleaves specific 19 S proteasome subunits in skeletal muscle stimulating proteasome activity. *The Journal of biological chemistry* 285, 21249-21257.
- Wang, Y., and Watford, M. (2007). Glutamine, insulin and glucocorticoids regulate glutamine synthetase expression in C2C12 myotubes, Hep G2 hepatoma cells and 3T3 L1 adipocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1770, 594-600.
- Wang, Z., Chen, W., Kono, E., Dang, T., and Garabedian, M.J. (2007). Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Molecular endocrinology* 21, 625-634.
- Wang, Z., Frederick, J., and Garabedian, M.J. (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *The Journal of biological chemistry* 277, 26573-26580.
- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., and Cooper, J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *The EMBO journal* 16, 1909-1920.
- Watchko, J., O'Day, T., Wang, B., Zhou, L., Tang, Y., Li, J., and Xiao, X. (2002). Adeno-associated virus vector-mediated minidystrophin gene therapy improves dystrophic muscle contractile function in mdx mice. *Human gene therapy* 13, 1451-1460.
- Watson, L.C., Kuchenbecker, K.M., Schiller, B.J., Gross, J.D., Pufall, M.A., and Yamamoto, K.R. (2013). The glucocorticoid receptor dimer interface allosterically transmits sequence-specific DNA signals. *Nature structural & molecular biology* 20, 876-883.
- Watson, M.L., Baehr, L.M., Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Bodine, S.C., and Furlow, J.D. (2012). A cell-autonomous role for the glucocorticoid receptor in skeletal muscle atrophy induced by systemic glucocorticoid exposure. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 302, E1210-1220.
- Watson, S., Fuqua, J.S., and Lee, P.A. (2014). Treatment of hypogonadism in males. *Pediatric endocrinology reviews : PER* 11 Suppl 2, 230-239.
- Watts, A.G. (2005). Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Frontiers in neuroendocrinology* 26, 109-130.
- Wei, B., Dui, W., Liu, D., Xing, Y., Yuan, Z., and Ji, G. (2013). MST1, a key player, in enhancing fast skeletal muscle atrophy. *BMC biology* 11, 12.
- Weigl, L.G. (2012). Lost in translation: regulation of skeletal muscle protein synthesis. *Curr Opin Pharmacol* 12, 377-382.
- Weisleder, N., and Ma, J.J. (2006). Ca²⁺ sparks as a plastic signal for skeletal muscle health, aging, and dystrophy. *Acta pharmacologica Sinica* 27, 791-798.
- Welsh, G.I., Miller, C.M., Loughlin, A.J., Price, N.T., and Proud, C.G. (1998). Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS letters* 421, 125-130.
- Welsh, T.H., Jr., Jones, P.B., Ruiz de Galarreta, C.M., Fanjul, L.F., and Hsueh, A.J. (1982). Androgen regulation of progestin biosynthetic enzymes in FSH-treated rat granulosa cells in vitro. *Steroids* 40, 691-700.
- Westerterp, M., Berbee, J.F., Delsing, D.J., Jong, M.C., Gijbels, M.J., Dahlmans, V.E., Offerman, E.H., Romijn, J.A., Havekes, L.M., and Rensen, P.C. (2007). Apolipoprotein C-I binds free fatty acids and reduces their intracellular esterification. *Journal of lipid research* 48, 1353-1361.
- Westin, S., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2000). Nuclear receptor coactivators. *Advances in pharmacology* 47, 89-112.

- Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews* 85, 1159-1204.
- Whalen, R.G., Harris, J.B., Butler-Browne, G.S., and Sesodia, S. (1990). Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Developmental biology* 141, 24-40.
- Whitehead, N.P., Pham, C., Gervasio, O.L., and Allen, D.G. (2008). N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *The Journal of physiology* 586, 2003-2014.
- Widegren, U., Jiang, X.J., Krook, A., Chibalin, A.V., Bjornholm, M., Tally, M., Roth, R.A., Henriksson, J., Wallberg-henriksson, H., and Zierath, J.R. (1998). Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12, 1379-1389.
- Widegren, U., Ryder, J.W., and Zierath, J.R. (2001). Mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle: effects of exercise and muscle contraction. *Acta physiologica Scandinavica* 172, 227-238.
- Widegren, U., Wretman, C., Lionikas, A., Hedin, G., and Henriksson, J. (2000). Influence of exercise intensity on ERK/MAP kinase signalling in human skeletal muscle. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 441, 317-322.
- Williamson, D., Gallagher, P., Harber, M., Hollon, C., and Trappe, S. (2003). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *The Journal of physiology* 547, 977-987.
- Wilschut, K.J., van Tol, H.T., Arkesteijn, G.J., Haagsman, H.P., and Roelen, B.A. (2011). Alpha 6 integrin is important for myogenic stem cell differentiation. *Stem cell research* 7, 112-123.
- Winbanks, C.E., Chen, J.L., Qian, H., Liu, Y., Bernardo, B.C., Beyer, C., Watt, K.I., Thomson, R.E., Connor, T., Turner, B.J., *et al.* (2013). The bone morphogenetic protein axis is a positive regulator of skeletal muscle mass. *The Journal of cell biology* 203, 345-357.
- Wing, S.S., and Goldberg, A.L. (1993). Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am J Physiol* 264, E668-676.
- Wissink, S., van Heerde, E.C., Schmitz, M.L., Kalkhoven, E., van der Burg, B., Baeuerle, P.A., and van der Saag, P.T. (1997). Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 272, 22278-22284.
- Wittert, G.A., Chapman, I.M., Haren, M.T., Mackintosh, S., Coates, P., and Morley, J.E. (2003). Oral testosterone supplementation increases muscle and decreases fat mass in healthy elderly males with low-normal gonadal status. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 58, 618-625.
- Wojtaszewski, J.F., MacDonald, C., Nielsen, J.N., Hellsten, Y., Hardie, D.G., Kemp, B.E., Kiens, B., and Richter, E.A. (2003). Regulation of 5'AMP-activated protein kinase activity and substrate utilization in exercising human skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 284, E813-822.
- Wolfe, R.R. (2006). The underappreciated role of muscle in health and disease. *The American journal of clinical nutrition* 84, 475-482.
- Woodier, J., Rainbow, R.D., Stewart, A.J., and Pitt, S.J. (2015). Intracellular Zinc Modulates Cardiac Ryanodine Receptor-mediated Calcium Release. *Journal of Biological Chemistry* 290, 17599-17610.
- Workeneh, B.T., Rondon-Berrios, H., Zhang, L., Hu, Z., Ayehu, G., Ferrando, A., Kopple, J.D., Wang, H., Storer, T., Fournier, M., *et al.* (2006). Development of a diagnostic method for detecting increased muscle protein degradation in patients with catabolic conditions. *J Am Soc Nephrol* 17, 3233-3239.
- Wretman, C., Lionikas, A., Widegren, U., Lannergren, J., Westerblad, H., and Henriksson, J. (2001). Effects of concentric and eccentric contractions on phosphorylation of MAPK(erk1/2) and MAPK(p38) in isolated rat skeletal muscle. *The Journal of physiology* 535, 155-164.
- Wright, A.P., and Gustafsson, J.A. (1991). Mechanism of synergistic transcriptional transactivation by the human glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 8283-8287.

- Wu, Y., Zhao, W., Zhao, J., Pan, J., Wu, Q., Zhang, Y., Bauman, W.A., and Cardozo, C.P. (2007). Identification of androgen response elements in the insulin-like growth factor I upstream promoter. *Endocrinology* *148*, 2984-2993.
- Wu, Y., Zhao, W., Zhao, J., Zhang, Y., Qin, W., Pan, J., Bauman, W.A., Blitzer, R.D., and Cardozo, C. (2010). REDD1 is a major target of testosterone action in preventing dexamethasone-induced muscle loss. *Endocrinology* *151*, 1050-1059.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., *et al.* (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* *98*, 115-124.
- Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature structural biology* *3*, 87-94.
- Wyce, A., Bai, Y., Nagpal, S., and Thompson, C.C. (2010). Research Resource: The androgen receptor modulates expression of genes with critical roles in muscle development and function. *Molecular endocrinology* *24*, 1665-1674.
- Wyrwoll, C.S., Holmes, M.C., and Seckl, J.R. (2011). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress. *Frontiers in neuroendocrinology* *32*, 265-286.
- Xie, N., Cheng, H., Lin, D., Liu, L., Yang, O., Jia, L., Fazli, L., Gleave, M.E., Wang, Y., Rennie, P., *et al.* (2015). The expression of glucocorticoid receptor is negatively regulated by active androgen receptor signaling in prostate tumors. *International journal of cancer Journal international du cancer* *136*, E27-38.
- Xu, T., Shen, Y., Pink, H., Triantafillou, J., Stimpson, S.A., Turnbull, P., and Han, B. (2004). Phosphorylation of p70s6 kinase is implicated in androgen-induced levator ani muscle anabolism in castrated rats. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *92*, 447-454.
- Xu, X., Sarikas, A., Dias-Santagata, D.C., Dolios, G., Lafontant, P.J., Tsai, S.C., Zhu, W., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Field, L.J., *et al.* (2008). The CUL7 E3 ubiquitin ligase targets insulin receptor substrate 1 for ubiquitin-dependent degradation. *Molecular cell* *30*, 403-414.
- Yakar, S., Liu, J.L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., and LeRoith, D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 7324-7329.
- Yamaki, T., Wu, C.L., Gustin, M., Lim, J., Jackman, R.W., and Kandarian, S.C. (2012). Rel A/p65 is required for cytokine-induced myotube atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* *303*, C135-142.
- Yang, H., Wei, W., Menconi, M., and Hasselgren, P.O. (2007). Dexamethasone-induced protein degradation in cultured myotubes is p300/HAT dependent. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *292*, R337-334.
- Yang, S.H., Galanis, A., and Sharrocks, A.D. (1999). Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors. *Molecular and cellular biology* *19*, 4028-4038.
- Yang, Y., Creer, A., Jemiolo, B., and Trappe, S. (2005). Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology* *98*, 1745-1752.
- Yao, Z., DuBois, D.C., Almon, R.R., and Jusko, W.J. (2006). Modeling circadian rhythms of glucocorticoid receptor and glutamine synthetase expression in rat skeletal muscle. *Pharmaceutical research* *23*, 670-679.
- Yarrow, J.F., McCoy, S.C., and Borst, S.E. (2012). Intracrine and myotrophic roles of 5alpha-reductase and androgens: a review. *Medicine and science in sports and exercise* *44*, 818-826.
- Yeh, S., Tsai, M.Y., Xu, Q., Mu, X.M., Lardy, H., Huang, K.E., Lin, H., Yeh, S.D., Altuwaijri, S., Zhou, X., *et al.* (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 13498-13503.
- Yen, P.M., Liu, Y., Palvimo, J.J., Trifiro, M., Whang, J., Pinsky, L., Janne, O.A., and Chin, W.W. (1997). Mutant and wild-type androgen receptors exhibit cross-talk on androgen-, glucocorticoid-, and progesterone-mediated transcription. *Molecular endocrinology* *11*, 162-171.

- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological reviews* *93*, 23-67.
- Yoshinaga, S.K., Peterson, C.L., Herskowitz, I., and Yamamoto, K.R. (1992). Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* *258*, 1598-1604.
- Yoshizawa, F., Kimball, S.R., Vary, T.C., and Jefferson, L.S. (1998). Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* *275*, E814-820.
- You, J.M., Yun, S.J., Nam, K.N., Kang, C., Won, R., and Lee, E.H. (2009). Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. *Canadian journal of physiology and pharmacology* *87*, 440-447.
- Yu, P.B., Deng, D.Y., Lai, C.S., Hong, C.C., Cuny, G.D., Boussein, M.L., Hong, D.W., McManus, P.M., Katagiri, T., Sachidanandan, C., *et al.* (2008). BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. *Nature medicine* *14*, 1363-1369.
- Zhao, J., Bauman, W.A., Huang, R., Caplan, A.J., and Cardozo, C. (2004). Oxandrolone blocks glucocorticoid signaling in an androgen receptor-dependent manner. *Steroids* *69*, 357-366.
- Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism* *6*, 472-483.
- Zhao, W., Pan, J., Wang, X., Wu, Y., Bauman, W.A., and Cardozo, C.P. (2008a). Expression of the muscle atrophy factor muscle atrophy F-box is suppressed by testosterone. *Endocrinology* *149*, 5449-5460.
- Zhao, W., Pan, J., Zhao, Z., Wu, Y., Bauman, W.A., and Cardozo, C.P. (2008b). Testosterone protects against dexamethasone-induced muscle atrophy, protein degradation and MAFbx upregulation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *110*, 125-129.
- Zhao, W., Qin, W., Pan, J., Wu, Y., Bauman, W.A., and Cardozo, C. (2009). Dependence of dexamethasone-induced Akt/FOXO1 signaling, upregulation of MAFbx, and protein catabolism upon the glucocorticoid receptor. *Biochemical and biophysical research communications* *378*, 668-672.
- Zhou, X., Wang, J.L., Lu, J., Song, Y., Kwak, K.S., Jiao, Q., Rosenfeld, R., Chen, Q., Boone, T., Simonet, W.S., *et al.* (2010). Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* *142*, 531-543.

ANNEXES

I. L'EFFET DE L'INACTIVATION CONSTITUTIVE DU GENE DE LA MYOSTATINE SUR LE GAIN DE PERFORMANCE MUSCULAIRE LORS DE LA CROISSANCE POST-NATALE DANS DEUX MODELES MURINS.

La Mstn est un facteur de croissance appartenant à la famille des TGF β , et limitant la croissance des tissus musculaires. De nombreuses études ont examiné la force musculaire chez les souris adultes n'exprimant pas la myostatine. Les résultats sont extrêmement variables, puisque la force maximale absolue est augmentée, inchangée, ou même réduite par rapport aux souris contrôles.

L'objectif de cette étude est de déterminer dans deux modèles de souris, le modèle de Lee (KO^{Lee}) et le modèle de Grobert (KO^{Grobert}), l'effet d'une inactivation constitutive de la Mstn sur le gain de performance musculaire au cours de la croissance post-natale.

Nos résultats indiquent que la Mstn endogène joue un rôle important au cours du développement post-natal du muscle squelettique chez la souris. Elle limite le gain de force maximale absolue et de la puissance, et améliore la qualité musculaire, notamment la fonction contractile, en particulier chez les souris mâles. Cependant, le rôle de la Mstn endogène varie selon les modèles et le sexe, pour des raisons physiologiques encore inconnues, puisque nous avons exclu le biais expérimental.

The effect of constitutive inactivation of the myostatin gene on the gain in muscle strength during postnatal growth in two murine models

Amalia Stantzou PhD¹, Vanessa Ueberschlag-Pitiot PhD², Remi Thomasson PhD³, Denis Furling PhD⁴, Anne Bonnieu PhD⁵, Helge Amthor PhD¹, Arnaud Ferry PhD^{4,6}

1- Université de Versailles Saint-Quentin, Unité de formation et de recherche des sciences de la santé des sciences, Inserm U1179, LIA BAHN CSM Montigny-le-Bretonneux, France.

2- Université de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7104/INSERM U964, Illkirch Cedex, France

3-Université Paris Descartes, Institut de Recherche bio-Médicale et d'Epidémiologie du Sport, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

4-Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Inserm, CNRS, Centre de Recherche en Myologie, Paris, France

5- INRA, Université Montpellier, UMR 866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, Montpellier, France

6-Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

Running title: Maximal force without myostatin

Correspondance :

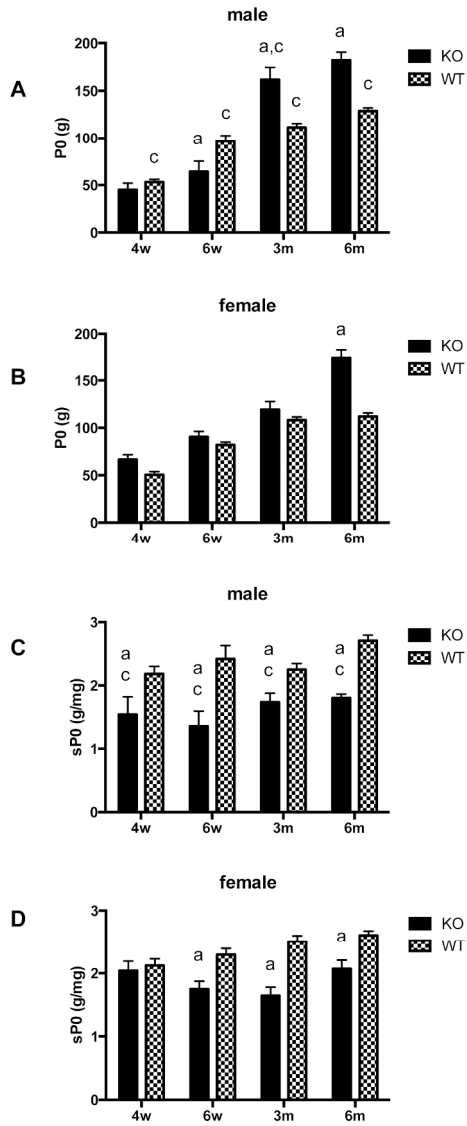
A. Ferry

G.H. Pitié-Salpêtrière, 47, bld de l'Hôpital, Bâtiment Babinski, Centre de recherche en myologie , 75651 Paris cedex 13, France.

arnaud.ferry@upmc.fr

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as an 'Accepted Article', doi: 10.1002/mus.25220

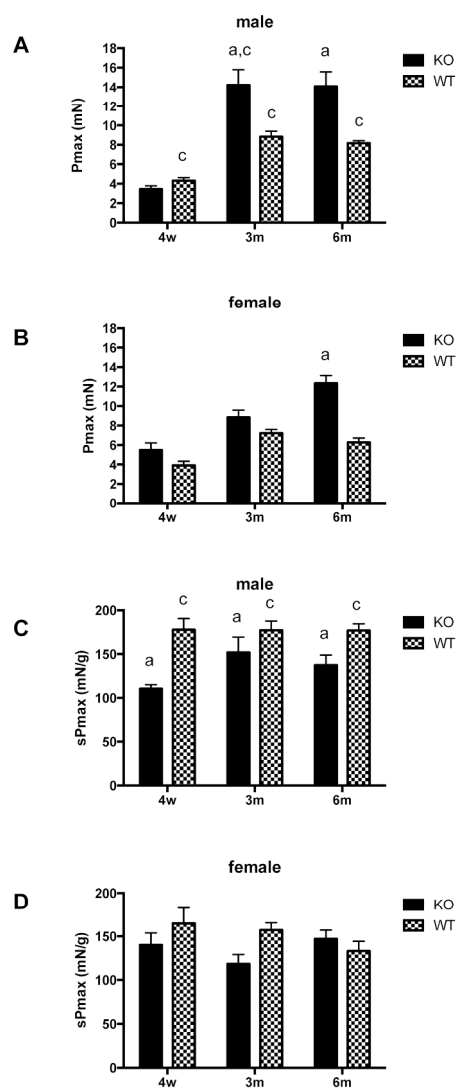
Figure 1



105x266mm (300 x 300 DPI)

AC

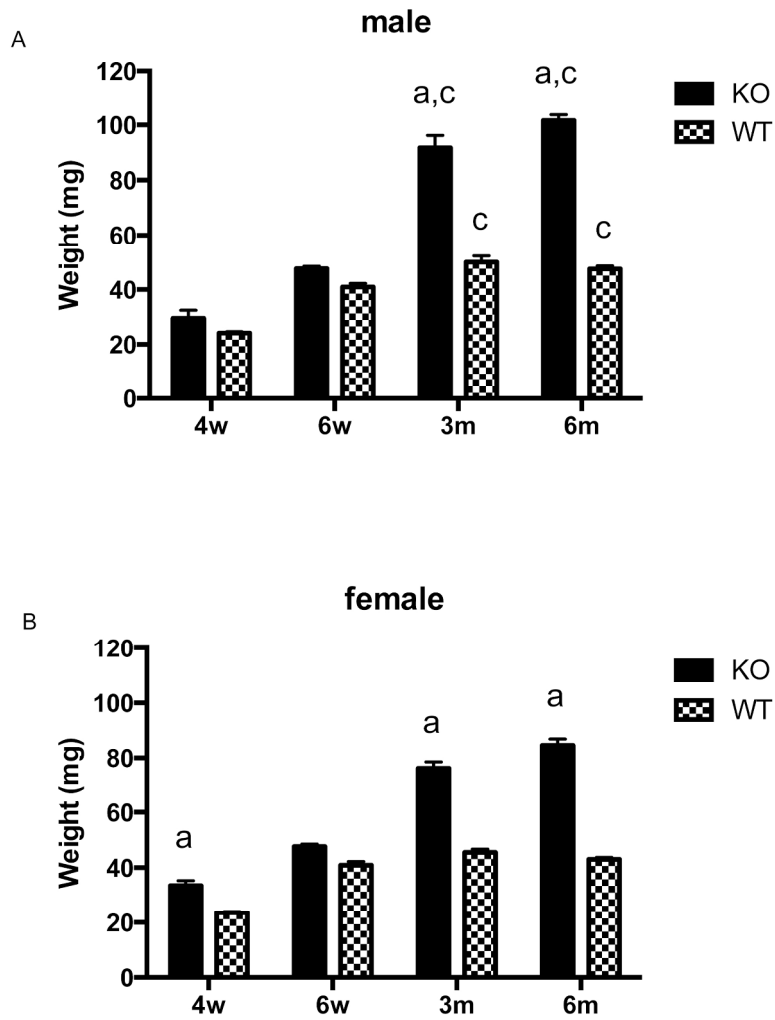
Figure 2



101x264mm (300 x 300 DPI)

AC

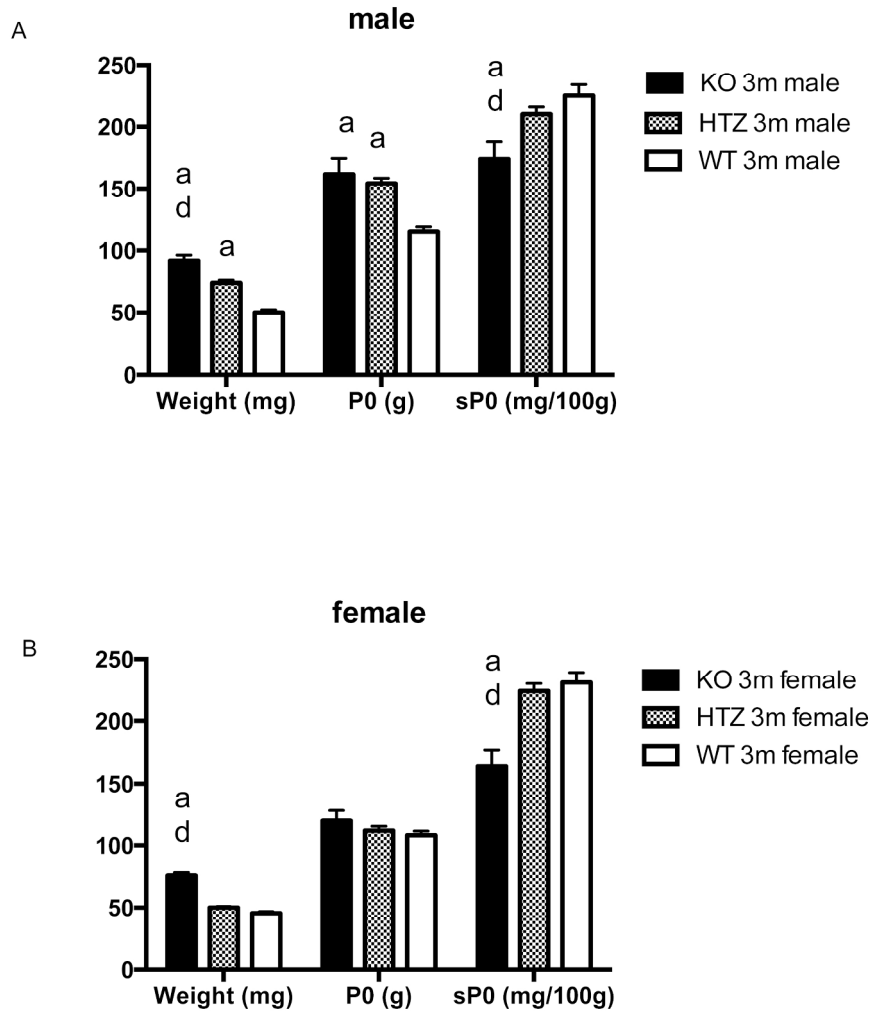
Figure 3



173x262mm (300 x 300 DPI)

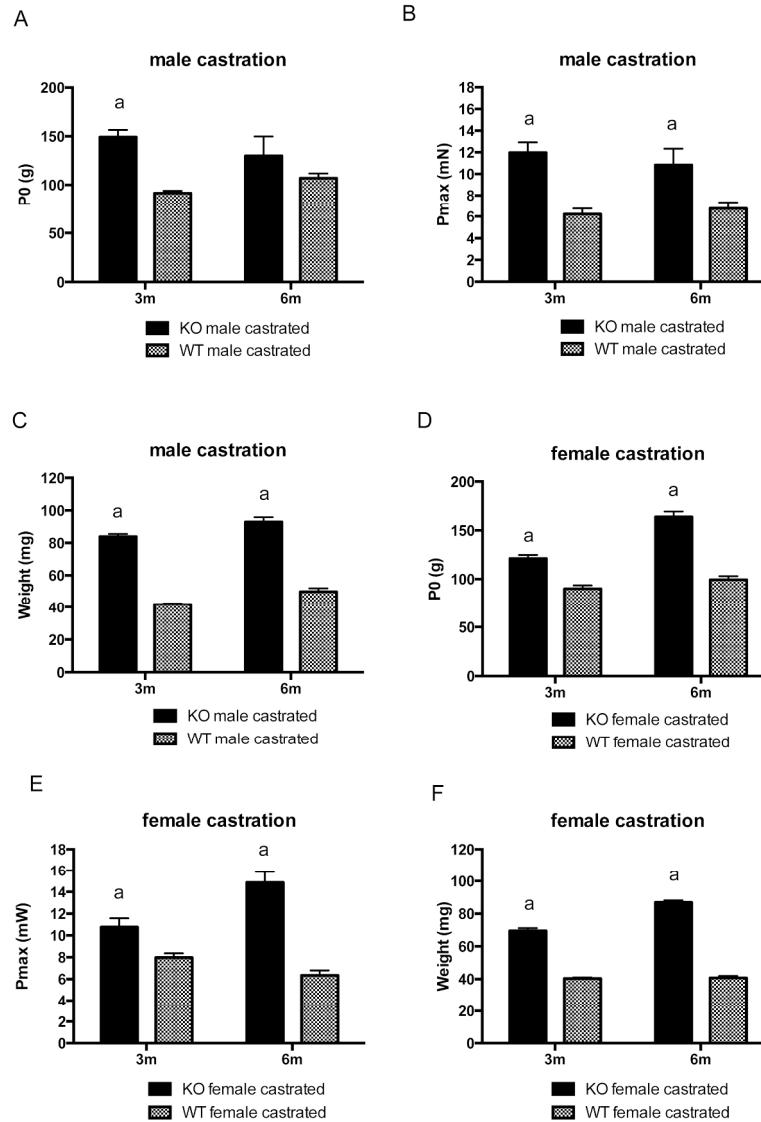
AC

Figure 4



AC

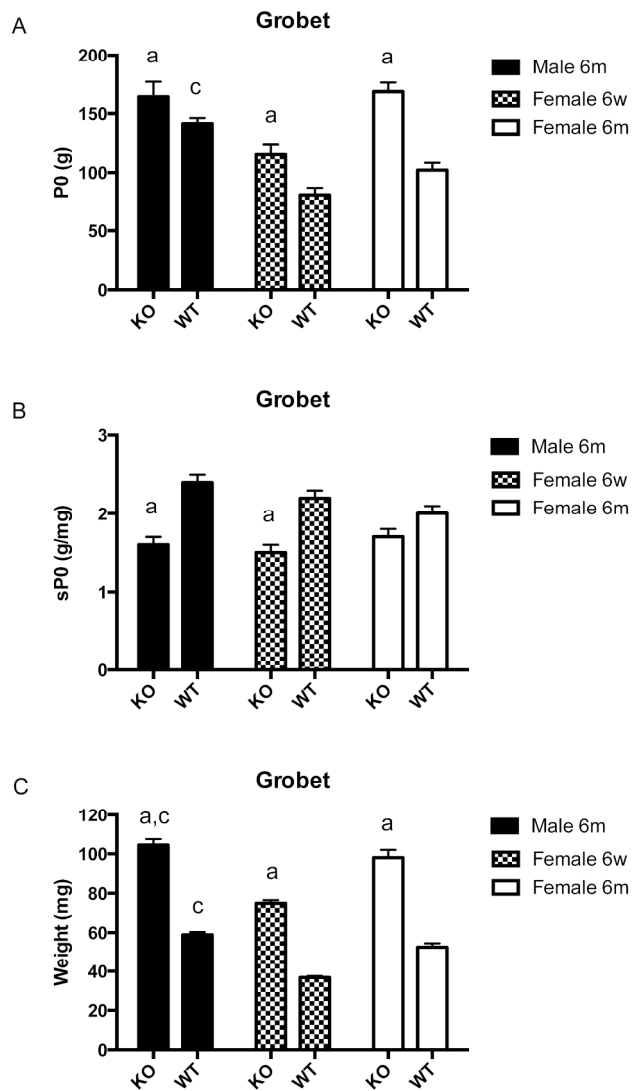
Figure 5



178x270mm (300 x 300 DPI)

AC

Figure 6



142x266mm (300 x 300 DPI)

AC

Abstract

Introduction. The effect of constitutive inactivation of the gene encoding myostatin on the gain in muscle performance during postnatal growth has not been well characterized.

Methods. We analyzed 2 murine myostatin knockout (KO) models: i) the Lee model (KO^{Lee}) and ii) the Grobet model (KO^{Grobet}), and measured the contraction of tibialis anterior muscle *in situ*. **Results.** Absolute maximal isometric force was increased in 6-month old KO^{Lee} and KO^{Grobet} mice, as compared to wild-type mice. Similarly, absolute maximal power was increased in 6-month old KO^{Lee} mice. In contrast, specific maximal force (relative maximal force per unit of muscle mass) was decreased in all 6-month old male and female KO mice, except in 6-month old female KO^{Grobet} mice, whereas specific maximal power was reduced only in male KO^{Lee} mice. **Discussion.** Genetic inactivation of myostatin increases maximal force and power, but in return it reduces muscle quality, particularly in male mice.

Keywords

Skeletal muscle; postnatal growth; knockout; myostatin; force; power; castration; orchidectomy

Introduction

Myostatin, a member of the transforming growth factor beta family of signaling molecules, is a negative regulator of skeletal muscle growth. The gene encoding myostatin (*Mstn*) is expressed in both developing and adult muscle (1; 2). In 2 mouse models and 1 rat model of constitutive *Mstn* knockout (KO), it has been reported that skeletal muscle undergoes marked hypertrophy (2–4). The supplementary Table S1 (available online) highlights the increase in muscle weight, an index of muscle hypertrophy, that results mainly from hyperplasia in KO adult rodents (2; 4–6). Many studies have examined muscle strength, i.e. absolute maximal force (tetanic isometric force), in KO adult rodents. The findings are extremely variable, since absolute maximal force has been reported to be increased (4; 6; 7), unchanged (8–10), or even reduced (11) as compared to wild-type rodents. As shown in supplementary Table S1, the discrepancy in absolute maximal force appears to be more related to differences in the reduction of specific maximal force, i.e. absolute maximal force relative to muscle size, than to an increase in muscle weight (hypertrophy). Alternatively, the discrepancies between the studies may be due to methodological differences in force measurements (*in situ* versus *in vitro*, or nerve versus muscle stimulation), or to differences in ages, sexes, and genetic models.

The general aim of this study was to systematically determine the effect of constitutive genetic inactivation of myostatin on muscle performance gain during postnatal growth by analyzing different stages of postnatal development. We first analyzed absolute maximal force and absolute maximal power in 4 week-, 6 week-, 3 month-, and 6 month-old KO mice, using the mouse model generated by the Lee group to constitutively inactivate *Mstn* (2) (referred to hereafter as KO^{Lee} mice). It is not yet known at what age the performance gain induced by *Mstn* inactivation occurs. We also evaluated whether the effect of genetic

inactivation of myostatin varies between murine models. To this end, mice from the Grobet model of constitutive *Mstn* inactivation (3) (referred to hereafter as KO^{Grobet} mice) were studied and compared to KO^{Lee} mice. Moreover, we analyzed the effect of castration in order to determine the effect of *Mstn* inactivation in the absence of sex hormones, which are additional potential regulators of muscle performance. In this study, mice of both sexes were studied since there have been reports of differences between sexes regarding the effect of *Mstn* inactivation on muscle performance (7; 9).

Materials and Methods

Animals

All procedures were performed in accordance with national and European laws and were approved by our institutional animal care and use committee. Mice were group-housed in plastic cages and maintained on a standard chow-diet with a 12 h light and dark cycle, with 21°C room temperature. Two mouse models with constitutive *Mstn* inactivation were analyzed. We studied 61 female and 48 male KO^{Lee} mice, which were compared to 45 female and 61 male wild-type (WT) mice. KO^{Lee} mice founder breeding pairs were a gift from Se-Jin Lee (2). The KO^{Lee} mice carry a deletion of the entire mature C-terminal region (which comprises the third exon of the *Mstn* gene), which is replaced by a neo cassette. We used 10 female and 8 male KO^{Grobet} mice which were compared to 8 female and 7 male WT mice. We also studied some heterozygous mice (HTZ^{Lee} mice). KO^{Grobet} mice founder breeding pairs were provided by Luc Grobet (3). The KO^{Grobet} mice carry the floxed *Mstn* allele (where the third exon of the *Mstn* gene is flanked with a pair of loxP sites) that was deleted at the zygote stage by a Cre plasmid. Both mouse models had a C57BL/6

background. Some female and male KO^{Lee} mice ($n=24$ and $n=19$ respectively), as well as female and male WT mice ($n=14$ and $n=15$ respectively) were neutered by surgical removal of the gonads before age 4 weeks, approximately corresponding to the beginning of puberty (12). At age 6 months, body weights were $35.5 \pm 0.2g$ (neutered $32.9 \pm 0.3g$) in male KO^{Lee} mice, $30.0 \pm 0.5g$ (neutered $30.9 \pm 1.1g$) in male wild-type (WT) mice, $29.8 \pm 0.4g$ (neutered $30.0 \pm 0.6g$) in female KO^{Lee} mice, $25.4 \pm 0.4g$ (neutered $30.4 \pm 1.1g$) in WT female mice.

Muscle performance

Force and power were evaluated by measuring *in situ* tibialis anterior (TA) muscle contraction in response to nerve stimulation, as described previously (13; 14). Mice were anesthetized using pentobarbital (60 mg/kg injected intraperitoneally). Body temperature was maintained at $37^{\circ}C$ using radiant heat. The knee and foot were fixed with pins and clamps, and the distal tendon of the muscle was attached to a lever arm of a servomotor system (305B, Dual-Mode Lever, Aurora Scientific) using a silk ligature. The sciatic nerve was crushed proximally and stimulated distally by a bipolar silver electrode using 0.1 ms duration supramaximal square wave pulses. We measured the absolute maximal force (P0) that was generated during isometric contractions in response to electrical stimulation (frequency, 75–150 Hz, 500 ms stimulus train). Absolute maximal force was determined at L0 (length at which maximal tension was obtained during the tetanus). Absolute maximal force was normalized to the muscle mass as an estimate of specific maximal force (sP0), i.e. relative force-generating capacity per unit of muscle mass.

Force-velocity data were then obtained by eliciting contractions in response to sciatic nerve stimulation (500 ms, 125 Hz) at 6 different afterloads over the range of approximately 10-

50% absolute maximal force. The sciatic nerve was stimulated for 700 ms (125 Hz). A maximal isometric contraction of the muscle was initiated during the first 200 ms. Then, the muscle shortened during the last 300 ms against the load. Each contraction was separated by a 1 min resting period. The (peak) shortening velocity was measured during the first 20 ms of the shortening period. The absolute power was calculated from the force-velocity data, and the absolute maximal power was reported (Pmax). Specific maximal power (sPmax) was calculated by dividing maximal power by muscle weight. After contractile measurements, the animals were sacrificed by cervical dislocation, and muscles were removed and weighed.

Statistical analysis

Groups were generally compared using 2-way analysis of variance (genotype x age, sex x age, sex x genotype, castration x age) of variance. If necessary, Bonferroni post-tests were also performed. For groups that did not pass tests of normality and equal variance, non-parametric tests were used (Kruskal Wallis and Wilcoxon). Values are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Effect of Mstn inactivation: Lee model

There were significant ($P < 0.05$) effects of both age and genotype on absolute maximal force and interaction between factors in male KO^{Lee} mice. The analyses revealed that absolute maximal force increased with age ($P < 0.05$) and peaked at ages 3 and 6 months in

male KO^{Lee} mice and at age 6 months in male WT mice (Figure 1A). Moreover, absolute maximal force was increased in 3-month old male KO^{Lee} mice (+45%) and 6-month old male KO^{Lee} mice (+41%), as compared to age-matched male WT mice (Figure 1A). However, absolute maximal force was decreased in 6-week old male KO^{Lee} mice compared to WT (Figure 1A). In contrast to male KO^{Lee} mice, absolute maximal force was only increased in 6-month old female KO^{Lee} mice (+55%), but not at age 3 months, as compared to age-matched female WT mice (Figure 1B). Gender dimorphism was also studied by a 2-way analysis of variance (gender x age) in KO^{Lee} and WT mice. The analyses revealed that, in contrast to WT mice, only the absolute maximal force of 3-month old male KO^{Lee} mice (Figure 1A) was increased compared to age-matched female KO^{Lee} mice (Figure 1B).

Specific maximal force (absolute maximal force/muscle weight) was decreased in 4-week, 6-week, 3- (-23%), and 6-month old (-34%) male KO^{Lee} mice, as compared to age-matched male WT mice (Figure 1C). Similarly, specific maximal force was reduced in female KO^{Lee} mice at ages 6 weeks, 3 months (-30%), and 6 months (-20%), as compared to age-matched female WT mice (Figure 1D). Moreover, in contrast to WT mice, the specific maximal force of male KO^{Lee} mice (Figure 1C) was reduced as compared to age-matched female KO^{Lee} mice (Figure 1D).

Another important aspect of muscle performance is the absolute maximal power, a more dynamic measure that also accounts for shortening velocity. Absolute maximal power increased with age ($P < 0.05$) and peaked at ages 3 and 6 months in male KO^{Lee} and WT mice. Three-month (+ 61%) and 6-month (+72%) old male KO^{Lee} mice had a greater absolute maximal power than age-matched male WT mice (Figure 2A). In contrast to male KO^{Lee} mice, absolute maximal power was only increased in 6-month old female KO^{Lee} mice

(+97%), but not in 3-month-old female KO^{Lee} mice, as compared to age-matched female WT mice (Figure 2B). Moreover, in contrast to WT mice, only the absolute maximal power of 3-month old male KO^{Lee} mice (Figure 2A) was increased as compared to age-matched female KO^{Lee} mice (Figure 2B).

Absolute maximal power was related to specific maximal power and muscle weight (see below). Specific maximal power was reduced in 4-week, 3-, and 6-month old (-22%) male KO^{Lee} mice, as compared to age-matched male WT mice (Figure 2C). In contrast to male KO^{Lee} mice, specific maximal power was not reduced in female KO^{Lee} mice, as compared to age-matched female WT mice (Figure 2D). Moreover, in contrast to WT mice, the specific maximal power of male KO^{Lee} mice was not increased (Figure 2C), as compared to age-matched female KO^{Lee} mice (Figure 2D).

We also analyzed muscle weight, because force and power are proportional to muscle size (muscle cross-section area and volume). Muscle weights increased with age ($P < 0.05$) and peaked at ages 3 and 6 months in both male KO^{Lee} and WT mice. The muscle weight of 3- and 6-month old male KO^{Lee} mice was greater (+83% and +114%), as compared to age-matched male WT mice (Figure 3A). Similarly to male KO^{Lee} mice, muscle weight was increased in female KO^{Lee} mice at ages 3 and 6 months (+67% and +96%), as compared to age-matched female WT mice (Figure 3B). However, in contrast to male KO^{Lee} mice, muscle weight was also increased in female KO^{Lee} mice at age 4 weeks, as compared to age-matched female WT mice (Figure 3B). Moreover, similarly to WT mice, the muscle weight of 3- and 6-month old male KO^{Lee} mice was greater (Figure 3A), as compared to age-matched female KO^{Lee} mice (Figure 3B).

Effect of inactivation of a single Mstn allele: Lee model

We also studied the effect of inactivation of a single copy of the *Mstn* allele in heterozygous (referred to as HTZ^{Lec}) mice in the Lee model at age 3 months. Similarly to 3-month old male KO^{Lec} mice, absolute maximal force was increased in 3-month old male HTZ^{Lec} mice, as compared to age-matched male WT mice (Figure 4A). In contrast to 3-month old KO^{Lec} mice, specific maximal force was not reduced in 3-month old male and female HTZ^{Lec} mice, as compared to age- and sex-matched WT mice (Figure 4A,B). In contrast to 3-month old KO^{Lec} mice, muscle weight was less or not increased in 3-month old male and female HTZ^{Lec} mice, respectively, as compared to age- and sex-matched WT mice (Figure 4A,B). Together, these results suggest a dose-dependent effect of *Mstn* inactivation.

Effect of Mstn inactivation in neutered mice (Lee model)

Mice were neutered at age 4 weeks in both male and female KO^{Lec} mice, and they were studied at ages 3 and 6 months. In contrast to intact male KO^{Lec} mice (not neutered) (Figure 1A), absolute maximal force was increased (+63%) in 3-month old neutered male KO^{Lec} mice but not at age 6 months, as compared to age-matched neutered male WT mice (Figure 5A). Similarly to intact male KO^{Lec} mice (Figures 2A and 3A), absolute maximal power and muscle weight were increased in 3- and 6-month old neutered male KO^{Lec} mice (+100%, +91% respectively), as compared to age-matched neutered WT mice (Figures 5BC).

In contrast to intact female KO^{Lec} mice (Figures 1B and 2B), absolute maximal force and absolute maximal power were increased in both 3- and 6-month old neutered female KO^{Lec} mice, as compared to age-matched neutered female WT mice (Figure 5DE). Similarly to

intact female KO^{Lee} mice (Figures 3B), muscle weight was increased in 3- and 6-month old neutered female KO^{Lee} mice, as compared to age-matched neutered WT mice (Figure 5F).

Taken together, these results suggest that castration modulates some effects of *Mstn* inactivation.

Effect of Mstn inactivation: Grobet Model

Two-way analyses of variance (genotype x gender; genotype x age) were performed. The latter revealed that absolute maximal force was increased in 6-month old male and female KO^{Grobet} mice, as compared to sex-and age-matched WT mice (Figure 6A). In contrast to male KO^{Grobet} mice (+16%), absolute maximal force increased more markedly in 6-month old female KO^{Grobet} mice (+65%), as compared to age-matched female WT mice (Figure 6A). Absolute maximal force was also increased in 6 week-old female KO^{Grobet} mice (Figure 6A). Moreover, in contrast to WT mice, the absolute maximal force was not increased in 6-month old male KO^{Grobet} mice, as compared to age-matched female KO^{Grobet} mice (Figure 6A).

Specific maximal force was decreased in 6-month old male KO^{Grobet} mice (-35%), as compared to age-matched male WT mice (Figure 6B). In contrast to male KO^{Grobet} mice, specific maximal force was not reduced in 6-month old female KO^{Grobet} mice, as compared to age-matched female WT mice (Figure 6B) ($P = 0.055$). However, specific maximal force was reduced in female KO^{Grobet} mice (-33%) at age 6 weeks. There were no other signs of gender dimorphism.

The muscle weight of 6-month old male and female KO^{Grobet} mice was greater by +73% and +87%, respectively as compared to sex-and age-matched WT mice (Figure 6C). Moreover, muscle weight was also increased in 6-week old female KO^{Grobet} mice (Figure 6C). Furthermore, in both genotypes, the muscle weight of 6-month old male mice was greater as compared to age-matched female mice (Figure 6C).

We next compared the effect of *Mstn* inactivation between the Lee and Grobet models. Table 1 shows the effect of *Mstn* inactivation on muscle weight, absolute maximal force, and specific maximal force in KO^{Lee} and KO^{Grobet} mice of both sexes at age 6 months. Absolute maximal force increased in both sexes and models ($P < 0.05$), but to a lower extent in male KO^{Grobet} mice. Specific maximal force decreased in both male and female KO^{Lee} mice and male KO^{Grobet} mice ($P < 0.05$), but not in female KO^{Grobet} mice. In both models, muscle weight increased in male and female KO mice ($p < 0.05$). Together, these results indicate some differences between the 2 models.

Discussion

Mstn inactivation increases absolute maximal force/power in 6-month old mice

A main finding of our study is that inactivation of the *Mstn* gene increased absolute maximal force at age 6 months in both models and sexes, in line with some but not all previous studies (see supplementary table). However, the extent of the increase varied markedly (+16% to +65%), depending on the model and sex. Absolute maximal power was also increased in 6-month old KO mice, at least in KO^{Lee} mice. However, the general notion that *Mstn* inactivation increases maximal force/power may be incorrect in younger KO^{Lee} mice

since, for example, absolute maximal force was found unchanged in 3-month old female KO^{Lee} mice and was reduced in 6-week old male KO^{Lee} mice.

Interestingly, our study indicates that the increase in maximal force and power occurs late during postnatal growth in the Lee model (at ages 3 and 6 months). This is apparently not the case in the Grobet model, in which a notable absolute maximal force gain was observed in 6-week old female KO^{Grobet} mice. The explanation of this delayed effect in the Lee model can likely be explained by the fact that no substantial muscle hypertrophy (increased weight) occurred until age 3 or 6 months in KO^{Lee} mice, in contrast to the Grobet model. This result suggests that the effect of *Mstn* inactivation on muscle size in the Lee model only occurs during the postnatal growth stage in which fiber growth is achieved without myonuclear accretion (beyond age 3 weeks) (15).

Mstn inactivation reduces specific maximal force

We also found that *Mstn* inactivation reduces specific maximal force (-20 to -35%), i.e. relative force generating capacity per unit of muscle mass (muscle quality), except in 6-month old female KO^{Grobet} mice (see Table 1). These results are in line with several previous studies (see supplementary Table). The fact that specific maximal force was not reduced in 6-month old female KO^{Grobet} as compared to age-matched female WT mice ($p = 0.055$) has to be confirmed since younger female KO^{Grobet} mice exhibited a reduction (-33%) in specific maximal force. Moreover, we detected a *Mstn* gene dose effect, as inactivation of a single *Mstn* gene allele is not sufficient to lead to a decrease in the specific maximal force (no reduction in HTZ^{Lee} mice). It is noteworthy that the reduced specific maximal force decreases the potential gain in absolute maximal force (see above) that can be expected on

the basis of muscle hypertrophy in both models (see Table 1).

An interesting finding was that the lower specific maximal force occurs very early during postnatal growth (4 or 6 weeks). Another important result of this study is that the reduced specific maximal force is not related to muscle hypertrophy, since notable hypertrophy occurs later, at least in the Lee model (in 3-month old male and female KO^{Lee} mice).

Previous studies have shown that *Mstn* inactivation reduces specific maximal force produced by individual permeabilized muscle fibers when activated by external calcium (16; 17). Moreover, a recent study reported a reduction in electrically evoked calcium release in mice with a mutation in *Mstn* probably due to reduction of calcium content in the sarcoplasmic reticulum (18). Therefore, one can postulate that the reduced specific maximal force in both models is likely caused by decreased myofibrillar function, and a dysfunction of sarcoplasmic calcium release. Since we found no reduced specific maximal force in 6-month old female KO^{Grobet} , we hypothesise that in these mice there is no dysfunction. The lower muscle quality resulting from *Mstn* inactivation is also evidenced by reduced specific maximal power, at least in male KO^{Lee} mice. Since it has been shown that exercise training can normalize specific maximal force in KO^{Lee} mice (11), it is possible that the reduced muscle quality results from a lower amount of habitual activity. However, a recent study failed to demonstrate any reduction in the level of home cage voluntary locomotor activity in KO^{Lee} mice (19). It is noteworthy that inactivation of myostatin has been shown to induce a fiber type shift (8). In future studies, it would be of interest to determine the effect of *Mstn* inactivation on the work loop power output, since the work loop technique relates well to the dynamic muscle performance *in vivo* (20).

Gender differences and effect of castration

We found several differences between sexes at ages 3 and 6 months in KO mice of both models, i.e. in mature mice. First, the effect of *Mstn* inactivation varied between genders in both models. Notable increases in absolute maximal force and power occur later in female KO^{Lee} mice as compared to male KO^{Lee} mice. Moreover, in contrast to male KO^{Grobet} mice, there was no reduction in specific maximal force, and absolute maximal force increased more in female KO^{Grobet} mice. Secondly, gender dimorphism decreased with *Mstn* inactivation in both models. In contrast to WT mice, there were no differences between sexes concerning absolute maximal force and absolute maximal power in both models. Sexual dimorphism concerning performance was reduced in KO mice, because absolute maximal force and power continued to increase beyond age 3 months in female KO^{Lee} mice, and specific maximal force was not reduced in female KO^{Grobet} mice. These results confirmed that the effects of *Mstn* inactivation on absolute and specific maximal forces can vary between sexes (7; 9).

Less is known concerning the interaction of *Mstn* and other regulators of muscle growth, such as sex hormones (14; 21–23). Recent studies reported that *Mstn* is an androgen target in skeletal muscle (24–26). We found that castration decreased the effect of *Mstn* inactivation on absolute maximal force in 6-month old male KO^{Lee} mice (there was no longer any difference between genotypes in neutered male mice). In contrast, castration increased the effect of *Mstn* inactivation on both absolute maximal force and power in 3-month old female KO^{Lee} mice (a difference appears between genotypes). Together, our findings suggest that removal of endogenous androgens and estrogens, respectively attenuates and promotes the effect of *Mstn* inactivation on some aspects of muscle performance. Thus, it would be of

interest to explore the mechanisms of this potential interaction between *Mstn* and sex hormones.

Conclusion

This study demonstrates that constitutive *Mstn* inactivation increases absolute maximal force of 6-month old KO mice in both models and sexes. Similarly, absolute maximal power is increased by genetic deficiency of myostatin at 6 months of age in both sexes, at least in the Lee model. The gain in muscle performance largely varies between models and sexes, but not for methodological reasons. Moreover, this effect of *Mstn* inactivation might not be observed in younger KO mice, at least in the Lee model. In contrast, specific maximal force is reduced with *Mstn* inactivation and occurs earlier during postnatal growth, but the extent of the reduction also varies between models and sexes. In the Lee model, reduced specific maximal force was not related to the hypertrophic effect of *Mstn* inactivation, at least in younger mice. Moreover, *Mstn* inactivation reduced the sexual dimorphism regarding absolute maximal force in both models. We show that castration modulates the effect of *Mstn* inactivation, at least in the Lee model, confirming the notion that endogenous androgens and estrogens might attenuate and promote, respectively the effect of *Mstn* inactivation on some aspects of performance. Together, these results indicate that endogenous myostatin plays an important role during postnatal skeletal muscle development in mice. It limits the gains in absolute maximal force and power, but in return it improves muscle quality, notably with regard to high intensity muscle contractile function, particularly in male mice. However, the role of endogenous myostatin varies between models and sexes, for yet unknown physiological reasons, as we excluded methodological bias.

Acknowledgements

We are grateful to Antoine Espagnol, Arthur Cetaire, Juliette Breuil and Saad Idrissi-Zouggari (Université Pierre et Marie Curie) for their assistance during the experiments and Daniel Owens for the carefully proofreading the text.

Financial support has been provided by Université Pierre et Marie Curie (UPMC), CNRS, INSERM, University Paris Descartes, the Association Française contre les Myopathies. We would like to acknowledge Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Université Franco-Allemand towards A.S. and H.A. (as part of the MyoGrad International Graduate School for Myology DRK 1631/1 and CDFA-06-11),

Abbreviations

KO : knockout, with genetic myostatin inactivation

KO^{Grobet} : mice with genetic myostatin inactivation from the model of Grobet laboratory

KO^{Lee} : mice with genetic myostatin inactivation from the level of Lee laboratory

Mstn : gene encoding myostatin

P0 : absolute maximal force

Pmax : absolute maximal power

sP0 : specific maximal force

sPmax : specific maximal power

TA : *tibialis anterior* muscle

WT : wild-type

References

1. McMahon CD, Popovic L, Jeanplong F, Oldham JM, Kirk SP, et al. Sexual dimorphism is associated with decreased expression of processed myostatin in males. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284(2):E377-E381.
2. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997;387(6628):83-90.
3. Grobet L, Pirottin D, Farnir F, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, et al. Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis* 2003;35(4):227-238.
4. Mendias CL, Lynch EB, Gumucio JP, Flood MD, Rittman DS, Van Pelt DW, et al. Changes in skeletal muscle and tendon structure and function following genetic inactivation of myostatin in rats. *J Physiol* 2015;593(8):2037-2052.
5. Gay S, Jublanc E, Bonniieu A, Bacou F. Myostatin deficiency is associated with an increase in number of total axons and motor axons innervating mouse tibialis anterior muscle. *Muscle Nerve* 2012;45(5):698704.
6. Mendias CL, Marcin JE, Calderon DR, Faulkner JA. Contractile properties of EDL and soleus muscles of myostatin-deficient mice. *J Appl Physiol* 2006;101(3):898-905.
7. Schirwis E, Agbulut O, Vadrot N, Mouisel E, Hourde C, Bonniieu A, et al. The beneficial effect of myostatin deficiency on maximal muscle force and power is attenuated with age. *Exp Gerontol* 2013;48(2):183-190.
8. Amthor H, Macharia R, Navarrete R, Schuelke M, Brown SC, Otto A, et al. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(6):1835-1840.
9. Gentry BA, Ferreira JA, Phillips CL, Brown M. Hindlimb skeletal muscle function in myostatin-deficient mice. *Muscle Nerve* 2011;43(1):49-57.
10. Ploquin C, Chabi B, Fouret G, Vernus B, Feillet-Coudray C, Coudray C, et al. Lack of myostatin alters intermyofibrillar mitochondria activity, unbalances redox status, and impairs tolerance to chronic repetitive contractions in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302(8):E1000-1008.
11. Matsakas A, Macharia R, Otto A, Elashry MI, Mouisel E, Romanello V, et al. Exercise training attenuates the hypermuscular phenotype and restores skeletal muscle function in the myostatin null mouse. *Exp Physiol* 2012;97(1):125-140.
12. Pinter O, Beda Z, Csaba Z, Gerendai I. Differences in the onset of puberty in selected inbred mouse strains. *Endocr. Abstr.* 2007;14:617.
13. Ferry A, Parlakian A, Joanne P, Fraysse B, Mgrditchian T, Roy P, et al. Mechanical Overloading Increases Maximal Force and Reduces Fragility in Hind Limb Skeletal Muscle from Mdx Mouse. *Am J Pathol* 2015;185(7):2012-224.

14. Hourde C, Joanne P, Noirez P, Agbulut O, Butler-Browne G, Ferry A. Protective effect of female gender-related factors on muscle force-generating capacity and fragility in the dystrophic mdx mouse. *Muscle Nerve* 2013;48(1):68-75.
15. White RB, Bierinx AS, Gnocchi VF, Zammit PS. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev Biol* 2010;10:21.
16. Mendias CL, Kayupov E, Bradley JR, Brooks SV, Claflin DR. Decreased specific force and power production of muscle fibers from myostatin-deficient mice are associated with a suppression of protein degradation. *J Appl Physiol* 2011;111(1):185-191.
17. Qaisar R, Renaud G, Morine K, Barton ER, Sweeney HL, Larsson L. Is functional hypertrophy and specific force coupled with the addition of myonuclei at the single muscle fiber level? *Faseb J* 2012;26(3):1077- 1085.
18. Bodnar D, Geyer N, Ruzsnavszky O, Olah T, Hegyi B, Sztretye M, et al. Hypermuscular mice with mutation in the myostatin gene display altered calcium signalling. *J Physiol* 2014;592(Pt 6):1353- 1365.
19. Mouisel E, Relizani K, Mille-Hamard L, Denis R, Hourde C, Agbulut O, et al. Myostatin is a key mediator between energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014 août;307(4):R444-454.
20. James RS, Altringham JD, Goldspink DF. The mechanical properties of fast and slow skeletal muscles of the mouse in relation to their locomotory function. *J. Exp. Biol.* 1995 févr;198(Pt 2):491-502.
21. Chambon C, Duteil D, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Malivindi R, et al. Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proc Natl Acad Sci U A* 2010;107(32):14327-14332.
22. Greising SM, Carey RS, Blackford JE, Dalton LE, Kosir AM, Lowe DA. Estradiol treatment, physical activity, and muscle function in ovarian-senescent mice. *Exp Gerontol* 2011;46(8):685- 693.
23. Hourde C, Jagerschmidt C, Clement-Lacroix P, Vignaud A, Ammann P, Butler-Browne GS, et al. Androgen replacement therapy improves function in male rat muscles independently of hypertrophy and activation of the Akt/mTOR pathway. *Acta Physiol.* 2009;195(4):471- 482.
24. Braga M, Bhasin S, Jasuja R, Pervin S, Singh R. Testosterone inhibits transforming growth factor-beta signaling during myogenic differentiation and proliferation of mouse satellite cells: potential role of follistatin in mediating testosterone action. *Mol Cell Endocrinol* 2013;350(1):39-52.
25. Dubois V, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D, Claessens F. Androgens and skeletal muscle: cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic actions. *Cell Mol Life Sci* 2013;69(10):1651- 1667.

26. Mendler L, Baka Z, Kovacs-Simon A, Dux L. Androgens negatively regulate myostatin expression in an androgen-dependent skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361(1):237-242.

Accepted Article

Legends of figures

Figure 1. Absolute and specific maximal forces of tibialis anterior muscles in male (AC) and female (BD) KO^{Lec} mice. A and B : absolute maximal force (P0) ; C and D : specific maximal force (sP0). a : KO different from corresponding WT ($P < 0.05$). c : male different from corresponding female ($P < 0.05$). n=8-28/group for female mice and n=6-22/group for male mice

Figure 2. Absolute and specific maximal powers of tibialis anterior muscle in male (A,C) and female (B,D) KO^{Lec} mice. A and B : absolute maximal power (Pmax) ; C and D : specific maximal power (sPmax). a : KO different from corresponding WT ($P < 0.05$). c : male mice different from corresponding female mice ($P < 0.05$). n=6-14/group for female and n=6-12/group for male

Figure 3. Muscle weight of tibialis anterior muscle in male (A) and female (B) KO^{Lec} mice. a : KO different from corresponding WT ($P < 0.05$). c : male different from corresponding female ($P < 0.05$). n=8-28/group for female mice and n=6-22/group for male mice

Figure 4. Absolute and specific maximal forces, and weight of tibialis anterior muscle in male (A) and female (B) HTZ^{Lec} mice. HTZ : heterozygous mice ; P0 : absolute maximal force ; sP0 : specific maximal force. a : KO or HTZ different from corresponding WT ($P < 0.05$). d : KO different from corresponding HTZ ($P < 0.05$). n=6-34/group for female mice and n=6-28/group for male mice

Figure 5. Absolute maximal force and power, and weight of tibialis anterior muscle in

neutered male (A-C) and female (D-F) KO^{Lec} mice. P0 : absolute maximal force ; sP0 : specific maximal force ; Pmax : absolute maximal power ; sPmax : specific maximal power, a : KO different from corresponding WT ($P < 0.05$). n=7-22/group for female mice and n=8-28/group for male mice.

Figure 6. Absolute (A) and specific (B) maximal forces, and weight (C) of tibialis anterior muscle in male and female KO^{Grobet} mice. P0 : absolute maximal force ; sP0 : specific maximal force ; a : KO different from corresponding WT ($P < 0.05$); c : male different from corresponding female ($P < 0.05$); n=8-16/group for female mice and n=10-16/group for male mice

Table 1. Effect of *Mstn* inactivation in both Lee and Grobet mouse models at age 6 months.

	KO ^{Lee}		KO ^{Grobet}	
	Male	Female	Male	Female
Absolute maximal force (P0)	+41%	+55%	+16%	+65%
Specific maximal force (sP0)	-34%	-20%	-35%	=
Muscle weight	+114%	+96%	+75%	+87%

=: no significant difference; -: decrease; +: increase; KO^{Grobet}: mice with myostatin inactivation from the model of Grobet; KO^{Lee}: mice with myostatin inactivation from the level of Lee.

II. LES DERIVES REACTIFS DE L'OXYGENE INDUITS PAR L'IFN-B ET LES DOMMAGES MITOCHONDRIAUX PARTICIPENT A LA DEFICIENCE MUSCULAIRE ET LA MAINTENANCE DE L'INFLAMMATION DANS LA DERMATOPOLYMYOSITE

La dermatopolymyosite (DM) est une myopathie inflammatoire auto-immune rare caractérisée par des lésions de la peau qui précèdent la faiblesse musculaire. Les patients présentent des fibres musculaires atrophiées notamment à la périphérie des fascicules, des infiltrats inflammatoires périvasculaires ainsi que des dépôts au niveau des capillaires. La DM se manifeste par un déficit moteur proximal, évoluant sur plusieurs semaines à plusieurs mois, conduisant à la mort des patients. L'origine de cette déficience musculaire reste inconnue. Les traitements actuellement disponibles ne permettent qu'une récupération partielle et induisent de nombreux effets secondaires. Ainsi il est nécessaire d'améliorer la compréhension et le traitement des DM.

Dans cette étude, l'analyse transcriptomique de muscle squelettique de patients DM non traités a révélé une augmentation des niveaux de transcrits des gènes induits par l'interféron de type I (IFN-I) et une diminution de l'expression des gènes reliés à la mitochondrie. Les études morphologiques et fonctionnelles des muscles de patients DM ont révélé des dysfonctionnements mitochondriaux, en corrélation avec les faibles capacités d'exercice et la signature de l'IFN-I, ainsi que la production d'espèces dérivées de l'oxygène (ROS). Les résultats ont montré que la production de radicaux libres est induite par l'IFN- β et contribue aux dysfonctionnements mitochondriaux. De plus, nos résultats ont démontré que dans un modèle de souris mimant la DM, l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC) réduit les dysfonctionnements mitochondriaux, l'augmentation des transcrits induits par l'IFN-I et l'inflammation et prévient la faiblesse musculaire.

Nos résultats montrent que le dysfonctionnement mitochondrial musculaire est une caractéristique de la pathogenèse des DM, et que les ROS représentent probablement une cible thérapeutique intéressante pour cette maladie.

MANUSCRIPT IN REVISION

IFN- β -INDUCED REACTIVE OXYGEN SPECIES AND MITOCHONDRIAL DAMAGE PARTICIPATE IN MUSCLE IMPAIRMENT AND INFLAMMATION MAINTENANCE IN DERMATOMYOSITIS

Alain Meyer^{1,2,3†*}, Gilles Laverny^{3,4†}, Yves Allenbach⁵, Vanessa Ueberschlag³, Andoni Echaniz-Laguna⁶, Béatrice Lannes⁷, Anne Laure Charles^{1,3}, François Singh^{1,3}, Joffrey Zoll^{1,3}, Evelyne Lonsdorfer^{1,3}, François Maurier⁸, Olivier Boyer⁹, Jacques-Eric Gottenberg^{2,3}, Olivier Benveniste⁵, Daniel Metzger^{3,4‡}, Jean Sibilia^{2,3‡} and Bernard Geny^{1,3‡}

¹ Institut de Physiologie EA 3072, Service de physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France.

² Centre de Référence des Maladies Autoimmunes Rares, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France.

³ Fédération de Médecine Translationnelle de Stasbourg, Université de Strasbourg, France

⁴ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964.

⁵ Département de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Centre de Référence Maladies Neuro-Musculaires Paris Est, Assistance Public – Hôpitaux de Paris (AP-HP), DHU I2B, Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Inserm, CNRS, Myology research center, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Paris, France

⁶ Service de neurologie, Centre de Référence des Maladies Neuro-musculaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France.

⁷ Département de Pathologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg France.

⁸ Service de Médecine Interne, Centre de compétences de maladies systémiques rares, Hôpitaux Privés de Metz, Metz, France

⁹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médical, U905 Université de Normandie, Rouen France

† ‡ These authors contributed equally to this work

* Corresponding author: alain.meyer7@gmail.com

ABSTRACT

Background: Dermatomyositis (DM) has been associated with enhanced type I interferon (IFN) signalling in skeletal muscle. However, the mechanisms underlying muscle dysfunction and inflammation perpetuation remain unknown.

Methods: Twelve consecutive early untreated DM patients were prospectively included and compared with patients suffering from myalgia without evidence of neuromuscular disease.

Transcriptomic analysis pointed to mitochondrial malfunctions which was further assessed using histochemical, morphological and *in situ* functional studies, including reactive oxygen species (ROS) production. Links between mitochondrial malfunctions, ROS and muscle inflammation were assessed using IFN- β -treated muscle cells and an experimental autoimmune myositis mouse model treated with the ROS scavenger N-acetyl cysteine (NAC).

Results: In early untreated DM muscle, the first cluster of down-regulated genes was mitochondrial-related. Histochemistry, electronic microscopy and *in situ* oxygraphy further revealed mitochondrial dysfunctions correlated with low exercise capacities and type I IFN signature with ROS production. Cell studies showed that ROS production was induced by IFN- β and contributed to mitochondrial malfunctions. Importantly, in the mouse model, NAC was found to reduce muscle mitochondrial dysfunctions, type I IFN-stimulated transcript levels and inflammatory cell infiltrate, in addition to preventing muscle weakness.

Conclusion: These data highlight a central role of mitochondria and ROS in DM. Mitochondrial malfunctions, mediated by IFN- β induced-ROS, contribute to poor exercise capacity. This impairment also drives type I IFN-inducible gene expression and muscle inflammation, which could self-sustain the disease. Given that current DM treatment induces partial recovery and exposes to serious adverse events (including muscular toxicity), these findings may open new therapeutic avenues for DM.

INTRODUCTION

DM is an autoimmune muscle disease defined by a characteristic myopathological pattern, including perimysial and perivascular inflammatory infiltrates along with changes in perifascicular myofibres and capillary injury [11, 19]. DM patients experience muscle weakness and low aerobic capacities [3, 41], which correlates with poor health status [2] and increased mortality [26]. The origin of this muscle impairment remains unknown. The severity of the inflammatory infiltrate in DM muscle is poorly correlated with muscle weakness [14] and although DM is an autoimmune disorder, adaptive immunity (notably auto-antibodies) does not appear to be directly involved in muscle alterations [11]. Moreover, while IFN- β , a major regulator of innate immunity, has been shown to play a pivotal role in both initiation [33] and maintenance [22, 34] of the disease, its implication in muscle dysfunction remains to be determined. Current therapies are based on empirical use of corticosteroids and immunosuppressive agents. However they induce only partial recovery [2], expose to many adverse effects, and disease relapses are frequent [25]. Thus, there is a need to improve understanding and treatment of DM.

RESULTS

Muscle mitochondrial dysfunctions participate in poor aerobic capacities in early untreated DM.

To gain better insight into the molecular mechanisms underlying muscle dysfunction in early untreated DM patients, we performed transcriptomic analyses of deltoid muscle biopsies. Statistically significantly deregulated transcripts with a >1.2- or <0.8-fold change relative to controls were considered. The transcript levels of 1537 genes were increased, whereas those of 956 genes were decreased in DM patients (**Fig. 1a & d and Supplementary table 3**). Clusters of genes according to their fold change and functions were identified using Cluster 3 and DAVID software, respectively. The main cluster of up-regulated genes encoded proteins involved in inflammatory responses (**Fig. 1b**). Notably, in agreement with previous reports [18, 29], RT-qPCR analyses showed increased transcript levels of numerous type I IFN-stimulated genes, including *ISG15*, *IFI44L*, *MX1*, *OAS2* and *IFI27* (**Fig. 1c**). Strikingly, the main cluster of down-regulated genes encoded proteins involved in mitochondrial integrity and function (**Fig. 1e**). Transcript levels of genes encoding proteins of the electron transport chain complexes (e.g. *NDHUB11*, *COX8a* and *ATP5D*) and involved in mitochondrial biogenesis (*TFAM* and *PPARGC1A*) were decreased by 1.4-fold in muscle biopsies from DM patients compared to controls (**Fig. 1f**).

Histochemical staining for NADH dehydrogenase (mitochondrial respiratory complex I), succinate dehydrogenase (complex II) and cytochrome c oxidase (complex IV) activities in deltoid muscle biopsies showed irregular and/or negative fibre staining in all DM patients, especially in the perimysial area (**Fig. 2a**). Electron microscopy analysis of DM muscle revealed abnormal mitochondrial morphology in 80% of fibres, including mitochondrial swelling, condensation and/or abnormal cristae shape (**Fig. 2b**). None of these abnormalities were found in deltoid biopsies of gender- and age-matched controls. Moreover, maximal mitochondrial respiration from complexes I to IV (V_{\max}) was 2.0-fold lower in permeabilised deltoid fibres of DM patients comparatively to controls (**Fig. 2c**). The respiratory control ratio ($RCR=V_{\max}/V_0$, V_0 representing mitochondrial respiration in the absence of ADP) was decreased 1.4-fold in skeletal myofibres from DM patients (**Fig. 2d**), showing reduced mitochondrial coupling between respiration and phosphorylation [7, 20]. Thus, DM muscle exhibits, along with an early onset, significant mitochondrial structural and functional defects.

Aerobic capacity is a general indicator of survival in healthy subjects [26] and health status in DM patients [2]. Maximal exercise capacities are known to be reduced early in DM patients [3]. Since mitochondrial function is a critical factor for maximal exercise capacities [31], we investigated whether reduced aerobic capacity and mitochondrial dysfunction may be linked in DM patients. A positive correlation was found between maximal aerobic capacity determined on a cycloergometer and maximal mitochondrial respiration in muscle (**Fig. 2e**). Thus, impaired mitochondrial function likely contributes to poor aerobic capacity in DM patients.

Given that mitochondria are both vulnerable to oxidative damages and an important source of ROS, especially when malfunctioning [36], ROS production in deltoid muscles was therefore determined. DHE-positive pixel counts were 5-fold higher in deltoid muscle of DM patients comparatively to controls, and were present in both myofibres and inflammatory cells (**Fig. 2f**). Moreover, while H_2O_2 production was not statistically different between skinned muscle fibres of DM patients and controls in the absence of mitochondrial substrates, it was increased by approximately 5-fold in DM muscle

biopsies under maximal respiration conditions (**Fig. 2g**) suggesting that impaired mitochondrial function contributes to increased ROS levels in this tissue.

IFN- β induced-ROS participate in mitochondrial respiration impairment

Since type I IFN signature has been shown to correlate with disease severity in DM [38], we next investigated the relationship between type I IFN signature, impaired mitochondrial respiration and increased ROS production. In DM muscle, type I IFN score (median fold change in expression of the seven type I IFN-stimulated genes, see [28]) was negatively correlated with V_{\max} (**Fig. 3a**), indicating that type I IFN may impair mitochondrial function. Among type I IFNs, only high blood IFN- β levels have been associated with DM [31]. We thus assessed the impact of this cytokine on myoblast mitochondrial functions. IFN- β (4000 UI/ml) induced a 25% decrease in maximal mitochondrial respiration in C₂C₁₂ cells at 24h. Addition of the ROS scavenger NAC to IFN- β -treated C₂C₁₂ cells prevented this decrease (**Fig. 3b**), thus demonstrating that IFN- β induces mitochondrial impairment in a ROS-dependent manner.

ROS-induced mitochondrial impairment participate in muscle weakness and inflammation in experimental autoimmune myositis

To determine the impact of ROS on muscle impairment and inflammation occurring in DM, we explore the therapeutic potential of ROS scavenging in EAM mice. Compared to controls, immunised mice exhibited a 30% lower muscle force (**Fig. 4a**). In addition, ROS levels recorded by electron paramagnetic resonance were increased 2-fold while maximal oxygen consumption and mitochondrial coupling of muscle fibres were significantly decreased (**Fig. 4b-d**). Moreover, transcript levels of type I IFN-stimulated genes (i.e. *IFIT3*, *ISG15*) and of other pro-inflammatory genes (*CD74* and *CXCL9*) were 2-fold higher in EAM mice than in controls (**Fig. 4e**), while histological analyses revealed intense muscular inflammatory infiltrates (**Fig. 4f**). Thus, EAM mice displayed muscle damages resembling those of DM patients.

NAC treatment (300 mg/kg/day) reduced ROS levels and prevented muscle weakness and improved myofibre V_{\max} and RCR in EAM mice (**Fig. 4a-d**), indicating that ROS mediate muscle mitochondrial defect and weakness in these mice. Furthermore, NAC prevented the increase in type I IFN-stimulated transcripts and inflammatory infiltrate in gastrocnemius muscle (**Fig. 4e and f**). Taken together, these results indicate that ROS play a central role in the induction of muscle mitochondria dysfunction, type I IFN signature and inflammation in EAM mice.

DISCUSSION

The mechanisms underlying muscle dysfunctions and inflammation perpetuation in DM have remained unknown. We show herein that muscle mitochondrial malfunctions, mediated by IFN- β -induced ROS, contribute to early poor aerobic capacity and furthermore drives type I IFN-inducible gene expression and muscle inflammation, likely contributing to disease maintenance.

While previous histochemical assessment of oxidative enzymes and electron microscopy results have suggested mitochondrial dysfunctions in DM muscle [8, 9, 23, 37], analysis of spectrophotometric activities of the respiratory chain and the respiration of isolated DM muscle mitochondria have yielded conflicting results [8, 23]. Given that the study protocol used herein allowed the preservation of mitochondrial integrity and interactions with other intracellular structures [20], our findings demonstrate that DM muscle exhibits, along with an early onset, significant mitochondrial structural

and functional defects. A recent study demonstrated lipid peroxidation in DM muscle, an indirect sign of high ROS production [16]. The present observations confirm by using three different methods, that ROS production is increased in DM as well as in a mouse model of myositis.

The origin of muscle impairment during DM has been unanswered. Surprisingly, the histological muscle abnormalities that are the hallmark of DM are poorly correlated with muscle symptoms. These features can remain unchanged despite clinical improvement [5] and conversely, muscle impairment can persist even after these lesions have disappeared [27]. The mitochondrial dysfunctions demonstrated herein strongly correlate with aerobic capacity, a critical factor of exercise performance [31] and a powerful indicator of survival in healthy subjects [26] as well as of health status in DM patients [2]. The present findings thus provide new insights into the understanding of poor exercise capacities of DM patients.

High blood IFN- β has been correlated with DM but the mechanisms explaining its links with muscle impairment have remained unknown [17]. The present study shows that type I IFN signature is correlated with mitochondrial dysfunction and that IFN- β induces mitochondrial dysfunction in a ROS-dependent manner in muscle cells. This is consistent with the location into DM perifascicular myofibers of both mitochondrial dysfunctions [37] and type I IFN-stimulated genes expression [29]; and with the previously reported effects of IFN- β in other cell types [30, 32]. Additional mechanisms linking high IFN- β and muscle mitochondrial damages are however possible. In particular, IFN- β has been shown to reduce vascular density [13], a hallmark of DM shown to drive ischemia/reperfusion injuries [16] which may also contribute to mitochondrial dysfunction and ROS production [21].

The source of self-sustained type I IFN signature and inflammation in DM muscle has been unresolved. Turn-on expression of innate immune receptors such as RIG-1 in DM myofibres has been shown to likely participate in IFN- β production [34] although the cause of their activation remains unknown. Importantly, we demonstrate that type I IFN signature and inflammation was blocked by ROS and mitochondrial damage prevention in the muscle of EAM mice. Mitochondria and ROS have recently emerged as critical components of innate immunity [40]. Notably, RIG-1 signals through mitochondrial antiviral signalling (MAVS) that positively regulate RIG-1 pathway in response to mitochondrial dysfunctions and ROS production [35]. Moreover, mitochondrial dysfunction has been shown to provoke the release of mitochondrial DNA in the cytoplasm where it engages innate immune receptors leading to the expression of type I IFN-stimulated genes [39]. Cytosolic DNA can be indirectly detected by RIG-1 through the generation of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate [1]. The above data together with our findings, strongly suggest that ROS-induced mitochondrial damage self-sustained innate immune response in DM muscle.

Our findings may also explain the partial efficacy of corticosteroids, the current cornerstone of conventional DM management, since, although potent anti-inflammatory drugs, they are known to induce muscle mitochondrial dysfunction and oxidative stress [24]. The present data highlighting a central role of mitochondria and ROS in DM, may open new therapeutic avenues for DM.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Doulaye Dembele for his assistance in analysing microarray data, and Nadia Messaddeq for electron microscopy analyses. Transcriptomic analyses were performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, which is supported by the "France Génomique" National Infrastructure, funded as part of the "Investissements d'Avenir" program managed by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-INBS-0009). This work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Collège de France, the ADIRAL and by French state funds through the *Agence Nationale de la Recherche* ANR-10-LABX-0030-INRT under the frame program *Investissements d'Avenir* labelled ANR-10-IDEX-0002-02. G.L. was supported by the Agence Nationale de la Recherche (2010BLAN1108-01).

MATERIALS AND METHODS

Patients and muscle biopsies

Twelve DM patients and 12 gender- and age-matched sedentary controls were prospectively included according to the Helsinki declaration. Written informed consent was obtained from all participants. All deltoid muscle biopsies were performed during the regular diagnostic procedure. Diagnosis of DM was based according to European Neuromuscular Centre criteria [19]. The delay between inclusion and disease onset was <6 months and no DM patient was under corticosteroid treatment at inclusion. Control subjects suffered from myalgia, but presented no evidence of neuromuscular disease (no muscle weakness, normal neurological examination, normal blood creatinine kinase level, normal electromyographic recording and muscle biopsy).

Aerobic capacity measurements

The DM patients able to cycle performed a cycloergometric incremental symptom-limited maximal exercise test, while measuring O₂ by means of an open circuit metabolic cart (Sensor Medics Vmax229, Yorba Linda). Peak VO₂ was considered as the VO_{2max} as described previously[42].

Experimental autoimmune myositis mice and N-acetyl cysteine treatment

Experimental procedures were approved by the local animal ethics committee (*CREMIA Strasbourg AL/71/78/02/13*). Experimental autoimmune myositis (EAM) mice were obtained as previously described [4]. Briefly, twelve-week-old female BALB/c mice (Charles River Laboratories) were immunised 3 times, at 1-week intervals, with 100 µl phosphate-buffered saline containing 1 mg myosin or vehicle emulsified with an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma-Aldrich). These preparations were injected on bilateral sides of the hind foot pads (first immunisation) and the tail base (second and third immunisation). Pertussis toxin (Sigma-Aldrich) was injected intraperitoneally (500 ng in 200 µl saline) during the first immunisation. In the treated group, the ROS scavenger N-acetyl cysteine (NAC (Sigma-Aldrich), 300 mg/kg/day) was administered in the drinking water starting the day before the first injection. Two weeks after the last immunisation, animals were sacrificed by cervical dislocation and muscle blocks were excised for experiments.

Grip strength in mice

At day 24 after the first immunisation, a grip strength meter (Bioseb, France) was used to measure forelimb and hindlimb grip strength. The test was repeated three consecutive times within the same session, and the mean value was recorded as the maximal grip strength for each mouse.

Cell culture

C₂C₁₂ murine myoblasts obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM Low glucose, Milerium, VWR International) supplemented with 20% foetal calf serum and 1% antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin; Gibco) at 37°C under a humidified 5% CO₂ atmosphere. At 70% confluence, the cells were treated with IFN-β (PBL Assay Science, 4000 UI/mL) and NAC (Sigma-Aldrich, 10mM) for 24 hours.

RNA extraction and RT-qPCR analysis

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). cDNA was synthesised from 2 µg of RNA by reverse transcription using random primers and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies), according to the manufacturer's protocol. Quantitative RT-PCR analysis was performed with gene-specific primers using the QuantiTect™ SYBR Green PCR kit (Roche), according to the manufacturer's protocol. Relative abundance of transcript levels was calculated after normalisation to RPLPO. The primer sequences are given in Supplementary Table 1 and 2.

Microarray analysis

Biotinylated single strand cDNA targets were prepared, starting from 150 ng of total RNA, using the Ambion WT Expression Kit (Cat # 4411974) and the Affymetrix GeneChip® WT Terminal Labeling Kit (Cat # 900671) according to Affymetrix recommendations. Following fragmentation and end-labelling, 3 µg of cDNAs were hybridised for 16 hours at 45°C on GeneChip® Human Gene 2.0 ST arrays (Affymetrix), interrogating over 400000 RefSeq transcripts and ~ 11000 LncRNAs represented by approximately 27 probes spread across the full length of the transcript. Chips were washed and stained in the GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix) and scanned with the GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) at a resolution of 0.7 µm. Raw data (CEL Intensity files) were extracted from the scanned images using the Affymetrix GeneChip® Command Console (AGCC) version 4.0. CEL files were further processed with the Affymetrix Expression Console software version 1.3.1 to calculate probe set signal intensities using Robust Multi-array Average (RMA) algorithms with default settings. Statistical analyses were performed as described in [12]. Datasets, available on GEO datasets, were uploaded on the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) for gene ontology analyses.

Optical and electron microscopy studies

Hematoxylin eosin, NADH-tetrazolium reductase, SDH and COX staining, as well as ultrastructural analyses, were performed as previously described [15].

Dihydroethidium staining

As previously described, [10], 10 µm muscle cryosections were incubated for 30 min at 37°C with 2.5 µM dihydroethidium (DHE) in phosphate-buffered saline. DHE produces a red fluorescence when oxidised to ethidium bromide by ROS. After staining, the sections were rinsed, air-dried, mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and slides examined under a fluorescence microscope. The emission signal was recorded using a Zeiss 573–637 nm filter and the number of pixels per field was quantified.

Muscle samples preparation before mitochondrial respiration and ROS production recording

Immediately after biopsy, a part of muscle tissue was immediately prepared under biomicroscope optical inspection in Petri dishes with black bottoms. When present, conjunctive tissue was removed

before the functional analysis described above. After the measurement, the samples were dried for 15 minutes at 150°C.

Mitochondrial respiration recording

Oxygen consumption of the total mitochondrial population was analysed *in situ* in saponin-skinned fibres and saponin-permeabilised cells as previously described [20] using a Clark electrode (Strathkelvin Instruments) in an oxygraphic cell (3ml) at 22°C with continuous stirring. After addition of fibres or cells, basal oxygen consumption (V_0) due to proton leak in the presence of glutamate (5 mmol/L) and malate (2 mmol/L) was measured. Maximal fibre respiration (V_{max}) was recorded after addition of saturating amounts of ADP (2 mmol/L) leading to electron flow through complexes I, III and IV and oxidative phosphorylation of ADP. Mitochondrial respiration rates in C₂C₁₂ cells are expressed as $\mu\text{mol O}_2 / \text{min} / 10^5$ cells.

H₂O₂ production measurement

H₂O₂ production in saponin-skinned muscle fibres was determined with 5 mmol/L Amplex Red (Invitrogen), which reacts with H₂O₂ in a 1:1 stoichiometry catalysed by horseradish peroxidase (HRP; 0.5 U/ml, Invitrogen) to yield the fluorescent compound resorufin and a molar equivalent of O₂. Resorufin has excitation and emission wavelengths of 563 nm and 587 nm, respectively, and is very stable once formed. Fluorescence was measured continuously with a Fluoromax 3 (Jobin Yvon) spectrofluorometer at 37°C and magnetic stirring at baseline (reactants only) and after adding, in order, a permeabilised fibre bundle, 10 mmol/L glutamate, 2 mmol/L malate, 5 mmol/L succinate and 2 mmol/L ADP as substrates. Results are reported in pmol/min/mg dry weight.

Electron Paramagnetic Resonance (EPR)

EPR was performed as previously described [6]. Minced muscle samples were washed twice with Krebs HEPES Buffer containing 25 $\mu\text{mol/L}$ deferoxamine and 5 $\mu\text{mol/L}$ diethyldithiocarbamate (DETC) to minimise CMH auto-oxidation. Samples were then incubated in a plate at 37°C with the spin probe CMH (200 μM) for 30 minutes under 20 mmHg of oxygen partial pressure (mimicking physiological conditions) using a Gas-Controller (Noxygen Sciences Transfer). The reaction was stopped by placing the plate on ice. Supernatant (40 μl) was injected in a disposable capillary tube, and placed in Bench Top EPR spectrometer E-SCAN (Bruker) at 15°C. Detection of ROS unpaired electrons was conducted under the following EPR settings: centre field 3461.144 g, microwave power 21.85 mW, modulation amplitude 2.40 g, sweep time 5.24 sec (10 scans), sweep width 60 g, number of lag curve points 1. The amplitude of the signal was measured, and the concentration of CM-radicals was determined by calibration with standard concentrations of the CM-radicals. and O₂^{-•}. Production is expressed in nM per minute per milligram of dry weight (nM/min/mg).

Data analysis

All data and experiments were performed and analysed blindly. Data are represented as mean \pm standard error of the mean (SEM). The Mann-Whitney U-test test was used to compare DM and control patients while a one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare more than 2 experimental conditions. Further analysis was conducted when differences were observed. Post hoc testing was performed using Newman-Keuls analysis. The Spearman test was used to analyse correlation between the data. The samples followed a normal distribution, and the variances were similar. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Prism 5 (Graph Pad Software Inc).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Transcriptomic analysis highlights mitochondrial impairment in early untreated DM muscle. (a) Pie chart representation of the number of up-regulated genes in deltoid muscle of DM patients compared to controls. (b) Heat map representation of the cluster of genes, the expressions of which are up-regulated in DM deltoid muscle compared to that of controls. (c) Transcript levels of *MX1*, *IFI27*, *IFI44L*, *OAS2* and *ISG15* encoding proteins involved in type I interferon immune response in deltoid biopsies of DM and healthy controls (n=3). (d) Pie chart representation of the number of down-regulated genes in DM patients compared to controls. (e) Heat map representation of the cluster of genes, the expressions of which are down-regulated in DM biopsies compared to that of controls. (f) Transcript levels of *NDHUB11*, *COX8A*, *ATP5D*, *TFAM* and *PPARGC1A* encoding proteins involved in mitochondria respiration and biogenesis in deltoid biopsies of DM and healthy controls (n=3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, by the Mann-Whitney U-test for DM versus control patients.

Figure 2. Muscle mitochondrial dysfunctions with high reactive oxygen species production participate in poor aerobic capacities in early untreated DM. (a) Representative histological staining of deltoid muscle biopsies from DM patients and gender- and age-matched controls for NADH, SDH and COX activity (n=12). Scale bars: 100 μm . (b) Representative electron micrographs of deltoid muscle biopsies from DM patients and gender- and age-matched controls (n=3). Scale bars: 100 nm. (c) Mitochondria respiration rates in the presence of glutamate and malate (V_0) and saturating amounts of ADP (V_{max}) and (d) respiratory control ratio (V_{max}/V_0) determined on deltoid fibres of DM patients and controls (n=12). (e) Correlation between aerobic capacities determined on a cycloergometer and V_{max} in DM patients (n=7, $p < 0.05$ by Spearman test). (f) Representative DHE staining of deltoid muscle sections from DM and control patients (left panel) and staining intensity quantification (right panel), (n=12). * Inflammatory infiltrates. (g) H_2O_2 production in the presence of glutamate and malate (V_0) and saturating amounts of ADP (V_{max}) in deltoid fibres of DM (n=8) and control (n=12) patients. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ by The Mann-Whitney U-test for DM versus control patients.

Figure 3. IFN- β -induced ROS mediate mitochondrial respiration impairment. (a) Correlation between mitochondrial maximal respiration and type I IFN signature in DM muscles ($p < 0.05$). (b) Maximal mitochondrial respiration (V_{max}) in C_2C_{12} myoblasts grown in presence of IFN- β with (dashed bars) or without (black bars) the ROS scavenger N-acetyl cysteine (NAC). Untreated C_2C_{12} myoblast (white bars) (n=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by one way ANOVA and post hoc Newman-Keuls test for IFN- β stimulated cells versus medium and IFN- β + NAC-treated cells.

Figure 4. ROS-induced mitochondrial dysfunctions participate in muscle weakness and inflammation in experimental autoimmune myositis (EAM).

(a) Grip strength measurement of control (white bar) and EAM mice, treated (dashed bar) or not (black bar) with NAC (n=12). (b) Reactive oxygen species levels in gastrocnemius muscle, (c) mitochondria respiration rates and (d) respiratory control ratio (V_{max}/V_0) in gastrocnemius and soleus muscle of control (white bars) and EAM mice treated (dashed bars) or not (black bar) with NAC (n=12). (e) Relative transcript levels of *IFIT3*, *CD74*, *CXCL9* and *ISG15* in gastrocnemius muscle of control (white bars) and EAM mice, treated (dashed bars) or not (black bars) with NAC (n=6). (h) Representative hematoxylin and eosin staining of gastrocnemius cryosections from control and EAM mice, treated or not with NAC (n=6). Scale bar: 100. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by one way ANOVA and post hoc Newman-Keuls test for untreated EAM versus control and NAC treated EAM mice.

FIGURE 1:

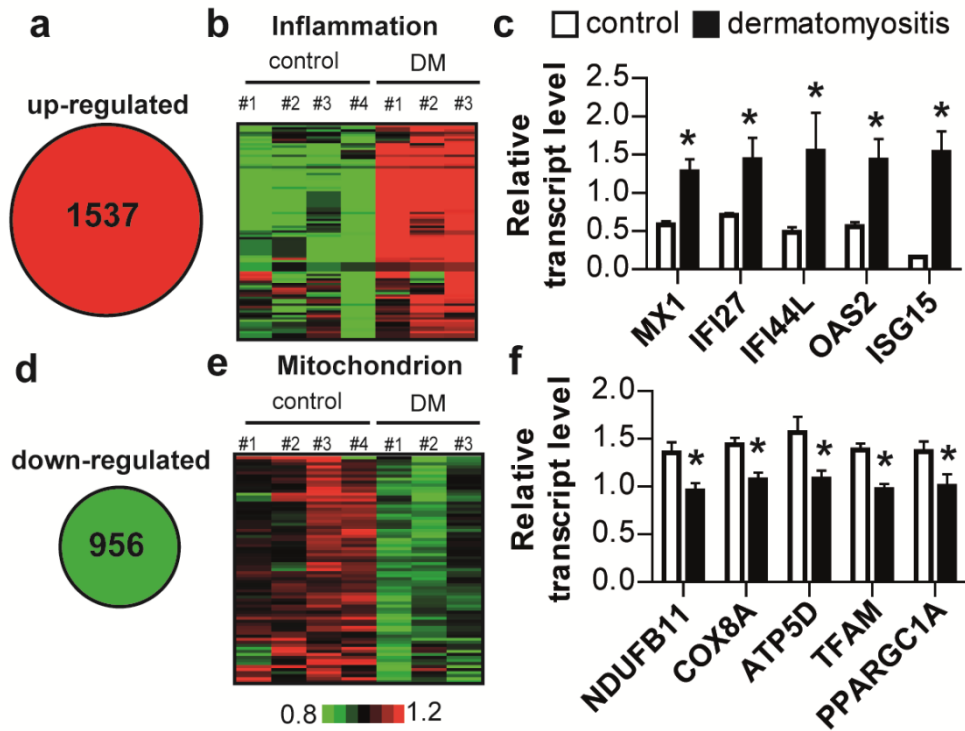


FIGURE 2:

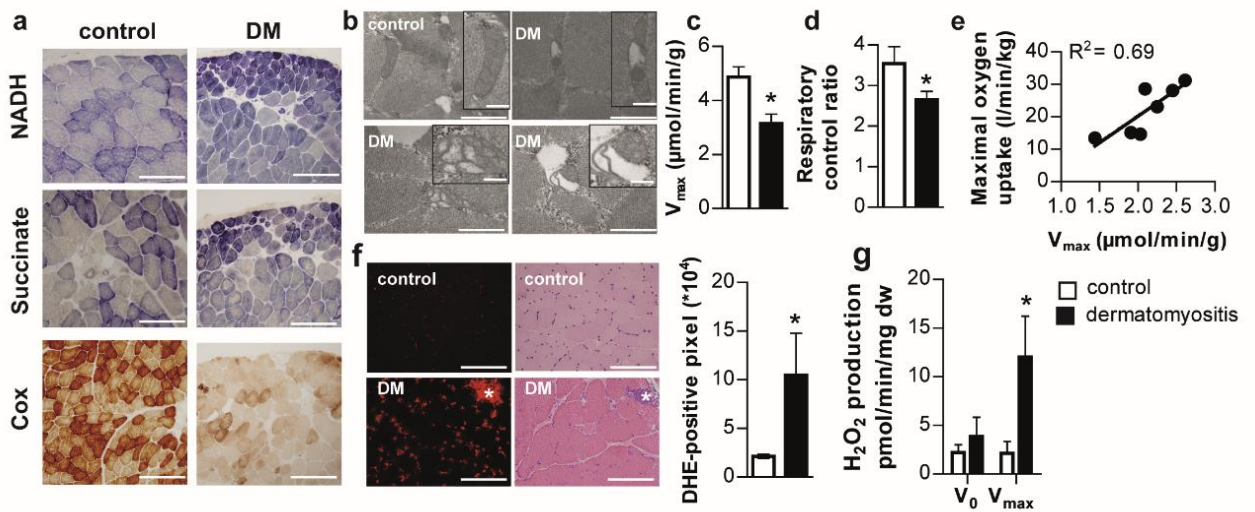


FIGURE 3:

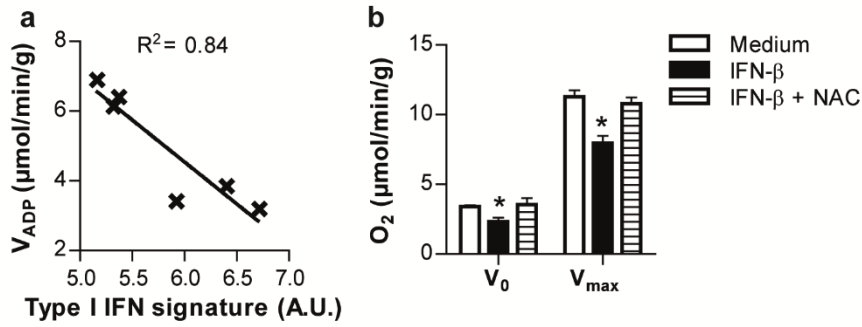
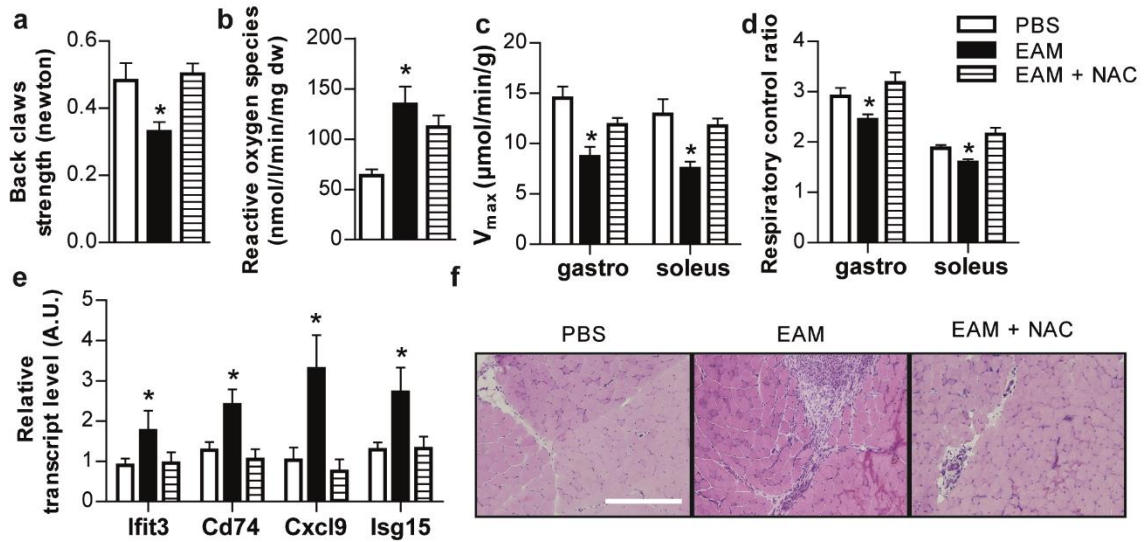


FIGURE 4:



RÉFÉRENCES

1. Dalakas MC. Inflammatory Muscle Diseases. *N Engl J Med* 2015;372:1734–1747.
2. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, Choy EH, Lundberg IE, Rose MR, et al. 119th ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord NMD* 2004;14:337–345.
3. Alexanderson H, Munters LA, Dastmalchi M, Loell I, Heimbürger M, Opava CH, et al. Resistive home exercise in patients with recent-onset polymyositis and dermatomyositis -- a randomized controlled single-blinded study with a 2-year followup. *J Rheumatol* 2014;41:1124–1132.
4. Wiesinger GF, Quittan M, Nuhr M, Volc-Platzer B, Ebenbichler G, Zehetgruber M, et al. Aerobic capacity in adult dermatomyositis/polymyositis patients and healthy controls. *Arch Phys Med Rehabil* 2000;81:1–5.
5. Alemo Munters L, Dastmalchi M, Katz A, Esbjörnsson M, Loell I, Hanna B, et al. Improved exercise performance and increased aerobic capacity after endurance training of patients with stable polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R83.
6. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med* 2002;346:793–801.
7. Dorph C, Englund P, Nennesmo I, Lundberg IE. Signs of inflammation in both symptomatic and asymptomatic muscles from patients with polymyositis and dermatomyositis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1565–1571.
8. Somani A-K, Swick AR, Cooper KD, McCormick TS. Severe Dermatomyositis Triggered by Interferon Beta-1a Therapy and Associated With Enhanced Type I Interferon Signaling. *Arch Dermatol* 2008;144. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3881235/>. Accessed November 1, 2014.
9. Liao AP, Salajegheh M, Nazareno R, Kagan JC, Jubin RG, Greenberg SA. Interferon β is associated with type 1 interferon-inducible gene expression in dermatomyositis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:831–836.
10. Suárez-Calvet X, Gallardo E, Nogales-Gadea G, Querol L, Navas M, Díaz-Manera J, et al. Altered RIG-I/DDX58-mediated innate immunity in dermatomyositis. *J Pathol* 2014;233:258–268.
11. Murray SG, Schmajuk G, Trupin L, Lawson E, Cascino M, Barton J, et al. A population-based study of infection-related hospital mortality in patients with dermatomyositis/polymyositis. *Arthritis Care Res* 2015;67:673–680.
12. Zoll J, Koulmann N, Bahi L, Ventura-Clapier R, Bigard A-X. Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity. *J Cell Physiol* 2003;194:186–193.
13. Allenbach Y, Solly S, Grégoire S, Dubourg O, Salomon B, Butler-Browne G, et al. Role of regulatory T cells in a new mouse model of experimental autoimmune myositis. *Am J Pathol* 2009;174:989–998.
14. Dembélé D, Kastner P. Fuzzy C-means method for clustering microarray data. *Bioinforma Oxf Engl* 2003;19:973–980.
15. Dubowitz V, Sewry C, Oldfors A. Histological and histochemical stains and reactions. In: *Muscle biopsy: a practical approach*. Elsevier. Elsevier.
16. Charles A-L, Meyer A, Dal-Ros S, Auger C, Keller N, Ramamoorthy TG, et al. Polyphenols prevent ageing-related impairment in skeletal muscle mitochondrial function through decreased reactive oxygen species production. *Exp Physiol* 2013;98:536–545.

17. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965–976.
18. Bourji K, Meyer A, Chatelus E, Pincemail J, Pigatto E, Defraigne J-O, et al. High reactive oxygen species in fibrotic and nonfibrotic skin of patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Free Radic Biol Med* 2015;87:282–289.
19. Greenberg SA, Pinkus JL, Pinkus GS, Burleson T, Sanoudou D, Tawil R, et al. Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol* 2005;57:664–678.
20. Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, Walsh RJ, Liao A, Nazareno R, et al. Interferon-Stimulated Gene 15 (ISG15) Conjugates Proteins in Dermatomyositis Muscle with Perifascicular Atrophy. *Ann Neurol* 2010;67:53–63.
21. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 2011;435:297–312.
22. Schlagowski AI, Singh F, Charles AL, Gali Ramamoorthy T, Favret F, Piquard F, et al. Mitochondrial uncoupling reduces exercise capacity despite several skeletal muscle metabolic adaptations. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* 2014;116:364–375.
23. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552:335–344.
24. Walsh RJ, Kong SW, Yao Y, Jallal B, Kiener PA, Pinkus JL, et al. Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum* 2007;56:3784–3792.
25. Rice GI, Forte GMA, Szykiewicz M, Chase DS, Aeby A, Abdel-Hamid MS, et al. Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. *Lancet Neurol* 2013;12:1159–1169.
26. Varadhachary AS, Wehl CC, Pestronk A. Mitochondrial pathology in immune and inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:651–657.
27. Chariot P, Ruet E, Authier FJ, Labes D, Poron F, Gherardi R. Cytochrome c oxidase deficiencies in the muscle of patients with inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol (Berl)* 1996;91:530–536.
28. Campos Y, Arenas J, Cabello A, Gomez-Reino JJ. Respiratory chain enzyme defects in patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Ann Rheum Dis* 1995;54:491–493.
29. Miró O, Casademont J, Grau JM, Jarreta D, Urbano-Márquez A, Cardellach F. Histological and biochemical assessment of mitochondrial function in dermatomyositis. *Br J Rheumatol* 1998;37:1047–1053.
30. Gitiaux C, Kostallari E, Lafuste P, Authier F-J, Christov C, Gherardi RK. Whole microvascular unit deletions in dermatomyositis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:445–452.
31. Barbasso Helmers S, Dastmalchi M, Alexanderson H, Nennesmo I, Esbjörnsson M, Lindvall B, et al. Limited effects of high-dose intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment on molecular expression in muscle tissue of patients with inflammatory myopathies. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1276–1283.
32. Rayavarapu S, Coley W, Kinder TB, Nagaraju K. Idiopathic inflammatory myopathies: pathogenic mechanisms of muscle weakness. *Skelet Muscle* 2013;3:13.
33. Greenberg SA. Type 1 interferons and myositis. *Arthritis Res Ther* 2010;12 Suppl 1:S4.
34. Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, et al. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 2010;142:613–624.
35. Sasaki M, Ikeda H, Sato Y, Nakanuma Y. Proinflammatory cytokine-induced cellular senescence of biliary epithelial cells is mediated via oxidative stress and activation of ATM pathway: a culture study. *Free Radic Res* 2008;42:625–632.

36. Demir R, Höper J. Effect of beta-interferon on vascular density, mitochondrial metabolism and alkaline phosphatase in normoxia and hypoxia. *Adv Exp Med Biol* 1997;428:439–447.
37. Lejay A, Meyer A, Schlagowski A-I, Charles A-L, Singh F, Bouitbir J, et al. Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;50:101–105.
38. West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2011;11:389–402.
39. Tal MC, Sasai M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS, Iwasaki A. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2770–2775.
40. West AP, Khoury-Hanold W, Staron M, Tal MC, Pineda CM, Lang SM, et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* 2015.
41. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 2009;10:1065–1072.
42. Mitsui T, Azuma H, Nagasawa M, Iuchi T, Akaike M, Odomi M, et al. Chronic corticosteroid administration causes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *J Neurol* 2002;249:1004–1009.

Régulation des fonctions musculaires par les glucocorticoïdes et les androgènes

Résumé

L'utilisation de glucocorticoïdes (GC) pour le traitement de maladies inflammatoires ou d'antagonistes des androgènes pour le cancer de la prostate est limitée par l'induction d'effets secondaires, tels que l'atrophie musculaire. Comme les mécanismes sous-jacents étaient mal connus, nous avons caractérisé le rôle de ces hormones dans la régulation des fonctions musculaires. Nos résultats montrent que le récepteur aux GC des myofibres contrôle négativement la masse musculaire par des actions distinctes en présence de concentrations physiologiques et pharmacologiques de GC. De plus, notre étude a permis d'identifier de nouveaux réseaux de gènes contrôlés par les GC dans le muscle. Nous avons également démontré que les androgènes favorisent le gain de performance musculaire via l'amélioration de la force. Ainsi, cette étude a clarifié les mécanismes régulant l'homéostasie musculaire et ouvre des perspectives prometteuses pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mots clés : Glucocorticoïdes, androgènes, récepteur nucléaire, muscle squelettique, myofibres, régulation de la masse et des fonctions musculaires

Abstract

The use of glucocorticoids (GC) to treat inflammatory diseases or androgen antagonists for prostate cancer is limited by the occurrence of side effects such as muscle atrophy. As the underlying mechanisms were unclear, we characterized the effects of GC and androgens on muscle mass and function. Our results demonstrate that myofiber GC receptor negatively controls muscle mass by distinct actions under physiological and pharmacological levels of GC. Moreover, our data identified many genes and networks controlled by GC in myofibers. We also showed that androgens promote the gain in muscle performance during postnatal development via the improvement of specific maximal force and power. Thus, this study allowed to clarify the molecular and cellular mechanisms regulating muscle homeostasis, and paves the way to identify new therapeutic targets.

Keywords: Glucocorticoids, androgens, nuclear receptor, skeletal muscle, myofibers, muscle mass and function regulation