



Mécanismes impliqués dans l'atrophie et la récupération musculaire après immobilisation chez le rat. : Rôle des altérations de la matrice extracellulaire.

Lamia Slimani

► To cite this version:

Lamia Slimani. Mécanismes impliqués dans l'atrophie et la récupération musculaire après immobilisation chez le rat. : Rôle des altérations de la matrice extracellulaire.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. NNT : 2012CLF1MM21 . tel-01849811

HAL Id: tel-01849811

<https://theses.hal.science/tel-01849811>

Submitted on 26 Jul 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.

Université Blaise Pascal

Année 2012

Université d'Auvergne

N° d'ordre

ECOLE DOCTORALE

DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité

Biochimie et Biologie Cellulaire

soutenue le 26 Novembre 2012

SLIMANI Lamia

Mécanismes impliqués dans l'atrophie et la récupération musculaire
après immobilisation chez le rat : Rôle des altérations de la matrice
extracellulaire

Président Dr. Damien FREYSSNET

Membres Dr. Didier ATTAIX
Dr. Lydie COMBARET
Dr. Anne LISTRAT

Rapporteurs Dr. Dominique DESPLANCHES
Dr. Claire LETHIAS

Unité de Nutrition Humaine, Equipe « Protéolyse »
INRA de Clermont-Ferrand/Theix
63122 CEYRAT

Résumé

Le muscle squelettique est le réservoir principal d'acides aminés libres de l'organisme. Ainsi, l'atrophie musculaire induite par l'immobilisation peut entraîner un affaiblissement et un allongement des périodes de récupération générant des coûts de santé publique élevés. Une aggravation de l'atrophie caractérise de façon surprenante le muscle *tibialis anterior* (TA) après le déplâtre, retardant la récupération. Mon objectif a été de comprendre les mécanismes à l'origine de l'aggravation de l'atrophie du TA pendant les phases précoces de récupération en étudiant i) la structure et le phénotype des muscles, ii) la composition de la matrice extracellulaire (MEC), iii) la protéolyse et l'apoptose, et iv) les processus de signalisation via les intégrines.

Des rats ont été soumis à une immobilisation par plâtre pendant 8 jours d'une des deux pattes arrière, l'autre servant de témoin, et placés en récupération pendant 10 jours. L'aggravation de l'atrophie du TA apparaît dès déplâtre et corrèle avec i) une baisse de l'aire des fibres associée à leur déformation, ii) une redistribution des isoformes des chaînes lourdes de myosines, iii) une augmentation de l'apoptose localisée dans le tissu conjonctif, iv) un épaississement de l'endomysium pendant la remobilisation, v) des adaptations au niveau des processus de remodelage des collagènes, et vi) une activation prononcée et persistante du système protéolytique ubiquitine-protéasome (UPS) et de l'apoptosome. Nous montrons également une élévation des niveaux ARNm dans le TA remobilisé vii) de la ténascine-C et de Sparc dès le déplâtre, et viii) de marqueurs de l'autophagie à partir du moment où l'atrophie se stabilise. Enfin, nous montrons également une élévation des ARNm dans le TA immobilisé ix) des facteurs myogéniques, et x) des intégrines membranaires et de leurs partenaires pendant l'immobilisation et après le déplâtre.

En conclusion, mon travail de thèse a permis de montrer que l'aggravation de l'atrophie du TA est précoce, associée à un remodelage important de la structure et de la composition de la MEC et du phénotype des fibres musculaires, et pourrait résulter de l'augmentation persistante et prononcée de la voie UPS et de l'apoptose. Ce travail suggère que des modifications au niveau des molécules matricielles pendant la remobilisation pourraient influencer la signalisation dépendante des intégrines et la régénération musculaire.

Mots clés : *Muscle squelettique ; Immobilisation ; Récupération ; Matrice extracellulaire ; Protéolyse ; Apoptose ; Intégrines*

Summary

Skeletal muscle is the main reservoir of body amino acids. Thus, muscle atrophy induced by immobilization can lead to a weakening and to a lengthening of recovery periods, leading to elevated healthcare costs. Surprisingly, a worsening of *tibialis anterior* (TA) muscle atrophy prevailed after cast removal and thus delayed recovery. The aim of my Ph.D was to understand mechanisms underlying the worsening of TA atrophy during early recovery by studying i) the muscle structure and phenotype, ii) the composition of the extracellular matrix (ECM), iii) proteolysis and apoptosis, and iv) the signaling pathways via integrins.

Rats were subjected to hindlimb casting for 8 days of one hindlimb, the other leg served as control, and then were allowed to recover for 10 days. The worsening of TA atrophy appeared immediately after cast removal and correlated with i) a decrease in fiber cross-section area associated to fiber deformation, ii) a redistribution of myosin heavy chain isoforms, iii) an increase in apoptosis localized in the connective tissue, iv) a thickening of the endomysium during remobilization, v) some adaptations in collagen remodeling processes, and vi) a pronounced and sustained activation of the ubiquitin-proteasome proteolytic system (UPS) and of the apoptosome. We also showed an increase in the remobilized TA of mRNA levels vii) of tenascin-C and Sparc immediately after cast removal, and viii) of some autophagy markers, when atrophy stabilized. Finally, we showed an elevation of mRNA levels encoding ix) myogenic factors, and x) transmembrane integrins and their partners during TA immobilization and after cast removal.

In conclusion, my Ph.D project showed that the worsening of the TA atrophy occurred early after cast removal, was associated with a significant remodeling of the structure and composition of the ECM and of the phenotype of muscle fibers, and may result from pronounced and sustained increase in the UPS and apoptosis. This work suggests that changes in the extracellular matrix molecules during remobilization could influence integrin-dependent signaling and muscle regeneration.

Keywords: *Skeletal muscle; Immobilization; Recovery; ExtraCellular Matrix; Proteolysis, Apoptosis, Integrins*

A mes parents & mes sœurs

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord :

- Le Docteur Damien Freyssenet, Professeur à l'Université de Saint Etienne pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse et pour avoir accepté de juger ce travail.
- Le Docteur Dominique Desplanches, Chargée de recherches au centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université Claude Bernard de Lyon, pour avoir accepté de siéger à ce jury et pour l'intérêt qu'elle a manifesté pour ce travail en acceptant de le juger.
- Le Docteur Claire Lethias, Professeur à l'Université de Lyon, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de participer à ce jury.

Mes remerciements chaleureux vont au Docteur Didier Attaix, Directeur de recherches de l'équipe « Protéolyse » à l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix, pour m'avoir accueilli dans son équipe durant ces trois années de thèse, pour ses précieux conseils, entre autres, concernant la rédaction des articles scientifiques, et pour ses nombreuses qualités humaines et professionnelles. Je le remercie beaucoup pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité ses conseils.

J'exprime mes plus sincères remerciements au Docteur Lydie Combaret (ma directrice de thèse) pour m'avoir encadré et apporté son plus grand soutien. Lydie, merci pour tout ce que tu m'as appris, pour tes précieux conseils, ta gentillesse, ton aide, ta disponibilité et pour m'avoir permis de « grandir » dans le monde de la recherche. Je souhaite que tous ceux qui auront la chance de te côtoyer prennent le temps d'apprécier tes qualités humaines et professionnelles.

Je remercie également le Docteur Anne Listrat pour m'avoir initié au « domaine » de la matrice extracellulaire, pour ses conseils et sa gentillesse.

Mes remerciements s'adressent à tous les membres de l'équipe « Protéolyse ». Merci à Christianne Deval pour son aide, ses corrections et sa disponibilité. Merci à Daniel Taillandier, Daniel Bechet et Cécile Polge (ma «Coloc» de bureau) pour avoir accepté de partager leurs connaissances avec moi et pour avoir répondu avec attention à mes nombreuses interrogations. Merci pour votre disponibilité. Merci également à Agnès Claustre pour m'avoir formé sur les mesures des activités du protéasome et pour sa bonne humeur au quotidien. Je remercie aussi Marianne Jarzaguet, pour sa gentillesse, son aide et sa bonne humeur au quotidien.

Merci également à l'ensemble de l'équipe « AMUVI » de l'URH et plus particulièrement à Brigitte Picard pour sa disponibilité et ses précieux conseils sur les mesures des chaines lourdes de myosines. Merci à Didier Micol et Bruno Meunier pour leur aide, leur disponibilité et leurs précieux conseils sur les statistiques et l'analyse d'image. Merci à Isabelle Cassar-Malek, Christianne Barboiron, David Chadeyron, Jean-Luc Montel, Geneviève Gentes, Arnaud Delavaud et Nicole Dunoyer pour leur aide et leur gentillesse.

Un grand Merci à mes « parrains » et amis :

Noureddine Hafnanoui (je ne te remercierais jamais assez), Didier Viala, Christophe Chambon, Pierro et Thierry Sayd pour leur soutien sans faille, leur disponibilité et leur gentillesse. Je suis très heureuse d'avoir fait votre connaissance.

Mes remerciements vont également à toute l'équipe « NSP » et particulièrement à : Dominique Dardevet : pour son aide au plâtrage et sa bonne humeur. Merci à Claire Sornet, Isabelle Papet, Isabelle Savary, Caroline Buffière, Laurent Mosoni et Aurélia Revel pour nos nombreux bavardages et pour leur bonne humeur au quotidien.

Merci à mes chers amis qui m'ont toujours soutenus (surtout aux moments difficiles) : Roza, Majdouline, Ghizlane, Lahlou, Malek, Annabelle, Emilie, Marine, Yasmine, Wafa, Maya, Sghaier, Carole P., Carole M., Sylvain, Moufida, Aurélia, Samira B. etc...Je vous souhaite une bonne continuation, vous êtes sur la dernière ligne droite les amis. Tenez bon et sachez que vous pouvez toujours compter sur moi.

Je tiens à remercier aussi tous les membres des familles « Nejjar », « Slimani », « Mouo », « Jamali », « Loubane » et « Lahmami » pour leur soutien. Je vous porterais toujours dans mon cœur.

Je remercie tous les CDD et stagiaires que j'ai côtoyé et qui m'ont donné un coup de main pour achever ce travail. Je pense à : Marion Coissard, Geoffrey Delcros et Julien AMAT.

Enfin, je ne peux finir ce chapitre sans témoigner mon amour à mes parents sans qui je n'en serais jamais arrivée là. Merci pour leur soutien sans faille au cours de ces années et pour leurs encouragements; merci d'avoir cru en moi et d'avoir toujours trouvé les mots justes pour me remotiver quand le moral n'y était plus. Merci d'être toujours présents et pour m'avoir toujours aidé à réaliser mes projets. Cette thèse est un peu la vôtre!

Je pense également à mes sœurs Fati et Soukaina qui ont toujours cru en moi, que je remercie pour leur présence et qui, sans le savoir, m'ont apporté une grande part de courage dans mon parcours universitaire.

Et puis, à toi courageux lecteur, que l'épaisseur du manuscrit n'aura pas effrayé. Ne t'arrêtes pas en si bon chemin, tourne encore quelques pages...leur lecture n'est pas si difficile.

Sommaire

Contexte	1
Bibliographie	3
<i>Chapitre I- Plasticité du muscle squelettique</i>	5
I. Structure et activité du muscle squelettique.....	5
I.1 Niveau d'organisation.....	5
I.2 Fibre musculaire squelettique	6
I.3 Les myofibrilles et les protéines myofibrillaires	7
I.4 La contraction musculaire	9
II. Phénotype des muscles squelettiques	10
II.1 Méthodes d'études du phénotype musculaire.....	11
II.2 Les fibres de type I	13
II.3 Les fibres de type II	13
II.4 Composition des muscles squelettiques	14
III. La myogenèse.....	14
III.1 Acteurs et étapes de la régénération musculaire	15
III.2 Régulation de la régénération musculaire	16
IV. Atrophie musculaire	17
IV.1 Au cours de l'inactivité physique.....	17
IV.1.1 Altérations structurales	18
IV. 1.2 Altérations cellulaires	19
IV.2 Pendant la récupération suite à une inactivité physique	20
IV.2.1 Altérations structurales et fonctionnelles	20
IV.2.2 Altérations cellulaires (métabolisme & stress oxydant...).....	21
<i>Chapitre II- Rôle de la protéolyse et de l'apoptose dans l'atrophie et la récupération musculaire</i>	25
I. Rôle de la protéolyse dans l'atrophie et la récupération musculaire.....	25
I.1 Les systèmes protéolytiques	26
I.1.1 L'autophagie	26
I.1.2 Le système protéolytique Ubiquitine-Protéasome-dépendant	27
a. Reconnaissance et ciblage des substrats à dégrader	28

b. Dégradation des protéines poly-ubiquitinyllées par le protéasome 26S	30
I.2.1 Au cours de l'inactivité physique	30
a. L'autophagie.....	30
b. La voie Ubiquitine protéasome-dépendante.....	31
I.2.2 Au cours de la récupération musculaire	32
a. L'autophagie.....	32
b. La voie Ubiquitine protéasome-dépendante.....	33
II. Rôle de la l'apoptose dans l'atrophie et la récupération musculaire.....	34
II.1 Les voies apoptotiques.....	34
II.1.1 Voies indépendantes des caspases.....	34
II.1.2 Voies dépendantes des caspases	36
a. La voie intrinsèque mitochondriale	37
b. La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort	39
II.2 Rôle de l'apoptose dans l'inactivité physique et la récupération musculaire.....	39
II.2.1 Au cours de l'inactivité physique	39
II.2.2 Au cours de la récupération musculaire.....	41
<i>Chapitre III : Transduction du signal de la matrice extracellulaire vers la cellule musculaire</i>	
.....	45
I. La matrice extracellulaire	45
I.1 Composition de la matrice extracellulaire	45
I.1.1 Les protéines structurales fibreuses	46
I.1.2 Les protéoglycanes.....	47
I.1.3 Les glycoprotéines	48
I.2 Molécules régulant la matrice extracellulaire	49
I.2.1 Les Métalloprotéases Matricielles (MMPs).....	49
I.2.2 Modes de régulation de l'activité des MMPs.....	51
I.1.2.3 Les protéines matricellulaires	52
II. Rôle de la MEC sur la régulation de voies de signalisation intracellulaires via les	
intégrines	53
II.1 Activation des intégrines	54
II.2 Régulation de la signalisation par les intégrines	55
III Rôle de la MEC dans l'inactivité physique et la récupération musculaire.....	58
III.1 Au cours de l'inactivité physique	58
III.2 Au cours de la récupération musculaire	60

<i>Hypothèse, objectifs et stratégie expérimentale</i>	65
<i>Présentation des travaux</i>	69
<i>Publication 1</i>	71
<i>Publication 2</i>	125
<i>Discussion générale</i>	163
<i>Conclusions & Perspectives</i>	175
<i>Références Bibliographiques</i>	183
<i>Annexes</i>	213
<i>Matériels et méthodes</i>	215
<i>Communications orales et affichées</i>	225
<i>Autres publications</i>	227

Glossaire

ACINUS: Apoptotic Chromatin condensation inducer in the nucleus

AIF: Apoptosis Inducing Factor

Apaf-1: Apoptosis Inducing Factor

Atg: Autophagy related genes

ATP: Adénosine TriPhosphate

Bcl₂ : B-cell leukemia protein-2

CAD: Caspase Activated DNase

Caspase: Cystein-Aspartic ProteASES

Cf : confère

CSA: Cross sectional area

Cyto C: Cytochrome C

Col: Collagène

DEN: Denervation

DISC: Death-Inducing Signaling Complex

DOK1: Docking protein 1

DR: Death Receptor

α -DG : α -Dystroglycan

β -DG : β -Dystroglycan

EDL: Extensor Digitorum Longus

EGF: Epidermal Growth Factors

Endo G: Endonuclease G

FA: Focal Adhesions

FADD: Fas-Associated Death Domain protein

FAK: Focal Adhesion Kinase

FLN: Filamine

GA: Gactrocnemius

GPI: Glycosyl Phosphatidyl Inositol

IAP: Inhibitor of Apoptosis Proteins

IGF-I: Insulin Like Growth Factor I

IGF-II: Insulin Like Growth Factor II

IHC: ImmunoHistochemie

ILK: Integrin-Linked Kinase

IMM: Immobilisation

IPP: ILK/PINCH/Parvin

HECT: Homologous to E6-Associated Protein C-Terminus

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HSP: Heat shock Protein

HU: Hindlimb Unloading

LC3: Light Chain 3

MEC : Matrice Extracellulaire

MAFbx: Muscle Atrophy F-box

MAPKinases: Mitogen-Activated Protein Kinases

MLC: Myosin Light Chain

MMP: Matrix Metallo Protease

MURF-1 : Muscle Ring Finger 1

MyHC : Myosin Heavy Chain

Myf-5 : Myogenic factor 5

Myf-6 : Myogenic factor 6

MNF : Myocyte nuclear factor

Msx-1 : Muscle segment homeobox 1

MRF: Myogenic Regulatory Factors

NF-kb: Nuclear Factor-kappa B

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase

Pax7: Paired box transcription factor

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PGPH: Peptidyl-glutamyl Peptide Hydrolysis

RVB: Rouge-Verte-Bleu

ROS: Reactive Oxygen Species

SDH: Succinate Déshydrogénase

Sem: semaine

Smac/Diablo: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases / direct IAP-binding protein with low pI

SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein

TA: Tibialis Anterior

TC: Tissu Conjonctif

TFPI-2: Tissue-Factor Pathway-Inhibitor-2

Tn: Ténascine

TIMP: Tissue Inhibitor of MetalloProteinases

TNF: Tumor Necrosis Factor

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

TSP : Thrombospondines

UPS: Ubiquitine Proteasome System

Vs: Versus

WB: Western Blot

Wk: Week

Figures

Parties : Bibliographie, discussion générale et matériels & méthodes

Figure 1 : Organisation du muscle squelettique.	P06
Figure 2 : Localisation des myofibrilles.	P07
Figure 3 : Structure du muscle squelettique : du muscle à l'unité contractile	p08
Figure 4 : Schéma représentant les différentes étapes de la régénération musculaire.	p15
Figure 5 : Représentation des 3 types d'autophagie : microautophagie, autophagie impliquant des chaperonnes, et macroautophagie.	p27
Figure 6 : Représentation schématique du système ubiquitine-protéasome-dépendant.	P28
Figure 7 : Libération des facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie de manière dépendante ou indépendante des caspases.	P35
Figure 8 : Schéma représentant la formation des caspases actives à partir de procaspases.	p37
Figure 9 : Signalisation extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.	P38
Figure 10 : Représentation schématique de la MEC dans le muscle squelettique.	P46
Figure 11 : Représentation schématique de la relation éventuelle entre les molécules de la MEC et celles impliquées dans la protéolyse UPS.	p58
Figure 12 : Evolution des niveaux d'ARNm codant pour Sharpin pendant l'immobilisation et la remobilisation dans le TA.	p173
Figure 13 : Immobilisation unilatérale de la patte arrière droite.	p215

Publication 1

Figure 1 : Evolution de la consommation alimentaire et du poids des rats au cours de l'immobilisation et la récupération.	p114
Figure 2 : L'aggravation de l'atrophie induite par l'immobilisation observée dans le tibialis anterior a lieu juste après déplâtre.	p115
Figure 3 : Les modifications de l'aire du tissu conjonctif du tibialis anterior s'aggravent après déplâtre.	p116

- Figure 4 :** Modifications des niveaux ARNm codant pour certains collagènes, MMPs et TIMPs dans le tibialis anterior au cours de l'immobilisation et la récupération. p117
- Figure 5 :** Les modifications de la proportion des différentes isoformes de chaînes lourdes de myosines s'accroissent après déplâtrage dans le tibialis anterior. p118
- Figure 6 :** L'expression protéique de MURF1 augmente durant l'immobilisation et la récupération dans les muscles tibialis anterior et gastrocnemius au cours de l'immobilisation et la récupération. p119
- Figure 7:** Modifications des niveaux d'ARNm codant pour MURF1 et MAFbx/atrogin-1 au cours de l'immobilisation et la récupération dans le tibialis anterior et le gastrocnemius. p120
- Figure 8:** L'augmentation des activités du protéasome s'accroît au cours de la remobilisation dans le tibialis anterior. p121
- Figure 9:** Modifications des niveaux d'ARNm codant pour certains marqueurs de l'autophagie au cours de l'immobilisation et la récupération dans les muscles tibialis anterior et gastrocnemius. p122
- Figure 10:** L'activité de la caspase-9 augmente de manière persistante dans le tibialis anterior après déplâtrage. p123
- Figure 11:** La proportion des noyaux apoptotiques augmente après déplâtrage dans le tissu conjonctif du muscle tibialis anterior. p124

Publication 2

- Figure 1 :** Le tibialis anterior présente des modifications au niveau de l'aire et de la forme des fibres musculaires durant la phase précoce de récupération musculaire. p157
- Figure 2 :** Le tibialis anterior présente un épaississement du périmysium et de l'endomysium au cours de l'immobilisation et de la récupération respectivement, ainsi qu'une augmentation de la ramification de la matrice extracellulaire. p158
- Figure 3 :** Modifications des niveaux ARNm codant pour la décorine, pour Sparc et pour la Ténascine-C dans le muscle tibialis anterior immobilisé et remobilisé. p159
- Figure 4 :** Modifications des niveaux ARNm codant pour MyoD et Myf-5 dans le muscle tibialis anterior immobilisé et remobilisé p160
- Figure 5 :** Modifications des niveaux ARNm codant pour les intégrines- $\alpha 7$ et $-\beta 1$ dans le muscle tibialis anterior immobilisé et remobilisé. p161

Figure 6 : Modifications des niveaux ARNm et/ou protéique de l'ILK, Pinch et Parvin- α dans le muscle tibialis anterior immobilisé et remobilisé.

p162

Tableaux

Tableau 1 : Classification des fibres lentes (I) et rapides (II) grâce à leur type contractile (révélé à l'aide de l'anticorps anti chaînes lourdes de myosine (MyHC)) et à leur type métabolique (analysé par la révélation de l'activité succinate déshydrogénase (SDH)).....p12

Tableau 2 : Altérations structurales pendant l'atrophie induite par l'inactivité physique et la récupération musculaire (aire des fibres, aire du tissu conjonctif et composition en chaînes lourdes de myosines).....p23

Tableau 3 : Régulation des différentes molécules impliquées dans l'apoptose au cours de l'inactivité physique (dénervation, suspension ou immobilisation par plâtrage) et la récupération musculaire..... p43

Tableau 4 : Altérations des molécules de la matrice extracellulaire au cours de l'inactivité physique (suspension ou immobilisation par plâtrage) et de la récupération..... p63

Tableau 5 : Amorces utilisées pour les analyses en RT-qPCR quantitative. p223

Contexte

Le muscle squelettique est un tissu en constant renouvellement qui possède de grandes capacités d'adaptation. La récupération musculaire dépend de la capacité du muscle à s'adapter aux changements physiologiques ou environnementaux suite à une situation catabolique, comme l'immobilisation. Le muscle est le réservoir principal d'acides aminés libres de l'organisme. Ainsi, une fonte musculaire prolongée entraîne un affaiblissement et un allongement des périodes de récupération qui s'accompagne d'une réduction de l'efficacité des traitements mis en place et d'une réduction de la mobilité pouvant conduire à terme à l'alitement des individus. L'alitement est un facteur aggravant l'atrophie musculaire et peut ainsi entraîner une baisse d'autonomie, augmenter les taux de mortalité des patients et élever le coût de santé publique. L'atrophie musculaire observée lors de nombreuses situations physio-pathologiques (cancers, vieillissement, immobilisation...) résulte d'un déséquilibre entre les vitesses de synthèse et de dégradation des protéines mais également entre les processus apoptotiques et de régénération musculaires.

L'atrophie induite par l'immobilisation, dans le muscle, chez le rat est associée 1/ à une activation des voies protéolytique ubiquitine-protéasome dépendante (UPS) et apoptotique mitochondriale, 2/ à des modifications de la typologie des fibres musculaires, et 3/ à des altérations de la structure (fibres et matrice extracellulaire (MEC)) du muscle squelettique. Après le déplâtrage, une aggravation d'atrophie caractérise certains muscles, ce qui retarde la récupération musculaire, et suggère des processus de remodelage très importants dans les phases initiales de récupération. Cependant, les mécanismes mis en jeu au cours de la période de récupération musculaire suivant une inactivité physique restent très peu étudiés comparés à la période d'immobilisation.

Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans le contrôle de la masse musculaire au cours de l'immobilisation et la récupération musculaire afin de développer de nouvelles stratégies permettant de prévenir ou limiter l'atrophie musculaire, mais également de favoriser la récupération musculaire.

Bibliographie

Chapitre I- Plasticité du muscle squelettique

Les muscles squelettiques recouvrent le squelette osseux, s'y attachent et constituent l'ensemble des muscles striés. Leurs propriétés (excitabilité, contractilité, élasticité...) permettent de générer force et mouvement. Bien qu'ils soient parfois activés par des réflexes, les muscles squelettiques sont aussi appelés muscles volontaires parce qu'ils sont soumis au système nerveux central.

Le tissu musculaire représente 40 % du poids corporel, soit 30 kg pour un individu de 70 kg. Il est majoritairement composé d'eau (73 à 75 %), de protéines (16 à 18 %), de lipides (1 à 6 %), de glucides, de minéraux et de vitamines (1 à 2 %). Les variations de composition dépendent principalement du muscle considéré, de l'espèce, de l'âge et du sexe.

Le muscle squelettique est caractérisé par sa grande plasticité lui permettant de s'adapter à plusieurs situations. Cette plasticité musculaire dépend de la capacité du muscle à modifier sa structure et les propriétés métaboliques et contractiles de ses fibres en réponse à des conditions environnementales imposées.

I. Structure et activité du muscle squelettique

I.1 Niveau d'organisation

Le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires. Les fibres musculaires sont les composantes essentielles du muscle. En se rétrécissant, ces cellules raccourcissent le muscle et permettent ainsi sa contraction. Un muscle est composé d'un nombre très important de fibres. Chaque muscle est inséré sur l'os par l'intermédiaire de tendons constitués essentiellement de tissu fibreux, élastique et solide. Le muscle squelettique est entouré de plusieurs couches de tissu conjonctif (Figure 1):

- l'endomysium entoure chaque fibre musculaire.
- le périmysium assemble les différentes fibres musculaires en faisceau de fibres musculaires.
- l'épimysium recouvre l'ensemble du muscle.

Après avoir traversé l'épimysium, les vaisseaux sanguins (artérioles, veinules), qui assurent la vascularisation du muscle, donnent naissance à un fin réseau de capillaires qui gagne le

périmysium puis l'endomysium pour vasculariser chaque fibre musculaire. Les prolongements des nerfs gagnent également le périmysium. Ils se terminent dans la jonction neuromusculaire pour innerver les différentes fibres musculaires. Les cellules du tissu conjonctif sont séparées grâce à une matrice extracellulaire composée de plusieurs types de molécules (protéoglycanes, glycoprotéines, collagènes, etc) qui jouent plusieurs rôles dont le soutien structural et l'adhérence de la cellule (Cf chapitre 3).

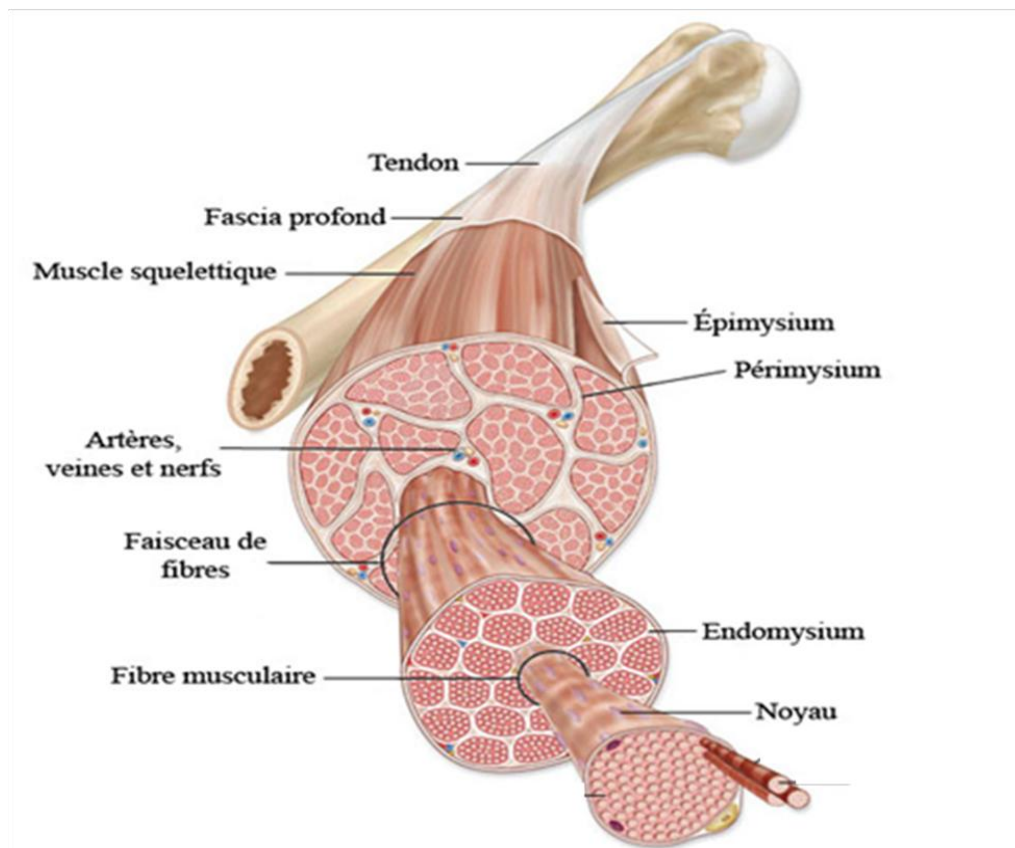


Figure 1 : Organisation du muscle squelettique. Schéma adapté à partir du site <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/25962/ch03.html>

I.2 Fibre musculaire squelettique

La fibre musculaire est une cellule de grande taille, fusiforme et allongée, pouvant atteindre une longueur de 30cm chez l'homme et ayant un diamètre de 10 à 100µm. Chaque fibre musculaire présente de nombreux noyaux répartis à la périphérie de la cellule, délimitée par

une membrane sarcoplasmique. Cette dernière présente de fines invaginations tubulaires réparties régulièrement le long de la fibre musculaire appelées tubules transverses ou tubules T. Ils permettent de propager rapidement le potentiel d'action et sont donc responsables de la contraction musculaire à l'intérieur de la fibre. Le sarcoplasme (cytoplasme) d'une fibre musculaire contient des réserves importantes de glycogène et de myoglobine. Il abrite les organites habituels indispensables au fonctionnement cellulaire tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi et les mitochondries. Le sarcoplasme renferme également des organites modifiés comme les myofibrilles (Figure 2).

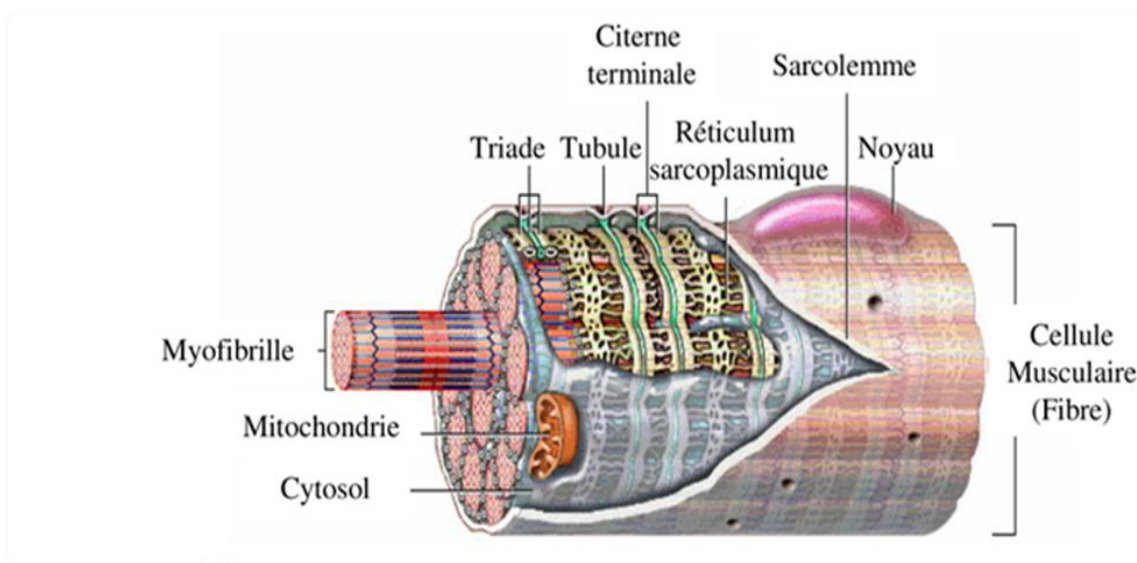


Figure 2 : Localisation des myofibrilles

Le cytoplasme des fibres musculaires est composé d'un assemblage de myofibrilles qui sont disposées longitudinalement (selon le grand axe de la cellule).

I.3 Les myofibrilles et les protéines myofibrillaires

Les myofibrilles sont les unités contractiles du muscle. Elles occupent environ 80% du volume de la fibre musculaire et sont caractérisées par un diamètre de 1 à 2 μ m (Bouisset & Maton, 1995). Ce sont des cylindres parallèles allongés dans le sens de la cellule, issus de la succession régulière, bout à bout, de petits cylindres identiques appelés sarcomères.

Chaque sarcomère est formé d'un faisceau de myofilaments parallèles à son grand axe. Le myofilament est caractérisé par un diamètre de 5 à 14 nm, et présente une alternance régulière

de bandes claires I (monoréfringentes isotropes) et de bandes A sombres (biréfringentes anisotropes), d'où le nom de muscle strié (Figure 3A). Un sarcomère est composé d'une bande A et de deux demi bandes I, séparées en leur centre par la ligne Z. Les bandes A sont composées de filaments épais de myosine qui chevauchent les filaments fins d'actine. Les bandes I ne contiennent pas de myosine mais sont composées des filaments fins d'actine (Figure 3B).

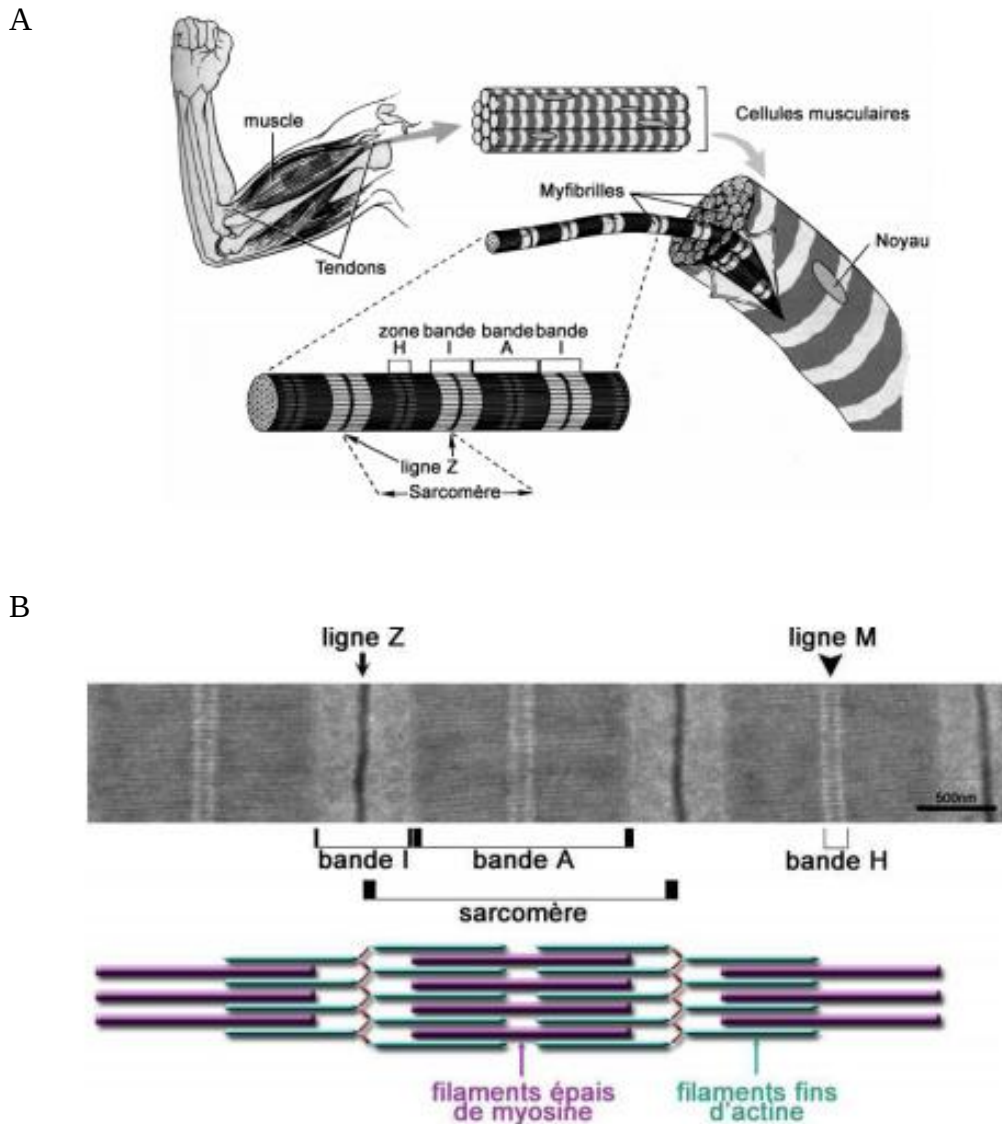


Figure 3 : Structure du muscle squelettique : du muscle à l'unité contractile. A. La fonction de contraction du muscle est réalisée par les myofibrilles. B. Trois sarcomères d'une myofibrille de muscle squelettique de souris en coupe longitudinale observés au microscope électronique. Adapté de (Goll *et al.*, 2008).

L'actine et la myosine constituent les protéines myofibrillaires majeures, sont impliquées dans la contraction musculaire, et peuvent être régulées par d'autres protéines myofibrillaires.

L'actine est une protéine qui peut exister soit sous forme globulaire et monomérique, de 42 kDa, encore appelée actine G, soit sous forme polymérique filamenteuse de 7nm de diamètre, dite actine F, résultant de la polymérisation de l'actine G. Six isoformes d'actine, regroupées en trois catégories (α , β , γ), ont été identifiées chez les mammifères. L'actine β et γ jouent un rôle dans la division cellulaire et les mouvements intracellulaires. L'actine α , spécifique du muscle strié (Herman, 1993) est, avec la myosine, responsable de la contraction musculaire.

La myosine est une protéine de haut poids moléculaire de 480 kDa composée de 6 sous-unités. Chaque myosine est composée de 2 chaînes lourdes (Myosin Heavy Chain, MyHC) identiques enroulées l'une autour de l'autre et de 2 paires de chaînes légères globulaires (Myosin Light Chain, MLC) (Young *et al.*, 1986; Pette & Staron, 2000). Ces chaînes légères sont classées en chaînes légères essentielles (MLC1 et MLC3) et régulatrices (MLC2). En effet, chaque monomère de chaîne lourde s'associe d'une part avec une chaîne légère essentielle et d'autre part avec une chaîne légère régulatrice.

La chaîne lourde de la myosine est constituée d'une tête globulaire et d'une queue en hélice α . Possédant une activité ATPasique, la tête de la myosine peut transformer l'énergie chimique après hydrolyse de l'ATP en fonction mécanique ce qui permet d'effectuer la contraction musculaire. La queue de la myosine possède des sites d'interaction avec des protéines de la ligne M (myoméline), des protéines de stabilisation (protéine C) et avec la titine.

La titine, est une protéine élastique géante de 3000 kDa. Elle couvre la moitié d'un sarcomère de la strie Z jusqu'à la ligne M (Skeie, 2000). La titine peut interagir avec plusieurs protéines (myosine, actine, calpaïne, ...) contrôlant l'assemblage des protéines sarcomériques et régule l'élasticité du sarcomère.

Le mécanisme de contraction musculaire nécessite d'être régulé. Certaines protéines associées au filament d'actine sont capables de réguler l'activité du complexe acto-myosine comme la tropomyosine et la troponine (Cooke, 1997; Gordon *et al.*, 2000).

I.4 La contraction musculaire

La contraction musculaire résulte de la mise en jeu de cycles de raccourcissements des myofibrilles qui composent les fibres.

Lorsqu'un muscle exerce une force avec une charge donnée, il produit une tension sur cette charge. Le terme contraction désigne le déclenchement du processus producteur de tension dans le muscle. Il existe deux types fondamentaux de contractions : les contractions isotoniques (ou anisométrique) et les contractions isométriques.

La contraction isotonique est un type de contraction musculaire dans laquelle la tension reste inchangée. Ce type de contraction est le plus commun et est impliqué dans de nombreux exercices physiques. Il existe deux types de contractions isotoniques : concentrique et excentrique.

La contraction isotonique est concentrique quand le mouvement est réalisé par le muscle acteur de ce mouvement. C'est le type de contraction le plus courant. Au cours de ce type de contraction, les extrémités du muscle se rapprochent entraînant ainsi le raccourcissement du muscle pour créer un mouvement.

La contraction isotonique est excentrique quand le mouvement est freiné par les muscles opposés à ce mouvement. C'est la phase où le muscle, conservant le contrôle de la charge, s'allonge pour reprendre sa longueur initiale.

La contraction isométrique est un type de contraction où la tension augmente mais la longueur du muscle reste la même. La résistance externe est égale à la tension fournie par le muscle : elle est également qualifiée de contraction statique. Ce type de contraction intervient essentiellement dans le maintien de la posture contre les forces de gravité et généralement dans les mouvements dits « résistants ».

La force maximale et la puissance générées par un muscle lors des contractions dépendent de nombreux facteurs dont 1) la taille des muscles et des fibres ainsi que leur longueur, 2) le volume maximal que peut atteindre les fibres composant ce muscle, 3) le type de fibre, 4) la vitesse ou la fréquence du mouvement, 5) l'âge, 6) le sexe, 7) l'angle articulaire, ainsi que 8) la section transversale du muscle (Fitts *et al.*, 1991).

II. Phénotype des muscles squelettiques

Les fibres musculaires diffèrent entre elles par leur diamètre, le nombre de myofibrilles qu'elles contiennent, leur équipement mitochondrial, leur vascularisation ainsi que leurs

propriétés métaboliques et contractiles (vitesse à laquelle les têtes de myosines se détachent de l'actine). En effet, les fibres musculaires possèdent un métabolisme glycolytique, oxydatif ou oxydo-glycolytique, et sont à contraction rapide ou lente. Les propriétés contractiles et métaboliques des fibres ont permis de les classer en 2 types : fibres de type I et fibres de type II. Différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine existent dans le muscle strié squelettique, certaines associées à une vitesse de contraction rapide (MyHC IIa, MyHC IId/x, MyHC IIb), d'autres à une vitesse de contraction lente (MyHC-I) (Tableau 1).

Durant le développement ou la régénération, certaines isoformes apparaissent de manière transitoire ou peuvent être tissu spécifique. Il s'agit des fibres embryonnaire, néonatale, fœtale, extra-oculaire ou encore mandibulaire (Rushbrook *et al.*, 1994; Gagniere *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 1999; Pette & Staron, 2000).

II.1 Méthodes d'études du phénotype musculaire

Plusieurs techniques sont utilisées pour distinguer les différents types de fibres.

La mesure de l'activité ATPase des fibres musculaires sur coupes histologiques est la technique la plus utilisée dans le passé. En effet, les différences d'activité enzymatique des ATPases de la myosine sont révélées par une double incubation des coupes dans des solutions tampon acide (pH 4,3 puis 4,6), puis alcaline (10,3). Au microscope, les fibres lentes (I) apparaissent alors en foncé, les fibres rapides IIa en clair et les fibres rapides IIb en gris (Barrey, 1994). Cependant cette méthode basée sur l'activité enzymatique globale des fibres analysées ne permet pas de se prononcer de manière précise sur leur contenu en protéines contractiles spécifiques.

La technique d'électrophorèse 1D permet de séparer les différentes isoformes de myosine en fonction de leur taille à partir d'extraits musculaires. (Kohn & Myburgh, 2006; Mizunoya *et al.*, 2008a). Il existe plusieurs isoformes des chaînes lourdes et légères de myosine dont l'expression est étroitement régulée au sein des muscles squelettiques ou en réponse à des changements d'activité contractile. L'expression de ces isoformes dépend du type de fibre (rapide, lente) mais aussi de l'espèce. Par exemple, chez le rat 4 isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) ont été identifiées. Il s'agit des isoformes MyHC I, MyHC IIa, MyHC IIb, MyHC IIx. Bien que le gène soit présent dans le génome humain, l'isoforme MyHC IIb est absente chez l'homme, et seules les isoformes MyHC I, MyHC IIa et MyHC IIx sont présentes. Ainsi chez l'homme l'isoforme la plus rapide, hormis dans le muscle extra-oculaire

(où l'isoforme MyHC extra-oculaire est exprimée), est l'isoforme MyHC IIx alors que chez les rongeurs, il s'agit de l'isoforme MyHC-IIb.

De nos jours, les différentes isoformes de myosines sont souvent mises en évidence par immunohistologie. En effet, les chaînes lourdes de la myosine lente et rapide ont des propriétés antigéniques distinctes ce qui a permis de préparer des anticorps monoclonaux anti-myosine lente et anti-myosine rapide (Danieli Betto *et al.*, 1986; Barrey, 1994). Il est donc possible d'identifier les différentes isoformes de chaînes lourdes de myosines et également de distinguer les fibres hybrides (à métabolisme oxydo-glycolytique). Ceci permet ainsi d'étudier les transitions de fibres.

Type de fibres	I	IIA	IIX	IIB
Contraction	Lente	Rapide		
MyHC	I	Ila	IIX	Iib
Activité ATPasique	Faible	Forte		
Métabolisme	Oxydatif	Oxydo-glycolytique		Glycolytique
Vitesse de contraction				
Activité ATPase myosine alcaline	lente	rapide	rapide	rapide
Activité ATPase myosine acide	élevée	faible	faible	faible
Résistance à la fatigue	+++	++	+	+
Métabolisme énergétique				
Activité SDH (succinate déshydrogénase)	+++	+++	++	+
Activité αGPDH (α-phosphoglycérate déshydrogénase)	+	++	+++/-	+++
Activité phosphorylase	+	+++	+++	+++
Nombre de mitochondries	+++	++	+	+/-

Tableau1 : Classification des fibres lentes (I) et rapides (II) grâce à leur type contractile (révélé à l'aide d'anticorps anti chaînes lourdes de myosine (MyHC)) et à leur type métabolique (analysé par la révélation de l'activité succinate déshydrogénase (SDH)). Adapté à partir de (Picard *et al.*, 2003).

II.2 Les fibres de type I

Les fibres de type I appelées également fibres lentes sont caractérisées par un petit diamètre et une vitesse de contraction lente. Ce sont des fibres très vascularisées, riches en myoglobine, en mitochondries et en enzymes oxydatives. Ces dernières sont caractérisées par une faible activité ATPasique acide résistante à pH4.3 (Padykula & Herman, 1955; Brooke & Kaiser, 1970). Les fibres de types I possèdent peu de myofibrilles et développent ainsi une force très faible. Elles fonctionnent selon un métabolisme oxydatif (aérobie), produisent peu d'acide lactique et sont donc très résistantes à la fatigue. La grande quantité de myoglobine permet d'assurer un bon transfert d'oxygène et leur confère une couleur rouge. Ces fibres sont surtout utilisées lors d'exercices peu puissants et prolongés (maintien de la posture).

II.3 Les fibres de type II

Les différents sous-types de fibres de type II sont toutes caractérisées par une vitesse de contraction rapide mais un approvisionnement énergétique pouvant être plus ou moins dépendant de l'oxygène.

Les fibres de type IIb sont des fibres peu vascularisées, pauvres en mitochondries mais très riches en glycogène. De ce fait, elles fonctionnent selon un métabolisme glycolytique (anaérobie). Ces fibres sont peu irriguées et possèdent peu de myoglobine d'où la couleur blanche qui caractérise les muscles composés principalement de ce type de fibres. Ces fibres sont très fatigables mais très puissantes et sont donc sollicitées lors des contractions rapides et des exercices intenses.

Les fibres de type IIa possèdent moins de myofibrilles mais plus de mitochondries que les fibres rapides glycolytiques IIb. Dans ce type de fibres, les deux types de métabolisme coexistent (Peter *et al.*, 1972). Elles fonctionnent donc selon un métabolisme oxydo-glycolytique. Les muscles composés de ce type de fibres sont donc dotés d'une grande faculté d'adaptation.

Les fibres de type IIx sont relativement peu décrites dans la littérature et sont caractérisées par un métabolisme oxydo-glycolytique intermédiaires entre les fibres de type IIa et IIb.

II.4 Composition des muscles squelettiques

La distribution des fibres dans un muscle donné définit ses propriétés contractiles et métaboliques. Il existe deux catégories de muscles :

1- Les muscles à fonction posturale sont majoritairement composés de fibres de type I à contraction lente. Ils jouent un rôle dans le maintien de l'équilibre lors du mouvement et de la station debout. C'est le cas du soleus par exemple.

2- Les muscles à fonction phasique ou muscles d'action sont composés principalement de fibres de type II à contraction rapide. Ils interviennent lors des mouvements volontaires par exemple.

La composition en fibre d'un muscle donné peut changer sous l'effet de certains facteurs comme l'âge, le stress ou l'exercice (Kirkendall & Garrett, 1998; Pette & Staron, 2001; Quindry *et al.*, 2011). On parle alors de transition de type de fibres.

III. La myogenèse

La myogenèse est un processus biologique qui conduit à la formation des tissus musculaires lors du développement de l'embryon et qui intervient également lors de la régénération musculaire suite à une lésion traumatique ou pathologique. En effet, contrairement au muscle cardiaque ou au muscle lisse, qui ont un faible potentiel de régénération, le muscle squelettique peut se régénérer de façon extensive et autonome. La régénération musculaire est précédée d'une dégénérescence musculaire qui comporte deux phases distinctes et consécutives qui mènent à la nécrose de la fibre musculaire lésée : une phase non inflammatoire, qui se limite aux minutes voire à l'heure qui suit le traumatisme, caractérisée par l'entrée de calcium extracellulaire et par la désintégration des organites comme les mitochondries, les ribosomes et les myofibrilles (Hansensmith & Carlson, 1979), puis une phase de dégénérescence inflammatoire qui se caractérise par une infiltration de cellules inflammatoires.

III.1 Acteurs et étapes de la régénération musculaire

Chez l'adulte, les principaux acteurs de la régénération musculaire suite à une blessure ou une maladie sont les cellules satellites. Ces dernières sont des cellules souches musculaires permettant la croissance, le renouvellement et la régénérescence du tissu musculaire. En effet, ces cellules souches qui se divisent, vont réparer, et réguler la croissance du tissu musculaire squelettique suite à leur différenciation en cellules musculaires. Les cellules satellites sont des cellules de petite taille mononucléées, pauvres en cytoplasme et en organites. Elles se trouvent juxtaposées aux fibres musculaires entre la membrane basale et la membrane plasmique. La régénération musculaire se déroule en trois étapes majeures: 1/ la différenciation des cellules satellites en myoblastes ; 2/ la prolifération des myoblastes ; 3/ leur fusion en myotubes. Enfin une dernière étape qui correspond à la maturation du muscle (transition des MyHC, biogénèse mitochondriales, etc) pendant laquelle les noyaux vont migrer du centre de la fibre en cours de régénération vers sa périphérie (Figure 4).

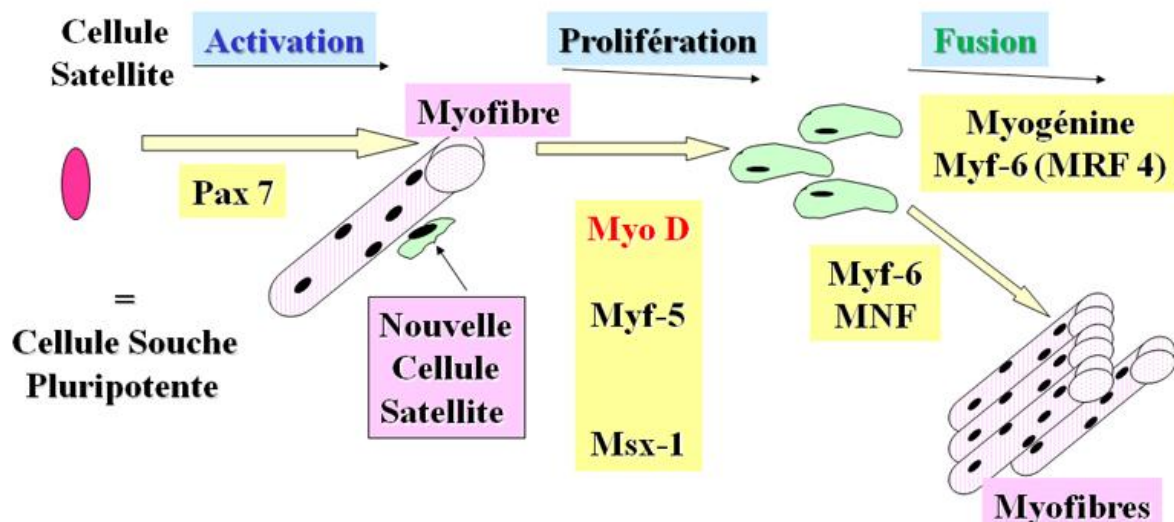


Figure 4 : Schéma représentant les différentes étapes de la régénération musculaire.

D'après : http://www.univmontp1.fr/media/images/unites_de_recherche/u1046_images/genes_impliques_dans_la_regeneration_musculaire.

Myf-5 : Myogenic factor 5 ; Myf-6 : Myogenic factor 6 ; MNF: Myocyte nuclear factor ;

Msx-1: Muscle segment homeobox 1 ; Pax7 : paired box transcription factor

L'enchaînement de ces différentes étapes nécessite l'expression des facteurs myogéniques, les MRFs (« Myogenic Regulatory Factors »), et est régulé par des mécanismes moléculaires qui font notamment intervenir différents facteurs de transcription et de croissance. En effet, les MRFs sont des facteurs de transcription capables d'orchestrer le programme myogénique dans la cellule. Lorsqu'elles sont activées, les cellules satellites expriment les quatre facteurs myogéniques (Myf-5, MyoD, myogénine et MRF4) alors qu'elles ne les expriment pas ou faiblement (Myf-5) à l'état quiescent (Beauchamp *et al.*, 2000; Wozniak *et al.*, 2005). De plus, ces MRFs semblent exercer des fonctions différentes durant la régénération musculaire. En effet, certains facteurs (MyoD et Myf-5) s'expriment au cours de la phase précoce alors que d'autres (Myogénine et MRF4) s'expriment durant les phases tardives.

III.2 Régulation de la régénération musculaire

Comme tout processus de développement tissulaire, la régénération musculaire est régulée par différents mécanismes moléculaires impliquant des facteurs de transcription (Pax 3 et Pax7) (Buckingham, 2007) mais également des facteurs de croissance.

Des études ont montré que des souris doublement invalidées pour ces gènes présentaient un défaut quasi-total en cellules musculaires. Ceci suggérait un rôle essentiel de ces facteurs dans l'apparition ainsi que la survie des progéniteurs musculaires (Relaix *et al.*, 2005; Tajbakhsh, 2005; Buckingham, 2007). Ces protéines, notamment Pax7, seraient fortement impliquées dans la spécification des cellules satellites. En effet, Pax7 est exprimée par les cellules satellites qu'elles soient à l'état quiescent, activé ou prolifératif. A l'opposé, Pax3 n'est pas toujours exprimée par les cellules satellites. Les progéniteurs Pax3⁺/Pax7⁺ peuvent initier le programme myogénique en activant les facteurs Myf5 et MyoD1 (Sambasivan & Tajbakhsh, 2007) soit directement comme au cours de la période prénatale (Bajard *et al.*, 2006; Relaix *et al.*, 2006), soit indirectement, durant la période post-natale, (Relaix *et al.*, 2005; Buckingham, 2007).

La régénération musculaire implique également l'intervention de plusieurs facteurs de croissance. L'activation des cellules satellites peut avoir lieu à la suite de la fixation du facteur de croissance HGF (Hepatocyte Growth Factor) sur son récepteur (c-met). Elle peut également être régulée par d'autres facteurs de croissance tels que IGF-I (Insulin Like Growth Factor I) et IGF-II (Insulin Like Growth Factor II) qui agissent sur la prolifération des cellules

satellites. D'autres facteurs de croissance comme le facteur FGF ou les protéines Notch et BMP-4 capables d'induire l'expression de gènes régulateurs positifs de la prolifération cellulaire (c-myc, c-jun et c-fos) interviennent également lors de la prolifération des myoblastes.

IV. Atrophie musculaire

Le muscle squelettique est doté d'une grande plasticité lui permettant de s'adapter à plusieurs situations. Cette plasticité nécessite un contrôle rigoureux de l'évolution de la masse protéique musculaire qui dépend de l'équilibre entre la protéolyse et la synthèse protéique. En effet, chez un individu adulte sain (dépourvu de pathologies), la synthèse protéique et la protéolyse sont en équilibre engendrant une balance azotée nulle. Néanmoins, dans certaines situations, cette balance est modifiée. Soit elle devient positive permettant un gain de masse musculaire, soit elle devient négative ce qui induit une perte de masse musculaire. Ceci s'observe dans plusieurs pathologies ou de traumatismes comme le cancer, le diabète, les infections, les fractures, etc.

Au cours de l'inactivité physique, l'équilibre de la balance protéolyse et synthèse protéique est rompu (Thomason & Booth, 1990; Haddad *et al.*, 2003), et la quantité des protéines dégradées dépasse celles des protéines synthétisées conduisant à une atrophie musculaire. Le muscle possédant des fonctions locomotrices et métaboliques, cette atrophie musculaire peut engendrer un affaiblissement qui est aggravé en présence de l'inactivité physique. Cet affaiblissement peut aller jusqu'à l'alitement des patients. Ceci a pour conséquence d'augmenter le coût de santé publique mais aussi le taux de mortalité. Il est donc nécessaire 1) de caractériser les mécanismes impliqués dans l'atrophie musculaire issue de l'inactivité physique afin de prévenir ou limiter ses effets néfastes, ainsi que 2) de favoriser la récupération musculaire qui s'ensuit.

IV.1 Au cours de l'inactivité physique

Différents modèles animaux ont été mis en place afin d'étudier les effets de l'immobilisation: l'immobilisation par plâtrage, la dénervation (section du nerf dorsal ou sciatique) et l'apesanteur réelle (vols spatiaux ou vols paraboliques) ou simulée (suspension des membres

inférieurs). Dans ces modèles, l'immobilisation ou l'absence d'utilisation des muscles induit de profondes modifications au niveau de la structure des muscles immobilisés.

IV.1.1 Altérations structurales

L'inactivité physique désigne un état dans lequel les mouvements sont réduits au minimum et la dépense énergétique est quasi égale au métabolisme énergétique de repos. Elle augmente le risque des maladies cardiovasculaires d'un facteur 2 par rapport à des personnes qui pratiquent une activité sportive.

L'immobilisation affecte principalement la surface et le diamètre des fibres musculaires, sans réduction du nombre de fibres musculaires (Nicks *et al.*, 1989; Bruusgaard & Gundersen, 2008). En effet, l'aire des fibres musculaires diminue chez l'Homme et l'animal suite à l'immobilisation par plâtrage (Mattiello-Sverzut *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2008; Psatha *et al.*, 2012; Vazeille *et al.*, 2012), à la suspension (Dudley *et al.*, 1992; Hather *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2006; Oishi *et al.*, 2008; Desaphy *et al.*, 2010), ou encore à l'alitement (Berg *et al.*, 1997; Larina *et al.*, 1997) (Tableau 2).

Plusieurs études montrent que l'atrophie induite par l'inactivité physique affecte principalement les muscles à fonction posturale caractérisés par un métabolisme oxydatif rapide comme le soleus. Ce dernier s'atrophie autour de 24% après 8 jours (Vazeille *et al.*, 2008) et de 44% après 3 semaines (Coutinho *et al.*, 2004) d'immobilisation par plâtrage. Cette atrophie atteint 55 à 60% après 9 jours (Taillandier *et al.*, 1996) ou 5 semaines (Desplanches *et al.*, 1990) de suspension. De plus, la position d'immobilisation semble influencer le degré d'atrophie musculaire après une immobilisation par plâtrage. En effet, l'atrophie des muscles immobilisés en position raccourcie est plus importante que celle des muscles immobilisés en position étirée (Goldspink, 1977; Booth, 1982; Vazeille *et al.*, 2008). L'inactivité physique entraîne une redistribution des chaînes lourdes de myosines. En effet, 3 à 4 semaines de suspension chez le rat induisent une baisse du pourcentage (ou du nombre) des isoformes de type I, et une augmentation des isoformes de type IIa, et des IIx (Cornachione *et al.*, 2008; Guillot *et al.*, 2008; Oishi *et al.*, 2008; Cornachione *et al.*, 2011).

Une diminution de la proportion ou des niveaux des ARNm codant pour les MyHC de type I est observée chez le rat (Mattiello-Sverzut *et al.*, 2006) ou l'Homme (Hortobagyi *et al.*, 2000) après 2 ou 3 semaines d'immobilisation par plâtrage respectivement. Le comportement des

ARNm des MyHC de type IIa quant à lui n'est pas clairement défini dans la littérature. En effet, la proportion ou des niveaux des ARNm codant pour les MyHC de type IIa peut diminuer (Polizello *et al.*, 2011), augmenter (Mattiello-Sverzut *et al.*, 2006) chez le rat ou alors ne pas être modifiée chez l'Homme (Hortobagyi *et al.*, 2000) après 2-3 semaines d'immobilisation. L'aire ou le diamètre des fibres de type I, IIa ou IIx diminue chez le rat (Polizello *et al.*, 2011) ou l'Homme (Hortobagyi *et al.*, 2000) après 2 ou 3 semaines d'immobilisation par plâtrage respectivement (Tableau 2).

Enfin, le tissu conjonctif semble aussi être altéré suite à l'inactivité physique. Par exemple, l'immobilisation par plâtrage induit un épaissement du tissu conjonctif dans des muscles de rat ou de souris (Williams & Goldspink, 1984; Appell, 1990; Jozsa *et al.*, 1990; Lapier *et al.*, 1995; Jarvinen *et al.*, 2002; Mattiello-Sverzut *et al.*, 2006; Polizello *et al.*, 2011). Cet épaissement devient plus important quand les muscles immobilisés subissent un étirement (Mattiello-Sverzut *et al.*, 2006).

La majorité des données présentes dans la littérature, étudiant les altérations structurales au cours de l'inactivité physique, s'intéressent principalement à l'étude des fibres musculaires (aire, diamètre, distribution des chaînes lourdes de myosines, etc...). Peu de données existent sur les altérations du tissu conjonctif et encore moins sur l'évolution de celui-ci en parallèle avec les altérations des fibres. Pourtant, les altérations des fibres et du tissu conjonctif pourraient être reliées, et exercer un rôle sur l'évolution des altérations des un(e)s et des autres.

IV. 1.2 Altérations cellulaires

Les processus inflammatoires et de stress oxydant sont souvent associés aux processus d'atrophie musculaire au cours de l'inactivité physique (Kondo *et al.*, 1993; Andrianjafiniony *et al.*, 2010; Magne *et al.*, 2011). Au cours de l'inactivité physique, l'atrophie musculaire peut être « médiée » par une augmentation d'expression des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (en particulier le TNF (« Tumor Necrosis Factor »)) (Andrianjafiniony *et al.*, 2010). Ces ROS semblent participer à l'atrophie musculaire au cours de l'inactivité musculaire (Powers *et al.*, 2007; Powers *et al.*, 2012) en activant la protéolyse musculaire. Une augmentation de la quantité de protéines carbonylées

(considérées comme un marqueur du stress oxydant) ou de l'expression des ROS est observée dans des muscles soleus ou gastrocnemius immobilisés par plâtre (Kondo *et al.*, 1993; Magne *et al.*, 2011). De la même manière, la suspension semble induire un stress oxydant dans des muscles de rat ou de lapin, en augmentant l'activité des Cu-Zn superoxyde dismutase, la quantité de lipides peroxydés et en réduisant l'activité des enzymes anti-oxydantes comme les catalases ou les glutathion peroxydases (Lawler *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Lawler *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2011). L'immobilité présente également une augmentation du contenu musculaire en protéines carbonylées (Vescovo *et al.*, 2008; Dalla Libera *et al.*, 2009). L'atrophie musculaire génère des dommages cellulaires qui peuvent induire une inflammation locale (Kasper, 1995; McClung *et al.*, 2007). En effet, l'immobilisation par plâtre de souris par exemple, induit une augmentation des niveaux ARNm codant pour le TNF- α , les IL-6 (Interleukine-6) et IL-1 et pour le marqueur leucocytaire (CD45) (Caron *et al.*, 2009).

Au cours de l'inactivité physique, les cellules opèrent une transition métabolique favorisant l'utilisation de la voie glycolytique. L'immobilisation par plâtre entraîne une diminution d'un facteur 3 de l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique oxydatif, en particulier l'ATPase, la cytochrome-C oxydase, la NADH déshydrogénase, et la protéine phosphatase (St-Amand *et al.*, 2001). Chez des rats soumis à une apesanteur simulée, une diminution de la masse musculaire du soleus et de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'oxydation des acides gras accompagnées d'une augmentation de l'activité glycolytique ont été observées (Edgerton *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 2002).

IV.2 Pendant la récupération suite à une inactivité physique

IV.2.1 Altérations structurales et fonctionnelles

Les périodes de récupération musculaire ont été peu étudiées comparées aux périodes d'atrophie musculaire. De plus, suite à un même modèle d'inactivité physique, les données ne permettent pas de dégager un message clair sur les altérations pendant la récupération. Par exemple, dans le muscle soleus, la masse et/ou l'aire des fibres musculaires sont soit normalisées 5-9 jours après la désuspension (Litvinova *et al.*, 2007; Widrick *et al.*, 2008;

Andrianjafiniony *et al.*, 2010), ou alors restent diminuées, même après 7 à 16 jours de désuspension (Dapp *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2010) chez des souris ou des rats ayant été suspendus pendant 2 à 4 semaines. Dans le modèle d'immobilisation par plâtrage, les données sont plus éparses. La masse et/ou l'aire des fibres musculaires sont normalisées après 2 à 4 semaines de récupération dans le muscle du genou chez l'Homme (Hvid *et al.*, 2010) ou alors restent diminuées après 10 jours de récupération chez le rat (Vazeille *et al.*, 2012) (Tableau 2).

Les modifications de la proportion des différentes isoformes de chaînes lourdes de myosines de type I, IIa ou IIx, observés au cours de l'inactivité physique, sont normalisées après 14j de désuspension chez le rat (Oishi *et al.*, 2008; Andrianjafiniony *et al.*, 2010) ou après 10 à 14j de remobilisation après déplâtrage chez le rat (Polizello *et al.*, 2011) ou l'Homme (Hortobagyi *et al.*, 2000) (Tableau 2).

La position d'immobilisation semble jouer un rôle important dans le maintien de la masse musculaire au cours de la période de récupération. En effet, après 10 jours de remobilisation, l'atrophie observée dans le muscle gastrocnemius (immobilisé en position raccourcie) se stabilise alors qu'elle s'aggrave de façon surprenante dans le muscle tibialis anterior (immobilisé en position étirée) (Vazeille *et al.*, 2008).

Cependant, l'épaississement du tissu conjonctif du muscle vastus intermedius observé au cours l'immobilisation par plâtrage peut être augmenté même après 4 semaines de récupération chez des lapins immobilisés pendant 3 jours en position raccourcie (Kauhanen *et al.*, 1996). Ainsi, les altérations touchant le tissu conjonctif semble nécessiter un temps de récupération plus long que les autres paramètres précités.

IV.2.2 Altérations cellulaires (métabolisme & stress oxydant...)

Une augmentation du stress oxydant caractérise les muscles au cours de la période de récupération après une atrophie musculaire. En effet, au cours de cette période, une augmentation du niveau de peroxydation des lipides, de l'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase a été constatée dans des muscles de rat ayant été suspendus pendant 2 semaines (Andrianjafiniony *et al.*, 2010) ou de lapin ayant été immobilisé par plâtrage pendant 3 semaines (Liu *et al.*, 2005). En parallèle, la quantité de glutathion peroxydase a été diminuée (Liu *et al.*, 2005; Lawler *et al.*, 2006). De plus, l'expression des «Heat Shock Proteins» (HSP), induite en présence d'un stress oxydant, est augmentée dans le muscle

gastrocnemius au cours de la récupération après 4 semaines d'immobilisation par plâtrage chez le rat contribuant probablement à la récupération de ces muscles (Venojarvi *et al.*, 2007).

L'inflammation semble également jouer un rôle important au cours de la récupération musculaire (Stpierre & Tidball, 1994; Nguyen & Tidball, 2003a, b). En effet, une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6 est observée dès le premier jour de récupération chez des rats ayant été suspendus pendant 14 jours. La sécrétion de l'IL-6 jouerait un rôle très important dans les processus de régénération musculaire et donc de récupération musculaire au cours de la désuspension (Washington *et al.*, 2011). En effet, cette cytokine permettrait d'induire la prolifération des cellules satellites (Cantini *et al.*, 1995). De plus, l'IL-6 est décrite dans la littérature comme étant capable de favoriser l'élimination du tissu endommagé, de synchroniser le cycle cellulaire des cellules satellites, et d'induire l'apoptose des macrophages après une lésion musculaire (Hawke & Garry, 2001). L'importance de cette cytokine dans la récupération musculaire a été confirmée par les travaux de Washington *et al.* (2011). Ces derniers montrent que l'inhibition de l'IL-6 chez des souris désuspendues induirait une inhibition d'une voie qui contrôle la synthèse protéique (Akt-mTOR) ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines MyoD et myogénine impliquées dans la régénération musculaire.

Peu d'études portant sur les phases de récupération musculaire sont disponibles actuellement dans la littérature, notamment sur le rôle des altérations structurales (i.e. aire des fibres et du tissu conjonctif). Pourtant, ces altérations peuvent influencer la durée de récupération ou les mécanismes impliqués dans le maintien de la masse musculaire au cours de cette période. La position d'immobilisation semble impliquée dans l'allongement des périodes de récupération (Vazeille *et al.*, 2008). L'étude de l'impact de la position d'immobilisation sur les altérations structurales et fonctionnelles des muscles devraient apporter plus d'informations sur les processus de récupération musculaire. Relier ce type d'information à des données sur le métabolisme protéique musculaire qui conditionne le maintien de la masse musculaire (Cf. Chapitre 2) devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les processus de récupération musculaire.

Modèle	Immobilisation / récupération	Durée	Données	Espèce	Muscle	Référence
Modèle d'immobilisation par plâtre	Immobilisation	7 semaines (wk)		Homme	Tendon d'achille	Christensen <i>et al.</i> , 2008
		6 wk	↓ CSA fibres	Homme	TA, GA, soelus	Psatha <i>et al.</i> , 2012
		8 jours (j)		Rat	GA	Vazeille <i>et al.</i> , 2012
		14 j	↓ aire du TC	Rat	Soleus	Mattiello-sverzut <i>et al.</i> , 2006
		14 jours	↓MyHCI ↓MyHCII ↓MyHC hybrides	Rat	Soleus	Mattiello-sverzut <i>et al.</i> , 2006
	Récupération	4 wk (après 2wk d'immo) 1 à 3 wk (après 2wk d'immo) 10 j (après 8j d'immo)	CSA normalisé CSA reste ↓	Homme Homme Rat	Muscle du genou EDL GA	Hvid <i>et al.</i> , 2010 Stevens-Lapsley <i>et al.</i> , 2010 Vazeille <i>et al.</i> , 2012
Modèle de suspension (HU)	Suspension	-		Homme	quadriceps	Dudley <i>et al.</i> , 1992
		6 wk		Homme	vastus lateralis	Hather <i>et al.</i> , 1992 2
		16 j	↓ CSA fibres	Rat	Soleus	Wang <i>et al.</i> , 2006
		2 wk		Rat	Soleus	Oishi <i>et al.</i> , 2008
		14 j		Souris	Soleus	Desaphy <i>et al.</i> , 2010
	Récupération (R).	14 j	↔MyHCI, ↓ MyHCIIa, ↑MyHC IIX et IIb	Souris	Soleus	Desaphy <i>et al.</i> , 2010
		14 j	↔MyHCI, MyHC IIb, IIX, IIa	Souris	GA	Desaphy <i>et al.</i> , 2010
		9 jours (après 15j HU)	CSA normalisé	Rat	Soleus	Widrick <i>et al.</i> , 2008
		1, 5 et 14 j (après 2 wk HU) 1 et 7 j (après 7j HU) 7 j(après 28j HU)	CSA normalisé à R14 ↓ CSA fibres	Rat souris Rat	Soleus Soleus Soleus	Adrianjafiniony <i>et al.</i> , 2010 Dapp <i>et al.</i> , 2004 Lawler <i>et al.</i> , 2006

Tableau 2 : Altérations structurales pendant l’atrophie induite par l’inactivité physique et la récupération musculaire (aire des fibres, aire du tissu conjonctif et composition en chaînes lourdes de myosines). CSA : aire des fibres ; TC : tissu conjonctif ; wk : week ; j : jour ; MyHC : Myosin Heavy Chain ; HU : Hindlimb Unloading ; GA : Gastrcnemius ; TA : Tibialis Anterior ; EDL : extensor digitorum longus.

Chapitre II- Rôle de la protéolyse et de l'apoptose dans l'atrophie et la récupération musculaire

La masse musculaire est maintenue grâce à un équilibre entre la synthèse protéique et la protéolyse mais également entre les processus apoptotiques et de régénération musculaire. Cet équilibre peut être perturbé lors de situations pathologiques (cancers, maladies neurodégénératives,...) et/ou physiologiques (vieillesse, ...). Dans ces conditions, la protéolyse et l'apoptose peuvent être activées (Tisdale, 2002) conduisant à une perte excessive de protéines et de cellules musculaires non compensée par la synthèse protéique et la régénération. La protéolyse et l'apoptose semblent donc jouer un rôle très important dans l'établissement des atrophies musculaires.

I. Rôle de la protéolyse dans l'atrophie et la récupération musculaire

La protéolyse musculaire constitue la principale source d'acides aminés pour l'organisme. Elle fait intervenir cinq systèmes protéolytiques : la voie lysosomale, la voie ubiquitine protéasome-dépendante, la voie des caspases, la voie calcium-dépendante et les métalloprotéases. La dégradation des protéines dans le muscle squelettique est contrôlée par deux systèmes protéolytiques majeurs, le système ubiquitine protéasome-dépendant et l'autophagie (Masiero *et al.*, 2009; Paul & Kumar, 2011). Ces systèmes sont activés dans un grand nombre de situations cataboliques dont le cancer, le SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise), le diabète, l'insuffisance rénale ou cardiaque, ou encore l'immobilisation ce qui contribue à la perte de masse musculaire et à un affaiblissement des individus.

I.1 Les systèmes protéolytiques

I.1.1 L'autophagie

L'autophagie, terme provenant du grec signifiant « se manger soi-même », est un processus majeur de ciblage des constituants intracellulaires vers la voie lysosomale. Les lysosomes sont des organites cellulaires de 0,2 à 0,5µm, au sein desquels les enzymes (hydrolases) vont exercer leur fonction protéolytique. Ils sont présents dans le cytosol de toutes les cellules animales, à l'exception des hématies. L'autophagie participe au maintien de l'homéostasie cellulaire en permettant la dégradation des protéines ou des organelles non fonctionnelles et joue également un rôle dans la survie des cellules soumises à des conditions de stress (Masiero & Sandri, 2010; Martinez-Borra & Lopez-Larrea, 2012).

Il existe trois types d'autophagie qui dépendent de l'élément à dégrader (Lynch-Day & Klionsky, 2010; Chen *et al.*, 2012) (Figure 5):

- 1) La microautophagie permet de dégrader les protéines de différents types cellulaires caractérisées par une longue durée de vie. C'est un processus au cours duquel les lysosomes vont englober des petites parties du cytosol en invaginant leur membrane (Li *et al.*, 2012).
- 2) L'autophagie impliquant des chaperonnes permet de dégrader uniquement les protéines du cytoplasme (solubles) (Arias & Cuervo, 2011). Ces protéines doivent posséder un motif spécifique (KFERQ) qui leur permet d'être reconnues et transportées par les protéines chaperonnes, comme la protéine Hsc70 jusqu'à la membrane lysosomale (Chiang *et al.*, 1989). Le complexe « protéine cytosolique-Hsc70 » est ainsi transféré à la membrane lysosomale et interagit avec une protéine associée à la membrane lysosomale, LAMP-2a (Cuervo & Dice, 2000). Cette action nécessite l'activation de la chaperone Hsc73 pour atteindre le lumen lysosomal afin d'assurer la dégradation (Cuervo *et al.*, 1997).
- 3) La macroautophagie appelée également autophagie est la seule voie qui permet de dégrader des macromolécules et des organelles. Le processus de macroautophagie consiste à séquestrer une partie du cytoplasme dans des vésicules appelées autophagosomes. Ce processus implique l'intervention de la protéine LC-3 (Light Chain 3). En effet, la forme cytosolique LC3-I est conjuguée avec la phosphatidyléthanolamine pour former la LC3-II (forme lipidée) qui peut ensuite être recrutée par les membranes des autophagosomes. Ceux-ci vont ensuite fusionner avec des lysosomes pour former les autolysosomes. Les composants de l'autophagosome sont alors lysés et libérés dans le cytoplasme (Noda *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2011).

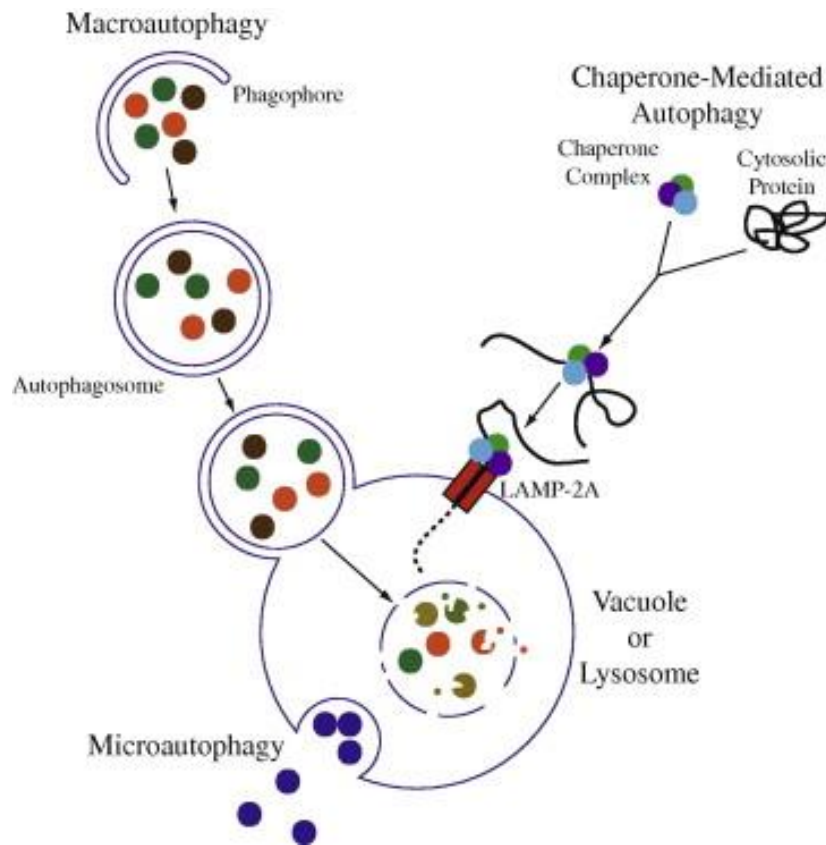


Figure 5 : Représentation des trois types d'autophagie : microautophagie, autophagie impliquant des chaperonnes et macroautophagie. D'après (Lynch-Day & Klionsky, 2010)

I.1.2 Le système protéolytique Ubiquitine-Protéasome-dépendant

Chez les eucaryotes, le système Ubiquitine-Protéasome (UPS) dépendant constitue la principale voie de dégradation des protéines intracellulaires. Ce système est impliqué dans la régulation physiologique de nombreux processus cellulaires, y compris le cycle cellulaire, la différenciation musculaire et la transduction des signaux (Kornitzer & Ciechanover, 2000). Il fait intervenir deux étapes majeures: le marquage de la protéine substrat, puis sa dégradation par le protéasome 26S (Attaix *et al.*, 2001) (Figure 6).

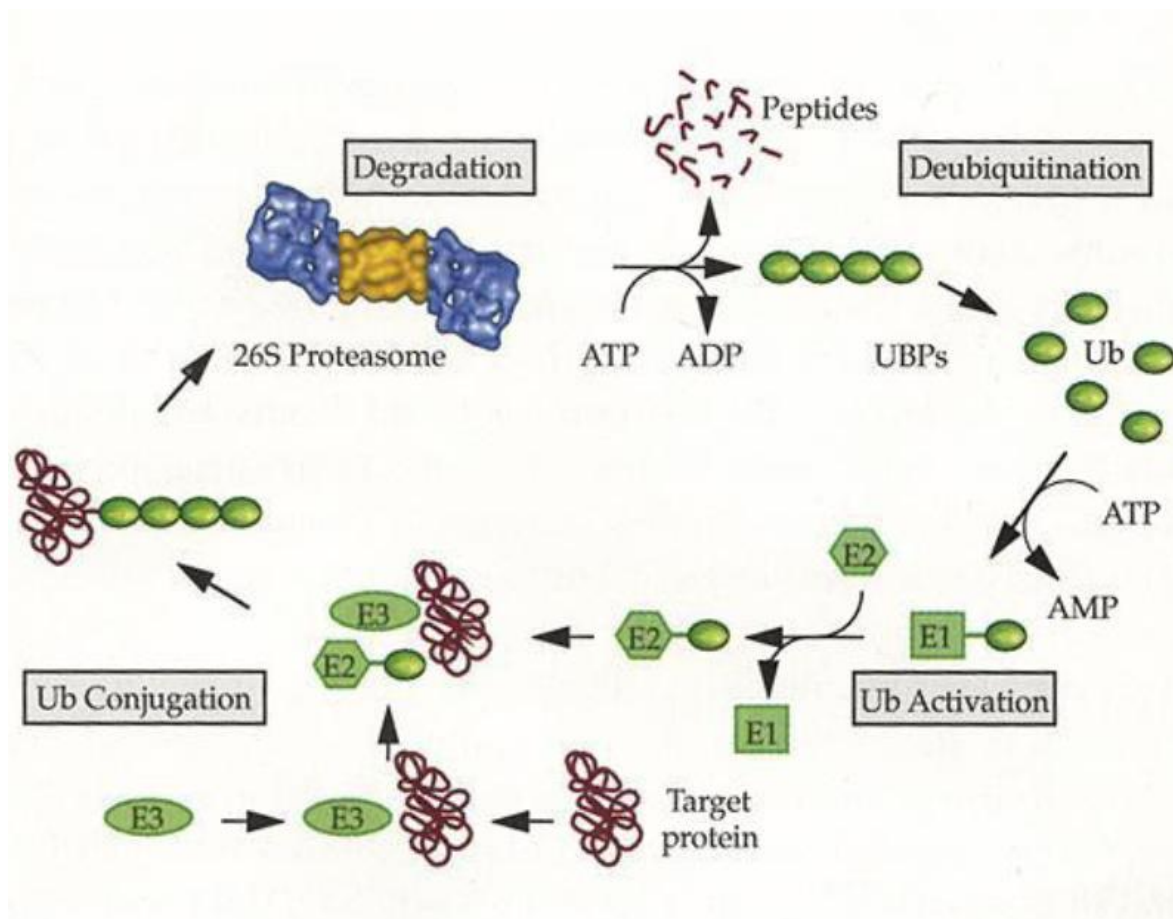


Figure 6: Représentation schématique du système ubiquitine-protéasome-dépendant. Cette voie de dégradation nécessite deux étapes :

- 1) le marquage des protéines par une chaîne de poly-ubiquitine ou ubiquitinylation
- 2) la reconnaissance et la dégradation par le protéasome 26S.

a. Reconnaissance et ciblage des substrats à dégrader

Pour être reconnues et dégradées par le protéasome 26S, les protéines cibles subissent la fixation d'une chaîne de poly-ubiquitine. Cette poly-ubiquitinylation fait intervenir une cascade enzymatique. Tout d'abord, une enzyme E1 (« ubiquitin activating enzyme ») active l'ubiquitine en présence d'ATP et forme ainsi un résidu thiol-ester entre un résidu cystéine de son site catalytique et la glycine C-terminale de l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée sur un résidu cystéine de l'enzyme E2 (« ubiquitin conjugating enzyme »). La fixation de l'ubiquitine sur la protéine substrat est réalisée directement par l'enzyme E2 ou en présence d'une enzyme E3 (« ubiquitin protein ligase »).

La liaison entre les molécules d'ubiquitine s'effectue entre le groupement COOH d'un résidu ubiquitine et, le plus souvent, le résidu Lysine en position 48 (K48) de la molécule

précédemment fixée. Les protéines portant une chaîne de polyubiquitine sur la K48 comportant au moins 4 résidus d'ubiquitine sont destinées à être dégradées par le protéasome 26S. Cependant, il existe d'autres types de chaînes de polyubiquitine faisant intervenir d'autres résidus lysine de l'ubiquitine. Par exemple, les chaînes d'ubiquitine en K63 interviennent dans le ciblage des protéines marquées vers le lysosome (Ye & Rape, 2009), mais également dans des fonctions, comme la réponse aux altérations de l'ADN ou dans la réponse inflammatoire.

Chez les mammifères, on dénombre deux isoformes de l'enzyme E1, quelques dizaines d'enzymes E2, plusieurs centaines d'enzymes E3.

Il existe 3 types d'enzymes E3 ligases :

- les E3s ligases à domaine HECT (homologous to E6-Associated Protein C-Terminus). Le domaine HECT permet la liaison avec l'enzyme E2 qui transfère l'ubiquitine sur un résidu cystéine présent dans ce domaine. L'enzyme E3 transfère alors l'ubiquitine sur la protéine cible grâce à la formation d'une liaison thioester.
- Les U-box E3. Elles possèdent un motif U-box de 75 acides aminés. Ces protéines peuvent être douées d'une activité E3 ligase lorsqu'elles sont associées à d'autres protéines chaperonnes. C'est le cas de la protéine CHIP (Carboxy Terminus of HSP 70 binding protein) qui collabore avec les HSP 70 ou 90 pour initier leur ubiquitinylation.
- Les RING-finger E3s constituent une importante sous famille des E3 ligases (> 350 E3s). Ces E3s peuvent être soit sous forme de monomère et portent à la fois le site catalytique et le site de reconnaissance des substrats soit sous forme d'un complexe protéique qui interagit d'une part avec l'enzyme E2 et d'autre part avec le substrat. Les E3 ligases MAFbx (Muscle Atrophy F-box) (ou Atrogin-1) et MURF-1 (Muscle Ring Finger 1) sont spécifiques au muscle squelettique et sont des RING-finger E3s multimériques. MURF1 et MAFbx interviennent dans plusieurs processus cellulaires comme la transcription des gènes ou la différenciation. Ces deux protéines sont impliquées également dans le contrôle de la masse musculaire (Bodine *et al.*, 2001). Elles possèdent cependant des substrats spécifiques. En effet, seul le facteur myogénique MyoD (Tintignac *et al.*, 2005) et le facteur d'initiation de la traduction eIF3F (Lagirand-Cantaloube *et al.*, 2008) ont été identifiés comme substrats de MAFbx suggérant un rôle de cette E3 dans la myogenèse et la synthèse protéique. Plusieurs protéines contractiles majeures sont des substrats de MURF1, incluant les chaînes lourdes et légères de Myosine (Cohen *et al.* 2009, Clarke *et al.* 2007), l'actine (Polge *et al.*, 2011), ou

encore la desmine et la titine (Cohen *et al.* 2012), Ceci suggère donc un rôle central de MURF1 dans la protéolyse des protéines structurelles du muscle.

Cette diversité d'enzymes E2s et E3s conditionne la formation de couples d'enzymes E2/E3s variés, ce qui rend cette voie capable de répondre à des signaux de régulation variés et d'assurer la spécificité de reconnaissance des substrats en permettant l'existence de voies de poly-ubiquitinylation multiples (Pickart & Eddins, 2004).

b. Dégradation des protéines poly-ubiquitinylées par le protéasome 26S

Les protéines marquées par la fixation d'au moins 4 molécules d'ubiquitine sur le résidu K48 peuvent être reconnues puis dégradées par le protéasome 26S (Pickart, 2001; Attaix *et al.*, 2003). Le protéasome 26S est un complexe de 2500 kDa composé d'un core catalytique 20S entouré de deux complexes régulateurs 19S. Les complexes 19S i) reconnaissent les substrats poly-ubiquitinylés, ii) déubiquitinylent les substrats ubiquitylés, iii) dénaturent la protéine avant de permettre son injection dans le core catalytique 20S, et iv) active les sites catalytiques du protéasome 20S. Celui-ci est composé de 7 sous-unités α et β différentes ($\alpha 7\beta 7\beta 7\alpha 7$). Il est responsable des activités protéolytique et peptidasique portées par les sous-unités β . Le protéasome 20S possède 5 activités peptidasiques. Les 3 principales sont l'activité PGPH (« peptidyl-glutamyl peptide hydrolysis ») ou « caspase-like », l'activité « trypsin-like » et l'activité « chymotrypsin-like » portées respectivement par les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ (Murata *et al.*, 2009). Par la dégradation contrôlée de certaines protéines, le protéasome permet la régulation de nombreux processus biologiques, notamment le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la dégradation des protéines contractiles majeures comme les myosines (Broemer & Meier, 2009; Benanti J, 2012).

I.2 Rôle de la protéolyse dans l'inactivité physique et la récupération musculaire

I.2.1 Au cours de l'inactivité physique

a. L'autophagie

Le rôle de l'autophagie dans les fontes musculaires est complexe car elle peut générer de l'atrophie ou la prévenir. En effet, bloquer l'autophagie ne prévient pas forcément l'atrophie musculaire mais au contraire l'induit fortement avec accumulation d'inclusions et de

mitochondries anormales. Ceci suggère que l'autophagie pourrait au contraire permettre de préserver la masse musculaire dans certaines conditions (Masiero *et al.*, 2009).

L'induction de l'autophagie a été décrite au cours de l'inactivité physique uniquement dans les muscles dénervés. En effet, une augmentation de l'expression de plusieurs protéines impliquées dans l'autophagie a été montrée dans des muscles dénervés (Schiaffino & Hanzlikova, 1972; O'Leary & Hood, 2008; O'Leary MF, 2012). Il s'agit de 1/ LC3-II (Light Chain 3) qui est un marqueur spécifique de la formation des autophagosomes, 2/ Ulk1 et Ulk2 (Serine/threonine-protein kinase) qui sont des protéines indispensable à l'initiation de l'autophagie et à la dégradation de certains organelles comme la mitochondrie (Kundu *et al.*, 2008), 3/ Atg7, Atg12 et Atg14 (Autophagy Related Genes), 4/ Beclin-1 (homologue de la l'Atg6) qui est une protéine indispensable pour l'initiation de la formation des autophagosomes (Liang *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2009), et aussi 5/ Gabarapl1 qui s'associe aux vésicules d'autophagie (Chakrama *et al.*, 2010). Le rôle de l'autophagie dans les modèles de suspension et d'immobilisation n'a été que très peu, voire pas du tout étudié. En effet, la suspension ne semble pas induire d'augmentation d'autophagie dans les muscles (Andrianjafiniony *et al.*, 2010). Cependant, seule l'expression de Beclin-1 a été étudiée dans ce contexte. De plus, l'autophagie n'a pas été étudiée dans les muscles atrophiés suite à l'immobilisation.

Par ailleurs, certains travaux montrent également l'implication de la voie lysosomale dans les atrophies induites par l'inactivité physiques. En effet, une augmentation des niveaux ARNm et de l'activité des cathepsines B, L ou D a été observée dans le muscle soleus du rat pendant la suspension (Taillandier *et al.*, 1996).

b. La voie Ubiquitine protéasome-dépendante

Le rôle du système ubiquitine protéasome-dépendant (UPS) dans l'atrophie musculaire induite lors de l'inactivité physique a été mis en évidence en déterminant l'accumulation des conjugués polyubiquitylés, l'expression des différents acteurs de cette voie au niveau protéique et ARNm, et en utilisant des inhibiteurs des activités du protéasome.

Une augmentation des niveaux d'ARNm et/ou protéique de l'ubiquitine et des enzymes impliquées dans l'ubiquitylation, ainsi qu'une accumulation de conjugués ubiquitynés ont été constatées chez le rat dans les muscles dénervés (Medina *et al.*, 1995; Wing *et al.*, 1995; Bodine *et al.*, 2001; Beehler *et al.*, 2006; Russo *et al.*, 2010), soumis à une apesanteur réelle

ou simulée (Taillandier *et al.*, 1996; Bodine *et al.*, 2001; Ikemoto *et al.*, 2001; Taillandier *et al.*, 2003; Yimlamai *et al.*, 2005; Dupont-Versteegden *et al.*, 2006; Berthon *et al.*, 2007; Heng *et al.*, 2008; Andrianjafiniony *et al.*, 2010), ou encore immobilisés par plâtrage (Bodine *et al.*, 2001; Krawiec *et al.*, 2005; Vazeille *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2011). De plus, l'inactivation des gènes codant pour les protéines MURF1 ou MAFbx permet de prévenir partiellement l'atrophie musculaire du muscle GA induite par la dénervation chez la souris (Bodine *et al.*, 2001).

L'inhibition du protéasome, par le Velcade® ou le MG132, induit une diminution importante de la protéolyse induite par l'immobilisation par plâtrage ou la suspension (Krawiec *et al.*, 2005; Jamart *et al.*, 2011), ce qui prouve son implication dans la fonte musculaire. En effet, la seconde étape de la voie UPS est également affectée par l'inactivité physique. Une augmentation des niveaux d'ARNm codant pour les sous-unités (C2 et C9) du protéasome 20S ou pour plusieurs sous-unités (S7, S8, S1 et S14) du complexe 19S a été constatée après 9 jours de suspension dans le muscle soleus du rat (Taillandier *et al.*, 1996; Heng *et al.*, 2008). De plus, les activités « chymotrypsin-like » et/ou « trypsin-like » du protéasome sont augmentées dans les muscles d'animaux suspendus pendant 5 à 21 jours (Ikemoto *et al.*, 2001; Yimlamai *et al.*, 2005; Berthon *et al.*, 2007) ou immobilisés par plâtrage pendant 8 jours (Vazeille *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2011; Vazeille *et al.*, 2012).

Le rôle de la voie UPS au cours de la période d'inactivité physique chez l'Homme a également été exploré. En effet, une augmentation des transcrits des E2 (UBE2E) ou E3 (atrogin-1/MAFbx, MuRF-1 ou FBX09) a été observée dans des muscles de personnes soumis à une suspension pendant 2 (Reich *et al.*, 2010) et 10 (de Boer *et al.*, 2007) jours, ou alors à une immobilisation par plâtrage pendant 48H (Urso *et al.*, 2006). De plus, une augmentation de l'expression ARNm et/ou protéique des sous-unités du protéasome a été constatée dans les muscles après 48H de suspension (Reich *et al.*, 2010) ou après 2 à 14 jours d'immobilisation par plâtrage (Glover *et al.*, 2010).

I.2.2 Au cours de la récupération musculaire

a. L'autophagie

Très peu de données existent actuellement dans la littérature quant au rôle de l'autophagie au cours de la période de récupération suite à l'inactivité physique. Après la désuspension

Adrianjafiniony *et al.* (2010) montrent une augmentation de l'expression de la protéine Beclin-1, au 5^{ème} jour de récupération chez le rat. La majorité des études portant sur les phases de récupération s'intéresse plutôt au rôle de la voie lysosomale en général (Taillandier *et al.*, 2003; Kramerova *et al.*, 2005). En effet, une diminution des niveaux de l'ARNm codant pour la cathepsine D (Taillandier *et al.*, 2003) et une augmentation de l'expression protéique de la calpaïne-3 (Kramerova *et al.*, 2005) par rapport au groupe contrôle composé d'animaux non suspendus sont observés, chez le rat ou la souris, après 18H ou 48H de récupération respectivement, suite à une période de suspension de 9 à 10 jours. Il n'existe pas à notre connaissance d'étude rapportant le rôle de l'autophagie pendant la récupération musculaire suite à l'immobilisation par plâtrage. Cependant, le rôle décrit de ce processus dans le maintien de la masse musculaire laisse supposer qu'il puisse être impliqué. Son rôle dans le maintien ou l'aggravation de l'atrophie observés pendant la remobilisation dans les muscles gastrocnemius ou tibialis anterior respectivement (Vazeille *et al.*, 2008; Vazeille *et al.*, 2012) reste à définir.

b. La voie Ubiquitine protéasome-dépendante

Le rôle de la voie Ubiquitine proteasome-dépendante (UPS) dans les processus de récupération musculaire est de plus en plus étudié. Des études montrent une normalisation des niveaux d'ARNm codant pour l'enzyme E3-ligase MAFbx après 24H de remobilisation chez l'Homme (Jones *et al.*, 2004) ou après 24H de désuspension intermittente chez le rat (Miyazaki *et al.*, 2008). A l'inverse, une augmentation des niveaux d'ARNm codant pour MAFbx est observée après 24H de désuspension chez l'Homme sans modification de la quantité de protéines MAFbx (Reich *et al.*, 2010). L'expression de l'ARNm de l'enzyme E3 ligase MURF1 diminue après 7 jours de désuspension comparée au dernier jour de suspension chez le rat (Kachaeva *et al.*, 2011). Son expression est normalisée après 24H de remobilisation chez l'Homme (Jones *et al.*, 2004) et également après 5 jours de remobilisation chez le rat (Vargas & Lang, 2008). Les niveaux des ARNm codant pour l'ubiquitine ou pour certaines sous-unités du protéasome 20S, ainsi que la quantité de conjugués polyubiquitinylés sont augmentées dans le muscle soleus du rat après 18h de désuspension par rapport aux muscles de rats non suspendus puis sont normalisés après 7 jours de désuspension (Taillandier *et al.*, 2003). Vazeille *et al.* (2008 et 2012) montrent une normalisation de la quantité de conjugués polyubiquitinylés 10 jours après le déplâtrage dans le muscle gastrocnemius de rat (Vazeille *et al.*, 2008; Vazeille *et al.*, 2012).

Des travaux récents s'intéressent à l'étude la deuxième étape de la voie UPS. Les niveaux ARNm codant pour la sous unité $\alpha 7$ du protéasome 20S reste élevée après 24H de remobilisation chez l'Homme puis est normalisée au bout d'une semaine de remobilisation (Jones *et al.*, 2004). De plus, l'augmentation de l'activité «chymotrypsin-like» observée à la fin de la période d'immobilisation est normalisée dans le gastrocnemius du rat adulte (Vazeille *et al.*, 2008) ou âgé (Magne *et al.*, 2011) après dix jours de remobilisation. La majorité des études que ce soit dans le modèle de suspension ou d'immobilisation s'est intéressée à la régulation de cette voie protéolytique dans l'atrophie et la récupération dans les muscles soleus et gastrocnemius. Le muscle TA se comporte de façon très différente suite au déplâtrage. En effet, une aggravation de l'atrophie du muscle TA est observée 10 jours après déplâtrage alors que l'atrophie s'est stabilisée dans le muscle gastrocnemius du rat (Vazeille *et al.*, 2008), pourtant, aucune donnée ne permet actuellement de déterminer le rôle de la voie UPS dans ces divergences de réponse.

II. Rôle de la l'apoptose dans l'atrophie et la récupération musculaire

Parmi les processus pouvant être responsables de l'atrophie musculaire, l'apoptose semble occuper une place non négligeable. En effet, les différentes voies conduisant à l'apoptose sont activées entre autres par l'inflammation et/ou le stress oxydant qui sont des processus activés dans les muscles immobilisés (Powers *et al.*, 2007; Magne *et al.*, 2011).

II.1 Les voies apoptotiques

II.1.1 Voies indépendantes des caspases

Certaines molécules sont capables d'induire l'apoptose indépendamment des caspases : l'AIF (Apoptotic Inducing Factor) (Lu *et al.*, 2003) et l'endonucléase G (van Loo *et al.*, 2001; van Gurp *et al.*, 2003; Apostolov *et al.*, 2011) (Figure 7).

La protéine AIF est localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial (Susin *et al.*, 1999). La protéine AIF est dotée de deux fonctions, indépendante l'une de l'autre, une fonction oxydoréductase et une autre apoptogène (Mate *et al.*, 2002). La voie AIF est indépendante des caspases et ne nécessite aucun intermédiaire pour provoquer l'apoptose

nucléaire (Cregan *et al.*, 2004). En effet, la protéine AIF peut rejoindre le noyau de la cellule pour initier une apoptose nucléaire indépendante de celle initiée par le cytochrome C. Cette protéine est impliquée, entre autres, dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Susin *et al.*, 1999; Susin *et al.*, 2000; Miramar *et al.*, 2001; Millan & Huerta, 2009).

L'endonucléase (Endo G) est une endonucléase spécifique de la mitochondrie (Li *et al.*, 2001). Une fois libérée par la mitochondrie, cette protéine migre au niveau nucléaire et clive la chromatine de l'ADN en fragments nucléosomiques de manière indépendante des caspases (Li *et al.*, 2001). Des études réalisées sur des cellules ont montré que l'Endo G recombinante était capable de cliver l'ADN plasmidique et d'induire sa fragmentation dans des noyaux isolés (Cregan *et al.*, 2004).

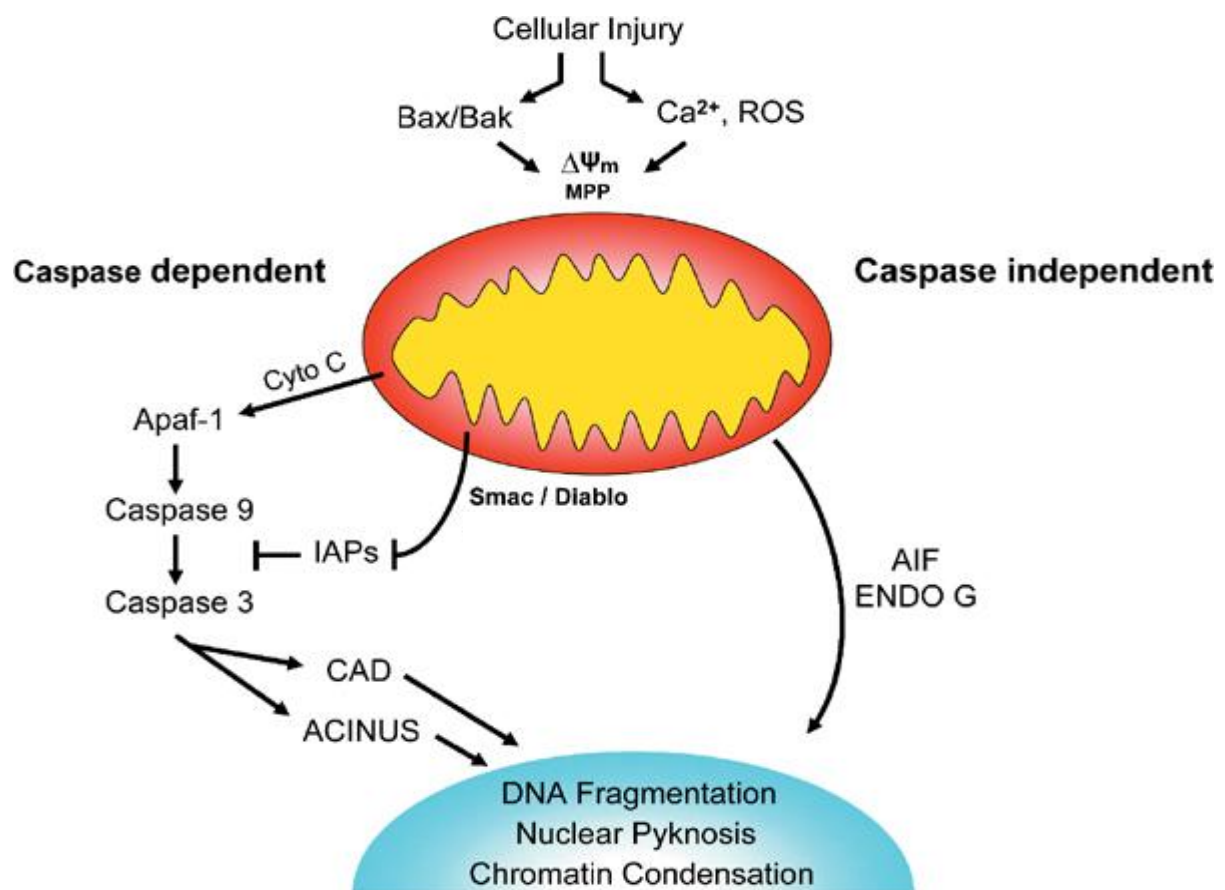


Figure 7: Libération des facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie de manière dépendante ou indépendante des caspases. D'après (Cregan *et al.*, 2004).

Cyto C : cytochrome C; IAP : Inhibitor of Apoptosis Proteins; Apaf-1: Apoptotic peptidase activating factor 1; AIF: Apoptosis Inducing Factor; ENDO G: Endonuclease G; CAD: Caspase Activated DNase; ACINUS: apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus; Smac/Diablo: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases / direct IAP-binding protein with low pI.

II.1.2 Voies dépendantes des caspases

Les **caspases** (Cystein-ASpartic ProteASES) sont des cystéines protéases qui clivent leur substrat après un résidu aspartate et jouent un rôle essentiel dans l'apoptose. Il existe des caspases initiatrices et des caspases effectrices. Elles sont d'abord exprimées sous forme de procaspases et sont constituées de 3 domaines : un pro-domaine du côté N-terminal, une grande sous-unité d'environ 20 kDa, et enfin une petite sous-unité de 10 kDa du côté C-terminal (Nicholson, 1999; Chang & Yang, 2000). La grande sous-unité est caractérisée par la présence d'un motif très conservé QACXG qui contient le résidu cystéine. Les caspases sont activées après clivage de part et d'autre de la grande sous-unité ce qui libère 3 fragments dont une sous-unité p20 et une sous-unité p10 (Figure 8). Ces deux sous-unités s'assemblent pour former un complexe hétérodimérique. L'association de deux hétérodimères permet d'obtenir la forme active des caspases qui posséderont donc deux sites actifs.

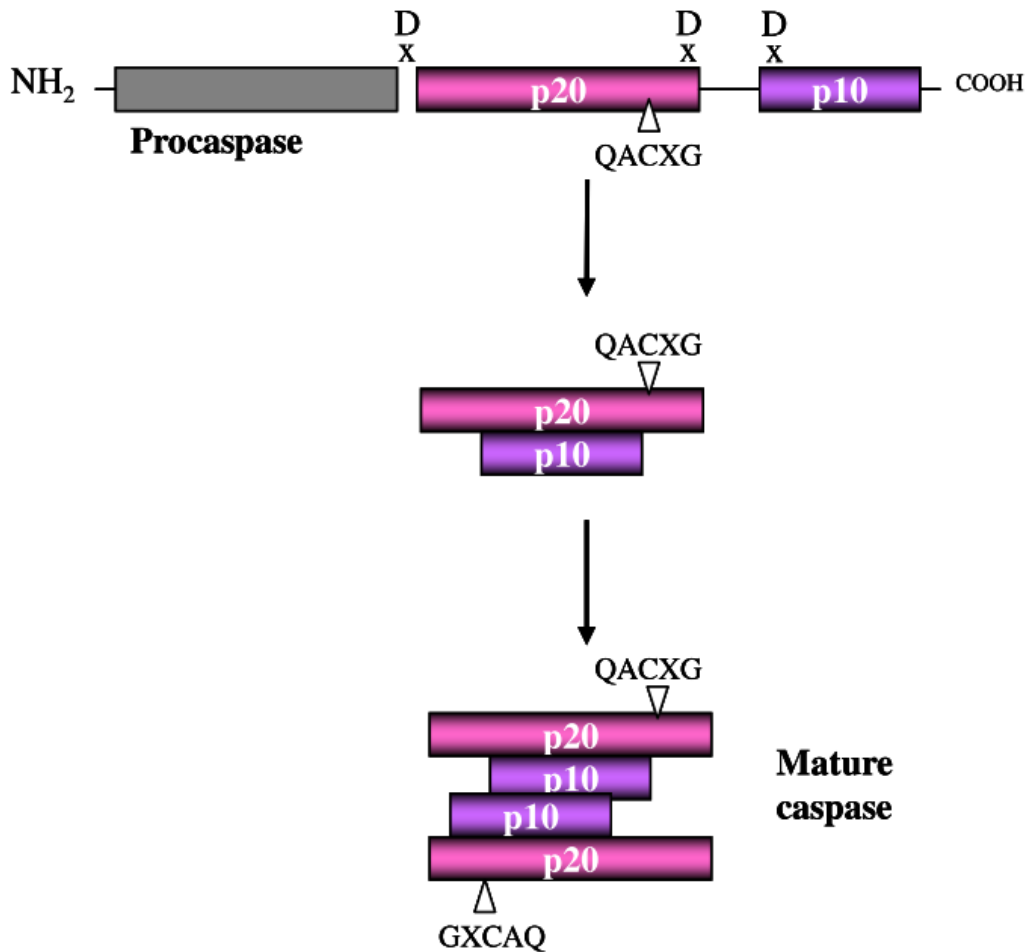


Figure 8 : Schéma représentant la formation des caspases actives à partir de procaspases.

Les caspases sont activées par deux voies principales: une voie intrinsèque et une voie extrinsèque appelées encore voie dépendante de la mitochondrie et la voie des « récepteurs de mort» respectivement. Les voies intrinsèque et extrinsèque conduisent toutes les deux à l'activation de la caspase-3 effectrice pour induire l'apoptose (Figure 9A-B).

a. La voie intrinsèque mitochondriale

Cette voie est activée suite à un signal intracellulaire (dommages au niveau de l'ADN par exemple). La mitochondrie est un acteur nécessaire à la régulation de la voie apoptotique intrinsèque. En effet, après un « stimulus », la membrane externe de la mitochondrie est perméabilisée, ce qui permet la libération du cytochrome-C dans le cytosol. Une fois libéré, le

cytochrome-C va pouvoir se fixer et activer la protéine adaptatrice Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1). Apaf-1 activée est capable de recruter la procaspase-9. Ceci permet donc de former un complexe trimoléculaire, composé de cytochrome-C / Apaf-1 / procaspase-9, et appelé « apoptosome ». La caspase-9 devient active et permet d'activer des caspases effectrices comme la caspase-3 (Figure 9-A).

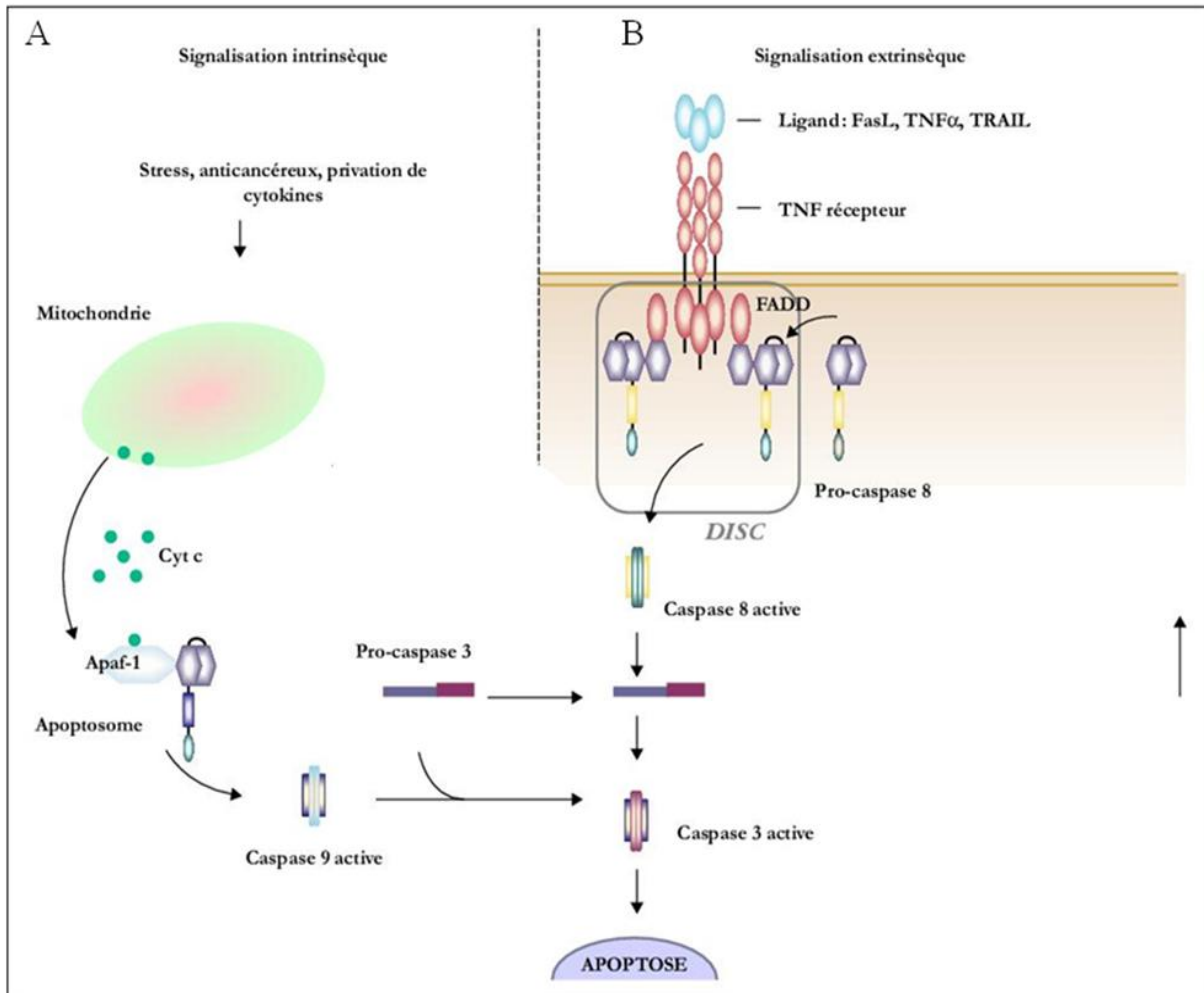


Figure 9 : Signalisation extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

D'après: <http://www.jle.com/e-docs/00/04/3F/69/article.phtml?fichier=images.htm>

A. La voie intrinsèque mitochondriale; B. La voie extrinsèque ou la voie des récepteurs de mort. Cyt c: Cytochrome-C ; Apaf-1: Apoptotic Protease-Activating Factor-1 ; DISC: Death-Inducing Signaling Complex; FADD: Fas-Associated Death Domain protein (protéine adaptatrice).

b. La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

Cette voie est activée pour répondre à un signal externe, en l'occurrence la fixation d'un ligand de mort (FasL, TRAIL, TNF...) sur son récepteur de mort DR (Death receptor) appartenant à la famille du récepteur au TNF-R. Il existe plusieurs couples ligand/récepteur de mort (Fas-L/Fas, TNF/TNF-R1, etc...), mais quelque soit le ligand et le récepteur de mort considérés, les étapes menant à l'apoptose restent les mêmes: suite à la fixation du ligand, les récepteurs de la superfamille des récepteurs au TNF vont s'oligomériser, et ainsi entraîner l'activation de la caspase 8 initiatrice dès son recrutement dans le complexe multi-protéique « DISC » (death-inducing signaling complex) grâce à des protéines adaptatrices comme FADD (Fas-associated death domain protein). Ces protéines adaptatrices vont alors recruter les caspases initiatrices comme la caspase 8 ou la caspase 10. Dès leur activation, ces dernières vont cliver et activer à leur tour des caspases effectrices comme la caspase 3 pour induire la cascade des caspases (Figure 9-B).

II.2 Rôle de l'apoptose dans l'inactivité physique et la récupération musculaire

II.2.1 Au cours de l'inactivité physique

L'inactivité physique induit une perte de protéines musculaires mais également de noyaux dans les fibres musculaires dans le modèle de dénervation (Schmalbruch & Lewis, 2000), de suspension (Allen *et al.*, 1997) et d'immobilisation par plâtrage (Smith *et al.*, 2000) chez l'animal. Cependant ces données restent controversées puisque de récentes études montrent que l'atrophie induite par la suspension ou la dénervation ne serait pas associée à une perte du nombre de noyaux dans la fibre (Bruusgaard & Gundersen, 2008; Gundersen & Bruusgaard, 2008; Bruusgaard *et al.*, 2012).

De plus, le nombre de noyaux apoptotiques a augmenté dans les muscles atrophiés chez des animaux dénervés (Lim & Han, 2010; O'Leary MF, 2012), suspendus (Leeuwenburgh *et al.*, 2005; Siu *et al.*, 2005b; Oishi *et al.*, 2008; Ogata *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2012) ou immobilisés par plâtrage (Smith *et al.*, 2000). Les cellules satellites musculaires semblent également subir de l'apoptose au cours de l'atrophie due à la suspension (Siu *et al.*, 2005b;

Bruusgaard & Gundersen, 2008; Guo *et al.*, 2012), à la dénervation (Rodrigues & Schmalbruch, 1995) ou encore à l'immobilisation par plâtrage (Chakravarthy *et al.*, 2000).

Au cours des atrophies musculaires induites par l'inactivité physique, les différentes voies apoptotiques semblent activées. L'implication de la voie apoptotique dépendante des caspases extrinsèque (voie des récepteurs de mort) a principalement été montrée par l'augmentation des niveaux protéiques de la caspase 8 clivée (active) ou de son activité dans les muscles d'animaux suspendus (Alway *et al.*, 2003a; Ferreira *et al.*, 2008; Andrianjafiniony *et al.*, 2010), dénervés (Alway *et al.*, 2003b) ou encore immobilisés par plâtrage (Magne *et al.*, 2011) (Tableau 3).

De plus, des modifications des niveaux protéiques et/ou ARNm de certains facteurs pro-apoptotiques comme la protéine Bax ou anti-apoptotiques comme la protéine Bcl2 ont été enregistrées dans les muscles d'animaux dénervés (Adhihetty *et al.*, 2007; O'Leary & Hood, 2008; Lim & Han, 2010) ou suspendus (Hunter *et al.*, 2002; Siu *et al.*, 2005a; Siu *et al.*, 2005b; Pistilli *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2012) (Tableau 3). Ceci conduit à des modifications du rapport Bax/Bcl2 qui conditionne l'induction de la voie apoptotique mitochondriale et la libération de cytochrome-C et du facteur pro-apoptotique Apaf-1. Une augmentation du contenu en Bax et Bcl2 a été enregistrée au cours de la dénervation (Siu & Alway, 2006; Adhihetty *et al.*, 2007; O'Leary & Hood, 2008), de la suspension (Siu *et al.*, 2005b; Siu & Alway, 2006) et de l'immobilisation (Siu & Alway, 2006; Adhihetty *et al.*, 2007; Vazeille *et al.*, 2008; O'Leary MF, 2012) (Tableau 3).

De plus, les niveaux protéiques de XIAP (anti-apoptotique) ont diminué et ceux de Smac/DIABLO (pro-apoptotique) ont augmenté dans le muscle GA du rat immobilisé par plâtrage (Siu & Alway, 2006; Vazeille *et al.*, 2008; Vazeille *et al.*, 2012), ou dans le muscle GA de rats dénervés (Siu & Alway, 2006). Ils sont par contre inchangés dans le muscle GA suite à la suspension (Siu *et al.*, 2005a). Ces modifications sont associées à une induction de l'activité de certaines caspases impliquées dans cette voie comme la caspase-9 (Berthon *et al.*, 2007; Servais *et al.*, 2007; Vazeille *et al.*, 2008), la caspase-6 (Berthon *et al.*, 2007) et la caspase-12 (Servais *et al.*, 2007) dans les muscles suspendus ou immobilisés par plâtrage (Tableau 3).

La caspase-3 effectrice est la caspase la plus étudiée parmi toutes les caspases et est commune aux voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque. Une augmentation des niveaux ARNm

et/ou de l'activité de cette caspase a été constaté dans les muscles atrophiés que ce soit avec le modèle de dénervation (Siu & Alway, 2006), de suspension (Leeuwenburgh *et al.*, 2005; Berthon *et al.*, 2007; Servais *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008) ou d'immobilisation par plâtrage (Vazeille *et al.*, 2008). Dans certains cas, l'augmentation de la fragmentation de l'ADN observée dans les muscles quelque soit le modèle considéré (Tableau 3), est associée à l'induction des voies indépendante des caspases. En effet, les niveaux d'AIF ou EndoG sont augmentés dans les muscles d'animaux suspendus adultes (Ferreira *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2012) et âgés (Leeuwenburgh *et al.*, 2005; Siu *et al.*, 2005a; Ferreira *et al.*, 2008), mais également dans les muscles dénervés de souris (Siu & Alway, 2006; O'Leary MF, 2012).

II.2.2 Au cours de la récupération musculaire

Le rôle de l'apoptose dans les processus de récupération musculaire suite à l'atrophie induite par l'inactivité physique a été de plus en plus étudié au cours des dernières années.

L'augmentation du pourcentage de noyaux apoptotiques observée dans les muscles après 2 semaines de suspension chez le rat est normalisée après 7 jours de récupération dans le soleus (Oishi *et al.*, 2008) ou alors est restée élevée même après 14 jours de récupération (Hao *et al.*, 2011).

L'augmentation de l'activité de la caspase-8 observée après 8 jours d'immobilisation par plâtrage (Magne *et al.*, 2011) ou après 14 jours de suspension (Andrianjafiniony *et al.*, 2010) est soit normalisée après 10 jours de récupération (Magne *et al.*, 2011) ou alors reste élevée même après 14 jours de récupération (Andrianjafiniony *et al.*, 2010) dans les muscles soleus et GA du rat respectivement. Aussi, l'augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax observée après 2 semaines de suspension, est maintenue après deux semaines de récupération dans les muscles soleus et plantaris chez le rat (Hao *et al.*, 2011). De plus, les niveaux protéiques de XIAP et de Smac/Diablo sont respectivement augmentés et diminués au cours de la période de récupération (10 à 15 jours) par rapport aux muscles GA immobilisés pendant 8 jours chez le rat (Vazeille *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2011; Vazeille *et al.*, 2012).

L'augmentation et la diminution des activités de la caspase-9 et de la caspase-12 observées dans le muscle soleus du rat après 2 semaines de suspension ont été normalisées dans les 5

premiers jours de récupération (Andrianjafiniony *et al.*, 2010). L'évolution de l'activité de la caspase-9 au cours de la période de récupération suivant une immobilisation par plâtre est relativement différente. En effet, l'augmentation de l'activité de la caspase-9 après 8 jours d'immobilisation dans le muscle GA est supprimée après 10 jours de récupération, sous-réglée après 15 jours de récupération puis normalisée après 30 jours de récupération chez le rat adulte (Vazeille *et al.*, 2008). Elle est normalisée dans les 10 premiers jours de récupération chez le rat âgé (Magne *et al.*, 2011). De plus, l'augmentation de l'activité de la caspase-3 commune aux deux voies apoptotiques (intrinsèque et extrinsèque) est normalisée après 5 jours de récupération suivant deux semaines de suspension dans le muscle soleus du rat (Andrianjafiniony *et al.*, 2010) et également après 10 (Magne *et al.*, 2011; Vazeille *et al.*, 2012) ou 20 (Vazeille *et al.*, 2008) jours de récupération suivant 8 jours d'immobilisation dans le muscle GA du rat.

Toutefois, il existe très peu (voire pas du tout) de données concernant la régulation de l'apoptose durant les phases précoces de récupération consécutive à l'inactivité physique. Cependant, il est légitime de penser que les processus apoptotiques pourraient être activés au cours de ces phases précoces dans le but d'éliminer les cellules endommagées suite à l'immobilisation et de favoriser ainsi la réparation tissulaire.

		Modèle	Durée	Données	Espèce	Muscle	Référence
Voies indépendantes des caspases	HS	DEN	7 jrs	↗ AIF (protéine)	Rat	TA	(O'Leary MF, 2012)
			24H ; 14 jrs	↗ AIF (protéine)	Souris	Sol	(Ferreira <i>et al.</i> , 2008; Guo <i>et al.</i> , 2012)
			14 jrs	↗ AIF (protéine)	Rat âgé	GA	(Siu <i>et al.</i> , 2005a)
				↗ EndoG (protéine)	Rat	Sol	(Leeuwenburgh <i>et al.</i> , 2005)
			7-14 jrs	↔ AIF (mRNA)	Caille	Patagialis	(Siu <i>et al.</i> , 2005b)
Voies dépendantes des caspases	Intrinsèque	DEN	1-4-12 sem	↗ Bax et Bcl-2 (protéine)	Rat	GA / EDL / TA	(Adhihetty <i>et al.</i> , 2007; O'Leary & Hood, 2008; Lim & Han, 2010)
				↘ Bcl-2 (protéine)		TA	(Adhihetty <i>et al.</i> , 2007)
		HS	7 jrs	↗ Bax et ↘ Bcl-2 (ARNm)	Caille	Patagialis	(Siu <i>et al.</i> , 2005b)
				↘ Bax et ↗ Bcl-2 (protéine)	Rat	Sol	(Hunter <i>et al.</i> , 2002)
		HS	10 jrs	↗ Caspase-9 (Activité)	Rat	Sol	(Berthon <i>et al.</i> , 2007)
		HS	14 jrs	↔ Bax et Bcl-2 (protéine, ARNm)	Rat / Caille	GA / Sol / Patagialis	(Siu <i>et al.</i> , 2005b; Pistilli <i>et al.</i> , 2006; Ogata <i>et al.</i> , 2009; Jackson <i>et al.</i> , 2010)
				↘ Bcl-2 (protéine) et ↗ Bax (protéine, ARNm)	Souris / Rat	Sol / Plantaris	(Siu <i>et al.</i> , 2005a; Pistilli <i>et al.</i> , 2006; Guo <i>et al.</i> , 2012)
				↗ Bcl-2 (protéine)	Rat	GA / Plantaris	(Siu <i>et al.</i> , 2005a; Pistilli <i>et al.</i> , 2006; Jackson <i>et al.</i> , 2010)
				↗ Cyt c cytosolique	Rat	GA	(Siu <i>et al.</i> , 2005a)
				↘ Cyt c mitochondrial et ↔ Cyt c total (protéine)	Rat / Souris	Sol	(Ogata <i>et al.</i> , 2009; Guo <i>et al.</i> , 2012)
				↔ Apaf1 (ARNm)	Caille	Patagialis	(Siu <i>et al.</i> , 2005b)
				↔ Caspase-9 total et ↗ Caspase-9 et -12 clivées (protéines)	Rat	GA / Sol	(Andrianjafiniony <i>et al.</i> , 2010; Jackson <i>et al.</i> , 2010)
		IMM	8 jrs	↗ Smac/Diablo et ↘ XIAP (protéine)	Rat	GA	(Magne <i>et al.</i> , 2011; Vazeille <i>et al.</i> , 2012)
				↗ Caspase-9 liée à apoptosome (Activité)	Rat	GA	(Magne <i>et al.</i> , 2011; Vazeille <i>et al.</i> , 2012)

	Extrinsèque	DEN	8 sem	↗ Caspase-8 clivée (protéine)	Rat	Sol	(Tsai <i>et al.</i> , 2011)
		HS (24H)	24H	↗ Caspase-8 (Act)	Souris	Sol	(Ferreira <i>et al.</i> , 2008)
		HS (14j)	14 jrs	↗ Caspase-8 clivée (protéine)	Rat	Sol	(Andrianjafiniony <i>et al.</i> , 2010)
		IMM (8j)	8 jrs	↗ Caspase-8 (Act)	Rat	GA	(Magne <i>et al.</i> , 2011; Vazeille <i>et al.</i> , 2012)
Terminaison de l'apoptose	HS	DEN	7j et 4→12 sem	↗ Fragmentation ADN (ELISA ou TUNEL)	Rat	TA / GA	(Lim & Han, 2010; O'Leary MF, 2012)
			12H→14j	↗ Fragmentation ADN (ELISA ou TUNEL)	Rat / Souris	GA / Sol	(Siu <i>et al.</i> , 2005a; Dupont-Versteegden, 2006; Ogata <i>et al.</i> , 2009; Jackson <i>et al.</i> , 2010; Guo <i>et al.</i> , 2012)
			14 jrs	↔ Fragmentation ADN (TUNEL)	Caille	Patagialis	(Siu <i>et al.</i> , 2005b)
			24H, 10 jrs	↗ Caspase-3 (Act)	Souris	Sol	(Berthon <i>et al.</i> , 2007; Ferreira <i>et al.</i> , 2008)
				↗ Caspase 3 (protéine, ARNm)	Souris / Rat	Sol	(Servais <i>et al.</i> , 2007; Gwag <i>et al.</i> , 2009; Andrianjafiniony <i>et al.</i> , 2010; Guo <i>et al.</i> , 2012)
			14 jrs	↔ Caspase-3 (protéine)	Rat	GA	(Jackson <i>et al.</i> , 2010)
				↗ PARP clivée (protéine)	Souris	Sol	(Guo <i>et al.</i> , 2012)
		IMM	2 et 14 jrs	↔ Caspase-3 (Act / qRT-PCR)	Homme	VL / Sol / QC	(Glover <i>et al.</i> , 2010; Gustafsson <i>et al.</i> , 2010)
		IMM	8 jrs	↗ Fragmentation ADN (TUNEL)	Rat	GA	(Magne <i>et al.</i> , 2011; Vazeille <i>et al.</i> , 2012)
				↗ Caspase-3 (Act)	Rat	GA	(Magne <i>et al.</i> , 2011; Vazeille <i>et al.</i> , 2012)

Tableau 3 : Régulation des différentes molécules impliquées dans l'apoptose au cours de l'inactivité physique (dénervation, suspension ou immobilisation par plâtrage) et la récupération musculaire.

DEN : dénervation ; HS (Hindlimb Suspension) : suspension ; IMM : immobilisation par plâtrage ; Act : activité ; GA : Gastrocnemius ; TA : Tibialis

Anterior ; Sol : Soleus ; EDL : Extensor Digitorum Longus. VL : Vastus Lateralis ; QC : Quadriceps ; H : Heure ; sem : semaine ;

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase = Marqueur de l'apoptose; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling ;

AIF : Apoptosis Inducing Factor ; Bcl₂ : B-cell leukemia protein-2.

Chapitre III : Transduction du signal de la matrice extracellulaire vers la cellule musculaire

Les modifications observées au niveau de la structure des muscles pendant l'inactivité physique (Cf. chapitre 1, paragraphe IV.1) pourraient impacter certains processus intracellulaires. En effet, 1) l'organisation de la MEC sous forme d'un réseau conditionne sa rigidité et/ou son élasticité et 2) la MEC est constituée de protéines de structure et également de protéines matricellulaires qui régulent les interactions Matrice-Matrice et Matrice-Cellule, mais aussi certaines voies de signalisation par leur interaction avec des protéines transmembranaires.

I. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) correspond à l'ensemble des macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif. Ces molécules jouent un rôle important dans le développement, la différenciation, la communication cellulaire ainsi que dans les processus de signalisation. C'est aussi un réservoir de nombreuses molécules comme des facteurs de croissance. La MEC est un réseau complexe composé de polysaccharides et de protéines qui remplissent l'espace extracellulaire (Scott, 1995). Au départ la MEC était considérée comme une structure inactive composée de protéines de soutien (collagènes, élastines) et d'une substance fondamentale amorphe (protéoglycanes et glycoprotéines). Actuellement, la MEC est reconnue comme une structure dynamique organisée, tissu spécifique, qui joue un rôle important dans le maintien et le remodelage de l'architecture tissulaire (Scott, 1995).

I.1 Composition de la matrice extracellulaire

Les principaux composants de la MEC sont des protéines structurales fibreuses (collagènes et élastine), des glycoprotéines non fibreuses (laminines et fibronectine,...), des protéoglycanes (décorine, perlécan,...), et des protéines spécialisées (facteurs de croissance, small integrin-binding glycoproteins (SIBLINGS),...) (Figure 10). Cependant, la MEC est tissu-spécifique et sa composition exacte varie d'un tissu à l'autre (Daley *et al.*, 2008). J'ai donc détaillé plus

précisément la composition de la MEC au niveau des muscles squelettiques, en privilégiant les collagènes et leurs molécules régulatrices, ainsi que certaines protéines matricielles particulières.

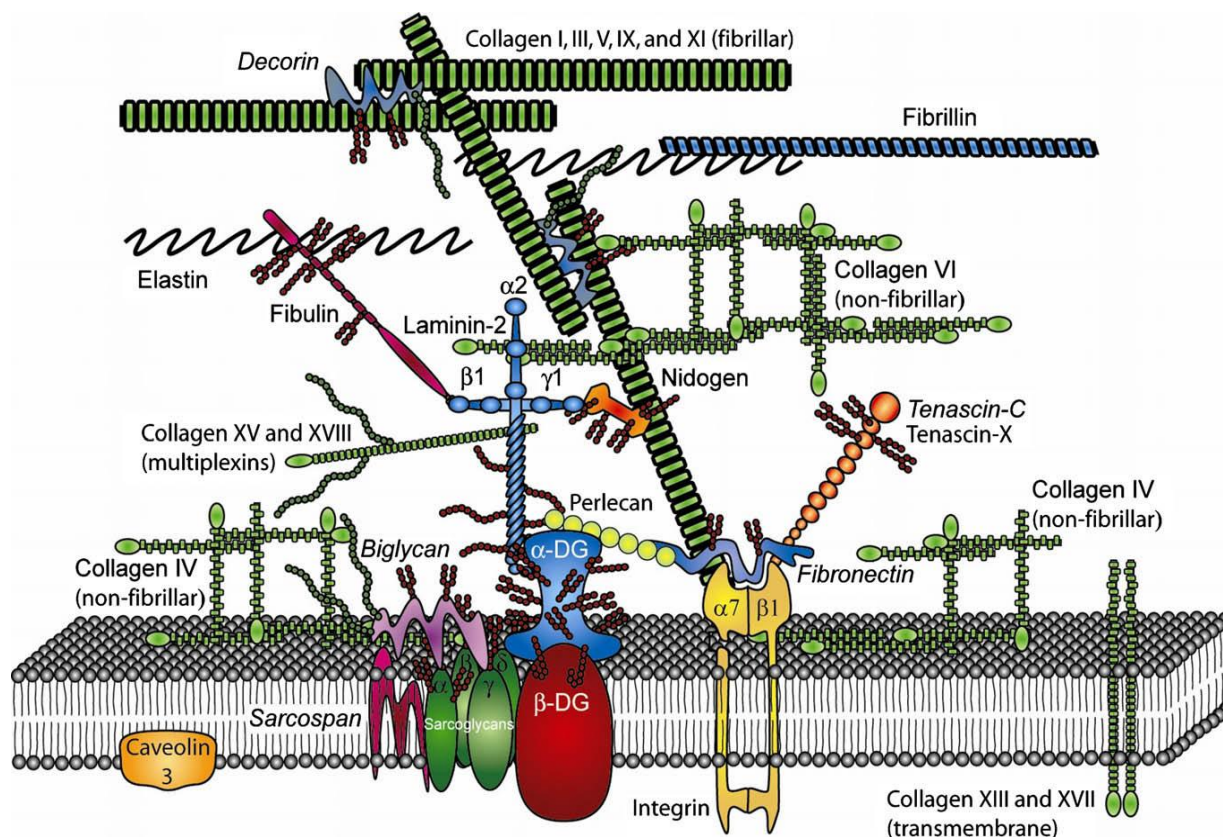


Figure 10 : Représentation schématique de la MEC dans le muscle squelettique. D'après (Voermans *et al.*, 2008). α -DG : α -Dystroglycan; β -DG : β -Dystroglycan.

I.1.1 Les protéines structurales fibreuses

❖ Les collagènes

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes de la MEC et représentent 70 à 80% des protéines du tissu conjonctif. Actuellement, on dénombre 19 types de collagènes différents. Les collagènes de type I, III, IV et V sont majeurs dans le muscle squelettique (Takala & Virtanen, 2000). Ils jouent un rôle important dans le muscle squelettique à la fois lors de la différenciation et la croissance musculaire mais également pour former la structure de soutien (Takala & Virtanen, 2000). Les collagènes sont caractérisés par une structure fibreuse, non élastique et insoluble.

Le collagène est synthétisé sous forme d'un monomère, le tropocollagène, constitué de trois chaînes polypeptidiques (hélices α ou hélices α) d'environ 1000 acides aminés. Les hélices α qui composent les collagènes s'enroulent les unes sur les autres et sont reliées entre elles par des ponts-disulfures pour former une triple hélice (Vanderrest & Garrone, 1991; Brodsky & Ramshaw, 1997).

Etant donné la diversité de la composition des chaînes α , de la taille ainsi que de la fonction des collagènes, ces derniers se classent en 3 groupes : les collagènes fibrillaires (de type I, II, III, V et X), les collagènes non fibrillaires (types IV, VI, VII, VIII et XI) et enfin les collagènes associés aux fibrilles ayant une triple hélice avec des interruptions non hélicoïdales (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices) (FACIT) (de type IX, XII, XIV, XVI et XIX) (Vanderrest & Garrone, 1991; Brown & Timpl, 1995). Chaque groupe de collagènes possède une fonction particulière. En effet, les collagènes fibrillaires permettent aux tissus de résister aux forces de tension. Les collagènes non-fibrillaires sont des protéines de structure, capables d'interagir avec d'autres molécules et sont impliqués dans la régulation de l'adhérence cellulaire. Enfin, les collagènes FACIT s'associent aux collagènes fibrillaires et peuvent modifier leurs interactions avec d'autres molécules de la MEC.

❖ L'élastine

L'élastine est le constituant principal (90%) des fibres élastiques (Pasquali-Ronchetti & Baccarani-Contrì, 1997) qui sont caractérisées par une structure fibreuse insoluble. L'élastine est une protéine de 70 kDa, fibreuse et très élastique, qui constitue le cœur de la fibre élastique. En périphérie, les microfibrilles viennent se positionner mais ne semblent pas être impliquées dans les propriétés mécaniques des fibres élastiques. Ces fibres permettent le maintien de l'organisation du collagène (Yu *et al.*, 2002), assurent l'élasticité et la résistance des tissus musculaires, et interviennent lors de la contraction musculaire.

I.1.2 Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des polymères solubles composés d'un noyau protéique (polypeptide) sur lequel est fixée une (ou plusieurs) chaîne de glycane (des glycosaminoglycanes) (Scott, 1988). Les protéoglycanes sont impliqués dans la régulation de l'assemblage de la MEC, la signalisation cellulaire, la signalisation par les facteurs de croissance ou encore la prolifération cellulaire (Hardingham & Fosang, 1992).

Les protéoglycanes les plus répandus sont la décorine (chondroïtine-sulfate/dermatane-sulfate) présente dans tous les tissus conjonctifs et le perlécan (héparane-sulfate) présent dans les membranes basales.

La décorine est un petit protéoglycane (autour de 100 kDa) impliqué dans plusieurs processus biologiques importants, dont la fibrillogenèse du collagène et l'assemblage de la MEC (Bredrup *et al.*, 2010). La décorine interagit avec plusieurs collagènes dont les collagènes de type II, III, IV et V pour former des structures supramoléculaires. Elle peut également être impliquée dans l'interaction de la ténascine-X avec des fibrilles de collagène (Voermans *et al.*, 2008).

Le perlécan est un protéoglycane de 750 kDa impliqué dans les processus de régénération et de différenciation. Le cœur de cette protéine se lie à la fibronectine et aussi à d'autres composants de la matrice extracellulaire comme le collagène de type I (Murdoch & Iozzo, 1993).

I.1.3 Les glycoprotéines

Contrairement aux collagènes et aux fibres élastiques, les glycoprotéines sont des composés solubles et minoritaires de la MEC. Ce sont des hétéroprotéines constituées d'une (ou de plusieurs) chaîne(s) d'acides aminés, sur laquelle (lesquelles) viennent se fixer, par des liaisons covalentes, des oses ou des dérivés d'oses (oligosaccharides ou glycanes).

Les glycoprotéines sont des molécules de liaison entre le collagène IV et le sarcolemme (Gillies & Lieber, 2011), permettant de former la base de l'architecture de la membrane basale (Sanes, 2003). Les interactions entre les glycoprotéines favorisent la transmission de force latérale à partir de la myofibrille (Grounds *et al.*, 2005; Gillies & Lieber, 2011). Les glycoprotéines peuvent interagir avec les récepteurs de surface des cellules et avec d'autres molécules de la MEC, et donc avoir diverses fonctions biologiques comme la stabilisation de la structure de la MEC ou le maintien de la forme des cellules.

Parmi ces glycoprotéines, on trouve la laminine et la fibronectine. Ces dernières jouent un rôle dans l'association des cellules aux macromolécules de la MEC, tels que les collagènes, les protéoglycanes et l'élastine (Laurie *et al.*, 1986). Les molécules de laminine 1 par exemple s'assemblent pour former un réseau qui, associé au réseau formé par le collagène IV, constitue la trame de fond de la plupart des membranes basales. La fibronectine quant à elle, présente de nombreux sites de liaison pour des protéines de la MEC (comme les collagènes), pour des récepteurs membranaires (tels que les intégrines), ou pour des glycosaminoglycanes

(comme l'héparine et le chondroïtine-sulfate). La fibronectine, en plus de son rôle de molécule majeure de l'adhérence cellulaire avec le tissu conjonctif, intervient dans la communication cellulaire.

I.2 Molécules régulant la matrice extracellulaire

I.2.1 Les Métalloprotéases Matricielles (MMPs)

Les MMPs (Matrix Metallo Protease) forment une famille de protéases tissulaires impliquées dans la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Elles sont impliquées dans de nombreux processus de remaniement et de remodelage de la MEC. Elles sont capables de dégrader la majorité des composants de la MEC (Murphy & Docherty, 1992; Birkedal-hansen *et al.*, 1993; Kahari & Saarialho-Kere, 1997).

La structure primaire et la spécificité des MMPs vis-à-vis de certains substrats protéiques a permis de les classer en 6 groupes différents (Chakraborti *et al.*, 2003):

1/ Les gélatinases (MMP-2 et MMP-9). Elles sont exprimées dans nombreux types de cellules comme les kératinocytes et les cellules endothéliales. Elles dégradent plusieurs types de collagènes, notamment le collagène de type IV des membranes basales. Elles ont aussi pour substrats la laminine, la protéine du « core » de l'agglicane et l'élastine. Elles ont également la capacité de dégrader le collagène dénaturé (gélatine). MMP-2, mais pas MMP-9, est faiblement exprimée dans le muscle squelettique chez l'homme et dégrade les collagènes de type I, II et III (Visse & Nagase, 2003). Des données de la littérature montrent que l'action de la MMP-9 sur le Col-IVa3 génère un peptide signal appelé « tumstatin » (Ma *et al.*, 2007; Reich *et al.*, 2010). Ce dernier est présent au niveau circulant et peut être impliqué dans la régulation de certaines voies de signalisation (Sudhakar *et al.*, 2003).

2/ Les matrilysines (MMP-7 et MMP-26). Ces protéines ne sont pas exprimées dans le muscle squelettique chez l'homme. La MMP-7 (Matrilysine 1) est faiblement exprimée dans les tissus sains, essentiellement dans des tissus à caractère glandulaire comme la glande mammaire, la prostate, le pancréas et le foie. Elle intervient dans la réparation tissulaire et la différenciation osseuse. Son expression est fortement augmentée au cours des proliférations cellulaires bénignes et cancéreuses et est impliquée dans le développement tumoral et la

prolifération métastatique (Remy & Trespeuch, 2005). La MMP- 7 agit sur le Col-XVIII pour générer un autre peptide signal appelé «endostatin» (Ma *et al.*, 2007; Reich *et al.*, 2010). La MMP-26 est exprimée dans plusieurs organes du système uro-génital, clive plusieurs composants de la MEC comme le collagène de type IV, la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène. Cette métalloprotéinase est exprimée dans des cancers d'origine épithéliale, de l'endomètre, de la prostate et du poumon (Zhao *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004).

3/ Les collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8, MMP-13). Seule la MMP13 est exprimée dans le muscle squelettique chez l'homme, les deux autres MMPs sont exprimées, entres autres, dans les cellules microgliales. Ces protéines interviennent dans la dégradation des collagènes fibrillaires de type I, II et III, ainsi que d'autres molécules de la MEC comme le fibrinogène et l' α -2 macroglobuline. La MMP-1 clive aussi les collagènes de type VII, VIII, X et XI. La MMP13 clive les collagènes de type IV, IX, X et XIV également (Ala-Aho & Kahari, 2005).

4/ Les stromélysines (MMP-3, MMP10 et MMP-11). Parmi les trois MMPs, seules les MMP-3 et -11 sont exprimées dans le muscle squelettique chez l'homme. Les stromélysines ont de nombreux substrats. Les stromélysines-1 (MMP-3) et -2 (MMP-10) sont capables de dégrader les protéoglycanes, les laminines, la fibronectine, l'élastine, le nidogène, la gélatine, et les collagènes de type IV, V, IX et X. Elles participent également à l'activation des pro-MMPs (Visse & Nagase, 2003). La MMP-11 a une faible activité sur les molécules de la MEC (Murphy *et al.*, 1993). Toutefois elle clive les serpinines (inhibiteurs des sérine protéases) plus rapidement (Luo *et al.*, 2002).

5/ Les MMPs transmembranaires (MMP-14, -15, -16, -17, -24 et -25). L'ensemble de ces MMPs est exprimé dans le muscle squelettique chez l'homme. Ce groupe de métalloprotéases est composé de quatre protéinases de type transmembranaire (MMP-14, MMP-15, MMP-16 et MMP-24) et de deux ancrées au Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) (MMP-17 et MMP-25). À l'exception de MMP-17, elles sont toutes capables d'activer la pro-MMP-2 (English *et al.*, 2000). Par exemple, la MMP-14 est un activateur de la pro-MMP2 dans les tumeurs (Sato *et al.*, 1994), et joue aussi un rôle central dans la réponse angiogénique (Genis *et al.*, 2006).

6/ Sept autres MMPs ne sont pas classées dans les catégories ci-dessus (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23A/B, MMP-27, MMP-28). A part la MMP-12, toutes ces

MMPs sont exprimées dans le muscle squelettique chez l'homme. La MMP-12, majoritairement exprimée dans les macrophages (Shapiro *et al.*, 1993), est essentielle à la migration des macrophages (Shipley *et al.*, 1996) et est impliquée dans la croissance de la plaque d'athérome (Luttun *et al.*, 2004). Les MMP-19 et -20 dégradent différents éléments de la MEC. La MMP-19 est exprimée dans tous les tissus et chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. L'expression de la MMP-20 est restreinte à l'émail des dents (Stracke *et al.*, 2000).

Seules les MMPs 2, 9, 14 et 28 ont été étudiées dans les muscles atrophiés suite à l'inactivité physique (Cf. Paragraphe III.1).

I.2.2 Modes de régulation de l'activité des MMPs

Les MMPs sont finement régulées à trois niveaux : au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, par maturation de l'enzyme ou encore par des inhibiteurs endogènes.

❖ Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

Les MMPs sont en général peu exprimées dans les tissus adultes sains. Cependant, l'expression des MMPs augmente lors des processus de remodelage de la MEC ou lors de remaniement tissulaire physiologique ou pathologique. L'induction de leur expression est sous l'influence de cytokines (e.g. TNF- α), de facteurs de croissances (e.g. EGF) ou de transcription (e.g. Activator Protein-1(AP-1)).

Au niveau transcriptionnel, l'expression des MMPs peut être perturbée par l'action de certaines molécules. En effet, les ARNm codant pour la MMP-1 et la MMP-13 sont stabilisés par les esters de phorbols et l'EGF (Sternlicht & Werb, 2001). Certaines molécules comme le PDGF ou les glucocorticoïdes semblent stabiliser les transcrits de MMP-13, alors que d'autres comme le TGF- β les déstabilisent (Delany *et al.*, 1995; Sternlicht & Werb, 2001; Vincenti, 2001).

❖ Maturation de l'enzyme

Les pro-MMPs sont constituées d'un pro-peptide (pro-domaine) à l'extrémité N-terminale et sont donc inactives. Le motif consensus PRCGXPDV du pro-peptide contient un groupement thiol capable de lier l'atome de zinc du site actif de l'enzyme empêchant ainsi le clivage du pro-peptide. L'activation des MMPs nécessite tout d'abord, un clivage peptidique dans le pro-

domaine par d'autres MMPs actives. La cystéine pourra alors réagir avec une molécule d'eau ce qui permet de casser la liaison cystéine/Zn. Des enzymes permettent ensuite de cliver le site PRCGXPDV au niveau C-terminal (Nagase, 1997; Sternlicht & Werb, 2001) libérant les MMPs actives.

❖ Inhibiteurs endogènes

Les MMPs peuvent être inhibées par des inhibiteurs spécifiques naturels appelés TIMPs (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases). L'équilibre entre les activités des MMPs et des TIMPs est impliqué dans plusieurs processus tels que la cicatrisation des plaies, le remodelage des tissus, l'angiogenèse, ou les métastases (Lambert *et al.*, 2004). D'autres inhibiteurs de type sérine protéase peuvent également inhiber les MMPs. En effet, TFPI-2 (Tissue-Factor Pathway-Inhibitor-2) réduit la capacité des collagénases interstitiels (MMP-1 et MMP-13) à dégrader la triple hélice du collagène et l'activité des gélatinases MMP-2 et MMP-9 (Herman *et al.*, 2001).

I.1.2.3 Les protéines matricellulaires

Les protéines matricellulaires appartiennent à une famille de protéines non structurales de la MEC capables de s'associer aux molécules de la MEC et participent à la stabilité de la MEC (Brekken & Sage, 2000; Chong *et al.*, 2012). Ces molécules sont exprimées dans les tissus en renouvellement ou qui subissent des processus de remodelage, de réparation ou de cicatrisation (Brekken & Sage, 2000).

Ces protéines se classifient en 3 groupes: les ténascines, l'ostéonectine et les thrombospondines.

Les ténascines sont des grosses protéines (220 kDa) synthétisées principalement par les cellules du tissu conjonctif. Quatre ténascines (Tn) (Tn-C, -X, -R et -W) sont actuellement décrites chez les vertébrés (Chiquet-Ehrismann & Tucker, 2004). La Tn-C est fortement exprimée lors de l'embryogénèse, mais est faiblement exprimée voire absente dans les organes adultes. Cependant, elle réapparaît dans des situations pathologiques causées par des infections, des inflammations ou lors de la tumorigénèse (Chiquet-Ehrismann & Chiquet, 2003). La Tn-X est exprimée exclusivement au niveau des fibroblastes (Jing *et al.*, 2011). La Tn-R est exclusivement exprimée dans le système nerveux central (Anlar & Gunel-Ozcan, 2012), et enfin la Tn-W est exprimé durant l'ostéogénèse et le développement des muscles

lisses (Scherberich *et al.*, 2004). Parmi toutes les ténascines, l'étude de la Tn-C nous a semblé intéressante car son expression semble être altérée lors de l'inactivité physique et notamment dans les muscles de rats suspendus (Fluck *et al.*, 2003) ou après désuspension (Flück *et al.*, 2005) (Cf. III-2).

L'ostéonectine encore appelé SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein), BM-40 ou protéine 43K, est une glycoprotéine de 32 kDa dont l'expression est limitée aux tissus en remodelage chez l'animal adulte (Brekken & Sage, 2000). SPARC module les interactions cellulaires avec la MEC en se liant aux molécules de structure de la MEC comme le collagène ou la vitronectine, et en abrogeant les adhésions focales (Brekken & Sage, 2000).

Les thrombospondines (TSPs) sont des glycoprotéines de grande taille (450 kDa). La famille des TSPs est composée de 5 membres TSP-1, -2, -3, -4 et -5. Ces molécules sont impliquées entre autres dans les processus d'adhésion cellulaire et également dans le remodelage de la MEC (Haddadin RI, 2012).

II. Rôle de la MEC sur la régulation de voies de signalisation intracellulaires via les intégrines

Les intégrines sont des protéines de la MEC transmembranaires hétérodimériques, composées de sous-unités α et β , et qui interviennent dans les adhérences cellule-cellule et cellule-MEC (Hynes, 2002; Rantala *et al.*, 2011; Lenci *et al.*, 2012). Ces molécules jouent un rôle important dans la migration, la prolifération, l'adhérence cellulaire et dans la transduction des signaux entre le compartiment intra et extracellulaire (Moser *et al.*, 2009; Chua *et al.*, 2012).

Les intégrines sont constitués de 3 domaines: un domaine extracellulaire à l'extrémité N-terminale, un domaine transmembranaire et enfin un domaine intracellulaire cytoplasmique à l'extrémité C-terminale (Chua *et al.*, 2012). Actuellement, on dénombre 18 sous-unités α et 8 sous-unités β chez les mammifères. L'association de ces différentes sous-unités donne 24 dimères d'intégrines différents (Arnaout *et al.*, 2005; Moser *et al.*, 2009; Chua *et al.*, 2012). Un degré de similitude élevé caractérise les extrémités cytoplasmiques des sous-unités α et β (Moser *et al.*, 2009).

Les intégrines existent sous une conformation active ou inactive au niveau des membranes plasmiques, et présentent donc une affinité faible ou forte pour les ligands extracellulaires, respectivement (Moser *et al.*, 2009). Les domaines extracellulaires des intégrines se lient de

façon spécifique à des protéines de la MEC, ce qui leur confère un rôle dans l'adhésion cellulaire, la réparation tissulaire, la défense de l'hôte, etc (Harburger & Calderwood, 2009). En dehors de leur ancrage avec le cytosquelette intracellulaire, les intégrines transmettent des signaux vers la cellule (Harburger & Calderwood, 2009). Ces signaux déterminent les réponses cellulaires comme la migration, la survie, la différenciation, et la motilité. De plus, les intégrines peuvent réguler leur affinité pour les ligands extracellulaires par des changements de conformation dans leur domaine extracellulaire en réponse à des signaux qui affectent les extrémités cytoplasmiques des intégrines. Ceci permet l'activation des intégrines ou la signalisation de l'intracellulaire vers l'extracellulaire.

II.1 Activation des intégrines

Parmi les partenaires intracellulaires qui régulent l'activation des intégrines, la taline est une protéine de ~ 270 kDa qui se fixe au niveau du motif NPxY des intégrines β . Des mutations de ce motif au niveau des intégrines $\beta 1$ (Bouaouina *et al.*, 2008) et $\beta 3$ (Tadokoro *et al.*, 2003) associées à une mutation du domaine de fixation phosphotyrosine-binding (PTB) de la taline (Wegener *et al.*, 2007) abolissent la fixation de la taline et réduisent son affinité aux intégrines (Moser *et al.*, 2009). La fixation de la taline à la chaîne β des intégrines modifierait des interactions inhibitrices entre les chaînes α et β , et permettrait l'activation des intégrines (Wegener *et al.*, 2007). D'autres protéines, comme celles de la famille des « kindlins » (Malinin *et al.*, 2012) peuvent activer les intégrines. Les « kindlins » se lient au motif NxxY présent sur la partie C-terminale des sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ (Ma *et al.*, 2008; Ussar *et al.*, 2008). Etant donné que les protéines « kindlin » et taline interagissent avec des régions distinctes de l'extrémité C-terminale des intégrines β , elles peuvent coopérer pour réguler l'affinité des intégrines pour leurs ligands (Moser *et al.*, 2009).

Les mécanismes antagonistes qui permettent d'inhiber les intégrines β sont cependant mal connus. Récemment, la protéine « Sharpin » a été identifiée comme un important inhibiteur des intégrines capable de se fixer sur un domaine conservé présent au niveau C-terminal de toutes les intégrines α . Cette protéine agirait en inhibant, directement ou indirectement, le recrutement des protéines activatrices taline et « kindlin » aux intégrines dans les cellules (Rantala *et al.*, 2011). Le mécanisme de cette inhibition reste encore mal connu. D'autres molécules comme la filamine (FLN) et la Docking protein 1 (DOK 1) participent à

l'inhibition des intégrines β par des processus de compétition avec la taline ce qui empêche l'activation des intégrines (Kiema *et al.*, 2006; Wegener *et al.*, 2007).

II.2 Régulation de la signalisation par les intégrines

Après l'interaction de la chaîne β des intégrines avec les protéines activatrices, les changements de conformation se propagent à travers la membrane vers les domaines extracellulaires des intégrines, augmentant leur affinité pour leurs ligands. De plus, les intégrines rassemblent des complexes multiprotéiques cytoplasmiques d'adhérence appelés « focal adhesions » (FA). Ces complexes leur permettent d'induire une vaste gamme de modifications intracellulaires (« outside-in signaling ») (Wickstroem *et al.*, 2010). Ainsi, la fixation du ligand sur les intégrines, dépend non seulement de la nature de l'hétérodimère d'intégrine formé mais également de la composition moléculaire du complexe d'adhérence (Wickstroem *et al.*, 2010).

L'une des premières molécules étudiées dans la signalisation par les intégrines est la « Focal Adhesion Kinase (FAK) ». Elle agit comme un partenaire régulé par phosphorylation et est importante pour les processus d'adhésion, de migration cellulaire, et les échanges entre les facteurs de croissance et les intégrines (Harburger & Calderwood, 2009). FAK interagit avec la paxilline et la taline. En réponse à l'activation des intégrines, FAK s'autophosphoryle. Ceci induit un changement de conformation qui permet l'ancrage et l'activation de certaines protéines kinases comme les « Src kinases », qui en retour phosphorylent FAK favorisant son activité et son interaction avec d'autres protéines (Harburger & Calderwood 2009).

L'« Integrin Linked Kinase (ILK) » est un autre partenaire clé impliqué dans la signalisation par les intégrines. Le complexe ILK/PINCH/Parvin (IPP) joue un rôle important dans la liaison entre les intégrines et le cytosquelette d'actine, et dans la transduction des signaux de l'extra- vers l'intra-cellulaire (Wu, 2004). L'ILK est composée de trois domaines : 1) un domaine N-terminal composé de cinq répétitions d'ankyrine (protéine membranaire responsable de l'attachement au cytosquelette d'actine), 2) un domaine intermédiaire appelé Pleckstrin homology (PH) like domain (domaine d'une protéine de ~ 120 acides aminés impliquée dans la signalisation intracellulaire), et 3) un domaine C-terminal appelé kinase-like domain.

Le premier domaine d'ILK est responsable de la fixation de la protéine PINCH (protéine appartenant à la famille des LIMs, composée de 2 membres PINCH1 et PINCH2). La protéine

PINCH contient cinq domaines LIM dont deux qui lui permettent de fixer d'une part l'ILK et d'autre part des protéines adaptatrices comme Parvin (α -Parvin, β - Parvin et γ - Parvin).

Pour le maintien de leur niveau protéique, les protéines ILK, PINCH et Parvin du complexe IPP seraient dépendantes les uns des autres (Fukuda *et al.*, 2003). En effet, une délétion de PINCH1 induit une sous-expression d'ILK et de Parvin alors qu'une surexpression de PINCH2 empêche leur sous-expression (Fukuda *et al.*, 2003). La protéine ILK peut interagir également avec certaines protéines activatrices des intégrines comme les Kindlins (Harburger & Calderwood, 2009), mais également avec la paxilline (Harburger & Calderwood, 2009). La paxilline sert de protéine d'accueil pour recruter des molécules de signalisation dans un compartiment cellulaire spécifique, comme par exemple les adhésions focales. En effet, la paxilline possède plusieurs sites de phosphorylation permettant de réguler les interactions protéine-protéine pour le recrutement de kinases (e.g FAK et ILK), de protéines qui se lient au cytosquelette d'actine comme Parvin ou la vinculine ou même de phosphatases (Harburger & Calderwood, 2009). En se liant à FAK et à l'ILK, la paxilline pourrait donc jouer un rôle dans les processus de transmission de signaux de l'extra-à l'intracellulaire.

L'ILK a été identifiée au départ comme une kinase pouvant phosphoryler plusieurs substrats comme Akt (Persad *et al.*, 2001). Cette fonction reste cependant controversée (Wickstroem *et al.*, 2010; Hannigan *et al.*, 2011; Riaz *et al.*, 2012). En effet, des études ont montré que la déplétion de l'ILK dans des cellules vasculaires du muscle lisse entraîne une hyperphosphorylation du substrat étudié (Kogata *et al.*, 2009; Montanez *et al.*, 2009). De plus, des fibroblastes ILK-déficients ne présentent pas de défaut de phosphorylation de la protéine Akt par exemple (Grashoff *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2007). Cependant, une inactivation du gène codant pour l'ILK au niveau du cœur, du muscle squelettique, du système nerveux ou des macrophages supprime la phosphorylation de la sérine 473 de la protéine Akt (Troussard *et al.*, 2003; White *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009). Considérés ensemble, ces résultats suggèrent que la fonction kinase de l'ILK serait tissu spécifique (Wickstroem *et al.*, 2010). De plus, une délétion de PINCH1 entraîne une diminution de la phosphorylation de AKT sur la thréonine 308 et sur la sérine 473. Il est donc possible que le rôle de l'ILK sur la phosphorylation d'Akt dépende de son interaction avec ses partenaires PINCH et Parvin.

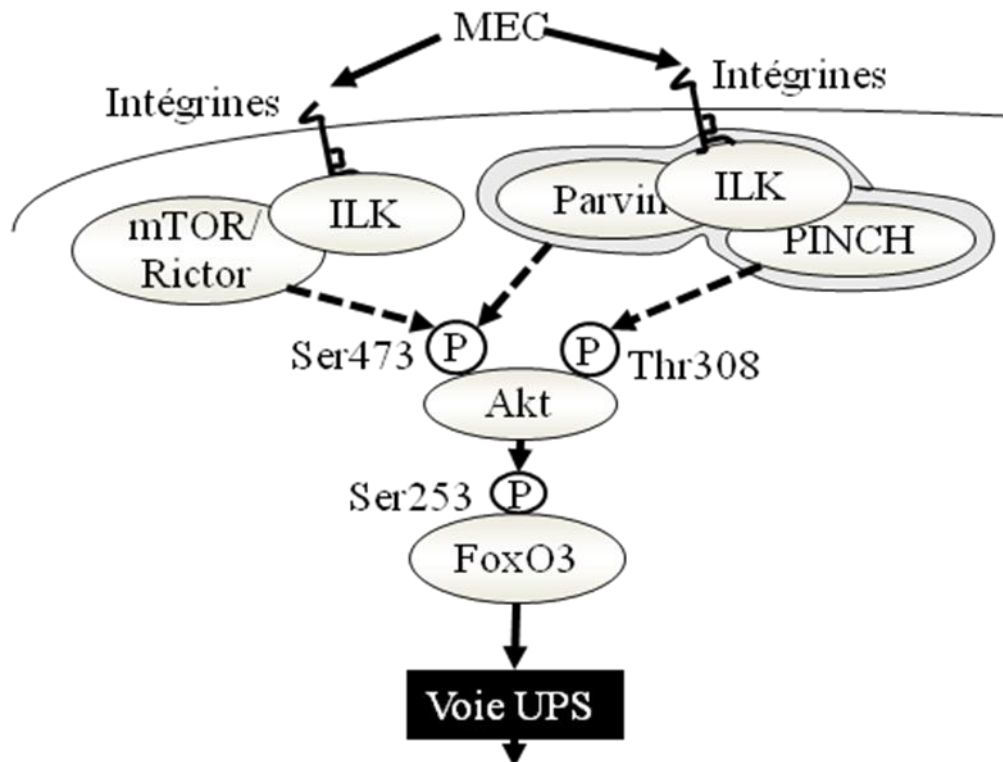
La protéolyse musculaire est régulée par différentes voies dont NF- κ B (nuclear factor-kappa B), P-38 MAPKinases (Mitogen-activated protein kinases) et Akt. L'ILK pourrait donc être impliquée dans la régulation de la protéolyse musculaire par son rôle sur l'activation d'Akt

(Figure 11). En effet, Akt peut réguler la protéolyse musculaire en phosphorylant le facteur de transcription FoxO3. Selon le degré et les sites de phosphorylation de FoxO3, celui-ci pourra ou non migrer vers le compartiment nucléaire et induire la transcription de gènes impliqués dans la voie UPS (e.g. MAFbx et MURF1) et dans l'autophagie (e.g. Atg4, Atg12) (Glass, 2003; Attaix & Bechet, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Le rôle d'ILK dans le contrôle de l'atrophie et la récupération via la voie Akt/Foxo3 reste une hypothèse à tester.

L'ILK est impliquée également dans la réparation tissulaire notamment en régulant la myogenèse. En effet des études Huang *et al.* (2000) ont mis en évidence qu'une surexpression d'ILK dans des myoblastes C2C12 inhibe l'expression de certains facteurs myogéniques tels que la myogénine ou MyoD (Huang *et al.*, 2000). De plus, il a été montré lors de stress mécanique in vitro dans des fibroblastes que l'ILK jouerait un rôle important dans la stimulation de l'expression de la Ténascine C (Maier *et al.*, 2008). Un changement d'expression de l'ILK pourrait ainsi modifier le niveau d'expression de la ténascine C et également sa localisation ce qui altérerait la structure de la MEC musculaire.

De plus, une autre molécule de la MEC : SPARC est également impliquée dans la régénération musculaire et serait capable d'activer Akt via la phosphorylation d'ILK (Shi *et al.*, 2007; Weaver *et al.*, 2008) par interaction au niveau extracellulaire avec les hétérodimères des intégrines $\beta 1$ (Weaver *et al.*, 2008).

Ainsi, des altérations de la MEC pourraient influencer la régulation de la protéolyse musculaire, mais également la capacité de régénération du muscle squelettique pendant l'immobilisation et la récupération musculaire.



Perte de la masse de muscles et récupération

Figure 11: Représentation schématique de la relation éventuelle entre les molécules de la MEC et celles impliquées dans la protéolyse UPS.

III Rôle de la MEC dans l'inactivité physique et la récupération musculaire

III.1 Au cours de l'inactivité physique

La matrice extracellulaire semble être altérée dans les situations d'atrophie induite par l'inactivité physique (Seene *et al.*, 2012). En effet, une baisse de l'expression protéique et ARNm du collagène fibrillaire majoritaire de type I (Col-I) a été montrée dans les muscles soleus ou gastrocnemius chez le rat suspendu pendant 5 à 28 jours (Miller *et al.*, 2001; Giannelli *et al.*, 2005; Oguro *et al.*, 2006; Dupont-Versteegden *et al.*, 2008) ou après immobilisation pendant 1 à 2 semaines chez le rat (Han *et al.*, 1999; Ahtikoski *et al.*, 2001; Ahtikoski *et al.*, 2003; Polizello *et al.*, 2011) ou 48H chez l'homme (Urso *et al.*, 2006). Dans de rares cas, les niveaux d'ARNm codant pour le Col-I sont inchangés dans le soleus après 14 jours de suspension (Heinemeier *et al.*, 2009) ou dans le TA après 7 jours d'immobilisation

(Han *et al.*, 1999; Ahtikoski *et al.*, 2001; Ahtikoski *et al.*, 2003) chez le rat. Le niveau protéique ou ARNm du Col-III diminue également dans les muscles soleus ou gastrocnemius au cours de la suspension (Cros *et al.*, 2001; Heinemeier *et al.*, 2009; Kaasik *et al.*, 2011) ou de l'immobilisation chez le rat (Han *et al.*, 1999; Ahtikoski *et al.*, 2001; Ahtikoski *et al.*, 2003). Une diminution des niveaux ARNm codant pour le Col-IV a également été rapportée dans les muscles de rats immobilisés (Ahtikoski *et al.*, 2001) ou suspendus (Giannelli *et al.*, 2005; Riso *et al.*, 2010; Kaasik *et al.*, 2011). Des altérations similaires existent aussi dans le muscle vastus lateralis chez l'homme immobilisé pendant 48H (Urso *et al.*, 2006). Cependant, ces modifications ne sont pas systématiques puisque les niveaux ARNm codant pour le Col-III peuvent aussi être inchangés dans le soleus pendant la suspension (Heinemeier *et al.*, 2009) et dans le TA pendant l'immobilisation (Ahtikoski *et al.*, 2001) chez le rat. Ils peuvent être augmentés dans le muscle soleus chez le rat pendant la suspension (Miller *et al.*, 2001). L'expression ARNm de la Tn-C est cependant diminuée dans le GA après 3 semaines d'immobilisation par plâtrage (Jarvinen *et al.*, 2003) (Tableau 4).

Des études portant sur les molécules régulant la MEC montrent que les activités et/ou les niveaux d'ARNm ou de protéines de la MMP-2 ou de la MMP-9 augmentent dans les muscles pendant la suspension (Wittwer *et al.*, 2002; Giannelli *et al.*, 2005; Riso *et al.*, 2010; Kaasik *et al.*, 2011) ou pendant l'immobilisation (Ahtikoski *et al.*, 2003; Reznick *et al.*, 2003; Bar-Shai *et al.*, 2005; Carmeli *et al.*, 2006). Cependant, dans certains cas, les activités des MMP-2 et -9 sont restées inchangées dans les muscles après 5 jours de suspension (Berthon *et al.*, 2007). Inversement, une baisse des niveaux ARNm codant pour la MMP-28 a été observée après 48H d'immobilisation dans le muscle vastus lateralis chez l'Homme (Urso *et al.*, 2006). Ces divergences de réponse peuvent être expliquées par des régulations au niveau des inhibiteurs endogènes des MMPs : les TIMPs. Cependant, les niveaux protéiques ou ARNm de TIMPs (Timp-1 et -2) peuvent être diminués ou augmentés dans les muscles pendant l'immobilisation (Reznick *et al.*, 2003; Stevenson *et al.*, 2003) ou pendant la suspension (Stevenson *et al.*, 2003; Giannelli *et al.*, 2005; Kaasik *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces données montrent bien la complexité d'étudier les processus de remodelage de la MEC en raison probablement des différents niveaux de régulation des MMPs, des différents muscles étudiés ou de la longueur des protocoles d'immobilisation ou de suspension. Cependant, une induction des MMPs est souvent rapportée (8 références / 10) quel que soit le modèle considéré. Pour la régulation des TIMPs, les données sont beaucoup moins claires et réparties entre induction et répression.

Pour les autres molécules de la MEC, il existe beaucoup moins de données. Seule la Tn-C a été étudié pendant la suspension (Fluck *et al.*, 2003; Fluck *et al.*, 2005) et l'immobilisation par plâtrage (Jarvinen *et al.*, 2003). Les niveaux protéiques (analysés par histochimie) ou ARNm de la Tn-C n'ont pas été modifiés après 14 jours de suspension dans le muscle soleus du rat (Fluck *et al.*, 2003; Fluck *et al.*, 2005). Par contre, l'expression de Tn-C a diminué après 3 semaines d'immobilisation (Jarvinen *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces régulations influence forcément les dépôts de collagène au niveau du tissu conjonctif au cours de l'inactivité physique. D'ailleurs, l'immobilisation par plâtrage modifie la densité de la matrice extracellulaire. Un épaissement de l'endomysium et du périmysium a été observé chez le rat suite à l'immobilisation (Jarvinen *et al.*, 2002), et est d'autant plus important qu'un étirement est appliqué (Mattiello-Sverzut *et al.*, 2006). De plus, l'étirement (sans immobilisation) semble induire à lui seul un épaissement de la matrice extracellulaire de l'ordre de 40% accompagné d'une augmentation du contenu en collagène (Willems *et al.*, 2010). Ainsi, la position d'immobilisation pourrait jouer probablement un rôle dans le degré d'altérations structurales qui pourraient avoir lieu dans la MEC suite à l'immobilisation. En d'autres termes, les modifications de la MEC pourraient être plus prononcées dans les muscles immobilisés en position étirée que dans ceux immobilisés en position raccourcie.

III.2 Au cours de la récupération musculaire

Les altérations de la MEC au cours de la période de récupération musculaire à la suite d'une inactivité physique ont été très peu étudiées, et principalement en utilisant le modèle de suspension. Pendant la période de récupération suivant une suspension, des altérations précoces au niveau de l'expression du collagène ont été constatées chez l'animal et l'Homme. En effet, les niveaux d'ARNm codant pour le Col-I et le Col-III ont augmenté précocement dès deux jours de récupération suite à 14 jours de suspension dans le muscle soleus chez le rat, et sont restés élevés jusqu'au 16^{ème} jour de récupération (Heinemeier *et al.*, 2009). Chez l'Homme, une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour le Col-IVa3 a été observée après 24H de récupération suivant 48H de suspension dans le muscle vastus lateralis (Reich *et al.*, 2010). Cependant, une diminution des niveaux d'ARNm codant pour le procollagène I a été constatée dans le muscle GA dès le premier jour de récupération suivant 10 jours de suspension chez la souris (Washington *et al.*, 2011). Dans cette étude, les niveaux d'ARNm codant pour la fibronectine augmentent d'un facteur 3 dans le muscle GA, dès le

premier jour de récupération, après 10 jours de suspension chez la souris, puis ont été normalisés après 7 jours de récupération (Washington *et al.*, 2011). Une augmentation de l'expression protéique de la fibronectine accompagnée d'une accumulation de la ténascine-C ont été constatées dans l'endomysium du muscle soleus du rat dès le premier jour de récupération après 14 jours de suspension (Fluck *et al.*, 2003; Fluck *et al.*, 2005) et ont persistées jusqu'au 14^{ème} jour de récupération (Fluck *et al.*, 2003). L'immobilisation par plâtrage également induit une légère augmentation de l'expression de la ténascine-C, après 8 semaines de remobilisation, au niveau de la jonction ostéo-tendineuse chez le rat (Jarvinen *et al.*, 1999) (Tableau 4).

REFERENCES	Espèce	Modèle	Muscle	Méthode	Données
(Polizello <i>et al.</i> , 2011)	Rat	Immobilisation (14 jours)	EDL	IHC	↘ Col-I
(Urso <i>et al.</i> , 2006)	Homme	Immobilisation (48H)	Vastus lateralis	mRNA	↘ Col-III, Col-IV ↘ MMP28, TIMP1
(Han <i>et al.</i> , 1999; Ahtikoski <i>et al.</i> , 2001; Ahtikoski <i>et al.</i> , 2003)	Rat	Immobilisation (7 jours)	GA / sol / TA	mRNA	↘ Col-I, Col-III, Col-IV (GA)
					↔ Col-I, Col-III (TA)
				mRNA et Activité	↘ Pre-Col-I, -III (sol)
					↘ TIMP2 (GA)
(Reznick <i>et al.</i> , 2003; Bar-Shai <i>et al.</i> , 2005; Carmeli <i>et al.</i> , 2006)	Rat	Immobilisation (4 sem)	GA / sol / TA	mRNA	↗ MMP2
				Activité	↗ MMP2, MMP9 (GA)
				WB	↗ MMP2, TIMP1
(Jarvinen <i>et al.</i> , 1999)	Rat	Immobilisation (3 sem)	jonction ostéo- tendineuse	IHC (immunohistochimie)	-
		Récupération (8 sem)			↗ Tn-C
(Jarvinen <i>et al.</i> , 2003)	Rat	Immobilisation (3 sem)	GA/tendon d'achille	IHC	↘↘ Tn-C
		Récupération (8 sem)			↗ Tn-C vs. Immobilisés
(Miller <i>et al.</i> , 2001)	Rat	Suspension (28 jours)	Sol	Histologie	↘ Col-I
					↗ Col-III
(Giannelli <i>et al.</i> , 2005)	Rat	Suspension (14 jours)	Sol / GA	IHF, Elisa, contenu protéique	↗ MMP2
					↘ TIMP2
					↘ Col-I, Col-IV

(Heinemeier <i>et al.</i> , 2009)	Rat	Suspension (14 jours) Récupération	Sol	mRNA	↔ Col-I, Col-III ↗ Col-I, Col-III (x 10)
(Kaasik <i>et al.</i> , 2011)	Rat	Suspension Récupération	Fast-twitch (EDL ou TA?)	mRNA	↘ Col-I, Col-III, Col-IV ↗ MMP2, TIMP2 ↗ Col-I, Col-III, Col-IV, ↗ MMP2, TIMP2
(Cros <i>et al.</i> , 2001)	Rat	Suspension	Sol	mRNA, IHC, WB	↘ Col-III
(Washington <i>et al.</i> , 2011)	Souris	Suspension (10 jours) Récupération (1 jour)	GA	mRNA	↘ procollagène I ↘ procollagène I ↗ fibronectine
(Fluck <i>et al.</i> , 2003; Fluck <i>et al.</i> , 2005)	Rat	Suspension (14 jours) Récupération (1 jour)	Sol	IHC mRNA	↔ Tn-C ↗ Tn-C vs. Immobilisés ↗ Tn-C (x 40), fibronectine
(Reich <i>et al.</i> , 2010)	Homme	suspension (48H) Récupération (24H)	Vastus lateralis	mRNA	↗ Col-IVa3 ↗ Col-IVa3

Tableau 4 : Altérations des molécules de la matrice extracellulaire au cours de l'inactivité physique (suspension ou immobilisation par plâtre) et de la récupération.

IHC : ImmunoHistoChimie ; GA : Gastrocnemius ; TA : Tibialis Anterior ; Sol : Soleus ; EDL : extensor digitorum longus ; Col : Collagène ; MMP : Matrix metalloproteinases ; TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinases ; Tn : Ténascine ; WB : Western Blot ; sem : semaine

Hypothèse, objectifs et stratégie expérimentale

L'analyse de ces données bibliographique nous a amené à formuler l'hypothèse qu'une relation forte existait entre les modifications subies par la MEC au cours de la période d'immobilisation et l'induction de la protéolyse musculaire influençant ainsi la cinétique de récupération musculaire qui s'ensuit.

Pour vérifier cette hypothèse pendant ma thèse, nous avons fixé 3 objectifs :

1/ caractériser les modifications subies par la MEC dans les muscles TA et GA immobilisés en position étirée et raccourcie respectivement,

2/ étudier la régulation de la protéolyse UPS et de l'autophagie, ainsi que de l'apoptose au cours de la période d'immobilisation et de récupération, et

3/ mieux comprendre les voies de signalisation impliquant les intégrines permettant d'établir un lien entre la MEC et le compartiment intracellulaire.

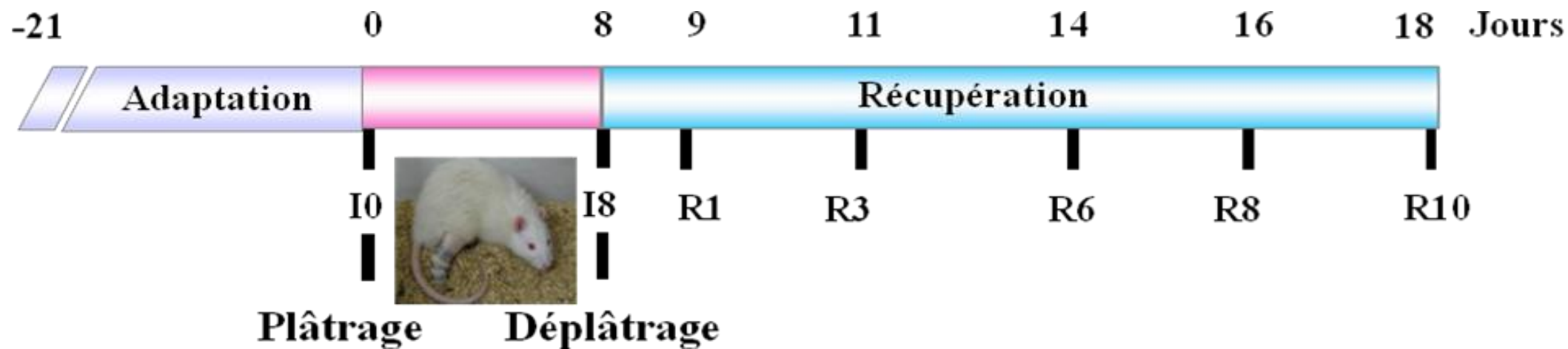
Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé le modèle d'immobilisation unilatérale de la patte arrière par plâtrage, dans lequel une patte arrière est immobilisée et l'autre sert de témoin. Bien qu'il existe d'autres modèles d'immobilisation ou d'induction d'atrophie musculaire, le plâtrage reste le modèle le plus adapté à nos objectifs. En effet ce modèle est réversible, nous permettant ainsi d'étudier les phases d'atrophie mais également les phases de récupération musculaire à l'inverse du modèle de dénervation. De plus, le plâtrage d'une seule des 2 pattes arrière du rat permet à l'animal d'être son propre témoin. Ceci n'est pas le cas avec le modèle de suspension par le train arrière. Enfin, ce modèle est proche le plus des situations d'inactivités physiques rencontrées chez l'Homme, notamment en terme de durée de période de récupération.

Les muscles ont été immobilisés en position étirée (tibialis anterior, TA) ou raccourcie (gastrocnemius, GA). Après 8 jours d'immobilisation (I8), la période de récupération (R) a été étudiée 1 à 10 jours après le déplâtrage (R1, R3, R6, R8 et R10) dans les muscles TA et GA immobilisés et témoins à chaque point de la cinétique (Schéma ci-contre).

Les altérations structurales au niveau de la MEC et des fibres ont été étudiées après coloration au rouge Sirius de coupes transversales de muscles et par mise en évidence des noyaux apoptotiques par la méthode de TUNEL. La composition de la MEC a été déterminée

par mesure de l'expression au niveau ARNm par RT-q-PCR de différentes molécules (i.e. collagènes Ia1, IVa1, XIIa1, XV et XVIII, décorine, ténascine-C, Sparc, MMP-2 et -14 et TIMP-1 et -2).

La régulation des voies protéolytiques UPS, lysosomale et apoptotique mitochondriale dépendante des caspases a été étudiée par mesure des activités du protéasome et de l'apoptosome, de l'expression au niveau ARNm ou protéique de marqueurs tels que MAFbx, MURF1, LC3b, Beclin-1, et Cathepsine L. Enfin, la régulation par les intégrines membranaires a été réalisée par mesure de l'expression au niveau ARNm ou protéique de différents partenaires dont les intégrines $\alpha 7$ et $\beta 1$, PINCH, Parvin, ILK, FAK, Paxilline, et Shardin.



NA : Noyaux Apoptotiques.

ST : Structure.

MEC : Matrice ExtraCellulaire.

IPP : ILK-PINCH-Parvin.

UPS : Ubiquitin Proteasome System.

MyHC : Myosin Heavy Chain.

Présentation des travaux

Publication 1

The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis and apoptosis.

Slimani L, Micol D, Amat J, Delcros G, Meunier B, Taillandier D, Polge C, Béchet D, Dardevet D, Picard B, Attaix D, Lustrat A & Combaret L

American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, acceptée le 25
Septembre 2012, sous presse.

Contexte

Le muscle squelettique est le réservoir majeur d'acides aminés de l'organisme. Les fontes musculaires prolongées entraînent de sévères conséquences métaboliques et génèrent des coûts de santé publique élevés. Il n'existe cependant pas de traitement efficace permettant de prévenir ces atrophies lors de pathologies. Les atrophies induites par l'immobilisation (souvent associée à de nombreuses pathologies (cancers, infections, traumatismes...)) ont été très étudiées et résultent d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation protéique. L'atrophie induite par l'immobilisation est associée 1/ à une activation de la protéolyse ubiquitine protéasome dépendante (UPS) et de l'apoptose, 2/ à des modifications du phénotype des fibres musculaires, et 3/ à des altérations de la structure (fibres et matrice extracellulaire (MEC)) du muscle. Cependant, les mécanismes impliqués dans la récupération musculaire après immobilisation ont été peu documentés. Par ailleurs, la position d'immobilisation semble influencer la cinétique de récupération musculaire. En effet, des résultats obtenus précédemment au laboratoire montrent que l'atrophie observée à la fin de la période d'immobilisation est aggravée 10 jours après le déplâtrage dans le muscle Tibialis Anterior (TA) immobilisé en position étirée, alors qu'elle s'est stabilisée dans le muscle gastrocnemius (GA) immobilisé en position raccourcie (Vazeille *et al.*, 2008). De plus, la protéolyse UPS et l'apoptose mitochondriale dépendante des caspases ont été normalisées dans les 10 premiers jours de récupération dans le muscle GA (Vazeille *et al.*, 2008).

Hypothèse

Nous avons émis l'hypothèse que le TA pourrait présenter des altérations structurales (composition en type de fibres, épaisseur du tissu conjonctif) plus prononcées que le muscle GA, impliquant plus de remodelage dans le TA et retardant la mise en place des processus de récupération dans ce muscle.

Objectifs

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'aggravation de l'atrophie du TA après le déplâtrage nous avons eu pour objectifs 1/ de caractériser les altérations

structurales au niveau des fibres et du tissu conjonctif et 2/ d'évaluer le rôle du système protéolytique UPS et de l'autophagie, ainsi que celui des processus apoptotiques pendant l'immobilisation et la récupération dans les muscles TA et GA.

Stratégie

Des rats adultes ont été immobilisés pendant 8 jours (I8) par plâtrage unilatéral, une patte arrière étant immobilisée et l'autre servant de témoin. Dans ce modèle, les muscles sont immobilisés en position étirée (tibialis anterior, TA) ou raccourcie (gastrocnemius, GA) et caractérisés par des cinétiques de récupération différentes pouvant résulter d'altérations différentes du tissu conjonctif.

Après déplâtrage, la période de récupération (R) est étudiée pendant 1, 3, 6, 8 et enfin 10 jours (R1, R3, R6, R8 et R10) dans les muscles TA et GA immobilisés et témoins à chaque point de la cinétique. Les altérations structurales ont été étudiées en mesurant 1/ l'aire du tissu conjonctif, 2/ la proportion des différentes chaînes lourdes de myosines (MyHC) de type I, Iib, Iix et Iia, 3/ l'expression des ARNm codant pour les collagènes I, XII, IV et XVIII, les Matrix MetalloProteinases (MMP) MMP-2 et -14 qui dégradent le collagène et pour leurs inhibiteurs TIMP-1 et -2 (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). De plus, l'activation de la voie UPS a été étudiée en évaluant les niveaux protéique et/ou ARNm des enzymes E3 ligases MAFbx et MuRF-1, et en mesurant les principales activités du protéasome (activités chymotrypsin- et trypsin-like). L'activation de l'autophagie a été déterminée en mesurant les niveaux d'ARNm de marqueurs tels que Beclin-1, LC3b et la cathepsine L. Enfin le rôle de l'apoptose a été étudié en mesurant l'activité de la caspase-9 et le pourcentage des noyaux apoptotiques.

Principaux résultats et conclusions

Nous montrons que l'aggravation d'atrophie observée 10 jours après le déplâtrage par Vazeille *et al.* (2008) s'est installée très précocement dès le premier jour de remobilisation et se poursuit jusqu'à R6.

Cette aggravation précoce d'atrophie du TA est corrélée à :

1/ un épaissement du tissu conjonctif dans ce muscle pendant la période de récupération qui résulterait d'une augmentation du dépôt de collagène à la fois par augmentation de leur synthèse et par diminution de leur dégradation,

2/ une forte induction des niveaux d'ARNm codant pour le collagène fibrillaire majoritaire (Col-I) à R1 et jusqu'à R10, associé à une augmentation des MMPs, suggérant un remodelage important au niveau du tissu conjonctif dès le déplâtre,

3/ une augmentation du pourcentage des noyaux apoptotiques principalement localisée dans le tissu conjonctif, suggérant que l'apoptose aurait probablement lieu au niveau des cellules stromales (fibroblastes ou cellules endothéliales), au niveau de cellules inflammatoires infiltrées, et/ou des cellules satellites,

4/ une augmentation des activités du protéasome et de l'apoptosome plus prononcées et persistantes dans le TA que dans le GA, suggérant une implication des voies UPS et apoptotique mitochondriales dans l'aggravation d'atrophie du TA pendant la remobilisation, et

5/ une augmentation tardive de certains marqueurs de l'autophagie dans les muscles TA remobilisés au moment où son atrophie se stabilise.

En conclusion, ces données suggèrent un remodelage important dans le tissu conjonctif du TA plus important que dans le GA, qui pourrait influencer la rigidité et/ou l'élasticité de la matrice extracellulaire, les capacités de régénération du muscle et/ou sur sa micro-vascularisation. De plus, nos travaux suggèrent que la voie UPS participerait à l'aggravation de l'atrophie du TA après déplâtre alors que l'autophagie pourrait être impliquée plus tardivement pour l'élimination de protéines ou d'organelles déficientes et permettre l'initiation de la récupération musculaire proprement dite.

The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis and apoptosis

Lamia Slimani¹, Didier Micol², Julien Amat¹, Geoffrey Delcros¹, Bruno Meunier², Daniel Taillandier¹, Cécile Polge¹, Daniel Béchet¹, Dominique Dardevet¹, Brigitte Picard², Didier Attaix¹, Anne Listrat², and Lydie Combaret¹

¹INRA, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, 63122 Saint Genès Champanelle, France, and, Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, 63000 Clermont-Ferrand, France ; ²INRA, UMR 1213 Herbivores, 63122 Saint Genès Champanelle, France

Running Head: Altered proteolysis and connective tissue in muscle recovery

Corresponding author: L. Combaret: INRA, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, 63122 Saint Genès Champanelle, France. Email: lydie.combaret@clermont.inra.fr

Abstract

Sustained muscle wasting due to immobilization leads to weakening and severe metabolic consequences. The mechanisms responsible for muscle recovery after immobilization are poorly defined. Muscle atrophy induced by immobilization worsened in the lengthened tibialis anterior (TA) muscle, but not in the shortened gastrocnemius muscle. Here we investigated some mechanisms responsible for this differential response. Adult rats were subjected to unilateral hindlimb casting for 8 days (I8). Casts were removed at I8 and animals were allowed to recover for 10 days (R1 to R10). The worsening of TA atrophy following immobilization occurred immediately after cast removal at R1 and was sustained until R10. This atrophy correlated with a decrease in type IIb myosin heavy chain isoform and an increase in type IIx, IIa and I isoforms, with muscle connective tissue thickening, and with increased collagen (Col) I mRNA levels. Increased Col-XII, -IV, and -XVIII mRNA levels during TA immobilization normalized at R6. Sustained enhanced peptidase activities of the proteasome and apoptosome activity contributed to the catabolic response during the studied recovery period. Finally, increased nuclear apoptosis only prevailed in the connective tissue compartment of the TA. Altogether, the worsening of the TA atrophy pending immediate reloading reflects a major remodeling of its fiber type properties and alterations in the structure/composition of the extracellular compartment that may influence its elasticity/stiffness. The data suggest that sustained enhanced ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis and apoptosis are important for these adaptations and provide some rationale for explaining the atrophy of reloaded muscles pending immobilization in a lengthened position.

Key Words: ubiquitin-proteasome proteolysis; caspase 9; extracellular matrix remodeling; reloading; matrix metalloproteases

Introduction

Skeletal muscle is the major reservoir of body proteins. Sustained muscle wasting due to immobilization leads to weakening and severe metabolic consequences, which impacts health care costs. This wasting has been thoroughly investigated and results from an imbalance between protein synthesis and breakdown rates, but also between apoptotic and regeneration processes (Charge & Rudnicki, 2004; Vazaille *et al.*, 2008; Evans, 2010; Magne *et al.*, 2011; Vazaille *et al.*, 2012). By contrast, the mechanisms responsible for muscle recovery after remobilization are poorly defined.

The ubiquitin (Ub)–proteasome system (UPS) is involved in the breakdown of the major contractile proteins in catabolic conditions. Briefly, in this pathway a polyUb chain is covalently attached to the substrate by the ubiquitin conjugation machinery, and the targeted protein is then recognized and degraded by the 26S proteasome (Attaix *et al.*, 2005). This pathway is activated after immobilization or unloading in atrophying muscles from animals (Taillandier *et al.*, 1996; Heng *et al.*, 2008; Vazaille *et al.*, 2008; Andrianjafiniony *et al.*, 2010; Magne *et al.*, 2011) or humans (Jones *et al.*, 2004; Gustafsson *et al.*, 2010; Reich *et al.*, 2010).

The muscle specific ubiquitin ligases (E3) MuRF1 and MAFbx/Atrogin-1 play key roles in disuse induced-muscle atrophy (Bodine *et al.*, 2001). In addition, MURF1 is involved in the ubiquitination of the major contractile proteins, such as actin and myosins (Clarke *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2009; Polge *et al.*, 2011).

DNA fragmentation, caspase activities and the mitochondria-associated apoptotic pathway are also enhanced in immobilized (Vazaille *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2011) and unloaded (Alway *et al.*, 2003a; Berthon *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2009; Andrianjafiniony *et al.*, 2010) atrophying muscles.

Investigating the mechanisms responsible for muscle recovery in the cast immobilization model is very clinically relevant since it better mimics events prevailing with fractures and bed-rest associated immobilization compared with unloading models. However, few groups have investigated muscle recovery pending remobilization. Muscle recovery is delayed after cast removal (Vazeille *et al.*, 2008; Vazeille *et al.*, 2012). In addition, tibialis anterior (TA) and gastrocnemius (GA) muscles did not exhibit the same kinetics of recovery. In fact, there is a worsening of the TA atrophy 10 days after cast removal (Vazeille *et al.*, 2008). This surprising observation appears a distinct feature of the TA, suggesting a more important remodeling of that muscle. This may result from the position of immobilization. In fact TA and GA muscles are located respectively in the anterior and posterior hindlimb compartment, and thus were respectively immobilized in a lengthened and shortened position. Connective tissue thickening that prevailed during immobilization (Willems *et al.*, 2010) was greater when lengthening is applied (Mattiello-Sverzut *et al.*, 2006).

In addition changes in fiber-type composition reported during immobilization and/or recovery may depend on the muscle studied and on its location (Mattiello-Sverzut *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2007; Cornachione *et al.*, 2008; Guillot *et al.*, 2008). Finally, the position of immobilization was also previously reported to influence the regulation of muscle protein turnover (Goldspink, 1977). Both UPS and the mitochondria-associated apoptotic pathways were normalized in GA within 10 days after cast removal (Vazeille *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2011). To the best of our knowledge, there is no study in the TA investigating the role of these pathways during early recovery periods following cast immobilization. Thus, whether muscle structural alterations, and/or the UPS and apoptosis may be involved in the remodeling of the TA during early recovery after cast immobilization remains unknown. Therefore, we hypothesized i) that the lengthened TA muscle may exhibit specific modifications of fiber-type composition and/or more extensive connective tissue damages,

compared with the shortened GA muscle during immobilization, and ii) that the UPS and the mitochondria-associated apoptotic pathway could be involved in the worsening of TA muscle atrophy during early recovery.

Materials and Methods

Animals and experimental design

The present study was approved by the Animal Care and Use Committee at the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and adhered to the current legislation on animal experimentation in France. Six months male Wistar rats (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed individually in controlled environmental conditions (room temperature 22°C; 12-h light–dark cycle, light period starting at 8 h), fed *ad libitum* (Vazeille *et al.*, 2008; Vazeille *et al.*, 2012), and given free access to water. After a 3-week adaptation period, rats were anesthetized with forene inhalation and subjected to unilateral hindlimb immobilization via an Orfit-soft plaque (Gibaud). Rats were casted as described previously (Vazeille *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2011; Magne *et al.*, 2012; Vazeille *et al.*, 2012) so that GA and TA muscles were immobilized in a shortened and a lengthened position, respectively. Muscles from the contralateral non-casted leg did not exhibit hypertrophy or atrophy during immobilization due to increased workload or to changes in food intake respectively, as previously described (Vazeille *et al.*, 2008), and served as controls. After 8 days of immobilization (I8, $n = 11$), casts were removed and animals ($n = 10$ -11) were allowed to recover for 1 (R1), 3 (R3), 6 (R6), 8 (R8) and 10 (R10) days. For convenience, muscles that were immobilized between I0 and I8 are named remobilized during the recovery period (R1-R10). A group of non-casted rats was also included (I0, $n = 11$). At the end of the immobilization or recovery periods, animals were euthanized under pentobarbital sodium

anesthesia (50 mg/kg ip). GA and TA skeletal muscles were carefully dissected, weighed, and frozen in liquid nitrogen. A central part of one head of GA and TA muscles was fixed at resting length using Tissue-Tek[®] OCT[™] (Sakura Finetek, France), and then frozen in cooled isopentane (-100°C), and stored at -80°C until histological analyses. The remaining part was finely pulverized in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analyses.

Histological analyses of muscles

Ten- μ m-thick TA and GA cross-sections were performed at -25°C using a cryostat (HM500M Microm International), and stained with Picro-Sirius red, which reveals intramuscular connective tissue (Flint & Pickering, 1984). Observations and image acquisitions were performed using a photonic microscope in bright field mode (Olympus BX-51, Tokyo, Japan), coupled to a high-resolution cooled digital camera (Olympus DP72) and Cell-D software (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). For each muscle section, 3 color images were acquired using a $\times 10$ objective, each image representing a $879 \times 662 \mu\text{m}^2$ field of view. Image analysis was performed using the Visilog 6.9 software (Noesis, France). Briefly, the green component of the initial image was used for higher contrast. Top-hat filtering followed by manual thresholding on gray level allowed segmentation of the connective tissue network (perimysium and endomysium). Measurement of the area of this network was performed by

counting the number of pixels in the resulting binary images, and was expressed in % of the total field area. This connective network is potentially discontinuous because of very low thickness of the endomysium in some area (see Figure 3). Thus, we applied the watershed algorithm to automatically close this network. When necessary, the network was manually outlined. This step results in separating objects corresponding to muscle cells.

RNA extraction and real-time PCR

Total RNA was extracted from TA samples using TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. RNA concentration was determined with a Nanodrop ND 1000 spectrophotometer and the integrity of the RNA was evaluated with a bioanalyzer (Agilent Technologies).

One µg of RNA was treated with DNase I Amp grade (Invitrogen), prior to cDNA Synthesis. Treated RNA was reverse transcribed using random primers and superscript II reverse transcription kit (Invitrogen) according to the manufacturer instructions.

Real time PCR was carried out using the CFX96 Real-time PCR detection system (Biorad). For PCR reactions a master mix of the following reaction components was prepared: 3.6 µl of water, 0.7µl of each forward and reverse primer (10µM), 7 µl of IQ SYBR Green Supermix (BIORAD) and 2 µl of a 50 fold dilution of the reverse transcribed total cDNA. The reaction mixture was initially denatured at 95°C for 3 min then cycled 40 times. In each cycle, the mixture was kept in 95°C for 10 s plus 60°C for 20 s. The PCR reaction was supplemented by a melting curve analysis process in a temperature range from 55°C to 95°C with 0.5°C increments at each step. A negative control without cDNA template was run with every assay to assess the overall specificity. Primers for rat sequences (Table 1) were used and yielded PCR products 100 bp in size. 18S rRNA was also amplified to normalize for mRNA content. The comparative threshold cycle ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method (Livak & Schmittgen, 2001), with 18S rRNA as a reference gene, was used to compare the relative mRNA expression between each group, where the relative mRNA abundance was arbitrarily set to 1 for IO group.

Separation of myosin heavy chain isoforms

Samples of GA and TA from contralateral control and immobilized hindlimbs at each time point were homogenized using a polytron in 10 vol of an ice-cold buffer (pH 7.4) that was

freshly prepared [20 mM Hepes, 50 mM β -glycerophosphate, 100 mM potassium chloride, 50 mM sodium fluoride, 2 mM EGTA, 0.2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM benzamidine, 0.5 mM sodium vanadate, 1 % triton X100, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and proteinase inhibitor cocktail (Sigma, France)]. Homogenates were centrifuged at 14,500 g for 12 min at 4°C. The protein content was determined according to the Bio-Rad Protein Assay kit. Aliquots of supernatants were diluted in Laemmli sample buffer, and stored at -80°C until use.

SDS-PAGE was used to determine the proportion of myosin heavy chain (MyHC) isoforms in muscles as described (Mizunoya *et al.*, 2008b). Briefly, protein extracts from immobilized and contralateral control GA (6 μ g) and TA (3 μ g) were loaded onto 4% w/v acrylamide gel [acrylamide-N,N'-methylenebisacrylamide (Bis) (50:1), 30 % glycerol, 70 mM Tris-HCl (pH 6.7), 4 mM EDTA (pH 7.0), 0.4 % SDS, 0.1 % ammonium persulfate (APS), and 0.05 % N,N'-N,N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)], and then separated on a 8 % w/v acrylamide gel [acrylamide-Bis (99:1), 35 % glycerol, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 M glycine, 0.4 % SDS, 0.1 % APS, and 0.05 % TEMED]. Electrophoresis was performed at 4°C using lower running buffer [Buffer A: 0.05 M Tris-base, 75 mM glycine, and 0.05 % w/v SDS] and upper running buffer [6X Buffer A containing 0.12 % v/v β -mercaptoethanol] at 10 mA for 40 min, and then at 140 V for 15 h. Gels were then incubated in a fixation solution, containing 30 % ethanol and 5 % acetic acid for 20 min, before Coomassie blue R250 (Sigma-Aldrich, France) staining. MyHC isoforms were then quantified by densitometry using Image-Quant TL v7.0 (GE Healthcare Europe GmbH, Uppsala, Sweden).

Apoptotic nuclei quantification

Ten- μ m-thick frozen GA and TA cross sections (cryostat HM500M Microm International) were triple-stained with TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase fluorescein-dUTP

Nick End Labeling) fluorescent detection kit (Roche Applied Science, Meylan, France) (green) to detect apoptotic nuclei, with Hoechst dye 33258 (blue) to verify that TUNEL labeling corresponded to nuclei, and then with laminin-2 α antibody (red, Sigma-Aldrich, France) to distinguish myofiber nuclei from connective tissue nuclei. Briefly, apoptotic nuclei were detected using the TUNEL fluorescent detection kit according to the manufacturer's instructions. For all groups, positive controls were carried out on cross sections after prior incubation with 0.12 μ g/ μ l DNase I (Roche Applied Science, Meylan, France). Negative controls were incubated using labeling solution instead of TUNEL solution. Then, after antigenic site saturation with 10 % goat serum in PBS 1X, sections were incubated with primary anti-laminin-2 α at 1:200 dilution to label myofiber basal lamina (1 h, 37°C), rinsed with PBS 1X (10 min), and then incubated with the secondary antibody conjugated to Dylight 546 (Life Technologies, Saint Aubin, France) at 1:400 dilution (30 min, 37°C). Muscle sections were then washed twice with PBS 1X, incubated for 1 min with Hoechst 33258 (1:10,000 in 1X PBS), and mounted with Fluoromount (Sigma-Aldrich, France). Observations and image acquisitions were performed using a fluorescent microscope (Olympus BX-51) coupled to a high-resolution cooled digital camera (Olympus DP72) and Cell-D software (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). Finally, connective tissue and myofiber apoptotic nuclei were localized after merging images using a dedicated image analysis application developed under the Visilog 6.9 software (Noesis, France). Briefly, the blue-image was filtered and binarized to count automatically all nuclei (fiber nuclei plus connective tissue nuclei). This binary image was displayed in the overlay plan of the red-image to distinguish visually the connective tissue nuclei from the fiber nuclei. Finally, the green-image was also filtered and binarized to detect fluorescent dots corresponding potential apoptotic nuclei. To reduce false positive detection due to the inherent variability of the TUNEL method (Rodriguez & Schaper, 2005), only the centre of gravity of each fluorescent

dot was overlapped and tested for perfect co-localization with both the fiber and connective tissue nuclei. Hence, the proportion of apoptotic nuclei (%) in fiber and in connective tissue were deducted with confidence and for a representative population.

Measurement of proteasomes and apoptosome activities

Samples of GA and TA from immobilized and contralateral control hindlimbs were homogenized in 10 vol of an ice-cold buffer (pH 7.5) [50 mM Tris-HCL, 250 mM sucrose, 10 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, and proteinase inhibitors (10 µg/ml antipain, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin, 0.2 mM PMSF)]. Apoptosome complexes co-sediment with proteasomes (Cain *et al.*, 1999) and the apoptosome-linked caspase 9 activity co-eluates with peptidase activities of the proteasome on 10-40 % sucrose gradients (Cain *et al.*, 1999; Vazeille *et al.*, 2008). Apoptosome complexes and proteasomes were therefore isolated by three sequential centrifugations as described (Fang *et al.*, 2000). Briefly, extracts were centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4°C. Supernatants were then centrifuged at 100,000 g for 1 h at 4°C. The resulting supernatants were finally centrifuged at 100,000 g for 5 h at 4°C. The resulting protein pellets were resuspended in 150 µl of a buffer containing glycerol (20 %), 50 mM MgCl₂ and 5 mM Tris-Cl (pH 7.5) (Buffer B). Protein concentration was determined on these resuspended pellets using the Bio-Rad protein assay kit.

The proteasome chymotrypsin- and trypsin-like activities, and the apoptosome-linked caspase 9 activity were determined by measuring the hydrolysis of the fluorogenic substrates succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC), succinyl-Leu-Arg-Arg-AMC (LRR-AMC), and N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (LEHD-AMC) (Enzo Life Sciences, France), respectively. Five µl (~15 µg proteins) of the resuspended pellets from GA or TA respectively were diluted in 15 µl of Buffer B and added to 60 µl of a reaction buffer [50 mM Tris-Cl (pH 8), 11.25 mM MgCl₂, 1.25 mM DTT, 0.01 U apyrase]

containing either 300 μ M LLVY-AMC or 800 μ M LRR-AMC to measure the proteasome chymotrypsin- and trypsin-like activities, respectively. To measure the apoptosome-linked caspase 9 activity, 25 μ l (~75 μ g of proteins) of the resuspended pellets were diluted to 50 μ l in Buffer B, and then incubated with 50 μ l of a reaction buffer [100 mM Pipes (pH 6.5), 0.2 mM EDTA, 5 mM DTT], and containing 100 μ M LEHD-AMC (Enzo Life Sciences, France). Preliminary experiments were performed to ensure that the caspase 9 assay does not detect the activity of the caspase site of the proteasome. In addition, pilot experiments were performed with or without inhibitors of the chymotrypsin-like (40 μ M MG132, Enzo Life Sciences, France), the trypsin-like (100 μ M MG132), and the caspase 9 (50 μ M LEHD-CHO, Enzo Life Sciences, France) activities to ensure full inhibition. Activities were determined by measuring the accumulation of the fluorogenic cleavage product (AMC) using a luminescence spectrometer FLX800 (Biotek, USA) during 45 min at 380 nm excitation wavelength and 440 nm emission wavelength. Then, the activities were determined by calculating the difference between arbitrary fluorescence units recorded with or without the specific inhibitor in the reaction medium. The final data were corrected by the amount of protein. The time course for the accumulation of AMC after hydrolysis of the substrate was analyzed by linear regression to calculate activities, i.e. the slopes of best fit of accumulation AMC vs. time.

MuRF-1 protein content

The expression of the MuRF-1 E3 ubiquitin ligase was assessed by immunoblotting. Seventy five μ g of the total protein extract obtained as described above (see separation of MyHC isoforms) were separated by SDS-PAGE on a 12 % acrylamide gel (acrylamide-bis (29:1)), and then transferred on nitrocellulose membranes (Li-Cor Biosciences, ScienceTec, Courtaboeuf, France). The antibody against MuRF-1 (R&D Systems, MN, USA) was used at a 1:200 dilution. Immunoblots were revealed using the Li-Cor Odyssey (Li-Cor Biosciences)

procedures after pre-incubation with a fluorescent labeled secondary antibody (IRDye[®] 800CW Donkey Anti-Goat IgG (Li-Cor Biosciences) used at a 1:3,000 dilution. The densitometry was performed using the Odyssey 2.1 software (Li-Cor Biosciences).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistical Analysis Systems 9.1 procedures (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data were analyzed for normality and equal variances. No set of data was transformed for non-normality distribution. In a first step, data were analyzed by three-way ANOVA (GLM SAS Procedure) for the fixed effects of muscle (GA, TA), immobilization, and stage of immobilization and recovery (I0 up to R10). A strong interaction “muscle×stage” appeared with nearly whole of the variables ($P < 0.001$). Consequently in a second step statistical analyses were performed within each muscle (GA or TA) by two-way ANOVA for the effects of immobilization and stage of immobilization-recovery and their interactions. In these analyses an animal effect (paired effect), nested within the stage of immobilization-recovery was introduced to take into account the fact that the Con and Imm muscles were sampled from the same animal. Multiple comparisons of adjusted means were based on Tukey’s test. Level of significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Animal characteristics

Food intake decreased by 15 % ($P < 0.05$) in casted rats between I0 and I8, and returned progressively to initial I0 values 6 days after cast removal (R6, Fig. 1A). By contrast, body weight slightly decreased by about 7% at R6 compared to I0 ($P < 0.05$, Fig. 1B).

Gastrocnemius and tibialis anterior muscle atrophy during immobilization and early recovery

Figure 2 shows that immobilized GA and TA muscles atrophied respectively by 22 % ($P < 0.001$) and 7 % ($P < 0.05$) at I8 compared to contralateral control muscles. Immediately after cast removal, the atrophy stabilized and remained constant in the remobilized GA compared to contralateral controls from R1 to R10 ($P < 0.001$). By contrast, the remobilized TA further atrophied by 15 % at R1 ($P < 0.001$), by 32% at R6 ($P < 0.001$), and then start to improve at R8 and R10 (-26%, $P < 0.001$), compared to contralateral controls. Thus, the worsening of the remobilized TA occurs very early pending cast removal (Fig. 2).

Connective tissue area alterations in gastrocnemius and tibialis anterior muscles during immobilization and early recovery

We hypothesized that the lengthened TA may exhibit extensive connective tissue damages compared to the shortened GA in the immobilization period. Therefore, we used Sirius Red staining (Fig. 3A) to assess such changes in connective tissue (CT) area in both muscles during the whole kinetic studied. CT area increased similarly between immobilized and contralateral control GA and TA at I8 (+22 % and +14%, respectively, $P < 0.05$), and remained elevated until R10 in both remobilized muscles (GA: +28 % and TA: +32 %, $P < 0.05$) (Fig. 3B). By contrast, there were significant differences between muscles when compared to I8. In the GA, there was no significant change in the CT area after cast removal between I8 and R10. However, CT area further increased in remobilized TA starting at R6 when compared to I8. Thus, an additional thickening of CT prevailed during early recovery in the remobilized TA, but not in the GA.

We next investigated changes in mRNA levels for some major collagens, MMPs (i.e. Matrix MetalloProteinases, which degrade collagens) and TIMPs (i.e. Tissue Inhibitors of

Metalloproteinases) in the TA (Figure 4). mRNA levels for Col IA1 (i.e. the major component of type I collagen) tended to be elevated in immobilized TA (+200 %, $P = 0.14$) compared to I0 group, and further increased during remobilization at R1, R6 and R10 by 5-7.5 fold ($P < 0.05$). Levels of mRNA encoding Col XII, which interacts with type I containing fibrils, also increased in immobilized (I8, +280 %, $P < 0.05$) and remobilized (R1, +500 %, $P < 0.05$) TA, when compared to I0 group. Similarly, mRNA levels for Col XVIII and Col IVA1 were elevated in the immobilized TA at I8 (+116 % and 92 %, respectively, $P < 0.05$), and remained high in the remobilized TA at R1 (+167 % and 62 %, respectively, $P < 0.05$) compared to I0 group. Col XII, Col IVA1 and Col XVIII mRNA levels returned progressively to basal levels at R6 and R10, while expression of Col IA1 remained high until R10 (+530 %, $P < 0.05$). mRNA levels for MMP-2 and -14 did not change in the immobilized TA at I8, but increased at R1 (+217 % and 192 %, respectively, $P < 0.05$) compared to I0 group, and then returned progressively to basal values at R10. TIMP-1 and -2 mRNA levels increased in the immobilized TA at I8 by ~30 and ~2 fold, respectively, remained elevated in the remobilized TA at R1 and returned to basal levels at R6.

Distribution of MyHC isoforms in gastrocnemius and tibialis anterior muscles during immobilization and early recovery

The distribution of myosin heavy chain (MyHC) isoforms was investigated after separation of type I, IIb, IIx, and IIa MyHC by SDS-PAGE (Fig. 5A) in TA and GA during immobilization and subsequent recovery. The proportion of these MyHC isoforms did not change in immobilized and remobilized GA compared to contralateral controls, except at the very end of the recovery period studied (R8 and R10) (Fig. 5B-E).

There were significant differences between immobilized and contralateral control TA for all MyHC isoforms during immobilization and recovery periods, except for type I and type IIa

MyHC at R1. In the immobilized TA, the proportion of type IIb MyHC isoforms decreased (-14 %, $P < 0.05$) concomitantly with an increase of type I (+211 %), type IIx (+24 %) and type IIa (+84 %) at I8 compared to contralateral control muscles (Fig. 5B-E). These changes worsened during recovery, particularly at R6 and R8.

Altogether, these data suggest pronounced and sustained modifications of the TA contractile properties during remobilization.

Regulation of the Ub-proteasome dependent pathway and autophagy in gastrocnemius and tibialis anterior muscle during immobilization and early recovery

To test whether the UPS was involved in the worsening of the TA atrophy after cast removal, we next measured (i) the protein and mRNA expression of the muscle specific E3 ligases MAFbx/Atrogin-1 and MURF1, which polyubiquitinates specific contractile proteins (Clarke *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2009; Polge *et al.*, 2011), and (ii) the chymotrypsin- and trypsin-like activities of the proteasome involved in their breakdown.

Figure 6 shows that MURF1 protein levels increased in immobilized GA at I8 (+81 %, $P < 0.05$ vs. contralateral controls), and remained elevated when remobilized until R8 (+40-48 %, $P < 0.05$ vs. contralateral controls). The increase in MURF1 protein levels was more pronounced in immobilized TA muscles at I8 (+158 %, $P < 0.05$ vs. contralateral controls), remained elevated when remobilized at R1 and R3 (+150 % and +147 % respectively, $P < 0.05$ vs. contralateral controls), and then declined progressively from R6 (+76 %, $P < 0.05$ vs. contralateral controls) until R10 (n.s.). Figure 7 shows that MURF1 and MAFbx/Atrogin-1 mRNA levels also increased at I8 in the immobilized GA (+485 and 270% respectively, $P < 0.05$ vs. contralateral controls), and were normalized at R6. By contrast, mRNA levels for MURF1 and MAFbx/Atrogin-1 did not change at I8 in the immobilized TA, but increased at R1 (~+90 %, $P < 0.05$ vs. contralateral controls), and then returned to basal levels at R6.

The proteasome chymotrypsin-like activity significantly increased in remobilized GA muscle only at R1 and R3 (+28 % and +46 %, respectively, $P < 0.005$ vs. contralateral controls) (Fig. 8A). The trypsin-like activity followed a similar pattern (Fig. 8B).

By contrast, both chymotrypsin- and trypsin- like activities increased markedly in immobilized TA at I8 (+113% and +122 % respectively, $P < 0.001$ vs. contralateral controls), and remained elevated until R10 (+112 % and +67 % respectively, $P < 0.005$ vs. contralateral controls) (Fig. 8). Altogether, the UPS was activated very early in remobilized muscles and this activation was more pronounced and persistent in the TA than in the GA.

The role of autophagy in muscle atrophy and recovery pending immobilization has been assessed by measurement of mRNA levels for cathepsin L, LC3b, and beclin-1. Figure 9 shows that cathepsin L mRNA levels increased in both immobilized GA and TA compared to contralateral muscles at I8 (+300 and 160% respectively, $P < 0.001$ vs. contralateral controls) and R1 (+400 and 210% respectively, $P < 0.001$ vs. contralateral controls), and returned to basal levels at R6. mRNA levels for LC3b increased only in the GA at I8 (+350%, $P < 0.001$ vs. contralateral controls), and returned to basal levels immediately after cast removal. mRNA for Beclin-1 increased at I8 and R1 (~+200%, $P < 0.001$ vs. contralateral controls) in the immobilized and remobilized GA respectively. By contrast, they increased at R6 (+260%, $P < 0.001$ vs. contralateral controls) and R10 (+60%, $P < 0.001$ vs. contralateral controls) in the remobilized TA.

Regulation of apoptosis in gastrocnemius and tibialis anterior muscles during immobilization and early recovery

We next investigated the role of the mitochondria-associated apoptotic pathway during early recovery. Figure 10 shows that apoptosome linked-caspase 9 activity increased only in the remobilized GA at R1 (+31 %, $P < 0.05$ vs. contralateral controls), as did proteasome

activities (Fig. 8). In the immobilized TA muscle, this activity was enhanced at I8 (+79 %, $P < 0.05$ vs. contralateral controls), and remained elevated when remobilized until R8 (+149 %, $P < 0.001$ vs. contralateral controls), except at R1 (+33 %, n.s.).

These data suggest that apoptosis was also enhanced to a greater extent in the TA than in the GA during both immobilization and recovery periods. We thus investigated whether the proportion of apoptotic nuclei was different in both muscles at I8 (i.e. at the end of the immobilization period) and at R6 (i.e. at the time point of maximal TA atrophy (Fig. 2) and of connective tissue alterations (Fig. 3B)). It was previously suggested that apoptosis does not occur within fibers undergoing atrophy during disuse, but is more likely confined to stromal and satellite cells (Bruusgaard & Gundersen, 2008). Therefore, we assessed whether apoptosis may be specifically altered in the extracellular compartment. Myofiber and connective tissue (CT) apoptotic nuclei were localized after triple labeling of GA and TA muscle cross sections. The proportion of apoptotic nuclei did not change either in fiber or in the CT compartment in immobilized GA muscle compared to contralateral controls at I8 or at R6 (data not shown). By contrast, Figure 11 shows that the proportion of apoptotic nuclei from immobilized (I8) and remobilized (R6) TA increased only within the CT compartment (+158 % and +200 %, respectively, $P < 0.01$ vs. contralateral controls). Altogether, these data suggest a more pronounced and sustained activation of the apoptosome linked-caspase 9 activity, as well as an increase of connective tissue apoptotic nuclei in the TA vs. the GA.

Discussion

This study aimed to characterize the mechanisms responsible for the worsening of TA atrophy during early recovery following immobilization. We show that this worsening i) occurred very early after cast removal, ii) correlated with a redistribution in MyHC isoforms, and iii) was associated with a sustained activation of both the UPS and apoptosome during early

recovery. Furthermore, this worsening was associated with iv) pronounced muscle connective tissue thickening, v) sustained increased expression of the major fibrillar collagen I, and vi) transient increased of other collagens and markers of connective tissue remodeling. Finally, vii) increased nuclear apoptosis only prevailed in the connective tissue compartment.

We hypothesized that the early and pronounced worsening of TA atrophy after cast removal presumably implies or results from a large remodeling of muscle fibers. Our observations support this hypothesis. Myosins are major contractile proteins and the proportion of MyHC isoforms is crucial for muscle metabolic and contractile properties. We report that the proportion of the type IIb MyHC isoform decreased while other isoforms increased in the immobilized TA, as already reported in the unloaded TA (Cornachione *et al.*, 2011). Our data further show that these changes worsened in the remobilized TA starting at R6, when TA muscle atrophy peaked at a maximum. Altogether, this suggests a transition of muscle fiber metabolic and contractile properties, from fast-twitch glycolytic to slow-twitch oxidative, which worsened during early recovery. This transition may influence TA atrophy during immobilization and the subsequent recovery, as fibers expressing mainly type I MyHC seem to be a primary target for proteolysis, at least during unloading (Baldwin & Haddad, 2002).

The present study also shows that skeletal muscle atrophy was associated with an increase in muscle connective tissue in both immobilized GA and TA compared to control muscles at the end of the immobilization period. This is in accordance with previous studies during cast immobilization or unloading (Jozsa *et al.*, 1990; Lapier *et al.*, 1995; Jarvinen *et al.*, 2002; Mattiello-Sverzut *et al.*, 2006). During recovery, an additional thickening of connective tissue was observed only in the remobilized TA muscle. This modification peaked at R6, when TA muscle atrophy worsening was at a maximum. Whether there is a causal relationship between

muscle connective tissue thickening and muscle atrophy is unclear. However, the expression of specific collagens and of TIMPs increased in the immobilized TA, without any change in MMP mRNA levels, suggesting enhanced collagen synthesis and inhibition of collagen breakdown that both contributed to collagen deposition. Interestingly, although MMP mRNA levels increased in the recovery period, TIMP-1 and -2 also increased in parallel (Fig. 4). Furthermore, the expression of the major fibrillar collagen I was enhanced during early TA remobilization. Therefore, the thickening of the TA connective tissue during remobilization (Fig. 3B) results from complex modifications of the equilibrium between collagen synthesis and breakdown. Altogether, connective tissue thickening may either impair muscle function and/or alter signal transduction from the extracellular compartment to myofibers. The stiffness of the extracellular compartment may be modified, influencing signal transduction to muscle fibers, and proteolytic and apoptotic pathways. In fact, ECM molecules include transmembrane proteins (i.e. integrins) that can associate with scaffold proteins and control intracellular signaling pathways potentially regulating muscle protein turnover (i.e. PI3K/Akt, p38) and/or apoptosis (Bornstein & Sage, 2002; Aszodi *et al.*, 2006).

Furthermore, we report here that the increased apoptotic nuclei in the TA muscle was restricted to the connective tissue compartment during immobilization. Previous studies suggested that apoptosis mainly occurs in the interstitial compartment in several models of atrophy, including disuse (Sandri *et al.*, 1998; Vescovo *et al.*, 1998). In addition, when co-stained for laminin and dystrophin, virtually none of the TUNEL-positive nuclei could be classified as myonuclei in denervation atrophy and unloading, but apoptosis was confined to stromal and satellite cells (Bruusgaard & Gundersen, 2008). Accordingly, our study shows that immobilization neither decreased the number of myonuclei (data not shown), nor increased the number of apoptotic nuclei within the myofibers. In addition, we report that apoptotic nuclei increased only in the connective tissue compartment of the immobilized and

remobilized TA. The nature of cells undergoing apoptosis remains to be elucidated. However, it may include fibroblasts, macrophages and/or leukocytes, satellite cells, and/or endothelial cells. The localization of TUNEL positive nuclei outside the basal lamina suggests that stromal cells (i.e. fibroblasts and endothelial cells) may undergo apoptosis. The reported local inflammatory response in immobilized muscles from aged rats (Magne *et al.*, 2011) may result from an invasion by macrophages and/or leukocytes, which may also undergo apoptosis. This may influence protein turnover and thus muscle atrophy and recovery. We cannot exclude that activated satellite cells may migrate across basal lamina (Hughes & Blau, 1990) and could also contribute to apoptosis. Changes in satellite cells proliferating activity or apoptosis occurred differentially in fast- and slow-twitch muscles (Hawke & Garry, 2001), suggesting a relation between satellite cell functions and fiber type transition. In addition, muscle fibers may regenerate from intrinsically different satellite cells in "fast" and "slow" muscle following denervation (Kalhovde *et al.*, 2005). The role of different extrinsic factors arising in extracellular matrix or from muscle position and usage in the limb has not been excluded. Taken together, this suggests that muscle fiber type transition that prevails in immobilized and remobilized TA muscle could be a secondary response of satellite cell impairment. The greater thickening of connective tissue in the TA during remobilization may influence the composition and structure of the collagen network, leading to disorganization of the extracellular matrix and the apoptosis of some specific cells in that compartment. Altogether, this may impact muscle protein turnover, regeneration processes, connective tissue remodeling, and microvascularisation.

Increased apoptosis correlated with pronounced apoptosome activation in the immobilized TA, which remained elevated when remobilized. This is in accordance with previous work in immobilization and long term recovery (Vazeille *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2011; Vazeille *et al.*, 2012). We also report here a concomitant activation of the UPS in immobilized muscles

as previously reported in the GA (Vazeille *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2011; Vazeille *et al.*, 2012).

However, there was no change in mRNA levels for MURF1 and MAFbx in the TA during immobilization, whereas protein levels for MURF1 increased. In addition, mRNA levels for these E3s transiently increased at R1 in the remobilized TA and were rapidly normalized at R6, whereas protein levels remained elevated until R8. This may result from differences in the half-lives of mRNA and proteins as reported (Schwanhaeusser *et al.*, 2011), and suggested that post-translational modifications may play key roles in the control of the activity of the UPS and thus of muscle atrophy. Our data also suggest that autophagy may be enhanced in the GA during immobilization contributing to muscle atrophy at I8. However, Beclin-1 and LC3b, which are required for autophagosome formation (Zhong *et al.*, 2009), did not change in the immobilized TA, but increased at the mRNA level only from R6, when the worsening of TA muscle atrophy peaked at a maximum. Altogether, this suggested that autophagy may be induced in the remobilized TA after the large initial remodeling for restoring muscle mass and myofibre integrity, by elimination of deficient organelles for example (Masiero *et al.*, 2009).

Our data show that the shortened immobilized GA atrophied more than the lengthened immobilized TA at I8, in agreement with previous reports (Goldspink, 1977; Booth, 1982; Vazeille *et al.*, 2008; Fujita *et al.*, 2009). However, there was a greater activation of the proteasome-dependent pathway in the TA than in the GA at I8, but we cannot exclude that the GA atrophy reflected an activation of this pathway at earlier points of immobilization, as reported by Lang *et al.* (27). The position of immobilization also influences muscle protein turnover. Proteolysis was enhanced to a greater extent in lengthened immobilized muscles compared to shortened immobilized ones (Goldspink, 1977). This is in agreement with our observations of a much more pronounced activation of the UPS pathway during

immobilization in the lengthened TA compared to the shortened GA. Furthermore, protein synthesis is reduced in shortened immobilized muscles, but stimulated in lengthened immobilized ones (Goldspink, 1977; Lang *et al.*, 2012b). Therefore, the greater atrophy of the GA muscle during immobilization may also result from decreased protein synthesis.

During remobilization both apoptosome and proteasome activities were much more increased in the TA than in the GA, as did protein levels of the muscle-specific E3 ligase MURF-1. These data support that the increased activity of the UPS and perhaps apoptosis contributed to the worsening of the wasting of the remobilized TA, at least up to R6. However, the pattern of changes in MURF1 levels and proteasome activities are clearly different. Such measurements are static and do not necessarily strictly correlate. Interestingly, MURF1 protein levels remained highly enhanced at R1 and R3 (Fig. 5) when the remobilized TA dramatically atrophied (Fig. 2), and then decreased when muscle mass stabilized. This is in line with the critical role of MURF1 in the breakdown of the major contractile proteins (Clarke *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2009; Polge *et al.*, 2011). The prolonged activation of proteasome activities in the remobilized TA presumably reflected the remodelling of MyHC isoforms since only the proteasome is responsible for the breakdown of myofibrillar proteins. However, there was no strict correlation between the extent of muscle loss and MURF1 expression or proteasome activities. Altogether, this suggests that changes in protein synthesis may also contribute to the alteration of muscle size.

In conclusion, the position of immobilization influences both overall rates of protein turnover and structural properties of skeletal muscle (Goldspink, 1977; Mattiello-Sverzut *et al.*, 2006). TA and GA muscles are located in the anterior and posterior hindlimb compartment, and were immobilized in a lengthened and shortened position, respectively. We clearly show for the first time that the TA further atrophies very rapidly upon remobilization, pending sustained

activation of the UPS and/or apoptosis. Our data show that during the immobilization period muscle lengthening prevented muscle loss, but impacted the subsequent muscle recovery, because of sustained alterations in proteolysis, apoptosis and in ECM structure and composition. Whether manipulating the UPS and/or apoptosis may improve muscle recovery in such conditions remains to be experimentally demonstrated.

Acknowledgements

We thank Arlette Cissoire, Benoit Cohade, and Philippe Lhoste from the UEN (INRA Clermont-Ferrand-Theix, France) for excellently assisting with animal care. We are grateful to Marianne Jarzaguët and Cécile Coudy for their help during animal slaughtering and for sample care. We also thank i) Agnès Claustre for help with proteasome and apoptosome activity measurements, ii) Christiane Barboiron, David Chadeyron, and Jean-Luc Montel for help with myosin heavy chain isoform quantification, and iii) Christiane Deval, Geneviève Gentes, and Jean-Yves Exposito for q-RTPCR measurements.

Grants

This study was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique, the Association Française contre les Myopathies, and the Société Française de Nutrition. LS was supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

1. Conception and design of the experiments: AL, LC, LS
2. Collection, analysis and interpretation of data: AL, BM, BP, DM, DT, GD, JA, LC, LS
3. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content: AL, BM, CP, DA, DB, DD, DM, DT, LC, LS

Reference List

1. **Alway S, Martyn J, Ouyang J, Chaudhrai A, and Murlasits Z.** Id2 expression during apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R540-R549, 2003.
2. **Andrianjafiniony T, Dupre-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H, and Desplanches D.** Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *A J Physiol Cell Physiol* 299: C307-C315, 2010.
3. **Aszodi A, Legate KR, Nakchbandi I, and Faessler R.** What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. In: *Ann Review Cell Dev Biol*, 2006, p. 591-621.
4. **Attaix D, Ventadour S, Codran A, Bechet D, Taillandier D, and Combaret L.** The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. In: *Essays in Biochemistry, Vol 41: The Ubiquitin-Proteasome System*, edited by Mayer RJLR, 2005, p. 173-186.
5. **Baldwin KM and Haddad F.** Skeletal muscle plasticity - Cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehab* 81: S40-S51, 2002.
6. **Berthon P, Duguez S, Favier F, Amirouche A, Feasson L, Vico L, Denis C, and Freyssenet D.** Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. *Pflug Arch Eur J Physiol* 454: 625-633, 2007.
7. **Bodine S, Latres E, Baumhueter S, Lai V, Nunez L, Clarke B, Poueymirou W, Panaro F, Na E, Dharmarajan K, Pan Z, Valenzuela D, DeChiara T, Stitt T, Yancopoulos G, and Glass D.** Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294: 1704-1708, 2001.
8. **Booth F.** Effect of limb immobilization on skeletal-muscle *J Appl Physiol* 52: 1113-1118, 1982.

9. **Bornstein P and Sage E.** Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14: 608-616, 2002.
10. **Bruusgaard JC and Gundersen K.** In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *J Clin Invest* 118: 1450-1457, 2008.
11. **Cain K, Brown D, Langlais C, and Cohen G.** Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (similar to 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 274: 22686-22692, 1999.
12. **Charge SBP and Rudnicki MA.** Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84: 209-238, 2004.
13. **Clarke B, Drujan D, Willis M, Murphy L, Corpina R, Burova E, Rakhilin S, Stitt T, Patterson C, Latres E, and Glass D.** The E3 ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 6: 376-385, 2007.
14. **Cohen S, Brault J, Gygi S, Glass D, Valenzuela D, Gartner C, Latres E, and Goldberg A.** During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol* 185: 1083-1095, 2009.
15. **Cornachione A, Cacao-Benedini L, Martinez E, Neder L, and Mattiello-Sverzut A.** Effects of eccentric and concentric training on capillarization and myosin heavy chain contents in rat skeletal muscles after hindlimb suspension. *Acta Histochem* 113: 277-282, 2011.
16. **Cornachione A, Cacao-Benedini L, Shimano M, Volpon J, Martinez E, and Mattiello-Sverzut A.** Morphological comparison of different protocols of skeletal muscle remobilization in rats after hindlimb suspension. *Scand J Med Sci Sports* 18: 453-461, 2008.
17. **Evans WJ.** Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin Nutr* 91: 1123S-1127S, 2010.

18. **Fang C, Sun X, Li B, Fischer D, Pritts T, Penner G, and Hasselgren P.** Burn injuries in rats upregulate the gene expression of the ubiquitin-conjugating enzyme E2(14k) in skeletal muscle. *J Burn Care Rehab* 21: 528-534, 2000.
19. **Flint F and Pickering K.** Demonstration of collagen in meat-products by an improved picro-sirius red polarization method. *Analyst* 109: 1505-&, 1984.
20. **Fujita N, Fujimoto T, Tasaki H, Arakawa T, Matsubara T, and Miki A.** Influence of muscle length on muscle atrophy in the mouse tibialis anterior and soleus muscles. *Biomed Res* 30: 39-45, 2009.
21. **Goldspink D.** Influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal-muscle. *J Physiol* 264: 267-282, 1977.
22. **Guillot C, Steinberg J, Delliaux S, Kipson N, Jammes Y, and Badier M.** Physiological, histological and biochemical properties of rat skeletal muscles in response to hindlimb suspension. *J Electromyogr Kinesiol* 18: 276-283, 2008.
23. **Gustafsson T, Osterlund T, Flanagan J, von Walden F, Trappe T, Linnehan R, and Tesch P.** Effects of 3 days unloading on molecular regulators of muscle size in humans. *J Appl Physiol* 109: 721-727, 2010.
24. **Hawke TJ and Garry DJ.** Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91: 534-551, 2001.
25. **Heng A, Ventadour S, Jarzaguet M, Pouch-Pelissier M, Guezennec C, Bigard X, Attaix D, and Taillandier D.** Coordinate expression of the 19S regulatory complex and evidence for ubiquitin-dependent telethonin degradation in the unloaded soleus muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2544-2552, 2008.
26. **Hughes SM and Blau HM.** Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal-muscle development. *Nature* 345: 350-353, 1990.

27. **Jarvinen T, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen T, and Jarvinen M.** Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles - An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil* 23: 245-254, 2002.
28. **Jones S, Hill R, Krasney P, O'Conner B, Peirce N, and Greenhaff P.** Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *Faseb J* 18: 1025-+, 2004.
29. **Jozsa L, Kannus P, Thoring J, Reffy A, Jarvinen M, and Kvist M.** The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective-tissue - a morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br* 72: 293-297, 1990.
30. **Kalhovde JM, Jerkovic R, Sefland I, Cordonnier C, Calabria E, Schiaffino S, and Lomo T.** 'Fast' and 'slow' muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. *J Physiol* 562: 847-857, 2005.
31. **Lang SM, Kazi AA, Hong-Brown L, and Lang CH.** Delayed recovery of skeletal muscle mass following hindlimb immobilization in mTOR heterozygous Mice. *PloS one* 7: e38910, 2012.
32. **Lapier T, Burton H, Almon R, and Cerny F.** Alterations in intramuscular connective-tissue after limb casting affect contraction-induced muscle injury. *J Appl Physiol* 78: 1065-1069, 1995.
33. **Livak KJ and Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
34. **Magne H, Savary-Auzeloux I, Migné C, Peyron MA, Combaret L, Rémond D, and Dardevet D.** Contrarily to whey and high protein diets, dietary free leucine supplementation cannot reverse the lack of recovery of muscle mass after prolonged immobilization during ageing. *J Physiol* 590.8: 2035-2049, 2012.

35. **Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Claustre A, Attaix D, Anne L, Sante-Lhoutellier V, Gatellier P, Dardevet D, and Combaret L.** Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways. *J Physiol* 589: 511-524, 2011.
36. **Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S, and Sandri M.** Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 10: 507-515, 2009.
37. **Mattiello-Sverzut A, Carvalho L, Cornachione A, Nagashima M, Neder L, and Shimano A.** Morphological effects of electrical stimulation and intermittent muscle stretch after immobilization in soleus muscle. *Histol Histopathol* 21: 957-964, 2006.
38. **Mizunoya W, Wakamatsu J, Tatsumi R, and Ikeuchi Y.** Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Analytical Biochem* 377: 111-113, 2008.
39. **Ogata T, Machida S, Oishi Y, Higuchi M, and Muraoka I.** Differential cell death regulation between adult-unloaded and aged rat soleus muscle. *Mech Ageing Dev* 130: 328-336, 2009.
40. **Polge C, Heng A, Jarzaguët M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L, Bechet D, Matondo M, Uttenweiler-Joseph S, Monsarrat B, Attaix D, and Taillandier D.** Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *Faseb J* 25: 3790-3802, 2011.
41. **Reich K, Chen Y, Thompson P, Hoffman E, and Clarkson P.** Forty-eight hours of unloading and 24 h of reloading lead to changes in global gene expression patterns related to ubiquitination and oxidative stress in humans. *J Appl Physiol* 109: 1404-1415, 2010.
42. **Rodriguez M and Schaper J.** Apoptosis: measurement and technical issues. *J Mol Cell Cardiol* 38: 15-20, 2005.

43. **Sandri M, Minetti C, Pedemonte M, and Carraro U.** Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. *Lab Invest* 78: 1005-1016, 1998.
44. **Schwanhaeuser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, and Selbach M.** Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473: 337-342, 2011.
45. **Taillandier D, Aurousseau E, MeynialDenis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P, Ducastaing A, Bigard X, Guezennec C, Schmid H, and Attaix D.** Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J* 316: 65-72, 1996.fr
46. **Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Attaix D, and Combaret L.** The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1181-E1190, 2008.
47. **Vazeille E, Slimani L, Claustre A, Magne H, Labas R, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Astruc T, Attaix D, and Combaret L.** Curcumin treatment prevents increased proteasome and apoptosome activities in rat skeletal muscle during reloading and improves subsequent recovery. *J Nutr Biochem* 23: 245-251, 2012.
48. **Vescovo G, Zennaro R, Sandri M, Carraro U, Leprotti C, Ceconi C, Battista G, Ambrosio B, and Dalla Libera L.** Apoptosis of skeletal muscle myofibers and interstitial cells in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2449-2459, 1998.
49. **Willems MET, Miller GR, Stauber FD, and Stauber WT.** Effects of repeated lengthening contractions on skeletal muscle adaptations in female rats. *J Physiol Sci* 60: 143-150, 2010.

50. **Zhong H, Roy R, Woo J, Kim J, and Edgerton V.** Differential modulation of myosin heavy chain phenotype in an inactive extensor and flexor muscle of adult rats. *J Anat* 210: 19-31, 2007.
51. **Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, and Yue Z.** Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 11: 468-U262, 2009.

Figure legends

Fig. 1. Food intake and body weight of rats during immobilization and recovery

Food intake (A) and body weight (B) are expressed in g/day and g, respectively. I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data are means $\pm$ SE (vertical bars) for $n=10-11$ rats. Differences during immobilization and recovery were assessed by ANOVA (* $P < 0.05$ vs. I0).

Fig. 2. Immobilization induced-muscle atrophy worsened rapidly after cast removal in the tibialis anterior

Muscle atrophy is expressed in % difference from the contralateral control leg. I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Values are means $\pm$ SE (vertical bars) for $n = 10-11$ rats. Statistical differences were assessed by ANOVA. * $P < 0.05$ vs. contralateral controls; Bars with different letters within a given muscle are significantly different.

Fig. 3. Changes in connective tissue area worsened after cast removal in the tibialis anterior

(A) Gastrocnemius and tibialis anterior muscles were stained for connective tissue area with Sirius red. (B) Image analysis of connective tissue area from immobilized (open circles, Imm) and contralateral control (filled squares, Con) muscles was performed as described in Methods. I0, non-casted controls; I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Values are means $\pm$ SE (vertical bars) for $n = 8$ rats. * $P < 0.05$ vs. contralateral controls and vs. I0 group; $^{\S}P < 0.05$ vs. I8 for the same leg treatment.

Fig. 4. Changes in mRNA levels for some major collagens, matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibitors (TIMPs) in the immobilized and remobilized TA

mRNA levels for Collagen IA1 (Col IA1), Col XII, Col XVIII, Col IVA1, MMP-2 and -14, and TIMP-1 and -2 were measured by q-RT-PCR (see Methods) in immobilized (open circles, Imm) and contralateral control (filled squares, Con) TA muscles. I0, non-casted controls; I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data were normalized using 18S rRNA and are expressed as fold induction compared to I0 group. Data are means $\pm$ SE for n=4-5 rats. * $P < 0.05$ vs. contralateral controls; # $P < 0.05$ vs. I0 group; § $P < 0.05$ vs. I8 for the same leg treatment.

Fig. 5. Changes in Myosin Heavy Chain (MyHC) isoform distribution worsened after cast removal in the tibialis anterior

(A) MyHC isoforms from gastrocnemius (GA) and tibialis anterior (TA) muscles were separated by SDS-Page electrophoresis (see Methods). Quantification of type I (B), IIb (C), IIx (D), and IIa (E) MyHC isoforms was performed by densitometric analysis in immobilized (open circles, Imm) and contralateral control (filled squares, Con) GA and TA muscles. I0, non-casted controls; I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data are expressed in % of total MyHC and are means $\pm$ SE for n=10-11 rats. * $P < 0.05$ vs. contralateral controls; § $P < 0.05$ vs. I8 for the same leg treatment.

Fig. 6. MURF1 E3 ligase protein levels increased in tibialis anterior and gastrocnemius muscles during immobilization and after cast removal

(A) MURF1 protein levels were assessed in contralateral controls or immobilized gastrocnemius (GA) and tibialis anterior (TA) muscles by immunoblotting as described in Methods. (B) Signals were quantified using the Image J (version 1.42q) software, and

normalized against the amount of proteins (determined following Ponceau Red staining) to correct for uneven loading. I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data are expressed in % difference from contralateral control leg and are means $\pm$ SE (vertical bars) for n=8 rats. * $P < 0.05$ vs. contralateral controls.

Fig. 7. Changes in mRNA levels for MURF1 and MAFbx/atrogen-1 in tibialis anterior and gastrocnemius muscles during immobilization and after cast removal

mRNA levels for MURF1 and MAFbx were measured by q-RTPCR (see Methods) in immobilized and contralateral control gastrocnemius (GA) and tibialis anterior (TA) muscles. I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data were normalized using 18S rRNA, are expressed as % difference from contralateral control leg, and are means $\pm$ SE (vertical bars) for n=4-5 rats. * $P < 0.05$ vs. contralateral controls.

Fig. 8. Increased peptidase activities of the proteasome were pronounced and sustained in the tibialis anterior muscle after cast removal

The chymotrypsin- (A) and the trypsin- (B) like activities of the proteasome were measured using a fluorogenic substrate on partially purified proteasome extracts from control and immobilized gastrocnemius or tibialis anterior muscles as described in Methods. I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data are expressed as % difference from control leg and are means $\pm$ SE (vertical bars) for n=10-11 rats. * $P < 0.05$ vs. contralateral controls.

Fig. 9. Changes in mRNA levels for makers of autophagy in tibialis anterior and gastrocnemius muscles during immobilization and after cast removal

mRNA levels for cathepsin L, LC3b and beclin-1 were measured by q-RTPCR (see Methods) in immobilized and contralateral control gastrocnemius (GA) and tibialis anterior (TA) muscles. I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data were normalized using 18S rRNA, are expressed as % difference from contralateral control leg, and are means $\pm$ SE (vertical bars) for n=4-5 rats. * $P < 0.05$ vs. contralateral controls.

Fig. 10. Increased and sustained apoptosome-linked caspase 9 activity in the tibialis anterior muscle after cast removal

Apoptosome complexes were partially purified from gastrocnemius (GA) and tibialis anterior (TA) muscles. Apoptosome-associated caspase 9 activity was measured in immobilized and control GA and TA muscle extracts as described in Methods. I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data are expressed as % difference from control leg and are means $\pm$ SE (vertical bars) for n=10-11 rats. * $P < 0.05$ vs. contralateral controls.

Fig. 11. The proportion of apoptotic nuclei increased in the ECM compartment of the tibialis anterior muscle after cast removal

(A) Representative images for apoptotic nuclei localization in immobilized tibialis anterior (TA) muscle. Triple labeling of 10 μ m cross-sections of the TA allows the detection of total nuclei (Hoechst) and of apoptotic nuclei (TUNEL), and the visualization of the basal membrane (laminin-2 α). Merging the 3 images allows the localization of apoptotic nuclei within the myofibers (left panel) and the connective tissue (right panel). (B) The proportion of apoptotic nuclei inside or outside myofibers was quantified in triple labeled cross-sections of TA at I0, I8 and R6, and expressed in % of total nuclei. I0, non-casted controls; I8, 8 days

of hindlimb immobilization; R6, 6 days after cast removal. Values are means $\pm$ SE (vertical bars) for $n = 6$. $*P < 0.05$ vs. contralateral controls.

Table 1. Primers used for quantitative RT-PCR analysis.

Primer names	Accession number	Primer sens sequences	Primer antisens sequences
Col-IA1	NM_053304	5'-CCCTGCTGGTGAGAAAGGAT-3'	5'-GCTGTCCAGCAATACCCTGA-3'
Col-XIIA1	XM_243912	5'-GGAGACATTGCTTCCCAGAA-3'	5'-CAGCATCTGGTTGATCTGC-3'
Col-XVIIIA1	NM_053489	5'-GAGATCCCATCCAGAGCAGA-3'	5'-GCTGAGATTTGCGGACTT-3'
Col-IVA1	NM_001135009	5'-TCCTGCTTTCCGCTCTGC-3'	5'-GAAAGGCCTTGGCCTGTCCATACT-3'
MMP-2	NM_031054	5'-TGTGTTCTTCGCAGGGAATG-3'	5'-GCTGGACATCAGGGGGTAAA-3'
MMP-14	NM_031056	5'-TATGGGCCCCAACATCTGTGA-3'	5'-TATTCCTCACCCGCCAGAAC-3'
TIMP-1	NM_053619	5'-TCATGGGTTCCCCAGAAATC-3'	5'-ATTTCCCACAGCGTCGAATC-3'
TIMP-2	NM_021989	5'-TATCTACACGGCCCCCTCCT-3'	5'-GCATCTTGCCATCTCCTTCC-3'
Trim63	NM_080903	5'-GTGAAGTTGCCCCCTTACAA-3'	5'- TCCTCCTGCTCCTGAGTGAT-3'
Fbxo32	NM_133521	5'-CTACGATGTTGCAGCCAAGA-3'	5'- GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC-3'
LC3b	NM_022867	5'-CCGGAGCTTCGAACAAAGAG-3'	5'-CAGCTGCTTCTCACCCCTTGT-3'
Beclin-1	NM_053739	5'-TGTTCCCTATGGAAATCACTCG-3'	5'-GTCCCAGAAAAACCGCAAAC-3'
CstL	NM_013156	5'-GGTGGGGCCTATTTCTGTTG-3'	5'-TCGAGGTCCTTGCTGCTACA-3'
18S rRNA	NR_046237	5'-AATCAGTTATGGTTCCTTTGTCG-3'	5'-GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA-3'

Col = Collagen; MMP = Matrix metalloprotease; TIMP = Tissue inhibitor of matrix metalloprotease ; CstL = Cathepsin L; Trim63 = MURF1;

Fbxo32 = MAFbx/Atrogin-1

Figure 1: Food intake and body weight of rats during immobilization and recovery

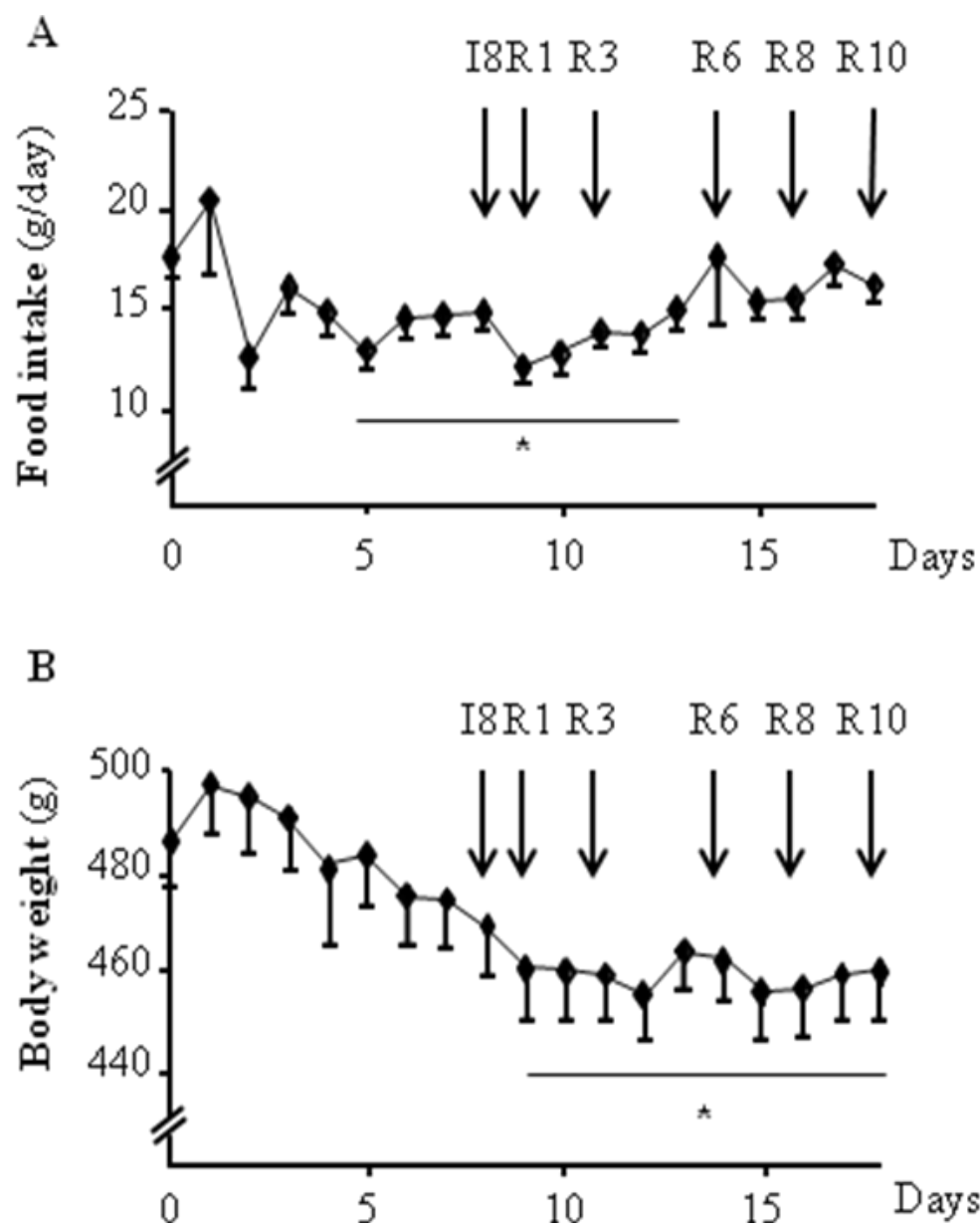


Figure 2: Immobilization induced-muscle atrophy worsened rapidly after cast removal in the tibialis anterior

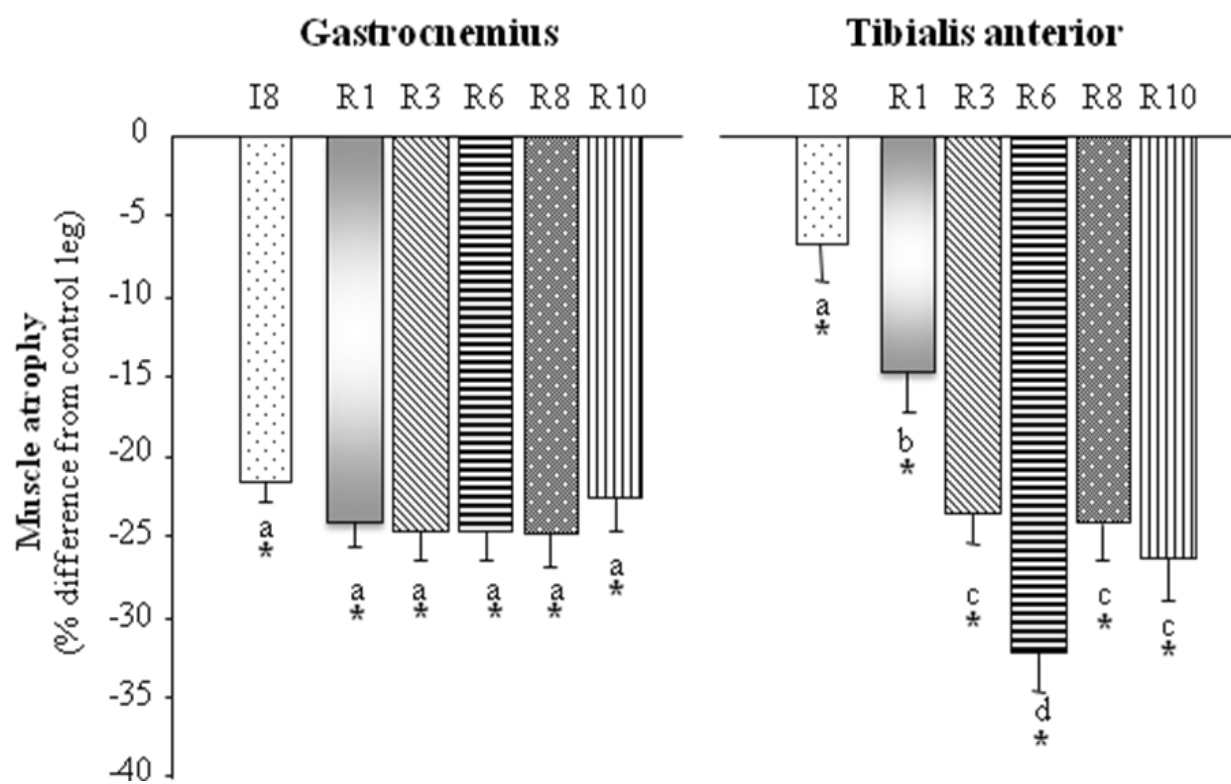


Figure 3: Changes in connective tissue area worsened after cast removal in the tibialis anterior

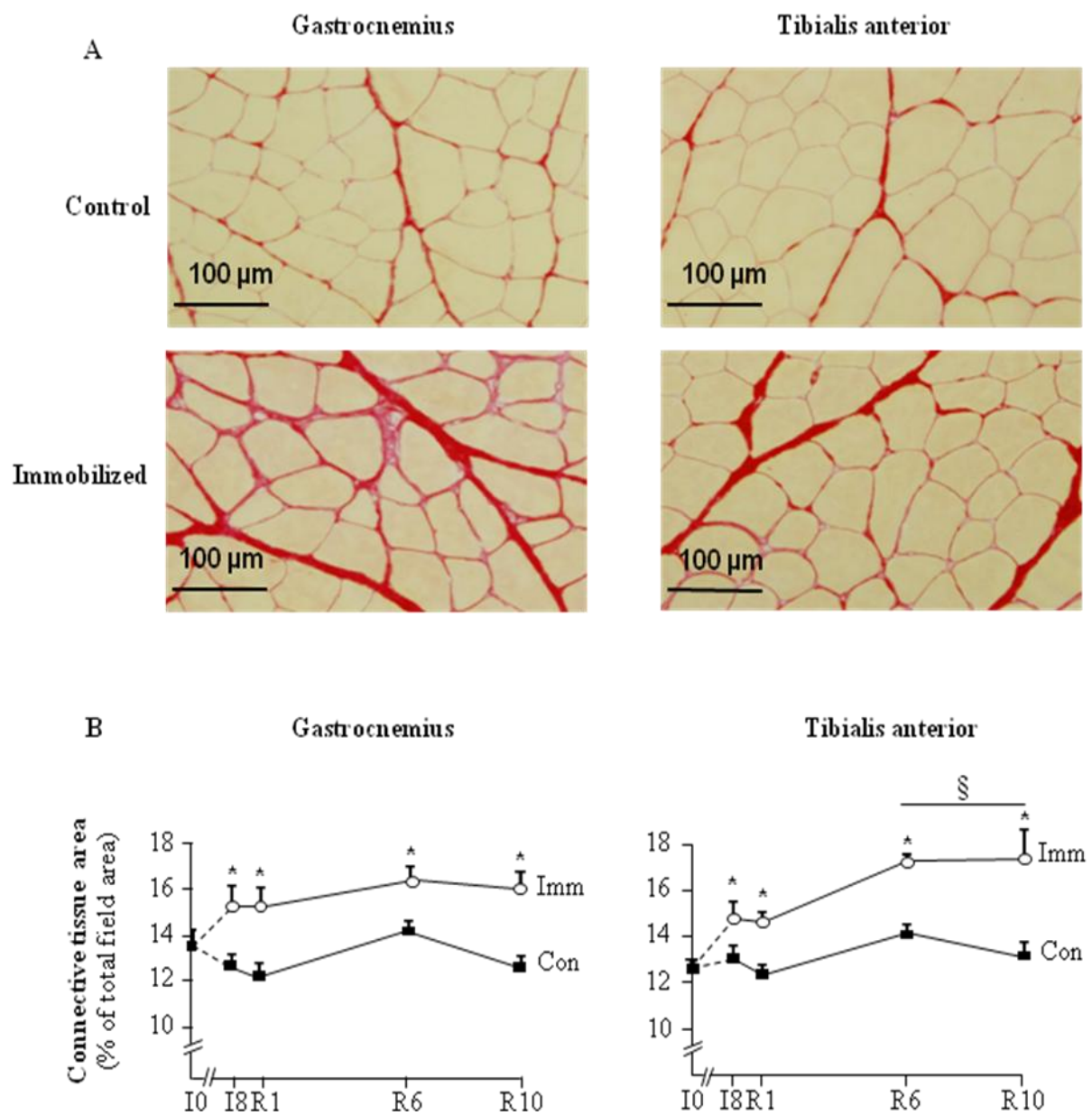


Figure 4: Changes in mRNA levels for some major collagens, matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibitors (TIMPs) in the immobilized and remobilized TA

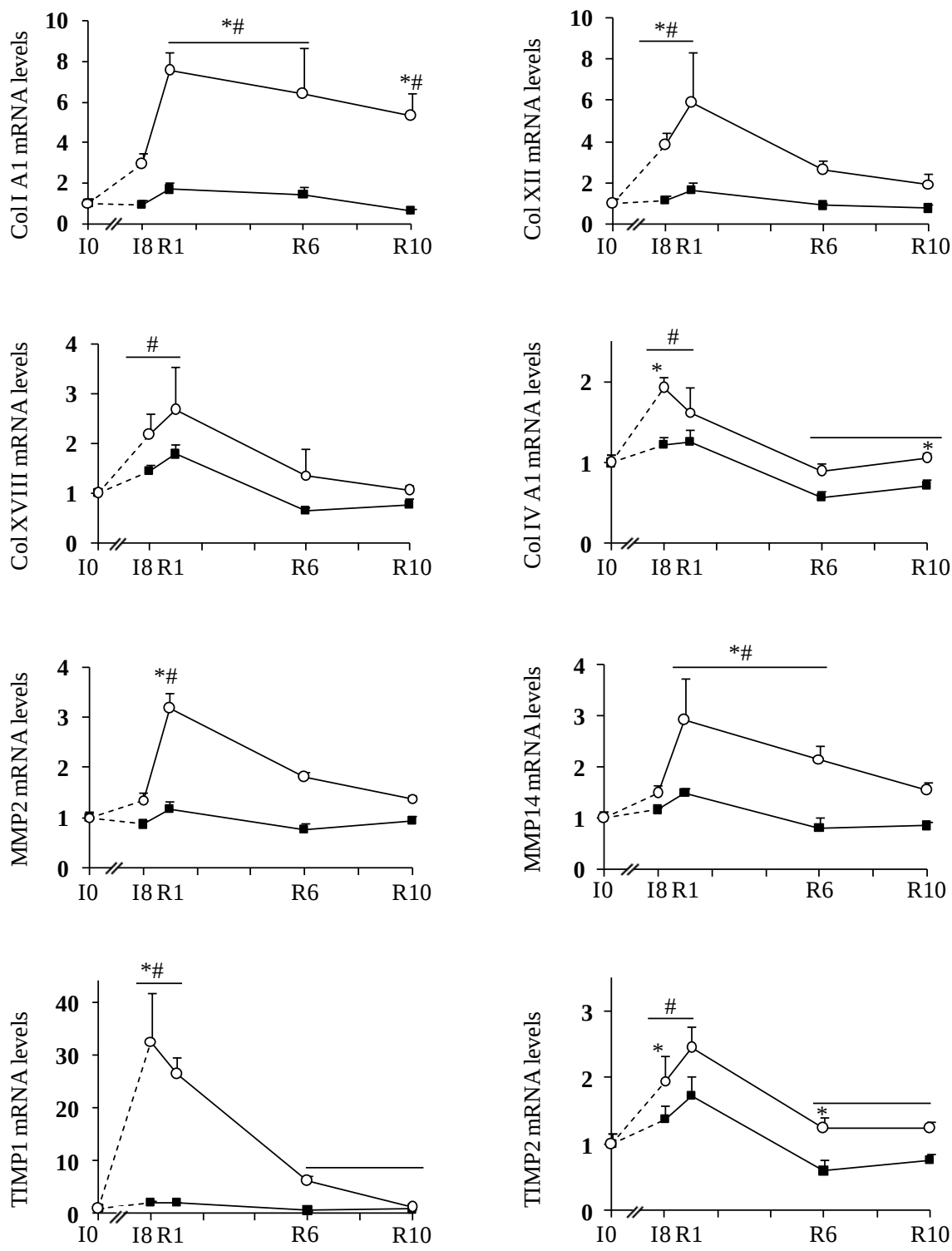


Figure 5: Changes in Myosin Heavy Chain (MyHC) isoform distribution worsened after cast removal in the tibialis anterior

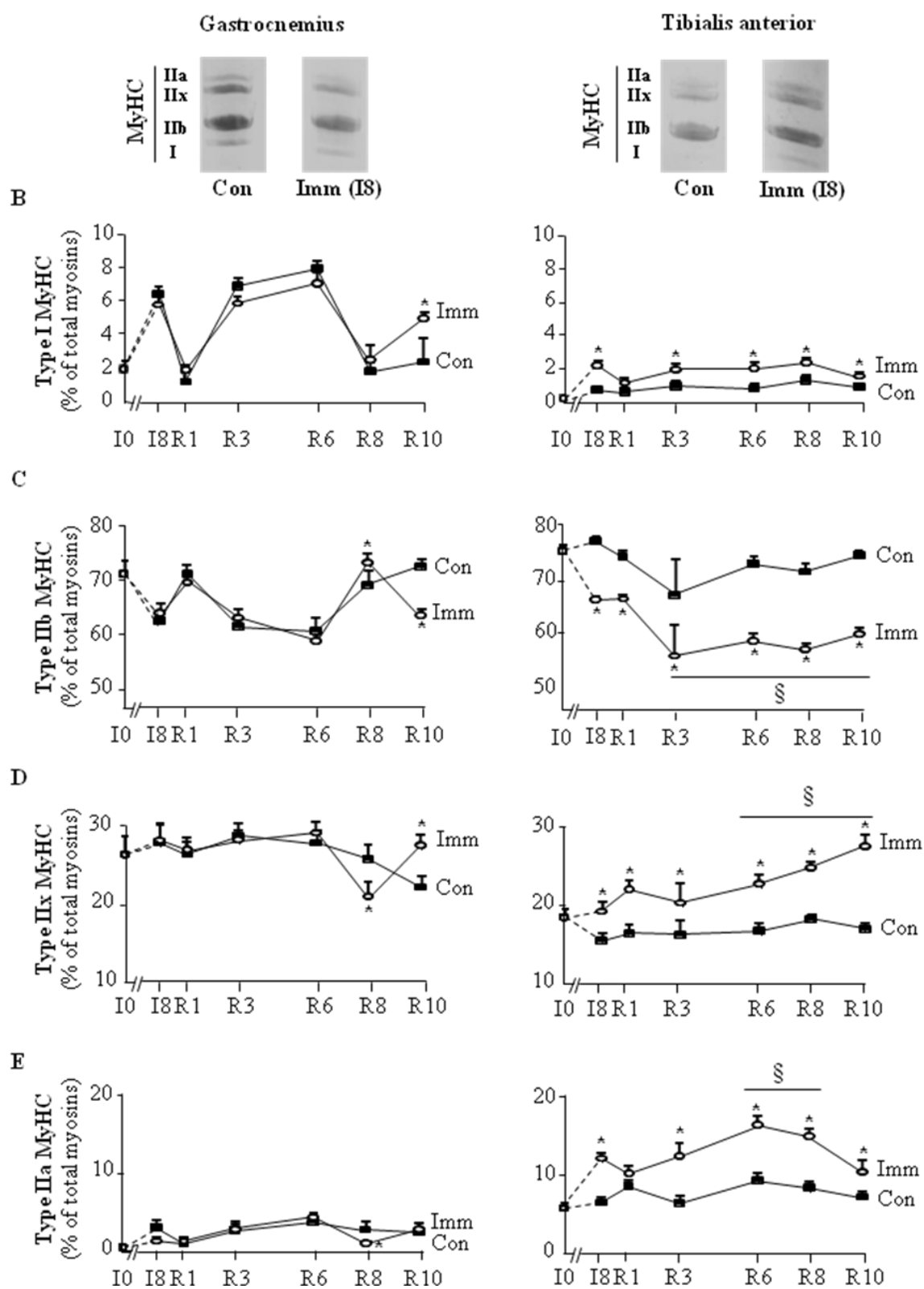


Figure 6: MURF1 E3 ligase protein levels increased in tibialis anterior and gastrocnemius muscles during immobilization and after cast removal

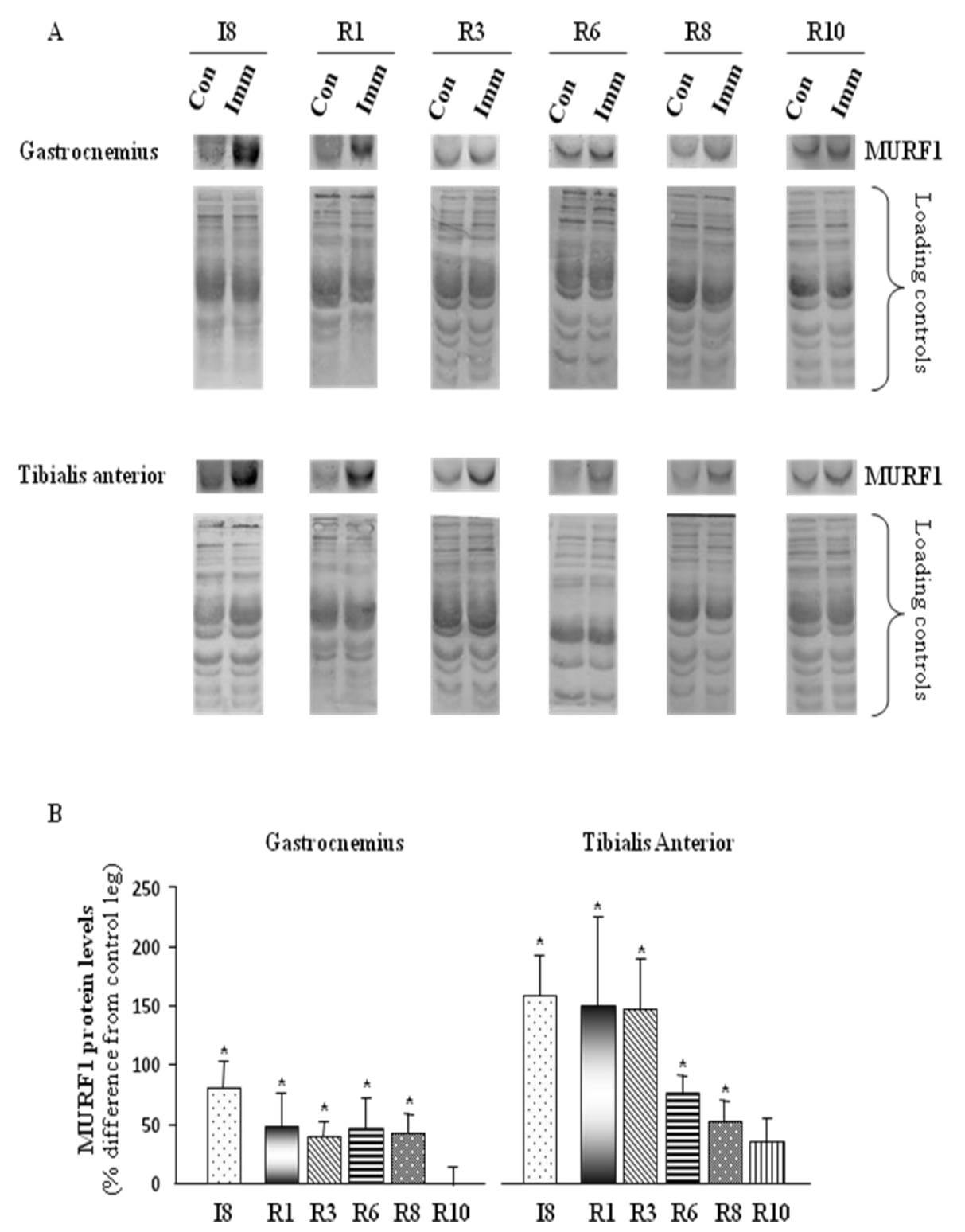


Figure 7: Changes in mRNA levels for MURF1 and MAFbx/atrogen-1 in tibialis anterior and gastrocnemius muscles during immobilization and after cast removal

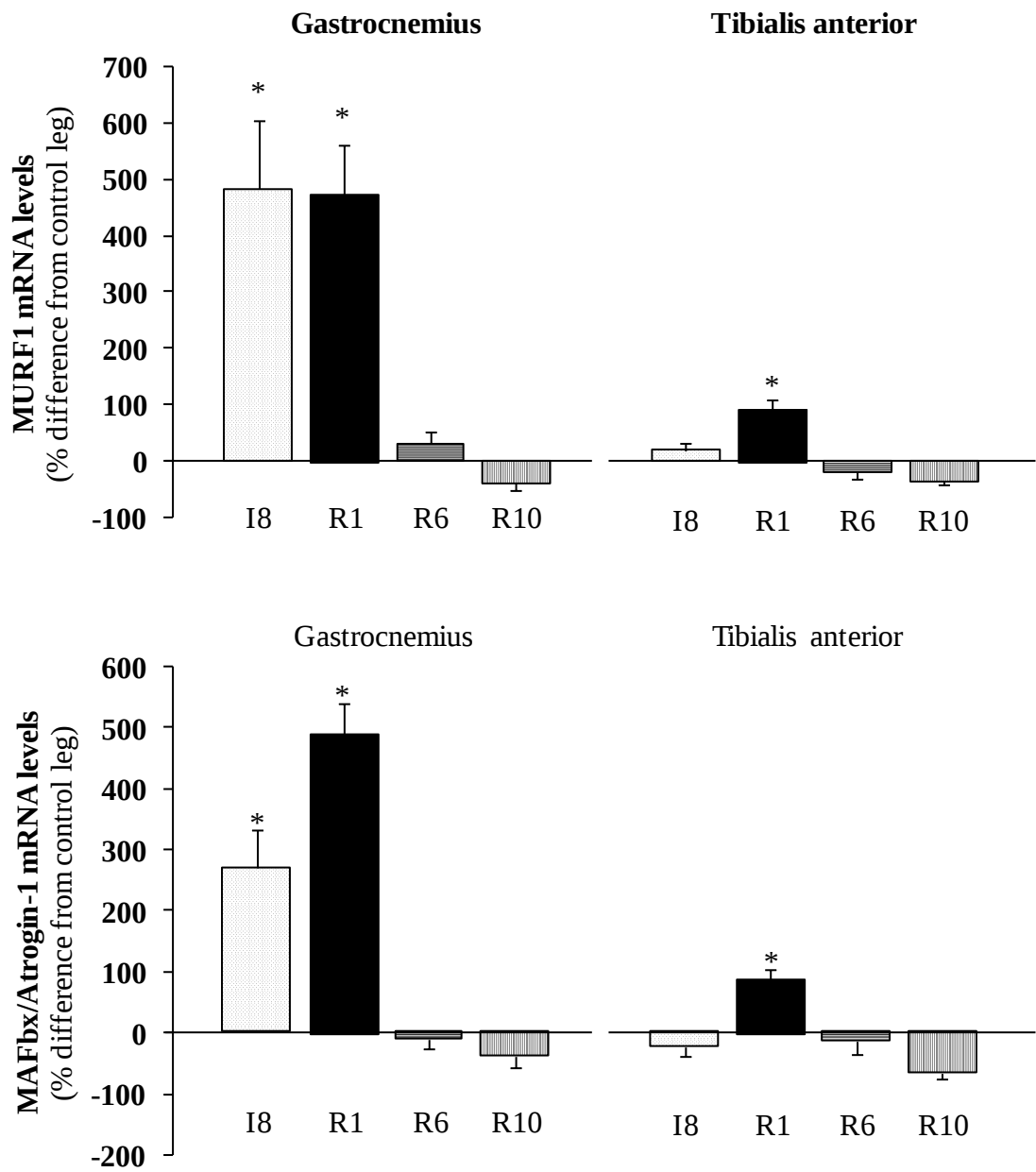


Figure 8: Increased peptidase activities of the proteasome were pronounced and sustained in the tibialis anterior muscle after cast removal

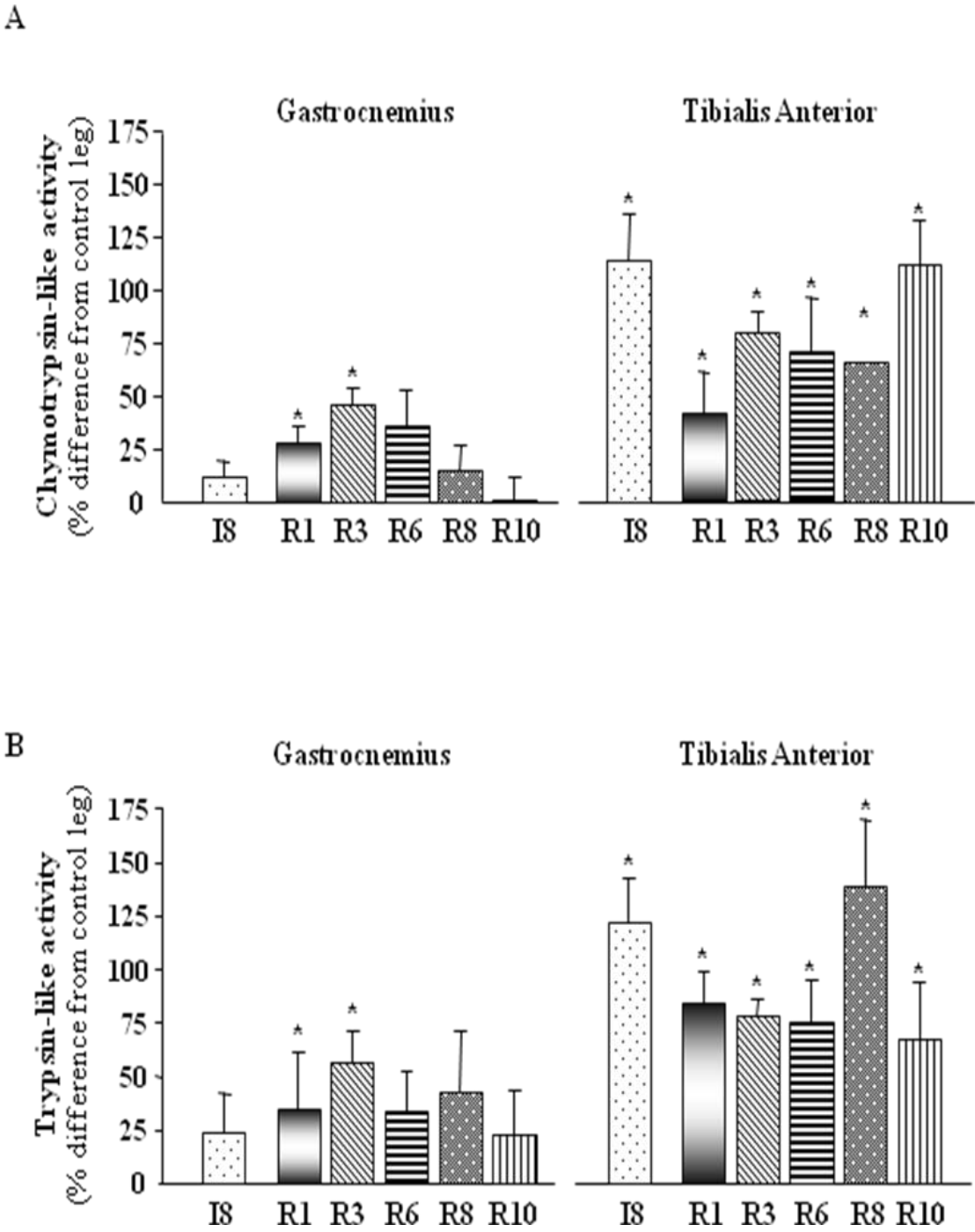


Figure 9: Changes in mRNA levels for makers of autophagy in tibialis anterior and gastrocnemius muscles during immobilization and after cast removal

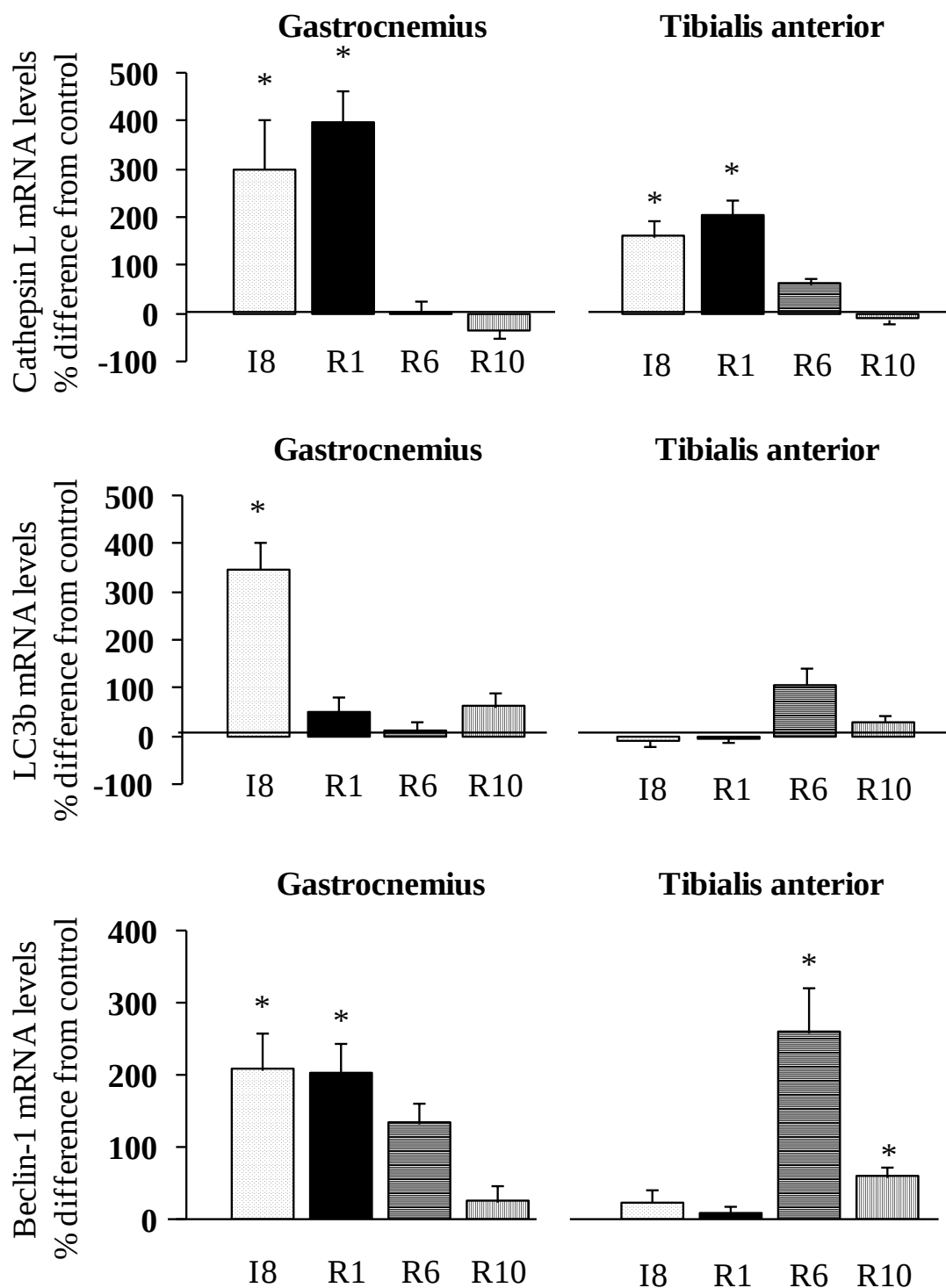


Figure 10: Increased and sustained apoptosome-linked caspase 9 activity in the tibialis anterior muscle after cast removal

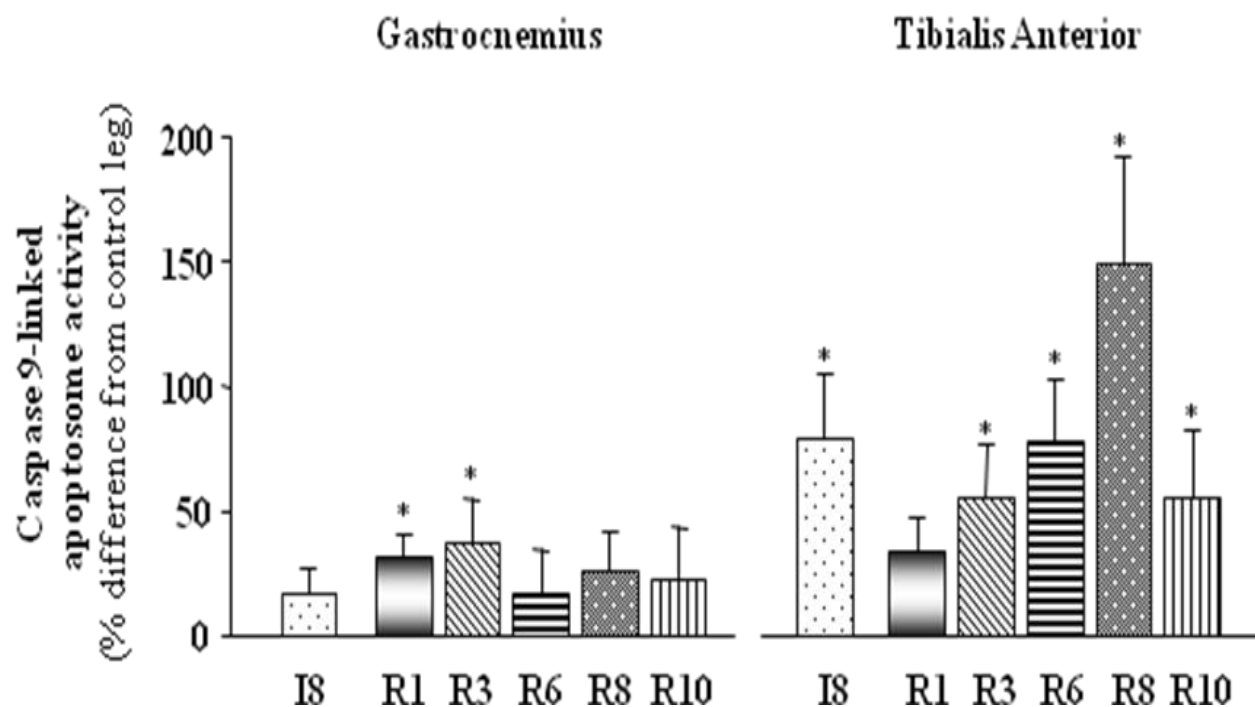
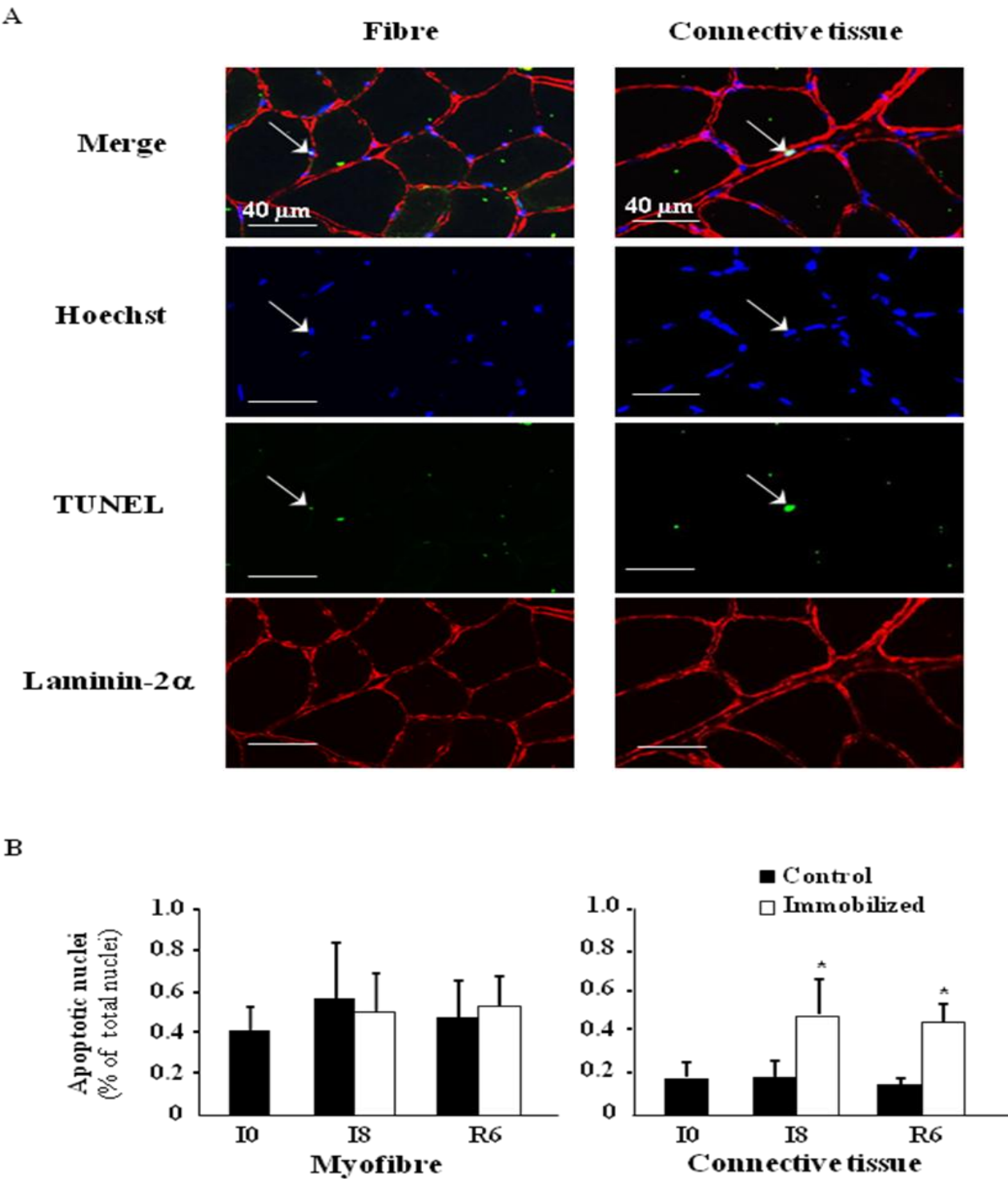


Figure 11: The proportion of apoptotic nuclei increased in the ECM compartment of the tibialis anterior muscle after cast removal



Publication 2

Tibialis anterior atrophy after immobilization correlates with changes in extracellular matrix molecules Sparc and Tenascin-C, and in integrin scaffold proteins

Slimani L, Listrat A, Amat J, Deval C, Micol D, Meunier B, Cassar-Malek I, Dardevet D, Picard B, Attaix D and Combaret L.

En préparation pour Journal of Applied Physiology

Contexte

Nos résultats précédents (Publication N°1) ont montré que l'aggravation d'atrophie observée dès déplâtre dans le Tibialis Anterior (TA) est associée à 1/ un épaissement du tissu conjonctif pendant l'immobilisation qui s'aggrave pendant la récupération, 2/ une augmentation des ARNm des marqueurs du remodelage des collagènes, 3/ une augmentation de l'apoptose localisée au niveau du tissu conjonctif, 4/ une activation importante et persistante de la voie ubiquitine-protéasome dépendante, et à une induction plus tardive des marqueurs de l'autophagie. Ces résultats ont suggéré un remodelage important au niveau de la matrice extracellulaire du muscle TA. La régulation des gènes impliqués dans l'activation de la voie UPS dépend de différentes voies de signalisation, dont la voie Akt/FoxO3 (Glass et al., 2010). Le complexe ILK/Pinch/Parvin (IPP), qui est capable d'interagir avec les intégrines membranaires, et peut réguler la phosphorylation d'Akt (Fukuda *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2007). Ce complexe pourrait donc réguler des voies de signalisation qui contrôlent la protéolyse musculaire. De plus, certaines molécules matricellulaires, comme Sparc ou la tenascine-C, peuvent réguler la matrice extracellulaire, la régénération musculaire, la phosphorylation de Akt mais également l'expression d'ILK (Shi *et al.*, 2007; Maier *et al.*, 2008).

Hypothèse

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'augmentation de la protéolyse musculaire pendant l'immobilisation et la récupération dans le TA pourrait résulter d'altérations au niveau des protéines matricellulaires (i.e. Sparc et tenascine-C) et de la signalisation via les intégrines, pouvant influencer la voie de signalisation Akt/FoxO3 et donc l'atrophie musculaire.

Objectifs

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons eu pour objectifs :

1/ de caractériser la composition de la MEC, notamment les changements au niveau de Sparc et de la tenascin-C,

2/ d'étudier la régulation des intégrines membranaires et des molécules du complexe IPP , et enfin 3/ de déterminer si les processus de régénération pouvaient être altérés pendant l'immobilisation et la récupération dans le TA.

Stratégie

Des rats adultes (6 mois) ont été immobilisés par plâtrage unilatéral pendant 8 jours (I8), une patte arrière étant immobilisée et l'autre servant de témoin. Les rats ont ensuite été déplâtrés afin d'initier la phase de récupération musculaire pendant 1, 6 et 10 jours. Dans ce modèle, le muscle TA a été immobilisé en position étirée. A chaque point de la cinétique étudiée, les altérations structurales (et/ou fonctionnelles) pouvant avoir lieu dans les muscles TA immobilisés et témoins ont été étudiées, en évaluant 1/ l'aire des fibres et leur déformation, 2/ l'aire de l'endomysium et du perimysium, 3/ la ramification de la MEC, 4/ les niveaux des transcrits ARNm codant pour certaines protéines qui composent la matrice extracellulaire (i.e. Sparc, Tenascin-c et décorine), 5/ les niveaux des transcrits ARNm codant pour les protéines à l'interface entre l'intra- et l'extra-cellulaire (intégrines- $\alpha 7$ et $-\beta 1$) et les protéines qui s'y fixent (ILK, Pinch et Parvin- α), et enfin 6/ les niveaux des transcrits ARNm codant pour les protéines Myf-5 et MyoD impliquées dans la myogenèse.

Principaux résultats et conclusions

Nous montrons que l'aggravation d'atrophie observée dès le premier jour de remobilisation dans le TA (Cf. Article1 (Figure 2)) corrèle avec :

1/ une baisse de l'aire des fibres accompagnée d'une augmentation du facteur de forme de ces fibres et de la ramification de la MEC, ce qui suggère une déformation des fibres musculaires en réponse à l'immobilisation et à la remobilisation du muscle TA,

2/ un épaissement de l'aire du perimysium pendant la période d'immobilisation et de l'aire de l'endomysium pendant la récupération, ce qui suggère des adaptations spécifiques de la MEC au niveau des fibres musculaires elles-mêmes pendant la période de remobilisation.

3/ une forte induction des niveaux des transcrits ARNm de la tenascin-C et de Sparc dès le déplâtrement, suggérant un rôle dans le remodelage et la récupération musculaire de ces deux molécules matricielles,

4/ une augmentation des niveaux de transcrits des intégrines- $\alpha 7$ et $-\beta 1$ et également de certaines molécules du complexe IPP pendant l'immobilisation, suggérant des adaptations au niveau membranaire pour la transduction de signaux de l'extra- vers l'intra-cellulaire, et enfin,

5/ une augmentation au niveau des transcrits de Myf-5 et MyoD pendant l'immobilisation, suggérant des adaptations importantes au niveau des processus de régénération musculaire.

En conclusion, l'aggravation d'atrophie musculaire observée dans le TA au cours de la phase précoce de récupération est associée à un remodelage important au niveau de la structure et de la composition de la matrice extracellulaire ce qui pourrait influencer des voies de signalisation intracellulaires, comme Akt/FoxO3, qui contrôlent la protéolyse musculaire.

Tibialis anterior atrophy after immobilization correlates with changes in extracellular matrix molecules Sparc and Tenascin-C, and in integrin scaffold proteins

Lamia Slimani¹, Anne Listrat², Julien Amat¹, Christiane Deval¹, Didier Micol², Bruno Meunier², Dominique Dardevet¹, Brigitte Picard², Daniel Taillandier¹, Didier Attaix¹, Lydie Combaret¹

¹INRA, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, 63122 Saint Genès Champanelle, France, and, Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, 63000 Clermont-Ferrand, France ; ²INRA, UMR 1213 Herbivores, 63122 Saint Genès Champanelle, France

Running head: Outside-in signaling changes during muscle remobilization

Corresponding author: L. Combaret: INRA, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, 63122 Saint Genès Champanelle, France. Email: lydie.combaret@clermont.inra.fr

Abstract

Sustained muscle loss leads to weakening and severe metabolic consequences.

Immobilization-induced muscle atrophy worsened in the tibialis anterior (TA) muscle immediately after cast removal and was associated with connective tissue alterations and sustained activation of proteolysis, suggesting a cross-talk between extracellular matrix (ECM) and muscle fibers. Here, we investigated ECM alterations during immobilization and remobilization of TA muscle in relation with integrin signaling. Adult rats were subjected to unilateral hindlimb casting for 8 days (I8). Casts were removed at I8 and animals were allowed to recover for 10 days (R1 to R10). The immobilization-induced connective tissue thickening in the TA resulted from an increase in perimysium and endomysium areas during immobilization and remobilization respectively. These alterations correlated with additional ramifications in the ECM during early recovery and with a decrease of muscle fiber area associated with their deformation. Levels of mRNA encoding two matricellular proteins, i.e. tenascin-C and Sparc, increased immediately after cast removal, while mRNA and/or protein levels ILK, Parvin- α , integrin- α 7 and - β 1 increased during immobilization and early recovery. Finally, mRNA levels for MyoD and Myf5 increased during immobilization and returned to basal levels at R6. The TA muscle atrophy during remobilization was associated with pronounced structural changes of the endomysium, suggesting a major remodeling of the ECM and/or the formation of more fiber groups. The up-regulation of integrin scaffold proteins and of some matricellular proteins that regulate myogenesis during immobilization and remobilization suggests that integrin signaling was enhanced and may influence skeletal muscle recovery.

Key words: Extracellular matrix, Outside-In signaling, Skeletal muscle atrophy, Remobilization, Integrin-Linked-Kinase

INTRODUCTION

Physical inactivity leads to muscle wasting that worsens during the early stages of recovery, especially in the tibialis anterior (TA) muscle. As skeletal muscle is the major reservoir of body proteins, sustained muscle wasting due to immobilization leads to weakening and severe metabolic consequences, which impacts health care costs.

We recently reported that the worsening of TA muscle atrophy early after cast removal was associated with i) a thickening of connective tissue, ii) increased remodeling of collagens, iii) increased apoptosis mainly localized in the ECM, iv) and a sustained activation of the Ubiquitin-Proteasome Proteolytic System (UPS) during recovery (Slimani *et al.*, 2012). We also suggested that enhanced autophagy pathway may be involved in recovery when TA muscle atrophy stabilized (Slimani *et al.*, 2012). The transcriptional up-regulation of genes involved in the activation of the UPS occurred through the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/FoxO signaling pathway (Glass, 2010). In addition, the FoxO3 transcription factor coordinately controls the activation of both UPS and autophagy (Attaix & Bechet, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Furthermore, FoxO3 enhanced Akt activity, which resulted in the phosphorylation and nuclear export of FoxO1, leading to increase in FoxO1-induced autophagy (Zhou *et al.*, 2012).

The Integrin Linked Kinase (Ilk)/Pinch/Parvin complex was also reported to control Akt phosphorylation (Fukuda *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2007). Although Ilk kinase activity is controversial (Wickstroem *et al.*, 2010; Hannigan *et al.*, 2011; Riaz *et al.*, 2012), this protein is a cytosolic partner of the transmembrane integrins (Wickstroem *et al.*, 2010; Hannigan *et al.*, 2011), which belong to ECM (Carmignac & Durbeej, 2012), and play key roles in myogenesis (Miller *et al.*, 2003), in the stabilization of myotendinous junctions (Wang *et al.*, 2008), and in controlling the PI3K/Akt signaling leading to either actin filament rearrangements (Qian *et al.*, 2005) or cadherin-dependent signaling (Joshi *et al.*, 2007). Sparc

is a matricellular glycoprotein also involved in myogenesis (Cho *et al.*, 2000) and in Akt phosphorylation (Shi *et al.*, 2007). Sparc enhanced Ilk activation (Shi *et al.*, 2007; Weaver *et al.*, 2008) through interaction at the extracellular level with β 1-integrin heterodimers (Weaver *et al.*, 2008). Tenascin C is another matricellular glycoprotein involved in muscle repair (Fluck *et al.*, 2005; Fluck *et al.*, 2008; Calve & Simon, 2012). Its induction requires Ilk during strain-induced mechanical stress in fibroblasts (Maier *et al.*, 2008).

Altogether this suggests that the enhanced activity of the UPS and autophagic pathway during immobilization and early recovery in the TA resulted from alterations in Sparc, Tenascin C and integrin signaling, that may ultimately induce changes in Akt/FoxO3 signaling. Thus, the objectives of the study were i) to characterize ECM composition, particularly changes in Sparc and Tenascin C, ii) to investigate the regulation of integrins and integrin-binding proteins in the intracellular compartment, and iii) to study whether regeneration processes were altered in immobilized and remobilized TA muscle.

MATERIALS AND METHODS

Animals. The present study was approved by the Animal Care and Use Committee at the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and adhered to the current legislation on animal experimentation in France. Male Wistar rats, 6 months old (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed individually in controlled environmental conditions (room temperature 22°C; 12-h light–dark cycle, light period starting at 8 h), fed ad libitum (Vazeille *et al.*, 2008; Vazeille *et al.*, 2012), and given free access to water.

Experimental protocol and groups. After a 3-week adaptation period, rats were anesthetized with forene inhalation and subjected to unilateral hindlimb immobilization via an Orfit-soft plaque (Gibaud). Rats were caged as described previously (Vazeille *et al.*, 2012) so that TA

muscles was immobilized in a lengthened position. Briefly, after 8 days of immobilization (I8, $n = 11$), casts were removed and animals ($n = 10-11$) were allowed to recover for 1 (R1), 3 (R3), 6 (R6), 8 (R8) and 10 (R10) days. A group of non-casted rats was also included and served as control (I0, $n = 11$). For convenience, muscles that were immobilized between I0 and I8 are named remobilized during the recovery period (R1-R10). At the end of the immobilization or recovery periods, animals were euthanized under pentobarbital sodium anesthesia (50 mg/kg ip). TA skeletal muscle was carefully dissected, weighed, and frozen in liquid nitrogen. A central part of TA muscle was fixed at resting length using Tissue-Tek[®] OCT[™] (Sakura Finetek, France), and then frozen in cooled isopentane (-100°C), and stored at -80°C until histological analyses. The remaining part was finely pulverized in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analyses.

Histological analyses of muscles. Ten- μ m-thick TA cross-section was performed at -25°C using a cryostat (HM500M Microm International), and stained with Picro-Sirius red, which reveals intramuscular connective tissue (IMCT) in red and muscle fiber in yellow (Flint & Pickering, 1984). Observations and image acquisitions were performed using a photonic microscope in bright field mode (Olympus BX-51, Tokyo, Japan), coupled to a high-resolution cooled digital camera (Olympus DP72) and Cell-D software (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) as previously described (Slimani *et al.*, 2012). Briefly, after image acquisition for each muscle section, image analysis was performed using the Visilog 6.9 software (Noesis, France). The green component of the initial image was used for higher contrast, and top-hat filtering followed by manual thresholding on gray level allowed segmentation of the connective tissue network (perimysium and endomysium). Measurement of the area of this network was performed by counting the number of pixels in the resulting binary images, and was expressed in % of the total field area. Additional segmentation of the connective network using the watershed algorithm resulted in separating objects

corresponding to muscle cells (Slimani *et al.*, 2012). Fiber boundaries were manually corrected when necessary.

RNA extraction and real-time PCR. Total RNA was extracted from TA samples using TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. RNA concentration was determined with a Nanodrop ND 1000 spectrophotometer and the integrity of the RNA was evaluated with a bioanalyzer (Agilent Technologies). One µg of RNA was treated with DNase I Amp grade (Invitrogen), prior to cDNA Synthesis. Treated RNA was reverse transcribed using random primers and superscript II reverse transcription kit (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. Real time PCR was carried out using the CFX96 Real-time PCR detection system (Biorad). For PCR reactions a master mix of the following reaction components was prepared: 3.6 µl of water, 0.7µl of each forward and reverse primer (10µM), 7 µl of IQ SYBR Green Supermix (BIORAD) and 2 µl of a 50 fold dilution of the reverse transcribed total cDNA. The reaction mixture was initially denatured at 95°C for 3 min then cycled 40 times. In each cycle, the mixture was kept in 95°C for 10 s plus 60°C for 20 s. The PCR reaction was supplemented by a melting curve analysis process in a temperature range from 55°C to 95°C with 0.5°C increments at each step. A negative control without cDNA template was run with every assay to assess the overall specificity. Primers for rat sequences (Table 1) were used and yielded PCR products 100 bp in size. 18S rRNA was also amplified to normalize for mRNA content. The comparative threshold cycle ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method (Livak & Schmittgen, 2001), with 18S rRNA as a reference gene, was used to compare the relative mRNA expression between each group, where the relative mRNA abundance was arbitrarily set to 1 for IO group.

ILK protein content measurements. One hundred milligrams of TA muscle powder from contralateral control and immobilized hindlimbs at each time point were homogenized using a polytron in 10 volumes of an ice-cold buffer that was freshly prepared (pH 7.4) [20 mM

Hepes, 50 mM β -glycerophosphate, 100 mM potassium chloride, 50 mM sodium fluoride, 2 mM EGTA, 0.2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM benzamidine, 0.5 mM sodium vanadate, 1 % triton X100, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and proteinase inhibitor cocktail (Sigma, France)]. Homogenates were centrifuged at 14,500 g for 12 min at 4°C. The protein content was determined according to the Bio-Rad Protein Assay kit. Aliquots of supernatants were diluted in Laemmli sample buffer, and stored at -80°C until use. The expression of the Integrin-Linked Kinase (Ilk) was assessed by immunoblotting. Fifty μ g of the total protein extract were separated by SDS-PAGE on a 10 % acrylamide gel (acrylamide-bis (29:1)), and then transferred on PVDF membranes (GE Healthcare). Antibody against Ilk (Sigma-Aldrich, Lyon, France) was used at 1:5,000 dilution. Signals were detected using the ECL+ detection kit (GE Healthcare, Orsay, France) after exposition onto radiographic film (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Orsay, France) and quantified by densitometry using the Image J software.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using Statistical Analysis Systems 9.1 procedures (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data were analyzed for normality and equal variances. No set of data was transformed for non-normality distribution. Data were analyzed by two-way ANOVA for the effects of immobilization and stage of immobilization-recovery and their interactions. In these analyses an animal effect (paired effect), nested within the stage of immobilization-recovery was introduced to take into account the fact that the Con and Imm muscles were sampled from the same animal. Multiple comparisons of adjusted means were based on Tukey's test. Level of significance was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

TA muscle atrophy, fiber CSA and ECM structural alterations during immobilization and remobilization. Structural muscle alterations that occur during immobilization and/or recovery were assessed after Sirius Red staining and image analysis to determine i) muscle fiber cross section area (CSA) and fiber shape factor, ii) endomysium and perimysium areas, and iii) the level of ECM ramification by counting ECM triple points .

The atrophy of immobilized TA muscles during immobilization (-18 %, $P < 0.05$ vs. I0) worsened immediately after cast removal (-23 %, -35 %, and -25 % at R1, R6 and R10 respectively, $P < 0.05$ vs. I0) (Table 2). This correlated with a decrease in muscle fiber CSA from I8 (-28%, $P < 0.05$) until R10 (-33%, $P < 0.05$) when compared to I0. The contralateral non-immobilized muscle atrophied to a lesser extent at I8 (-11.5 %) and R1 (-9.5 %) compared to the I0 group ($P < 0.05$, Table 2) and also exhibited diminution of muscle fiber CSA from I8 until R6 (~-15%, $P < 0.05$) vs. I0 ($P < 0.05$, Fig. 1A).

In parallel, the fiber shape factor increased in the immobilized muscles from I8 (+5 %, $P < 0.05$) and remained elevated until R10 (+3.8 %, $P < 0.05$) vs. I0 (Fig. 1B). This parameter was modified also in the contralateral non-immobilized muscle, but only after cast removal, from R1 until R10 (+3 %, $P < 0.05$ vs. I0). Thus, the decrease of muscle fiber CSA was inversely correlated with shape factor changes.

A connective tissue thickening occurs in the TA during remobilization (Slimani *et al.*, 2012). We now investigated whether endomysium or perimysium was under such conditions. Fig. 2A shows that the perimysium area of immobilized TA increased at I8 (+39 %, $P < 0.05$ vs. I0) and remained elevated until R10 (+30 %, $P < 0.05$ vs. I0), except for R1. In contrast, the endomysium area did not change in the immobilized muscles at I8, but increased in the remobilized muscles from R1 to R10 (+20 to 39 %, $P < 0.05$ vs. I0) (Fig. 2B). A further

additional thickening of the endomysium area prevailed at R6 and R10 (+24 and 27 % respectively, $P < 0.05$ vs. I8) (Fig. 2B).

Fig. 2C shows that the number of triple points within the ECM increased in immobilized muscles from I8 to R10 (+34 to 46%, $P < 0.05$ vs. I0). Again, this parameter further increased in remobilized muscles at R1 and R6 (+14 and 24 % respectively, $P < 0.05$ vs. immobilized TA at I8).

Decorin, Sparc, and tenascin-C mRNA levels in immobilized and remobilized TA. We previously reported that the TA connective tissue thickening during immobilization and/or remobilization could result from an increased collagen deposition through connective tissue remodeling (Slimani *et al.*, 2012). In the present work, we aimed at characterizing whether other structural ECM molecules (i.e. decorin) or some matricellular proteins (i.e. tenascin-C and Sparc) changed in immobilized and remobilized TA.

Fig. 3A shows that mRNA levels for decorin increased in immobilized TA at I8 and (+55 and 61 % respectively, $P < 0.05$ vs. I0), and returned to basal levels at R6 and R10 (-40%, $P < 0.05$ vs. I8). mRNA levels for decorin also increased in the contralateral non-immobilized TA muscle at R1 (+75 %, $P < 0.05$ vs. I0), and then decreased at R6) and R10 (-44 and -56 %, $P < 0.05$ vs. I8). mRNA levels for Sparc did not change in the immobilized TA at I8, but strongly increased at R1 and R10 (+115 and +158 %, $P < 0.05$ vs. I8) (Fig. 3B). Tenascin-C mRNA levels (Fig. 3C) were elevated in immobilized TA at I8 (+214 %, $P < 0.05$ vs. I0), and further increased in the remobilized muscles at R1 (+102 %, $P < 0.05$ vs. I8).

Myogenic factor mRNA levels in immobilized and remobilized TA. Tenascin-C and Sparc are involved in muscle regeneration and control of the expression and activity of myogenic factors respectively (Cho *et al.*, 2000; Cifuentes-Diaz *et al.*, 2002). Fig. 4 shows that mRNA levels for MyoD and Myf5 increased at I8 (+173 and 940 % respectively, $P < 0.05$) and R1 (+196 and 680 % respectively, $P < 0.05$) in the immobilized and remobilized

TA muscles when compared to I0. Both mRNA levels returned to basal levels at R6. mRNA levels for MyoD also increased in the non-immobilized contralateral TA at R1 (+130 %, $P < 0.05$ vs. I0).

Integrin and Ilk-Pinch-Parvin mRNA and/or protein levels in immobilized and remobilized TA. In addition to its role in muscle regeneration, Sparc was suggested to binds to integrins in different cell types (Nie *et al.*, 2008; Weaver *et al.*, 2008) and is involved in the activation of Ilk. Thus, we investigated whether mRNA levels for integrin- $\alpha 7$ and - $\beta 1$ were modified during immobilization and/or remobilization. Fig. 5 shows that mRNA levels for integrin- $\alpha 7$ and - $\beta 1$ increased in immobilized TA at I8 (+218 and 93 % respectively, $P < 0.05$) and in remobilized TA at R1 (+192 and 95 % respectively, $P < 0.05$) when compared to I0, and then returned to basal levels at R6.

mRNA levels for integrin- $\beta 1$ were also elevated in the contralateral non-immobilized TA at R1 (+62%, $P < 0.05$ vs. I0). We also investigated the changes in mRNA levels for some proteins (i.e. Ilk, Pinch, and Parvin) that are involved in integrin signaling. Fig. 6A shows that mRNA levels of ILK increased at I8 and R1 (+48 and 58 % respectively, $P < 0.05$ vs. I0) and then returned to basal levels at R6. However, ILK protein levels were elevated in the immobilized TA at I8 (+137%, $P < 0.05$ vs. I0), further increased at R1 (+221%, $P < 0.05$ vs. I0), and remained elevated until R10 (+87%, $P < 0.05$ vs. I0). By contrast, Pinch mRNA levels did not change in the immobilized or in the remobilized TA muscles, except at the very end of the recovery studied. In fact, Pinch mRNA level only decreased at R10 in the remobilized TA (-27%, $P < 0.05$ vs. I0) (Fig. 6B). By contrast, mRNA levels for Pinch increased in the non-immobilized contralateral TA at R1 (+57%, $P < 0.05$ vs. I0) and then returned to basal levels. mRNA levels for Parvin- α increased at I8 in both immobilized and contralateral non-immobilized TA (94% and 41% respectively, $P < 0.05$ vs. I0). After cast removal, they remained elevated at R1, and then returned to basal I0 values at R6.

DISCUSSION

The aim of this study was to investigate ECM alterations during immobilization and remobilization of TA muscle in relation with integrin signaling. We show that the thickening of intramuscular connective tissue (IMCT) i) correlated with a decrease of muscle fiber area associated with their deformation, and ii) resulted from an increase in perimysium and endomysium areas during immobilization and remobilization respectively. We also report that iii) mRNA levels encoding tenascin-C and Sparc increased immediately after cast removal, while mRNA levels for integrin- α 7 and - β 1 increased during immobilization and remobilization, as did ILK mRNA and protein levels.

The worsening of TA muscle atrophy pending remobilization after 8 days of hindlimb casting was associated with pronounced structural changes in muscle fibers and ECM. The thickening of IMCT in the lengthened immobilized TA (Slimani *et al.* unpublished data) was associated with muscle fiber atrophy and deformation. IMCT thickening resulted from an increased perimysium area during immobilization, but from increased endomysium area during remobilization. The division of a muscle into fascicles by the perimysial connective tissue is related to the need to accommodate shear strains as muscles change shape during contraction and extension (Purslow, 2002). Thus, the thickening of the perimysial collagen network during immobilization could be an adaptive process to prevent over-stretching of the muscle fiber. The maintenance of perimysium thickening after cast removal may influence perimysium stiffness and concur to the delayed recovery by defects in transmission of tensile force in response to remobilization (Kjaer, 2004). Predictions indicated that changing muscle fiber length would not affect the endomysium thickness (Trotter & Purslow, 1992), but may influence the orientation of collagen fibers (Purslow & Trotter, 1994). Thus, in our model, immobilizing the TA muscle in a lengthened position may have induced changes in collagen fiber orientation of endomysium without changing the overall thickness. Mechanical forces

are co-ordinated and passed between adjacent muscle cells via cell-matrix interactions and the endomysial connective tissue that links cells together (Purslow, 2002). Thus, the thickening of endomysium during remobilization suggests an adaptive response to sudden forces experienced by the muscle when cast is removed. However, the nature of the transition between endomysium the perimysium structures and how they interact for force transmission along and across muscle fibers are still open questions (Gillies & Lieber, 2011). Finally, additional ECM branching prevailed during early recovery suggesting a major remodeling of the ECM.

We report that mRNA levels for the two matricellular proteins tenascin-C and Sparc increased immediately after remobilization. Previous reports showed that induction of Tenascin-C prevailed after 24h of reloading in soleus muscles of hindlimb suspended rats (Fluck *et al.*, 2003) and orchestrated muscle repair (Fluck *et al.*, 2008). Moreover, the thickening of endomysium after cast removal in our study suggests a large remodeling of this compartment and is in agreement with Flück *et al.* (Fluck *et al.*, 2003) indicating that the tenascin-C induction occurred within the endomysium during reloading. Sparc is involved in muscle regeneration, by inducing myogenic factors expression (Cho *et al.*, 2000). Its induction immediately after cast removal suggests that regeneration processes were early initiated to favor muscle repair. However, Myf5 and MyoD mRNA levels already increased during immobilization when Sparc did not change. In addition, we previously reported that Myf5 protein levels decreased in the immobilized gastrocnemius muscle at I8 (Vazeille *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2011). Changes in mRNA and protein levels did not strictly correlate because of different half-lives (Schwanhaeusser *et al.*, 2011). Nevertheless, we cannot exclude that the myogenic factors could be differentially affected in fast- and slow-twitch muscles. In fact, muscle regeneration in EDL and soleus muscles following denervation occurred from intrinsically different satellite cells (Kalhovde *et al.*, 2005). Thus, the TA may

exhibit specific adaptations in response to mechanical stress (i.e. immobilization and lengthening) with activation of satellite cells differentiation and/or proliferation. The up-regulation of sparc and tenascin-C immediately after cast removal suggests that ECM structural and qualitative changes may play an important role in muscle recovery.

ECM plays also key roles in signal transduction to muscle cells. For example, Sparc can induce phosphorylation of Akt in an ILK dependent manner (Shi *et al.*, 2007). Here, we report increased mRNA levels for integrin- α 7 and - β 1 in immobilized TA, concomitantly with elevated mRNA and protein levels for ILK. Even mRNA levels for ILK were normalized at R6, protein levels remained elevated until R10. This suggests that signal transduction through integrins may be induced in response to immobilization and remobilization. ILK is involved in the phosphorylation of Akt (Fukuda *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2007). Thus, its up-regulation suggested an increased phosphorylation of Akt that may ultimately lead to decreased activity of UPS. However, we report here a concomitant increase in UPS proteolysis and in ILK protein levels in immobilized TA. Overall, the data suggest that the Akt/FoxO3 pathway is targeted by ILK during immobilization and/or that ILK play a role in muscle atrophy and recovery through alternative pathways, such as regeneration processes. In fact, ILK repressed the initiation of terminal myogenic differentiation, but is required for normal morphogenesis of myotubes, suggesting that ILK functions not only in the initial decision making process, but also in later stages (fusion or maintaining myotube integrity) of myogenic differentiation (Huang *et al.*, 2000). The concomitant activation of ILK and Sparc during remobilization may induce alternative signaling pathways such as the Wnt/ β -catenin pathway (Brekken & Sage, 2000; Oloumi *et al.*, 2004; Nie & Sage, 2009) that regulate myogenesis (Cossu & Borello, 1999; Nastasi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008; Otto *et al.*, 2008).

In conclusion, this work shows that the thickening of connective tissue results from adaptations in the perimysium and endomysium during immobilization and remobilization,

respectively, and correlated with muscle fiber atrophy and deformation. Our study also strongly suggests that the outside-in signaling through integrins was activated in response to immobilization and remobilization and may regulate muscle regeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Arlette Cissoire, Benoit Cohade, and Philippe Lhoste from the UEN (INRA Clermont-Ferrand-Theix, France) for excellent assistance with animal care. We are grateful to Marianne Jarzaguet and Cécile Coudy for their help during animal slaughtering and for sample care. We also thank Isabelle Cassar-Malek, Geoffrey Delcros, Jean-Yves Exposito, and Geneviève Gentes for q-RTPCR measurements.

GRANTS

This study was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique, the Association Française contre les Myopathies, and the Société Française de Nutrition. LS was supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

DISCLOSURE

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: A.L., D.A., L.C., and L.S. conception and design of research; C.D., J.A., and L.S. performed experiments; B.M., C.D., D.M., J.A., and L.S. analyzed data; C.D., J.A., L.C., and L.S. interpreted results of experiments; J.A., L.C., and L.S. prepared figures; L.C. and L.S. drafted manuscript; A.L., B.M., D.A., D.D., D.T., L.C., and L.S. edited and revised manuscript. A.L., D.A., L.C., and L.S. approved final version of manuscript.

REFERENCE LIST

1. **Attaix D, and Bechet D.** FoxO3 controls dangerous proteolytic liaisons. *Cell Metab* 6: 425-427, 2007.
2. **Brekken RA, and Sage EH.** SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol* 19: 569-580, 2000.
3. **Calve S, and Simon H-G.** Biochemical and mechanical environment cooperatively regulate skeletal muscle regeneration. *Faseb J* 26: 2538-2545, 2012.
4. **Carmignac V, and Durbeej M.** Cell-matrix interactions in muscle disease. *J Pathol* 226: 200-218, 2012.
5. **Cho WJ, Kim EJ, Lee SJ, Kim HD, Shin HJ, and Lim WK.** Involvement of SPARC in in vitro differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 630-634, 2000.
6. **Cifuentes-Diaz C, Faille L, Goudou D, Schachner M, Rieger F, and Angaut-Petit D.** Abnormal reinnervation of skeletal muscle in a tenascin-C-deficient mouse. *J Neurosci Res* 67: 93-99, 2002.
7. **Cossu G, and Borello U.** Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *Embo J* 18: 6867-6872, 1999.
8. **Flint F, and Pickering K.** Demonstration of collagen in meat-products by an improved picro-sirius red polarization method. *Analyst* 109: 1505-&, 1984.
9. **Fluck M, Chiquet M, Schmutz S, Mayet-Sornay MH, and Desplanches D.** Reloading of atrophied rat soleus muscle induces tenascin-C expression around damaged muscle fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R792-R801, 2003.
10. **Fluck M, Mund SI, Schittny JC, Klossner S, Durieux A-C, and Giraud M-N.** Mechano-regulated Tenascin-C orchestrates muscle repair. *Proc Nat Acad Sci U S A* 105: 13662-13667, 2008.

11. **Fluck M, Schmutz S, Wittwer M, Hoppeler H, and Desplanches D.** Transcriptional reprogramming during reloading of atrophied rat soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R4-R14, 2005.
12. **Fukuda T, Chen K, Shi XH, and Wu CY.** PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J Biol Chem* 278: 51324-51333, 2003.
13. **Gillies AR, and Lieber RL.** Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve* 44: 318-331, 2011.
14. **Glass DJ.** PI3 Kinase Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. In: *Phosphoinositide 3-Kinase in Health and Disease, Vol 1*, edited by Rommel C, Vanhaesebroeck B, and Vogt PK 2010, p. 267-278.
15. **Hannigan GE, McDonald PC, Walsh MP, and Dedhar S.** Integrin-linked kinase: Not so 'pseudo' after all. *Oncogene* 30: 4375-4385, 2011.
16. **Huang Y, Li J, Zhang YJ, and Wu CY.** The roles of integrin-linked kinase in the regulation of myogenic differentiation. *J Cell Biol* 150: 861-871, 2000.
17. **Joshi MB, Ivanov D, Philippova M, Erne P, and Resink TJ.** Integrin-linked kinase is an essential mediator for T-cadherin-dependent signaling via Akt and GSK3 beta in endothelial cells. *Faseb J* 21: 3083-3095, 2007.
18. **Kalhovde JM, Jerkovic R, Sefland I, Cordonnier C, Calabria E, Schiaffino S, and Lomo T.** 'Fast' and 'slow' muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. *J Physiol* 562: 847-857, 2005.
19. **Kim C-H, Neiswender H, Baik EJ, Xiong WC, and Mei L.** beta-catenin interacts with MyoD and regulates its transcription activity. *Mol Cell Biol* 28: 2941-2951, 2008.
20. **Kjaer M.** Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84: 649-698, 2004.

21. **Livak KJ, and Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
22. **Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Claustre A, Attaix D, Anne L, Sante-Lhoutellier V, Gatellier P, Dardevet D, and Combaret L.** Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways. *J Physiol* 589: 511-524, 2011.
23. **Maier S, Lutz R, Gelman L, Sarasa-Renedo A, Schenk S, Grashoff C, and Chiquet M.** Tenascin-C induction by cyclic strain requires integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1783: 1150-1162, 2008.
24. **Miller MG, Naruszewicz I, Kumar AS, Ramlal T, and Hannigan GE.** Integrin-linked kinase is a positive mediator of L6 myoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 796-803, 2003.
25. **Nastasi T, Bongiovanni A, Campos Y, Mann L, Toy JN, Bostrom J, Rottier R, Hahn C, Conaway JW, Harris AJ, and d'Azzo A.** Ozz-E3, a muscle-specific ubiquitin ligase, regulates beta-catenin degradation during myogenesis. *Dev Cell* 6: 269-282, 2004.
26. **Nie J, Chang B, Traktuev DO, Sun J, March K, Chan L, Sage EH, Pasqualini R, Arap W, and Kolonin MG.** IFATS Collection: Combinatorial Peptides Identify alpha 5 beta 1 Integrin as a Receptor for the Matricellular Protein SPARC on Adipose Stromal Cells. *Stem Cells* 26: 2735-2745, 2008.
27. **Nie J, and Sage EH.** SPARC Inhibits Adipogenesis by Its Enhancement of beta-Catenin Signaling. *J Biol Chem* 284: 1279-1290, 2009.
28. **Oloumi A, McPhee T, and Dedhar S.** Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1691: 1-15, 2004.

29. **Otto A, Schmidt C, Luke G, Allen S, Valasek P, Muntoni F, Lawrence-Watt D, and Patel K.** Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J Cell Sci* 121: 2939-2950, 2008.
30. **Purslow PP.** The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comp Biochem Physiol A-Mol Integr Physiol* 133: 947-966, 2002.
31. **Purslow PP, and Trotter JA.** The morphology and mechanical-properties of endomysium in series-fibered muscles-variations with muscle length *J Muscle Res Cell Motil* 15: 299-308, 1994.
32. **Qian Y, Zhong XS, Flynn DC, Zheng JZ, Qiao M, Wu CY, Dedhar S, Shi XL, and Jiang BH.** ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene* 24: 3154-3165, 2005.
33. **Riaz A, Zeller KS, and Johansson S.** Receptor-Specific Mechanisms Regulate Phosphorylation of AKT at Ser473: Role of RICTOR in beta 1 Integrin-Mediated Cell Survival. *PLoS One* 7: 2012.
34. **Schwanhaeusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, and Selbach M.** Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473: 337-342, 2011.
35. **Shi Q, Bao S, Song L, Bigner DD, Hjelmeland AB, and Rich JN.** Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene* 26: 4084-4094, 2007.
36. **Slimani L, Micol D, Amat J, Delcros G, Meunier B, Taillandier D, Polge C, Bechet D, Dardevet D, Picard B, Attaix D, Lustrat A, and Combaret L.** The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis and apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, in press, 2012.

37. **Trotter JA, and Purslow PP.** Functional-morphology of the endomysium in series fibered muscles. *J Morphol* 212: 109-122, 1992.
38. **Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Attaix D, and Combaret L.** The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1181-E1190, 2008.
39. **Vazeille E, Slimani L, Claustre A, Magne H, Labas R, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Astruc T, Attaix D, and Combaret L.** Curcumin treatment prevents increased proteasome and apoptosome activities in rat skeletal muscle during reloading and improves subsequent recovery. *J Nutr Biochem* 23: 245-251, 2012.
40. **Wang H-V, Chang L-W, Brixius K, Wickstroem SA, Montanez E, Thievensen I, Schwander M, Mueller U, Bloch W, Mayer U, and Faessler R.** Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *J Cell Biol* 180: 1037-1049, 2008.
41. **Weaver MS, Workman G, and Sage EH.** The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta 1 and activation of integrin-linked kinase. *J Biol Chem* 283: 22826-22837, 2008.
42. **Wickstroem SA, Lange A, Montanez E, and Faessler R.** The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase! *Embo J* 29: 281-291, 2010.
43. **Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, and Goldberg AL.** FoxO3 coordinately activates protein degradation by the Autophagic/Lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* 6: 472-483, 2007.

44. **Zhou J, Liao W, Yang J, Ma K, Li X, Wang Y, Wang D, Wang L, Zhang Y, Yin Y, Zhao Y, and Zhu W.** FOXO3 induces FOXO1-dependent autophagy by activating the AKT1 signaling pathway. *Autophagy* 8: 2012.

FIGURE CAPTIONS

Fig 1. Tibialis anterior (TA) muscle exhibited changes in fiber cross-section area (CSA) and shape factor during early recovery after immobilization. TA muscle sections were stained for fiber area and shape factor with Sirius Red. Image analysis of CSA (A) and shape factor (B) from immobilized (open squares, Imm) and contralateral control (filled circles, Con) muscles was performed as described in the Methods. I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1-R10, 1-10 days, respectively, of recovery from hindlimb immobilization after cast removal. Values are means $\pm$ SE (vertical bars) for $n = 8$ rats per group. $^*P < 0.05$ vs. contralateral control muscle at the same time point; $^{\#}P < 0.05$ vs. I0.

Fig. 2. Tibialis anterior (TA) muscle exhibited thickening of perimysium and endomysium areas during immobilization and recovery, respectively, and increased ramification of extracellular matrix (ECM). TA muscle sections were stained for extracellular matrix study with Sirius Red. Image analysis of perimysium (A) Endomysium (B) areas and ECM triple points (C) of immobilized (open squares, Imm) and contralateral control (filled circles, Con) muscles was performed as described in the Methods. I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1-R10, 1-10 days, respectively, of recovery from hindlimb immobilization after cast removal. Values are means $\pm$ SE (vertical bars) for $n = 8$ rats per group. $^*P < 0.05$ vs. control non immobilized muscle at the same time point; $^{\#}P < 0.05$ vs. I0; $^{\S}P < 0.05$ vs. I8 for same leg Imm or Con.

Fig. 3. Changes in mRNA levels for Decorin, Sparc and Tenascin-C in the immobilized and remobilized tibialis anterior (TA). mRNA levels for Decorin (A), Sparc (B) and Tenascin-C

(C) were measured by q-RTPCR (see Methods) in immobilized and contralateral control TA muscles. I0, non-casted controls; I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data were normalized using 18S rRNA and are expressed as fold induction compared to I0 group. Data are means $\pm$ SE (vertical bars) for n=4-5 rats. $^*P < 0.05$ vs. contralateral controls; $^{\#}P < 0.05$ vs. I0; $^{\S}P < 0.05$ vs. I8 for the same leg treatment.

Fig. 4. Changes in mRNA levels for MyoD and Myf- α 5 in the immobilized and remobilized tibialis anterior (TA). mRNA levels for MyoD (A) and Myf-5 (B) were measured by q-RTPCR (see Methods) in immobilized and contralateral control TA muscles. I0, non-casted controls; I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data were normalized using 18S rRNA and are expressed as fold induction compared to I0 group. Data are means $\pm$ SE for n=4-5 rats. $^*P < 0.05$ vs. contralateral controls; $^{\#}P < 0.05$ vs. I0; $^{\S}P < 0.05$ vs. I8 for the same leg treatment.

Fig. 5. Changes in mRNA levels for integrins in the immobilized and remobilized tibialis anterior (TA). mRNA levels for Integrin- α 7 (A) and Integrin- β 1 (B) were measured by q-RTPCR (see Methods) in immobilized and contralateral control TA muscles. I0, non-casted controls; I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Data were normalized using 18S rRNA and are expressed as fold induction compared to I0 group. Data are means $\pm$ SE for n=4-5 rats. $^*P < 0.05$ vs. contralateral controls; $^{\#}P < 0.05$ vs. I0; $^{\S}P < 0.05$ vs. I8 for the same leg treatment.

Fig. 6. Changes in mRNA levels and/or protein level for Integrin-Linked Kinase (ILK), PINCH and Parvin- α in the immobilized and remobilized tibialis anterior (TA). mRNA levels for ILK (A), PINCH (C) and Parvin- α (D) were measured by q-RTPCR (see Methods) in

immobilized and contralateral control TA muscles. Protein levels for ILK (B) were assessed by Western blots (see Methods). I0, non-casted controls; I8, 8 days of hindlimb immobilization; R1 to R10, recovery period in days after cast removal. Q-PCR data were normalized using 18S rRNA, are expressed as fold induction compared to I0 group and are means $\pm$ SE for n=4-5 rats. ILK protein levels were normalized using Ponceau red staining for uneven loading, are expressed as arbitrary units as means $\pm$ SE for n=8-10 rats. * P < 0.05 vs. contralateral controls; # P < 0.05 vs. I0; § P < 0.05 vs. I8 for the same leg treatment.

Table 1. *Primers used for quantitative RT-PCR analysis.*

Primer names	Accession number	Primer sens sequences	Primer antisens sequences
ILK	NM_133409	5'-GCACGCACTCAATAGCCGTA-3'	5'-ACCCAGGCAGGTGCATACAT-3'
Itg β 1	NM_017022	5'-TGGGCACACTGTCTGGAAAC-3'	5'-CTCCATCTGGCAATTTGCTG-3'
Itg α 7	NM_030842	5'-CATTGATCCAAGAGCCATCG-3'	5'-GCTGGGCACAGCAACATAAC-3'
Lims1 (Pinch)	NM_001145456	5'-GATGGGGGTCCCTATCTGTG-3'	5'-GGCACAAACAAAATGCTCCA-3'
Sparc	NM_12656	5'-TGGACTACATCGGACCATGC-3'	5'-TGACCAGGACGTTTTTGAGC-3'
Myod1	NM_176079	5'-CTGCTCTGATGGCATGATGG-3'	5'-ACTGTAGTAGGCGGCGTCGT-3'
Myf5	NM_001106783	5'-TGTCTGGTCCCGAAAGAACA-3'	5'-CAAGCAATCCAAGCTGGACA-3'
Dcn	NM_024129	5'-AGTTGGGCAGCATGACTTCT-3'	5'-TCTGAAGGTGTGTGGGTGAA-3'
Tn-C	NM_053861	5'-GCATGGTCACTGGATACCT-3'	5'-CAGGCTGTAGGAGGTGGTGT-3'
18S rRNA	NR_046237	5'-AATCAGTTATGGTTCCTTTGTCG-3'	5'-GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA-3'

ILK= Integrin-Linked Kinase; Itg= Integrin; Lims1= Pinch; Myf5= Myogenic factor 5; Sparc= Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine;

Dcn= Decorin, Tn-C= Tenascin-C

Table 2. *Tibialis muscle mass following immobilization and remobilization*

Stage	Con	Imm
I0	0.801 ± 0.017 ^a	
I8	0.708 ± 0.022 ^b	0.656 ± 0.014 ^c
R1	0.725 ± 0.018 ^b	0.618 ± 0.023 ^{cd}
R6	0.768 ± 0.026 ^{ab}	0.519 ± 0.021 ^e
R10	0.824 ± 0.024 ^a	0.603 ± 0.020 ^d

Values are means ± SE for n=10-11 rats. Con TA, contralateral tibialis anterior; Imm TA, immobilized tibialis anterior. I0, before hindlimb casting; I8, immobilized for 8 days; R1-R10, remobilized for 1-10 days. Data with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$) within a same column or line.

Figure 1: Tibialis anterior (TA) muscle exhibited changes in fiber cross-section area and shape factor during early recovery after immobilization.

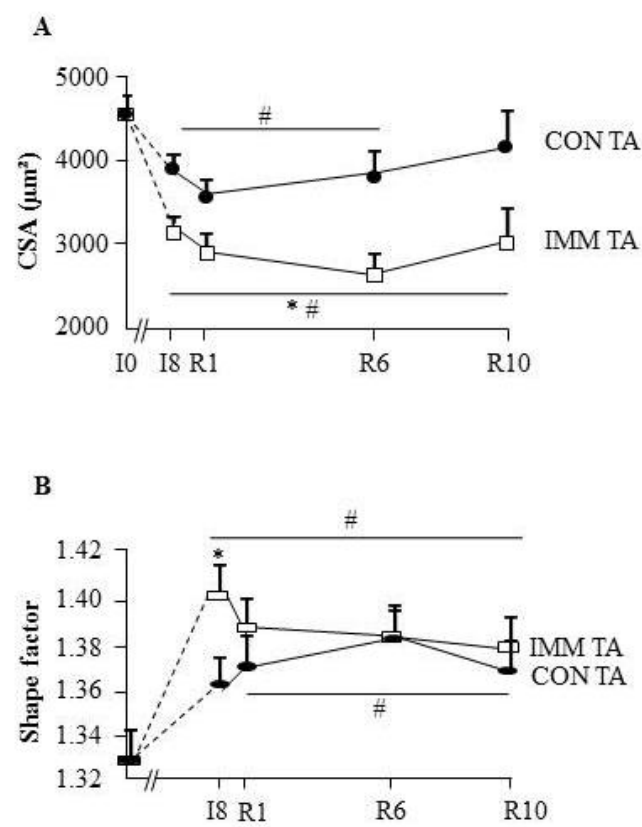


Figure 2: Tibialis anterior (TA) muscle exhibited thickening of perimysium and endomysium areas during immobilization and recovery, respectively, and increased ramification of extracellular matrix (ECM).

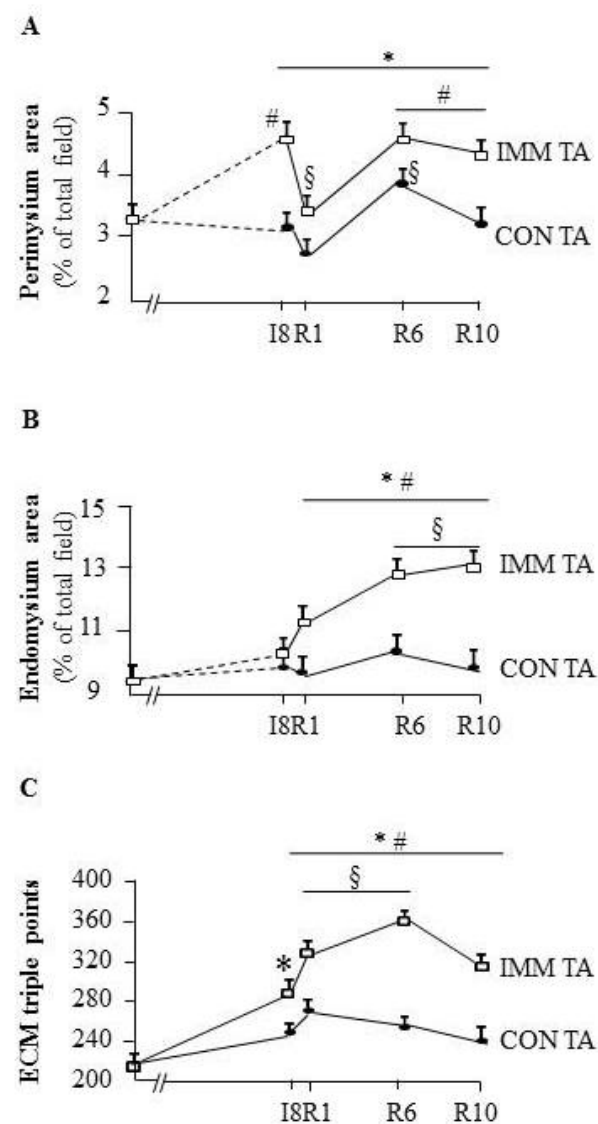


Figure 3: Changes in mRNA levels for Decorin, Sparc and Tenascin-C in the immobilized and remobilized tibialis anterior (TA).

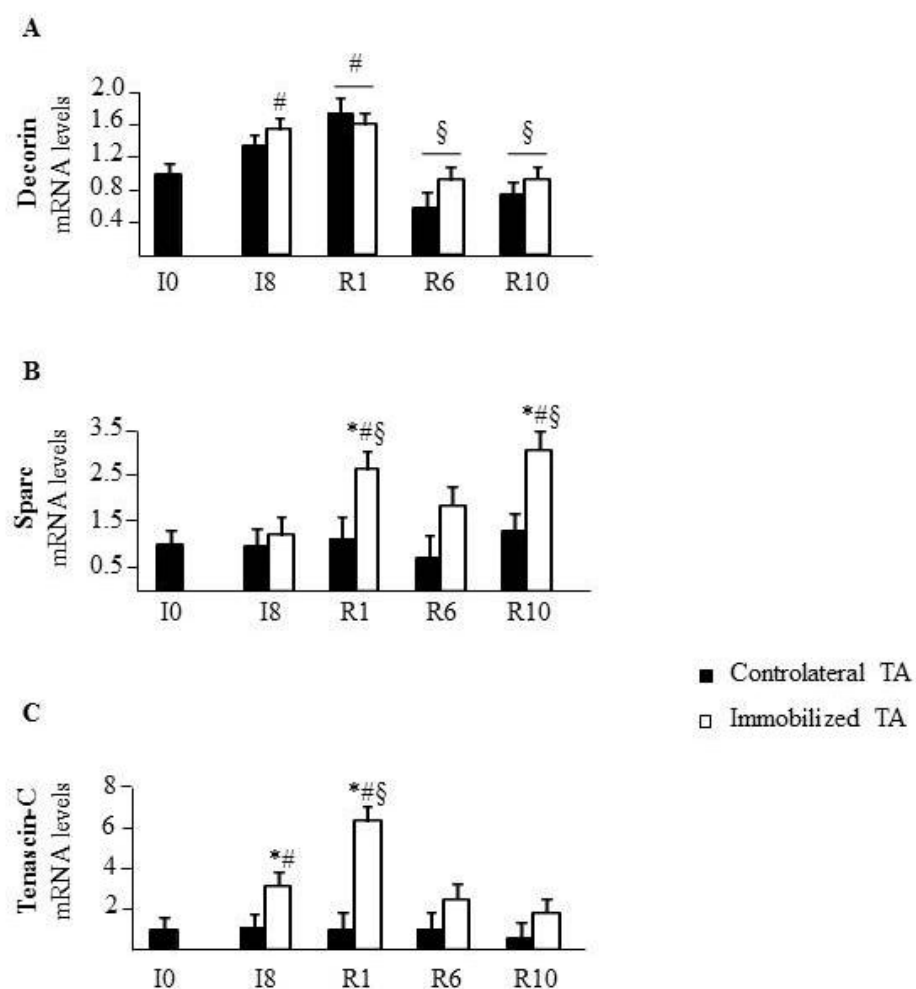


Figure 4: Changes in mRNA levels for MyoD and Myf- α 5 in the immobilized and remobilized tibialis anterior (TA).

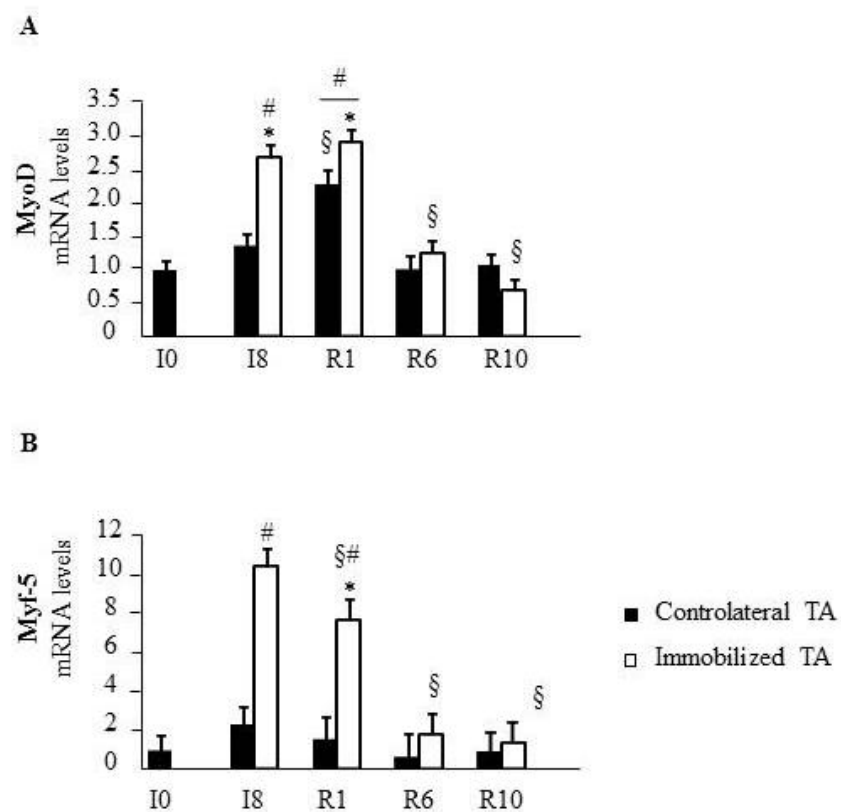


Figure 5: Changes in mRNA levels for integrins (ITG) in the immobilized and remobilized tibialis anterior (TA).

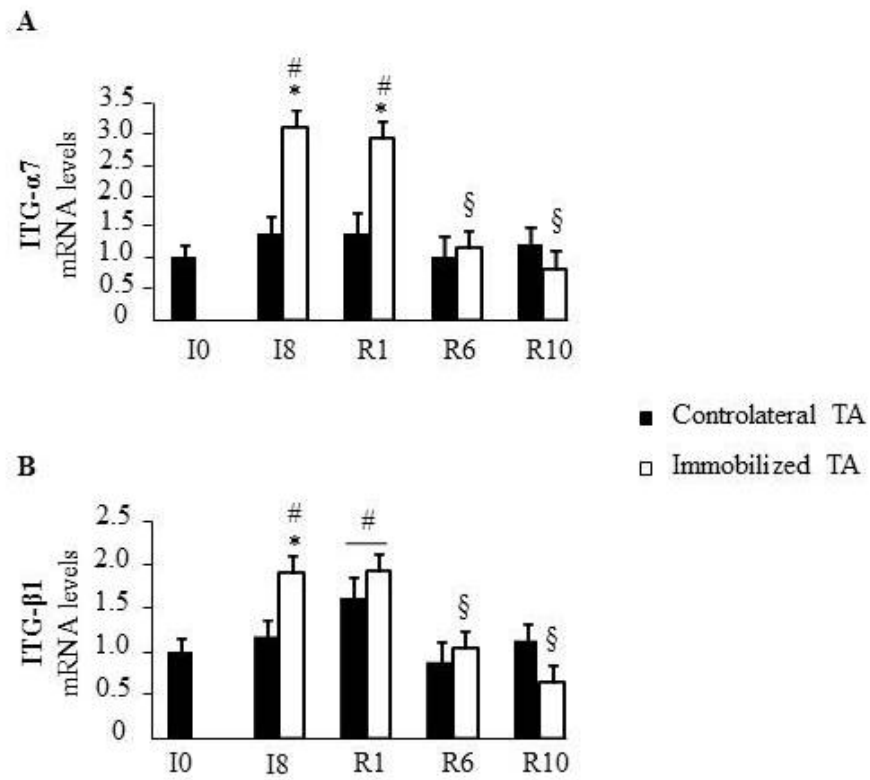
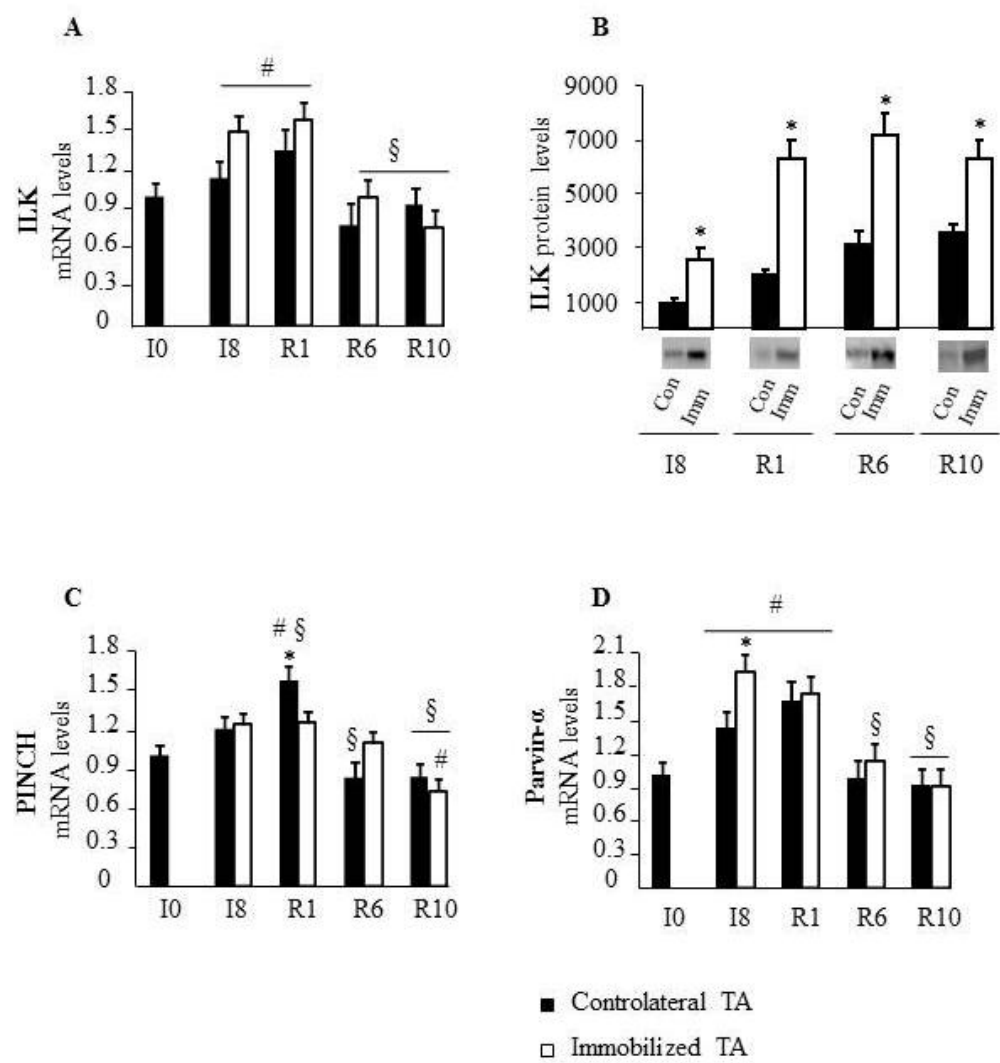


Figure 6: Changes in mRNA levels and/or protein level for Integrin-Linked Kinase (ILK), PINCH and Parvin- α in the immobilized and remobilized tibialis anterior (TA)



Discussion générale

Les objectifs de ma thèse étaient de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les processus de pertes et de récupération dans les muscles TA et GA immobilisés en position étirée et raccourcie respectivement en étudiant :

- 1/ les modifications subies par la MEC,
- 2/ les processus protéolytiques et apoptotiques, et
- 3/ les voies de signalisation impliquant les intégrines permettant d'établir un lien entre la MEC et le compartiment intracellulaire.

L'immobilisation par plâtrage et le stress chez le rat.

- ***Choix du modèle***

Plusieurs modèles sont utilisés dans la littérature pour étudier les conséquences de l'inactivité physique chez l'animal. Il s'agit du modèle de dénervation (section du nerf dorsal ou sciatique), l'immobilisation par plâtrage ou encore le modèle d'apesanteur simulée (des pattes postérieures). Nous avons sélectionné le modèle d'immobilisation par plâtrage parce que 1/ c'est le modèle qui s'approche le plus des situations d'inactivité physique rencontrées chez l'Homme et que 2/ c'est un modèle non pathologique et réversible qui nous permettra d'étudier les phases d'atrophie et également les phases de récupération musculaire.

- ***Etat de stress des rats***

L'immobilisation par plâtrage est considérée comme une contrainte de degré 3 dans la classification prospective des expériences sur animaux de l'office vétérinaire fédéral. Les animaux plâtrés ont été surveillés quotidiennement pour évaluer la présence éventuelle d'œdèmes, de gonflements ou de rougeurs au niveau des pattes immobilisées. Dans ce cas, ils ont été déplâtrés et replâtrés sous anesthésie. Ces anesthésies successives et l'immobilisation des rats peuvent contribuer à la baisse de la consommation alimentaire observée chez les rats au cours de la période d'immobilisation. Cependant, des études réalisées précédemment au laboratoire ont évalué le stress lié au plâtrage notamment en mesurant le poids des surrénales comme indicateur du stress chez des rats âgés soumis à une immobilisation unilatérale. Le poids des surrénales chez ces animaux n'était pas différent de celui mesuré chez des rats non plâtrés. Ceci suggérerait donc que le stress ne serait pas généralisé. Cependant, d'autres marqueurs de stress comme le cortisol, l'ACTH (adrénocorticotrophine) ou l'adrénaline pourraient être évalués. De plus, les rats n'ont diminué que faiblement leur prise alimentaire

pendant l'immobilisation, ce qui a entraîné une faible baisse des poids corporel (-3%, non significative) (Cf. Article1 (Figure 1)), suggérant que les rats ont été peu stressés au cours de notre protocole expérimental.

Impact de l'immobilisation sur le tissu conjonctif et les fibres musculaires.

- ***Notre étude indique que des modifications importantes de la structure du tissu conjonctif sont corrélées à l'aggravation du TA pendant la remobilisation.***

Dans notre étude, le GA s'est atrophié pendant la période d'immobilisation de manière plus importante comparé au TA. Ceci est cohérent avec de précédentes données qui montraient également une aggravation de l'atrophie du TA après déplâtreage alors que celle du GA se stabilisait (Vazeille et al. 2008). Ici, nous montrons que l'atrophie du TA s'est aggravée dès le premier jour après déplâtreage et s'est accentuée jusqu'à R6, ce qui suggère un remodelage important au niveau de la structure de ce muscle. L'atrophie du TA pendant l'immobilisation et la récupération est corrélée à une diminution de l'aire des fibres musculaires. De plus, nous montrons une augmentation de l'aire du tissu conjonctif pendant l'immobilisation qui s'est accentuée après déplâtreage. Cet épaississement est caractérisé par une augmentation de l'aire du périmysium sans modification de l'aire de l'endomysium pendant la période d'immobilisation, et inversement pendant la période de récupération. Ces données sont en accord avec un modèle géométrique, établi par Trotter & Purslow en 1992, qui prédisait une absence de modification de l'épaisseur de l'endomysium en réponse à un changement de la longueur des fibres (Trotter & Purslow, 1992). Par contre, la longueur musculaire aurait un impact sur l'orientation des fibres de collagènes (Purslow & Trotter, 1994). Il est donc possible que l'immobilisation en position étirée du TA ait provoqué des changements en termes d'orientation des fibres de collagènes de l'endomysium sans en modifier l'épaisseur globale. L'épaississement du périmysium pourrait être un processus adaptatif pour éviter des forces de tension trop importantes au niveau des fibres. En effet, en 1989, Purslow décrivait que le rôle du réseau de collagène perimysial serait d'éviter un étirement excessif des faisceaux de fibres musculaires (Purslow, 1989). Son épaississement dans le TA pendant l'immobilisation se maintient après déplâtreage, impliquant probablement des changements de sa rigidité. Ceci pourrait concourir à retarder la récupération de la force musculaire par des modifications de transmission des forces de tension en réponse à la remobilisation (Kjaer, 2004). Enfin, l'épaississement de l'endomysium observé en réponse à la remobilisation pourrait résulter de la soumission brutale du muscle à des forces de tension importantes au

moment du déplâtre. Cependant, il est difficile de conclure quant au rôle de l'épaississement du périmysium et de l'endomysium pendant l'immobilisation et la remobilisation, la nature de la transition et des connections entre les différentes structures (i.e. endomysium, périmysium, épimysium et tendon) étant toujours une inconnue (Gillies & Lieber, 2011).

- ***Ces modifications sont corrélées à des modifications du remodelage des collagènes pendant l'immobilisation et la récupération.***

L'augmentation des niveaux d'ARNm codant pour certains collagènes (Col-XIIa1, Col-IVa1, Col-XVIII) et inhibiteurs des MMPs à la fin de la période d'immobilisation suggère une augmentation de dépôt de collagène pouvant conduire à l'épaississement du tissu conjonctif. En revanche, après déplâtre, l'épaississement additionnel du tissu conjonctif est associé à une augmentation des niveaux d'ARNm du collagène fibrillaire majoritaire (i.e. Col-Ia1). De plus, l'expression des ARNm codant pour les MMP-2 et -14 a également augmenté après remobilisation du TA, suggérant un remodelage au niveau de la MEC dans ce muscle. Par conséquent, l'épaississement du tissu conjonctif observé dans le TA remobilisé résulterait d'un déséquilibre entre la synthèse du collagène et sa dégradation.

Nos données montrent également que l'augmentation de l'apoptose dans le TA pendant l'immobilisation et la récupération est localisée au niveau du compartiment extracellulaire.

Ceci est cohérent avec des données de la littérature qui suggèrent que l'apoptose n'a pas lieu dans les fibres au cours des atrophies musculaires, mais plutôt dans l'espace interstitiel (Sandri *et al.*, 1998; Vescovo *et al.*, 1998) et serait confinée aux cellules stromales et aux cellules satellites (Bruusgaard & Gundersen, 2008). Dans notre modèle, l'apoptose aurait lieu également au niveau des cellules stromales (fibroblastes ou cellules endothéliales). L'immobilisation est un modèle pouvant présenter des infiltrations de cellules inflammatoires comme en témoigne l'augmentation des marqueurs de l'inflammation précédemment démontré dans ce modèle au laboratoire (Magne *et al.*, 2011). Les cellules en apoptose pourraient donc également correspondre à des leucocytes ou des macrophages. Cependant, il pourrait s'agir également de cellules satellites. Ces dernières sont normalement localisées entre la membrane plasmique et la lame basale. Sachant que la laminine est un des constituants de la lame basale et que le marquage est situé à l'extérieur de la laminine, les

cellules satellites ne devraient donc pas être affectées par l'apoptose, sauf celles activées, qui elles, peuvent migrer à travers la lame basale (Hughes & Blau, 1990).

Ces données suggèrent un remodelage important dans le tissu conjonctif du TA, qui pourrait avoir un impact sur les capacités de régénération du muscle et/ou sur sa micro-vascularisation.

Nos travaux montrent que l'aggravation de l'atrophie du TA pendant la récupération s'accompagne d'une redistribution des chaînes lourdes de myosines.

Les myosines représentent les protéines contractiles majeures du muscle et conditionnent ses propriétés métaboliques et contractiles. Nos données montrent que la proportion des MyHC de type IIb diminue, tandis que celle des autres isoformes (I, IIa et IIx) augmente uniquement dans le TA immobilisé. Ce résultat est en accord avec des travaux réalisés dans le TA chez le rat suspendu (Cornachione *et al.*, 2011). De plus, nos données ne montrent pas de changements dans la redistribution des MyHC dans le GA alors que plusieurs études décrivent une modification de la proportion des différentes MyHC au cours de l'inactivité physique. Cependant, les transitions des MyHC ne sont pas clairement définies dans la littérature. En effet, la proportion des différentes MyHC dans le GA ou le soleus (situés dans la même loge) est modifiée après 2-4 semaines de suspension ou d'immobilisation chez le rat, mais de manière différente, même au sein d'un même modèle d'inactivité physique. Par exemple, Desaphy *et al.* 2010 ont montré une stabilisation de la proportion des MyHC I, IIa et IIx ainsi qu'une augmentation des IIb dans le muscle GA de souris soumises à 2 semaines de suspension. Alors que Cornachione *et al.* 2011, 2012 ont montré une baisse de la proportion des MyHC de type I et une augmentation de la proportion des MyHC de type IIa dans le muscle Soleus de rats suspendus pendant 4 semaines. Ces données suggèrent que la durée d'immobilisation, le type de modèle utilisé et la position d'immobilisation joueraient un rôle dans le type de transition de MyHC qui peut avoir lieu dans les muscles.

Nous montrons également que ces modifications de proportion des différentes isoformes de MyHC se poursuivent pendant la remobilisation dans le TA à partir de R6, au moment où l'atrophie musculaire du TA atteint son maximum. Ces données suggèrent une transition dans les propriétés métaboliques et contractiles des fibres allant des fibres glycolytique à contraction rapide vers des fibres oxydatives à contraction lente. Cette transition pourrait influencer l'évolution d'atrophie du TA lors de l'immobilisation et de la récupération. En effet, les fibres exprimant principalement les MyHC de type I semblent être une cible

principale pour les augmentations de protéolyse, au moins dans le modèle de suspension (Baldwin & Haddad, 2002).

De plus, les cellules satellites sont altérées différemment (entrée en apoptose, activité de prolifération) dans les muscles composés de fibres « lentes » ou « rapides » (Hawke & Garry, 2001). Ce résultat suggère une relation forte entre la fonction des cellules satellites et le type de fibres. Par ailleurs, les fibres musculaires peuvent se régénérer à partir des cellules satellites intrinsèquement différentes dans les muscles à contraction "rapide" et "lente" (Kalhovde *et al.*, 2005). Considérées ensemble, ces données suggèrent que la redistribution des chaînes lourdes de myosine observée dans le TA pourrait être une réponse secondaire à des altérations spécifiques au niveau des cellules satellites.

Rôle de la voie UPS et de l'apoptose pendant l'atrophie et la récupération musculaire suite à l'immobilisation.

Nos travaux montrent que le GA immobilisé en position raccourcie s'atrophie plus, à I8, que le muscle TA immobilisé en position étirée, en accord avec la littérature (Goldspink, 1977; Booth, 1982; Vazeille *et al.*, 2008; Fujita *et al.*, 2009). Cependant, le système UPS semble être activé dans ces deux muscles mais à des niveaux différents. En effet, les niveaux d'ARNm codant pour les enzymes E3 ligases MURF1 et MAFbx ont été fortement augmentés dans le GA sans modification dans le TA. Inversement, les niveaux protéiques de MURF1 ont été beaucoup plus augmentés dans le TA que dans le GA. Ceci suggère que l'étape d'ubiquitinylation serait induite dans les muscles immobilisés GA et TA à I8 mais via des régulations transcriptionnelle ou pré-traductionnelle dans le GA et post-traductionnelle dans le TA. De plus, les activités du protéasome n'ont été augmentées que dans le TA sans modification dans le GA à I8. L'induction du système UPS dans le GA serait donc principalement liée à l'activation de l'étape d'ubiquitinylation, alors que dans le TA, les deux étapes pourraient être régulées et ceci au niveau post-traductionnel.

De plus, nos données montrent une forte augmentation des niveaux de transcrits de LC3b et de Beclin-1 dans le GA immobilisé à I8, sans variation dans le TA. Ceci suggère une stimulation de l'autophagie au cours de l'immobilisation dans le GA, ce qui pourrait contribuer à la perte de masse musculaire plus importante dans le GA à I8 par rapport au TA. Malgré tout, les mesures réalisées sont ponctuelles alors que l'atrophie des muscles enregistrée au même jour est la résultante de l'accumulation des pertes de masse musculaire entre I0 et I8. Il est possible que des changements d'activité et/ou de contenu protéique et

ARNm se produisent plus précocement, comme décrit par le groupe de Lang en 2012 (Lang *et al.*, 2012a) et influence le degré d'atrophie musculaire.

Enfin, nous ne pouvons pas exclure non plus le rôle de la synthèse protéique dans la fonte musculaire du GA et du TA à I8. Le TA est immobilisé en position étirée et le GA en position raccourcie. Or, la position d'immobilisation semble influencer le métabolisme protéique. Des données de la littérature montrent que 1/ la synthèse protéique serait stimulée dans les muscles immobilisés en position étirée alors qu'elle serait réduite dans les muscles immobilisés en position raccourcie (Goldspink, 1977; Lang *et al.*, 2012a) et que 2/ la protéolyse est plus activée dans les muscles immobilisés en position étirée que dans les muscles immobilisés en position raccourcie (Goldspink, 1977).

Ainsi, l'atrophie importante observée dans le GA à I8 pourrait résulter à la fois d'une induction de la protéolyse UPS et de l'autophagie, mais aussi d'une diminution de la synthèse protéique dans ce muscle. La moindre atrophie musculaire observée dans le TA pourrait résulter d'un maintien, voire d'une stimulation, de la synthèse protéique liés à la position étirée pendant l'immobilisation, et d'une augmentation de la protéolyse UPS.

Nos données montrent également que l'aggravation de l'atrophie musculaire du TA corrèle avec une activation persistante du système UPS. En effet, les niveaux d'ARNm des enzymes E3 ligases MURF1 et MAFbx sont restés élevés dans le GA remobilisé, mais ont été induits dans le TA remobilisé à R1 par rapport à I8. De plus, les niveaux protéiques de MURF1 sont restés élevés dans les muscles GA et TA remobilisés jusqu'à R8, mais de façon beaucoup plus importante dans le TA. Enfin, les activités du protéasome ont été induites dans le GA remobilisé à R1 et ont été normalisées plus précocement dans le GA remobilisé que dans le TA où elles sont restées très élevées jusqu'à R10. Ceci suggère donc que l'activation de la voie UPS pourrait contribuer à l'aggravation d'atrophie observée dans le TA au cours de la récupération.

Des marqueurs de l'autophagie ont été induits tardivement après remobilisation du TA. En effet, les niveaux d'ARNm codant pour Beclin-1 et LC3b augmentent ou tendent à augmenter respectivement à R6, au moment où l'atrophie du TA a atteint son maximum. L'autophagie étant un processus important pour le maintien de la masse musculaire, et notamment par son rôle dans le maintien de l'intégrité myofibrillaire (Masiero *et al.*, 2009). Ces données suggèrent une induction de l'autophagie après la période de remodelage intense au niveau musculaire ce qui pourrait permettre l'élimination d'organelles déficientes, et favoriser l'initiation des processus de régénération et de récupération musculaire.

Rôle des protéines matricielles Ténascine-C et Sparc dans la transduction de signaux de l'extra- vers l'intracellulaire.

- ***L'induction forte de ces protéines au moment du déplâtre dans le TA suggère un rôle dans les processus de remodelage musculaire en réponse à la remobilisation.***

Une forte augmentation des niveaux d'ARNm codant pour la ténascine-C et pour Sparc s'est installée entre I8 et R1 dans les muscles TA remobilisés, suggérant un possible réarrangement de la MEC et des modifications au niveau des interactions cellules-matrice au cours de la période de récupération. Ce résultat est en accord avec des données montrant une accumulation de la ténascine-C dans l'endomysium du muscle soleus des rats dès le premier jour de désuspension (Fluck *et al.*, 2003). Cette protéine est régulée par la charge mécanique au niveau musculaire et sa surexpression jouerait un rôle clé dans les cycles de dommages et réparation musculaire (Fluck *et al.*, 2008). De plus, l'augmentation de l'expression de la ténascine-C permettrait d'augmenter l'élasticité des tissus conjonctifs en réponse à un effort de tension important (Jarvinen *et al.*, 2003), comme au moment du déplâtre où les muscles sont soumis à nouveau à des contraintes mécaniques très importantes.

La ténascine-C et Sparc seraient impliquées dans la régénération musculaire et dans le contrôle de l'expression et de l'activité des facteurs myogéniques respectivement (Cho *et al.*, 2000; Cifuentes-Diaz *et al.*, 2002). Notre étude montre que les niveaux d'ARNm codant pour MyoD et de Myf5 ont augmentés dans le TA immobilisé à I8, alors que les niveaux protéiques de Myf5 avaient été décrits comme diminués dans le GA immobilisé (Vazeille *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2011). Ces facteurs sont responsables de l'entrée en différenciation/prolifération des cellules satellites, et les fibres musculaires « rapides » ou « lentes » pourrait régénérer à partir de cellules satellites intrinsèquement différentes après dénervation (Kalhovde *et al.*, 2005). Outre la possibilité que les facteurs myogéniques puissent être régulés de façon différente dans le TA et le GA en réponse à l'immobilisation, il est également possible que les niveaux protéiques et ARNm ne soient pas strictement corrélés en raison de ½ vies différentes (Schwanhaeusser *et al.*, 2011), ou de régulations fines au niveau pré- ou post-traductionnel. L'étude des processus de régénération musculaire pendant la remobilisation dans le TA nécessite d'être étudiée au niveau protéique et histologique en terme d'état de prolifération des cellules satellites.

- ***La forte induction de Sparc et de la ténascine-C dès la remobilisation corrèle avec des changements au niveau des intégrines et de leurs partenaires.***

Les niveaux des ARNm codant pour les intégrines- $\alpha 7$ et - $\beta 1$ augmentent dans le TA immobilisé à I8 et remobilisé à R1. Ces données suggèrent des adaptations au niveau membranaire pour la transduction des signaux de la MEC vers la cellule. Cependant, les intégrines sont activées notamment par des changements de conformation régulés par des interactions au niveau cytoplasmique avec des protéines inhibitrices (e.g. Sharpin) ou activatrices (e.g. Taline, Kindlin-2), et au niveau extracellulaire avec leurs ligands (e.g. Sparc, fibronectine...). Nos données montrent que les niveaux d'ARNm codant pour Sharpin augmentent dans le TA immobilisé à I8, mais également dans la patte controlatérale (Figure 12). Ceci ne permet donc pas de conclure quant à l'impact de l'immobilisation par lui-même, puisqu'un effet généralisé semble prévaloir pour ce marqueur. Ce type d'effet généralisé a déjà été rapporté au niveau de l'expression ARNm de certains marqueurs dans la jambe contralatérale après 4-11 jours d'immobilisation chez l'homme (Chen *et al.*, 2007). L'état d'activation des intégrines reste à explorer de façon plus approfondie notamment par l'étude d'activateurs, comme la taline.

Cependant, nos données suggèrent que la signalisation via les intégrines pourrait être augmentée pendant l'immobilisation dans le TA car les niveaux d'ARNm codant pour l'ILK et Parvin- α sont également induits pendant l'immobilisation. Si les régulations au niveau ARNm et protéines ne sont pas toujours strictement corrélées, notre étude montre néanmoins que le niveau protéique de l'ILK augmente fortement dans les muscles TA immobilisés et restent élevés pendant la remobilisation. Les niveaux protéiques de Pinch, Parvin- α et ILK dépendant les uns des autres (Fukuda *et al.*, 2003), ces données suggèrent que le complexe ILK/Pinch/parvin (IPP) pourrait être activé en réponse à l'immobilisation, et donc que la transduction du signal via les intégrines serait augmentée. Par contre, l'hypothèse du rôle de l'ILK dans la régulation de la voie Akt/FoxO3 pouvant à terme contrôler la protéolyse musculaire semble s'avérer fausse. En effet, l'activation du complexe IPP devrait entraîner une augmentation de la phosphorylation d'Akt ce qui favoriserait l'inhibition de la protéolyse musculaire, ce que l'on n'observe pas (Cf. Article 1 (Figure 8)). Le rôle de l'ILK dans les processus d'atrophie musculaire pourrait donc s'exercer par d'autres mécanismes notamment en régulant la myogenèse (Cf. § ci-dessous).

- *L'activation conjointe de Sparc et d'ILK pendant la remobilisation dans le TA est corrélée avec une induction des facteurs myogéniques au niveau ARNm.*

L'ILK pourrait jouer un rôle non négligeable dans les processus d'adaptation musculaire en réponse à l'immobilisation et à la remobilisation dans le TA. En effet, l'ILK est impliquée dans le contrôle de la myogenèse. Elle réprimerait l'initiation du processus de différenciation, mais est toutefois requise pour la formation de myotubes normaux, suggérant que l'ILK joue un rôle non seulement dans le processus de décision initial, mais aussi dans les étapes tardives (fusion et maintien de l'intégrité des myotubes) de la différenciation myogénique (Huang *et al.*, 2000). Cependant, les activations coordonnées de Sparc et ILK restent à approfondir. En effet, Sparc, à l'inverse de l'ILK favoriserait la myogenèse. Certaines voies de signalisation conduisent à l'accumulation et la translocation nucléaire de la β -caténine conduisant à l'induction de la transcription de facteurs myogéniques (Cossu & Borello, 1999). Dans certains types cellulaires, la stabilisation de la β -caténine peut être « médiée » par Sparc de façon ILK dépendante (Nie & Sage, 2009). L'ensemble de ces informations suggère que les activations conjointes de Sparc et ILK pourraient être impliquées dans des processus adaptatifs au niveau musculaire pendant l'immobilisation et/ou la récupération afin de maintenir un potentiel de régénération pour favoriser la récupération musculaire en temps voulu.

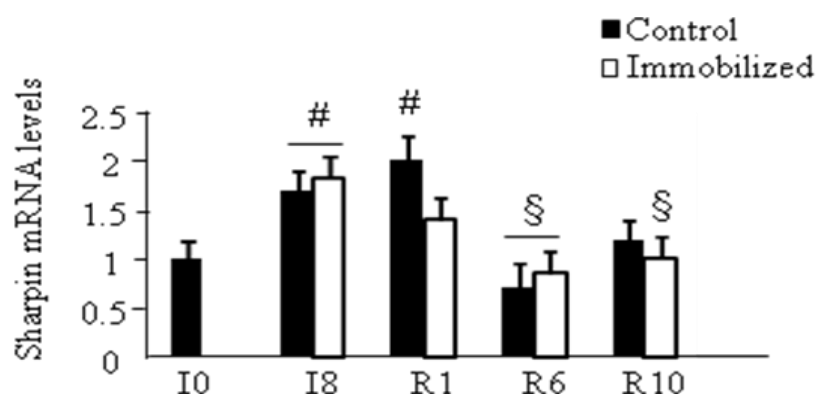


Figure 12 : Evolution des niveaux d'ARNm codant pour Sharpin pendant l'immobilisation et la remobilisation dans le TA. Les données sont des moyennes $\pm$ SEM (barres verticales) pour $n = 4$ à 5 rats par groupe. * $P < 0.05$: muscles immobilisés vs contrôles. # : Vs. I0 ; § : Vs. I8 (pour la même patte)

Conclusions

&

Perspectives

Nos données montrent que

- L'aggravation de l'atrophie du TA est précoce (dès le 1^{er} jour de récupération), et corrèle avec i) une déformation et une baisse de l'aire des fibres, et ii) un épaissement du tissu conjonctif (TC).
- Cet épaissement du tissu conjonctif (TC) dans le TA i) résulte d'une augmentation de l'aire du périnysium pendant l'immobilisation et de l'aire de l'endomysium pendant la récupération, et ii) corrèle avec des modifications du remodelage des collagènes, suggérant une augmentation de leur dépôt pendant l'immobilisation et une restructuration importante pendant les phases précoces de récupération.
- Les altérations structurales des fibres musculaires et du tissu conjonctif dans le TA pendant l'immobilisation et la récupération sont associées i) à une redistribution des chaînes lourdes de myosines, ii) à une induction de l'apoptose uniquement dans le compartiment extracellulaire, et iii) à une induction des marqueurs de régénération musculaire (i.e. Myf5 et MyoD).
- L'activation de la voie ubiquitine-protéasome dépendante (UPS) dans le GA et le TA atrophiés suite à l'immobilisation i) est normalisée rapidement après déplâtre, dans le GA, alors qu'elle reste prononcée et persistante dans le TA pendant toute la cinétique, et ii) serait soumise à des niveaux de régulation différents selon le muscle considéré.
- Les marqueurs de l'autophagie i) sont induits uniquement dans le GA pendant l'immobilisation et normalisés rapidement après déplâtre, alors qu'ils ii) sont induits tardivement après déplâtre dans le TA, suggérant des rôles spécifiques selon le muscle et l'état de récupération.
- Les niveaux ARNm ou protéique des intégrines et de leurs partenaires (i.e. ILK, Parvin- α , Shardin) sont induits dans le TA pendant l'immobilisation et normalisés rapidement, alors que ceux de protéines matricellulaires (i.e. Sparc et tenascine-C) sont fortement induits au moment du déplâtre.

Perspectives

Dans ce modèle la position d'immobilisation semble jouer un rôle important dans l'intensité d'atrophie et dans la durée de récupération qui s'ensuit. En effet, nous avons constaté que pendant la période d'immobilisation, l'atrophie du muscle GA immobilisé en position raccourcie est plus importante que celle du TA immobilisé en position étirée. Cependant, après déplâtre, l'atrophie du GA se stabilise tandis que celle du TA s'aggrave, ce qui retarderait les processus de récupération dans le muscle TA. Il serait donc intéressant d'étudier l'intensité d'atrophie et la cinétique de récupération dans le muscle TA après l'avoir immobilisé en position raccourcie et comparer les données obtenues pour mieux comprendre le rôle de la position d'immobilisation.

Les altérations structurales constatées au niveau des fibres et du tissu conjonctif méritent d'être mieux caractérisées. Une analyse plus poussée des caractéristiques de la MEC au niveau de l'endomysium et du périmysium permettrait de mieux comprendre la relation cause à effet qui pourrait exister entre les altérations des fibres et celles de la MEC en réponse à l'atrophie musculaire. Le degré de ramification, le nombre de fibres voisines ou encore la longueur de la matrice extracellulaire sont des paramètres qui informeraient plus précisément sur l'évolution de la structure fine des fibres individuelles et des faisceaux de fibres dans chaque niveau du tissu conjonctif, c'est-à-dire dans l'endomysium et dans le périmysium séparément pendant l'immobilisation et la récupération.

Les mécanismes régulant le dépôt de collagène au niveau du TC pourraient être caractérisés en mesurant 1/ le niveau d'expression protéique et/ou la localisation des collagènes par Western-blots ou par immunohistochimie, 2/ l'activité des MMPs, ou encore 3/ les interactions entre les fibrilles de collagène (par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)). Ceci permettrait d'informer sur la rigidité du réseau du collagène et donc du tissu conjonctif.

La redistribution des MyHC dans le TA suggère un changement dans ses propriétés métaboliques et contractiles. Des analyses en immunohistochimie grâce à des anticorps spécifiques à chaque type de MyHC permettraient de caractériser les transitions de fibres qui semblent exister dans le muscle TA pendant l'immobilisation, notamment en mettant en évidence la présence des fibres hybrides (fibres composées de différents types de myosines).

L'apoptose observée uniquement dans le compartiment extracellulaire du TA ouvre plusieurs perspectives. Il reste nécessaire de déterminer le type de cellules concernées par cette apoptose. Le marquage TUNEL étant localisé à l'extérieur de la laminine, les cellules concernées par l'apoptose pourrait être des cellules stromales (i.e. fibroblastes, cellules endothéliales). L'immobilisation étant un modèle qui peut favoriser les inflammations, les cellules en apoptose peuvent également correspondre à des leucocytes ou des macrophages. Cependant, la possibilité que des cellules satellites soient aussi concernées par l'apoptose au niveau extracellulaire ne peut être totalement exclue. Des analyses en immunohistochimie pourraient permettre de déterminer quel type cellulaire est affecté. Un triple marquage Hoechst, TUNEL et Pax-7 permettrait de déterminer si les cellules satellites sont en apoptose par exemple. Des marqueurs des cellules endothéliales, des fibroblastes ou des cellules inflammatoires pourraient également être utilisés pour caractériser si ces cellules sont en apoptose. Le lien entre le rôle des cellules satellites sur la transition de fibres pourraient être testé par immunohistochimie sur coupe sériées en juxtaposant les données sur l'état de prolifération des cellules satellites, leur apoptose et le type de fibre qui est à proximité.

Nos données suggèrent une activation de l'apoptose mitochondriale dépendante des caspases dans le TA, basée sur la mesure de l'activité de la caspase-9 associée à l'apoptosome. Cependant, pour valider le rôle de la voie intrinsèque dans l'atrophie du TA, des mesures des niveaux de protéines pro- ou anti-apoptotiques en amont ou en aval de la mitochondrie comme Smac/Diablo XIAP, Bcl-2, Bax, ainsi que les activités de la caspase-12 par exemple pourraient être effectuées. Pour définir le rôle de la voie extrinsèque dans cette atrophie, la mesure de l'activité de la caspase-8 peut être réalisée. Enfin, la mesure de l'activité de la caspase-3 (caspase commune aux 2 voies apoptotiques), ou encore du clivage de la PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase) qui est un des substrats clivés par la caspase-3 lors de l'apoptose pourraient être réalisées.

L'activation de l'autophagie suggérée dans le GA à la fin de la période d'immobilisation ou dans le TA pendant la récupération mérite une étude plus approfondie. En effet, nos données montrent une augmentation des niveaux de transcrits des ARNm codant pour la LC3b et Beclin-1 (deux protéines nécessaires pour la formation des autophagosomes) à I8 dans le GA, et à R6 dans le TA, ce qui suggère une activation de l'autophagie pouvant être impliqué dans l'atrophie du GA ou dans la récupération du TA. Pour valider cette hypothèse, des mesures complémentaires devraient être effectuées comme la mesure de l'expression

protéique 1/ de LC3b (pour mettre en évidence la présence de la forme lipidée de la LC3). 2/ de beclin-1, et 3/ d'autres Atg (Autophagy Related gene), comme Atg5 ou Atg12 qui assurent le recrutement de LC3, ou encore de Ulk1 et Ulk2 (Serine/threonine-protein kinase) qui sont des protéines indispensables à l'initiation de l'autophagie et notamment dans la dégradation de certains organelles comme la mitochondrie (Kundu *et al.*, 2008).

L'éventuelle activation de l'autophagie dans les phases de récupération musculaire suggère un rôle dans l'élimination d'organelles déficientes comme les mitochondries par exemple. Des marqueurs de la biogénèse (e.g. PGC1- α) ou de la fusion/fission (e.g. Mfn1, Mfn2, Fis1, Drp1) mitochondriales pourraient être évalués, de même que des marqueurs de la mitophagie (e.g. Bnip3, Parkin, Pink, p62...).

Enfin nos données suggèrent un rôle de la Tenascin-C et SPARC dans le remodelage de la MEC dans le TA pendant la récupération. En effet, nous avons montré une induction importante de la Tenascin-C et de SPARC dès le déplâtre. Il est crucial de valider cette induction au niveau protéique dans la MEC par Western blots ou immunohistochimie. Ces 2 protéines seraient impliquées également dans la régénération musculaire et dans le contrôle de l'expression et de l'activité des facteurs de myogénique respectivement (Cho *et al.*, 2000; Cifuentes-Diaz *et al.*, 2002).

Nous avons d'ailleurs montré une augmentation des niveaux de transcrits ARNm codant pour MyoD et Myf- pendant l'immobilisation et à R1. Cependant, ces mesures restent surprenantes par rapport à des données précédemment publiées (Vazeille et al. 2008, Magne et al. 2011). Les changements observés devront donc être validés au niveau protéique par Western blot. Afin de déterminer si les processus de régénération sont altérés ou se sont adaptés à la situation d'inactivité physique dans le TA, l'état de prolifération des cellules satellites pourrait être mesuré.

Nous avons également montré une augmentation des transcrits ARNm codant pour les intégrines $\alpha 7$ et $\beta 1$, l'ILK et Pinch à I8 et à R1. Il sera important de valider ces observations au niveau protéique par Western blots, et éventuellement de déterminer leur localisation. Par exemple, l'augmentation des niveaux protéiques de l'ILK dans le TA immobilisé et remobilisé, alors que les niveaux d'ARNm sont normalisés plus rapidement suggère des régulations post-traductionnelles, qui incluent des changements de localisation. Il est possible que l'association de l'ILK avec les intégrines soit réduite malgré une augmentation des niveaux protéiques totaux en ILK, et ne conduise pas à une activation de la signalisation via la

voie intégrine-ILK. L'état d'activation des intégrines pourrait être évalué en déterminant comment leurs activateurs et inhibiteurs sont régulés.

De plus, l'ILK et Sparc pouvant modifier l'état de phosphorylation d'Akt (impliqué dans les voies de transduction vers la protéolyse musculaire), des mesures de l'état de phosphorylation d'Akt et de FoxO3 pourraient informer sur l'activité de cette voie. Sparc et ILK étant impliquées dans les processus de régénération musculaire, il semble également intéressant d'étudier des voies de signalisation extracellulaire capable de réguler la myogenèse.

Références bibliographiques

- Adhihetty PJ, O'Leary MFN, Chabi B, Wicks KL & Hood DA. (2007). Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **102**, 1143-1151.
- Ahtikoski AM, Koskinen SOA, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J & Takala TES. (2003). Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiologica Scandinavica* **177**, 473-481.
- Ahtikoski AM, Koskinen SOA, Virtanen P, Kovanen V & Takala TES. (2001). Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiologica Scandinavica* **172**, 131-140.
- Ala-Aho R & Kahari VM. (2005). Collagenases in cancer. *Biochimie* **87**, 273-286.
- Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V & Edgerton VR. (1997). Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **273**, C579-C587.
- Alway S, Martyn J, Ouyang J, Chaudhrai A & Murlasits Z. (2003a). Id2 expression during apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **284**, R540-R549.
- Alway SE, Degens H, Krishnamurthy G & Chaudhrai A. (2003b). Denervation stimulates apoptosis but not Id2 expression in hindlimb muscles of aged rats. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences* **58**, 687-697.
- Andrianjafiniony T, Dupre-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H & Desplanches D. (2010). Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **299**, C307-C315.
- Anlar B & Gunel-Ozcan A. (2012). Tenascin-R: Role in the central nervous system. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**, 1385-1389.
- Apostolov EO, Ray D, Alobuia WM, Mikhailova MV, Wang X, Basnakian AG & Shah SV. (2011). Endonuclease G mediates endothelial cell death induced by carbamylated LDL. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **300**, H1997-H2004.
- Appell HJ. (1990). Muscular -atrophy following immobilization-a review. *Sports Medicine* **10**, 42-58.
- Arias E & Cuervo AM. (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Current Opinion in Cell Biology* **23**, 184-189.
- Arnaout MA, Mahalingam B & Xiong JP. (2005). Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pp. 381-410.

- Aszodi A, Legate KR, Nakchbandi I & Faessler R. (2006). What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pp. 591-621.
- Attaix D & Bechet D. (2007). FoxO3 controls dangerous proteolytic liaisons. *Cell Metabolism* **6**, 425-427.
- Attaix D, Combaret L, Kee AJ & Taillandier D. (2003). *Mechanisms of ubiquitination and proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle*.
- Attaix D, Combaret L, Pouch MN & Taillandier D. (2001). Regulation of proteolysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **4**, 45-49.
- Attaix D, Ventadour S, Codran A, Bechet D, Taillandier D & Combaret L. (2005). The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. In *Essays in Biochemistry, Vol 41: The Ubiquitin-Proteasome System*, ed. Mayer RJLR, pp. 173-186.
- Bajard L, Relaix F, Lagha M, Rocancourt D, Daubas P & Buckingham ME. (2006). A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes & Development* **20**, 2450-2464.
- Baldwin KM & Haddad F. (2002). Skeletal muscle plasticity - Cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* **81**, S40-S51.
- Bar-Shai M, Carmeli E, Coleman R, Rozen N, Perek S, Fuchs D & Reznick AZ. (2005). The effect of hindlimb immobilization on acid phosphatase, metalloproteinases and nuclear factor-kappa B in muscles of young and old rats. *Mechanisms of Ageing and Development* **126**, 289-297.
- Barrey E. (1994). Contractile properties of the muscle fibres and physical performance in the horse. *Productions Animales* **7**, 41-53.
- Beauchamp JR, Heslop L, Yu DSW, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA & Zammit PS. (2000). Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Biology* **151**, 1221-1233.
- Beehler BC, Sleph PG, Benmassaoud L & Grover GJ. (2006). Reduction of skeletal muscle atrophy by a proteasome inhibitor in a rat model of denervation. *Experimental Biology and Medicine* **231**, 335-341.
- Benanti J A. (2012). Coordination of cell growth and division by the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cell Dev Biol*.
- Berg H, Larsson L & Tesch P. (1997). Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest. *Journal of Applied Physiology* **82**, 182-188.

- Berthon P, Duguez S, Favier F, Amirouche A, Feasson L, Vico L, Denis C & Freyssenet D. (2007). Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **454**, 625-633.
- Birkedalhansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedalhansen B, Decarlo A & Engler JA. (1993). Matrix metalloproteinase: a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **4**, 197-250.
- Bodine S, Latres E, Baumhueter S, Lai V, Nunez L, Clarke B, Poueymirou W, Panaro F, Na E, Dharmarajan K, Pan Z, Valenzuela D, DeChiara T, Stitt T, Yancopoulos G & Glass D. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-1708.
- Booth F. (1982). Effect of limb immobilization on skeletal-muscle *Journal of Applied Physiology* **52**, 1113-1118.
- Bornstein P & Sage E. (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 608-616.
- Bouaouina M, Lad Y & Calderwood DA. (2008). The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta 1 and beta 3 integrins. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 6118-6125.
- Bouisset S & Maton B. (1995). Muscles, posture et mouvement : Bases et applications de la méthode électromyographique. *Hermann Ed, Paris*.
- Bredrup C, Stang E, Bruland O, Palka BP, Young RD, Haavik J, Knappskog PM & Rodahl E. (2010). Decorin accumulation contributes to the stromal opacities found in congenital stromal corneal dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **51**, 5578-5582.
- Brekken RA & Sage EH. (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biology* **19**, 569-580.
- Brodsky B & Ramshaw JAM. (1997). The collagen triple-helix structure. *Matrix Biology* **15**, 545-554.
- Broemer M & Meier P. (2009). Ubiquitin-mediated regulation of apoptosis. *Trends in Cell Biology* **19**, 130-140.
- Brooke M & Kaiser K. (1970). Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **18**, 670-672.
- Brown JC & Timpl R. (1995). The collagen superfamily *International Archives of Allergy and Immunology* **107**, 484-490.

- Bruusgaard JC, Egner IM, Larsen TK, Dupre-Aucouturier S, Desplanches D & Gundersen K. (2012). No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. *Journal of Applied Physiology* **113**, 290-296.
- Bruusgaard JC & Gundersen K. (2008). In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *Journal of Clinical Investigation* **118**, 1450-1457.
- Buckingham M. (2007). Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *Comptes Rendus Biologies* **330**, 530-533.
- Cain K, Brown D, Langlais C & Cohen G. (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (similar to 700 kDa) caspase-activating complex. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 22686-22692.
- Calve S & Simon H-G. (2012). Biochemical and mechanical environment cooperatively regulate skeletal muscle regeneration. *Faseb Journal* **26**, 2538-2545.
- Cantini M, Massimino ML, Rapizzi E, Rossini K, Catani C, Dallalibera L & Carraro U. (1995). Human satellite cell-proliferation in-vitro is regulated by autocrine secretion of il-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **216**, 49-53.
- Carmeli E, Haimovitch TG & Nemcovsky CE. (2006). Expression of matrix metalloproteinase 2 and heat shock protein-72 in immobilized muscle in rats. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **6**, 96-102.
- Carmignac V & Durbeej M. (2012). Cell-matrix interactions in muscle disease. *Journal of Pathology* **226**, 200-218.
- Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trenz F & Grenier G. (2009). A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *Journal of Applied Physiology* **106**, 2049-2059.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A & Chakraborti T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Molecular and Cellular Biochemistry* **253**, 269-285.
- Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, Perez V, Jouvenot M & Boyer-Guittaut M. (2010). GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* **6**, 495-505.
- Chakravarthy MV, Davis BS & Booth FW. (2000). IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **89**, 1365-1379.
- Chang HY & Yang XL. (2000). Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 821-+.
- Charge SBP & Rudnicki MA. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews* **84**, 209-238.

- Chen K, Cheng H-H & Zhou R-J. (2012). Molecular mechanisms and functions of autophagy and the ubiquitin-proteasome pathway. *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* **34**, 5-18.
- Chen Y, Gregory C, Scarborough M, Shi R, Walter G & Vandenborne K. (2007). Transcriptional pathways associated with skeletal muscle disuse atrophy in humans. *Physiological Genomics* **31**, 510-520.
- Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP & Dice JF. (1989). A role for a 70-kilodalton heat -shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* **246**, 382-385.
- Chiquet-Ehrismann R & Chiquet M. (2003). Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *Journal of Pathology* **200**, 488-499.
- Chiquet-Ehrismann R & Tucker RP. (2004). Connective tissues: signalling by tenascins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 1085-1089.
- Cho WJ, Kim EJ, Lee SJ, Kim HD, Shin HJ & Lim WK. (2000). Involvement of SPARC in in vitro differentiation of skeletal myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**, 630-634.
- Chong HC, Tan CK, Huang R-L & Tan NS. (2012). Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *Journal of oncology* **2012**, 351089-351089.
- Christensen B, Dyrberg E, Aagaard P, Enejhøj S, Krogsgaard M, Kjaer M & Langberg H. (2008). Effects of long-term immobilization and recovery on human triceps surae and collagen turnover in the Achilles tendon in patients with healing ankle fracture. *Journal of Applied Physiology* **105**, 420-426.
- Chua G-L, Tang X-Y, Patra AT, Tan S-M & Bhattacharjya S. (2012). Structure and binding interface of the cytosolic tails of alphaXbeta2 integrin. *PloS one* **7**, e41924-e41924.
- Cifuentes-Diaz C, Faille L, Goudou D, Schachner M, Rieger F & Angaut-Petit D. (2002). Abnormal reinnervation of skeletal muscle in a tenascin-C-deficient mouse. *Journal of Neuroscience Research* **67**, 93-99.
- Clarke B, Drujan D, Willis M, Murphy L, Corpina R, Burova E, Rakhilin S, Stitt T, Patterson C, Latres E & Glass D. (2007). The E3 ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metabolism* **6**, 376-385.
- Cohen S, Brault J, Gygi S, Glass D, Valenzuela D, Gartner C, Latres E & Goldberg A. (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *Journal of Cell Biology* **185**, 1083-1095.
- Cooke R. (1997). Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiological Reviews* **77**, 671-697.
- Cornachione A, Cacao-Benedini L, Martinez E, Neder L & Mattiello-Sverzut A. (2011). Effects of eccentric and concentric training on capillarization and myosin heavy chain

- contents in rat skeletal muscles after hindlimb suspension. *Acta Histochemica* **113**, 277-282.
- Cornachione A, Cacao-Benedini L, Shimano M, Volpon J, Martinez E & Mattiello-Sverzut A. (2008). Morphological comparison of different protocols of skeletal muscle remobilization in rats after hindlimb suspension. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **18**, 453-461.
- Cossu G & Borello U. (1999). Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *Embo Journal* **18**, 6867-6872.
- Coutinho EL, Gomes ARS, Franca CN, Oishi J & Salvini TF. (2004). Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **37**, 1853-1861.
- Cregan SP, Dawson VL & Slack RS. (2004). Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* **23**, 2785-2796.
- Cros N, Tkatchenko AV, Pisani DF, Leclerc L, Leger JJ, Marini JF & Dechesne CA. (2001). Analysis of altered gene expression in rat soleus muscle atrophied by disuse. *Journal of Cellular Biochemistry* **83**, 508-519.
- Cuervo AM & Dice JF. (2000). Regulation of Lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic* **1**, 570-583.
- Cuervo AM, Dice JF & Knecht E. (1997). A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 5606-5615.
- Daley WP, Peters SB & Larsen M. (2008). Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of Cell Science* **121**, 255-264.
- Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Tarricone E, Vitadello M, Biolo G, Vescovo G & Gorza L. (2009). A transient antioxidant stress response accompanies the onset of disuse atrophy in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **107**, 549-557.
- Danieli Betto D, Zerbato E & Betto R. (1986). Type 1, 2A, and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **138**, 981-987.
- Dapp C, Schmutz S, Hoppeler H & Fluck M. (2004). Transcriptional reprogramming and ultrastructure during atrophy and recovery of mouse soleus muscle. *Physiological Genomics* **20**, 97-107.
- de Boer MD, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, Maffulli N, Movin T, Narici MV & Rennie MJ. (2007). The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *Journal of Physiology-London* **585**, 241-251.

- Delany AM, Gabbitas BY & Canalis E. (1995). Cortisol down-regulates osteoblast alpha-1 (I) procollagen mRNA by transcriptional and posttranscriptional mechanisms *Journal of Cellular Biochemistry* **57**, 488-494.
- Desaphy J, Pierno S, Liantonio A, Giannuzzi V, Digennaro C, Dinardo M, Camerino G, Ricciuti P, Brocca L, Pellegrino M, Bottinelli R & Camerino D. (2010). Antioxidant treatment of hindlimb-unloaded mouse counteracts fiber type transition but not atrophy of disused muscles. *Pharmacological Research* **61**, 553-563.
- Desplanches D, Kayar SR, Sempore B, Flandrois R & Hoppeler H. (1990). Rat soleus muscle ultrastructure after hindlimb suspension. *Journal of Applied Physiology* **69**, 504-508.
- Dudley G, Hather B & Buchanan P. (1992). Skeletal muscle responses to unloading with special reference to man. *The Journal of the Florida Medical Association* **79**, 525-529.
- Dupont-Versteegden EE. (2006). Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. *World Journal of Gastroenterology* **12**, 7463-7466.
- Dupont-Versteegden EE, Fluckey JD, Knox M, Gaddy D & Peterson CA. (2006). Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats. *Journal of Applied Physiology* **101**, 202-212.
- Dupont-Versteegden EE, Nagarajan R, Beggs ML, Bearden ED, Simpson PM & Peterson CA. (2008). Identification of cold-shock protein RBM3 as a possible regulator of skeletal muscle size through expression profiling. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **295**, R1263-R1273.
- Edgerton VR, Zhou MY, Ohira Y, Klitgaard H, Jiang B, Bell G, Harris B, Saltin B, Gollnick PD, Roy RR, Day MK & Greenisen M. (1995). Human fiber size and enzymatic-properties after 5 and 11 days of spaceflight. *Journal of Applied Physiology* **78**, 1733-1739.
- English WR, Puente XS, Freije JMP, Knauper V, Amour A, Merryweather A, Lopez-Otin C & Murphy G. (2000). Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 14046-14055.
- Evans WJ. (2010). Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *American Journal of Clinical Nutrition* **91**, 1123S-1127S.
- Fang C, Sun X, Li B, Fischer D, Pritts T, Penner G & Hasselgren P. (2000). Burn injuries in rats upregulate the gene expression of the ubiquitin-conjugating enzyme E2(14k) in skeletal muscle. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* **21**, 528-534.
- Ferreira R, Neuparth MJ, Vitorino R, Appell HJ, Amado F & Duarte JA. (2008). Evidences of apoptosis during the early phases of soleus muscle atrophy in hindlimb suspended mice. *Physiological Research* **57**, 601-611.

- Fitts RH, McDonald KS & Schluter JM. (1991). The determinants of skeletal-muscle force and power their adaptability with changes in activity pattern *Journal of Biomechanics* **24**, 111-122.
- Flint F & Pickering K. (1984). Demonstration of collagen in meat-products by an improved picro-sirius red polarization method. *Analyst* **109**, 1505-&.
- Fluck M, Chiquet M, Schmutz S, Mayet-Sornay MH & Desplanches D. (2003). Reloading of atrophied rat soleus muscle induces tenascin-C expression around damaged muscle fibers. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **284**, R792-R801.
- Fluck M, Mund SI, Schittny JC, Klossner S, Durieux A-C & Giraud M-N. (2008). Mechano-regulated Tenascin-C orchestrates muscle repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 13662-13667.
- Fluck M, Schmutz S, Wittwer M, Hoppeler H & Desplanches D. (2005). Transcriptional reprogramming during reloading of atrophied rat soleus muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **289**, R4-R14.
- Fujita N, Fujimoto T, Tasaki H, Arakawa T, Matsubara T & Miki A. (2009). Influence of muscle length on muscle atrophy in the mouse tibialis anterior and soleus muscles. *Biomedical Research-Tokyo* **30**, 39-45.
- Fujita R, Tanaka Y, Saihara Y, Yamakita M, Ando D & Koyama K. (2011). Effect of Molecular Hydrogen Saturated Alkaline Electrolyzed Water on Disuse Muscle Atrophy in Gastrocnemius Muscle. *Journal of Physiological Anthropology* **30**, 195-201.
- Fukuda T, Chen K, Shi XH & Wu CY. (2003). PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 51324-51333.
- Gagniere H, Picard B & Geay Y. (1999). Contractile differentiation of foetal cattle muscles: intermuscular variability. *Reproduction Nutrition Development* **39**, 637-655.
- Genis L, Galvez BG, Gonzalo P & Arroyo AG. (2006). MT1-MMP: Universal or particular player in angiogenesis? *Cancer and Metastasis Reviews* **25**, 77-86.
- Giannelli G, De Marzo A, Marinosci F & Antonaci S. (2005). Matrix metalloproteinase imbalance in muscle disuse atrophy. *Histology and Histopathology* **20**, 99-106.
- Gillies AR & Lieber RL. (2011). Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & Nerve* **44**, 318-331.
- Glass D. (2003). Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends in Molecular Medicine* **9**, 344-350.

- Glass DJ. (2010). PI3 Kinase Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. In *Phosphoinositide 3-Kinase in Health and Disease, Vol 1*, ed. Rommel C, Vanhaesebroeck B & Vogt PK, pp. 267-278.
- Glover EI, Yasuda N, Tarnopolsky MA, Abadi A & Phillips SM. (2010). Little change in markers of protein breakdown and oxidative stress in humans in immobilization-induced skeletal muscle atrophy. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme* **35**, 125-133.
- Goldspink D. (1977). Influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal-muscle. *Journal of Physiology-London* **264**, 267-282.
- Goll DE, Neti G, Mares SW & Thompson VF. (2008). Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *Journal of Animal Science* **86**, E19-35.
- Gordon AM, Homsher E & Regnier M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews* **80**, 853-924.
- Grashoff C, Aszodi A, Sakai T, Hunziker EB & Fassler R. (2003). Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *Embo Reports* **4**, 432-438.
- Grounds MD, Sorokin L & White J. (2005). Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **15**, 381-391.
- Guillot C, Steinberg J, Delliaux S, Kipson N, Jammes Y & Badier M. (2008). Physiological, histological and biochemical properties of rat skeletal muscles in response to hindlimb suspension. *Journal of Electromyography and Kinesiology* **18**, 276-283.
- Gundersen K & Bruusgaard J. (2008). Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost? *Journal of Physiology-London* **586**, 2675-2681.
- Guo B-S, Cheung K-K, Yeung SS, Zhang B-T & Yeung EW. (2012). Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. *PloS one* **7**.
- Gustafsson T, Osterlund T, Flanagan J, von Walden F, Trappe T, Linnehan R & Tesch P. (2010). Effects of 3 days unloading on molecular regulators of muscle size in humans. *Journal of Applied Physiology* **109**, 721-727.
- Gwag T, Lee K, Ju H, Shin H, Lee J-W & Choi I. (2009). Stress and signaling responses of rat skeletal muscle to brief endurance exercise during hindlimb unloading: a catch-Up process for atrophied muscle. *Cellular Physiology and Biochemistry* **24**, 537-546.
- Haddad F, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR & Baldwin KM. (2003). Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. *Journal of Applied Physiology* **95**, 791-802.
- Haddadin RI OD, Kang MH, Villarreal G Jr, Kang JH, Jin R, Gong H, Rhee DJ. (2012). Thrombospondin-1 and -2 null mice exhibit lower intraocular pressures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

- Han XY, Wang W, Myllyla R, Virtanen P, Karpakka J & Takala TES. (1999). mRNA levels for alpha-subunit of prolyl 4-hydroxylase and fibrillar collagens in immobilized rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **87**, 90-96.
- Hannigan GE, McDonald PC, Walsh MP & Dedhar S. (2011). Integrin-linked kinase: Not so 'pseudo' after all. *Oncogene* **30**, 4375-4385.
- Hansensmith FM & Carlson BM. (1979). Cellular-responses to free grafting of the extensor digitorum longus muscle of the rat. *Journal of the Neurological Sciences* **41**, 149-173.
- Hao Y, Jackson J, Scheller E, Wang Y, Edens N, Pereira S & Alway S. (2010). Effects Of Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate On Markers Of Muscle Hypertrophy And Apoptotic Signaling During Reloading In Aged Rats Following Disuse. *Med Sci Sports Exerc* **42**, 2-2.
- Hao Y, Jackson J, Wang Y, Edens N, Pereira S & Alway S. (2011). beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate reduces myonuclear apoptosis during recovery from hind limb suspension-induced muscle fiber atrophy in aged rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **301**, R701-R715.
- Harburger DS & Calderwood DA. (2009). Integrin signalling at a glance. *Journal of Cell Science* **122**, 159-163.
- Hardingham TE & Fosang AJ. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb Journal* **6**, 861-870.
- Hather B, Adams G, Tesch P & Dudley G. (1992). Skeletal-muscle responses to lower-limb suspension in humans. *Journal of Applied Physiology* **72**, 1493-1498.
- Hawke TJ & Garry DJ. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology* **91**, 534-551.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Haddad F, Schjerling P, Baldwin KM & Kjaer M. (2009). Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. *Journal of Applied Physiology* **106**, 178-186.
- Heng A, Ventadour S, Jarzaguet M, Pouch-Pelissier M, Guezennec C, Bigard X, Attaix D & Taillandier D. (2008). Coordinate expression of the 19S regulatory complex and evidence for ubiquitin-dependent telethonin degradation in the unloaded soleus muscle. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 2544-2552.
- Herman IM. (1993). Actin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology* **5**, 48-55.
- Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P & Schonbeck U. (2001). Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* **107**, 1117-1126.

- Hortobagyi T, Dempsey L, Fraser D, Zheng D, Hamilton G, Lambert J & Dohm L. (2000). Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *Journal of Physiology-London* **524**, 293-304.
- Huang Y, Li J, Zhang YJ & Wu CY. (2000). The roles of integrin-linked kinase in the regulation of myogenic differentiation. *Journal of Cell Biology* **150**, 861-871.
- Hughes SM & Blau HM. (1990). Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal-muscle development. *Nature* **345**, 350-353.
- Hunter RB, Stevenson EJ, Koncarevic A, Mitchell-Felton H, Essig DA & Kandarian SC. (2002). Activation of an alternative NF-kappa B pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *Faseb Journal* **16**, 529-538.
- Hvid L, Aagaard P, Justesen L, Bayer ML, Andersen JL, Ortenblad N, Kjaer M & Suetta C. (2010). Effects of aging on muscle mechanical function and muscle fiber morphology during short-term immobilization and subsequent retraining. *Journal of Applied Physiology* **109**, 1628-1634.
- Hynes RO. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687.
- Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin KM, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K & Kishi K. (2001). Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *Faseb Journal* **15**, 1279-1281.
- Jackson JR, Ryan MJ, Hao Y & Alway SE. (2010). Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **299**, R1572-R1581.
- Jamart C, Raymackers J-M, An GL, Deldicque L & Francaux M. (2011). Prevention of muscle disuse atrophy by mg132 proteasome inhibitor. *Muscle & Nerve* **43**, 708-716.
- Jarvinen T, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen T & Jarvinen M. (2002). Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles - An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **23**, 245-254.
- Jarvinen TAH, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TLN, Hurme T, Kvist M, Peltö-Huikko M, Kalimo H & Jarvinen M. (2003). Mechanical loading regulates the expression of tenascin-C in the myotendinous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in the skeletal muscle. *Journal of Cell Science* **116**, 857-866.
- Jarvinen TAH, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TLN, Kvist M, Hurme T, Isola J, Kalimo H & Jarvinen M. (1999). Mechanical loading regulates tenascin-C expression in the osteotendinous junction. *Journal of Cell Science* **112**, 3157-3166.

- Jing L, Zhou L-j, Zhang F-m, Li W-m & Sang Y. (2011). Tenascin-x facilitates myocardial fibrosis and cardiac remodeling through transforming growth factor-beta 1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in alcoholic cardiomyopathy. *Chinese Medical Journal* **124**, 390-395.
- Jones S, Hill R, Krasney P, O'Conner B, Peirce N & Greenhaff P. (2004). Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *Faseb Journal* **18**, 1025-+.
- Joshi MB, Ivanov D, Philippova M, Erne P & Resink TJ. (2007). Integrin-linked kinase is an essential mediator for T-cadherin-dependent signaling via Akt and GSK3 beta in endothelial cells. *Faseb Journal* **21**, 3083-3095.
- Jozsa L, Kannus P, Thoring J, Reffy A, Jarvinen M & Kvist M. (1990). The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective-tissue - a morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* **72**, 293-297.
- Kaasik P, Riso EM & Seene T. (2011). Extracellular matrix and Myofibrils during unloading and reloading of skeletal muscle. *International Journal of Sports Medicine* **32**, 247-253.
- Kachaeva EV, Turtikova OV, Ushakov IB, Orlov OI & Shenkman BS. (2011). Postural Muscle Recovery under Lowered Oxygen Concentration after Prolonged Disuse. *Doklady Biochemistry and Biophysics* **437**, 102-104.
- Kahari VM & SaarialhoKere U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology* **6**, 199-213.
- Kalhovde JM, Jerkovic R, Sefland I, Cordonnier C, Calabria E, Schiaffino S & Lomo T. (2005). 'Fast' and 'slow' muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. *Journal of Physiology-London* **562**, 847-857.
- Kasper CE. (1995). Sarcolemmal disruption in reloaded atrophic skeletal-muscle. *Journal of Applied Physiology* **79**, 607-614.
- Kauhanen S, Leivo I, Pettila M & Michelsson JE. (1996). Recovery of skeletal muscle after immobilization of rabbit hindlimb - A light microscopic study. *Apmis* **104**, 797-804.
- Kiema T, Lad Y, Jiang PJ, Oxley CL, Baldassarre M, Wegener KL, Campbell ID, Ylanne J & Calderwood DA. (2006). The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Molecular Cell* **21**, 337-347.
- Kim C-H, Neiswender H, Baik EJ, Xiong WC & Mei L. (2008). beta-catenin interacts with MyoD and regulates its transcription activity. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 2941-2951.
- Kirkendall DT & Garrett WE. (1998). The effects of aging and training on skeletal muscle. *American Journal of Sports Medicine* **26**, 598-602.

- Kjaer M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological Reviews* **84**, 649-698.
- Kogata N, Tribe RM, Faessler R, Way M & Adams RH. (2009). Integrin-linked kinase controls vascular wall formation by negatively regulating Rho/ROCK-mediated vascular smooth muscle cell contraction. *Genes & Development* **23**, 2278-2283.
- Kohn TA & Myburgh KH. (2006). Electrophoretic separation of human skeletal muscle myosin heavy chain isoforms: The importance of reducing agents. *Journal of Physiological Sciences* **56**, 355-360.
- Kondo H, Nakagaki I, Sasaki S, Hori S & Itokawa Y. (1993). Mechanism of oxidative stress in skeletal-muscle atrophied by immobilization. *American Journal of Physiology* **265**, E839-E844.
- Kornitzer D & Ciechanover A. (2000). Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *Journal of Cellular Physiology* **182**, 1-11.
- Kramerova I, Kudryashova E, Venkatraman G & Spencer MJ. (2005). Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway (Retracted Article. See vol 16, pg 1006, 2007). *Human Molecular Genetics* **14**, 2125-2134.
- Krawiec BJ, Frost RA, Vary TC, Jefferson LS & Lang CH. (2005). Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **289**, E969-E980.
- Kundu M, Lindsten T, Yang C-Y, Wu J, Zhao F, Zhang J, Selak MA, Ney PA & Thompson CB. (2008). Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* **112**, 1493-1502.
- Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Battonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT & Leibovitch SA. (2008). The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *Embo Journal* **27**, 1266-1276.
- Lambert E, Dasse E, Haye B & Petitfrere E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Critical Reviews in Oncology Hematology* **49**, 187-198.
- Lang SM, Kazi AA, Hong-Brown L & Lang CH. (2012a). Delayed recovery of skeletal muscle mass following hindlimb immobilization in mTOR heterozygous mice. *PloS one* **7**.
- Lang SM, Kazi AA, Hong-Brown L & Lang CH. (2012b). Delayed Recovery of Skeletal Muscle Mass following Hindlimb Immobilization in mTOR Heterozygous Mice. *PloS one* **7**, e38910.
- Lapier T, Burton H, Almon R & Cerny F. (1995). Alterations in intramuscular connective-tissue after limb casting affect contraction-induced muscle injury. *Journal of Applied Physiology* **78**, 1065-1069.

- Larina I, Tcheglova I, Shenkman B & Nemirovskaya T. (1997). Muscle atrophy and hormonal regulation in women in 120 day bed rest. *Journal of gravitational physiology : a journal of the International Society for Gravitational Physiology* **4**, P121-122.
- Laurie GW, Bing JT, Kleinman HK, Hassell JR, Aumailley M, Martin GR & Feldmann RJ. (1986). Localization of binding-sites for laminin, heparan-sulfate proteoglycan and fibronectin on basement-membrane (type-IV) collagen. *Journal of Molecular Biology* **189**, 205-216.
- Lawler JM, Song W & Demaree SR. (2003). Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine* **35**, 9-16.
- Lawler JM, Song W & Kwak HB. (2006). Differential response of heat shock proteins to hindlimb unloading and reloading in the soleus. *Muscle & Nerve* **33**, 200-207.
- Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA & Dupont-Versteegden EE. (2005). Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **288**, R1288-R1296.
- Lenci RE, Rachakonda PS, Kubarenko AV, Weber ANR, Brandt A, Gast A, Sucker A, Hemminki K, Schadendorf D & Kumar R. (2012). Integrin genes and susceptibility to human melanoma. *Mutagenesis* **27**, 367-373.
- Li LY, Luo L & Wang XD. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99.
- Li W-w, Li J & Bao J-k. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 1125-1136.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H & Levine B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672-676.
- Lim J-Y & Han TR. (2010). Effect of electromyostimulation on apoptosis-related factors in denervation and reinnervation of rat skeletal muscles. *Muscle & Nerve* **42**, 422-430.
- Litvinova KS, Tarakin PP, Fokina NM, Istomina VE, Larina IM & Shenkman BS. (2007). Reloading of rat soleus after hindlimb unloading and serum insulin-like growth factor 1. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni IM Sechenova / Rossiiskaia akademiia nauk* **93**, 1143-1155.
- Liu MJ, Li JX, Lee KM, Qin L & Chan KM. (2005). Oxidative stress after muscle damage from immobilization and remobilization occurs locally and systemically. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 246-250.
- Livak KJ & Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* **25**, 402-408.

- Lorenz K, Grashoff C, Torka R, Sakai T, Langbein L, Bloch W, Aumailley M & Faessler R. (2007). Integrin-linked kinase is required for epidermal and hair follicle morphogenesis. *Journal of Cell Biology* **177**, 501-513.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A & Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**, 265-275.
- Lu C-X, Fan T-J, Hu G-B & Cong R-S. (2003). Apoptosis-inducing factor and apoptosis. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica* **35**, 881-885.
- Luo DC, Mari B, Stoll I & Anglard P. (2002). Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 25527-25536.
- Luttun A, Lutgens E, Manderveld A, Maris K, Collen D, Carmeliet P & Moons L. (2004). Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation* **109**, 1408-1414.
- Lynch-Day MA & Klionsky DJ. (2010). The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *Febs Letters* **584**, 1359-1366.
- Ma DH-K, Yao J-Y, Kuo M-T, See L-C, Lin K-Y, Chen S-C, Chen J-K, Chao A-S, Wang S-F & Lin K-K. (2007). Generation of endostatin by matrix metalloproteinase and cathepsin from human limboconal epithelial cells cultivated on amniotic membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **48**, 644-651.
- Ma Y-Q, Qin J, Wu C & Plow EF. (2008). Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta(3) integrins. *Journal of Cell Biology* **181**, 439-446.
- Magne H, Savary-Auzeloux I, Migné C, Peyron MA, Combaret L, Rémond D & Dardevet D. (2012). Contrarily to whey and high protein diets, dietary free leucine supplementation cannot reverse the lack of recovery of muscle mass after prolonged immobilization during ageing. *Journal of Physiology-London* **590.8**, 2035-2049.
- Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Claustre A, Attaix D, Anne L, Sante-Lhoutellier V, Gatellier P, Dardevet D & Combaret L. (2011). Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways. *Journal of Physiology-London* **589**, 511-524.
- Maier S, Lutz R, Gelman L, Sarasa-Renedo A, Schenk S, Grashoff C & Chiquet M. (2008). Tenascin-C induction by cyclic strain requires integrin-linked kinase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1783**, 1150-1162.
- Malinin NL, Pluskota E & Byzova TV. (2012). Integrin signaling in vascular function. *Current Opinion in Hematology* **19**, 206-211.

- Martinez-Borra J & Lopez-Larrea C. (2012). Autophagy and self-defense. *Advances in experimental medicine and biology* **738**, 169-184.
- Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S & Sandri M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metabolism* **10**, 507-515.
- Masiero E & Sandri M. (2010). Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles. *Autophagy* **6**, 307-309.
- Mate MJ, Lombardía MO, Boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, Penninger J, Kroemer G & Alzari PM. (2002). The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nature Structural Biology* **9**, 442-446.
- Mattiello-Sverzut A, Carvalho L, Cornachione A, Nagashima M, Neder L & Shimano A. (2006). Morphological effects of electrical stimulation and intermittent muscle stretch after immobilization in soleus muscle. *Histology and Histopathology* **21**, 957-964.
- McClung JM, Davis JM & Carson JA. (2007). Ovarian hormone status and skeletal muscle inflammation during recovery from disuse in rats. *Experimental Physiology* **92**, 219-232.
- Medina R, Wing SS & Goldberg AL. (1995). Increase in levels of polyubiquitin and proteasome messenger-rna in skeletal-muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochemical Journal* **307**, 631-637.
- Millan A & Huerta S. (2009). Apoptosis-Inducing Factor and Colon Cancer. *Journal of Surgical Research* **151**, 163-170.
- Miller MG, Naruszewicz I, Kumar AS, Ramlal T & Hannigan GE. (2003). Integrin-linked kinase is a positive mediator of L6 myoblast differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **310**, 796-803.
- Miller TA, Lesniewski LA, Muller-Delp JM, Majors AK, Scalise D & Delp MD. (2001). Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **281**, R1710-R1717.
- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G & Susin SA. (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 16391-16398.
- Miyazaki M, Noguchi M & Takemasa T. (2008). Intermittent reloading attenuates muscle atrophy through modulating Akt/mTOR pathway. *Med Sci Sports Exerc* **40**, 848-855.
- Mizunoya W, Wakamatsu J-I, Tatsumi R & Ikeuchi Y. (2008a). Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Analytical Biochemistry* **377**, 111-113.

- Mizunoya W, Wakamatsu J, Tatsumi R & Ikeuchi Y. (2008b). Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Analytical Biochemistry* **377**, 111-113.
- Montanez E, Wickstroem SA, Altstaetter J, Chu H & Faessler R. (2009). alpha-parvin controls vascular mural cell recruitment to vessel wall by regulating RhoA/ROCK signalling. *Embo Journal* **28**, 3132-3144.
- Moser M, Legate KR, Zent R & Faessler R. (2009). The Tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**, 895-899.
- Murata S, Yashiroda H & Tanaka K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 104-115.
- Murdoch AD & Iozzo RV. (1993). Perlecan-the multidomain heparan-sulfate proteoglycan of basement-membrane and extracellular-matrix. *Virchows Archiv a-Pathological Anatomy and Histopathology* **423**, 237-242.
- Murphy G & Docherty AJP. (1992). The matrix metalloproteinases and their inhibitors *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **7**, 120-125.
- Murphy G, Segain JP, Oshea M, Cockett M, Ioannou C, Lefebvre O, Chambon P & Basset P. (1993). The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general-properties of a weak mettalo-proteinase. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 15435-15441.
- Nagase H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry* **378**, 151-160.
- Nastasi T, Bongiovanni A, Campos Y, Mann L, Toy JN, Bostrom J, Rottier R, Hahn C, Conaway JW, Harris AJ & d'Azzo A. (2004). Ozz-E3, a muscle-specific ubiquitin ligase, regulates beta-catenin degradation during myogenesis. *Developmental Cell* **6**, 269-282.
- Nguyen HX & Tidball JG. (2003a). Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use in mice. *Journal of Physiology-London* **550**, 347-356.
- Nguyen HX & Tidball JG. (2003b). Null mutation of gp91(phox) reduces muscle membrane lysis during muscle inflammation in mice. *Journal of Physiology-London* **553**, 833-841.
- Nicholson DW. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* **6**, 1028-1042.
- Nicks DK, Beneke WM, Key RM & Timson BF. (1989). Muscle-fiber size and number following immobilization atrophy. *Journal of Anatomy* **163**, 1-5.
- Nie J, Chang B, Traktuev DO, Sun J, March K, Chan L, Sage EH, Pasqualini R, Arap W & Kolonin MG. (2008). IFATS Collection: Combinatorial Peptides Identify alpha 5 beta

- 1 Integrin as a Receptor for the Matricellular Protein SPARC on Adipose Stromal Cells. *Stem Cells* **26**, 2735-2745.
- Nie J & Sage EH. (2009). SPARC Inhibits Adipogenesis by Its Enhancement of beta-Catenin Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 1279-1290.
- Noda T, Fujita N & Yoshimori T. (2009). The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell Death and Differentiation* **16**, 984-990.
- O'Leary MF VA, Carter HN, Zhang Y, Hood DA. (2012). Denervation-induced mitochondrial dysfunction and autophagy in skeletal muscle of apoptosis-deficient animals. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- O'Leary MFN & Hood DA. (2008). Effect of prior chronic contractile activity on mitochondrial function and apoptotic protein expression in denervated muscle. *Journal of Applied Physiology* **105**, 114-120.
- Ogata T, Machida S, Oishi Y, Higuchi M & Muraoka I. (2009). Differential cell death regulation between adult-unloaded and aged rat soleus muscle. *Mechanisms of Ageing and Development* **130**, 328-336.
- Oguro A, Sakurai T, Fujita Y, Lee S, Kubota H, Nagata K & Atomi Y. (2006). The molecular chaperone HSP47 rapidly senses gravitational changes in myoblasts. *Genes to Cells* **11**, 1253-1265.
- Oishi Y, Ogata T, Yamamoto K, Terada M, Ohira T, Ohira Y, Taniguchi K & Roy R. (2008). Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta Physiologica* **192**, 381-395.
- Oloumi A, McPhee T & Dedhar S. (2004). Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1691**, 1-15.
- Otto A, Schmidt C, Luke G, Allen S, Valasek P, Muntoni F, Lawrence-Watt D & Patel K. (2008). Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *Journal of Cell Science* **121**, 2939-2950.
- Padykula H & Herman E. (1955). The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **3**, 170-195.
- Pasquali-Ronchetti I & Baccarani-Contri M. (1997). Elastic fiber during development and aging. *Microscopy Research and Technique* **38**, 428-435.
- Paul P & Kumar A. (2011). TRAF6 coordinates the activation of autophagy and ubiquitin-proteasome systems in atrophying skeletal muscle. *Autophagy* **7**, 555-556.

- Pereira JA, Benninger Y, Baumann R, Goncalves AF, Oezcelik M, Thurnherr T, Tricaud N, Meijer D, Faessler R, Suter U & Relvas JB. (2009). Integrin-linked kinase is required for radial sorting of axons and Schwann cell remyelination in the peripheral nervous system. *Journal of Cell Biology* **185**, 147-161.
- Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, Yan J, Sanghera J, Walsh MP & Dedhar S. (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase - Critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 27462-27469.
- Peter J, Barnard R, Edgerton V, Gillespie C & Stempel K. (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* **11**, 2627-2633.
- Pette D & Staron RS. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique* **50**, 500-509.
- Pette D & Staron RS. (2001). Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochemistry and Cell Biology* **115**, 359-372.
- Picard B, Jurie C, Cassar-Malek I & Hocquette JF. (2003). Typology and ontogenesis of muscle fibres in cattle. *INRA Productions Animales* **16**, 125-131.
- Pickart CM. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 503-533.
- Pickart CM & Eddins MJ. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1695**, 55-72.
- Pistilli EE, Siu PM & Alway SE. (2006). Molecular regulation of apoptosis in fast plantaris muscles of aged rats. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences* **61**, 245-255.
- Polge C, Heng A, Jarzaguet M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L, Bechet D, Matondo M, Uttenweiler-Joseph S, Monsarrat B, Attaix D & Taillandier D. (2011). Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *Faseb Journal* **25**, 3790-3802.
- Polizello J, Carvalho L, Freitas F, Padula N, Martinez E & Mattiello-Sverzut A. (2011). Morphological effects of resumption of loading after immobilization of skeletal muscles in lengthened position in female rats. *Revista Brasileira De Fisioterapia* **15**, 73-79.
- Powers SK, Kavazis AN & McClung JM. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology* **102**, 2389-2397.
- Powers SK, Smuder AJ & Judge AR. (2012). Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **15**, 240-245.

- Psatha M, Wu Z, Gammie F, Ratkevicius A, Wackerhage H, Lee J, Redpath T, Gilbert F, Ashcroft G, Meakin J & Aspden R. (2012). A longitudinal MRI study of muscle atrophy during lower leg immobilization following ankle fracture. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* **35**, 686-695.
- Purslow PP. (1989). Strain-induced reorientation of an intramuscular connective-tissue network-implications for passive muscle elasticity *Journal of Biomechanics* **22**, 21-31.
- Purslow PP. (2002). The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* **133**, 947-966.
- Purslow PP & Trotter JA. (1994). The morphology and mechanical-properties of endomysium in series-fibered muscles-variations with muscle length *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **15**, 299-308.
- Qian Y, Zhong XS, Flynn DC, Zheng JZ, Qiao M, Wu CY, Dedhar S, Shi XL & Jiang BH. (2005). ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene* **24**, 3154-3165.
- Quindry J, Miller L, McGinnis G, Irwin M, Dumke C, Magal M, Triplett NT, McBride J & Urbiztondo Z. (2011). Muscle-Fiber Type and Blood Oxidative Stress After Eccentric Exercise. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* **21**, 462-470.
- Rantala JK, Pouwels J, Pellinen T, Veltel S, Laasola P, Mattila E, Potter CS, Duffy T, Sundberg JP, Kallioniemi O, Askari JA, Humphries MJ, Parsons M, Salmi M & Ivaska J. (2011). SHARPIN is an endogenous inhibitor of beta 1-integrin activation. *Nature Cell Biology* **13**, 1315-U1377.
- Reich K, Chen Y, Thompson P, Hoffman E & Clarkson P. (2010). Forty-eight hours of unloading and 24 h of reloading lead to changes in global gene expression patterns related to ubiquitination and oxidative stress in humans. *Journal of Applied Physiology* **109**, 1404-1415.
- Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A & Buckingham M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *Journal of Cell Biology* **172**, 91-102.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A & Buckingham M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **435**, 948-953.
- Remy L & Trespeuch C. (2005). Matrilysin-1 and cancer pathology. *M S-Medecine Sciences* **21**, 498-502.
- Reznick AZ, Menashe O, Bar-Shai M, Coleman R & Carmeli E. (2003). Expression of matrix metalloproteinases, inhibitor, and acid phosphatase in muscles of immobilized hindlimbs of rats. *Muscle & Nerve* **27**, 51-59.

- Riaz A, Zeller KS & Johansson S. (2012). Receptor-Specific Mechanisms Regulate Phosphorylation of AKT at Ser473: Role of RICTOR in beta 1 Integrin-Mediated Cell Survival. *PloS one* **7**.
- Riso EM, Ahtikoski AM, Takala TES & Seene T. (2010). The effect of unloading and reloading on the extracellular matrix in skeletal muscle: changes in muscle strength and motor activity. *Biology of Sport* **27**, 89-94.
- Rodrigues AD & Schmalbruch H. (1995). Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles *Anatomical Record* **243**, 430-437.
- Rodriguez M & Schaper J. (2005). Apoptosis: measurement and technical issues. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **38**, 15-20.
- Rushbrook JI, Weiss C, Ko K, Feuerman MH, Carleton S, Ing A & Jacoby J. (1994). Identification of alpha-cardiac myosin heavy-chain messenger-RNA and protein in extraocular-muscle of the adult-rabbit. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **15**, 505-515.
- Russo TL, Peviani SM, Durigan JLQ, Gigo-Benato D, Delfino GB & Salvini TF. (2010). Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogen-1 in denervated rat skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **31**, 45-57.
- Sakai T, Li SH, Docheva D, Grashoff C, Sakai K, Kostka G, Braun A, Pfeifer A, Yurchenco PD & Fassler R. (2003). Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes & Development* **17**, 926-940.
- Sambasivan R & Tajbakhsh S. (2007). Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **18**, 870-882.
- Sandri M, Minetti C, Pedemonte M & Carraro U. (1998). Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. *Laboratory Investigation* **78**, 1005-1016.
- Sanes JR. (2003). The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12601-12604.
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E & Seiki M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor-cells. *Nature* **370**, 61-65.
- Scherberich A, Tucker RP, Samandari E, Brown-Luedi M, Martin D & Chiquet-Ehrismann R. (2004). Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *Journal of Cell Science* **117**, 571-581.
- Schiaffino S & Hanzlikova V. (1972). Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system. *Journal of ultrastructure research* **39**, 1-14.
- Schmalbruch H & Lewis DM. (2000). Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle & Nerve* **23**, 617-626.

- Schwanhaeussner B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W & Selbach M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337-342.
- Scott JE. (1988). Proteoglycan fibrillar collagen interactions. *Biochemical Journal* **252**, 313-323.
- Scott JE. (1995). Extracellular-matrix, supramolecular organization and shape. *Journal of Anatomy* **187**, 259-269.
- Seene T, Kaasik P & Riso E-M. (2012). Review on aging, unloading and reloading: Changes in skeletal muscle quantity and quality. *Archives of Gerontology and Geriatrics* **54**, 374-380.
- Servais S, Letexier D, Favier R, Duchamp C & Desplanches D. (2007). Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: Links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radical Biology and Medicine* **42**, 627-635.
- Shapiro SD, Kobayashi DK & Ley TJ. (1993). Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 23824-23829.
- Shi Q, Bao S, Song L, Bigner DD, Hjelmeland AB & Rich JN. (2007). Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene* **26**, 4084-4094.
- Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ & Shapiro SD. (1996). Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3942-3946.
- Siu PM & Alway SE. (2006). Deficiency of the Bax gene attenuates denervation-induced apoptosis. *Apoptosis* **11**, 967-981.
- Siu PM, Pistilli EE & Alway SE. (2005a). Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **289**, R1015-R1026.
- Siu PM, Pistilli EE, Butler DC & Alway SE. (2005b). Aging influences cellular and molecular responses of apoptosis to skeletal muscle unloading. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **288**, C338-C349.
- Skeie GO. (2000). Skeletal muscle titin: physiology and pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 1570-1576.

- Slimani L, Micol D, Amat J, Delcros G, Meunier B, Taillandier D, Polge C, Bechet D, Dardevet D, Picard B, Attaix D, Lustrat A & Combaret L. (2012). The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis and apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, In press.
- Smith HK, Maxwell L, Martyn JA & Bass JJ. (2000). Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell and Tissue Research* **302**, 235-241.
- St-Amand J, Okamura K, Matsumoto K, Shimizu S & Sogawa Y. (2001). Characterization of control and immobilized skeletal muscle: an overview from genetic engineering. *Faseb Journal* **15**, 684-692.
- Stein TP, Schluter MD, Galante AT, Soteropoulos P, Tolia PP, Grindeland RE, Moran MM, Wang TJ, Polansky M & Wade CE. (2002). Energy metabolism pathways in rat muscle under conditions of simulated microgravity. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 471-478.
- Sternlicht MD & Werb Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**, 463-516.
- Stevenson EJ, Giresi PG, Koncarevic A & Kandarian SC. (2003). Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology-London* **551**, 33-48.
- Stpierre BA & Tidball JG. (1994). Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *Journal of Applied Physiology* **77**, 290-297.
- Stracke JO, Fosang AJ, Last K, Mercuri FA, Pendas AM, Llano E, Perris R, Di Cesare PE, Murphy G & Knauper V. (2000). Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Febs Letters* **478**, 52-56.
- Sudhakar A, Sugimoto H, Yang CQ, Lively J, Zeisberg M & Kalluri R. (2003). Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4766-4771.
- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC & Kroemer G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 571-579.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM & Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.

- Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH & Calderwood DA. (2003). Talin binding to integrin beta tails: A final common step in integrin activation. *Science* **302**, 103-106.
- Taillandier D, Aurousseau E, Combaret L, Guezennec C & Attaix D. (2003). Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**, 665-675.
- Taillandier D, Aurousseau E, MeynialDenis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P, Ducastaing A, Bigard X, Guezennec C, Schmid H & Attaix D. (1996). Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochemical Journal* **316**, 65-72.
- Tajbakhsh S. (2005). Skeletal muscle stem and progenitor cells: Reconciling genetics and lineage. *Experimental Cell Research* **306**, 364-372.
- Takala TE & Virtanen P. (2000). Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **10**, 321-325.
- Thomason DB & Booth FW. (1990). Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *Journal of Applied Physiology* **68**, 1-12.
- Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP & Leibovitch SA. (2005). Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 2847-2856.
- Tisdale MJ. (2002). Biochemical mechanisms of cellular catabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **5**, 401-405.
- Trotter JA & Purslow PP. (1992). Functional-morphology of the endomysium in series fibered muscles. *Journal of Morphology* **212**, 109-122.
- Troussard AA, Mawji NM, Ong C, Mui A, St Arnaud R & Dedhar S. (2003). Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 22374-22378.
- Tsai F-C, Pai M-H, Chiu C-C, Chou C-M & Hsieh M-S. (2011). Denervation dynamically regulates integrin alpha 7 signaling pathways and microscopic structures in rats. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care* **70**, 220-227.
- Urso ML, Scrimgeour AG, Chen Y-W, Thompson PD & Clarkson PM. (2006). Analysis of human skeletal muscle after 48 h immobilization reveals alterations in mRNA and protein for extracellular matrix components. *Journal of Applied Physiology* **101**, 1136-1148.
- Ussar S, Moser M, Widmaier M, Rognoni E, Harrer C, Genzel-Boroviczeny O & Faessler R. (2008). Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction. *Plos Genetics* **4**.

- van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X & Vandenabeele P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**, 487-497.
- van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R & Vandenabeele P. (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death and Differentiation* **8**, 1136-1142.
- Vanderrest M & Garrone R. (1991). Collagen family of proteins. *Faseb Journal* **5**, 2814-2823.
- Vargas R & Lang CH. (2008). Alcohol accelerates loss of muscle and impairs recovery of muscle mass resulting from disuse atrophy. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* **32**, 128-137.
- Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Attaix D & Combaret L. (2008). The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **295**, E1181-E1190.
- Vazeille E, Slimani L, Claustre A, Magne H, Labas R, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Astruc T, Attaix D & Combaret L. (2012). Curcumin treatment prevents increased proteasome and apoptosome activities in rat skeletal muscle during reloading and improves subsequent recovery. *Journal of Nutritional Biochemistry* **23**, 245-251.
- Venojarvi M, Kvist M, Jozsa L, Kalimo H, Hanninen O & Atalay M. (2007). Skeletal muscle HSP expression in response to immobilization and remobilization. *International Journal of Sports Medicine* **28**, 281-286.
- Vescovo G, Ravara B & Libera LD. (2008). Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation and exercise capacity in heart failure. *Basic Research in Cardiology* **103**, 285-290.
- Vescovo G, Zennaro R, Sandri M, Carraro U, Leprotti C, Ceconi C, Battista G, Ambrosio B & Dalla Libera L. (1998). Apoptosis of skeletal muscle myofibers and interstitial cells in experimental heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **30**, 2449-2459.
- Vincenti MP. (2001). The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **151**, 121-148.
- Visse R & Nagase H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases - Structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* **92**, 827-839.
- Voermans NC, Bonnemann CG, Huijling PA, Hamel BC, van Kuppevelt TH, de Haan A, Schalkwijk J, van Engelen BG & Jenniskens GJ. (2008). Clinical and molecular

- overlap between myopathies and inherited connective tissue diseases. *Neuromuscular Disorders* **18**, 843-856.
- Wang H-V, Chang L-W, Brixius K, Wickstroem SA, Montanez E, Thievessen I, Schwander M, Mueller U, Bloch W, Mayer U & Faessler R. (2008). Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *Journal of Cell Biology* **180**, 1037-1049.
- Wang X, Kawano F, Matsuoka Y, Fukunaga K, Terada M, Sudoh M, Ishihara A & Ohira Y. (2006). Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **290**, C981-C989.
- Washington TA, White JP, Davis JM, Wilson LB, Lowe LL, Sato S & Carson JA. (2011). Skeletal muscle mass recovery from atrophy in IL-6 knockout mice. *Acta Physiologica* **202**, 657-669.
- Weaver MS, Workman G & Sage EH. (2008). The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta 1 and activation of integrin-linked kinase. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22826-22837.
- Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH & Campbell ID. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* **128**, 171-182.
- Weiss A, Schiaffino S & Leinwand LA. (1999). Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: Implications for functional diversity. *Journal of Molecular Biology* **290**, 61-75.
- White DE, Coutu P, Shi Y-F, Tardif J-C, Nattel S, Arnaud RS, Dedhar S & Muller WJ. (2006). Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure. *Genes & Development* **20**, 2355-2360.
- Wickstroem SA, Lange A, Montanez E & Faessler R. (2010). The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase! *Embo Journal* **29**, 281-291.
- Widrick J, Maddalozzo G, Hu H, Herron J, Iwaniec U & Turner R. (2008). Detrimental effects of reloading recovery on force, shortening velocity, and power of soleus muscles from hindlimb-unloaded rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **295**, R1585-R1592.
- Willems MET, Miller GR, Stauber FD & Stauber WT. (2010). Effects of repeated lengthening contractions on skeletal muscle adaptations in female rats. *Journal of Physiological Sciences* **60**, 143-150.
- Williams PE & Goldspink G. (1984). CONNECTIVE-TISSUE CHANGES IN IMMOBILIZED MUSCLE. *Journal of Anatomy* **138**, 343-350.
- Wing SS, Haas AL & Goldberg AL. (1995). Increase in ubiquitin protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal-muscle during starvation and atrophy denervation. *Biochemical Journal* **307**, 639-645.

- Wittwer M, Fluck M, Hoppeler H, Muller S, Desplanches D & Billeter R. (2002). Prolonged unloading of rat soleus muscle causes distinct adaptations of the gene profile. *Faseb Journal* **16**, 884-+.
- Wong ASL, Cheung ZH & Ip NY. (2011). Molecular machinery of macroautophagy and its deregulation in diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1812**, 1490-1497.
- Wozniak AC, Kong JM, Bock E, Pilipowicz O & Anderson JE. (2005). Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: Markers, models, stretch, and potential alternate pathways. *Muscle & Nerve* **31**, 283-300.
- Wu CY. (2004). The PINCH-ILK-parvin complexes: assembly, functions and regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1692**, 55-62.
- Ye Y & Rape M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 755-764.
- Yimlamai T, Dodd SL, Borst SE & Park S. (2005). Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Applied Physiology* **99**, 71-80.
- Young RB, Moriarity DM & McGee CE. (1986). Structural-analysis of myosin genes using recombinant-dna techniques. *Journal of Animal Science* **63**, 259-268.
- Yu J, Peter C, Roberts S & Urban JPG. (2002). Elastic fibre organization in the intervertebral discs of the bovine tail. *Journal of Anatomy* **201**, 465-475.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the Autophagic/Lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism* **6**, 472-483.
- Zhao YG, Xiao AZ, Newcomer RG, Park HI, Kang TB, Chung LWK, Swanson MG, Zhau HE, Kurhanewicz J & Sang QXA. (2003). Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 15056-15064.
- Zhao YG, Xiao AZ, Park HI, Newcomer RG, Yan M, Man YG, Heffelfinger SC & Sang QXA. (2004). Endometase/matrilysin-2 in human breast ductal carcinoma in situ and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -4: A putative role in the initiation of breast cancer invasion. *Cancer Research* **64**, 590-598.
- Zhong H, Roy R, Woo J, Kim J & Edgerton V. (2007). Differential modulation of myosin heavy chain phenotype in an inactive extensor and flexor muscle of adult rats. *Journal of Anatomy* **210**, 19-31.
- Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N & Yue Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature Cell Biology* **11**, 468-U262.

Zhou J, Liao W, Yang J, Ma K, Li X, Wang Y, Wang D, Wang L, Zhang Y, Yin Y, Zhao Y & Zhu W. (2012). FOXO3 induces FOXO1-dependent autophagy by activating the AKT1 signaling pathway. *Autophagy* **8**.

Annexes

Matériels et méthodes

I. Protocole expérimental

L'expérimentation animale a été réalisée sur des rats mâles adultes (6 mois) de souche Wistar (Charles River Laboratories (BP 0109, 69592 l'Arbresle Cedex France)).

Les rats ont été hébergés dans des cages individuelles à l'animalerie de l'INRA. Ces animaux ont été placés en adaptation pendant 3 semaines afin de leur permettre de s'habituer aux nouvelles conditions environnementales (cage, température, régime alimentaire). Pendant cette période, les rats ont été nourris à volonté avec un régime standard de croquette contenant 13% de protéines (source protéique = caséine), et ont eu un libre accès à l'eau. A la fin de la période d'adaptation (I0), les rats ont été soumis à une immobilisation unilatérale de la patte arrière droite par la pose d'un plâtre thermo-moulant (ORFIT, Soft micro-perforé, Gibaud) maintenu par un fil de fer protecteur (Figure 13), sous anesthésie, pendant 8 jours. Dans notre expérimentation, la patte a été immobilisée de façon à provoquer une atrophie importante des muscles de la loge postérieure de la patte (Gastrocnemius et soleus). Les muscles GA et TA se retrouvent ainsi immobilisés en position raccourcie et étirée respectivement. Une étude réalisée précédemment au laboratoire a montré que les muscles GA et Soleus de la patte controlatérale (non plâtrée) ne sont pas affectés par la restriction alimentaire ou par le plâtrage (Vazeille *et al.*, 2008). C'est pourquoi la patte arrière gauche a servi de contrôle pour notre expérimentation. Tout au long de la période de plâtrage, les rats ont été suivis quotidiennement pour vérifier l'état de leur plâtre et de la patte plâtrée (rougeur, œdème, état de plâtre).



Figure 13: Immobilisation unilatérale de la patte arrière droite

A la fin de la période d'immobilisation (I8), les rats ont été déplâtrés sous anesthésie et placés en récupération pendant 10 jours (R1, R3, R6, R8 et R10), pour étudier les mécanismes impliqués dans l'atrophie musculaire et ceux qui s'installent dès les premiers jours de récupération. Le poids corporel et la consommation journalière (par pesée des refus) ont également été suivis pendant toute la durée de l'expérimentation.

A chaque point de la cinétique (I0, I8, R1, R3, R6, R8 et R10), les animaux ont été euthanasiés sous anesthésie au pentobarbital (40 – 50 IP (intrapéritonéal); 35 - 50 mg/kg) (n=10-11 / temps) et les muscles GA et TA ont été prélevés et pesés. Les muscles GA et TA ont été divisés en deux portions. Une portion a été congelée rapidement dans l'azote liquide et conservée à -80°C jusqu'à utilisation. L'autre portion des muscles a été placée sur un morceau de liège grâce à un milieu de montage en respectant le sens d'orientation des fibres, puis congelée rapidement dans de l'isopentane refroidi préalablement dans de l'azote liquide. Les muscles ont ensuite été stockés à -80°C jusqu'aux analyses histologiques.

II. Analyses histologiques des muscles

II.1. Préparation des coupes transversales

Les échantillons cryo-fixés ont été décollés du liège et placés sur une platine, prévue à cet effet, préalablement recouverte d'une goutte de milieu d'enrobage. L'échantillon a été orienté de manière à placer les fibres musculaires perpendiculairement au sens de coupe afin d'assurer la réalisation de coupes transversales. L'ensemble a été ensuite déposé quelques heures à -20°C pour faciliter la confection des coupes et placé sur le support de coupe situé dans le cryostat (Microm HM 500M Microm International). L'échantillon a été « usiné » délicatement, en déplaçant le couteau par manipulation micrométrique, jusqu'à obtention d'une surface d'échantillon bien plane et homogène. Des coupes de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées, déposées par adsorption sur des lames de verre, et déshydratées par un séchage à l'air libre et à température ambiante pendant au moins 1 heure.

Les coupes destinées à la détermination du nombre de noyaux apoptotiques ont été fixées dans un bain de paraformaldéhyde 4% PBS 1X, déshydratées dans un bain d'éthanol 100% et ensuite séchées à l'air libre puis stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

II.2. Analyse structurale des fibres musculaires et du tissu conjonctif

Les coupes ont été colorées au Rouge Sirius pour mettre en évidence le collagène (coloré en rouge) et les fibres musculaires (colorées en jaune). Les coupes ont ensuite été observées à l'aide d'un microscope optique à transmission (Olympus BX-51, Tokyo, Japon), couplé à une caméra haute résolution (Olympus DP72). Pour chaque section de muscle, 3 images en couleur (RVB) ont été acquises à l'aide d'un objectif x 10, chaque image représentant un champ de $879 \times 662 \mu\text{m}^2$. Les images ont été ensuite analysées semi-automatiquement à l'aide d'un algorithme spécifique développé en « visual basic » sous le logiciel Visilog 6.9 (Noesis, France). Brièvement, la composante verte de l'image originale (RVB) est « seuillée » pour segmenter la MEC. L'image binaire inverse de la MEC est alors soumise à un algorithme pour parfaire la segmentation des fibres et rendre ainsi la MEC continue dans des zones où elle était trop fine pour être détectée. L'image binaire de la MEC est « érodée » un certain nombre de fois pour séparer l'endomysium (fin et donc érodé) du perymysium (plus épais et donc non érodé). L'architecture de cette image de la MEC est en plus dessinée pour en mesurer le degré de ramification (points triples). L'ensemble des ces images binaires est analysé pour en déduire l'aire des fibres, leur circularité inverse (shape factor), l'aire de l'endomysium et du perymysium, et enfin le nombre de points triple de la MEC.

II.3. Quantification des noyaux apoptotiques

Les coupes stockées à -20°C ont été perméabilisées dans une solution contenant du triton 0.1% PBS1X et du citrate de sodium 0.1% PBS1X. Un triple marquage a été réalisé sur ces coupes en utilisant 1/ un kit TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase fluorescein-dUTP Nick End Labeling) pour détecter les noyaux apoptotiques (marquage en vert) selon les instructions du fabricant, 2/ le réactif Hoechst qui permet de marquer tous les noyaux présents dans les fibres (marquage en bleu) et, 3/ un anticorps anti laminine-2 α (marquage en rouge) pour distinguer les noyaux présents à l'intérieur de la fibre de ceux présents au niveau du tissu conjonctif. Des contrôles positifs ont été effectués après incubation préalable des coupes avec la DNase I (Roche Applied Science, Meylan, France) à $0,12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Les contrôles négatifs ont été incubés avec la solution de marquage à la place de la solution TUNEL. Après saturation des sites antigéniques des coupes avec du sérum de chèvre à 10% dans du PBS 1X, les coupes

ont d'abord été incubées avec un anticorps primaire anti-laminine-2 α dilué au 1:200 pour marquer la lame basale des fibres musculaires (1h, 37 °C), puis rincées avec du PBS 1X (10 min) et enfin incubées avec un anticorps secondaire conjugué au fluorophore « DyLight 546 » (Life Technologies, Saint Aubin, France) dilué au 1:400 (30 min, 37 °C). Les coupes musculaires ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS 1X, puis incubées pendant 1 min avec du Hoechst 33258 (dilué au 1:10000 dans du PBS 1X), et montées avec du Fluoromount (Sigma-Aldrich, France). Les acquisitions d'images ont été réalisées avec un microscope à fluorescence (Olympus BX-51) couplé à un appareil photo numérique haute résolution (Olympus DP72) et au logiciel Cell-D soft Olympus Imaging Solutions, Münster, Allemagne). Enfin, les noyaux présents dans le tissu conjonctif ou dans les fibres musculaires ont été repérés après la superposition des images en utilisant le logiciel d'analyse d'image Visilog 6.9 (Noesis, France).

III. Typologie des fibres musculaires

Les muscles GA et TA témoins et immobilisés ont été réduits en poudre afin d'assurer l'homogénéité de ces muscles qui peuvent présenter des hétérogénéités de type de fibre dans certaines régions. Les poudres de muscles GA et TA, immobilisés et témoins, préalablement pesés (150 mg pour le GA et 110 mg pour le TA) ont été extraits dans 2 ml de tampon H préparé extemporanément (Hepes 20mM, β -glycérophosphate 50mM, KCl 100mM, NaF 50mM, EGTA 2mM et EDTA 0.2mM, DTT 1mM, benzamidine 1mM, sodium vanadate 0.5mM, triton X100 1%, PMSF 200mM, cocktail d'inhibiteurs (Sigma P8340) (pH7.4). Les muscles ont ensuite été broyés au polytron quelques secondes, et les homogénats ont été centrifugés à 14500 g pendant 12 minutes à 4°C. Un aliquot de chaque surnageant a été conservé à -80°C pour déterminer la concentration en protéines selon la méthode de (Lowry *et al.*, 1951). Le reste de chaque extrait a été dénaturé en présence de Laemli 1X pendant 5 min à 95°C, puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Ces extraits ont servi pour l'étude de la proportion des différentes isoformes de chaînes lourdes de myosines en électrophorèse 1D et pour la mesure de l'expression protéique de l'ILK (Cf. § VI. Mesure des niveaux d'expression protéique de l'ILK et de MURF1).

Les différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC), MyHC I, IIb, IIx et IIa, ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) selon la méthode de Mizunoya *et al.* (Mizunoya *et al.*, 2008b). Brièvement,

les protéines contenues dans chacun des extraits des muscles GA (6µg) et TA (3µg) immobilisés ou témoins ont été déposées sur un gel d'acrylamide 4% w/v [acrylamide-N,N'-methylenebisacrylamide (Bis) (50 :1), 30% glycérol, 70mM Tris-HCl (pH 6.7), 4mM EDTA (pH 7.0), 0.4% SDS, 0.1% persulfate d'ammonium (APS), et 0.05% N, N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)], puis séparées sur un gel d'acrylamide 8% w/v [Bis-acrylamide (99 :1), glycérol 35%, Tris-HCl (pH8.8), glycine 0.1M, SDS 0.4%, APS 0.1% et TEMED 0.05%]. L'électrophorèse s'est déroulée à 4°C en utilisant un tampon inférieur composé de [tampon (A) : Tris-base 0.05M, glycine 75mM et SDS w/v 0.05%] et un tampon supérieur [tampon A concentré 6 fois contenant du β-mercaptoethanol à 0.12% v/v]. La migration a été programmée d'abord à 10 mA pendant 40 min puis à 140V pendant 15h. Au terme de la migration, les gels sont placés dans une solution de base (Ethanol 30%, acide acétique 5% et eau distillée 65%) qui permet de fixer les protéines pendant 20 min. Les gels sont ensuite colorés au bleu de coomassie R250 pendant 40 min sous agitation, puis rincés dans de l'eau ultrapure, et enfin décolorés dans la solution de base (un 1^{er} bain rapide et un deuxième bain de 20min). La proportion de chaque isoforme de chaîne lourde de myosine (I, IIb, IIx ou IIa) est ensuite évaluée grâce au logiciel Image-Quant TL v7.0 (GE Healthcare Europe GmbH, Uppsala, Soudan).

IV. Mesure des activités des protéasomes et de l'apoptosome

Les poudres des muscles GA (150 mg) et TA (110 mg) témoins et immobilisés ont été homogénéisés à 4°C, à l'aide d'un polytron dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCL, 250 mM de sucrose, 10mM d'ATP, 5mM de MgCl₂, 1mM de DTT, 10µg/ml d'antipain, 10µg/ml de leupeptine, 10µg/ml d'aprotinine et 10µg/ml de pepstatine et 0.2mM de PMSF, pH 7.0. Les homogénats ont ensuite été centrifugés pendant 20 min à 10000g (4°C) puis pendant 5h à 100000g (4°C). Les protéasomes contenus dans le culot ont été solubilisés dans un tampon contenant 5mM de Tris-Hcl (pH 7.5), 50mM de MgCl₂ et 20% de glycérol (tampon A). Les teneurs protéiques de chaque extrait de protéasomes ont été déterminées par la méthode de Lowry *et al.* (1951) et les échantillons purifiés ont été stockés à -80°C pour mesurer les activités des protéasomes.

Les activités « chymotrypsin-like » et « trypsin-like » du protéasome 20S ont été évaluées en mesurant la vitesse d'hydrolyse des substrats fluorogéniques LLVY-AMC (succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-méthylcoumarin) et LRR-AMC (Leu-Arg-Arg-AMC) respectivement.

Pour cela, 5 μ l (GA) ou 7 μ l (TA) d'extraits de protéasome ont été complétés à 15 μ l avec du tampon A, et incubés avec 60 μ l de tampon réactionnel (Tris-Cl 50mM, MgCl₂ 11,25mM, DTT 1,25mM, Apyrase 0,01u/ μ l) contenant 375 μ M de LLVY-AMC ou 800 μ M de LRR-AMC, en présence ou non d'un inhibiteur du protéasome, le MG132 (50 μ M ou 100 μ M respectivement). La mesure de l'accumulation du produit de clivage AMC (7-amido-4-methycoumarin) a été réalisée grâce à un spectrofluorimètre FLX800 pendant 1h (λ_{ex} = 380nm et λ_{em} = 480nm). La pente obtenue correspond à la quantité de substrat hydrolysé par unité de temps et est exprimée en RFU (Relative Fluorescence Unit)/min. La différence entre l'activité mesurée avec et sans inhibiteur permet de déterminer l'activité « chymotrypsin-like » ou « trypsin-like » des protéasomes. Elle est finalement exprimée en RFU/min/ μ g de protéines.

L'apoptosome est un complexe de haut poids moléculaire (700-1400 kDa) qui co-purifie avec les protéasomes. L'activité de l'apoptosome a été déterminée en mesurant l'activité de la caspase-9 sur les extraits ci-dessus en mesurant la vitesse d'hydrolyse du substrat fluorogénique Ac-LEHD-AMC (Enzo Life Sciences, France). 25 μ l de chaque extrait ont été additionnés à 25 μ l de tampon A et incubés avec 50 μ l de tampon réactionnel (PIPES 100mM, EDTA 0.2mM, DTT 5mM et du substrat AC-LEHD-AMD 100 μ M) en présence ou non de l'inhibiteur de la caspase-9 (LEHD-CHO) (Enzo Life Sciences, France, 50 μ M). La mesure de l'accumulation du produit de clivage AMC a été réalisée exactement comme décrit ci-dessus pour les activités des protéasomes.

V. Mesure des niveaux d'expression ARNm de molécules de la MEC, de marqueurs de la signalisation via les intégrines, de la protéolyse et de la régénération musculaire

Les ARN totaux ont été extraits au TRIzol (Life technologies) à partir de 50mg de muscles TA et GA respectivement. La quantité des ARN obtenus a été évaluée sur biopuce LabChip par bioanalyseur (2100 AGILENT) en utilisant le kit RNA 6000 Nano Assay microarrays et leur concentration a été déterminée par mesure de l'absorption à 260 nm (Nanodrop). Après traitement de 1 μ g d'ARN total par la DNase I (15 min, température ambiante), ensuite inactivée (65°C, 10 min), 0,5 μ g d'ARN ont été rétrotranscrits en présence d'amorces aléatoires avec le kit Superscript II (Invitrogen). Les ADNc obtenus ont été dilués au 50^{ème} et stockés à -20°C.

Les amorces (Tableau 5) pour l'amplification des transcrits cibles ont été dessinés grâce au logiciel Primer3 à partir des séquences présentes dans la banque de données Genomatix. L'absence de similarité pour d'autres séquences que la séquence cible a été vérifiée par NCBI BLAST. L'efficacité de la réaction de PCR a été évaluée grâce à une gamme étalon réalisée à partir de dilutions en série (de 10 en 10) d'ADNc. La spécificité de la réaction a été contrôlée après amplification par le thermocycleur CFX96™ Real-time system (BIORAD) selon le protocole suivant : 3 min d'activation de la Taq Polymérase à 95°C suivies de 40 cycles de 10 secondes à 95°C (dénaturation) et 20 secondes à 60°C (hybridation + élongation). Les courbes de fusion obtenues permettent de détecter de possibles multiples produits de PCR incluant les dimères d'amorces.

2µl d'ADNc dilués au 50^{ème} ont été ajoutés à 0,7µl de chaque amorce (10µM), 7µl d'IQSYBR Green Supermix (BIORAD) et 3,6µl d'H₂O, puis amplifiés selon le protocole décrit ci-dessus. Les CT (Threshold Cycle) ont été déterminés à partir des courbes d'amplification des échantillons. La concentration initiale d'une cible est déduite de son CT, qui correspond au nombre de cycles où la courbe d'amplification croise la ligne de seuil. La méthode de comparaison des cycles de seuil (delta delta CT, (Livak & Schmittgen, 2001)) a été utilisée pour comparer l'expression relative des ARNm en utilisant le 18S comme gène de référence.

VI. Mesure des niveaux d'expression protéique de l'ILK et de MURF1

Les niveaux protéiques d'ILK et de MURF1 ont été évaluée par western blot. 50µg (ILK) ou 75µg (MURF1) d'extraits de protéines totales (voir § extraction pour la séparation des isoformes MyHC) ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel à 10% (ILK) ou 12% (MURF1) d'acrylamide acrylamide-bis (29:1)), puis transférés sur des membranes en PVDF (GE Healthcare) (ILK) ou de nitrocellulose (MURF1) (Li Co-Biosciences, ScienceTec, Courtaboeuf, France).

Pour l'ILK, les membranes sont incubées ensuite avec l'anticorps anti ILK (Cell Signaling) dilué au 1:5000. Les protéines ont été détectées grâce au kit ECL+ (GE Healthcare, Orsay, France) après avoir exposé les membranes sur un film radiographique (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Orsay, France) et quantifié les protéines par densitométrie en utilisant le logiciel Image J. Pour MURF1, les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps contre MURF-1 (R & D Systems, MN, USA) dilué au 1:200, puis avec l'anticorps secondaire IRdye[®] 800CW (âne Anti-chèvre IgG (Li-Cor Biosciences)) dilué au 1:3000. Les protéines ont

été révélées par fluorescence et quantifiées grâce au logiciel Odyssey 2.1 (Li-Cor Biosciences).

VII. Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel d'analyse Statistical Analysis Systems 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Les données ont été analysées par ANOVA à trois facteurs afin de tester l'effet « muscle » (GA et TA), l'effet « immobilisation », et l'effet « stade » (temps d'immobilisation ou de récupération (I0 à R10)). Cependant, une interaction forte "muscle × stade" apparaît avec, quasiment, l'ensemble des variables mesurées ($P < 0,001$). Ainsi, une deuxième analyse a été réalisée, en séparant cette fois-ci les deux muscles, par ANOVA à deux facteurs pour tester l'effet « Immobilisation » et l'effet « stade » ainsi que leur interaction pour chaque variable et au sein de chaque muscle. L'effet de l'immobilisation entre la patte immobilisée et la patte témoin a été testé grâce au test de « Tukey » en mesures appariées. Les données sont des moyennes $\pm$ SEM et sont considérées comme statistiquement différentes pour une valeur de P inférieure à 0,05. *, $P < 0,05$ I vs. Témoin; les barres d'histogrammes portant des lettres différentes sont statistiquement différentes.

Symbole officiel	Référence NCBI	Séquence amorce sens	Séquence amorce anti-sens
Mmp2	NM_031054	5'-TGTGTTCTTCGCAGGGAATG-3'	5'-GCTGGACATCAGGGGGTAAA-3'
ILK	NM_133409	5'-GCACGCACTCAATAGCCGT-3'	5'-ACCCAGGCAGGTGCATACAT-3'
Itgβ1	NM_017022	5'-TGGGCACACTGTCTGGAAAC-3'	5'-CTCCATCTGGCAATTTGCTG-3'
Itga7	NM_030842	5'-CATTGATCCAAGAGCCATCG-3'	5'-GCTGGGCACAGCAACATAAC-3'
Lims1 (Pinch)	NM_001145456	5'-GATGGGGGTCCCTATCTGTG-3'	5'-GGCACAAACAAAATGCTCCA-3'
Parva (Parvin)	NM_020656	5'-TTCCATCCAAGTGGTTGTGG-3'	5'-CGGAAAGGGCCTCTGTGTTA-3'
Mmp14 (Mt1-mmp)	NM_031056	5'-TATGGGCCCAACATCTGTGA-3'	5'-TATTCCTCACCCGCCAGAAC-3'
Timp1	NM_053619	5'-TCATGGGTTCCCCAGAAATC-3'	5'-ATTTCACACAGCGTCGAATC-3'
Sparc	NM_12656	5'-TGGACTACATCGGACCATGC-3'	5'-TGACCAGGACGTTTTTGAGC-3'
Sharnin	NM_031153	5'-TCCCATAAAGGCTGCAAGTCA-3'	5'-AATGGAACAGTGTGGGTGGA-3'
Col1a1	NM_053304	5'-CCCTGCTGGTGAGAAAGGAT-3'	5'-GCTGTCCAGCAATACCCTGA-3'
Timp2	NM_021989	5'-TATCTACACGGCCCCCTCCT-3'	5'-GCATCTTGCCATCTCCTTCC-3'
MyoD (Myod1)	NM_176079	5'-CTGCTCTGATGGCATGATGG-3'	5'-ACTGTAGTAGGCGGCGTCGT-3'
Myf5	NM_001106783	5'-TGTCTGGTCCCGAAAGAACA-3'	5'-CAAGCAATCCAAGCTGGACA-3'
Col-VIIa1	XM_243912	5'-GGAGACATTGCTTCCCAGAA-3'	5'-CAGCATCTGGTTGATCTGC-3'
Col-XVIIIa1	NM_053489	5'-GAGATCCCATCCAGAGCAGA-3'	5'-GCTGAGATTGCGGACTT-3'
Col-IVa1	NM_001135009	5'-TCCTGCTTTCCGCTCTGC-3'	5'-GAAAGGCCTTGGCCTGTCCATACT-3'
Col-IA1	NM_053304	5'-CCCTGCTGGTGAGAAAGGAT-3'	5'-GCTGTCCAGCAATACCCTGA-3'
18S rRNA	NR_046237	5'-AATCAGTTATGGTTCCTTTGTCG-3'	5'-GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA-3'
Dcn	NM_024129	5'-AGTTGGGCAGCATGACTTCT-3'	5'-TCTGAAGGTGTGTGGGTGAA-3'
Col-XIVa1	NM_001130548	5'-GTGTCCCATCCAGATCAACC-3'	5'-CCTGCTCTTCCAATGTCTCC-3'
TnC	NM_053861	5'-GCATGGTCACTGGATACCT-3'	5'-CAGGCTGTAGGAGGTGGTGT-3'
MURF1(Trim63)	NM_080903	5'-GTGAAGTTGCCCCCTTACAA-3'	5'-TCCTCCTGCTCCTGAGTGAT-3'
MAFbx (Fbxo32)	NM_133521	5'-CTACGATGTTGCAGCCAAGA-3'	5'-GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC-3'
LC3B	NM_022867	5'-CCGGAGCTTCGAACAAAGAG-3'	5'-CAGCTGCTTCTCACCCTTGT-3'
Beclin-1	NM_053739	5'-TGTTCCCTATGGAAATCACTCG-3'	5'-GTCCCAGAAAAACCGCAAAC-3'
Cathepsine-L (CstL)	NM_013156	5'-GGTGGGGCCTATTTCTGTTG-3'	5'-TCGAGGTCCTTGCTGCTACA-3'

Tableau 5: Amorces utilisées pour l'analyse RT-qPCR quantitative. Col= Collagen; MMP = Matrix metalloprotease; TIMP = Tissue inhibitor of matrix metalloprotease; LC3b= Light Chain 3 b; TnC= Ténascine C; Itg: Intégrine; Sparc: Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein; MURF-1: Muscle Ring Finger 1; MAFbx: Muscle Atrophy F-box; Myf : Myogenic factor.

Communications orales et affichées

Communications orales

Slimani L, Dubost A, Meunier B, Attaix D, Listrat A, Combaret L. Tibialis anterior skeletal muscle alterations following immobilization in the rat is associated with sustained activation of the proteasome dependent proteolysis and the mitochondria associated apoptosis during the early stages of recovery. *40th European Muscle Conference*. Berlin, Germany, September 2011. Communication orale, abstract.

Slimani L, Meunier B, Attaix D, Listrat A, Combaret L. Rôle des altérations de la matrice extracellulaire dans les processus de récupération musculaire. *Journée scientifique des doctorants UNH*, Clermont-Ferrand, France, 24 mai 2011. Abstract.

Slimani L, Micol D, Meunier B, Delcros G, Dardevet D, Picard B, Attaix D, Listrat A, Combaret L. Pendant la phase précoce de récupération, le muscle tibialis anterior s'atrophie et présente des altérations prononcées et persistantes du tissu conjonctif, de la protéolyse et de l'apoptose. *Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé*, Clermont-Ferrand, France, 24-25 mai 2012. Abstract soumis.

Communications affichées

Codran A, Vazeille E, Samuels SE, Taillandier D, Béchet D, **Slimani L**, Breuillé D, Corthezy-Theulaz I, Attaix D, Combaret L. GLP-2 inhibits intestinal lysosomal proteolysis and improves skeletal muscle recovery in the starved/refed rat. *First International Congress of Translational Research in Human Nutrition*, Clermont-Ferrand, France, 19-20 mars, 2010, poster, abstract.

Vazeille E, **Slimani L**, Magne H, Labas R, Béchet D, Taillandier D, Dardevet D, Astruc T, Attaix D, Combaret L. Curcumin treatment prevented increased proteasome and apoptosome activities in rat skeletal muscle after immobilization and improved subsequent recovery. *1st International Congress of Translational Research in Human Nutrition*, Clermont-Ferrand, France, 19-20 Mars, 2010, poster, abstract.

Slimani L, Vazeille E, Magne H, Claustre A, Taillandier D, Béchet D, Polge C, Dardevet D, Attaix D, Combaret L. Rôle des altérations de la protéolyse ubiquitine-protéasome dépendante et de l'apoptose mitochondriale dans les processus de récupération musculaire. *2^{ème} Journée scientifique du CRNH Auvergne*. Clermont-Ferrand, France, 18 novembre, 2010, poster, abstract.

Slimani L, Vazeille E, Magne H, Claustre A, Taillandier D, Béchet D, Polge C, Dardevet D, Attaix D, Combaret L. Rôle des altérations de la protéolyse ubiquitine-protéasome dépendante et de l'apoptose mitochondriale dans les processus de récupération musculaire. *6^{ème} Journées de la Recherche de l'IFR Santé-Auvergne*. Clermont-Ferrand, 25 novembre, 2010, poster, Abstract.

Slimani L, Dubost A, Meunier B, Attaix D, Listrat A, Combaret L. Tibialis anterior skeletal muscle alterations following immobilization in the rat is associated with sustained activation of the proteasome dependent proteolysis and the mitochondria associated apoptosis during the early stages of recovery. *40th European Muscle Conference*. Berlin, Germany, 14-18 Septembre, 2011, poster, abstract.

Slimani L, Dubost A, Meunier B, Attaix D, Listrat A, Combaret L. Mécanismes impliqués durant l'immobilisation et les phases précoces de récupération chez le rat. *3^{ème} Journée Scientifique du CRNH Auvergne*, Novembre, 2011, poster abstract.

Slimani L, Dubost A, Meunier B, Attaix D, Listrat A, Combaret L. Mécanismes impliqués durant l'immobilisation et les phases précoces de récupération chez le rat. *7^{ème} Journée de la Recherche de l'IFR Santé-Auvergne*, Clermont-Ferrand, France, décembre 2011, poster, abstract.

Slimani L, Dubost A, Meunier B, Dardevet D, Listrat A, Combaret L, Attaix D. During early recovery the worsening of immobilization-induced rat tibialis anterior muscle atrophy is associated with sustained activation of proteolytic and apoptotic pathways. *6th Cachexia Conferences*, Milan, Italy, December 8-10, 2011, poster, abstract 1-04, J Cachexia Sarcopenia Muscle. DOI 10.1007/s13539-011-0045-3.

Autres publications

Curcumin treatment prevents increased proteasome and apoptosome activities in rat skeletal muscle during reloading and improves subsequent recovery[☆]

Emilie Vazeille^{a,b}, Lamia Slimani^{a,b}, Agnès Claustre^{a,b}, Hugues Magne^{a,b}, Roland Labas^c, Daniel Béchet^{a,b}, Daniel Taillandier^{a,b}, Dominique Dardevet^{a,b}, Thierry Astruc^c, Didier Attaix^{a,b}, Lydie Combaret^{a,b,*}

^aINRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^bClermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^cINRA, UR 370 Qualité des Produits Animaux, 63122 Saint Genès Champanelle, France

Received 17 June 2010; received in revised form 20 October 2010; accepted 29 November 2010

Abstract

Immobilization is characterized by activation of the ubiquitin (Ub)–proteasome-dependent proteolytic system (UPS) and of the mitochondrial apoptotic pathway. Increased oxidative stress and inflammatory response occur in immobilized skeletal muscles. Curcumin exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties, blocked proteasome activation in intact animals, and may favor skeletal muscle regeneration. We therefore measured the effects of curcumin on immobilization-induced muscle atrophy and subsequent recovery. Rats were subjected to hindlimb immobilization for 8 days (I8) and allowed to recover for 10 days (R10). Fifty percent of the rats were injected daily with either curcumin or vehicle. Proteolytic and apoptotic pathways were studied in gastrocnemius muscles. Curcumin treatment prevented the enhanced proteasome chymotrypsin-like activity and the trend toward increased caspase-9-associated apoptosome activity at I8 in immobilized muscles. By contrast, the increase of these two activities was blunted by curcumin at R10. Curcumin did not reduce muscle atrophy at I8 but improved muscle recovery at R10 and the cross-sectional area of muscle fibers of immobilized muscles. Curcumin reduced the increased protein levels of Smac/DIABLO induced by immobilization and enhanced the elevation of X-linked inhibitory apoptotic protein levels at R10. Ub-conjugate levels and caspase-3 activity increased at I8 and were normalized at R10 without being affected by curcumin treatment. Altogether, the data show that curcumin treatment improved recovery during reloading. The effect of curcumin during the atrophic phase on proteasome activities may facilitate the initiation of muscle recovery after reloading. These data also suggest that this compound may favor the initial steps of muscle regeneration.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Ubiquitin–proteasome-dependent pathway; Disuse; Intrinsic apoptotic pathway; Protein breakdown; Reloading

1. Introduction

Muscle wasting is observed in many conditions including immobilization. Skeletal muscle provides power and strength for locomotion and posture but is also the major reservoir of body proteins. Thus, sustained muscle wasting leads to difficulties in performing daily activities and has severe metabolic consequences. The resulting weakness lengthens recovery periods. A major clinical issue is the identification of approaches to limit skeletal muscle atrophy in catabolic situations and/or to improve subsequent muscle recovery.

Muscle protein loss results from an imbalance between protein synthesis and breakdown rates, but also from an imbalance between

apoptotic and regeneration processes. The ubiquitin (Ub)–proteasome system (UPS) is involved in the breakdown of the major contractile proteins. In this pathway, a poly-Ub chain is covalently attached to the substrate and then recognized by the 26S proteasome before the subsequent breakdown of the targeted protein [1]. We and others have previously shown that this pathway is activated during disuse muscle atrophy [2–8]. An activation of apoptosis during immobilization has also been previously reported [8–11]. The mitochondrial apoptotic pathway is triggered by the release of killer proteins, such as cytochrome *c* and Smac/Diablo, and is stimulated by oxidative stress [12]. In this pathway, the release of cytochrome *c* from the mitochondria leads to the formation of a complex (called apoptosome) with apoptotic protease activating factor-1 and procaspase-9 and to the activation of caspase-3 [13]. This pathway is believed to be physiologically important in regulating disuse-induced muscle atrophy [8,9,13–15]. In addition, this pathway is concomitantly activated with the UPS during immobilization-induced atrophy and normalized during recovery [8].

The activation of inflammatory processes and oxidative stress pathways in immobilized muscles [16,17] has been suggested to result in muscle damages and in increased proteolysis and apoptosis

[☆] This study was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique and the Association Française contre les Myopathies. E.V., L.S., and H.M. were supported by a Ph.D. fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

* Corresponding author. UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Tel.: +33 4 73 62 48 24; fax: +33 4 73 62 47 55.

E-mail address: lydie.combaret@clermont.inra.fr (L. Combaret).

[17,18]. Therefore, using compounds counteracting inflammation and oxidative stress may prove beneficial in disuse atrophy. Curcumin (diferuloylmethane) is a component of the spice turmeric (*Curcuma longa*), which exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties [19]. Treatment of cultured myotubes with curcumin prevented the increase in protein degradation caused by a cachectic factor purified from experimental tumors in mice [20]. Furthermore, in other experiments, intraperitoneal (ip) administration of curcumin prevented the loss of muscle mass and protein in lipopolysaccharide (LPS)-injected mice [21]. This compound blocked the induction of the UPS in several catabolic conditions [19–22]. Curcumin could also prevent the induction of some signaling pathways (i.e., nuclear factor κ B, p38 MAP (mitogen-activated protein) kinase, ERK kinase (extra-cellular signal-regulated kinase), xanthine oxidase, β -catenin ...) [21,23–27]. These pathways are activated during disuse [16,17,28–30] and associated with the induction of the UPS and the mitochondrial apoptotic pathway [11,31–33]. Finally, curcumin stimulated muscle regeneration after myotoxic injury in mice [24]. In addition, curcumin is well tolerated and did not exhibit detrimental effects on muscle recovery after myotoxic injury at low doses (<2 mg/kg; ip) [34]. Therefore, we hypothesized that ip curcumin treatment may (1) limit immobilization-induced atrophy and/or favor muscle recovery and (2) modulate the activity of the UPS and the mitochondrial apoptotic pathway.

2. Methods and materials

2.1. Experimental animals

The present study was approved by the Animal Care and Use Committee of the Institut National de la Recherche Agronomique and adhered to the current legislation on animal experimentation in France. Male Wistar rats, 8 months old (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France), were housed individually under controlled environmental conditions (temperature, 22°C; 12 h dark period starting at 8 h), fed a basal diet ad libitum, and given free access to water. The macronutrient composition of the basal diet was (in g/kg diet) as follows: 470 wheat flour, 152 casein, 100 sucrose, 134 lactose, 30 colza oil, 27 peanut oil, 3 sunflower oil, 35 AIN93 mineral mix, 10 AIN93 vitamin mix and 35 cellulose. After a 3-week adaptation period, 32 rats were anesthetized with forene inhalation and subjected to unilateral hindlimb immobilization via an orbit-soft plaque (Gibaud, France) for 8 days. The foot was positioned in plantar extension to induce maximal atrophy of the gastrocnemius and the soleus muscles [5]. We previously reported that the gastrocnemius muscle mass from the nonimmobilized contralateral leg of the caged rats is not significantly different from the gastrocnemius mass of noncaged rats [8]. This indicates that the muscles from the contralateral leg did not hypertrophy because of overloading and that the muscle atrophy at I8 reflects a loss of muscle mass in the immobilized leg [8]. Therefore, the contralateral noncaged leg served as the control in all experiments. At the end of the immobilization period, casts were removed, and animals were allowed to recover for 10 days. During immobilization and recovery periods, animals were daily injected (ip) with either 1 mg/kg body weight of curcumin diluted in dimethyl sulfoxide/0.9% NaCl (1:1000) (curcumin group) or dimethyl sulfoxide/0.9% NaCl alone (vehicle group). At the end of the immobilization (I8) and the recovery periods (R10), rats ($n=8$ /group) were sacrificed under pentobarbital sodium anesthesia (50 mg/kg body weight, ip). Hindlimb gastrocnemius muscles were carefully excised and weighed. The central part of gastrocnemius samples was frozen in cooled isopentane (-160°C), at resting length, and stored at -80°C until histochemical analysis (see below). The remaining was finely pulverized in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analyses.

2.2. Histochemical analyses of muscle

Cross 10- μm -thick cryosections were performed using a cryostat (HM560 Microm) and stained using picro-Sirius red coloration [35], which reveals the collagen of perimysium and endomysium. Observations and image acquisitions were performed using a photonic microscope in bright field mode (Olympus BX 71) coupled to a high-resolution cooled digital camera (Olympus DP 71) and Cell F software (Olympus Soft Imaging Solutions). For each muscle section, 15–20 images, depending on the total area of the muscle, were acquired using a 10 $\times$ objective. Image analysis was performed using the Visilog 5.4 software (Noesis, France). The green component, in gray level, of initial color image was used for higher contrast. For a given optical field, automatic thresholding on gray level allowed segmentation of the connective tissue network (perimysium and endomysium). Measurement of the area of this network was performed by counting the number of pixels. Additional segmentation procedure of the binary images of the connective network with the “watershed” method results in separating objects corresponding to muscle cells. Fiber

boundaries were manually corrected when necessary. Cross-sectional area (CSA) of each cell was automatically calculated.

2.3. Measurement of proteasome and apoptosome activities

Powder (150 mg) of gastrocnemius muscles from control and immobilized hindlimbs at I8 and R10 was homogenized in an ice-cold buffer (pH 7.5) containing 50 mM Tris, 250 mM sucrose, 10 mM ATP, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT (dithiothreitol) and protease inhibitors ($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of antipain, aprotinin, leupeptin and pepstatin A, and 20 μM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)). Apoptosome complexes exhibit molecular weight ranging from ~ 700 to $\sim 1,500$ kDa and therefore cosediment with proteasomes [36]. Accordingly, caspase 9-linked apoptosome activity coelutes with peptidase activities of the proteasome on 10%–40% sucrose gradients [8,36]. Apoptosome complexes and proteasomes were therefore concomitantly isolated by three sequential centrifugations as described previously [37]. Briefly, homogenates were first centrifuged at $10,000g$ for 20 min at 4°C . The resulting supernatant was then centrifuged at $100,000g$ for 1 h at 4°C . This last supernatant was then centrifuged at $100,000g$ for 5 h at 4°C . The final pellet was resuspended in a buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM MgCl_2 and 20% glycerol. The protein content was determined according to Lowry et al. [38]. The proteasome chymotrypsin-like and the apoptosome-linked caspase-9 activities were determined by measuring the hydrolysis of the fluorogenic substrates succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC) (Sigma) and the *N*-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (LEHD-AMC) (Biomol), respectively. To measure the chymotrypsin-like activity of the proteasome, 15 μL of each pellet was added to 60 μL of medium containing 50 mM Tris (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 2 U apyrase and 300 μM of LLVY-AMC with or without the proteasome inhibitor MG132 (40 μM ; Affiniti). To measure the apoptosome-linked caspase-9 activity, 25 μL of each pellet was diluted to 50 μL with buffer A [20 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 20% glycerol, 0.1% Triton X-100 and 1 mM DTT]. Fractions were then incubated with 50 μL of the reaction buffer B [50 mM PIPES, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 10 mM DTT] containing 50 μM of LEHD-AMC. Reactions were performed with or without the caspase-9 inhibitor LEHD-CHO (50 μM ; Biomol). Both activities were determined by measuring the accumulation of the fluorogenic cleavage product (methylcoumaryl-amide, or AMC) using a fluorescence spectrometer FLX800 (Biotek) during 45 min at 380-nm excitation wavelength and 440-nm emission wavelength. The proteasome chymotrypsin-like and the apoptosome-linked caspase-9 activities were measured by calculating the difference between arbitrary fluorescence units recorded with or without the specific inhibitors in the reaction medium. The final data were corrected by the amount of protein in the reaction medium. The time course for the accumulation of AMC after hydrolysis of the substrate was analyzed by linear regression to calculate activities, that is, the slopes of best fit of accumulating AMC versus time.

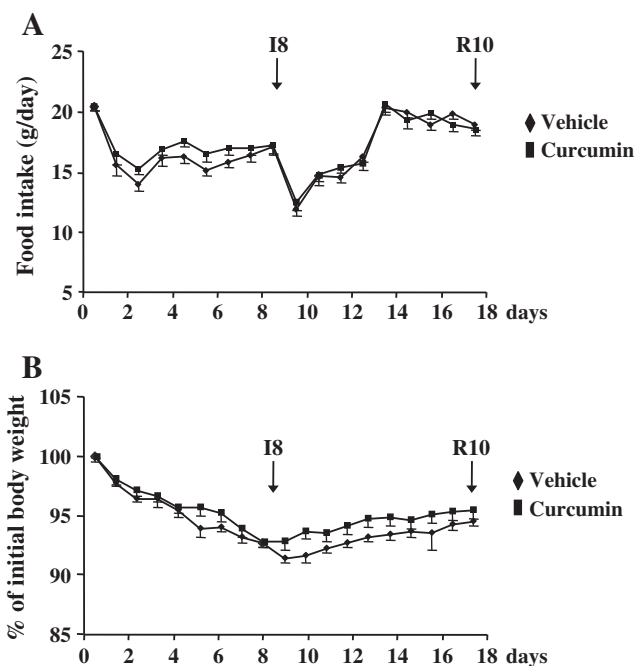


Fig. 1. Effect of curcumin treatment on food intake and body weight during immobilization and recovery. Food intake (A) and body weight (B) are expressed in g/day and in percent of initial body weight, respectively. Data are means $\pm$ S.E.M. (vertical bars) for $n=8$ rats per group.

2.4. Caspase-3 activity measurements

Caspase-3 activity was assessed on total cytosolic protein extracts. Powder (150 mg) of gastrocnemius muscles was homogenized in an ice-cold buffer A (see above) as described by Siu et al. [10]. Extracts were centrifuged at 1,500g for 5 min at 4°C, and the resulting supernatants were subjected to three successive centrifugations at 3,500g for 5 min at 4°C. The last supernatants were stored as total cytosolic protein extracts at –80°C. A protease inhibitor cocktail containing 104 mM 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSE), 0.08 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 4 mM bestatin, 1.5 mM pepstatin A and 1.4 mM E-64 (Sigma) was added to a fraction of the supernatants, which were then stored at –80°C for subsequent determination of X-linked inhibitory apoptotic protein (XIAP) and Smac/Diablo protein levels (see below). Protein concentration was determined according to Lowry et al. [38]. To determine caspase-3 activity, 25 µl of the total cytosolic protein extracts was diluted to 50 µl with buffer A and incubated with 50 µl of buffer B (see above) containing 50 µM of Ac-Asp-

Glu-Val-Asp-AMC (Calbiochem). Reactions were performed with or without 50 µM of the inhibitor of caspase-3 (Ac-Asp-Met-Gln-Asp-CHO [PMQD-CHO] Calbiochem). Caspase-3 activity was determined by measuring the accumulation of AMC using a fluorescence spectrometer FLX800 (Biotek) during 1 h at 380-nm excitation wavelength and 460-nm emission wavelength. The caspase-3 activity was calculated as described for the apoptosome and the proteasome activities.

2.5. Western blots analyses

The accumulation of Ub conjugates was assessed by immunoblotting on myofibrillar protein extracts. Powder (150 mg) of gastrocnemius muscles was homogenized in an ice-cold buffer (buffer C) containing 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, pH 8, 1 mM PMSF, 0.25 mM tosyl-lysylchloromethane), 5 mM N-ethyl-

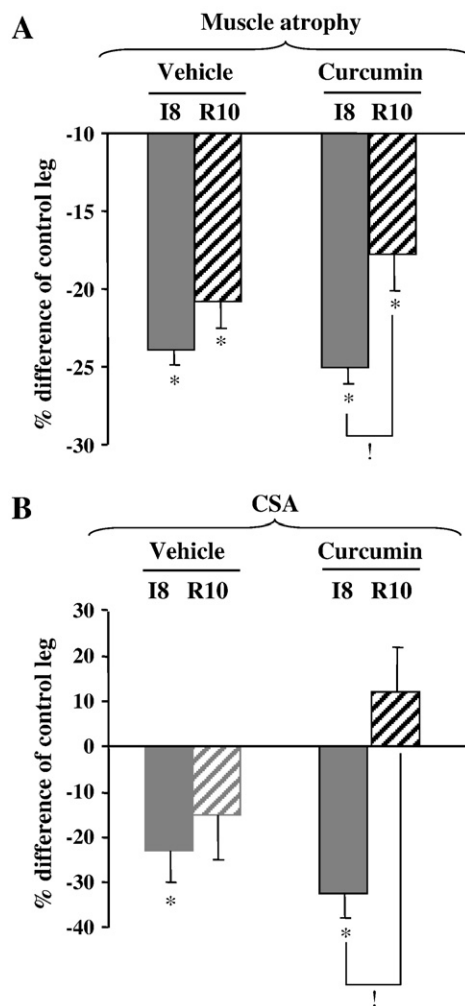


Fig. 2. Curcumin treatment improved muscle recovery after immobilization. (A) Gastrocnemius muscle atrophy is expressed in percent difference of the contralateral noncasted control leg. (B) Cross-sectional fiber area (CSA) is expressed in percent difference of the contralateral noncasted control leg. CSA (μm^2) was measured on 987 to 1,725 control and immobilized muscle fibers from vehicle- and curcumin-treated rats. Means were calculated per muscles. CSAs of control muscle fibers from vehicle and curcumin-treated rats were $3,512 \pm 274$ and $5,152 \pm 401$ (I8), and $3,619 \pm 493$ and $2,760 \pm 283$ (R10), respectively. CSAs of immobilized muscle fibers from vehicle and curcumin-treated rats were $2,549 \pm 143$ and $3,396 \pm 250$ (I8), and $2,848 \pm 196$ and $3,000 \pm 226$, respectively (R10). The difference between immobilized and control muscle fibers CSA was calculated, and values are means $\pm$ S.E.M. (vertical bars) for $n=8$ rats per group. Differences between control and immobilized muscles were assessed by the Student's *t* test ($*P<.05$); Changes in the percent difference observed in immobilized muscles compared with control muscles were assessed by two-way ANOVA (curcumin effect and recovery effect). When significant differences were detected by ANOVA, a post hoc Fisher's test was performed to compare the variations between groups. $^{\dagger}P<.05$, I8 versus R10 in curcumin group.

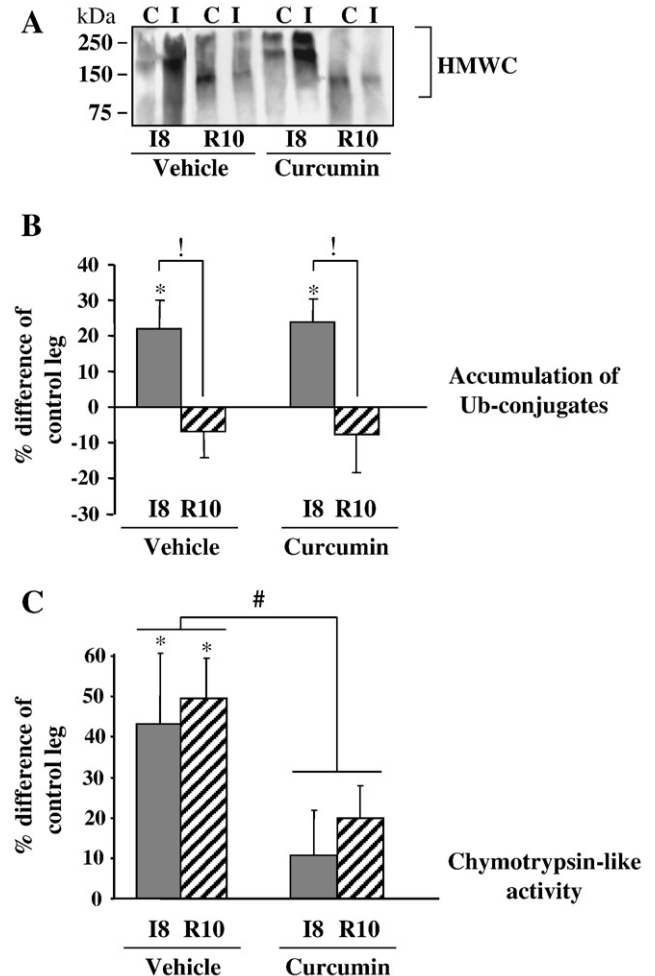


Fig. 3. Curcumin treatment blocked increased proteasome activity but not Ub-conjugate accumulation during immobilization and recovery. (A) High-molecular-weight Ub conjugates (HMWC) were measured on 25 µg of myofibrillar proteins from control (C) or immobilized (I) gastrocnemius muscles from vehicle- and curcumin-treated rats by Western blotting using an antibody that recognizes specifically poly-Ub chains. (B) Signals were quantified in each lanes by using the Image J software and normalized against the amount of proteins (determined following Ponceau Red staining) to correct for uneven loading. Changes of Ub-conjugate accumulation in immobilized muscles compared with control muscles were calculated, and data were expressed in percent variation from control leg. (C) The chymotrypsin-like activity of the proteasome was measured by using a fluorogenic substrate on partially purified proteasome extracts from gastrocnemius muscles as described in experimental procedures. All data are expressed as percent difference of control leg and are means $\pm$ S.E.M. (vertical bars) for $n=8$ rats per group. Differences between control and immobilized muscles were assessed by the Student's *t* test ($*P<.05$). Changes in the percent difference observed in immobilized muscles compared with control muscles were assessed by two-way ANOVA (curcumin effect and recovery effect). When significant differences were detected by ANOVA, a post hoc Fisher's test was performed to compare the variations between groups. $^{\dagger}P<.05$, curcumin versus vehicle group; $^{\ddagger}P<.05$, I8 versus R10 in vehicle or curcumin group.

maleimide, 5 µg/ml leupeptin and 5 µg/ml soybean trypsin inhibitor [8]. Homogenates were centrifuged for 5 min (1,500g, 4°C) to pellet myofibrillar proteins, which were then washed three times in buffer C containing 1% Triton X-100. Myofibrillar proteins were then resuspended in 8 M urea/5 mM Tris–HCl (pH 7.5). Protein concentration was determined as described [38]. The accumulation of Ub conjugates was measured on 25 µg of myofibrillar proteins separated on 7.5% (wt/vol) acrylamide gels and transferred onto PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes. The FK1 antibody (Affiniti), which recognizes poly-Ub chains, was used at a 1:1000 dilution.

The amount of protein levels for the antiapoptotic protein XIAP and for the proapoptotic protein Smac/Diablo (Second mitochondrial-derived activators of caspases) was assessed by immunoblotting on the cytosolic proteins extracted for the caspase-3 activity measurements and stored in the presence of protease inhibitors (see above). Fifty micrograms of protein was separated on a 15% (wt/vol) polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes (GE Healthcare). Antibodies (Cell Signalling) against XIAP and Smac/DIABLO were used at 1:1000 and 1:4000 dilution, respectively. Signals were detected using the ECL+ detection kit (GE Healthcare) after exposition onto radiographic films (Hyperfilm ECL; GE Healthcare), quantified by using the Image J software, and normalized against the amount of proteins (determined following Ponceau Red staining) to correct for uneven loading.

2.6. Statistical analyses

All data are expressed as means±S.E.M. Differences between control and immobilized muscles at each time point were assessed using the Student's *t* test. The effect of curcumin treatment (vehicle vs. curcumin-treated rats) and of recovery by itself (immobilization vs. recovery periods) were assessed by two-way analysis of variance. When significant differences were detected by ANOVA, comparisons between groups were made using the post hoc Fisher's test. Significance was defined at the .05 level. All tests were performed by using Statview (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Animal characteristics

Food intake decreased by 20% in both curcumin- and vehicle-injected rats after 8 days of immobilization (Fig. 1A), so that their body weight decreased by ~8% (Fig. 1B). After cast removal, food

intake increased progressively and was rapidly normalized (about 20 g of dry matter intake) in both groups. Consequently, body weight increased progressively, but rats did not recover their initial body weight 10 days after cast removal (R10).

3.2. Muscle atrophy and recovery

Hindlimb gastrocnemius muscles atrophied in vehicle-injected and curcumin-treated rats, respectively, by 24% and 25% ($P<.0001$) after 8 days of immobilization (I8) (Fig. 2A). Similarly, the muscle fiber CSA decreased by 23% (vehicle) and 32% (curcumin) at I8 ($P<.05$) (Fig. 2B). Two-way ANOVA analysis showed that muscle atrophy and CSA reduction were not modified by curcumin treatment but between immobilization and recovery ($P<.05$). Ten days after cast removal, gastrocnemius muscles mass from the casted leg remained significantly lower compared with control muscles ($P<.0001$) in both groups of rats (Fig. 2A). However, an improvement of muscle atrophy and CSA reduction was observed between I8 and R10 only in curcumin-treated rats ($P<.05$) (Fig. 2A and B).

3.3. Regulation of the Ub–proteasome-dependent pathway

This pathway (also called UPS) involves two distinct steps, that are the ubiquitination of proteins and their subsequent degradation by the 26S proteasome. We have investigated both steps, by (1) measuring the accumulation of Ub conjugates, which are the final products of the ubiquitination step, and (2) the chymotrypsin-like activity of the proteasome.

Fig. 3A and B shows that Ub conjugates accumulated to the same extent at I8 in immobilized gastrocnemius muscles from vehicle- (+43%, $P<.05$) and curcumin-treated (+24%, $P<.05$) rats. The amount of poly-Ub conjugates was normalized at R10 in both groups. The

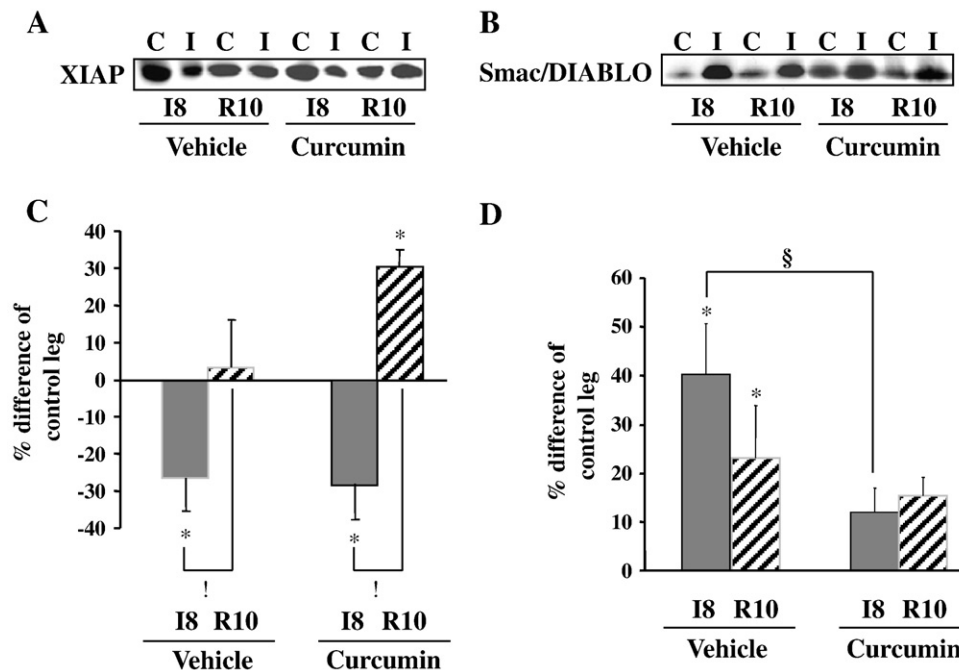


Fig. 4. Curcumin treatment increased XIAP protein content during recovery. Levels for the antiapoptotic protein XIAP (A) and for the proapoptotic protein Smac/DIABLO (B) were assessed on control (C) or immobilized (I) gastrocnemius muscles by Western blotting as described in experimental procedures. Signals recorded for XIAP (C) and Smac/DIABLO (D) were quantified by using the Image J software and normalized against the amount of proteins (determined following Ponceau Red staining) to correct for uneven loading. All data are expressed as percent difference of control leg and are means±S.E.M. (vertical bars) for $n=5$ rats per group. Differences between control and immobilized muscles were assessed by the Student's *t* test ($*P<.05$); Changes in the percent difference observed in immobilized muscles compared with control muscles were assessed by two-way ANOVA (curcumin effect and recovery effect). When significant differences were detected by ANOVA, a post hoc Fisher's test was performed to compare the variations between groups. $^{\dagger}P<.05$, I8 versus R10 in vehicle or curcumin group; $^{\S}P<.05$, vehicle versus curcumin group at I8.

chymotrypsin-like activity of the 20S proteasome increased in muscles from the immobilized leg compared with the control leg in the vehicle-treated group at both I8 and R10 (+43% and +50%, respectively; $P<.05$) (Fig. 3C). This increased activity did not prevail in curcumin-treated rats during immobilization or the subsequent recovery ($P<.05$, two-way ANOVA). Thus, at the end of immobilization period (I8), muscles from curcumin-treated rats likely exhibit higher ubiquitination rates, because Ub conjugates accumulate without change in proteasome chymotrypsin-like activity. Similarly, ubiquitination rates are also likely enhanced at R10 in muscles from untreated rats, because normalization of Ub conjugates occurs during recovery, whereas proteasome chymotrypsin-like activities are still elevated. It is noteworthy that muscle recovery was initiated only in muscles from curcumin-treated rats at R10, when both chymotrypsin-like and accumulation of Ub conjugates were normalized. This further indicates that normalization of both steps of the Ub-proteasome-dependent pathway is crucial for muscle mass gain.

3.4. Regulation of the apoptotic mitochondrial pathway

We have previously reported a role for the apoptotic mitochondrial pathway during immobilization-induced atrophy and muscle recovery [8]. The antiapoptotic XIAP protein level (Fig. 4A and C) was reduced in immobilized gastrocnemius muscles compared with

control muscles from vehicle- (−27%, $P<.05$) and curcumin-treated group (−28%, $P<.05$). These changes were improved during recovery ($P<.05$, two-way ANOVA): between I8 and R10, the protein levels for XIAP were normalized in vehicle-treated rats, but increased above basal levels in immobilized muscles from curcumin-treated animals (+30%, $P<.01$) (Fig. 4C). The proapoptotic Smac/DIABLO protein level (Fig. 4B and D) increased in immobilized muscles compared with control muscles at I8 (+40%, $P<.05$) and R10 (+23%, $P<.05$) in the vehicle-injected group but were not different in the curcumin-treated rats. Curcumin treatment prevented the increased Smac/DIABLO protein levels in immobilized muscles at I8 ($P<.05$).

The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway was next assessed by measuring the caspase-3 and the apoptosome-linked caspase-9 activities. The apoptosome-linked caspase-9 activity increased in muscles from the immobilized leg compared with control leg in vehicle-treated group at R10 (+26%, $P<.05$), but only tended to increase at I8 (+43%, $P=.07$) (Fig. 5A). Conversely, this activity was unchanged in immobilized muscles from curcumin-treated rats compared with control muscles at I8 or at R10. Fig. 5B shows that caspase-3 activity increased at I8 in immobilized gastrocnemius muscles from vehicle- (+51%, $P<.0001$) and curcumin-treated (+66%, $P<.0001$) rats. This activity was normalized at R10 in both groups.

4. Discussion

This work suggests that curcumin had beneficial effects during skeletal muscle recovery following immobilization. After cast removal, curcumin treatment resulted in an increased expression of the antiapoptotic XIAP protein and improved muscle recovery, through increased CSA and muscle mass.

As previously reported [8], all processes measured in the UPS and the mitochondria-associated apoptotic pathway were concomitantly activated during immobilization. Curcumin administration prevented the elevation of proteasome activity in immobilized skeletal muscles but failed to suppress the accumulation of poly-Ub conjugates, suggesting that ubiquitination rates were enhanced. This effect is in agreement with previous studies showing that curcumin inhibited 20S proteasome activities in muscles from septic rats or MAC16 tumor-bearing mice [39,40] but did not alter the amount of poly-Ub conjugates in muscles from septic or LPS-treated animals [21,39]. We further demonstrate here that curcumin prevented the increased expression of the proapoptotic protein Smac/DIABLO without any effect on the depressed expression of the antiapoptotic protein XIAP. This selective effect of this anti-inflammatory compound on Smac/DIABLO protein levels increased the ratio of XIAP to Smac/DIABLO in immobilized muscles. Previous work showed that mycycycline, which also exhibit anti-inflammatory properties, increased this ratio and decreased caspase 9 activation in the intact heart exposed to ischemia/reperfusion [41]. Altogether, this suggests that inflammation could trigger the entry into apoptosis through modulating this ratio. Our data also indicate that curcumin did not prevent all processes of the mitochondrial apoptotic pathway during immobilization-induced muscle atrophy: curcumin prevented the trend toward enhanced apoptosome-linked caspase-9 activity in immobilization-induced muscle atrophy, but not the increased caspase-3 activity. Therefore, our work also suggests that the extrinsic pathway of apoptosis, which also leads to caspase-3 activation, is presumably enhanced during immobilization-induced muscle atrophy.

Previous reports indicate that the CSA decreased during immobilization [42,43], hindlimb unloading [44–46] or bed-rest [47]. The present study shows that muscle atrophy and reduced CSA observed after 8 days of immobilization were not prevented by a daily administration of curcumin. However, the efficacy of curcumin on

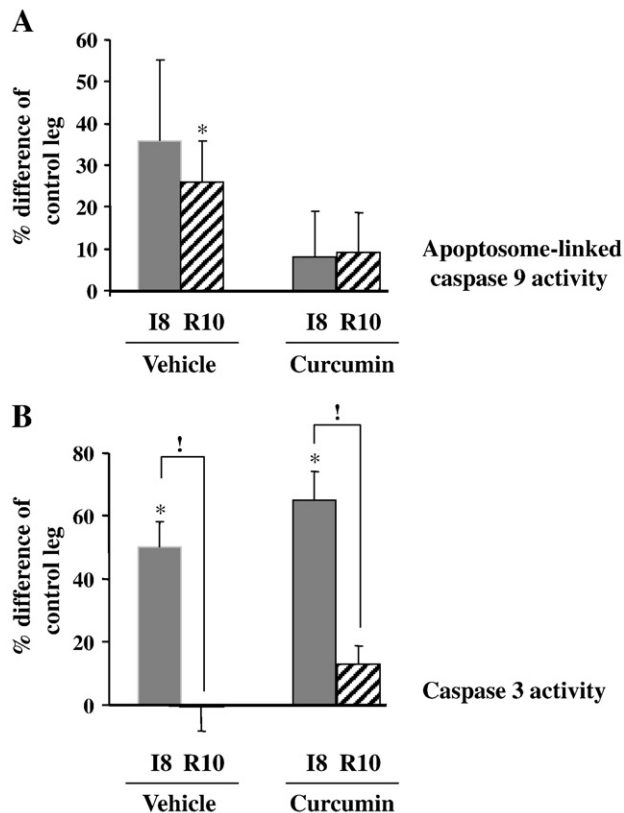


Fig. 5. Curcumin blocked increased apoptosome activity but not increased caspase-3 activity during immobilization and recovery. The caspase-9 associated apoptosome (A) and the caspase-3 (B) activities were measured using fluorogenic substrates on gastrocnemius protein extracts as described in experimental procedures. All data are expressed as percent difference of control leg and are means $\pm$ S.E.M. (vertical bars) for $n=8$ rats per group. Differences between control and immobilized muscles were assessed by the Student's t test (* $P<.05$); Changes in the percent difference observed in immobilized muscles compared with control muscles were assessed by two-way ANOVA (curcumin effect and recovery effect). When significant differences were detected by ANOVA, a post hoc Fisher's test was performed to compare the variations between groups. ! $P<.05$, I8 versus R10 in vehicle or curcumin group.

skeletal muscle atrophy may depend on the route of administration, its bioavailability and/or the catabolic model used [21,39,40]. For example, an ip administration of curcumin (as in the present study) prevented the muscle wasting of LPS-treated mice [21] or septic rats [39]. Similarly, the administration of high doses of the curcumin c3 complex (100 mg/kg body weight) did prevent muscle wasting in MAC16 tumor-bearing mice [40]. This effect on muscle mass was associated with a protective effect of curcumin on fiber CSA in muscles from these cachectic cancer mice [40]. By contrast and in accordance with our data, the administration of curcumin *per os* did not prevent skeletal muscle dysfunction and atrophy in unloaded mice [45], another model of immobilization. In addition to the effect of curcumin on the chymotrypsin-like activity of the proteasome during immobilization, we show here that this compound prevented increased apoptosis-linked caspase-9 and chymotrypsin-like proteasome activities during recovery. This resulted in a beneficial effect on muscle mass and CSA during reloading after cast removal. Altogether, our data suggest for the first time that curcumin treatment is potentially useful for improving subsequent recovery in a model of immobilization. These effects of curcumin, which exhibits anti-inflammatory properties, suggest also that inflammatory processes play key roles in alterations of proteolytic and apoptotic processes during immobilization-induced atrophy and the subsequent recovery.

The p38 MAP kinase and nuclear factor κ B pathways are enhanced in immobilized muscles [16,17]. In our work, we showed that curcumin did not prevent muscle atrophy, suggesting that it does not regulate these two pathways in our model. However, we showed that curcumin improved muscle recovery, although the p38 MAP kinase has been reported to be normalized very early during recovery (i.e., 3 day after cast removal) [48]. Altogether, these observations suggest that this compound may act through other pathways to improve muscle mass gain during recovery. Indeed, pathways involving the ERK kinase, the xanthine oxidase or the β -catenin are activated during disuse muscle atrophy [29–31] and are regulated by curcumin [25–27,49]. Moreover, some of them are involved during muscle regeneration such as ERK [50] and β -catenin [51]. Altogether, curcumin may modulate one or several of these pathways during immobilization and recovery and thereby exert its beneficial effect on muscle mass gain.

Curcumin administration at low doses in this study concomitantly inhibited both proteasome chymotrypsin-like and apoptosis-linked caspase-9 activities after cast removal and most importantly improved muscle recovery. Our data further show that curcumin treatment increased muscle XIAP protein levels during reloading above basal levels. This antiapoptotic protein has been recently reported to restrict the apoptotic pathway in skeletal muscle under differentiation [52]. In addition, curcumin stimulated muscle regeneration *in vivo* and restored the normal tissue architecture after local muscle injury *in vivo* [24]. Finally, *in vitro* studies indicate that curcumin can act directly on myoblasts to stimulate cell proliferation as well as fusion and differentiation [24]. Altogether, these observations suggest that curcumin may improve muscle recovery and differentiation/regeneration processes following immobilization by regulating the antiapoptotic XIAP protein of the mitochondrial apoptotic pathway.

In conclusion, our work shows that curcumin treatment during immobilization prevented increased proteasome chymotrypsin-like activity and proapoptotic smac/DIABLO protein levels. During reloading, curcumin treatment blocked the elevated proteasome chymotrypsin-like and apoptosis-linked caspase-9 activities, increased XIAP protein levels and improved the recovery of muscle mass and CSA. This suggests that curcumin may modulate the entry into apoptosis during immobilization and stimulate initial steps of muscle regeneration, which are highly important for muscle function (total strength/fatigability).

Acknowledgments

We thank Arlette Cissoire, Benoit Cohade, Christian Lafarge and Alexandre Teynie from the UEN (INRA Clermont-Ferrand-Theix, France) for excellently assisting with animal care. We also thank Marie-Edith Arnal and Marie-Line Coutin for histological studies.

References

- Attaix D, Ventadour S, Codran A, Bechet D, Taillandier D, Combaret L. The ubiquitin–proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem* 2005; 41:173–86.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704–8.
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14440–5.
- Ikemoto M, Nikawa T, Kano M, Hirasaka K, Kitano T, Watanabe C, et al. Cysteine supplementation prevents unweighting-induced ubiquitination in association with redox regulation in rat skeletal muscle. *Biol Chem* 2002;383:715–21.
- Krawiec BJ, Frost RA, Vary TC, Jefferson LS, Lang CH. Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:E969–980.
- Taillandier D, Aourousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P, et al. Coordinate activation of lysosomal, Ca^{2+} -activated and ATP–ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J* 1996;316:65–72.
- Tawa Jr NE, Odessey R, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest* 1997;100:197–203.
- Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Bechet D, et al. The ubiquitin–proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E1181–1190.
- Borisov AB, Carlson BM. Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. *Anat Rec* 2000;258:305–18.
- Siu PM, Pistilli EE, Alway SE. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R1015–1026.
- Siu PM, Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. *J Physiol* 2005;565:309–23.
- Siu PM, Wang Y, Alway SE. Apoptotic signaling induced by H_2O_2 -mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life Sci* 2009;84:468–81.
- Kujawa M, Baran W, Jankowska-Steifer E. Morphometric ultrastructural analysis of satellite cells in denervated rat soleus muscle. *Exp Mol Pathol* 2004;76:166–72.
- Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V, et al. Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol* 1997;273:C579–587.
- Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209–38.
- Powers SK, Kavazis AN, McClung JM. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol* 2007;102:2389–97.
- Bar-Shai M, Carmeli E, Ljubuncic P, Rezmack AZ. Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF- κ B activation. *Free Radic Biol Med* 2008;4:202–14.
- Juo P, Kuo CJ, Reynolds SE, Konz RF, Raingeaud J, Davis RJ, et al. Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol Cell Biol* 1997;17:24–35.
- Alamdari N, O'Neal P, Hasselgren PO. Curcumin and muscle wasting: a new role for an old drug? *Nutrition* 2009;25:125–9.
- Wyke SM, Russell ST, Tisdale MJ. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF- κ B activation. *Br J Cancer* 2004;91:1742–50.
- Jin B, Li YP. Curcumin prevents lipopolysaccharide-induced atrogin-1/MAFbx upregulation and muscle mass loss. *J Cell Biochem* 2007;100:960–9.
- Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Nukina N. Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 2004; 279:11680–5.
- Carter RS, Pennington KN, Ungurait BJ, Arrate P, Ballard DW. Signal-induced ubiquitination of I κ B kinase- β . *J Biol Chem* 2003;278:48903–6.
- Thaloor D, Miller KJ, Gephart J, Mitchell PO, Pavlath GK. Systemic administration of the NF- κ B inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury. *Am J Physiol* 1999;277:C320–329.
- Zhou H, Li X, Gao M. Curcumin protects PC12 cells from corticosterone-induced cytotoxicity: possible involvement of the ERK1/2 pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009;104:236–40.
- Souchard JP, Limasset B, Michel F, Crastes de Paulet A, Labidalle S, Nepveu F. Substituted methoxyphenol with antioxidant activity: correlation between physicochemical and biological results. *C R Seances Soc Biol Fil* 1995;189(6): 1171–81.
- Aggarwal BB. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. *Annu Rev Nutr* 2010;30:173–99.

- [28] Choi I, Lee K, Kim M, Lee M, Park K. Differential activation of stress-responsive signalling proteins associated with altered loading in a rat skeletal muscle. *J Cell Biochem* 2005;96:1231–43.
- [29] Kondo H, Nakagaki I, Sasaki S, Hori S, Itokawa Y. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol* 1993;265: E839–844.
- [30] Cifuentes-Diaz C, Goudou D, Mège RM, Velasco E, Nicolet M, Herrenknecht K, et al. Distinct location and prevalence of alpha-, beta-catenins and gamma-catenin/plakoglobin in developing and denervated skeletal muscle. *Cell Adhes Commun* 1998;5:161–76.
- [31] Cai DQ, Lee KKH, Li M, Tang MK, Chan KM. Ubiquitin expression is up-regulated in human and rat skeletal muscles during aging. *Arch Biochem Biophys* 2004;425: 42–50.
- [32] Li YP, Chen YL, John J, Moylan J, Jin BW, Mann DL, et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/Mafbx in skeletal muscle. *Faseb J* 2005;19:362–70.
- [33] Zheng B, Ohkawa S, Li H, Roberts-Wilson TK, Price SR. FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogin-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *FASEB J* 2010;24: 2660–9.
- [34] Vignaud A, Cebrian J, Martelly I, Caruelle JP, Ferry A. Effect of anti-inflammatory and antioxidant drugs on the long-term repair of severely injured mouse skeletal muscle. *Exp Physiol* 2005;90:487–95.
- [35] Flint FO, Pickering K. Demonstration of collagen in meat products by an improved picro-Sirius red polarisation method. *Analyst* 1984;109:1505–6.
- [36] Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 1999;274:22686–92.
- [37] Fang CH, Li BG, Fischer DR, Wang JJ, Runnels HA, Monaco JJ, et al. Burn injury upregulates the activity and gene expression of the 20 S proteasome in rat skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)* 2000;99:181–7.
- [38] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [39] Poylin V, Fareed MU, O'Neal P, Alamdari N, Reilly N, Menconi M, et al. The NF-kappaB inhibitor curcumin blocks sepsis-induced muscle proteolysis. *Mediators Inflamm* 2008;2008:317851 (13 pp).
- [40] Siddiqui RA, Hassan S, Harvey KA, Rasool T, Das T, Mukerji P, et al. Attenuation of proteolysis and muscle wasting by curcumin c3 complex in MAC16 colon tumour-bearing mice. *Br J Nutr* 2009;102:967–75.
- [41] Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Gitti G, Townsend P, Lawrence K, et al. Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:865–74.
- [42] Nicks DK, Beneke WM, Key RM, Timson BF. Muscle fibre size and number following immobilisation atrophy. *J Anat* 1989;163:1–5.
- [43] Tomanek RJ, Lund DD. Degeneration of different types of skeletal muscle fibres. II. Immobilization. *J Anat* 1974;118:531–41.
- [44] Desplanches D, Kayar SR, Sempore B, Flandrois R, Hoppeler H. Rat soleus muscle ultrastructure after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 1990;69:504–8.
- [45] Farid M, Reid MB, Li YP, Gerken E, Durham WJ. Effects of dietary curcumin or N-acetylcysteine on NF-kappaB activity and contractile performance in ambulatory and unloaded murine soleus. *Nutr Metab (Lond)* 2005;2:20.
- [46] Thomason DB, Booth FW. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 1990;68:1–12.
- [47] Berg HE, Larsson L, Tesch PA. Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest. *J Appl Physiol* 1997;82:182–8.
- [48] Childs TE, Spangenburg EE, Vyas DR, Booth FW. Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C391–398.
- [49] Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1056:206–17.
- [50] Liang KW, Ting CT, Yin SC, Chen YT, Lin SJ, Liao JK, et al. Berberine suppresses MEK/ERK-dependent Egr-1 signaling pathway and inhibits vascular smooth muscle cell regrowth after in vitro mechanical injury. *Biochem Pharmacol* 2006; 71:806–17.
- [51] Kim KI, Cho HJ, Hahn JY, Kim TY, Park KW, Koo BK, et al. Beta-catenin overexpression augments angiogenesis and skeletal muscle regeneration through dual mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell proliferation and progenitor cell mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:91–8.
- [52] Smith MI, Huang YY, Deshmukh M. Skeletal muscle differentiation evokes endogenous XIAP to restrict the apoptotic pathway. *PLoS One* 2009;4:e5097.