

UNIVERSITE DE LILLE – DROIT ET SANTE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

DISCIPLINE : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

SPECIALITE : Physiologie

ROLE DU RECEPTEUR NUCLEAIRE REV-ERB- α DANS LA FONCTION
DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE DU MUSCLE SQUELETTIQUE :
IMPLICATIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES

Thèse soutenue le 5 avril 2019 par

ALEXIS BOULINGUIEZ

Devant le jury composé de :

Madame le Docteur Hélène DUEZ	Présidente du jury
Monsieur le Professeur Bruno ALLARD	Rapporteur
Monsieur le Professeur Frédéric RELAIX	Rapporteur
Madame le Docteur Jennifer RIEUSSET	Examinatrice
Monsieur le Docteur Steve LANCEL	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse de me faire l'honneur d'accepter de juger mes travaux. Mesdames Jennifer Rieusset et Hélène Duez, Messieurs Bruno Allard, Frédéric Relaix et Steve Lancel, je vous suis sincèrement reconnaissant de vous investir dans cet exercice.

Deuxièmement, j'exprime mes remerciements appuyés et toute ma gratitude à la Région Hauts de France ainsi qu'à l'Université de Lille qui ont financé mon allocation de recherche durant 3 années. Je suis également très reconnaissant à l'EGID de m'avoir accordé 6 mois de financement supplémentaire nécessaire à la finalisation de mes recherches.

Ce travail n'existerait pas sans la présence et le concours d'hommes et de femmes que j'aimerais saluer et remercier chaleureusement.

Steve, je vous remercie d'avoir fait de moi un chercheur. Vous m'avez tout appris, vous êtes ma référence scientifique en tout point. Comment vous exprimer ma reconnaissance ? Merci de n'avoir jamais cessé de croire en moi. Vous avez été présent et disponible en toutes circonstances. Je salue votre persévérance, votre compréhension et votre volonté de toujours bien faire. Vous êtes un modèle d'organisation, de rigueur, d'honnêteté et d'éthique scientifique. Vous avez un grand cœur et vous avez réussi à vous adapter à mon mode de fonctionnement. J'admire votre capacité à rebondir, à trouver des solutions à tout. Je vous sais gré d'avoir toujours maintenu votre niveau d'exigence élevé. Grâce à vous, j'ai vécu une expérience professionnelle doublée d'une expérience de vie fantastique.

Hélène, tu es l'exemple de la chercheuse épanouie dans son métier. Je me souviendrai de ton regard qui pétillait en parlant de science, de cette joie et de cette envie que tu nous as tous communiquée. Tu m'as apporté un angle de vue différent du mien, aussi bien sur l'aspect scientifique que sur le monde de la recherche. Chacune de nos discussions, où ont brillé ta lucidité et ton intelligence, m'a fait grandir.

Pr. Staels, vous avez su me faire profiter de toute votre expérience scientifique et de votre connaissance de l'environnement de la recherche. Je vous remercie de vous être intéressé à mes projets avec recul et bienveillance et de les avoir fait progresser par des remarques et des conseils forts judicieux. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir accordé les moyens financiers et techniques pour réaliser ce doctorat dans d'excellentes conditions.

Jennifer et Olivier, je vous remercie de votre implication et de votre intérêt dans le cadre de mes CSI. Vous m'avez apporté un éclairage qui a nourri ma réflexion.

Alicia, tu es mon modèle de dynamisme professionnel. Toujours active dans une vie qui file à 200 à l'heure et des idées pour tout, tu nous emportes dans ton tourbillon de positivité, de découverte de débrouillardise et d'audace. Avec toi, tout est facile. Quel exemple ! Impossible

n'est pas Alicia. Tu m'as insufflé une autre manière de considérer les événements. Je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté.

Christian, avant tout je retiendrai ta gentillesse. Tu as été mon maître technique, une référence indépassable, la norme maximale. Vous m'avez tant appris. Nos silhouettes similaires en auront trompé plus d'un ! Je suis toi de loin mais je suis loin d'être toi. Tu es un exemple de modestie et de recul. Quel plaisir de discuter avec toi. La profondeur de ta pensée corrèle avec ton immense modestie. Merci pour ces nombreux et inoubliables moments de partage !

Quentin, mon cher ami, je te suis reconnaissant de ton écoute et de ta compréhension en toutes circonstances. Depuis le début, tu as accompagné chaque jour et chaque instant de mon doctorat de ta présence bienveillante. Tu es indissociable de cette expérience. Je retiendrai également toutes les idioties que nous avons pu imaginer. Tu as été ma source quotidienne de vie, d'envie et de rire. Je suis très ému de te quitter mais ce n'est qu'un au revoir mon ami.

Stéphane, ta gentillesse n'a d'égal que ta discrétion. Durant tout ce temps, tu étais là dans l'ombre, déplaçant des montagnes de travail sans donner l'impression de la difficulté. Bravo pour ton courage et ta modestie.

Yasmine, merci de m'avoir accompagné durant ces trois années. Je te suis très reconnaissant et encore ému de ta bienveillance, de ton intérêt et de tes attentions à mon égard. Tu fais le bien autour de toi.

Justine, je te remercie pour ton sourire et ta fraîcheur. Une douceur incomparable, une joie de vivre associée à une efficacité redoutable en manip. Bravo à toi.

Marion, avec ton accent chantant, tu m'as mis de la joie de cœur.

Lise, je retiendrai ta discrétion, ton organisation remarquable et surtout une gentillesse indescriptible. J'ai grandement apprécié ton caractère et nos interactions. Tu es formidable !

Benoit, vous incarnez le sérieux, je dirai même et prenez le bien, la rigueur scientifique dans toute son excellence. Vous avez le mot juste, calme, précis et le propos systématiquement pertinent. J'admire également votre pouvoir de convivialité hautement apprécié et votre talent désopilant toujours bienvenu pour détendre l'atmosphère. Ne changez rien !

Marie, je n'oublie pas que nous avons partagé un bon bout de chemin ensemble dans cette aventure. Tu es indissociable de ce travail. Je suis fier de la relation que nous avons créée. Merci de ta présence et de ton soutien déterminant.

Sandrine, vous avez un don d'écoute et de compréhension incroyable. Merci d'avoir partagé votre générosité et votre humanité avec moi. J'admire votre caractère volontaire et positif ainsi que la profondeur de votre conversation. J'aime interagir avec vous. Vous m'êtes très précieuse.

Kateryna, j'ai vécu des moments formidables en ta compagnie. Passer du temps avec toi, c'est ouvrir une parenthèse de bonheur et de sagesse dont l'effet perdure bien longtemps. Nos discussions m'ont durablement bonifié. Tu m'as bien plus apporté que des figures de papier.

Anaïs, chère amie, quelle immense joie de te connaître. Je suis profondément ému de vivre des moments ineffables en ta compagnie. Je me remémore avec plaisir nos petits rituels savoureux en master. Tu es une merveille.

Marine, tu incarnes la gentillesse absolue. Quel bonheur inexprimable de partager nos expériences de vie. Je me souviendrai de ton sourire rayonnant. Merci de nous l'offrir chaque jour.

Audrey, votre compagnie est exquise. J'apprécie votre discrétion, votre calme apaisant et la relation que nous avons nouée. Bravo pour la très belle personne que vous êtes.

J'exprime également une petite pensée pleine de tendresse pour mes amies Lilia et Radia.

Bruno, grâce à vous, je n'étais pas le seul fou de la pédale dans le labo ! J'ai adoré partager les petites anecdotes de notre passion commune avec vous. Longue vie au vélo !

Laurent (Sire de l'Homme), durant 3 ans, je me suis permis de me nourrir de votre talent technique et scientifique puisque celui-ci est illimité. J'ai pu apprécier le très haut niveau qualitatif de l'humour belge. Toujours bon pied bon œil, vous incarnez un modèle d'investissement intensif dans la pratique scientifique tout en conservant un équilibre personnel. Sachez que je vous admire. Votre maîtrise dans le refroidissement des centrifugeuses est louée par-delà les océans.

Pelin, you are the sunshine of our lab. Oh my god! Your smile is unbelievable and gives us a lot of pleasure. Keep enjoy life (and science) forever!

Mathilde, j'ai marché dans vos pas. Merci de m'avoir guidé. Je retiendrai votre bonne humeur et votre autodérision ainsi que votre force de caractère incomparable.

Olivier, ton anticonformisme intelligent m'a souvent fait du bien. Laurent Pineau, vous incarnez la force tranquille. Merci pour l'excellente atmosphère au plateau de cytométrie.

Sarah, vous me survivrez à cette formidable aventure. Je loue votre abnégation, votre sourire et votre joie de vivre indestructibles. Vous êtes forte. Je suis heureux d'avoir partagé cette expérience avec vous.

Artemii, please continue to take a lot of pleasure with science experiments. What a wonderful life it will be for you!

Emilie, je serai ravi d'accueillir le petit Jojo dans quelques années pour un stage de découverte en laboratoire de recherche. Je vous remercie de votre confiance.

Joël, votre attitude relax rend votre environnement proche très apaisant. Soyez-en remercié.

Barbara, vous fûtes excellentissime durant toutes ces années. Et plutôt quatre fois qu'une. Je vous en sais fort gré.

Cecilia, je vous connais peu mais assurément je me reconnais en votre personnalité. Je vous souhaite bon plaisir pour cette aventure unique !

J'ai une pensée particulière pour nos amis de JK, Simon et Margaux pour nos discussions abracadabrantiques, Céline pour son aide pour l'analyse des microarray, Francesco, Thomas, Manjula, Vanessa, Jérôme, Xavier, Dani, Sophie, Anne et tous les autres !

Jérôme Kluza, merci de m'avoir considéré comme ton égal. Je me suis toujours senti à l'aise lors de mes venues dans ton laboratoire. Tes apprentissages restent associés à d'excellents moments.

Je remercie Bruno Bastide et Valérie Montel pour leur apport technique substantiel et France Piétri-Rouxel pour les souris myopathes.

Medhi, que de chemin parcouru depuis nos vertes années de master 2 et nos déjeuners partagés au restaurant universitaire. Nous avons évolué similairement dans nos expériences respectives. Au bon plaisir.

Sébastien, continuez à bien mousser, c'est très important.

Oscar, continuez à être sage et prude, à prier à genoux tous les soirs notre seigneur, avec un comportement moral très éthique. Protégez-vous du vulgaire et de l'indécent, vous qui êtes si pur, si innocent, si digne et si noble. Je vous promets de venir à votre ordination.

J'associe à ces remerciements Rosamée, Marie-Hélène, Julien et François pour leur rôle de facilitateurs indispensables à la vie quotidienne au labo ainsi que Denis, Key, Manue, Corinne, Jonathan, David, Nathalie, Jacques, Eric et Fanny pour leur présence joyeuse. Je me souviens également d'Evelyne et de Pascal, modèles de gentillesse.

Flore, je me remémore votre joie de vivre irrésistible.

Un grand merci à Anthony et toute l'équipe de l'animalerie.

Je remercie Valeria, Guillaume, Anaïs, Marie de Laure d'avoir partagé un peu plus qu'un bureau avec moi. J'émet également une pensée pour mon compère François Firmin.

Un très grand merci à toute l'Unité 1011 pour ces belles années !

Je tiens à remercier ma famille. Grâce à vous, je bénéficie depuis toujours d'un contexte émotionnel stable. Papa et Maman, vous avez été d'une importance capitale dans la production de ce travail. J'ai une pensée émue pour mes grands-parents, ici et maintenant, partout et éternellement. Je remercie bien sûr Emmanuel et Adrien, mes éternels compères de randonnées cyclistes et de courses à pied, grâce à qui j'ai pu me défouler et prendre de bons bols d'airs dans notre chère campagne flamande.

J'ai une grosse pensée pour mes amis de toujours Geoffrey, Thibaut, Xavier, Enguerran, Laurent, Farah, Florent, Guillaume que cette expérience a malheureusement un peu éloigné de moi. Nous nous retrouverons.

Enfin, une petite pensée pour mes partenaires officiels, Lalmas et le paki qui devront malheureusement, faute de chiffre d'affaires, mettre la clef sous la porte après mon départ de l'Institut Pasteur.

RESUME

Au sein du muscle squelettique, le réticulum sarcoplasmique occupe une place essentielle dans la régulation de l'homéostasie calcique et de la contraction musculaire. En particulier, le transporteur calcique SERCA, situé à la membrane du réticulum endoplasmique permet de reconstituer le contenu calcique réticulaire suite à une contraction musculaire. Dans le muscle squelettique, l'activité de SERCA est contrôlée par un peptide inhibiteur spécifique appelé la myoréguline. Nous nous intéressons au rôle du récepteur nucléaire Rev-erb- α , un répresseur de transcription connu pour favoriser la fonction musculaire et dont l'activité peut être modulée par des ligands pharmacologiques. Nos résultats montrent que Rev-erb- α réprime l'expression de la myoréguline en se fixant sur son promoteur, ce qui a pour conséquence l'augmentation de l'activité de SERCA et la hausse du contenu calcique réticulaire. Un traitement avec un agoniste de Rev-erb- α , le SR9009, améliore l'homéostasie calcique et la contractilité musculaire de souris *mdx/utr*^{+/-}, un modèle de la myopathie de Duchenne. Par ailleurs, le réticulum endoplasmique est le siège de la conformation des protéines de la voie sécrétoire. Des altérations de la conformation protéique provoquent un stress réticulaire et le déclenchement de la réponse aux protéines mal-conformées qui peut conduire jusqu'à l'apoptose. Il est décrit que le stress réticulaire est un phénomène impliqué dans l'activation de la cellule satellite musculaire suite à une blessure. Nous avons établi que Rev-erb- α , en augmentant l'interaction entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie accroît l'activation de la réponse aux protéines mal-conformées et l'apoptose de cellules satellites activées, ce qui pourrait impacter le potentiel de régénération musculaire. En conclusion, nous avons identifié Rev-erb- α comme un modulateur de la fonction du réticulum endoplasmique dans le muscle squelettique. Dans le futur, des thérapies ciblant spécifiquement Rev-erb- α pourraient être développées dans le cadre de pathologies musculaires chez l'Homme.

ABSTRACT

Within skeletal muscle, the sarcoplasmic reticulum plays an essential role in the regulation of calcium homeostasis and muscle contraction. In particular, the SERCA transporter, located at the membrane of the endoplasmic reticulum, by pumping calcium from cytosol from reticular lumen, allows the reticular calcium content to be reconstituted following muscle contraction. In skeletal muscle, SERCA activity is controlled by a specific inhibitory peptide called myoregulin. We are interested in the role of the nuclear receptor Rev-erb- α , a transcription repressor known to promote muscle function and whose activity can be modulated by pharmacological ligands. Our results show that Rev-erb- α represses the expression of myoregulin by binding to its promoter, which results in an increase in SERCA activity and an increase in reticular calcium content. Treatment with a Rev-erb- α agonist, SR9009, improves calcium homeostasis and muscle contractility in *mdx/utr*^{+/-} mice, a model of Duchenne myopathy. In addition, the endoplasmic reticulum is the site of protein conformation of the secretory pathway. Alteration in protein conformation causes reticular stress and triggers the unfolded protein response that can lead to apoptosis. It is described that reticular stress is a phenomenon involved in the activation of skeletal muscle satellite cell following an injury. We have established that Rev-erb- α , by increasing the interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria enhances the activation of unfolded protein response and apoptosis of activated satellite cells, which could impact the muscle regeneration capacity. In conclusion, we have identified Rev-erb- α as a modulator of endoplasmic reticulum function in skeletal muscle. In the future, specific Rev-erb- α targeting therapies may be developed for human muscle diseases.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	12
LISTE DES FIGURES.....	18
INTRODUCTION.....	21
1. PHYSIOLOGIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE.....	22
1.1. Structure du muscle squelettique.....	23
1.1.1. Structure de la fibre musculaire	23
1.1.2. Structure de la myofibrille.....	24
1.1.3. Les protéines motrices et régulatrices de la myofibrille	25
1.1.3.1. La myosine	25
1.1.3.2. L'actine.....	26
1.1.3.3. La tropomyosine.....	27
1.1.3.4. La troponine C.....	27
1.1.3.5. La troponine I.....	27
1.1.3.6. La troponine T	28
1.1.4. Les autres protéines myofibrillaires et sarcolémiques à rôle fonctionnel	28
1.1.4.1. Les protéines de la strie Z	28
1.1.4.2. Les filaments intermédiaires	30
1.1.4.3. La nébuline	30
1.1.4.4. Les protéines associées à la myosine	30
1.1.4.5. Les protéines de la ligne M	30
1.1.4.6. La dystrophine.....	31
1.1.5. La titine	32
1.1.5.1. Structure de la titine	32
1.1.5.2. Régulation de la force musculaire par la titine.....	33
1.2. La contraction et la relaxation musculaire	33
1.2.1. La jonction neuromusculaire	34
1.2.2. Genèse et propagation du potentiel d'action musculaire	35
1.2.3. Libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique	35
1.2.4. Levée d'inhibition par le complexe des troponines.....	39
1.2.5. La contraction musculaire	39
1.2.6. Le relâchement musculaire.....	41
1.2.7. Le retour à l'état initial	44
1.3. Types de fibres et métabolismes musculaires	47
1.3.1. Fibres lentes et fibres rapides	47
1.3.2. Le métabolisme musculaire.....	47
1.3.2.1. Sensibilité à l'insuline du muscle squelettique	47
1.3.2.2. Sources d'énergie	48
1.4. Maintien de l'homéostasie tissulaire.....	48
1.4.1. La cellule satellite.....	48

1.4.2. Activation des cellules satellites et régénération musculaire	49
2. FONCTIONS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE.....	50
2.1. Structure du réticulum endoplasmique.....	50
2.2. Dynamique du réticulum endoplasmique	50
2.3. Synthèse de céramides <i>de novo</i>	51
2.4. Translocation cotraductionnelle	52
2.5. Conformation des protéines	52
2.6. Chaperones et tampon calcique	53
2.7. Membranes associées aux mitochondries.....	54
2.7.1. IP3R1.....	55
2.7.2. VDAC1.....	56
2.8. Stress réticulaire et réponse aux protéines mal-conformées	57
2.8.1. La signalisation UPR.....	57
2.8.2. Rôle de l'UPR dans l'activation de la cellule satellite	58
2.8.3. Rôle de l'UPR dans la différenciation musculaire	60
2.8.4. Rôle de l'UPR dans l'adaptation du muscle squelettique à l'exercice.....	60
2.8.5. UPR et hormèse réticulaire	61
2.8.6. UPR et interactions MAMs	61
2.8.7. UPR, altérations mitochondriales et induction de l'apoptose	61
2.8.8. Effets délétères de l'UPR sur la contractilité musculaire.....	62
3. CONTEXTES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE DEREGULATIONS DU	
RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE	63
3.1. Obésité et diabète de type 2	63
3.1.1. Accumulation ectopique de lipides, lipotoxicité et insulino-résistance du muscle	
squelettique.....	63
3.1.2. Altérations de la voie de synthèse <i>de novo</i> des céramides.....	63
3.1.3. Stress réticulaire, signalisation de l'UPR et altération de la signalisation à	
l'insuline.....	64
3.1.4. Perte de masse musculaire induite par le stress réticulaire et résistance à	
l'insuline.....	67
3.1.5. MAM et insulino-résistance du muscle.....	67
3.1.6. Anomalies calciques.....	69
3.1.7. Anomalies contractiles	70
3.2. La myopathie de Duchenne	71
3.2.1. Définition générale	71
3.2.2. Les modèles animaux de la myopathie de Duchenne.....	72
3.2.3. Atteintes musculaires générales	72
3.2.4. Altérations de l'homéostasie calcique.....	73
3.2.4.1. Canaux de la membrane plasmique.....	73
3.2.4.2. RyR.....	74
3.2.4.3. IP3R.....	75
3.2.4.4. SERCA	75

3.2.4.5.	Sarcolipine.....	76
3.2.4.6.	Contenu calcique réticulaire.....	77
3.2.4.7.	Accumulation calcique cytosolique	78
3.2.4.8.	Activation des calpaïnes.....	79
3.2.5.	Anomalies conformationnelles, stress réticulaire et réponse aux protéines mal-conformées	79
3.2.6.	MAMs	80
3.2.7.	Altérations métaboliques.....	80
3.2.8.	Apoptose.....	81
3.2.9.	Anomalies contractiles	81
3.2.10.	Thérapies	84
4.	LE RECEPTEUR NUCLEAIRE REV-ERB-A : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE POTENTIELLE	85
4.1.	Rev-erb- α : un récepteur nucléaire répresseur de transcription, cible de ligands pharmacologiques.....	85
4.2.	Rev-erb- α , acteur du rythme circadien et régulateur du métabolisme	86
4.3.	Rev-erb- α et homéostasie calcique.....	90
4.4.	Rev-erb- α et stress réticulaire.....	90
4.5.	Rev-erb- α et apoptose.....	91
4.6.	Rev-erb- α et fonction du muscle squelettique.....	91
4.7.	Rev-erb- α et myopathies	92
	OBJECTIFS DE L'ETUDE	93
	MATERIEL ET METHODES	95
	RESULTATS	113
	Projet 1 : Rev-erb- α améliore l'homéostasie calcique et l'UPR en reprimant la myoreguline dans le muscle squelettique	114
	Projet 2 : L'augmentation des MAMs par Rev-erb- α contrôle le destin de la cellule satellite musculaire <i>via</i> l'accroissement de l'apoptose induite par le stress réticulaire.....	135
	Projet 3 : Expression différentielle des acteurs de l'UPR dans le muscle squelettique selon le statut glycémique de patients obèses	146
	DISCUSSION	149
	BIBLIOGRAPHIE.....	161

LISTE DES ABREVIATIONS

3-HNA : acide 3-Hydroxy-2-Naphtoïque
AV : Annexin V
AAV : Adeno Associated Virus
ABD : Actin Binding Domain
ABOS : Atlas Biologique de l'Obésité sévère
Actine F : Actine Filamenteuse
Actine G : Actine Globulaire
ADA : American Diabetes Association
ADP : Adénosine DiPhosphate
AF1 : Activation Function 1
AFM : Association Française de Myologie
AFP : Alpha-FetoProtein
AKAP : A-Kinase Anchor Proteins
ALN : Another réguline
AMPc : Adénosine Mono Phosphate cyclique
AMPK : AMP-activated Kinase
APOCIII : Apolipoprotein C-III
ARN : Acide RiboNucléique
ARNTL : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-like protein
Asp : Acide Aspartique
ATCC : American Type Culture Collection
ATF : Activating Transcription Factor
Atg12 : Autophagy-related protein 12
ATP : Adénosine TriPhosphate
Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAP31 : B-cell receptor-Associated Protein 31
Bax : Bcl-2-associated X
BCAT2 : Branched Chain Amino acid Transaminase 2
Bcl2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-XL : B-cell lymphoma-extra large
Bim : Bcl-2-like protein 11
BiP : Binding immunoglobulin Protein
BMAL1 : Brain and Muscle Arnt-Like protein-1
BSA : Bovine Serum Albumin
Calstabin-1 : Calcium channel stabilizing binding protein
CaMKK2 : Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Kinase 2
CarMeN : Laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition
CB2 et 3 : Cyanogen Bromide fragment 2 et 3
CCCP : Carbonyl Cyanide m-Chloro-Phenyl hydrazone
C/EBP : CCAAT-enhancer-binding proteins
CerS : Ceramide Synthase

CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
 ChIP : Chromatine Immuno-Precipitation
 CHOP : CEBP HOMologous Protein
 CKI ϵ : Casein Kinase I epsilon
 CLOCK : Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput
 CLP : Calsequestrin-Like Proteins
 CNF : Centro Nuclei Fiber
 CRY : Cryptochrome
 CS : Citrate Synthase
 CSA : Cross Sectionnal Area
 CT : Circadan Time
 Da : Dalton
 DAG : DiAcylGlycerol
 DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
 DBD : DNA Binding Domain
 DCFH-DA : 2',7'- dichlorofluorescéine
 DES : DHCer DESaturase
 DGC : Dystrophine Glycoprotein Complex
 DHCer : DiHydroCéramide
 DHPR : DiHydroPyridine Receptor
 DMD : Duchenne Muscular Dystrophy
 DMEM : Dulbecco's Modified Eagles Medium
 DMSO : DiMéthylSulfOxyde
 Drp1 : Dynamin Related Protein 1
 DTT : Dithiothreitol
 DWORF : Dwarf Open Reading Frame
 EB1 : End Binding 1
 ECL : Enhanced ChemiLuminescence
 ECM : ExtraCellular Matrix
 EDL : *extensor digitorum longus*
 EDTA : ÉthylèneDiamineTétraAcétique
 eIF2 α : eukaryotic translation Initiation Factor 2 α
 ELN : Endoréguline
 ERAD : Endoplasmic Reticulum-Assosiated Degradation
 ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
 ERO1 : Endoplasmic Reticulum Oxydoreductase 1
 EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
 FABP4 : Fatty Acid Binding Protein 4
 FAD : Flavin Adenine Dinucleotide
 FAS : Fatty Acid Synthase
 FATE1 : Fetal And Adult Testis Expressed 1
 FKBP : FK506 Binding Protein
 GADD34 : Growth Arrest and DNA-Damage-inducible 34
 GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GFP : Green Fluorescent Protein
 GLUT4 : GLUcose Transporters 4
 GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique
 GRP : Glucose-Related Peptide
 GS : Glycogène Synthase
 GSK3 β : Glycogène Synthase Kinase 3 β
 GSSG : disulfure de glutathion
 GTP : Guanosine TriPhosphate
 Hb1Ac : Hémoglobine glyquée
 HDAC1 : Histone Deacetylase 1
 HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
 HFD : High-Fat Diet
 HGF : Hepatic Growth Factor
 HSP : Heat Shock Protein
 hOGG1 : human 8-OxoGuanine DNA N-Glycosylase 1
 HSPA5 : Heat Shock Protein A5
 IgG : Immunoglobulin G
 IL : InterLeukin
 IMC : Indice de Masse Corporelle
 IP : Iodure de Propidium
 IP3 : Inositol trisphosphate
 IP3R : Inositol trisphosphate Receptor
 IR : Insulin Receptor
 IRE1 : Inositol-Requiring Enzyme 1
 IRES : Internal Ribosome Entry Site
 IRS : Insulin Receptor Substrate
 ITPR1 : Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1
 ITT : Insulin Tolerance Test
 JNK : c-Jun N-terminal Kinase
 KRH : Krebs-Ringer-HEPES-glucose-glutamine
 KSR : 3-cétoSphinganine Réductase
 LBD : Ligand Binding Domain
 LDL : Low-Density Lipoprotein
 LC3-II : microtubule-associated protein light chain 3 II
 LFD : Low Fat Diet
 LMWF : Low Molecular Weight Fucoidan
 lncRNA : long non codant RNA
 LPS : LipoPolySaccharide
 MAM : Mitochondria-Associated Membranes
 MCK : Muscle Creatine Kinase
 MCU : Mitochondrial Channel Uniport
 Mef2 : Myocyte enhancer factor-2
 Mfn : Mitofusin
 MHC : Myosin Heavy Chain

MLC : Myosin Light Chain
 MLN : Myoréguline
 MLP : Muscle Lim Protein
 MNF : Myocyte Nuclear Factor
 MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
 MPTP : Mitochondrial Permeability Transition Pore
 MRB : Mitochondria Resuspending Buffer
 mTOR : rictor-mammalian Target Of Rapamycin
 Murf1 : Muscle RING-finger protein-1
 MyBP : Myosin Binding Protein
 Myf5 : Myogenic factor 5
 MyoD : Myogenic Differentiation 1
 MyoG : Myogénine
 NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
 NAM : Nicotinamide
 NAMPT : NAM Phosphoribosyl Transferase
 Ncor1 : Nuclear receptor Co-repressor 1
 NF- κ B : Nuclear Factor kappa B
 NLRP3 : NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3
 NLS : Nuclear Localization Signal
 NMN : Nicotinamide mononucleotide
 NMNAT : NMN Adenylyl Transferases
 NOD : Nucleotide Oligomerization Domain
 NOE : N-Oleoyl-Ethanolamine
 NOS : Nitric-Oxide (NO) Synthase
 NR1D1 : Nuclear Receptor subfamily 1, group D, member 1
 OGT : O-GlcNAc transferase
 OGTT : Oral Glucose Tolerance Test
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 ORAI1 : Calcium release-activated calcium channel protein 1
 ORP150 : 150-kDa Oxygen-Regulated Protein
 PACS2 : Phosphofurine Acidic Cluster Sorting protein 2
 Palmitoyl-CoA : Palmitoyl-CoenzymeA
 PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymérase
 Pax7 : PAired boX 7
 PBA : 4-PhénylButyric Acid
 PBS : Phosphate Buffer Saline
 PERK : Protéine kinase R-like ER Kinase
 PEVK : Proline-Glutamate-Valine-Lysine
 PER : Period
 PDI : Protéine Disulfure Isomérase
 PDK1 : Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
 PDMP : DL-threo-1-Phenyl-2-Decanoylamino-3-Morpholino-1-Propanol
 PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α

PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pink : PTEN-induced kinase 1
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisPhosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol triPhosphate
PKA : Protein Kinase A
PLA : Proximity Ligation Assay
PLN : Phospholamban
PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride
PP1 : Protein Phosphatase 1
PP2A : Protein Phosphatase 2A
PPIA : Peptidylprolyl Isomerase A
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTP1B : Protéine Tyrosine Phosphatase 1B
PUGNAc : [(E)-[3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-ylidene]amino] N-phenylcarbamate
PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
RCR : Respiratory Control Ratio
RE : Réticulum Endoplasmique
RLC : Regulatory Light Chain
Rev-erb- α : Reverse strand of ERB α
RIPA : RadioImmunoPrecipitation Assay
ROR α : Retinoic acid-related orphan receptor α
RORE : ROR Response Elements
ROS : Reactive Oxygen Species
RR : Rouge de Ruthénium
RRE : Rev Response Element
RT : Reverse Transcription
RTqPCR : Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction
RyR : Ryanodine Receptor
SAR : Sarcalumenine
SCD1 : Stearoyl-CoA Desaturase 1
SDS : Sodium DodécylSulfate
SEM : Standard Error of the Mean
SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
SH2 : Src Homology 2
shRNA : short hairpin RNA
siRNA : small interfering RNA
SIRT1 : Sirtuine 1
SKIP : Skeletal muscle and Kidney-enriched Inositol polyphosphate Phosphatase
SL : Sarcomère Length
SLN : Sarcolipine
SOCE : Store-Operated Calcium Entry
SOICR : Store Overload-Induced Calcium Release

SP1/2 : Site-1 et Site-2 Protease
SPT : Sérine PalmitoylTransférase
STIM1 : Stromal Interaction Molecule 1
SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
SRF : Serum Response Factor
SRP : Signal Recognition Particule
SVF : Sérum de Veau Fœtal
SW : Swinging-Bucket Rotor
TAC : Tip Attachement Complex
Taq : *Thermus aquaticus*
TBS : Tris-Buffered Saline
TG : Thapsigargine
TnC : Troponine C
TNF : Tumor Necrosis Factor
TN : Tunicamycine
TnI : Troponine Inhibitrice
TnT : Troponine T
TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor 2
Tubule T : Tubule Transverse
TUDCA : TauroUrsoDeoxyCholic Acid
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
UPR : Unfolded Protein Response
UREPSSS : Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société
Utr : Utrophine
XPB1s : X-box Binding Protein-1 splicée
XBP1u : X-Box Binding Protein-1 non splice (unspliced)
VDAC : Voltage-Dependant Anion Channel
VLDL : Very Low Density Lipoprotein
VICR : Voltage-Induced Calcium Release
z-DEVD-fmk : z-DEVD-fluoromethyl ketone
ZT : Zeitgeber
 σ -1R : σ -1 Receptor

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Les muscles squelettiques du corps humain (Encyclopaedia Britannica, 2013)
- Figure 2 : Structure du muscle squelettique (Oregon state library)
- Figure 3 : Structure de la fibre musculaire (Pearson education, 2015)
- Figure 4 : Organisation d'un sarcomère (Ait Mou et al., 2015).
- Figure 5 : Observation d'un sarcomère au microscope électronique (Roger Craig, Université du Massachusetts)
- Figure 6 : Structure de la myosine et du filament épais (Openstax, Anatomy and Physiology)
- Figure 7 : Structure du filament fin (Openstax, Anatomy and Physiology)
- Figure 8 : Organisation du complexe des troponines (Wikiwand)
- Figure 9 : Organisation de la strie Z du sarcomère (Sheikh et al., 2007)
- Figure 10 : Organisation du DGC (Kamdar and Garry, 2016)
- Figure 11 : Structure dynamique de la titine (Neagoe et al., 2003)
- Figure 12 : Les étapes de la contraction musculaire (Openstax, Anatomy and Physiology)
- Figure 13 : La contraction musculaire au niveau moléculaire (Openstax, Anatomy and Physiology)
- Figure 14 : Les étapes de la relaxation musculaire (Openstax, Anatomy and Physiology)
- Figure 15 : Structure cristallographique de SERCA (Watson, 2015)
- Figure 16 : La famille de modulateurs de l'activité de SERCA (Anderson et al., 2016)
- Figure 17 : Structure du gène de la myoréguline (Anderson et al., 2015)
- Figure 18 : Interaction de la myoréguline avec SERCA (Anderson et al., 2015)
- Figure 19 : Voie de signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique (Boulinguez et al., 2017)
- Figure 20 : Les différents métabolismes du muscle squelettique (Openstax, Anatomy and Physiology)
- Figure 21 : Déroulement de la régénération musculaire (Mayeuf and Relaix, 2011)
- Figure 22 : Voie de synthèse des céramides *de novo* (Boulinguez et al., 2017)
- Figure 23 : Déroulement de la translocation cotraductionnelle (Cell and Molecular Biology, 7th Edition, chapter 11.7, Gerald Karp)
- Figure 24 : Structure de la protéine chaperonne BiP (Shah et al., 2017).
- Figure 25 : Structure des MAMs (Boulinguez et al., 2017)
- Figure 26 : Voies de signalisation de l'UPR (Boulinguez et al., 2017)
- Figure 27 : Maintien de la cellule satellite en quiescence par P-eIF2 α (Zismanov et al., 2016)
- Figure 28 : Rôles de l'UPR
- Figure 29 : Récapitulatif des altérations du réticulum endoplasmique du muscle squelettique dans les pathologies métaboliques
- Figure 30 : Tableau comparatif des modèles animaux de la myopathie de Duchenne par rapport à la pathologie humaine (Larcher et al., 2014)
- Figure 31 : Récapitulatif des atteintes de l'homéostasie calcique et réticulaires observées chez la souris *mdx*
- Figure 32 : Structure du récepteur nucléaire Rev-erb- α
- Figure 33 : Variations physiologiques générées par les rythmes circadiens (Masri and Sassone-Corsi, 2018)
- Figure 34 : Boucles de régulations transcriptionnelles de l'horloge biologique (Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2013)
- Figure 35 : Horloge centrale et horloges périphériques (Duez and Staels, 2009)
- Figure 36 : Intrication moléculaire de l'horloge circadienne et du métabolisme par SIRT1 (Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2009)

Figure 37 : Fonctions physiologiques de Rev-erb- α (Everett and Lazar, 2014)

Figure 38 : Représentation schématique des travaux de thèse

Figure 39 : Construction génique permettant la surexpression de Rev-erb- α dans la cellule satellite

Figure 40 : Les étapes du fractionnement cellulaire

Figure 41 : Chaîne respiratoire mitochondriale

Figure 42 : Modulation de la chaîne respiratoire mitochondriale

Figure 43 : Rev-erb- α améliore l'homéostasie calcique réticulaire dans les cellules musculaires

Figure 44 : L'inactivation de Rev-erb- α réduit la réponse aux protéines mal-conformées induite par un stress réticulaire dans le muscle squelettique de la souris.

Figure 45 : La diminution chronique du contenu calcique réticulaire minore la réponse aux protéines mal-conformées suite à un stress réticulaire.

Figure 46 : L'UPR induite par un stress réticulaire est diminuée chez les myotubes issues de cellules satellites de souris *Rev-erba*^{-/-}.

Figure 47 : La surexpression de Rev-erb- α amplifie l'UPR induite par un stress réticulaire *in vitro*

Figure 48 : L'activation pharmacologique des récepteurs Rev-erb amplifie l'UPR induite par un stress réticulaire.

Figure 49 : La déplétion calcique du reticulum endoplasmique par la thapsigargine abolit l'effet de Rev-erb- α sur l'UPR.

Figure 50 : Rev-erb- α réprime l'expression de la myoréguline par une liaison directe sur son promoteur.

Figure 51 : La surexpression de la myoréguline réduit le contenu calcique réticulaire et l'UPR en réponse à une stimulation à la tunicamycine.

Figure 52 : La surexpression de la myoréguline abolit l'exacerbation de l'UPR induit par un traitement à la tunicamycine.

Figure 53 : L'activation pharmacologique des récepteurs Rev-erb améliore l'homéostasie calcique et l'UPR dans les cellules musculaires issues de patients myopathes de Duchenne.

Figure 54 : L'activation pharmacologiques des récepteurs Rev-erb tend à améliorer la fonction des muscles squelettiques dans le modèle de souris de la myopathie de Duchenne *mdx/utr*^{+/-}.

Figure 55 : Résumé graphique des résultats du projet 1

Figure 56 : La surexpression de Rev-erb- α exacerbe l'apoptose induite par un stress réticulaire dans les cellules C2C12.

Figure 57 : L'exacerbation de la mort cellulaire par Rev-erb- α est dépendante d'un stress réticulaire ou mitochondrial.

Figure 58 : La surexpression de Rev-erb- α exacerbe l'UPR et l'apoptose au cours de l'activation de la cellule satellite musculaire.

Figure 59 : La surexpression de Rev-erb- α exacerbe les altérations mitochondriales induites par un stress réticulaire.

Figure 60 : La surexpression de Rev-erb- α augmente les MAMs et le transfert calcique du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie

Figure 61 : Rev-erb- α ne modifie pas la quantité globale de protéines IP3R1 et VDAC1

Figure 62 : L'inhibition des MAMs contrecarre l'effet pro-apoptotique de Rev-erb- α dans les cellules satellites activées.

Figure 63 : L'inhibition des MAMs contrecarre l'effet pro-apoptotique de Rev-erb- α dans les myoblastes C2C12.

Figure 64 : Les marqueurs de stress réticulaire sont exprimés différemment en fonction de l'état de tolérance au glucose du muscle squelettique.

Figure 65 : Les paramètres métaboliques sont en corrélation avec les gènes de l'UPR.

Figure 66 : Variations circadiennes de l'activité de SERCA dans le muscle squelettique.

Figure 67 : Variations circadiennes de l'expression des *nr1dl*, *bmali* et des gènes de l'UPR.

Figure 68 : La quantité de protéine BiP est significativement augmentée par l'inactivation génique de *Rev-erb- α* *in vivo*.

Figure 69 : *Rev-erb- α* réduit la sensibilité à l'insuline des myotubes en l'absence et en présence d'un stress réticulaire.

Figure 70 : Modèle hypothétique de la régulation du destin de la cellule satellite par *Rev-erb- α*

Tableau 1 : Isoformes des protéines musculaires

Tableau 2 : Caractéristiques des différents types de fibres musculaires

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées en qPCR

Tableau 4 : Caractéristiques des anticorps utilisés en western-blot

Tableau 5 : Amorces utilisées en Chromatine Immuno-Precipitation (ChIP)

Tableau 6 : Caractéristiques métaboliques de la cohorte d'obèses

INTRODUCTION

1. PHYSIOLOGIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

L'objectif de cette première partie est d'établir succinctement les caractéristiques principales de l'organe étudié dans le cadre de cette thèse. Sauf précision bibliographique, les informations contenues dans la première partie sont issues des connaissances générales de l'auteur sous le contrôle des revues suivantes : (Au, 2004) (Frontera and Ochala, 2015) (Henderson et al., 2017) pour l'ultrastructure du muscle, (Allard, 2018) (Calderón et al., 2014) (Rebbeck et al., 2014) pour le couplage excitation-contraction, (Schiaffino and Reggiani, 2011) (Holloszy, 2003) pour les types de fibres et le métabolisme musculaire, (Morgan and Partridge, 2003) (Hawke and Garry, 2001) (Yin et al., 2013) (Relaix and Zammit, 2012) (Relaix and Marcelle, 2009) pour les cellules satellites et la regeneration musculaire.

Les muscles squelettiques du corps humain (Figure 1) permettent la réalisation de nombreuses fonctions capitales telles que les mouvements volontaires, la respiration, la locomotion, la production de chaleur ou le maintien de la posture.

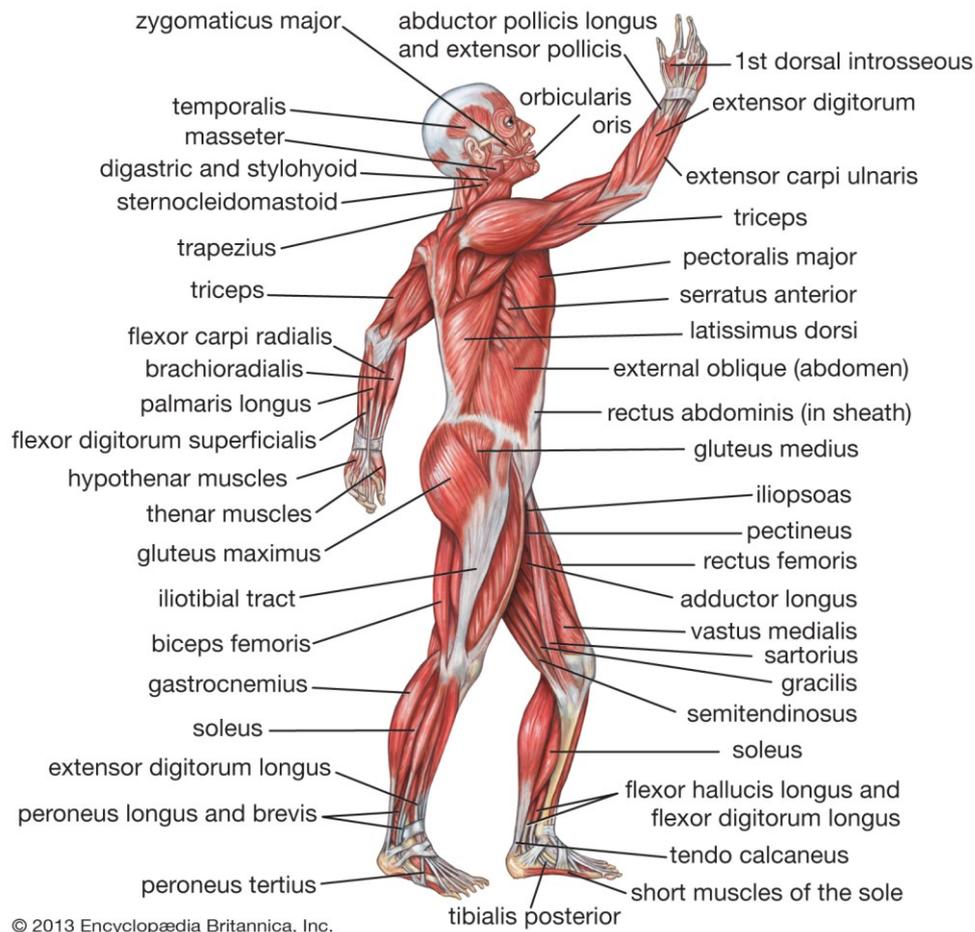


Figure 1 : Les muscles squelettiques du corps humain (Encyclopædia Britannica, 2013)

Représentant 40% de la masse corporelle et contenant 50 à 75% des protéines du corps humain, les muscles squelettiques se caractérisent par les propriétés suivantes : excitabilité, contractilité, extensibilité et élasticité. Ces caractéristiques sont permises par le degré

d'organisation du muscle squelettique obtenu au moyen des protéines myofibrillaires. Le terme de muscle strié squelettique provient de la striation régulière autour des deux filaments principaux que sont l'actine et la myosine.

1.1. Structure du muscle squelettique

Un muscle squelettique se constitue de plusieurs faisceaux de fibres musculaires. L'épimysium est le nom donné à la gaine qui entoure le muscle entier. Le pérmysium encercle chaque faisceau de fibres. L'endomysium ceint quant à lui les fibres musculaires. Les muscles squelettiques sont attachés aux os du squelette grâce aux tendons, prolongements de fibres et de tissu conjonctif (Figure 2).

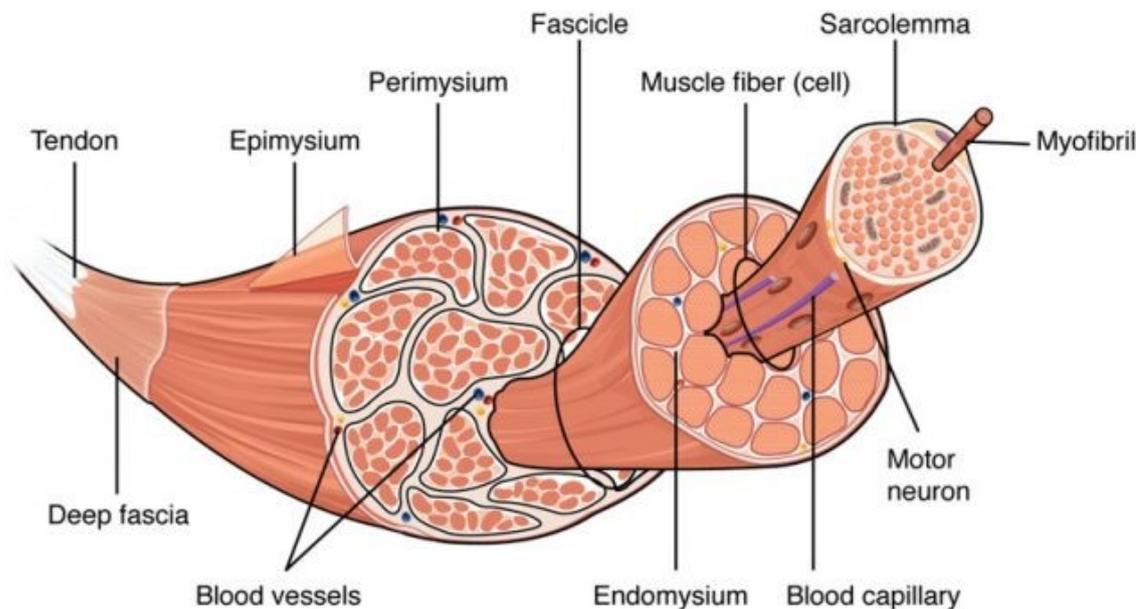


Figure 2 : Structure du muscle squelettique (Oregon state library)

Le muscle squelettique comprend également des vaisseaux sanguins qui permettent d'apporter les ressources énergétiques directement au cœur du muscle et une innervation pour la motricité, entre autres.

1.1.1. Structure de la fibre musculaire

La fibre musculaire est qualifiée d'unité cellulaire de la contraction du fait que chaque fibre peut se contracter indépendamment les unes des autres (Figure 3). Le diamètre d'une fibre musculaire varie entre 30 et 50 μm (jusqu'à 100 μm). Sa longueur correspond à celle du muscle. Plusieurs fibres musculaires se regroupent en faisceaux. Une fibre musculaire est plurinucléée car résultant de la fusion de plusieurs myocytes. Le volume de la fibre musculaire se compose majoritairement de protéines contractiles, les principales étant la myosine et l'actine. Du fait des spécificités inhérentes à l'identité de la fibre musculaire, la membrane plasmique, le cytoplasme et le réticulum endoplasmique lisse prennent dans ce

contexte précis les dénominations de sarcolemme, sarcoplasme et réticulum sarcoplasmique respectivement.

Le réticulum sarcoplasmique, qui tient lieu de réservoir calcique, encercle les myofibrilles (que constituent les protéines contractiles) et forme un vaste réseau tubulaire. A des points précis et réguliers, le sarcolemme s'invagine pour former les tubules transverses ou tubules T. Autour de chaque tubule T se regroupe une partie du réticulum sarcoplasmique appelée citerne terminale. Deux citernes terminales, issues de deux stries adjacentes, encadrent le tubule T pour former la triade musculaire. La triade est le siège de la libération calcique en réponse à un potentiel d'action.

Outre le réticulum sarcoplasmique, la présence de nombreuses mitochondries est observée autour des myofibrilles.

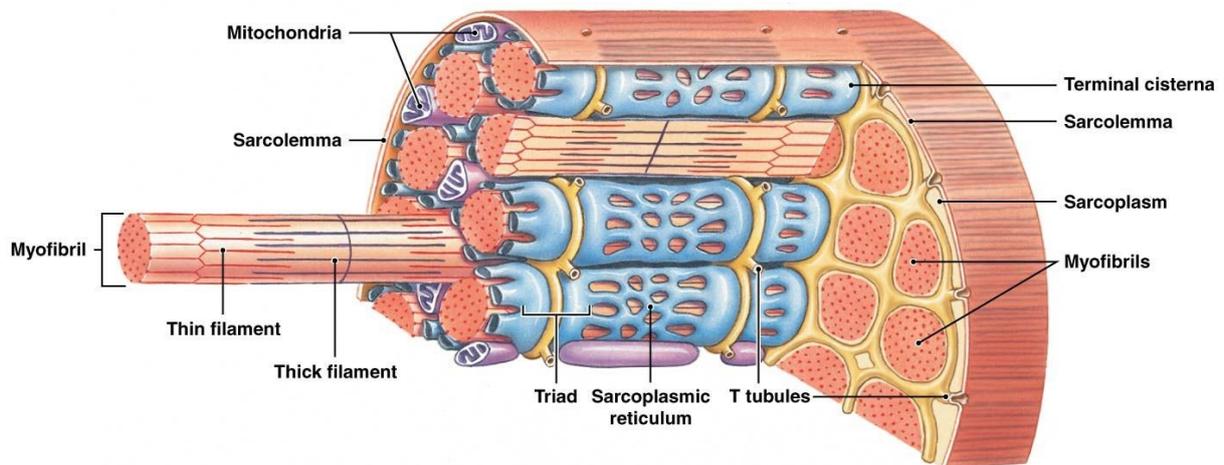


Figure 3 : Structure de la fibre musculaire (Pearson education, 2015)

1.1.2. Structure de la myofibrille

Le sarcomère est la zone comprise entre 2 stries Z (Figure 4). Entre deux filaments fins non contractés se tient la zone H, qui ne comporte que du filament épais. La zone M correspond au centre de la zone H. La strie Z est le point d'ancrage des filaments fins. L'observation en microscopie électronique fait apparaître 2 zones d'intensités distinctes ; la zone anisotrope (A) sombre et la zone isotrope (I) qui apparaît en clair (Figure 5).

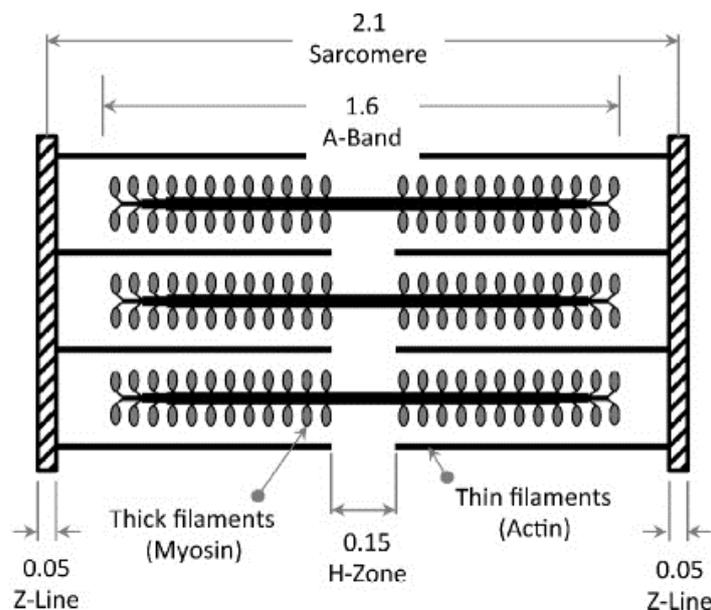


Figure 4 : Organisation d'un sarcomère (Ait Mou et al., 2015). Les distances sont indiquées en μm .

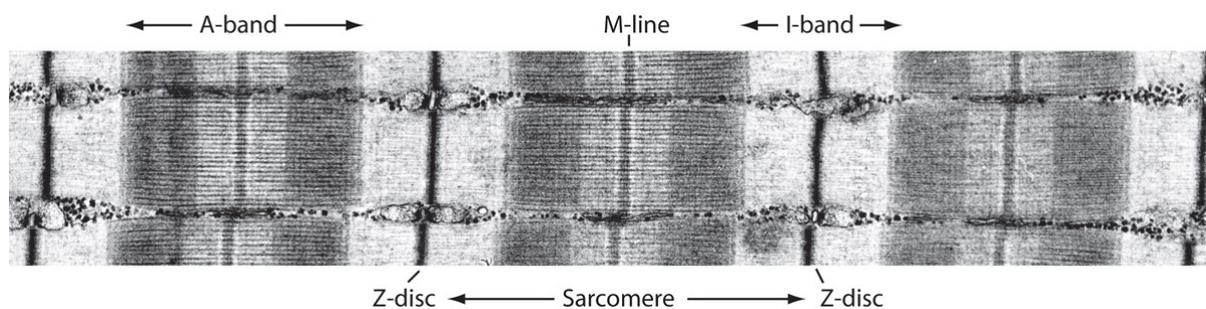


Figure 5 : Observation d'un sarcomère au microscope électronique (Roger Craig, Université du Massachusetts)

Dans le cas d'une hypercontraction, il y a contact entre le filament épais et la strie Z, ainsi qu'un chevauchement des filaments fins.

1.1.3. Les protéines motrices et régulatrices de la myofibrille

Les protéines motrices sont l'actine et la myosine. Elles ont un rôle architectural, enzymatique et mécanique. Il existe également des protéines régulatrices : les troponines et la tropomyosine. Celles-ci modulent la contractilité musculaire grâce au signal calcique.

1.1.3.1. La myosine

La myosine est une protéine asymétrique, hexamérique, en forme de club de golf. Elle se constitue de deux chaînes lourdes (MHC, Myosin Heavy Chain), et de deux paires de chaînes légères (MLC, Myosin Light Chain).

Les chaînes lourdes s'enroulent l'une autour de l'autre de manière hélicoïdale. 300 molécules de myosine sont associées de manière antiparallèle pour former un filament épais de 1,5µm de longueur et 15nm de diamètre. A l'extrémité du filament se trouvent les têtes S1 de myosine qui contiennent un site de fixation à l'actine et un site de fixation à l'Adénosine TriPhosphate (ATP) (Figure 6).

Les chaînes légères de myosine s'accrochent à la base de la tête des chaînes lourdes. Il existe des chaînes légères essentielles (Essential Light Chain, ELC) et régulatrices (Régulatory Light Chain, RLC). Les ELC sont des chaînes structurales pour lesquelles se distinguent deux isoformes (MLC1 et 3). Les RLC ou MLC2 possèdent 4 sites de liaison au calcium (dont 1 seul est fonctionnel) et sont modulables par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ou l'établissement d'un pont disulfure. La présence de calcium empêche la création du pont disulfure, autorisant la courbure de la MLC2 qui peut se fixer à la MHC, et donc permettre la contraction musculaire.

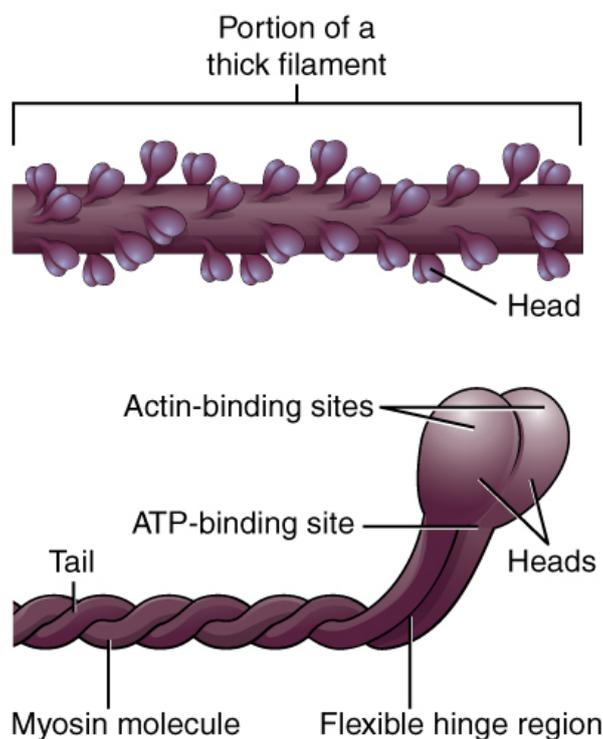


Figure 6 : Structure de la myosine et du filament épais (Openstax, Anatomy and Physiology)

1.1.3.2. L'actine

L'actine est une protéine retrouvée dans de nombreux tissus de par sa participation au cytosquelette. C'est une molécule très conservée sur le plan phylogénétique. Dans la fibre musculaire, l'actine est le composant principal du filament fin (Figure 7). La forme active nommée l'actine filamenteuse (F) résulte de la polymérisation hélicoïdale de l'actine globulaire (G) monomérique. L'actine G possède deux paires de sites d'attachement ; 2 mâles et 2 femelles. Les sites d'attachements sis aux pôles permettent de former la longueur de la chaîne lorsque les sites latéraux permettent de créer l'épaisseur du filament. L'actine G possède un site de liaison à la myosine. Liés à l'ATP, les globules d'actine polymérisent sous forme d'hélice hélicoïdale dont le pas est de 77nm. La fibre obtenue a un diamètre de 8nm.

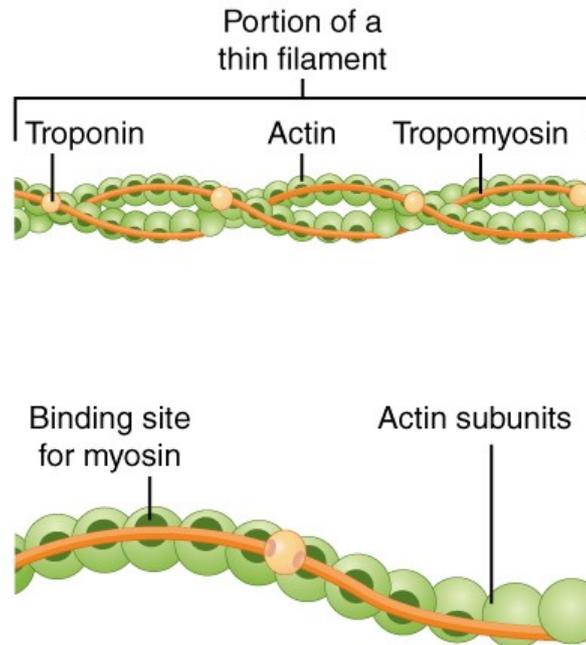


Figure 7 : Structure du filament fin (Openstax, Anatomy and Physiology)

1.1.3.3. La tropomyosine

La tropomyosine est un dimère de deux sous-unités de 33kDa, enroulées en hélice α . La tropomyosine s'enroule dans le sillon généré par le filament d'actine dans le sens de la longueur. Plus courts que le filament d'actine, les dimères de tropomyosine s'associent par des regroupements tête-queue avec un recouvrement d'acide aminés, pour couvrir l'intégrité du filament fin.

1.1.3.4. La troponine C

La troponine C (TnC) est une protéine de 13kDa qui possède un motif EF-hand et 4 sites de liaison au calcium : I et II en N-terminal, et III et IV en C-terminal. Les sites I et II sont spécifiques à l'ion calcique mais de faible affinité. Au cours de la contraction, le calcium se fixe sur les sites I et II, ce qui modifie leur conformation et favorise leur interaction avec la troponine I (1.1.3.5.). Les sites III et IV présentent une forte affinité pour le calcium mais peuvent aussi lier le magnésium. Ils jouent un rôle structural.

1.1.3.5. La troponine I

La troponine inhibitrice (TnI) est une protéine de 23kDa qui possède des interactions indépendantes du calcium avec la troponine C et la troponine T et dépendantes du calcium avec la troponine C, la tropomyosine et l'actine. Elle participe ainsi à l'intégrité structurale du complexe des troponines et à la contraction.

A l'état de repos, il existe une interaction forte entre la partie N-terminale de la troponine I et la partie C-terminale de la troponine C, mais une interaction faible entre la partie C-terminale de la troponine I et la partie N-terminale de de la troponine C. La troponine

I empêche la liaison de l'actine avec la myosine. Lorsque le calcium se fixe sur les sites I et II en N-terminal de la troponine C, cela renforce son interaction avec la partie C-terminale de la troponine I. Cette forte interaction libère le site de fixation à la myosine sur l'actine. Ainsi, la tête de myosine peut interagir avec l'actine.

1.1.3.6. La troponine T

La troponine T (TnT) se compose de deux protéines que sont la troponine T1 en N-terminal et la troponine T2 en C-terminal. La troponine T1 comporte deux domaines Cyanogen Bromide fragment 2 et 3 (CB2 et CB3) et interagit avec la tropomyosine indépendamment de la concentration en calcium. CB3 exerce un contrôle négatif sur les interactions avec la myosine.

La troponine T2 est associée à la tropomyosine de manière calcium-dépendante : l'interaction entre les deux protéines diminue en présence de calcium (Figure 8). La troponine T2 interagit avec l'actine, les troponine C et I. De plus, elle est mobile et transmet le signal aux protéines environnantes.

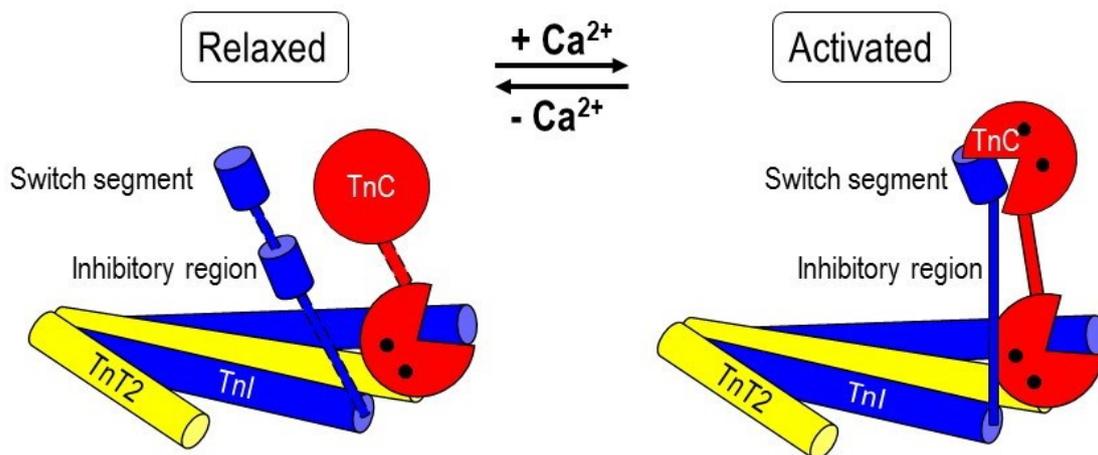


Figure 8 : Organisation du complexe des troponines (Wikiwand)

1.1.4. Les autres protéines myofibrillaires et sarcolémiques à rôle fonctionnel

1.1.4.1. Les protéines de la strie Z

La régularité de la disposition des filaments fins d'actine dans le sarcomère est due à leur interaction spécifique avec la strie Z. Les filaments fins sont disposés en alternance de part et d'autre de la strie Z. La strie Z est composée principalement de l' α -actinine.

- L' α -actinine : L' α -actinine est une molécule d'ancrage pour l'actine. En effet, elle constitue un réseau maillé sur lequel les filaments fins viennent s'ancrer en faisceaux parallèles. Elle est constituée de deux monomères de 95kDa en forme de bâtonnets, organisés de manière antiparallèle. L' α -actinine contient le domaine de liaison à l'actine (ABD, Actin Binding Domain) en partie N-terminale. Ainsi, à chaque extrémité du dimère se trouve un domaine ABD. Le centre de la protéine se compose de 4 domaines de type spectrine (R1 à R4), dont les multiples possibilités d'arrangement permettent de modifier la conformation du

dimère et donc de moduler sa longueur, et *in fine* l'organisation structurale de la strie Z ou de l'actine. En outre, l' α -actinine interagit avec la titine afin d'assurer l'intégrité du sarcomère.

- La Cap-Z : La Cap-Z est retrouvée à l'extrémité du filament d'actine. Elle interagit avec l' α -actinine notamment au niveau du domaine ABD et participe à l'ancrage du filament fin. Elle aurait un rôle important pendant la croissance musculaire en favorisant l'organisation du filament fin.
- La myopalladine : Protéine de 141kDa, la myopalladine connecte la nébuline à l' α -actinine et donc à la strie Z.
- La myopodine : La myopodine joue un rôle structural et stabilisateur. Elle interviendrait dans les voies de signalisation pendant le développement ou pendant le stress cellulaire.
- La famille des protéines à domaine LIM : Muscle Lim Protein (MLP), Zyxine *etc.* Il s'agit de protéines riches en cystéine et donc en ponts disulfures qui permettent de stabiliser la strie Z et de maintenir son intégrité mécanique lors de l'activité physique.

Pour de plus amples informations sur la strie Z (Figure 9), je vous renvoie à la revue suivante (Sheikh et al., 2007).

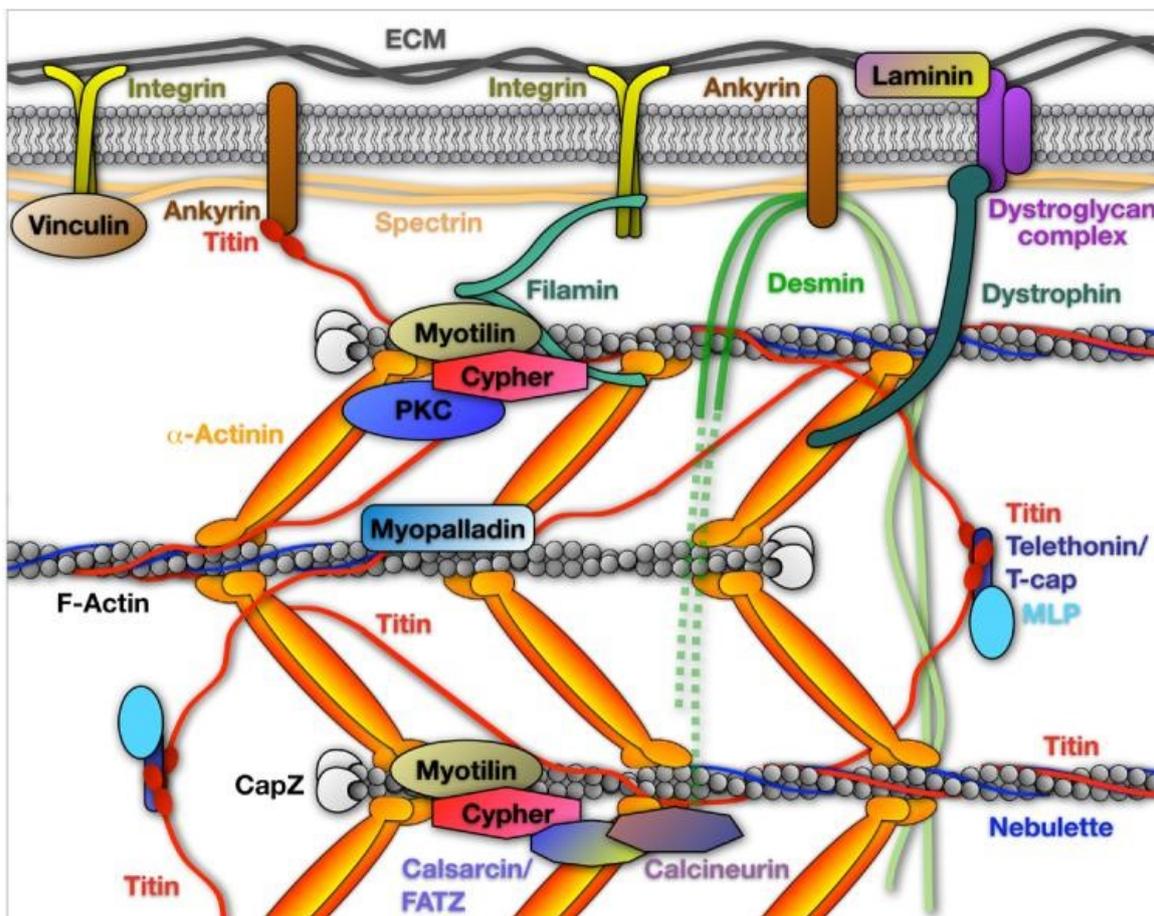


Figure 9 : Organisation de la strie Z du sarcomère (Sheikh et al., 2007)

1.1.4.2. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires jouent un rôle clef dans la genèse de la force et dans le maintien de la stabilité mécanique du muscle.

- La desmine : La desmine, protéine de 53kDa est retrouvée à différents endroits : dans la strie Z, entre la strie Z et la membrane plasmique, et en périphérie de chaque strie Z pour former des manchons autour des myofibrilles. Ainsi, la desmine assure la liaison et l'alignement structural des sarcomères entre eux et avec la membrane plasmique. Elle permet le regroupement des myofibrilles dans le muscle. Elle est également retrouvée en faible quantité autour de la strie M.
- La synémine : La synémine est une protéine additionnelle qui est coexprimée avec la desmine et qui permet le maintien de l'architecture cellulaire.

1.1.4.3. La nébuline

La nébuline est une protéine associée aux filaments fins. Protéine géante de 600 à 900kDa, elle peut représenter jusqu'à 3% de la masse des myofibrilles. Dans la zone centrale de la protéine est retrouvé 22 répétitions de 7 domaines de 35 acides aminés, avec la tyrosine pour acide aminé central. Les 7 domaines correspondent à la périodicité des 7 monomères d'actine. A l'extrémité C-terminale, se trouve un domaine SH3. La nébuline est une protéine qui est inextensible et est à ce titre qualifiée de régulateur moléculaire de la longueur des filaments fins. Le filament fin possède la même longueur que le filament de nébuline.

1.1.4.4. Les protéines associées à la myosine

La Myosin Binding Protein C (MyBP-C) est une protéine de 140kDa alors que la MyBP-H fait 58kDa. Elles présentent une structure similaire comprenant 3 domaines de type fibronectine-3 et 7 domaines de type immunoglobuline-I. Ces protéines sont retrouvées principalement dans la zone de chevauchement actine-myosine du sarcomère. La distance qui sépare 2 protéines est toujours de 43nm. La MyBP-C possède deux sites de liaison à la myosine, un site de liaison à la titine et un site de phosphorylation. La MyBP-H ne possède qu'un site de liaison avec la myosine. Les MyBP permettent l'assemblage des filaments épais et leur alignement de manière à maintenir une longueur de 1,6 μ m.

1.1.4.5. Les protéines de la ligne M

La ligne M est une bande de 80nm de large située au centre de la bande A et formée de ponts protéiques. Les ponts M assurent la liaison d'un filament épais à 6 autres filaments épais, assurant ainsi une disposition hexagonale de ces filaments. Les filaments M permettent d'associer des ponts M entre eux. Il existe également des ponts M secondaires reliant les filaments M les uns avec les autres.

La ligne M1 est la ligne centrale de la ligne M. De part et d'autre, se trouvent à 22nm M4 et M4'. Puis à 44nm de la ligne M1, se situent M6 et M6'. Une fibre lente contient 4 lignes ; M6'-M4'-M4-M6 sans la ligne M1, une fibre rapide 3 ponts ; M4'-M1-M4 et une

fibre intermédiaire contient les 5 lignes : M6'-M4'-M1-M4-M6. Le segment M4-M4', systématiquement retrouvé, est fondamental pour l'intégrité de la bande A.

Au sein de la ligne M se retrouve la myoméline et la protéine M. De structure identique, ces deux protéines participent à l'ancrage du filament épais à la titine.

1.1.4.6. La dystrophine

La dystrophine est une protéine de taille importante (427kDa), localisée sous le sarcolemme et liée à ce dernier. La dystrophine est codée par un gène de 2,2 megabases comprenant 79 exons et situé sur le chromosome X (Morales and Mahajan, 2018). Composante du cytosquelette musculaire, la dystrophine s'associe en homodimère antiparallèle. A l'extrémité N-terminale, la dystrophine est liée à l'actine du cytosquelette. A l'extrémité C-terminale, elle se rapproche d'un gros complexe transmembranaire appelé le DGC (Dystrophine Glycoprotein Complex) (Figure 10).

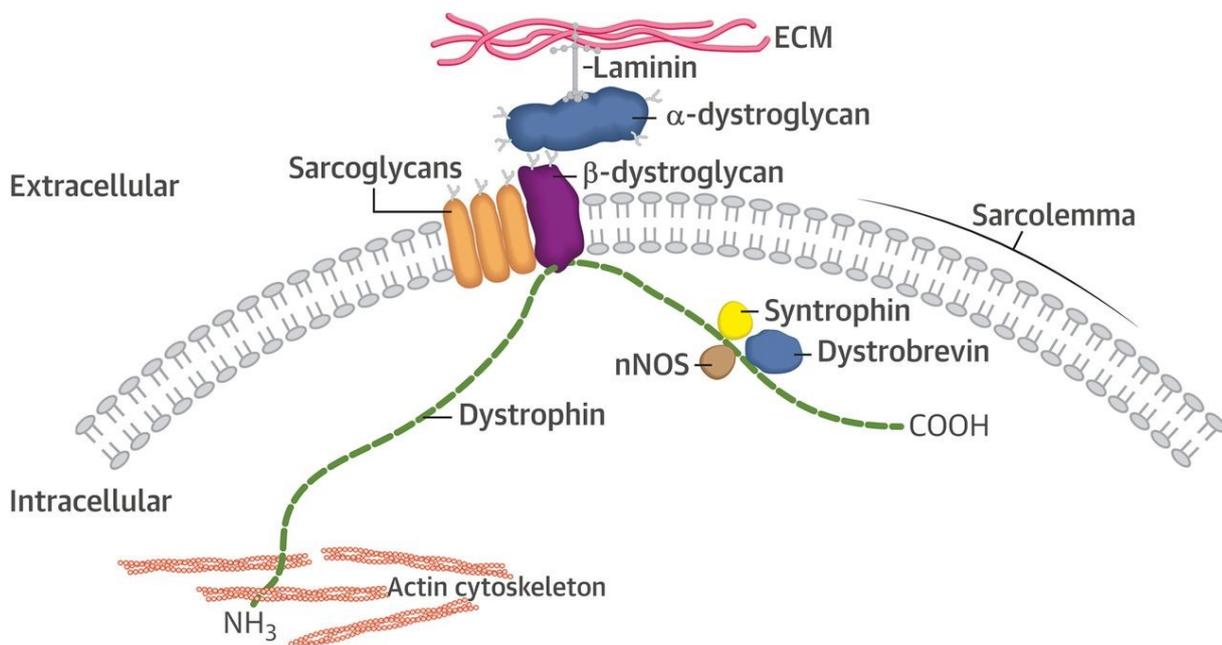


Figure 10 : Organisation du DGC (Kamdar and Garry, 2016)

Le DGC est composé des protéines suivantes :

- 2 dystroglycans α (extracellulaire) et β (transmembranaire)
- 4 sarcoglycans α , β , γ et δ
- Le sarcospane
- La syntrophine, intracellulaire
- La dystrobrevine intracellulaire
- La laminine 2, fixée aux dystroglycans et aux fibres de collagène de la matrice extracellulaire (ExtraCellular Matrix, ECM).

La dystrophine interagit avec la syntrophine et la dystrobrevine. A ce complexe s'associent des canaux ioniques, des tyrosines kinases, des Nitric-Oxide (NO) Synthase (NOS). L'interaction avec les sarcoglycans et les dystroglycans est particulièrement

importante pour assurer la résistance au stress mécanique et globalement la liaison de toute cette structure à la matrice extracellulaire. Le complexe DCG assure une continuité entre le cytosquelette d'actine et les fibres de collagène de la matrice extracellulaire.

La dystrophine est composée de 4 domaines principaux. Au niveau N-terminal, il existe un site de liaison à l'actine. Puis vient une succession de domaines R1 à R24 (de type spectrines) entrecoupés par des zones H (zones charnières).

La dystrophine maintient l'intégrité membranaire en liant les protéines du cytosquelette avec la matrice extracellulaire. Elle intervient dans la transmission de la tension entre les filaments d'actine et la matrice. Enfin, elle joue un rôle important à la jonction myotendineuse où la dystrophine est abondante, en transmettant la force des myofilaments jusqu'aux tendons.

La délétion d'exons dans le gène codant pour la dystrophine entraîne l'absence de protéine fonctionnelle à l'origine du développement de la myopathie de Duchenne (Morales and Mahajan, 2018), pathologie qui sera développée dans la section 3.1.

1.1.5. La titine

La titine est une protéine responsable de l'élasticité musculaire, également appelée la connectine. A ce titre, elle permet le maintien de l'intégrité structurale des fibres musculaires en réponse à un étirement. Souvent qualifiée comme le troisième filament d'importance après l'actine et la myosine, la titine est qualifiée de protéine « géante », comptant de 3 à 3,7 millions de Da et atteignant le μm de longueur pour 4nm de diamètre. Une protéine de titine s'étend sur toute la longueur d'un demi-sarcomère. Patron structural au cours du développement, la titine permet l'organisation précise des filaments fins et épais. A l'état adulte, elle joue un rôle de stabilisateur. La titine est également un ressort moléculaire, responsable des comportements mécaniques du muscle.

1.1.5.1. Structure de la titine

L'extrémité N-terminale (80kDa) de la titine est fixée à la strie Z. Cette structure traverse entièrement la strie Z, la titine d'un sarcomère se chevauchant avec la titine du sarcomère adjacent. Dans cette zone, la titine est considérée comme un contributeur clef de l'intégrité du sarcomère.

A la bande I, zone essentielle pour expliquer les propriétés élastiques du muscle, la structure de la titine se caractérise par le domaine N2VA qui contient beaucoup de motifs PEVK (Proline-Glutamate-Valine-Lysine), motifs qui confèrent l'élasticité à la titine.

La titine se prolonge vers la bande A, dans une structure inextensible pouvant atteindre 2 millions de Da. On y distingue deux zones ; C et D.

L'extrémité C-terminale de la titine se situe à la bande M et contient des domaines kinases et un site de phosphorylation. La titine kinase pourrait phosphoryler la myosine pour réguler la contraction musculaire. La titine favoriserait également l'organisation structurale de la bande M. Dans sa région C-terminale se trouvent des domaines sérine thréonine kinase qui implique la titine dans les voies de signalisation.

1.1.5.2. Régulation de la force musculaire par la titine

Dans un muscle, se distingue la force active due à l'actine et la myosine, de la force passive due à son élasticité (Figure 11). Lors d'un étirement musculaire, il se crée une tension passive. En premier, ce sont les domaines immunoglobulines de la titine qui s'allongent puis le domaine PEVK. L'étirement maximal, pour lequel il n'est plus possible d'allonger les PEVK s'appelle le point D.

L'élasticité du muscle squelettique se caractérise par les concepts suivants :

- Sarcomère length (SL) 0 : le muscle est au repos
- SLe (seuil d'étirement) : seuil pour lequel l'étirement du muscle ne génère ni force ni tension. Au-delà du SLe, l'étirement met en jeu la titine de la zone I.
- SLy : limite d'extensibilité du muscle. La titine de la bande A s'étire. Au-delà de SLy, la myosine peut se détruire et provoquer des déchirures musculaires.

Plus le muscle est lent, plus le point SLe est élevée, c'est-à-dire qu'il faut étirer davantage avant de générer une force.

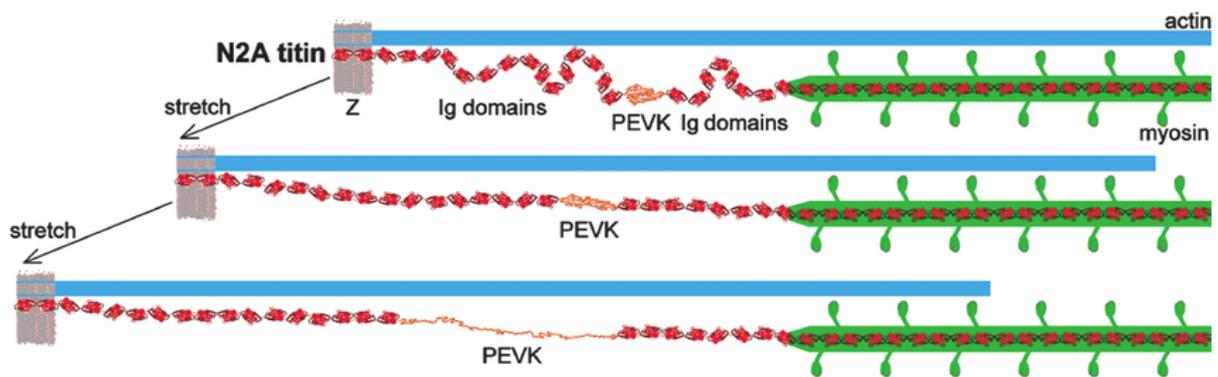


Figure 11 : Structure dynamique de la titine (Neagoe et al., 2003)

1.2. La contraction et la relaxation musculaire

En 1791, Luigi Galvani démontre qu'une stimulation électrique déclenche une contraction musculaire. La dépolarisation du sarcolemme entraîne la génération d'une énergie mécanique par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans le sarcomère. Nous détaillerons dans le paragraphe à venir les étapes qui conduisent à la contraction (Figure 12) et à la relaxation musculaire.

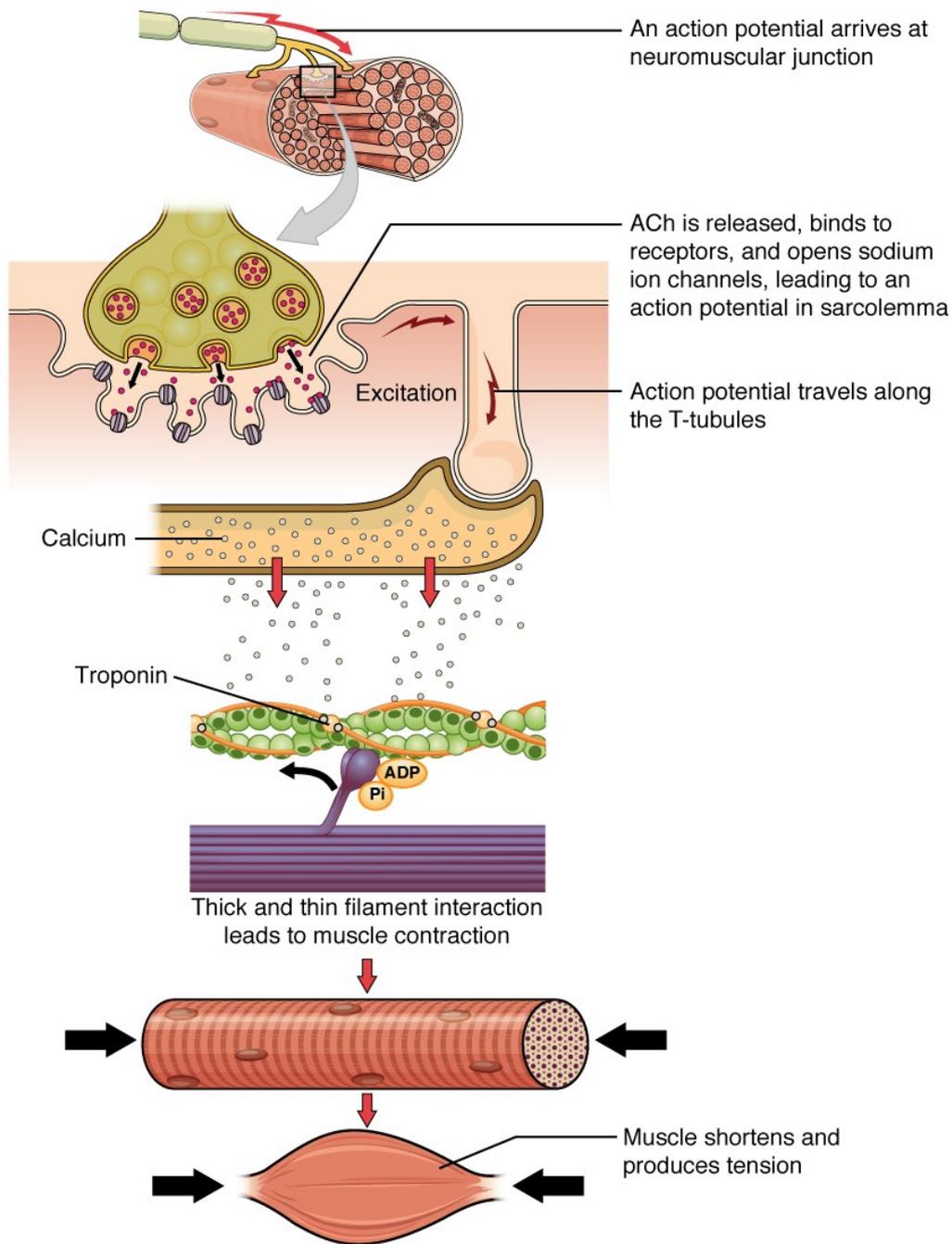


Figure 12 : Les étapes de la contraction musculaire (Openstax, Anatomy and Physiology)

1.2.1. La jonction neuromusculaire

La 1^{ère} étape se déroule au niveau de la jonction neuromusculaire. Les muscles striés squelettiques n'ont pas d'activité électrique autonome. On ne peut les dissocier des nerfs moteurs ou motoneurones qui commandent leur activité par l'intermédiaire des synapses : la jonction neuromusculaire.

La jonction neuromusculaire se compose de divers éléments : la plaque motrice, la terminaison axonale et la fente synaptique. L'arrivée d'un potentiel d'action déclenche une entrée de calcium dans la terminaison axonale. Ce courant calcique est primordial car il permet la libération des vésicules de neuromédiateur de la terminaison axonale. Les vésicules

se rapprochent de la surface de la membrane, puis procèdent à l'exocytose du neuromédiateur. Le neuromédiateur de la synapse musculaire est l'acétylcholine. L'acétylcholine se fixe sur les canaux-récepteurs post-synaptiques dits cholinergiques. Ceci entraîne une augmentation de la conductance aux cations du canal-récepteur. Le sodium passe du milieu extracellulaire vers le sarcoplasme par le canal et provoque localement un potentiel de plaque motrice.

1.2.2. Genèse et propagation du potentiel d'action musculaire

Si le potentiel de plaque motrice atteint le seuil supraliminaire, il déclenche un potentiel d'action musculaire. Ce potentiel d'action se propage le long de la membrane du sarcolemme et parvient à un tubule T, à savoir une invagination de la membrane. Grâce aux tubules T, le potentiel d'action pénètre profondément dans le muscle et est qualifié de potentiel d'action tubulaire.

1.2.3. Libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique

Le tubule T entouré de deux éléments du réticulum sarcoplasmique forme la triade. L'arrivée du potentiel d'action entraîne une libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique de sorte que la concentration intracellulaire passe de 10^{-7} à 10^{-5} mol/L. Cette différence de concentration renseigne le sarcolemme sur la nature (intensité et durée) de l'impulsion électrique reçue au niveau de la membrane.

Le sarcolemme possède des invaginations dans la fibre musculaire qui augmentent la surface d'échange avec les myofibrilles. L'intérêt est d'amener le message nerveux et donc par continuité le potentiel d'action musculaire en profondeur dans le muscle. Grâce à ce réseau tubulaire, l'excitation est globale.

1.2.3.1. Propagation du potentiel d'action dans le système tubule transverse

La fibre musculaire est une cellule excitable, contractile et élastique. Comme pour une cellule nerveuse, elle possède un potentiel de repos et génère un potentiel d'action. Calculé par l'équation de Goldman, Hodgkin et Katz, le potentiel de repos d'une cellule musculaire est d'environ -90mV. La dépolarisation (+30mV) est générée par une entrée de sodium lorsque la repolarisation est induite par la sortie de potassium.

1.2.3.2. Structure de la triade

Le réticulum sarcoplasmique comprend deux parties : le réticulum jonctionnel qui établit une apposition étroite avec le tubule T et le réticulum longitudinal en son centre. Le réticulum longitudinal, riche en pompes calciques Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) est spécialisé dans le repompage du calcium. Le réticulum jonctionnel est riche en calséquestrine et canaux calciques permettant la séquestration du calcium et sa libération vers le sarcoplasme.

De nombreuses expériences électrophysiologiques ont permis de montrer qu'il existe des interactions entre le tubule T et le réticulum sarcoplasmique. Il existe en effet un couplage direct entre deux récepteurs : le DiHydroPyridine Receptor (DHPR) sur la membrane

sarcolemmale du tubule T et le Ryanodine Receptor (RyR) sur la membrane du réticulum sarcoplasmique jonctionnel. La libération calcique du réticulum sarcoplasmique par les RyR est induite par la dépolarisation sarcolemmale *via* l'interaction avec le DHPR. Il est question de « voltage-induced calcium release » (VICR).

1.2.3.3. Le DHPR

Inhibé par la dihydropyridine, le DHPR est également appelé le canal calcique de type L $Ca_v1.1$. Dans le muscle squelettique, le DHPR a principalement un rôle de voltage senseur qui est nécessaire et suffisant pour permettre la contraction musculaire (Dayal et al., 2017). Sa fonction de canal calcique pourrait jouer un rôle de régulation. Le DHPR est organisé en tétrades. Il comprend 5 sous-unités (hétéropentamère) : $\alpha-1$, $\alpha-2$, β , γ et δ . Il s'agit d'un canal calcique de type lent. Le pore du canal est constitué par la sous-unité $\alpha-1$, elle-même organisée en 4 domaines : I, II, III et IV. Chaque domaine est composé de 6 segments transmembranaires.

Le domaine I de la sous-unité $\alpha-1$ est responsable des phénomènes d'activation et d'inactivation du canal et est régulé par la sous-unité β . Le segment S4 du domaine II est sensible au courant ou « voltage sensor ». La boucle entre les domaines II et III intervient dans le couplage excitation-contraction en transmettant l'information du DHPR au RyR. Le domaine IV contient des domaines de phosphorylation en C-terminal qui régulent l'ouverture du canal.

La sous-unité β contrôle la sélectivité ionique du canal et constitue le substrat de divers éléments régulateurs tels l'Adénosine Mono Phosphate cyclique (AMPC) ou la protéine kinase C. L'association des sous-unités $\alpha-2$ et δ est permise par des ponts disulfures, dont le rôle est de stabiliser le canal. La sous-unité γ , fortement glycosylable est une structure de régulation.

Le mouvement de charge correspond à des molécules liées au DHPR et chargées électriquement qui sous l'effet d'un potentiel vont changer de disposition, d'orientation ou de conformation. Il existe trois principes fondamentaux qui caractérisent le mouvement de charges :

- Ce mouvement de charge présente une saturation aux potentiels extrêmes puisque le nombre de particules chargées susceptibles de se déplacer est forcément limité.
- La quantité de charges transférée dans un sens correspond à la quantité de charge transférée dans l'autre sens.
- La quantité de charges est dépendante du potentiel. Le profil est sigmoïde : plus la dépolarisation est importante, plus le mouvement de charge est important. Le mouvement de charge est associé à la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique.

1.2.3.4. Le RyR

Le RyR tire son nom de sa haute affinité pour l'alkaloïde végétal ryanodine. Le RyR participe à la libération rapide du calcium dans le myoplasme. L'activité de ce canal est dépendante notamment de la concentration en calcium, en ATP et en magnésium dans le cytoplasme. Situé en face du DHPR, le RyR est un très gros récepteur constitué de 4 monomères identiques de 565 kDa chacun qui forment un canal calcique. La partie cytoplasmique du RyR, très élargie, est appelée le pied jonctionnel. C'est cette zone qui interagit avec la tétrade de DHPR. Riche en sites de phosphorylation, l'extrémité

cytoplasmique contient également de nombreux sites de liaison avec des protéines ; calmoduline, FKBP (FK506 Binding Protein) et impérotaxine mais aussi avec l'ATP, la caféine et bien sûr avec le calcium. Il existe 3 isoformes de RyR (1 à 3), RyR1 étant prédominante dans le muscle squelettique.

1.2.3.5. Interaction morphologique entre DHPR et RyR

L'interaction protéique entre ces deux récepteurs nécessite un arrangement géométrique strict. Les membranes du tubule T et du réticulum sarcoplasmique sont juxtaposées et séparées par un espace de 10nm. Ces 10nm sont occupés par les pieds jonctionnels des RyR. Les RyR sont alignés sur deux rangées (sur deux colonnes) et positionnés de manière régulière. Les tétrades de DHPR viennent s'y associer en alternance et en quinconce. Chaque RyR n'aura pas forcément une tétrade de DHPR en face de lui. Les tétrades de DHPR sont moins nombreuses que les RyR. Le rapport entre les tétrades DHPR/RyR est de 0,5-0,7 dans le muscle squelettique.

Les RyR non couplés aux tétrades de DHPR peuvent être activés par le calcium provenant de RyR couplés adjacents. La concentration de magnésium cytoplasmique est un facteur limitant à ce processus.

1.2.3.6. Les protéines de couplage du complexe DHPR-RyR

Parallèlement à l'interaction morphologique entre les deux récepteurs, il existe des protéines de couplage qui favorise cette interaction :

- La calséquestrine : elle se trouve dans la lumière du réticulum sarcoplasmique et fixe le calcium. Elle possède jusqu'à 40 sites de liaison au calcium mais avec une faible affinité. La calséquestrine forme des agrégats de manière à mobiliser une très grande quantité de calcium à un même endroit. Le domaine N-terminal de la calséquestrine est chargé positivement et interagit avec les domaines C-terminaux de la triadine et de la junctine chargés négativement.
- La triadine : il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire dont le domaine N-terminal est très court au contraire du domaine intra-réticulaire très allongé. La triadine sert de protéine d'ancrage pour la calséquestrine. Elle permet aussi l'interaction de la calséquestrine avec le RyR grâce à une séquence « KEKE ».
- La junctine : elle présente globalement la même organisation que la triadine. Comme la triadine, la junctine fixerait la calséquestrine.
- La FKBP12 : protéine de 12kDa, la FKBP12 se situe près de la zone de libération du calcium et conférerait de la stabilité au canal.

1.2.3.7. Régulation des RyR

- Agents physiologiques : Le calcium augmente la probabilité d'ouverture du canal en se fixant sur des sites de haute ou de basse affinité qui entraînent respectivement l'activation ou l'inhibition du canal. Ainsi, la forte présence de calcium dans le cytosol entraîne la fermeture du canal RyR. L'ATP accroît fortement la probabilité d'ouverture du canal en diminuant la

constante de temps de fermeture. Ainsi, le canal se ferme plus rapidement, de manière à s'activer à nouveau plus rapidement. Enfin, le magnésium entre en compétition avec le calcium pour le site d'activation calcique et produit en conséquence des effets inhibiteurs.

- L'état d'oxydoréduction : Il concerne la perte ou le gain d'un électron sur les cystéines du canal RyR. Par exemple, le monoxyde d'azote est connu pour oxyder le canal RyR, ce qui augmente son activité (Hidalgo et al., 2004).
- La phosphorylation/déphosphorylation : D'une manière générale, la phosphorylation de RyR entraîne l'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal par une action synergique. En effet, le canal phosphorylé est plus sensible aux actions activatrices du calcium et de l'ATP. La phosphorylation, phénomène réversible est dépendant de la PKA. La déphosphorylation du canal RyR est assurée par Protein Phosphatase 1 (PP1) et la Protein Phosphatase 2A (PP2A).
- Agents pharmacologiques : La caféine entraîne une stimulation importante de l'ouverture du canal. L'héparine accroît également la probabilité d'ouverture du canal. La ryanodine induit un état de semi-conductance, c'est-à-dire que le canal est ouvert de manière continue mais le passage des ions calciques est moins rapide. Les effets de la ryanodine sont dose-dépendants. En effet, des concentrations inférieures à 10 μ M activent l'ouverture du canal. *A contrario*, au-delà de 10 μ M, l'ouverture du canal RyR est inhibée. Ceci s'explique par l'existence, dans la structure du RyR, d'un site de forte affinité pour les faibles concentrations de ryanodine et d'un site de faible affinité pour les fortes concentrations. Ainsi, le domaine de faible affinité fermerait le canal RyR pour des concentrations de ryanodine supérieures à 10 μ M. Le rouge de ruthénium (RR) et l'impérotaxine inhibent l'activité du canal.
- Protéines associées au RyR : La calséquestrine est un activateur du RyR si elle est associée à la junctine et à la triadine. La liaison d'ions calciques modifie la conformation de la calséquestrine, modification structurale à l'origine de l'activation du RyR. Quand la concentration en calcium cytosolique est supérieure à 100nM, le canal est inhibé par la calmoduline. Celle-ci réduit la probabilité d'ouverture, les constantes de temps d'ouverture mais ne module pas la conductance. Enfin, la dissociation de FKBP12 du RyR1 active ce dernier. FKBP12 synchronise l'activité des RyR adjacents.

1.2.3.8. La libération de calcium par les RyR

La libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique génère des augmentations brèves de calcium localisées au niveau des RyRs appelées « sparks ». En fonction de la durée de stimulation, les sparks possèdent des variations d'amplitude et de diamètre. Il existe des sparks dépendants du potentiel, d'autres spontanés.

La libération calcique comporte deux phases. La première est de grande amplitude, très rapide et brève. La seconde phase s'étale davantage temporellement mais présente une plus faible amplitude.

Indépendamment du couplage excitation-contraction, la libération calcique du réticulum endoplasmique peut s'opérer spontanément en cas de surcharge des stocks réticulaires (Store Overload-Induced Calcium Release, SOICR) (Cully and Launikonis, 2016).

1.2.3.9. La variation transitoire de calcium

La libération du calcium sarcoplasmique engendre une augmentation très importante du calcium intracellulaire. Il correspond à l'ensemble des flux calciques provenant des RyR.

Suite à l'augmentation très rapide correspondant au pic des sparks s'observe un lent accroissement linéaire généré par la continuité des sparks. Enfin, à l'arrêt de la stimulation, la concentration calcique diminue décroît, le calcium est pompé par les pompes SERCA.

1.2.4. Levée d'inhibition par le complexe des troponines

Le calcium se fixe sur la troponine C, ce qui modifie sa structure tridimensionnelle. Et par la même, cela module la structure globale du complexe des troponines. En conséquence, le site de fixation entre l'actine et la myosine se libère.

1.2.5. La contraction musculaire

Nous assistons à la formation de ponts entre l'actine et la myosine. S'en suit le principe des filaments glissants : la myosine se fixe à l'actine et par son bras déplace le filament fin (Figure 13). Ainsi de suite, via les décrochages et accrochages successifs, l'actine et la myosine coulissent l'une par rapport à l'autre, raccourcissant le sarcomère. Ce mouvement répété est connu sous le nom de cycle cross-bridge. Cette étape nécessite la conversion de l'énergie chimique sous forme d'ATP en une énergie mécanique : la force musculaire. La force développée est proportionnelle au nombre de ponts structuraux entre l'actine et la myosine (Huxley, 1966).

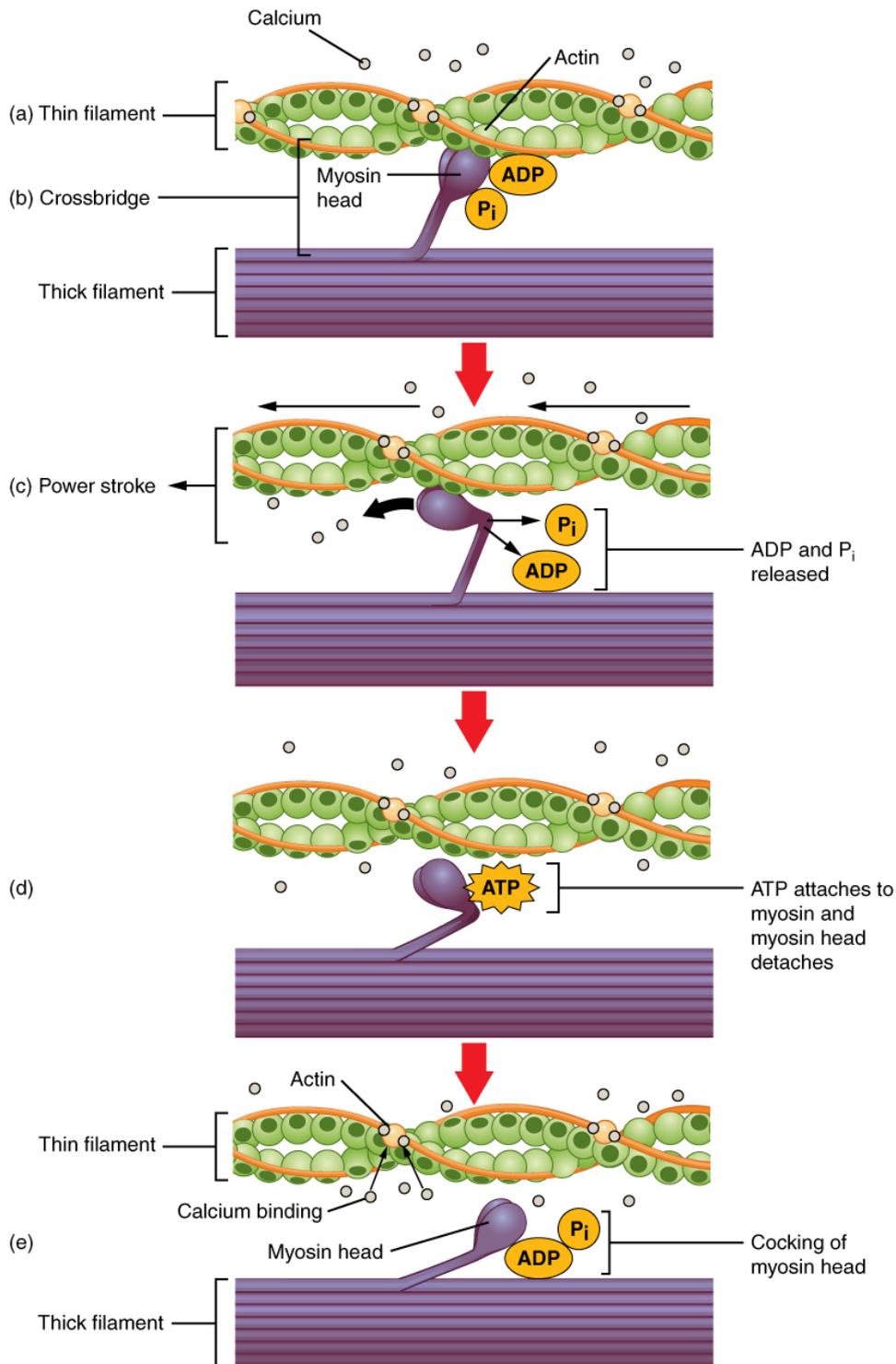


Figure 13 : La contraction musculaire au niveau moléculaire (Openstax, Anatomy and Physiology)

(a) Le site actif de l'actine est exposé car le calcium se lie à la troponine.

(b) La tête de myosine est attirée par l'actine et s'y fixe formant le pont transversal.

(c) Le cou de la myosine pivote alors vers le centre du sarcomère puis l'ADP et le groupement phosphate sont libérés.

(d) Une nouvelle molécule d'ATP se fixe à la tête myosine, ce qui provoque le détachement du pont transversal.

(e) La tête de myosine hydrolyse l'ATP en Adénosine DiPhosphate (ADP) et en groupement phosphate ; la myosine est prête pour le mouvement suivant.

Tant que l'ATP est disponible, il se lie facilement à la myosine, le cycle cross-bridge se reproduit et la contraction musculaire se poursuit.

1.2.6. Le relâchement musculaire

Lorsque la stimulation du motoneurone s'arrête, la dépolarisation s'interrompt ce qui met fin au couplage DHPR-RyR et entraîne la fermeture des canaux RyR. Le calcium est repompé par le réticulum sarcoplasmique grâce à la pompe SERCA. Le calcium se détache de la troponine C entraînant la séparation de l'actine et de la myosine (Figure 14).

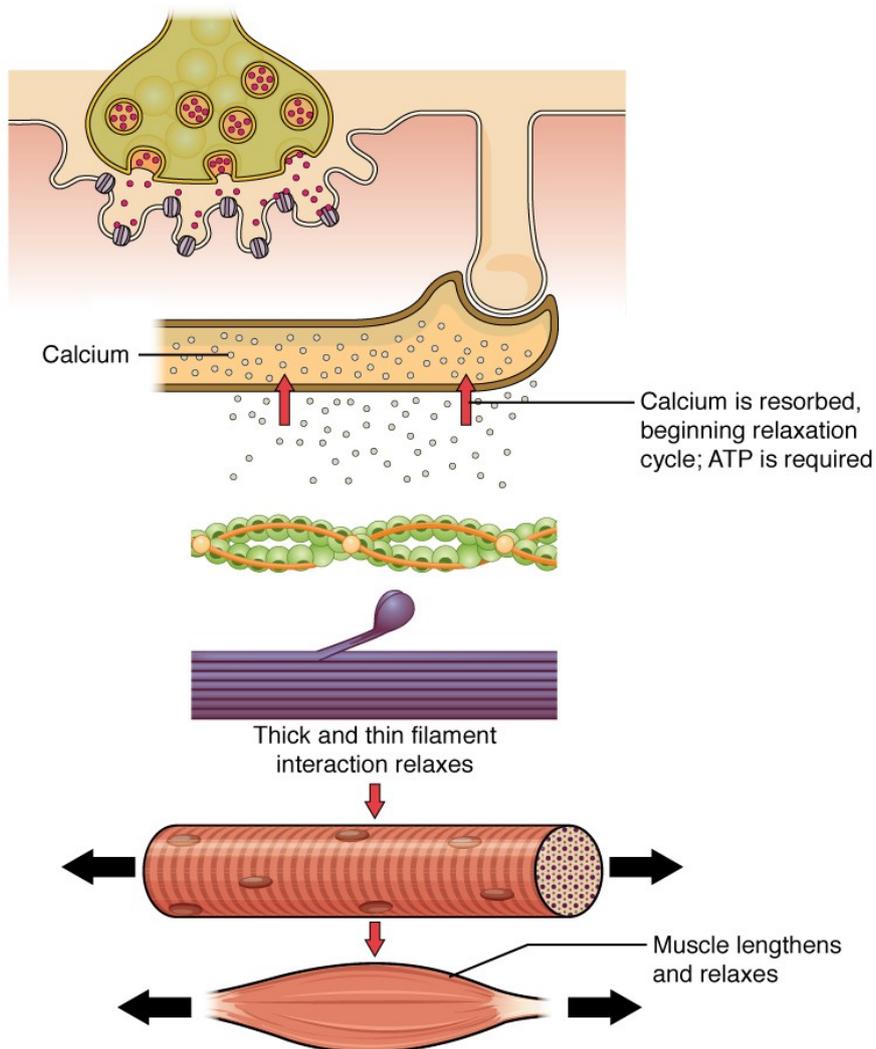


Figure 14 : Les étapes de la relaxation musculaire (Openstax, Anatomy and Physiology)

1.2.6.1. La pompe calcique SERCA

Protéine de 110kDa, la pompe SERCA permet l'entrée de 2 ions calciques dans la lumière réticulaire par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Sacchetto et al., 2012). Le mécanisme de transport s'explique par la succession de 2 stades conformationnels : E1 et E2. La conformation E1 qui présente une forte affinité pour le calcium, lie le calcium cytosolique. Puis la conformation E2, de faible affinité pour le calcium, libère l'ion dans la lumière du réticulum sarcoplasmique (De Meis and Hasselbach, 1971). La pompe SERCA fonctionne de manière permanente mais son activité est bien inférieure à la capacité de libération calcique du canal RyR.

La protéine SERCA se compose de trois domaines cytoplasmiques, appelés A, N et P, et d'un domaine M, qui comprend les hélices transmembranaires et les courtes boucles luminales (Figure 15). Le domaine A est appelé le domaine de régulation des ions calciques. Le domaine N contient le site de liaison au nucléotide. Le domaine P comprend le résidu acide aspartique 351 (Asp351, D351), qui est phosphorylé pendant le cycle de réaction. Le nucléotide se lie entre les domaines N et P, de telle sorte que son phosphate- γ est proche d'Asp351. Les deux sites de liaison au calcium sont situés dans les hélices α M4, M5, M6 et M8 du domaine M. Les trois domaines cytoplasmiques subissent un réarrangement important suite à la phosphorylation de l'aspartate, un événement clef de la libération du calcium dans le lumen (Autry et al., 2012).

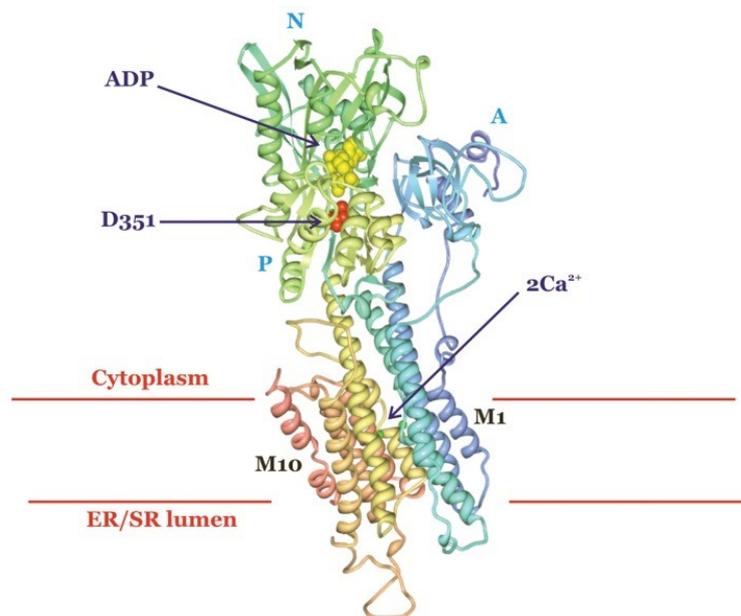


Figure 15 : Structure cristallographique de SERCA (Watson, 2015)

Il existe une dizaine d'isoformes de SERCA. SERCA1a est la forme adulte restreinte aux muscles squelettiques rapides et lents. La forme SERCA2a est également retrouvée dans les muscles squelettiques lents et dans le muscle cardiaque (Bravo et al., 2013). Une surexpression de SERCA1 restreinte au muscle squelettique augmente l'activité de capture calcique microsomale par SERCA ce qui a pour conséquence la diminution de la quantité calcique cytosolique et la potentialisation de la libération calcique en réponse à une stimulation électrique (Goonasekera et al., 2011).

1.2.6.2. Régulation de l'activité de SERCA

L'activité de SERCA est modulée par une famille de micro-peptides inhibiteurs ; phospholamban (PLN), myoréguline (MLN), sarcolipine (SLN), endoréguline (ELN), another-réguline (ALN), spécifiques du tissu étudié (Anderson et al., 2016) ou augmentateur tel le micropeptide dwarf open reading frame (DWORF) (Nelson et al., 2016) (Figure 16).

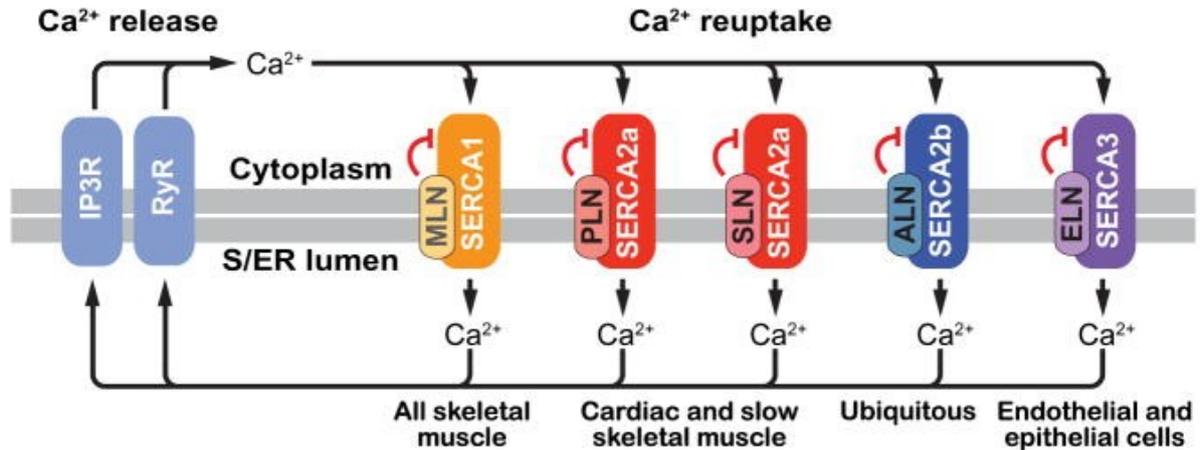


Figure 16 : La famille de modulateurs de l'activité de SERCA (Anderson et al., 2016)

En 2015, les recherches menées par l'équipe d'Anderson identifient la myoréguline comme l'inhibiteur principal et presque exclusif de SERCA dans le muscle squelettique adulte sain (Anderson et al., 2015). De manière intéressante, les stades fœtaux voient la co-expression de la myoréguline et de la sarcolipine, l'inhibiteur de SERCA2 dans le muscle cardiaque adulte (Anderson et al., 2015). La myoréguline était auparavant décrite comme un long Acide RiboNucléique (ARN) non codant (long non codant RNA, lncRNA) sous le nom de LINC00948 chez l'Homme et AK009351 chez la souris. La myoréguline est un micropeptide de 46 acides aminés codée par un gène de 3 exons sur le chromosome 10 (Anderson et al., 2015) (Figure 17). La protéine résultante consiste en une hélice α transmembranaire de type II à passage unique, dans laquelle les 19 résidus d'acides aminés N-terminaux sont exposés au cytosol et les 3 résidus C-terminaux sont situés dans la lumière du réticulum endoplasmique. Les résidus N-terminaux (5-10) se conforment en une petite feuille β et la moitié C-terminale de la protéine contient l'hélice α transmembranaire (Anderson et al., 2015). Il existe un motif hydrophobe (résidus leucine 29, phénylalanine 30 et 33) au sein de l'hélice transmembranaire de la myoréguline qui forme la face d'interaction avec les hélices M2, M6 et M9 de SERCA dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (Anderson et al., 2015) (Figure 18).

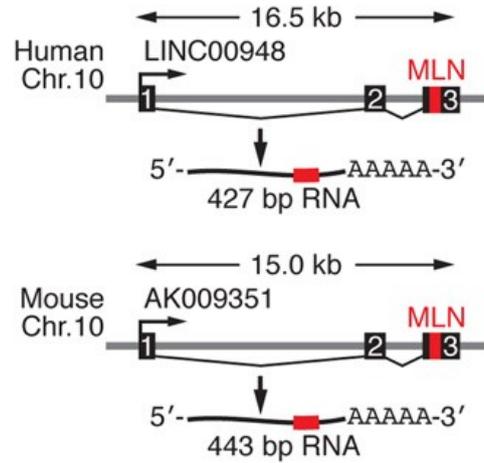


Figure 17 : Structure du gène de la myoréguline (Anderson et al., 2015)

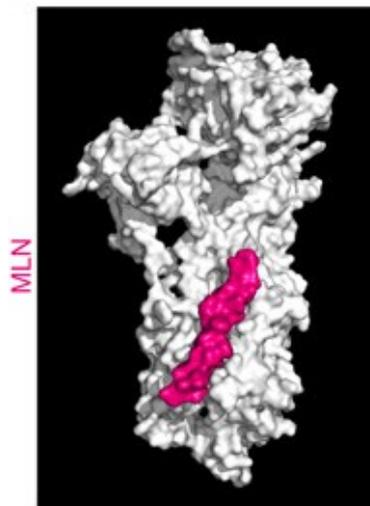


Figure 18 : Interaction de la myoréguline avec SERCA (Anderson et al., 2015)

La myoréguline présente une fonctionnalité essentielle dans la régulation de l'homéostasie calcique et contractile du muscle squelettique. En effet, la surexpression de la myoréguline entraîne une diminution significative de la recapture calcique réticulaire par SERCA (Anderson et al., 2015). De plus, l'inactivation génique de la myoréguline chez la souris provoque une augmentation du contenu calcique cytosolique de myoblastes issus des muscles des membres postérieurs et des performances physiques améliorées (+31% en durée et +55% en distance parcourue sur un tapis roulant) par rapport aux souris contrôles (Anderson et al., 2015).

1.2.7. Le retour à l'état initial

Libérée des ions calcium, la troponine C et plus largement le complexe des troponines reprend sa conformation d'origine. La troponine I inhibe à nouveau le site de fixation de la myosine sur l'actine. Dès lors, le muscle est en attente d'un nouvel ordre de contraction.

1.3. Types de fibres et métabolismes musculaires

1.3.1. Fibres lentes et fibres rapides

Les muscles squelettiques présentent des caractéristiques de force et d'endurance différentes selon leur emplacement anatomique et leur fonction. Cette spécialisation s'explique par l'hétérogénéité métabolique, contractile et d'homéostasie calcique des fibres musculaires qui composent les muscles squelettiques.

Le système de classification actuellement dominant pour les muscles squelettiques des mammifères est basé sur les isoformes de la chaîne lourde de myosine. Les principaux types de fibres sont de type I, IIa, IIx et IIb. Les muscles des rongeurs expriment les quatre types de MHC, alors que le MHC IIb n'est pas exprimé dans les muscles humains. L'isoforme I est la plus lente, le type IIa intermédiaire et IIx/b le plus rapide. En plus du MHC, l'expression des isoformes de nombreuses autres protéines diffère selon les fibres musculaires. Il existe un modèle de co-expression des gènes pour certaines isoformes de protéines, c'est-à-dire que le MHC lent de type I est co-exprimé avec les isoformes "lents" d'autres protéines, même si le processus moléculaire est généralement plus complexe (Spangenburg and Booth, 2003) (Tableau 1).

		Isoformes lentes	Isoformes rapides
MHC		MHC1 α	MHCIIa, MHCIIx/d, MHCIIb
MLC	ELC	MLC1s	MLC1f, MLC3f
	RLC	MLC2s	MLC2f
Actine		α -squelettique	
Tropomyosine		$\alpha/\beta=1$	$\alpha/\beta=4$
Troponine T		TnT1s, TnT2s	TnT1f, TnT2f, TnT3f, TnT4f, TnT5f, TnT6f
Troponine C		TnC _s	TnC _f
Troponine I		TnI _s	TnI _f

Tableau 1 : Isoformes des protéines musculaires

1.3.2. Le métabolisme musculaire

1.3.2.1. Sensibilité à l'insuline du muscle squelettique

Le muscle squelettique est l'un des organes les plus importants dans le contrôle de l'homéostasie du glucose. En effet, le muscle squelettique représente 30% du poids corporel total et on estime que près de 80% du glucose au cours de clamps hyperinsulinémiques euglycémiques est absorbé par le muscle squelettique (Thiebaud et al., 1982)

En situation physiologique, l'insuline produite par les cellules β -pancréatiques en réponse à l'hyperglycémie postprandiale est sécrétée dans le sang et se lie dans les tissus cibles au récepteur de l'insuline (Insulin Receptor, IR) (Figure 19). Les changements de conformation du récepteur conduisent à l'autophosphorylation de ses sous-unités intracellulaires sur les acides aminés tyrosines. Par conséquent, les substrats des récepteurs de l'insuline (Insulin Receptor Substrate, IRS) sont phosphorylés sur les résidus de tyrosine, ce qui permet à l'IRS d'interagir avec la PI3K par son domaine de liaison Src Homology 2 (SH2). La PI3K convertit le PIP2 en PhosphatidylInositol triPhosphate (PIP3). La formation de PIP3 permet le recrutement de la PKB, aussi appelée Akt, dans la membrane plasmique. Pour être pleinement activé, Akt est ensuite phosphorylé sur la sérine 473 par le rictor-mammalian

Target Of Rapamycin (mTOR) (Sarbassov et al., 2005), ce qui facilite la phosphorylation de la thréonine 308 par la Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 (PDK1) (Alessi et al., 1997).

Après sa translocation dans le cytoplasme, Akt phosphoryle plusieurs substrats, mobilisant les GLUcose Transporters 4 (GLUT4) à la membrane plasmique, augmentant ainsi la capacité d'absorption du glucose. Akt augmente également la glycolyse et la production de glycogène par phosphorylation et inhibition de la Glycogène Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), ce qui favorise l'activité de la Glycogène Synthase (GS) (Samuel and Shulman, 2016).

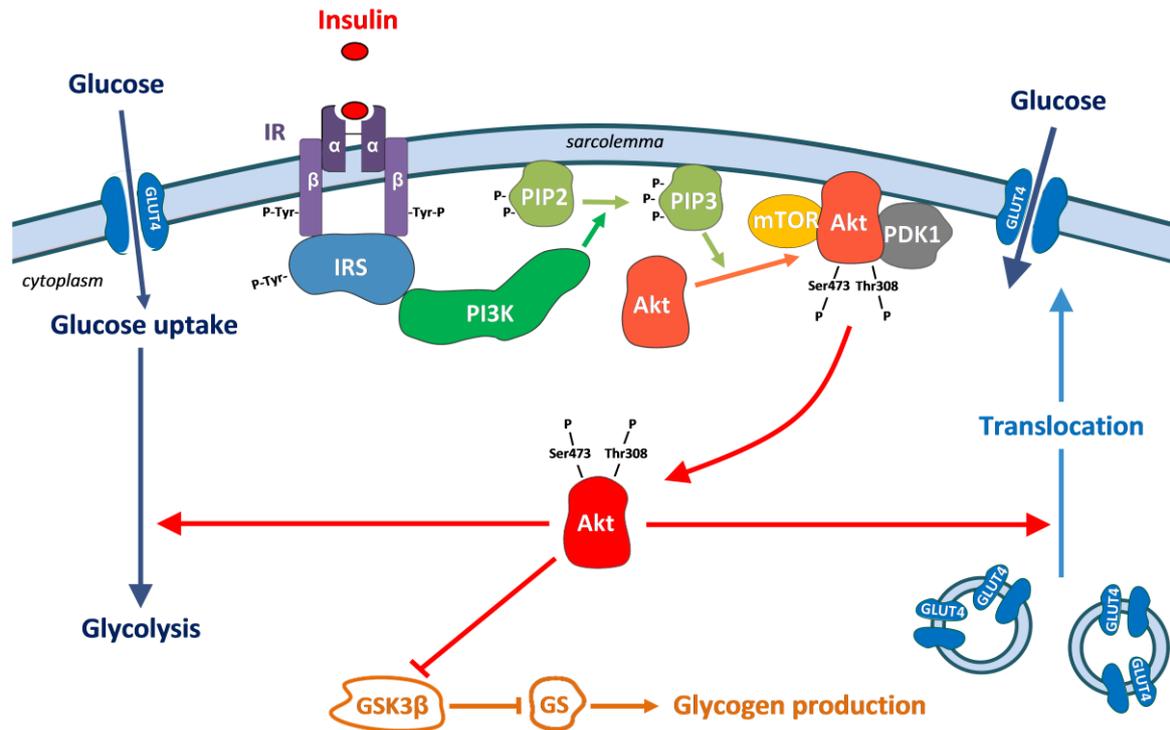


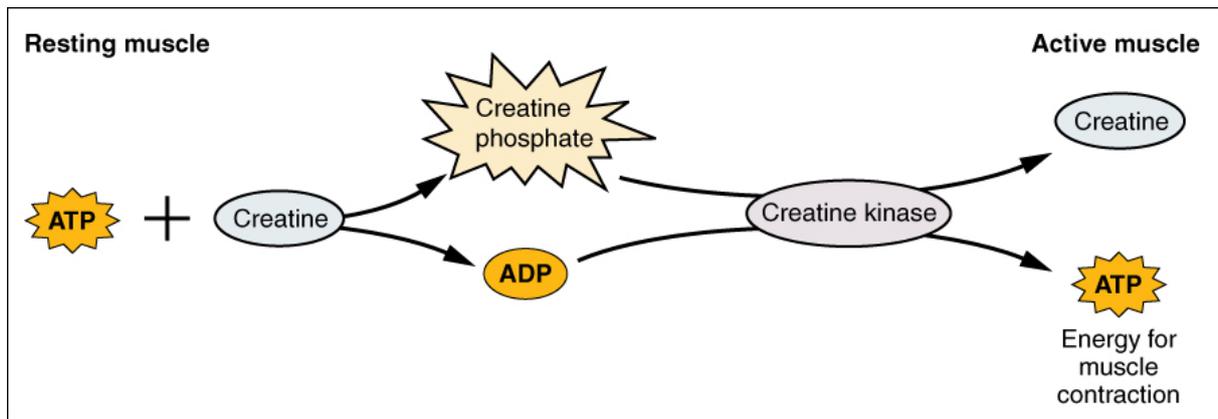
Figure 19 : Voie de signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique (Boulinguez et al., 2017)

L'homéostasie calcique du muscle squelettique et sa sensibilité à l'insuline sont des phénomènes intriqués. En effet, SERCA1 interagit physiquement avec les IRS1 et 2 dans le muscle quadriceps de rats Sprague-Dawley mâles (Algenstaedt et al., 1997). Une stimulation à l'insuline accroît ces interactions (Algenstaedt et al., 1997).

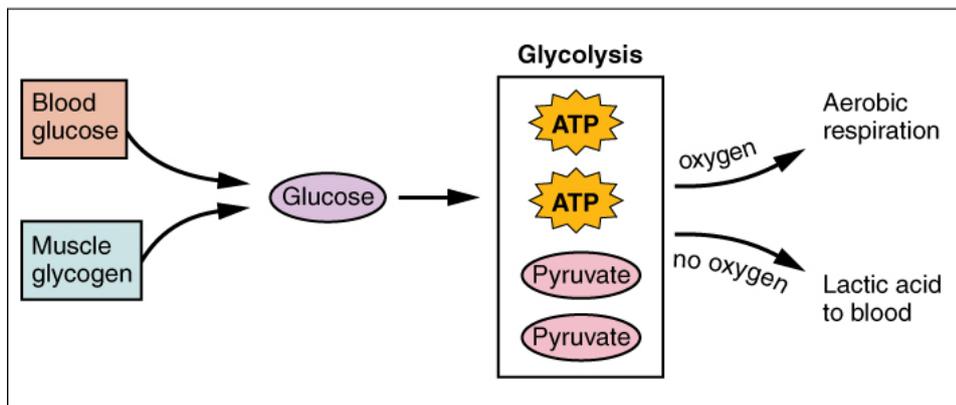
1.3.2.2. Sources d'énergie

Lors de la contraction, l'énergie est principalement consommée par les moteurs moléculaires (têtes myosiniques) et par les transporteurs ioniques et notamment SERCA. La source d'énergie immédiate pendant la contraction musculaire est l'ATP. Le stock intracellulaire d'ATP est petit (5-6 mM) et nécessite l'activation de voies métaboliques pour synthétiser de nouvelles molécules d'ATP (Figure 20). Elles se divisent en voies anaérobies et aérobie. Les voies anaérobies font intervenir la dégradation de la phosphocréatine et la dégradation du glycogène et du glucose par la glycogénolyse et la glycolyse, respectivement. Elles sont plus rapides et donc dominantes lors d'une activité physique de haute intensité de courte durée. Les voies aérobie mettent en jeu la phosphorylation oxydative de la chaîne

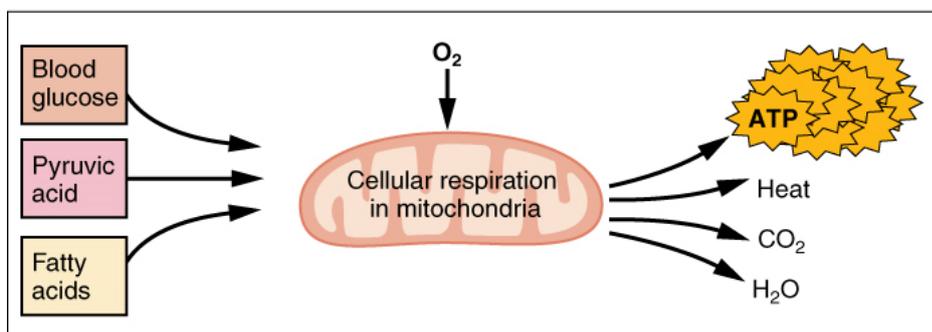
respiratoire mitochondriale à partir des produits du cycle de Krebs et s'activent lors d'un exercice prolongé peu intense.



(a)



(b)



(c)

Figure 20 : Les différents métabolismes du muscle squelettique (Openstax, Anatomy and Physiology)

Les muscles squelettiques sont composés de fibres musculaires présentant des différences marquées dans leur profil métabolique, allant de fibres lentes, économes en énergie et hautement oxydantes, optimisées pour des activités de faible intensité prolongées, à des fibres rapides et très énergivores qui dépendent principalement du métabolisme anaérobie

et sont adaptées aux mouvements explosifs courts. Les principales caractéristiques des fibres sont recensées dans le tableau 2.

	Fibres lentes oxydatives	Fibres intermédiaires	Fibres rapides glycolytiques
Structure			
Diamètre des fibres	Petit	Intermédiaire	Large
Contenu mitochondrial	Elevé	Elevé	Faible
Contenu en myoglobine	Elevé	Elevé	Faible
Réseau de capillaires	Etendu	Etendu	Restreint
Fonction			
Capacité et processus de génération de l'ATP	Elevée Respiration mitochondriale	Intermédiaire Glycolyse/respiration mitochondriale	Faible Glycolyse
Taux d'hydrolyse de l'ATP par la myosine kinase	Faible	Elevé	Elevé
Rapidité de contraction	Faible	Elevée	Elevée
Résistance à la fatigue	Elevée	Intermédiaire	Faible
Contenu en créatine kinase	Faible	Intermédiaire	Elevé
Stocks de glycogène	Faibles	Intermédiaires	Elevés
Localisation corporelle	Muscles posturaux	Muscles des jambes	Muscles des bras
Fonctions primaires	Maintien de la posture et activités aérobies d'endurance	Marche, sprint	Mouvements rapides et intenses de courte durée

Tableau 2 : Caractéristiques des différents types de fibres musculaires

1.4. Maintien de l'homéostasie tissulaire

1.4.1. La cellule satellite

Identifiée en 1961 par Alexander Mauro (Mauro, 1961), la cellule satellite est une cellule souche musculaire qui tire son nom de sa localisation périphérique dans la fibre musculaire. En effet, la cellule satellite se situe entre la lame basale et le sarcolemme de la fibre musculaire. Présentes dans le muscle squelettique adulte, les cellules satellites sont le reliquat d'un pool de cellules progénitrices responsables de la croissance musculaire au cours du développement du muscle squelettique. Les estimations portent entre 10 et 20 milliards le nombre de cellules satellites musculaires chez l'adulte humain (Morgan and Partridge, 2003). Les cellules satellites se trouvent dans un environnement spécifique nommé « niche » qui permet le maintien de l'état de quiescence (phase G0 du cycle cellulaire). Les cellules satellites se situent majoritairement dans un environnement péri-synaptique et péri-capillaire et sont sous l'influence des cellules interstitielles environnantes, de la matrice extracellulaire et des signaux moléculaires proximaux et lointains (pour revue (Yin et al., 2013)).

L'état de quiescence des cellules satellites se caractérise par l'expression de facteurs spécifiques : le facteur de transcription PAired boX 7 (Pax7) (Seale et al., 2000), la M-cadhérine, une protéine d'adhésion cellulaire dépendante du calcium (Irintchev et al., 1994), c-met, le récepteur aux facteurs de croissance hépatique (Hepatic Growth Factor, HGF) (Cornelison and Wold, 1997) et le Myocyte Nuclear Factor (MNF) (Garry et al., 2000).

1.4.2. Activation des cellules satellites et régénération musculaire

Les cellules satellites assurent une fonction essentielle de régénération musculaire. L'activation des cellules satellites se produit à la suite d'une blessure musculaire sous l'influence de signaux provenant des fibres endommagées ou du système immunitaire via les macrophages.

Une fois activées, les cellules satellites entrent dans le cycle cellulaire, prolifèrent et s'orientent vers deux destinées opposées mais complémentaires : (i) le retour en quiescence afin de permettre le renouvellement du pool physiologique de cellules satellites musculaires, (ii) l'entrée dans le programme myogénique qui entrainera leur différenciation et leur fusion avec les fibres préexistantes pour remplacer les fibres musculaires détruites (Figure 21).

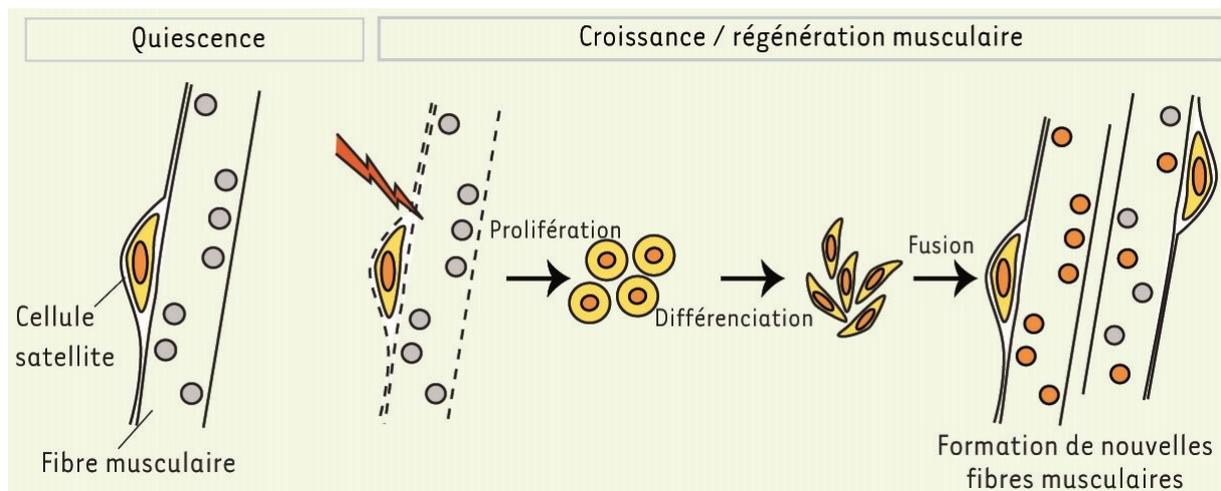


Figure 21 : Déroulement de la régénération musculaire (Mayeuf and Relaix, 2011)

La dualité de destin est engendrée par la première division asymétrique de la cellule satellite (Gurevich et al., 2016). L'activation et la différenciation des cellules musculaires se caractérisent par l'expression intermittente de facteurs myogéniques spécifiques. En particulier, les premières heures suivant la blessure voit apparaître l'expression de Myogenic factor 5 (Myf5) et de Myogenic Differentiation 1 (MyoD) (Cooper et al., 1999). Le ratio d'expression Pax7/MyoD semble devoir déterminer le devenir de la cellule satellite activé (Olguin et al., 2007). Le ratio élevé maintient l'état de quiescence, l'intermédiaire permet la prolifération, le faible engendre la différenciation. Au stade terminal de la différenciation, s'expriment entre autres les facteurs Myogénine (MyoG), Myocyte enhancer factor-2 (Mef2) et Myf6 (Cornelison and Wold, 1997) (Cornelison et al., 2000).

En parallèle se déroule l'élimination du matériel musculaire endommagé par les macrophages M1 (Rigamonti et al., 2014). L'empreinte de la fibre détruite reste présente et sert de patron à la régénération par les cellules satellites. Du fait de la fusion des cellules satellites, les fibres régénérées se caractérisent par une localisation centrale des noyaux. La migration des noyaux s'opère progressivement chez l'humain mais pas chez la souris. Chez la souris, le processus de régénération musculaire dure 3 semaines. Chez l'humain, le processus nécessite au moins 30 jours (Mackey and Kjaer, 2017)

Nous nous pencherons sur l'importance de la signalisation de la réponse aux protéines mal-conformées dans l'activation de la cellule satellite dans la section 2.8.3.

2. FONCTIONS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite impliqué dans de nombreux processus tels que l'homéostasie du calcium, la conformation des protéines de la voie sécrétoire et de certaines protéines résidentes du réticulum endoplasmique, le métabolisme lipidique et l'apoptose.

2.1. Structure du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est un compartiment cytosolique de la cellule dont la membrane s'inscrit dans la continuité de l'enveloppe nucléaire. D'après sa structure, le réticulum endoplasmique est classiquement subdivisé en réticulum endoplasmique rugueux ribosomique et réticulum endoplasmique lisse (English et al., 2009). Les cellules qui sécrètent de grandes quantités de protéines sont riches en réticulum endoplasmique rugueux, tandis que les cellules musculaires ont un réticulum endoplasmique lisse abondant. Dans de nombreuses cellules, les réticulum endoplasmiques rugueux et lisse n'occupent pas de régions ségréguées sur le plan spatial. La morphologie du réticulum endoplasmique lisse diffère de celle du réticulum endoplasmique rugueux par son réseau tubulaire typiquement plus complexe, avec un plus grand nombre de points de branchement. Une classification contemporaine divise le réticulum endoplasmique en trois domaines : l'enveloppe nucléaire, les feuilletts rugueux et le réseau tubulaire (Shibata et al., 2006).

Dans le muscle squelettique, le réticulum endoplasmique lisse est appelé réticulum sarcoplasmique et est spécialisée dans l'homéostasie calcique lors du couplage excitation-contraction, permettant la contraction musculaire (cf. section 1.2.).

2.2. Dynamique du réticulum endoplasmique

La structure tubulaire du réticulum endoplasmique est hautement dynamique et subit un remodelage morphologique constant. Le cytosquelette joue un rôle crucial dans l'organisation et la structure du réticulum endoplasmique, en particulier les microtubules (Terasaki et al., 1986). Le traitement avec des agents dépolymérisants des microtubules modifie la forme du réticulum endoplasmique en provoquant une rétraction lente de la périphérie vers le centre de la cellule. Il existe deux mécanismes différents d'allongement des tubules réticulaires le long des microtubules. Le premier, le Tip Attachment Complex (TAC), implique Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1), une protéine membranaire principalement réticulaire qui interagit directement avec End Binding 1 (EB1), une protéine qui se lie à l'extrémité positive du filament de microtubule (Grigoriev et al., 2008). Dans le mécanisme des TAC, la membrane réticulaire se fixe sélectivement à l'extrémité croissante d'un microtubule dans les régions de forte densité de réseau réticulaire et d'abondance en extrémités microtubulaires positives. Le TAC permet l'étirement des tubules réticulaires en fonction de la croissance des microtubules. Le second mécanisme, dit coulissant, implique que l'extrémité des tubules réticulaires se lie à un axe microtubulaire existant, formant une attache coulissante qui se déplace vers l'extrémité positive du microtubule (Waterman-Storer and Salmon, 1998). Ce second mécanisme est plus fréquent et rapide que le TAC et se déroule principalement dans les microtubules contenant de la α -tubuline acétylée (Friedman et al., 2010).

Les tubules réticulaires sont capables de processus de fusion et de fission, fondamentaux pour la formation du réseau réticulé (Anderson and Hetzer, 2007). Les protéines Guanosine TriPhosphate (GTP)ases atlastines interagissent avec différentes protéines réticulaires pour joindre et fusionner deux éléments de réticulum endoplasmique (Hu et al., 2009)

2.3.Synthèse de céramides *de novo*

Les céramides sont des sphingolipides appartenant à la famille générale des phospholipides. Ils sont composés d'un acide gras et d'une sphingosine liés par une liaison amide. Bien qu'ils ne soient pas des constituants de la membrane plasmique, les céramides participent indirectement à l'homéostasie de la membrane plasmique comme précurseurs des sphingomyélines, une classe importante de phospholipides de la membrane plasmique. De plus, les céramides sont des médiateurs lipidiques majeurs qui modulent le cycle cellulaire et favorisent l'apoptose (Chalfant and Del Poeta, 2010).

Deux voies de synthèse distinctes mènent à la formation de céramides. La première consiste à transformer la sphingomyéline localisée dans la membrane en céramide par l'action des sphingomyélinases, qui sont situées au niveau de la membrane plasmique ou dans les compartiments endosome/lysosome (Chalfant and Del Poeta, 2010). La seconde est appelée la biosynthèse de céramides *de novo* et s'initie dans le réticulum endoplasmique (Figure 22). La biosynthèse *de novo* est initiée par l'association de la palmitoyl-CoenzymeA (palmitoyl-CoA) et de la sérine en 3-cétosphinganine par la sérine palmitoylTransférase (SPT). Ensuite, la 3-cétoSphinganine réductase (KSR) convertit la 3-cétoSphinganine en sphinganine, qui est acylé par la Ceramide Synthase (CerS) pour produire du DiHydroCéramide (DHCer). Enfin, la DHCer DESaturase (DES) transforme la DHCer en céramide (Figure). Dans des conditions physiologiques, le céramide nouvellement formé est ensuite transloqué par la protéine de transfert du céramide vers l'appareil de Golgi, où il est transformé par la sphingomyélinase en sphingomyéline, un composant de la membrane plasmique. Ainsi, la biosynthèse *de novo* de céramides permet la régénération et l'expansion de la membrane cellulaire (Chalfant and Del Poeta, 2010).

Les enzymes de la biosynthèse de céramides *de novo* sont réunies uniquement au sein du réticulum endoplasmique (Hirschberg et al., 1993).

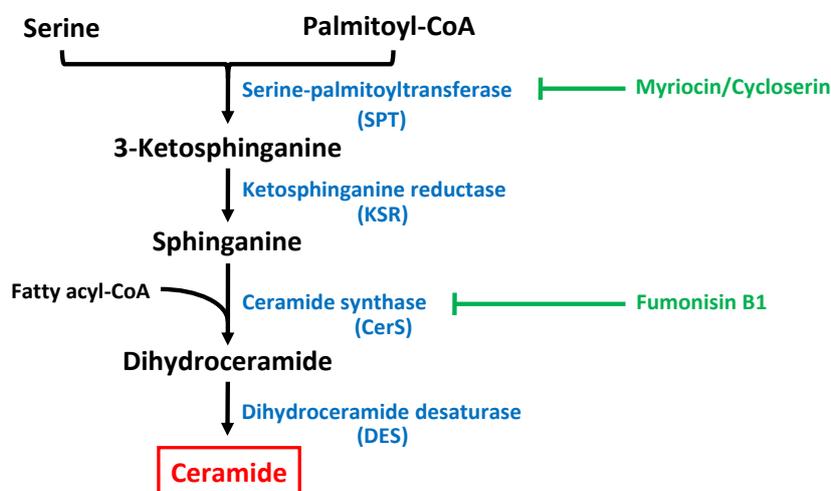


Figure 22 : Voie de synthèse des céramides *de novo* (Boulinguez et al., 2017)

2.4. Translocation cotraductionnelle

Les protéines résidentes du réticulum endoplasmique, destinées à d'autres organites ou de la voie sécrétoire transitent par le réticulum endoplasmique. Les polypeptides nouvellement synthétisés concernés possèdent une séquence riche en acides aminés hydrophobes en position N-terminale qui permet l'adressage au réticulum endoplasmique (Figure 23). Cette séquence est reconnue par le Signal Recognition Particle (SRP), un groupement de six polypeptides liés à un petit ARN circulant du cytosol. Le complexe SRP-ribosome transloque du cytoplasme à la membrane du réticulum endoplasmique rugueux et se lie au récepteur du SRP (Corsi and Schekman, 1996). Le SRP et son récepteur sont alors libérés et le polypeptide naissant est amené dans la lumière du réticulum endoplasmique par le complexe translocon (Nikonov and Kreibich, 2003), dont l'élément principal est Sec61. Sec61 est un complexe formé de trois sous-unités : Sec61 α , Sec61 β et Sec61 γ . Ce complexe possède des sites de liaison ribosomique et sa structure forme un pore à travers lequel le polypeptide traverse la membrane et entre dans la lumière du réticulum endoplasmique. Le processus est connu sous le nom de translocation ou insertion cotraductionnelle (Wu et al., 2018).

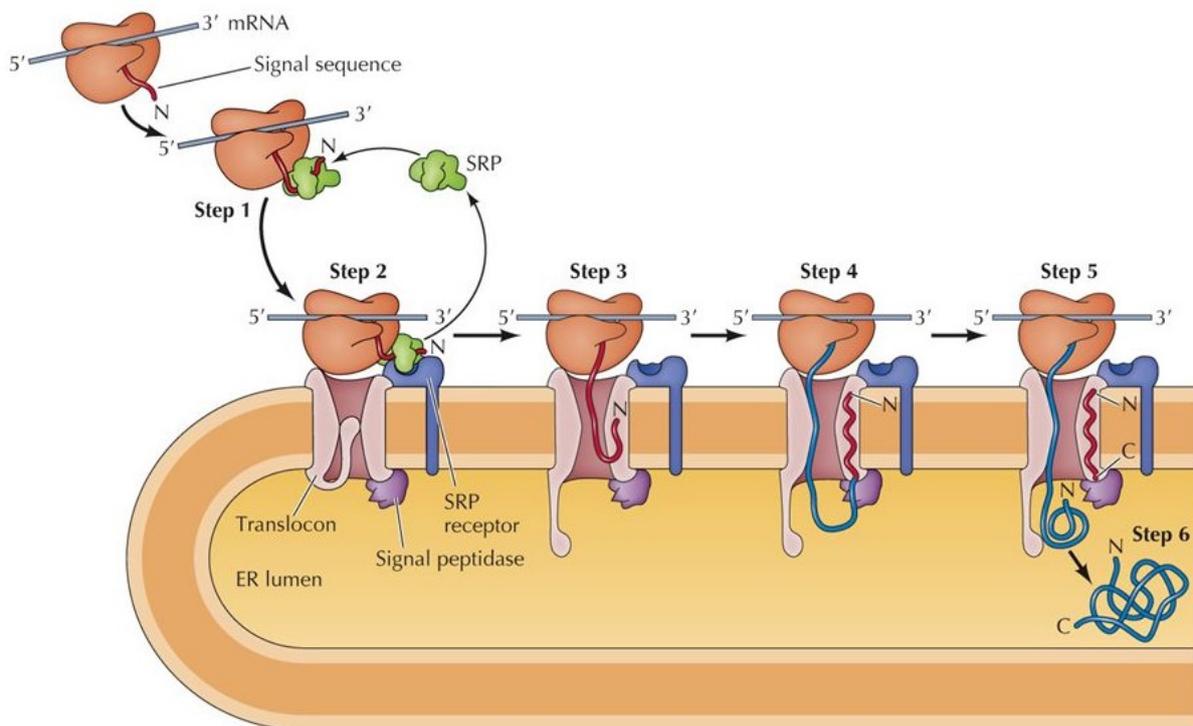


Figure 23 : Déroulement de la translocation cotraductionnelle (Cell and Molecular Biology, 7th Edition, chapter 11.7, Gerald Karp)

2.5. Conformation des protéines

Suite à la translocation cotraductionnelle, le réticulum endoplasmique assure la bonne conformation et le bon assemblage du polypeptide naissant. Pour ce faire, le réticulum endoplasmique contient une variété de protéines qui contribuent au processus. La protéine disulfure isomérase (PDI) et ERp57, par exemple, sont des thio-oxydoréductases qui catalysent la formation de liaisons disulfure au moyen de la capacité oxydante fournie par la Endoplasmic Reticulum Oxydoreduction 1 (ERO1). La protéine chaperonne Glucose-Related

Peptide 78 (GRP78) *alias* Binding immunoglobulin Protein (BiP) ou Heat Shock Protein A5 (HSPA5), reconnaît et stabilise les protéines non repliées et participe à la translocation post-traductionnelle (Ni and Lee, 2007). BiP se compose d'un domaine de liaison aux peptides en position N-terminale lié de manière flexible à un domaine de liaison aux nucléotides en position C-terminale doté d'une fonction ATPase (Wisniewska et al., 2010) (Figure 24). Le domaine de liaison aux peptides est lui-même composé d'un sous-domaine β -sandwich (2 associations antiparallèles de 4 feuillets β) et d'un faisceau hélicoïdal de plusieurs hélices α en tandem à l'extrémité C-terminale, particulièrement important dans la reconnaissance des ligands peptidiques par BiP (Wang et al., 2016).

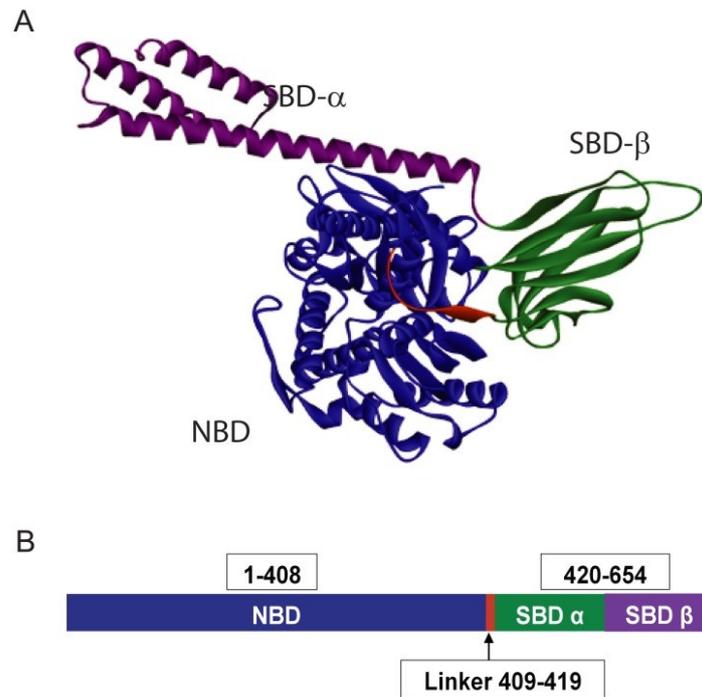


Figure 24 : Structure de la protéine chaperonne BiP (Shah et al., 2017).

Le réticulum endoplasmique est le principal organelle impliqué dans l'homéostasie calcique et par conséquent, nombre de ses fonctions requièrent du calcium, notamment la conformation des protéines et la glycosylation (Kuznetsov et al., 1992).

2.6. Chaperonnes et tampon calcique

Les chaperonnes liant le calcium, comme la calréticuline, la calnexine ou BiP jouent un rôle important dans la régulation du calcium intra-réticulaire. En séquestrant le calcium libre, les chaperonnes agissent comme des tampons ioniques et réduisent la concentration calcique libre dans la lumière du réticulum endoplasmique à 50-500 μ M contre 2mM pour la concentration réelle de calcium intra-réticulaire (Coe and Michalak, 2009).

La calréticuline, GRP97 et BiP sont les chaperonnes liant le calcium les plus abondantes dans le réticulum endoplasmique. Ces protéines possèdent de nombreux sites de liaison de haute affinité au calcium à leurs extrémités C-terminales (Michalak et al., 2009). Dans le réticulum sarcoplasmique, la principale chaperonne responsable du tampon calcique est la calséquestrine (Murphy et al., 2009), un homologue de la calréticuline, qui est d'une grande importance dans la contraction musculaire (cf. partie 1.2.) de par sa capacité à moduler

la fonction des canaux RyR (Michalak et al., 2009). Par ailleurs, BiP participe à hauteur de 25% de la capacité de tampon calcique intraréticulaire (Lièvreumont et al., 1997).

2.7.Membranes associées aux mitochondries

Siège du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative, les mitochondries présentent une fonction primordiale de production énergétique (cf. section 1.3.). Elles interviennent également dans la signalisation et la prolifération cellulaire, la communication inter-organite, l'homéostasie calcique, la production des espèces réactives à l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) et l'apoptose.

Les membranes mitochondriales sont étroitement associées au réticulum endoplasmique : il est question de Membranes (du réticulum endoplasmique) Associées aux Mitochondries (MAMs) (Figure 25). Les portions de membranes impliquées dans les MAMs sont enrichies en cholestérol, ce qui leur confère une densité et une architecture caractéristiques (Hayashi and Fujimoto, 2010). Étant donné que le réticulum endoplasmique et les mitochondries sont respectivement la principale source et le principal capteur de calcium de la cellule (Berridge, 2002), il n'est pas surprenant que les MAM jouent un rôle clef dans l'homéostasie calcique (Hayashi et al., 2009). Les MAMs permettent la formation de microdomaines à forte concentration de calcium à la membrane des mitochondries, facilitant ainsi une absorption rapide des ions calciques (Rizzuto et al., 1998). Il a été démontré que les protéines connues pour leur rôle dans l'homéostasie calcique sont enrichies au sein des MAM. C'est le cas des Inositol trisphosphate Receptor (IP3R) (Mendes et al., 2005) (Szabadkai et al., 2006), les RyR (García-Pérez et al., 2008) (Kopach et al., 2008), le récepteur $\sigma 1$ (σ -1R) (Hayashi and Su, 2007) et la calnexine (Myhill et al., 2008). Sont également retrouvées des enzymes de synthèse lipidique, la NADPH-cytochrome c réductase, des enzymes de régulation de l'homéostasie redox comme Ero1 α , la Phosphofurine Acidic Cluster Sorting protein 2 (PACS2), des chaperonnes comme la Grp75, certaines protéines itinérantes comme la B-cell receptor-Associated Protein 31 (BAP31), des protéines kinases comme PERK, des protéines impliquées dans la dynamique et la morphologie mitochondriale (Mitofusin (Mfn)1, Mfn2 et Dynamin Related Protein 1 (Drp1)) ainsi que la porine Voltage-Dependant Anion Channel (VDAC) (pour revue de la littérature sur les MAMs, voir (Vannuvel et al., 2013) (Giorgi et al., 2015) (Rieusset, 2018).

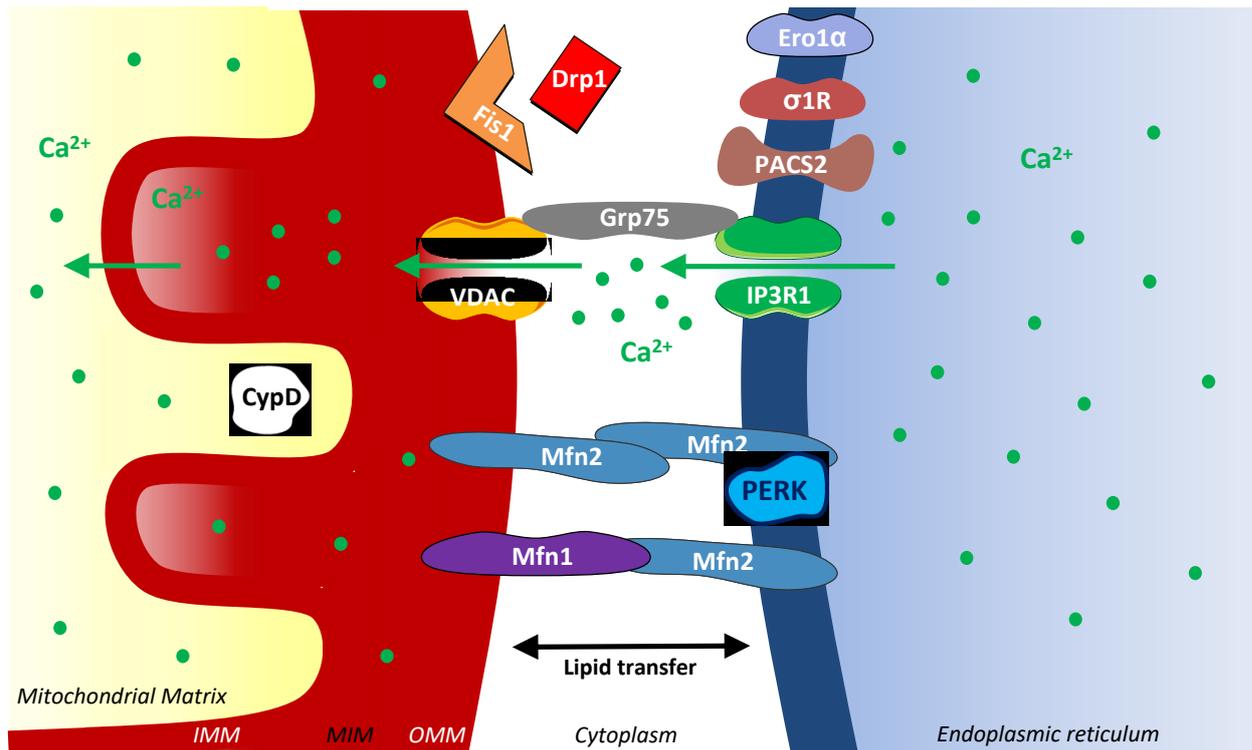


Figure 25 : Structure des MAMs (Boulinguez et al., 2017)

Outre la mitochondrie, le réticulum endoplasmique est également en relation étroite avec l'appareil de Golgi, la membrane plasmique (par STIM1 et Calcium release-activated calcium channel protein 1 (ORAI1)) et le noyau (English and Voeltz, 2013) (Phillips and Voeltz, 2016). Nous ne détaillerons volontairement pas ces informations qui, à la lueur de la littérature actuelle, ne sont pas en relation avec notre sujet.

2.7.1. IP3R1

L'IP3R est un tétramère transmembranaire réticulaire qui permet la transition passive du calcium du réticulum endoplasmique vers le cytosol. L'IP3R est responsable des variations transitoires de calcium dans les cellules non excitables, de la régulation du calcium nucléaire et du transfert du calcium du réticulum endoplasmique vers les mitochondries (Taylor and Tovey, 2010). L'IP3R nécessite des niveaux élevés de calcium pour être activé par son agoniste, l'IP3. L'IP3 se lie à l'IP3R sur quatre sites de manière coopérative. En parallèle, le calcium régule la fonction de l'IP3R par l'intermédiaire de sites de liaison au calcium, différents de ceux utilisés pour le transport ionique. Selon la concentration en calcium, les IP3R possèdent une réponse en deux phases. De faibles quantités de calcium activent la libération calcique par l'IP3R, indépendamment des niveaux d'IP3. Au contraire, des concentrations élevées de calcium ont des effets inhibiteurs sur le canal (Taylor and Tovey, 2010). De plus, l'IP3R est modulé par des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation de résidus clés par la PKA, Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) et/ou la PKC (Patterson et al., 2004). Les nucléotides, l'ATP et le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD)H jouent également un rôle important dans la modulation des canaux, reliant les besoins énergétiques de la cellule à l'activité IP3R (Patterson et al., 2004) (Taylor and Tovey, 2010). Par ailleurs, les protéines apoptotiques comme la caspase-3, les calpaïnes et le

cytochrome c interagissent avec les IP3R et les régulent, contribuant ainsi aux décisions de vie ou de mort des cellules (Patterson et al., 2004) (Taylor et al., 2004).

Des trois isoformes existantes (Ivanova et al., 2014), le type 1 (IP3R1) est le plus abondant et le plus étudié. Le gène codant pour IP3R1, Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 (ITPR1), est fortement exprimé dans les muscles squelettiques (Zhu et al., 2011). De plus, contrairement à l'isoforme 2, IP3R1 est indispensable à la génération des sparks calciques générés par le canal RyR1, puis que la diminution de l'expression d'IP3R1 par siRNA abolit totalement les sparks de fibres musculaires issues du *flexor digitorum brevis* (Tjondrokoesoemo et al., 2013). L'isoforme 3 n'est quant à elle pas exprimée dans le muscle squelettique (cf. Protein Atlas).

IP3R1 libère le calcium réticulaire au sein des MAMs, permettant sa rapide prise en charge par le canal VDAC1. IP3R1 et VDAC1 sont connectés physiquement par la chaperonne Grp75 (Szabadkai et al., 2006).

2.7.2. VDAC1

Trois isoformes différentes du VDAC sont décrites. VDAC1 est de loin le plus étudié, alors que l'on ne dispose que d'informations restreintes sur les fonctions cellulaires de VDAC2 et VDAC3 (De Pinto et al., 2010).

Le canal VDAC1 est un monomère dont les contours du pore sont formés de 19 feuillettes β (Bayrhuber et al., 2008). Les 25 derniers acides aminés de l'extrémité N-terminale s'organisent en hélice α qui se place horizontalement au sein du pore du canal (Bayrhuber et al., 2008). Les canaux VDAC1 sont susceptibles de s'associer entre eux sous forme d'oligomères (Zalk et al., 2005). VDAC1 est perméable aux ions calciques mais aussi à d'autres ions et molécules jusqu'à 5 kDa (Shoshan-Barmatz et al., 2018). VDAC1 est impliqué dans la régulation de la production énergétique mitochondriale, du transport du cholestérol et des ROS (pour revue (Shoshan-Barmatz et al., 2018)) et dans l'homéostasie calcique.

Localisée à la membrane mitochondriale externe, le canal VDAC1 permet l'entrée du calcium dans la mitochondrie. VDAC1 possède des sites de liaison au calcium (Báthori et al., 2006). La fixation du calcium sur ces sites entraîne une élévation de la conductance du canal (Báthori et al., 2006), un état décrit pour présenter la plus faible perméabilité aux ions calciques (Gincel et al., 2001). La surexpression de VDAC1 dans des myotubes entraîne la hausse du contenu calcique mitochondrial (Madesh and Hajnóczky, 2001). *A contrario*, un small interfering RNA (siRNA) ciblant VDAC1 dans les myotubes empêche l'entrée calcique dans la mitochondrie et l'apoptose induite par les céramides ou le peroxyde d'hydrogène (Madesh and Hajnóczky, 2001). VDAC1 assure l'entrée calcique en réponse à un stimulus apoptotique (De Stefani et al., 2012). En effet, les membres de la famille B-cell lymphoma 2 (bcl-2), régulatrice de l'apoptose, ont été montrés comme interagissant physiquement avec VDAC1 (Abu-Hamad et al., 2009), notamment Bcl-2-like protein 11 (Bim) (Sugiyama et al., 2002), Bcl2 (Arbel and Shoshan-Barmatz, 2010), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-XL) (Arbel et al., 2012) ou Bcl-2-associated X (Bax) (Yamagata et al., 2009). Au cours du processus apoptotique, VDAC1 participe à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la fuite du cytochrome c vers le cytosol. Le processus précis reste sujet à controverse (Shoshan-Barmatz et al., 2018).

VDAC1 permet l'entrée du calcium dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Puis le Mitochondrial Channel Uniport (MCU), dont la structure a été identifiée récemment

(Baradaran et al., 2018), localisé à la membrane mitochondriale interne, transfère le calcium vers la matrice mitochondriale (Baughman et al., 2011) (De Stefani et al., 2015).

2.8. Stress réticulaire et réponse aux protéines mal-conformées

2.8.1. La signalisation UPR

Un stress réticulaire se définit par un déséquilibre entre la capacité de conformation du réticulum endoplasmique et la quantité de protéines luminales à conformer. Les origines du stress réticulaire dans le muscle squelettique sont diverses : perte de l'homéostasie calcique ou du pouvoir de tampon redox (Hetz, 2012), accumulation de céramides (Tardif et al., 2014) dans le cadre de pathologies métaboliques ou d'un exercice intense nécessitant la synthèse importante de nouvelles protéines à des fins de régénération. Le stress réticulaire génère une réponse spécifique appelée réponse aux protéines mal-conformées (Unfolded Protein Response, UPR) (Hetz et al., 2015) (Wang and Kaufman, 2016) (Wu and Kaufman, 2006) (Hetz, 2012) (Figure 26).

Dans des conditions homéostatiques, l'Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1), la Protéine kinase R-like ER Kinase (PERK) et Activating Transcription Factor 6 (ATF6), trois protéines insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique, sont inactivées par leur liaison à la protéine chaperonne BiP. En cas de stress réticulaire, BiP est libéré pour participer la conformation des protéines. En conséquence, l'UPR est activé par oligomérisation de l'IRE1 et de PERK ainsi que par translocation d'ATF6 vers l'appareil de Golgi. IRE1, qui a une activité endonucléase, transforme la forme non clivée d'X-box Binding Protein-1 (unspliced XBP1, uXBP1) en XBP1 clivée (spliced XBP1, sXBP1). PERK phosphoryle l'eukaryotic translation Initiation Factor 2 α (eIF2 α), induisant ainsi une inhibition de la traduction protéique et une activation d'ATF4. ATF6 est clivée par les protéases Site-1 et Site-2 (SP1/SP2), qui sont localisées dans la membrane de l'appareil de Golgi. sXBP1, ATF4 et ATF6 clivé transloquent au noyau, se lient à des promoteurs spécifiques contrôlant l'expression de chaperonnes, d'enzymes antioxydantes et d'enzymes impliquées dans la dégradation des protéines dans la lumière du réticulum endoplasmique (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation, ERAD) afin de compenser la surcharge en protéines. Ces éléments constituent la phase résolutive initiale de l'UPR. L'objectif est de restaurer l'homéostasie du réticulum endoplasmique. L'UPR joue un rôle indispensable au maintien de la quiescence de la cellule satellite (2.8.2), à la différenciation myogénique (2.8.3.) et à l'adaptation du muscle à l'exercice (2.8.4.).

Cependant, la signalisation UPR est un processus hautement dynamique et sensible. Un stress réticulaire chronique mais modéré entraîne une adaptation cellulaire connu sous le concept d'hormèse réticulaire (section 2.8.5.) ou une sénescence prématurée (Pluquet et al., 2015). Un stress réticulaire trop intense ou irrésolu provoque des effets délétères pour la physiologie et la fonction musculaire : inflammation, perte de sensibilité à l'insuline, altération de la balance synthèse/dégradation protéique au profit de la dégradation (notions détaillées dans la section 3.1. dans un contexte de maladies métaboliques), altérations des MAMs (2.8.6.), dysfonctions mitochondriales et apoptose (2.8.7.), anomalies contractiles (2.8.8.).

La littérature précise les spécificités des réponses induites par chacune des 3 voies de signalisation de l'UPR (Okada et al., 2002) mais l'esprit de ce travail est de considérer l'UPR comme un processus physiologique global. La tunicamycine (inhibition de la N-glycosylation) (Heifetz et al., 1979), la thapsigargine (inhibition de SERCA) (Lyttton et al.,

1991) ou le palmitate sont couramment utilisés dans la littérature scientifique pour induire un stress réticulaire.

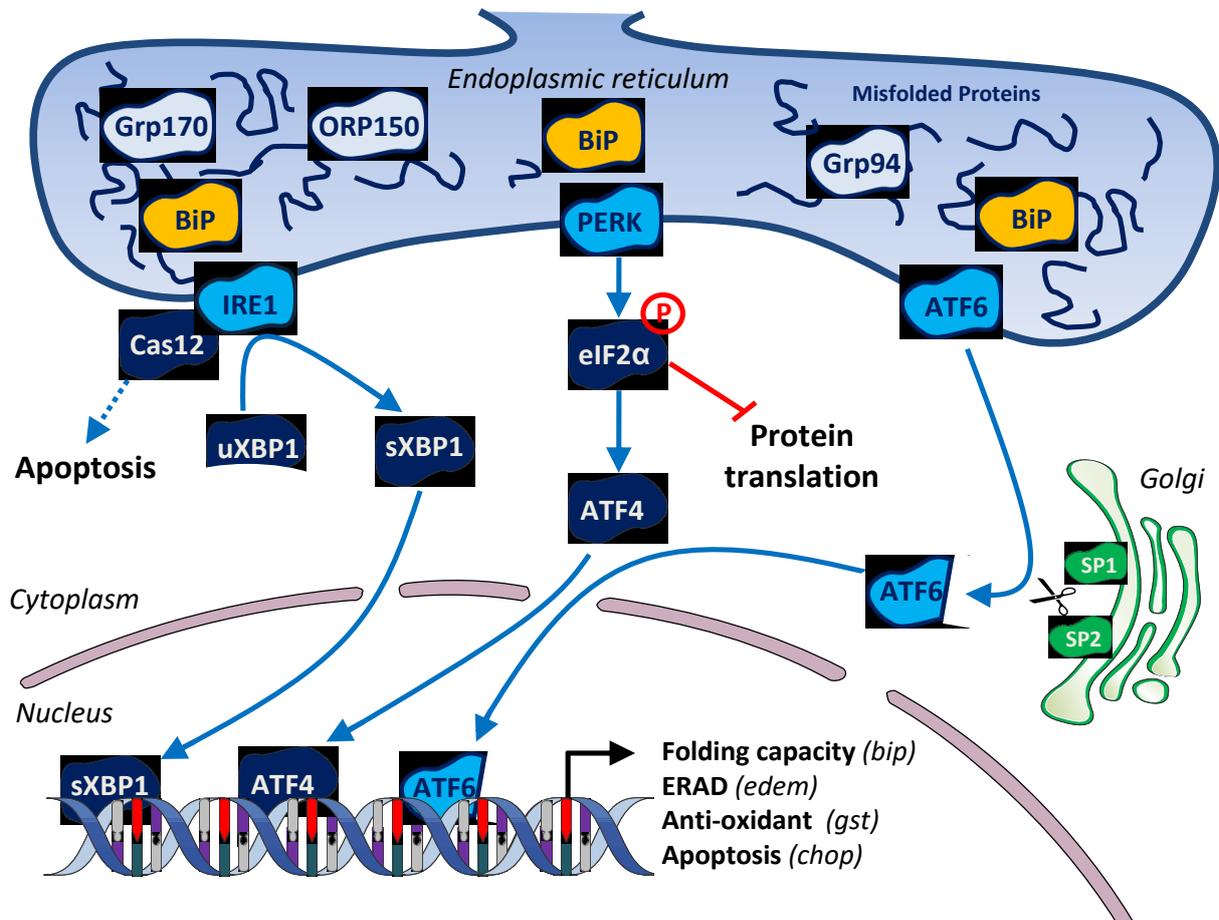


Figure 26 : Voies de signalisation de l'UPR (Boulinguez et al., 2017)

2.8.2. Rôle de l'UPR dans l'activation de la cellule satellite

Les différentes étapes de la vie d'une cellule satellite (activation, prolifération et différenciation) sont soumises à une régulation temporelle fine et précise. En effet, il a été montré qu'un taux spécifique de ROS est nécessaire à la sortie du cycle cellulaire de la cellule satellite et le passage de la phase de prolifération à la phase de différenciation (L'honoré et al., 2018). Ainsi, émerge dans la littérature la notion de points de contrôle au cours de l'activation de la cellule satellite, sortes de carrefour qui permettent d'éliminer les cellules satellites non fonctionnelles.

Récemment, la variation transitoire du niveau de stress réticulaire fut démontrée comme indispensable au processus d'activation de la cellule satellite (Zismanov et al., 2016) (Xiong et al., 2017). En effet, le stade de quiescence se caractérise une activation de l'UPR visualisée par la phosphorylation de PERK et d'eIF2α et l'expression des protéines ATF4, BIP et du facteur de transcription pro-apoptotique CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) HOMologous Protein (CHOP) (Zismanov et al., 2016). Cependant, trois jours après sortie de la niche et mise en culture des cellules satellites, les marqueurs d'UPR sont considérablement réduits (-75 à -90%) (Zismanov et al., 2016). De plus, les cellules satellites incapables de phosphoryler eIF2α sortent de l'état de quiescence et activent le programme

myogénique et inversement lorsque la phosphorylation d'eIF2 α est maintenue par le composé Sal003, inhibiteur de la phosphatase Growth Arrest and DNA-Damage-inducible 34 (GADD34)/PP1 (Zismanov et al., 2016). La phosphorylation du facteur d'initiation de la transcription eIF2 α entraîne l'interruption de la traduction protéique (Buchan and Parker, 2009). Or, la prolifération de la cellule satellite requiert la production d'une synthèse très importante de nouvelles protéines (Hill et al., 2003). Ainsi, la phosphorylation d'eIF2 permet de maintenir la cellule satellite dans l'état de quiescence en inhibant la synthèse protéique par la phosphorylation d'eIF2 α (Zismanov et al., 2016) (Figure 27).

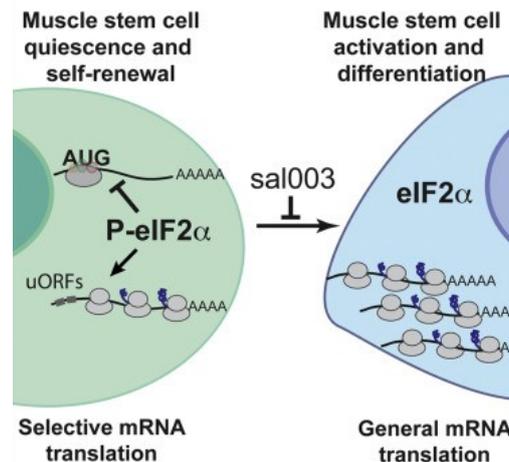


Figure 27 : Maintien de la cellule satellite en quiescence par P-eIF2 α (Zismanov et al., 2016)

Une autre publication (Xiong et al., 2017) vient confirmer l'importance de l'UPR dans la cellule satellite. En effet, les cellules satellites issues de muscles blessés pendant 5 jours présentent un profil d'expression des gènes de l'UPR différent de cellules satellites issues de muscles non blessé : hausse de l'expression de PERK, IRE1 et ATF4, baisse de ATF3 et GADD34, et stabilité de CHOP et de BIP (Xiong et al., 2017). De plus, l'inactivation spécifique de PERK à la cellule satellite génère une altération de la régénération musculaire du *tibialis anterior* 5 et 14 jours après une blessure, altération qui n'est pas observée avec les inactivations de XBP1 (Xiong et al., 2017). En particulier, les cellules satellites invalidées pour PERK sont davantage sujettes à la mort cellulaire par apoptose que les contrôles (Xiong et al., 2017). Sachant que PERK phosphoryle eIF2 α , l'inactivation de PERK empêche l'inhibition de la traduction et devrait promouvoir l'activation de la cellule satellite, y compris en l'absence de blessure.

Néanmoins, les cellules satellites qualifiées de « quiescentes » de ces deux publications (Zismanov et al., 2016) (Xiong et al., 2017) ont subi une sortie par cytométrie en flux, ce qui est comparable à une activation du fait de la perte de l'environnement de la niche. En effet, l'équipe de Frédéric Relaix montre combien le pattern d'expression de cellules satellites sorties au trieur de cellules (environ 3 à 5 heures de préparation) diffère de celui de cellules satellites immédiatement fixées dans le muscle squelettique avant tri cellulaire (Machado et al., 2017). Ainsi, la méthodologie de ces études (Xiong et al., 2017) (Zismanov et al., 2016) ne permet pas d'estimer le niveau de stress réticulaire au stade réel de quiescence et les différences de protocoles expérimentaux d'isolation des cellules satellites entre les deux laboratoires peuvent expliquer l'inadéquation des résultats.

2.8.3. Rôle de l'UPR dans la différenciation musculaire

La littérature scientifique rapporte que l'apoptose est un processus intimement lié à la différenciation myogénique (Dee et al., 2002) (Fernando et al., 2002). Au sein d'une population de myoblastes 23A2 en cours de différenciation, 30 à 50% des cellules sont apoptotiques avec une activation de la caspase 3 (Dee et al., 2002). L'inhibition pharmacologique de la caspase 3 (z-DEVD-fluorométhyl ketone, z-DEVD-fmk) empêche l'induction de l'apoptose sans altérer la différenciation myogénique (Dee et al., 2002). Ces résultats sont infirmés sur des myoblastes primaires issus de souris invalidées pour la caspase 3 et sur la lignée de cellules C2C12 traitée au z-DEVD-fmk où la différenciation en myotubes et myofibrilles est drastiquement réduite par rapport aux cellules contrôles respectives (Fernando et al., 2002). L'activité de la caspase 3 est maximale après 24h de différenciation puis décroît progressivement (Fernando et al., 2002). L'activation de la caspase 3 promeut la différenciation de myoblastes cultivés en milieu de croissance (Fernando et al., 2002). De plus, l'absence de modification de clivage de la Poly(ADP-Ribose) Polymérase (PARP), cible de la caspase 3 lors du processus d'apoptose, semble suggérer que la mortalité des cellules n'est pas due à l'action de la caspase 3 (Fernando et al., 2002), et que la caspase 3 serait une protéase pro-myogénique.

Les études menées par l'équipe de Nakanishi montrent que l'UPR est à l'origine de l'induction de l'apoptose dans un contexte de différenciation myogénique (Nakanishi et al., 2005) (Nakanishi et al., 2007). La caspase 12, activée par IRE1 est clivée à 1 et 5 jours de différenciation dans la lignée C2C12 (Nakanishi et al., 2005). La caspase 9 est elle aussi clivée mais 80% des cellules apoptotiques conservent un potentiel de membrane, soulignant une fonction mitochondriale préservée (Nakanishi et al., 2005). La protéine chaperonne BiP et le facteur pro-apoptotique CHOP augmentent dès l'induction de la différenciation (Nakanishi et al., 2005). La voie de signalisation relative à ATF6 semble la seule impliquée comme en témoigne le clivage d'ATF6 et l'absence de modifications de XBP1 et de la phosphorylation de PERK (Nakanishi et al., 2005). De manière intéressante, la potentialisation de l'activation de l'UPR par des agents stresseurs du reticulum endoplasmique, tunicamycine et thapsigargine, provoque une hausse de l'apoptose liée à la différenciation dans les premières 24h mais améliore considérablement la fusion des myotubes après 12 jours de différenciation (jusqu'à 250 noyaux par fibres contre 40 au maximum dans les contrôles non traités) (Nakanishi et al., 2007). L'élimination des myoblastes en moins bon état permettrait ainsi d'optimiser le processus de fusion musculaire.

La différenciation myogénique voit également l'accroissement du contenu calcique réticulaire aux dépens du contenu calcique cytosolique. En effet, le contenu calcique cytosolique, maximal chez les myoblastes, diminue au cours de la différenciation en myotubes (J2 et J4) (Marchand et al., 2001). La libération calcique en réponse à l'acétylcholine (10 μ M), la caféine (10mM) ou au potassium (100mM) augmente au cours de la différenciation des myoblastes en myotubes entre J0 et J4 (Marchand et al., 2001). A J6, le phénotype calcique est moins marqué ce qui s'explique peut-être par le décollement partiel des myotubes constaté (Marchand et al., 2001).

2.8.4. Rôle de l'UPR dans l'adaptation du muscle squelettique à l'exercice

L'activation de l'UPR est un processus nécessaire pour permettre l'adaptation musculaire à un exercice (Wu et al., 2011). En effet, les travaux de l'équipe de Spiegelman montrent que l'expression de la majorité des gènes de la signalisation de l'UPR, la quantité de

protéine BIP et la phosphorylation d'eIF2 α sont augmentées 5h après un exercice de course dans le muscle gastrocnémien de souris mâles C57/Bl6 (Wu et al., 2011). Et signe de leur adaptation, les souris entraînées à l'exercice montrent une réduction de l'activation de l'UPR par rapport à des souris confrontées à leur premier exercice (Wu et al., 2011). En particulier, la voie de signalisation médiée par ATF6 semble être primordiale dans ce contexte puisque l'adaptation à l'exercice n'est pas observée dans les modèles de souris invalidées pour ATF6 (Wu et al., 2011). A noter que la délétion de CHOP contrecarre la perte d'adaptation à l'exercice induit par l'invalidation génique de PGC1 α (Wu et al., 2011).

2.8.5. UPR et hormèse réticulaire

Une exposition chronique à de faibles niveaux de stress réticulaire peut être bénéfique grâce au phénomène d'hormèse réticulaire (ER hormesis) (Bohnert et al., 2018) (Mollereau et al., 2014) (Rutkowski and Kaufman, 2007) (Mollereau, 2013) (Salminen and Kaarniranta, 2010). L'hormèse réticulaire permet de mieux gérer un stress réticulaire postérieur d'importance. Par exemple, un prétraitement avec le composé bortezomib, un inhibiteur du protéasome inducteur de stress réticulaire protège les cellules C2C12 d'un stress réticulaire induit par un traitement au palmitate (Kwak et al., 2016). Dans les neurones, un prétraitement avec une faible dose de thapsigargine, via l'induction de l'expression de BiP et ATF4 protège les cellules contre l'apoptose induite par la 6-hydroxydopamine (Hara et al., 2011).

2.8.6. UPR et interactions MAMs

L'induction d'un stress réticulaire à la tunicamycine (Intra-péritonéale, 1mg/kg, 8h) diminue les MAMs (interactions IP3R1-VDAC1 et IP3R1-GRP75 par *in situ* PLA) des fibres du muscle *flexor digitorum brevis* de souris C57BL6 mâles âgées de 10 semaines (Pauly et al., 2017). Ceci est associé à une augmentation de l'expression protéique de SERCA1 et une diminution de l'import calcique mitochondrial suite à une vidange du réticulum endoplasmique par l'histamine via IP3R1 (Pauly et al., 2017). Le stress réticulaire à la tunicamycine entraîne également une augmentation du calcium cytosolique et une diminution de l'import calcique mitochondrial dans les fibres isolées du *flexor digitorum brevis*, 8h après l'injection intrapéritonéale de tunicamycine de la souris (Pauly et al., 2017).

2.8.7. UPR, altérations mitochondriales et induction de l'apoptose

D'abord décrit comme conséquence de l'activation des récepteurs de morts (voie extrinsèque) ou dépendante de la mitochondrie (voie intrinsèque), l'apoptose, processus de mort cellulaire programmée (Elmore, 2007) (Galluzzi et al., 2018), peut également être déclenchée par un stress réticulaire trop intense (Hetz, 2012) (Vannuvel et al., 2013). Nous recensons 3 signalisations convergentes d'induction de l'apoptose par le stress réticulaire. Premièrement, la procaspase 12 est recrutée à la membrane du réticulum endoplasmique où elle est clivée et activée par IRE1 (Szegezdi et al., 2003). La caspase 12 active cible la caspase 3, l'effecteur majeur de l'apoptose, directement ou indirectement *via* l'activation de la caspase 9 (apoptosome) (Shiraishi et al., 2006). Deuxièmement, l'activation des trois de signalisation de l'UPR (PERK, IRE1, ATF6) conduit à l'expression de CHOP (Li et al., 2014). CHOP modifie l'expression des membres de la famille Bcl2 (Li et al., 2014), notamment en se fixant sur le promoteur du facteur pro-apoptotique Bim afin d'activer sa

transcription (Weston and Puthalakath, 2010). Ceci conduit à l'activation des canaux Bax/Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak) (Li et al., 2014) et à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, provoquant la fuite du cytochrome c et l'assemblage de l'apoptosome. Enfin, troisièmement, le stress réticulaire conduit au transfert calcique du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie, *via* les MAMs ou le cytosol (Dejeans et al., 2010). La surcharge calcique mitochondriale conduit à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par l'ouverture du pore de transition mitochondrial (Mitochondrial Permeability Transition Pore, MPTP) (Elmore, 2007).

2.8.8. Effets délétères de l'UPR sur la contractilité musculaire

La force générée par le muscle *extensor digitorum longus* (EDL) est diminuée par une injection à la tunicamycine (IP, 1mg/kg, 8h) chez des souris C57BL6 mâles âgées de 10 semaines (Pauly et al., 2017). La diminution de la capacité contractile est associée à une activation de l'autophagie (hausse de l'expression protéique de Beclin1 et de microtubule-associated protein Light Chain 3 II (LC3-II) et de la calpaïne-1 (Pauly et al., 2017). Par ailleurs, l'inactivation de PERK dans le muscle squelettique de la souris réduit la masse musculaire squelettique et la production de force au cours des contractions isométriques (Gallot et al., 2018). Celle-ci entraîne également une transition de fibres lente à rapide, une expression accrue des composants du système ubiquitine-protéasome et de l'autophagie et une activation des calpaïnes conduisant à l'atrophie musculaire (Gallot et al., 2018).

Les rôles de l'UPR dans la fonction du muscle squelettique sont rassemblés dans la figure 28.

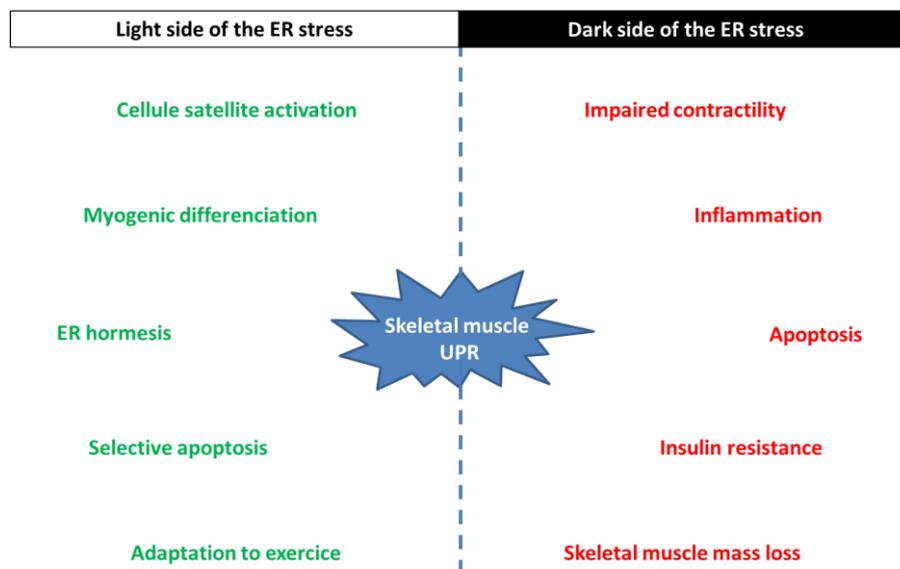


Figure 28 : Rôles de l'UPR dans le muscle squelettique

3. CONTEXTES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE DÉRÉGULATIONS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE

3.1. Obésité et diabète de type 2

L'obésité est une pathologie majeure du XX^{ème} et XXI^{ème} siècle (Busutil et al., 2017) (Hales et al., 2017). Selon l'organisation mondiale de la santé, l'obésité se définit par une accumulation anormale ou excessive de graisses qui altère la qualité de vie, indiquée par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 (Hales et al., 2017). Actuellement, les estimations donnent le chiffre assourdissant d'1,9 milliard d'adultes en état d'obésité à travers le monde soit 25% de la population (Samuel and Shulman, 2016). De nombreux experts s'accordent sur la dénomination de pandémie mondiale. L'obésité est causée par une association de facteurs favorisants, dont le terrain génétique (participation en général entre 25 à 40% dans la survenue de la pathologie et certaines obésités sont monogéniques), des comportements alimentaires excessifs (surconsommation) et inappropriés (malnutrition) en inadéquation avec le niveau de dépense énergétique (sédentarité), des comportements à risque (alcool, exposition à des perturbateurs endocriniens, prise chronique de certains médicaments) (Hruby and Hu, 2015). L'obésité par ses dérégulations métaboliques favorise la survenue de pathologies associées comme le syndrome métabolique, les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2 (Muoio and Newgard, 2006).

3.1.1. Accumulation ectopique de lipides, lipotoxicité et insulino-résistance du muscle squelettique

L'obésité est associée à une surcharge en lipides des muscles squelettiques. Ceci est dû à une augmentation de la synthèse et de l'exportation des lipoprotéines de très faible densité (Very Low Density Lipoprotein, VLDL) par le foie (Chan et al., 2014), ce qui augmente la libération d'acides gras libres dans les organes périphériques. Les dépôts de graisse ectopique (Schaffer, 2003), c'est-à-dire l'accumulation de triglycérides dans les tissus non adipeux, notamment les muscles squelettiques lorsque le tissu adipeux blanc atteint ses limites physiques et fonctionnelles (Levine and Levine, 2006). Au niveau cellulaire, l'accumulation de céramides, la production de DAG et à l'activation de la PKC provoquent entraînent une altération de la signalisation IR-IRS-PI3K-Akt, une réduction de l'absorption du glucose et *in fine* la résistance à l'insuline des muscles squelettiques (pour une revue de la littérature, consulter (Samuel and Shulman, 2016) (Petersen and Shulman, 2018)). La perte de sensibilité à l'insuline des organes métaboliques (foie, tissu adipeux et muscles squelettiques etc...) entraîne l'augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques et leur épuisement progressif, à l'origine du diabète de type 2 (Yaribeygi et al., 2018). Le diabète de type 2, par opposition au diabète auto-immun de type 1, est d'origine environnemental et polygénique et concerne 400 millions de personnes (Forouhi and Wareham, 2014).

Parmi les mécanismes cellulaires participant à l'action délétère des lipides sur la signalisation insuline du muscle squelettique, Penchons-nous à présent sur ceux ayant attiré à l'homéostasie calcique et réticulaire.

3.1.2. Altérations de la voie de synthèse *de novo* des céramides

Des études animales et humaines démontrent que l'alimentation par régime riche en graisses et l'obésité entraînent une accumulation de céramides dans les muscles squelettiques

(Tardif et al., 2014) (Adams et al., 2004). Le palmitate, transformé par l'action de la palmitoyl-CoA synthase dans la palmitoyl-CoA active, précurseur précoce de la biosynthèse de novo céramide (Gault et al., 2010), est utilisé pour induire une accumulation de céramide dans les lignées cellulaires des muscles squelettiques (Tardif et al., 2014). Il est intéressant de noter que le palmitate réprime la phosphorylation d'Akt et de GSK3 β suite à une stimulation à l'insuline (Tardif et al., 2014). Indépendamment, l'accumulation intracellulaire de céramides par inhibition de la glucosylation des céramides avec l'inhibiteur de la glucosylcéramide synthase DL-threo-1-Phenyl-2-Decanoylamino-3-Morpholino-1-Propanol (PDMP) ou par inhibition de la désacylation des céramides avec l'inhibiteur de la céramidase N-Oleoyl-Ethanolamine (NOE), empêche la phosphorylation d'Akt par l'insuline dans des cellules C2C12 (Chavez et al., 2003). De plus, l'activation de la PKC ζ par un traitement aux céramides réduit la phosphorylation Akt induite par l'insuline dans les myotubes L6 (Powell et al., 2003). Néanmoins, l'induction d'une accumulation de céramides peut ne pas récapituler entièrement l'insulinorésistance. Par exemple, alors que la surexpression des isoformes 1 et 6 de la céramide synthase dans les myotubes L6 favorise l'accumulation de céramides, cela améliore également la phosphorylation d'Akt après un traitement à l'insuline (Frangioudakis et al., 2010). Malheureusement, à notre connaissance, aucune étude humaine n'a encore permis de déterminer si ces isoformes enzymatiques sont modulées dans les muscles squelettiques de patients obèses ou diabétiques.

Les composés pharmacologiques fumonisine B1 et myriocine/cyclosérine inhibent respectivement CerS et SPT, et donc la synthèse *de novo* des céramides (Figure 4). La cyclosérine, la myriocine et la fumonisine B1 empêchent l'accumulation de céramides induite par le palmitate dans les cellules C2C12 (Chavez et al., 2003). Ces molécules restaurent également la phosphorylation d'Akt et de GSK3 β induite par l'insuline et altérée par le palmitate (Chavez et al., 2003). Chez la souris, l'injection sous-cutanée de myriocine au cours des 4 dernières semaines d'un régime de 6 semaines annule l'accumulation de céramides dans le muscle quadriceps et la tolérance au glucose (Frangioudakis et al., 2010). De façon consistante, les injections intrapéritonéales quotidiennes de myriocine durant les quatre dernières semaines chez des souris soumises à un régime riche en graisses pendant une période totale de 12 semaines protègent les animaux contre l'insulinorésistance et l'intolérance au glucose, associées à une diminution de l'accumulation de céramides et à une amélioration de la signalisation de l'insuline dans le muscle gastrocnémien (Ussher et al., 2010). L'activité physique est également bénéfique car l'exercice prévient l'accumulation de céramides et l'altération subséquente de la résistance à l'insuline *in vivo* des muscles soléaires traités au palmitate chez les rongeurs (Thrush et al., 2011). Il est intéressant de noter que le traitement à la fumonisine B1 a des effets similaires à ceux de l'exercice (Thrush et al., 2011).

3.1.3. Stress réticulaire, signalisation UPR et altération de la signalisation à l'insuline

Dans le muscle squelettique de souris nourries par un régime riches en graisses ou génétiquement obèses (*ob/ob*), l'UPR est activée et favorise l'insulinorésistance (Hwang et al., 2013a) (Ijuin et al., 2016) (Koh et al., 2013) (Yoon et al., 2013). Le palmitate, couramment utilisé pour induire une résistance à l'insuline dans les modèles de cellules musculaires, active l'UPR (Rieusset et al., 2012) (Salvadó et al., 2013). Il est à noter que des agents stressants non lipidiques comme la tunicamycine (Hwang et al., 2013a) (Koh et al., 2013) (Deldicque et al., 2011a) (Hwang et al., 2013b) (Hwang et al., 2012) (Panzhinskiy et al., 2013a) (Salvadó et al., 2014), inhibiteur de la N-glycosylation, et la thapsigargine (Koh et al., 2013) (Yoon et al.,

2013) (Deldicque et al., 2011a) (Hwang et al., 2012) (Salvadó et al., 2014), inhibiteur de la pompe SERCA, provoquent une insulino-résistance induite par le stress réticulaire dans les myotubes.

IRE1 active c-Jun N-terminal Kinase (JNK) par l'intermédiaire de Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor-associated factor 2 (TRAF2) (Urano et al., 2000). JNK, à son tour, phosphoryle l'IRS sur les résidus de sérine (Müssig et al., 2005), réduisant la signalisation de l'insuline. La voie IRE1, et plus spécifiquement XBP1s (Ijuin et al., 2016), s'est également révélée médiatrice de la résistance à l'insuline par l'inhibition de la signalisation PI3K en augmentant l'expression de la protéine Skeletal muscle and Kidney-enriched Inositol polyphosphate Phosphatase (SKIP), qui se lie à BiP en l'absence d'insuline et de stress réticulaire (Ijuin et al., 2015). De plus, la glucosamine, un métabolite du glucose produit pendant l'hyperglycémie, déclenche une résistance à l'insuline induite par le stress réticulaire, et ATF6 est capable de supprimer les effets inhibiteurs de la glucosamine sur la signalisation de l'insuline (Raciti et al., 2010).

Les interactions entre les voies de signalisation de l'UPR, d'ERK et de l'AMP-activated Kinase (AMPK) module la résistance à l'insuline du muscle squelettique (Hwang et al., 2013a) (Salvadó et al., 2013) (Hwang et al., 2013b) (Salvadó et al., 2014) (Jeong et al., 2013). Le stress réticulaire active ERK et inhibe l'AMPK dans les myotubes de rongeurs (Hwang et al., 2013a) (Hwang et al., 2013b) (Salvadó et al., 2014). L'inhibition d'ERK par le composé U0126 rétablit la signalisation de l'insuline et l'absorption du glucose par l'activation d'AMPK dans les myotubes traités à la tunicamycine provenant du muscle soléaire de souris *db/db* (Hwang et al., 2013b). De plus, l'U0126 n'a aucun effet lorsque les cellules sont transfectées avec un siRNA ciblant l'AMPK (Hwang et al., 2013b). Il est intéressant de noter que l'inhibition d'ERK prévient également la phosphorylation de PERK et d'IRE1 dans les myotubes traités à la tunicamycine (Hwang et al., 2013b), mais le rôle de l'AMPK dans cet effet n'a pas été étudié. Néanmoins, les activateurs de l'AMPK que constituent l'AICAR et l'A-769662 inversent à la fois la résistance à l'insuline et le stress réticulaire causés par le traitement au palmitate dans les myotubes, tandis que l'inhibition AMPK avec le composé C et la surexpression d'une forme dominante négative AMPK exacerbe la résistance à l'insuline (Salvadó et al., 2013). *In vivo*, le traitement avec l'activateur de l'AMPK, le Low Molecular Weight Fucoidan (LMWF) réduit le stress et la résistance à l'insuline dans les muscles squelettiques des souris *db/db* (Jeong et al., 2013). Fait intéressant, les souris *ob/ob* traitées avec la molécule anticancéreuse bortézomib, qui est principalement un inhibiteur du protéasome, présentent une meilleure sensibilité à l'insuline, une activation plus faible de l'UPR musculaire et une activation d'Akt plus élevée lors du traitement insulinique (Kwak et al., 2016). Les mêmes effets bénéfiques du bortézomib ont été observés dans les myotubes C2C12 traités au palmitate (Kwak et al., 2016). La diminution de l'expression de l'AMPK par siRNA abolit l'action du bortézomib (Kwak et al., 2016), ce qui suggère encore une fois que l'activation de l'AMPK réduit le stress réticulaire et améliore la sensibilité à l'insuline des muscles squelettiques.

Le calcium est un autre modulateur puissant de l'insulino-résistance induite par le stress réticulaire dans les muscles squelettiques. En effet, une augmentation de l'expression de SERCA2b par le composé naturel jacéosidine, un trihydroxyflavone végétal, rétablit la signalisation de l'insuline dans les myotubes C2C12 insulino-résistants, évaluée par une phosphorylation accrue des IR- β , IRS-1 et Akt (Ouyang et al., 2017). Ceci est associé à une induction plus faible des protéines BiP et CHOP ainsi que la phosphorylation d'eIF2 α (Ouyang et al., 2017). De façon constante, l'injection intrapéritonéale quotidienne de jacéosidine pendant 20 jours restaure la phosphorylation d'Akt stimulée par l'insuline et réduit la quantité de la protéine CHOP et la phosphorylation d'eIF2 α dans les muscles squelettiques de souris nourries avec un régime riche en graisses pendant 16 semaines (Ouyang et al.,

2017). Enfin, la Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Kinase 2 (CaMKK2) est nécessaire pour les effets bénéfiques de l'activateur de l'AMPK glycéolline sur la sensibilité à l'insuline des souris *db/db* (Yoon et al., 2013).

La protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), qui est située dans la membrane réticulaire, est un régulateur négatif de la signalisation de l'insuline par déphosphorylation des résidus de tyrosine des IR et IRS1 (Kenner et al., 1996). La réduction de l'expression du gène *ptp1b* par siRNA chez les souris obèses soulage l'intolérance au glucose des muscles squelettiques et réduit la phosphorylation d'eIF2 α (Panzhinskiy et al., 2013a). De façon consistante, l'inactivation du gène *ptp1b* chez les souris nourries avec un régime riche en graisses prévient à la fois le stress réticulaire et l'insulinorésistance des muscles squelettiques (Panzhinskiy et al., 2013b).

Chez les patients obèses, l'accumulation ectopique de lipides déclenche une inflammation musculaire qui, à son tour, contribue à une diminution de la sensibilité à l'insuline (Marette et al., 2014) (Varma et al., 2009). Le facteur de transcription pro-inflammatoire Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) est activé lors du traitement à la tunicamycine et dans le muscle gastrocnémien des souris nourries par un régime riche en graisses (Panzhinskiy et al., 2013b). En outre, le traitement par la chaperonne chimique TauroUrsoDeoxyCholic Acid (TUDCA), qui améliore la stabilisation des protéines directement ou par association avec d'autres chaperonnes (Cortez and Sim, 2014), et la réduction de l'expression des gènes de la signalisation UPR par knockdown contrecarrent l'inflammation induite par le LipoPolySaccharide (LPS) et l'InterLeukin-1 β (IL-1 β) dans les cellules primaires musculaires (Liong and Lappas, 2016). Ceci s'accompagne d'une restauration de l'absorption du glucose et de la phosphorylation de l'IR et de l'IRS1 suite à une stimulation à l'insuline (Liong and Lappas, 2016).

Quelques études proposent que l'UPR ne soit pas impliqué dans la résistance à l'insuline des muscles squelettiques (Rieusset et al., 2012) (Hage Hassan et al., 2012) (Ozcan et al., 2004) (Ye et al., 2010). Néanmoins, l'acide 4-PhénylButyrique (4-PhénylButyric Acid, PBA), qui réduit l'agrégation des protéines en se liant à des segments hydrophobes de protéines mal conformées (Cortez and Sim, 2014), et le TUDCA restaurent la sensibilité à l'insuline chez les souris *ob/ob*, en améliorant l'absorption du glucose par les muscles squelettiques, comme le montrent les tests de clamps euglycémiques hyperinsulinémiques (Ozcan et al., 2006). De même, les souris surexprimant la chaperonne réticulaire 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) affichent une meilleure signalisation de l'insuline dans les muscles squelettiques (Ozawa et al., 2005). De plus, un gavage quotidien avec l'acide 3-Hydroxy-2-Naphthoïque (3-HNA), une chaperonne chimique, pendant 2 semaines, restaure la phosphorylation d'Akt par l'insuline dans le muscle soléaire de souris *ob/ob* (Park et al., 2016). Chez l'humain, il n'y a aucune preuve d'altération de l'expression et de la fonction des chaperonnes réticulaires dans les troubles métaboliques. De plus, l'UPR n'est pas activé dans les muscles squelettiques de l'homme après un programme nutritionnel hypercalorique enrichi en graisses de 6 semaines (Deldicque et al., 2011b). Néanmoins, l'aire totale sous la courbe de glucose après un test de tolérance au glucose par voie orale et l'indice de Matsuda, qui reflète la sensibilité hépatique et musculaire à l'insuline, demeurent inchangés (Deldicque et al., 2011b). Aucune étude chez l'humain n'a mis à l'essai un paradigme plus pertinent pour la pathologie du diabète de type 2.

Conformément aux observations faites chez la souris (Ozcan et al., 2006), l'administration orale de la chaperonne chimique TUDCA, améliore la baisse de la glycémie *in vivo* mesurée par une procédure de clamp hyperinsulinémique euglycémique chez des

sujets obèses insulino-résistants (Kars et al., 2010). Après l'injection d'insuline, les taux de IRS et d'Akt phosphorylés sont plus élevés chez les patients obèses traités par le TUDCA que dans le groupe placebo (Kars et al., 2010). Cependant, aucun changement n'a été observé dans la voie liée à l'UPR, remettant en question les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets de cet acide biliaire (Kars et al., 2010). Des études futures sont nécessaires pour vérifier si des inhibiteurs plus spécifiques de l'UPR (Hetz et al., 2013) améliorent la sensibilité à l'insuline des muscles squelettiques.

3.1.4. Perte de masse musculaire induite par le stress réticulaire et résistance à l'insuline

Le stress réticulaire module la balance synthèse/dégradation des protéines en favorisant la protéolyse musculaire et en inhibant la création de nouvelles protéines. La tunicamycine et la thapsigargine, par l'inactivation d'Akt, bloquent l'activation de mTOR dans les cellules musculaires (Deldicque et al., 2011a), induisant ainsi une résistance anabolique. De plus, les taux de synthèse protéique diminuent dans les muscles squelettiques résistants à l'insuline de rats sarcopéniques obèses soumis à un réticulaire et chez les myotubes traités au palmitate, malgré une voie mTOR inchangée (Tardif et al., 2014). Cela pourrait s'expliquer par l'inhibition de la traduction des protéines par eIF2 α (Tardif et al., 2014). De plus, mTOR pourrait également moduler l'UPR car l'inhibition de mTOR induite par la rapamycine soulage le stress réticulaire dans les myotubes L6 traités à la tunicamycine (Hwang et al., 2012). Ceci est associé à une meilleure sensibilité à l'insuline (Hwang et al., 2012).

L'apoptose et l'autophagie induites par le stress réticulaire participent également à la perte de masse musculaire. Le stress réticulaire active l'autophagie en augmentant l'expression de l'ARNm d'Autophagy-related protein 12 (Atg12) et de la protéine à travers la phosphorylation d'eIF2 α (Kouyama et al., 2007). Un stress réticulaire soutenu contribue à la dégradation des protéines par leur ubiquitination (Yuzefovych et al., 2013a) et l'induction de l'apoptose (Moorwood and Barton, 2014) qui est médiée par la caspase-3 (Du et al., 2004) et l'endonucléase G (Dupont-Versteegden et al., 2006). Il est intéressant de noter que les inhibiteurs des caspases ainsi que la fumonisine, inhibiteur de la céramide synthase, préviennent l'apoptose, l'accumulation des céramides et restaurent la sensibilité à l'insuline induite par le traitement des cellules L6 par palmitate, d'où le concept de "lipoapoptose" (Turpin et al., 2006).

Les masses brutes de l'EDL et du soléus sont significativement diminuées chez des souris génétiquement obèses et diabétiques *ob/ob* mâles âgés de 5 mois (Warmington et al., 2000) mais la perte de masse musculaire n'est pas systématiquement retrouvée (Yuzefovych et al., 2013a).

3.1.5. MAM et insulino-résistance du muscle

D'après des modèles cellulaires et animaux, il semble que l'amélioration de la fonction des mitochondries (Boulinguez et al., 2017) et du réticulum endoplasmique puisse augmenter la sensibilité à l'insuline des cellules musculaires, bien que la pertinence clinique chez l'homme reste encore à évaluer. De plus, des études démontrent une intrication fonctionnelle forte des fonctions réticulaires et mitochondriales dans un contexte d'insulino-résistance du muscle squelettique. Par exemple, la surexpression de la protéine de réparation de l'ADN mitochondrial 8-OxoGuanine DNA N-Glycolase 1 humaine (hOGG1) (Yuzefovych et al., 2013a) empêche à la fois les lésions de l'ADN mitochondrial et la production de ROS ainsi

que l'activation de l'UPR (Yuzefovych et al., 2013b) (Yuzefovych et al., 2012). La surexpression d'hOGG1 protège également contre l'insulinorésistance induite par le palmitate dans les myotubes (Yuzefovych et al., 2013b).

Les effets des MAMs sur la résistance à l'insuline et les maladies métaboliques ont été initialement et principalement étudiés dans le foie (pour revue de la littérature voir (López-Crisosto et al., 2015) (Theurey and Rieusset, 2017)), donnant des résultats opposés concernant le rôle des MAMs dans la sensibilité hépatique à l'insuline (Theurey et al., 2016) (Rieusset et al., 2016) (Tubbs et al., 2014) (Arruda et al., 2014). D'une part, la microscopie électronique a montré que la formation hépatique de MAMs est augmentée chez les souris nourries par voie obstétricale ou par voie orale ou par régime riche en graisses (60 % de calories grasses). Dans ces conditions, le renforcement des MAMs pourraient entraîner une accumulation mitochondriale de calcium et conduire à un dysfonctionnement mitochondrial et finalement à une insulinorésistance (Arruda et al., 2014). Ces résultats, fruit d'une seule étude, n'ont jamais été confirmés. D'autre part, les souris *ob/ob* ou les souris nourries avec un régime riche en graisses et en sucres présentent une moindre quantité de MAMs, mais cette fois-ci, les MAMs sont détectées avec la technique d'*in situ* Proximity Ligation Assay (PLA) (Tubbs et al., 2014), technique de référence pour étudier l'interaction physique des deux organelles.

En janvier 2018, l'équipe de Jennifer Rieusset caractérise pour la première fois le rôle des MAMs dans la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique (Tubbs et al., 2018). En effet, les muscles gastrocnémiens provenant de souris mâles génétiquement obèses et diabétiques (*ob/ob*) âgées de 12 semaines et de souris mâles âgées de 5 semaines nourries avec un régime riche en graisses et en sucres durant 16 semaines, voient leur quantité de MAMs, quantifiée par *in situ* PLA (interaction VDAC-IP3R1) et par fractionnement cellulaire, diminuer par rapport aux souris contrôles respectives (Tubbs et al., 2018). Ceci est associé à la gluco-intolérance et à l'insulinorésistance des explants de muscles gastrocnémiens stimulés à l'insuline comme en témoignent la diminution de la phosphorylation de PKB et de la GSK-3 β (Tubbs et al., 2018). La diminution des MAMs est retrouvée dans des myotubes humains issus de cellules satellites de muscles *vastus lateralis* et traités au palmitate, inducteur de stress réticulaire et d'insulinorésistance, par microscopie électronique à transmission et *in situ* PLA (Tubbs et al., 2018). Le suivi cinétique du régime riche en graisses et en sucres a permis de montrer que l'altération des MAMs dans le muscle gastrocnémien survient dès la première semaine de régime et est par conséquent antérieure à l'état général d'insulino-résistance qui apparaît « seulement » à la douzième semaine (sans connaissance de l'état du muscle squelettique) et aux dysfonctions mitochondriales (perte d'ADN mitochondrial et de l'activité de la cytochrome c oxydase (COX) et de la Citrate Synthase (CS)) (Tubbs et al., 2018). La relation de causalité se confirme en constatant que l'augmentation des MAMs par la surexpression de Grp75 et Mfn2 restaure la sensibilité à l'insuline de myotubes humains traités au palmitate (Tubbs et al., 2018). De manière intéressante, les marqueurs de stress réticulaire (expression génique de CHOP, BIP et XBP1s) sont également réduits par la restauration des MAMs (Tubbs et al., 2018). A l'opposé, l'inhibition des MAMs, par siRNA de Grp75 ou Mfn2 ou la surexpression de Fetal And Adult Testis Expressed 1 (FATE1), un antigène du cancer des testicules récemment démontré pour découpler réticulum endoplasmique et mitochondrie (Doghman-Bouguerra et al., 2016) et non exprimé dans le muscle squelettique (Tubbs et al., 2018), induisent la perte de sensibilité à l'insuline de myotubes humains (Tubbs et al., 2018). Enfin, les MAMs sont diminuées dans les myotubes issues de biopsies musculaires de *vastus lateralis* de patients obèses et de patients diabétiques (Tubbs et al., 2018).

3.1.6. Anomalies calciques

Obésité

L'obésité engendre une augmentation de la production des espèces réactives à l'oxygène et un état de stress oxydatif (Espinosa et al., 2016) (Di Meo et al., 2017). Le stress oxydatif est connu pour altérer la fonction de SERCA (Matsunaga et al., 2003) et augmenter la fuite calcique du réticulum endoplasmique par les RyR (Baumann et al., 2016), conséquences fâcheuses pour la fonction contractile musculaire.

Diabète de type 2

Un corpus d'études scientifiques apporte les preuves d'une altération de l'homéostasie calcique réticulaire dans le muscle squelettique par le diabète de type 2. Tout d'abord, la quantité protéique de SERCA2a diminue dans le muscle soléaire de rats mâles âgés de 4 semaines rendus diabétiques par une injection à la streptozotocine (Rác et al., 2009). Ceci est associé à la diminution de l'activité de recapture calcique par SERCA dans les muscles squelettiques rapides de rats diabétiques (Eibschutz et al., 1984). De plus, l'association de SERCA avec les IRS est diminuée dans les muscles gastrocnémiens de rats diabétiques (Algenstaedt et al., 1997). Ceci impacte le contenu calcique du gastrocnémien qui augmente chez des souris KK-CAY mâles de 28-48 semaines obèses et diabétiques (Nakagawa et al., 1989) et de rats Zucker mâles obèses de 14 semaines (Zemel et al., 1990). En conséquence, l'activité protéolytique des calpaïnes s'accroît dans les muscles des membres inférieurs de souris KK-CAY mâles, obèses et diabétiques âgées de 28-35 semaines (Kobayashi et al., 1989), ainsi que dans les muscles EDL (Baviera et al., 2007) (Baviera et al., 2008) et soléaires (Baviera et al., 2008) de rats diabétiques (sans précision d'âge ni de sexe). Concomitamment, la quantité protéique de la calpaïne-m est spécifiquement augmentée dans les muscles EDL de rats diabétiques lorsque la quantité protéique de calpastatine, inhibiteur endogène de l'activité des calpaïnes, se réduit (Baviera et al., 2007). En définitive, cette perte d'homéostasie calcique affecte la capacité contractile du diaphragme de souris diabétiques comme en témoigne la diminution du pic calcique généré par une stimulation nerveuse (Kimura et al., 1995) et un prolongement de la durée du potentiel d'action (Kimura et al., 1988). A noter que l'augmentation du potentiel de membrane basale du sarcolemme observée est corrélée positivement à l'hyperglycémie des souris diabétiques (Kimura et al., 1988).

D'autres études observent des faits opposés, certes réalisés sur des modèles animaux et des muscles étudiés parfois différents, et concluent à une amélioration de l'homéostasie calcique réticulaire dans les muscles squelettiques d'animaux atteints par une pathologie métabolique. En effet, l'activité de recapture calcique par SERCA augmente dans les muscles squelettiques quadriceps et gastrocnémiens de rats rendus diabétiques par une injection de streptozotocine (Ganguly et al., 1986) (Taira et al., 1991) (Ganguly et al., 1987). En conséquence, la force contractile isométrique développée par les muscles squelettiques des rats diabétiques est logiquement augmentée dans cette étude (Ganguly et al., 1986). Cette même équipe souligne le fait que la perméabilité calcique de la membrane phospholipidique du réticulum sarcoplasmique est augmentée dans le muscle squelettique des rats diabétiques, ce qui pourrait être la cause de l'augmentation de l'activité de SERCA (Taira et al., 1988).

3.1.7. Anomalies contractiles

Obésité

La masse corporelle plus importante à déplacer est un facteur d'entraînement pour les muscles squelettiques de l'obèse. En effet, la force intrinsèque développée par un muscle d'obèse est généralement plus importante que chez un sujet mince (Garcia-Vicencio et al., 2016). Néanmoins, l'obésité altère le métabolisme du muscle squelettique affectant progressivement sa qualité, sa masse et sa fonction (Prado et al., 2008) (Tallis et al., 2018). D'autre part, la perte de l'homéostasie du muscle squelettique entraîne une perte de mobilité de l'obèse (Teasdale et al., 2013) et une diminution de la consommation énergétique (Busutil et al., 2017) et *in fine* l'aggravation de son obésité. S'enclenche alors un cercle vicieux d'amplification réciproque des deux phénomènes délétères, obésité et perte de fonction musculaire (Busutil et al., 2017).

De nombreuses études soulignent la réduction de la fonction contractile musculaire occasionnée par l'obésité. En effet, le rapport contraction/tension tétanique est diminué dans le diaphragme de rats Zucker génétiquement obèses âgés de 3-4 mois comparativement aux contrôles (van Lunteren, 1996). Une altération de la fonction contractile (allongement de la durée de l'activation et de la relaxation musculaire mais hausse du ratio contraction/tension tétanique et meilleure résistance à la fatigue) est également observé dans les muscles *soleus* et EDL de souris *ob/ob* mâles âgées de 5 mois (Warmington et al., 2000). L'allongement du temps de relaxation du soléus, également observé dans une autre étude (Tallis et al., 2017), suggère une réduction de l'activité de SERCA. Les modèles d'obésité induite par des régimes riches en graisses produisent également des effets délétères sur la fonction musculaire. En témoignent la baisse de la force de contraction isométrique et de la force tétanique du *soleus* par un régime de 5 semaines enrichi en graisses et en huile de palme chez des souris mâles de 12 semaines (Ciapaite et al., 2015). De plus, la force de contraction isométrique et la force tétanique de l'EDL sont également réduits par l'application d'un régime riche en graisses de 10 semaines chez des souris âgées de 4-5 mois (Matsakas et al., 2015). D'autres équipes attestent de la baisse de force tétanique aux stimulations maximale et submaximale de l'EDL chez des souris mâles 8 semaines nourries avec un régime riche en graisses de 12 semaines (Eshima et al., 2017) et de la diminution de la puissance développée au cours d'un protocole de work-loop par l'EDL et le diaphragme de souris femelles de 4 semaines soumises 12 semaines à un régime riche en graisses (Tallis et al., 2017).

L'obésité entraîne une transition métabolique des fibres rapides en fibres lentes (Seebacher et al., 2017) (Warmington et al., 2000), contribuant aussi à la perte de force musculaire développée par l'obèse.

Néanmoins, un nombre d'études limités concluent à une absence de modifications de la contractilité musculaire par l'obésité ; un régime riche en graisses de 8 semaines n'a pas d'effets sur la contractilité du complexe *gastrocnemius/plantaris* chez des souris mâles âgées de 10 semaines (Shortreed et al., 2009), de même qu'un régime riche en graisses de 3 semaines sur la contractilité du complexe *gastrocnemius/plantaris/soleus* de souris mâles âgées de 4 mois (Thomas et al., 2014). Enfin, la force tétanique absolue et la résistance à la fatigue du soléus sont augmentés chez des souris femelles âgés de 1 mois soumises durant 16 semaines à un régime riche en graisses (Tallis et al., 2017).

Les altérations du réticulum endoplasmique du muscle squelettique dans les pathologies métaboliques sont résumées dans la figure 29.

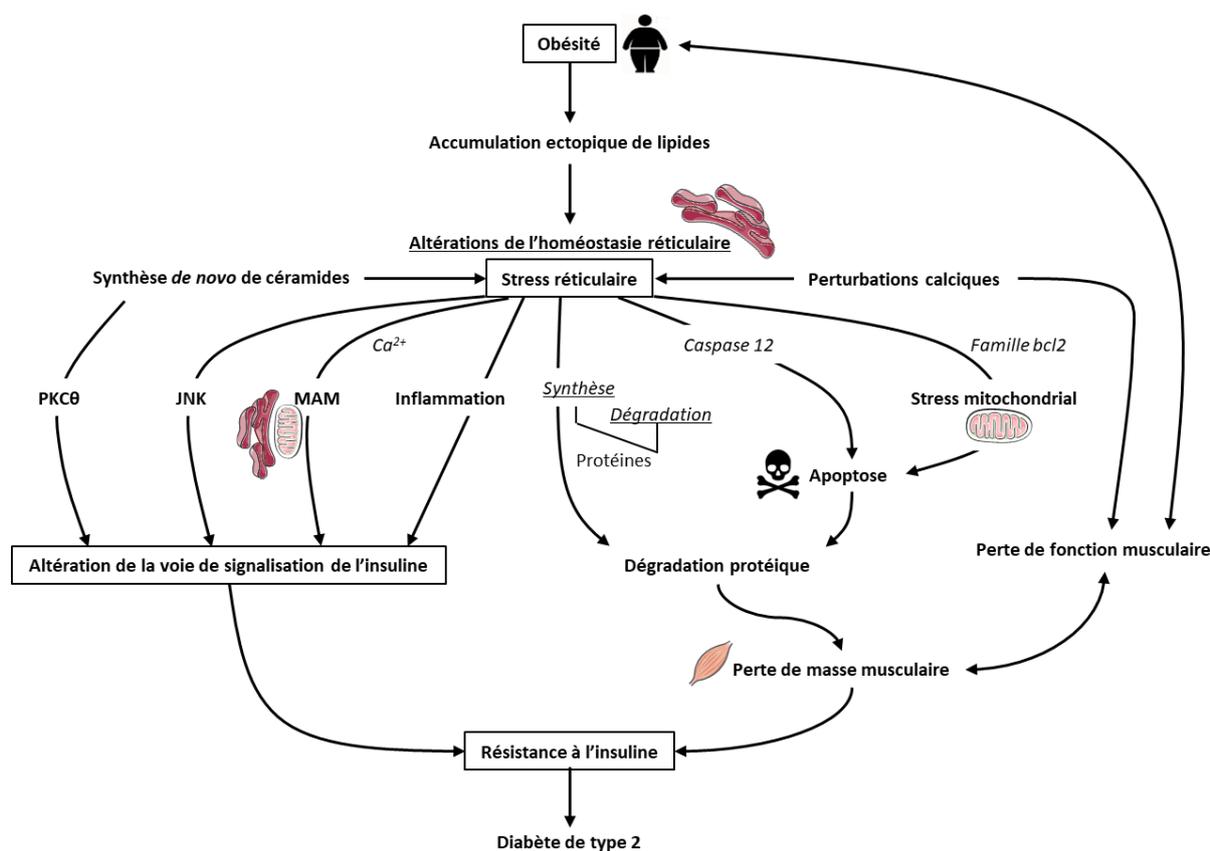


Figure 29 : Récapitulatif des altérations du réticulum endoplasmique du muscle squelettique dans les pathologies métaboliques

3.2. La myopathie de Duchenne

3.2.1. Définition générale

Le terme myopathie rassemble un large éventail de maladies musculaires dégénératives d'origine génétique, inflammatoire, infectieuse, métabolique, endocrinienne, toxique ou idiopathique (pour une revue de la littérature, voir (Chawla, 2011).

La myopathie de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des dystrophies musculaires, affectant environ 1 garçon sur 3500 à travers le monde (Moat et al., 2013). Cette maladie génétique, liée au chromosome X et causée par la délétion d'exons (majoritairement mais sont également observées substitutions, insertions ou duplications de nucléotides et modifications d'épissage) dans le gène codant pour la dystrophine entraîne l'absence de protéine fonctionnelle (Morales and Mahajan, 2018). Le défaut de dystrophine provoque la désorganisation générale du complexe protéique associé à la dystrophine (Morales and Mahajan, 2018), qui est essentiel dans la connexion entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (cf. partie 1.1.4.6.). Ainsi, la myopathie de Duchenne se caractérise par une perte de structure des muscles squelettiques et cardiaque. Cette atteinte conduit à une dégénérescence progressive et irréversible des muscles conduisant à la mort prématurée des malades par cardiomyopathie ou principalement par insuffisance respiratoire (Morales and Mahajan, 2018). Le diagnostic s'effectue généralement par le dosage des taux sériques de créatine kinase, indicateurs de la dégénérescence musculaire (Zatz et al., 1991). Depuis 1970 et le développement de l'assistance ventilatoire pour les malades, l'espérance de vie des myopathes de Duchenne a été portée en France à 40,95 ans contre 25,77 ans auparavant

(Kieny et al., 2013). La dénomination de myopathie de Becker est appliquée aux formes modérées de la myopathie de Duchenne.

3.2.2. Les modèles animaux de la myopathie de Duchenne

Il existe plusieurs modèles animaux qui récapitulent plus ou moins fidèlement les caractéristiques physiopathologiques de la myopathie de Duchenne chez l'Homme (Larcher et al., 2014) (Figure 30).

	DMD patient	GRMD dog	DMD pig	HFMD cat	Mdx mouse	<i>Dmd^{mdx}</i> rat
Muscle histopathology						
Revertant fibers	1 to 3%	<1%	ND	ND	5%	5%
Necrotic fibers	0.5 to 3.5%	2%	absent	present	5%	>10%
Regeneration	ND	15%	ND	present	10%	10%
Calcification	mild	mild to marked	ND	severe	mild	absent
Fibrosis	marked	present	present	diaphragm mainly	late & mainly diaphragm	marked
Lipomatosis	severe	absent	absent	absent	absent	mild
Cardiomyopathy	marked, major cause of death	mild	absent	present	absent or late	marked
Muscle function						
Strength reduction	marked	marked	ND	ND	mild	marked
Locomotion	severely impaired	impaired	impaired	ND	normal	impaired

Figure 30 : Tableau comparatif des modèles animaux de la myopathie de Duchenne par rapport à la pathologie humaine (Larcher et al., 2014)

Le modèle animal le plus couramment utilisé et le mieux caractérisé par la communauté scientifique pour étudier la myopathie de Duchenne est la souris invalidée pour le gène de la dystrophine (*mdx*) et ce, malgré un phénotype plus modéré que chez l'humain (Larcher et al., 2014). Ceci s'explique par la compensation par l'utrophine, homologue de la dystrophine chez la souris, qui n'existe pas chez l'Homme (Deconinck et al., 1997). Depuis quelques années, la remise en cause du modèle *mdx* a permis l'émergence du modèle d'invalidation homozygote ou hétérozygote de l'utrophine (*utr*) associé à l'absence de la dystrophine, respectivement *mdx/utr^{-/-}* et *mdx/utr^{+/-}*, au phénotype musculaire plus sévère tant sur le plan histologique (Gutpell et al., 2015) (Mázala et al., 2015) que fonctionnel (Capote et al., 2010) (McDonald et al., 2015). La relative fragilité et la très faible espérance de vie des souris homozygotes *mdx/utr^{-/-}* (environ 3 mois) (McDonald et al., 2015) restreignent leur potentiel d'étude et rend le modèle *mdx/utr^{+/-}* plus adapté à la recherche scientifique.

3.2.3. Atteintes musculaires générales

L'absence de la dystrophine génère un grand nombre d'altérations musculaires qui concourent au catabolisme et à la dégénérescence du muscle. En effet, dès l'âge de 6-7 semaines, l'augmentation du degré d'oxydation du glutathion (disulfure de glutathion, GSSG) révèle peut-être les prémices de l'apparition d'un stress oxydant dans le muscle gastrocnémien de souris *mdx* comparativement à des souris contrôles (Hulmi et al., 2016). De plus, les fibres issues de muscles *flexor digitorum brevis* de souris *mdx* de 5 à 8 semaines présentent une activation plus importante de l'autophagie (protéines LC3II et p63) et de la

mitophagie (ARNm et protéines Phosphatase and TENsin homolog (PTEN)-induced kinase 1 (Pink) et Parkin) par rapport à des souris contrôles (Valladares et al., 2018). Néanmoins, le fait d'augmenter davantage le niveau d'autophagie dans les muscles de souris *mdx* mâles de 6 semaines au moyen d'un traitement à l'AICAR (500mg/kg/jour, 5 jours/7, 4 semaines) augmente la force maximale générée par le diaphragme (Pauly et al., 2012), soulignant l'importance d'un niveau physiologique d'autophagie. La fibrose musculaire est en outre augmentée dans le diaphragme de souris *mdx* de 5 mois comme le montre l'accroissement des dépôts de collagène au sein de l'EDL (Moorwood and Barton, 2014). Par ailleurs, la dégénérescence musculaire, estimée par marquage histologique des IgG est très nettement supérieure dans les muscles EDL de souris *mdx* de 5 mois par rapport aux souris contrôles saines (Moorwood and Barton, 2014). L'invalidation de la dystrophine impacte aussi l'aire des fibres puisque comparativement à des souris contrôles, les souris *mdx* de 6 à 7 semaines se caractérisent par une plus forte proportion de fibres inférieures à 600 μ m² dans le muscle *gastrocnemius* (Hulmi et al., 2016). Cependant, une autre étude signale que la surface des fibres et la masse brute de l'EDL sont augmentées à 5 et 12 mois chez la souris *mdx* par rapport à la souris contrôle (Moorwood and Barton, 2014). De plus, la masse brute des *tibialis anterior*, *soleus*, *plantaris* est augmentée dans les modèles *mdx* et *mdx/utr*^{-/-} à l'âge de 3 mois (Mázala et al., 2015). A noter que seules les souris *mdx/utr*^{-/-}, dont le phénotype est plus marqué, présentent une élévation de la masse de l'EDL. En conséquence, les souris *mdx* présentent une réduction de la force développée au grip test (Hulmi et al., 2016). La force musculaire spécifiquement développée par l'EDL est significativement réduite chez les souris *mdx* à 5 mois et 1 an d'âge par rapport à des souris contrôles (Moorwood and Barton, 2014).

Pour rétablir son homéostasie, le muscle abîmé entame un processus de régénération musculaire. En effet, dès l'âge de 2 mois, les muscles du diaphragme, du soleus et du tibialis antérieur de souris *mdx* mâles présentent une proportion de fibres centro-nuclées considérablement accrue (60, 64 et 54% respectivement) par rapport aux souris contrôles ($\leq 1\%$) (Pertille et al., 2010). Ce constat se confirme dans le muscle EDL de souris *mdx* de 5 mois (40% contre 5% dans les muscles sains) (Moorwood and Barton, 2014).

Nous décidons de nous intéresser davantage aux altérations ayant attrait à l'homéostasie calcique et réticulaire du muscle squelettique dystrophique.

3.2.4. Altérations de l'homéostasie calcique

3.2.4.1. Canaux de la membrane plasmique

L'expression protéique du canal Cav1.1 (DHPR) est drastiquement réduite dans les muscles *flexor digitorum brevis* de souris *mdx* âgées de 5 à 7 semaines, altérant la réponse calcique des fibres musculaires à une stimulation électrique (Valladares et al., 2013). Paradoxalement, la quantité protéique de la sous-unité DHPR $\alpha 2\delta 2$ est retrouvée dans le muscle EDL de souris *mdx* mâles âgées de 20 à 24 semaines alors que les autres sous-unités du canal ($\alpha 1$, $\beta 1$, et $\alpha 2\delta 1$) ne varient pas (Schertzer et al., 2008). Néanmoins, une autre étude montre que la quantité globale du canal n'est pas significativement modifiée dans le muscle EDL des souris *mdx* mâles âgées de 6 mois par rapport aux souris contrôles (Horvath et al., 2016).

Une augmentation de l'expression protéique de STIM1 et ORAI1, les principaux canaux impliqués dans la réponse Store-Operated Calcium Entry (SOCE) est observée dans les muscles EDL de la souris *mdx* (sans précision d'âge ni de sexe) par rapport aux souris contrôles (Edwards et al., 2010). La réponse SOCE correspond à l'entrée calcique du milieu extracellulaire vers le cytosol en conséquence de la vidange calcique du réticulum

endoplasmique (Qiu and Lewis, 2019). ORAI1 est le senseur calcique réticulaire qui interagit avec STIM1 localisé à la membrane sarcolemmale. Il s'avère que la réponse SOCE est augmentée dans les muscles EDL de souris *mdx* (Edwards et al., 2010). Un accroissement de la protéine STIM1 est également retrouvée dans le quadriceps de souris mâles *mdx* (Goonasekera et al., 2014). De manière intéressante, la surexpression d'une protéine ORAI1 dominant-négative réduit le pourcentage de fibres centro-nuclées dans le soléus, diaphragme et quadriceps ainsi que les taux sériques de créatine kinase et augmente la durée de course de souris *mdx* mâles (Goonasekera et al., 2014). Cependant, la force isométrique générée par le tibialis antérieur est paradoxalement significativement réduite (Goonasekera et al., 2014).

De plus, les canaux calciques inactivées par l'étirement (Franco and Lansman, 1990) et les canaux de fuite calcique (Fong et al., 1990) situés à la membrane sarcolemmale présentent une probabilité d'ouverture plus importante dans des myotubes issues de souris *mdx* comparativement aux souris contrôles saines. La perturbation du potentiel de membrane causée par l'absence de dystrophine fonctionnelle expliquerait l'altération de la fonction des canaux calciques de la membrane sarcolemmale dont l'activité est dépendante du potentiel de membrane (pour revue (Allard, 2006)).

3.2.4.2. RyR

La quantité de protéines RyR est augmentée dans les muscles fœtaux (E18) de souris *mdx* par rapport à des souris contrôles (Farini et al., 2016). Le même constat est réalisé dans les muscles fœtaux humains DMD de 12 semaines (Farini et al., 2016). Néanmoins, à 6 mois, 2 études indépendantes affirment que la quantité protéique du canal RyR1 n'est pas modifiée dans le muscle EDL de souris *mdx* mâles (Horvath et al., 2016) (Schertzer et al., 2008).

A défaut d'observer la modification quantité protéique du canal RyR, les recherches avancent plutôt les preuves d'une altération fonctionnelle du canal dans le modèle *mdx*. En effet, le réticulum sarcoplasmique des souris C57BL/10*mdx* âgés de 4 et 11 semaines présente une fuite calcique spontanée plus importante que leurs homologues contrôles C57BL/10 (Divet and Huchet-Cadiou, 2002). Il est fait état que le seuil du SOICR (cf. partie 1) est diminué dans les muscles des souris *mdx* mâles de 2-4 mois ce qui accroît la fuite calcique du réticulum sarcoplasmique par les RyR (Cully and Launikonis, 2016). En conséquence, les microdomaines de fortes concentrations calciques (sparks), générés par la libération calcique par les canaux RyR, sont plus nombreux et importants dans les muscles *flexor digitorum brevis* de souris *mdx* de 3 mois comparativement à des souris contrôles (Cully and Launikonis, 2016). Suite à un exercice sur tapis roulant, la quantité de sparks calciques est également plus importante dans le muscle *flexor digitorum brevis* de souris *mdx* mâles de 6 à 8 semaines que dans les muscles issues d'animaux sains (Wang et al., 2005).

La stabilité du canal est également impactée par la déficience en dystrophine et participe à la fuite calcique. En effet, RyR1 est davantage soumis à la S-nitrosylation dans le muscle squelettique des souris *mdx* mâles (Bellinger et al., 2009). Ceci entraîne la dissociation de la calcium channel stabilizing binding protein-1 (calstabin-1) du canal et la fuite de celui-ci (Bellinger et al., 2009).

De manière intéressante, un traitement de 28 jours à 37,5mg/kg/jour au composé S107 qui se lie aux canaux RyR1 pour empêcher la dissociation des calstabin-1, inhibe la fuite calcique du réticulum sarcoplasmique, réduit les dommages histologiques des muscles de souris *mdx* mâles entraînant une amélioration de leur fonction musculaire et de leur performance à l'exercice (Bellinger et al., 2009). Un traitement avec un autre Rycal (stabilisateur de l'interaction RyR1-calstabin-1), le S48168/ARM210 à 50 mg/kg/jour pendant

12 semaines chez des souris *mdx* mâles de 4-5 semaines augmente la force musculaire intrinsèque du diaphragme sans pour autant réduire significativement les paramètres calciques (quantité calcique cytosolique et activité des calpaïnes) (Capogrosso et al., 2018).

Au contraire, une injection de dantrolène (40 mg/kg/jour, 1 injection par jour pendant 6 semaines), l'inhibiteur des canaux RyR, chez des souris *mdx* âgées de 4 semaines réduit logiquement la fonction musculaire enregistrée au grip test (Quinn et al., 2013). Ceci engendre pourtant la baisse du taux sérique de créatine kinase et la diminution de l'expression protéique de SERCA1 (Quinn et al., 2013).

3.2.4.3.IP3R

La quantité de protéines IP3R est augmentée dans les muscles fœtaux (E18) de souris *mdx* par rapport à des souris contrôles (Farini et al., 2016). Ceci est associé à une augmentation de la quantité d'IP3 (Farini et al., 2016). Le même constat est réalisé dans les muscles fœtaux humains DMD de 12 semaines (Farini et al., 2016).

La diminution de l'expression d'IP3R1 au moyen d'un shRNA dans le muscle *flexor digitorum brevis* de souris *mdx* âgées de 5 à 8 semaines rétablit les niveaux standards d'autophagie et de mitophagie ainsi que la structure et la dynamique des réseaux mitochondriaux (Valladares et al., 2018), sans pour autant évaluer le bénéfice éventuel sur la contractilité musculaire.

3.2.4.4.SERCA

Les microsomes issues de muscles *gluteus medius* de souris femelles âgées de 8 semaines C57BL/10SnJ et C57BL/10ScSn-mdx/J présentent une quantité de SERCA identiques (Kargacin and Kargacin, 1996). Une autre étude ne fait pas état de différence d'expression ou d'activité de SERCA dans le muscle *soleus* entre des souris mâles C57BL/10 et des C57BL/10*mdx* âgés de 4 et 11 semaines (Divet et al., 2005).

Cependant, une augmentation de la quantité protéique de l'isoforme lente SERCA2a est observée dans le muscle EDL des souris *mdx* mâles à l'âge de 4 semaines (Divet et al., 2005) et à 20-24 semaines (Schertzer et al., 2008). De manière intéressante, ce constat s'effectue également dans les muscles de souris *mdx/utr^{-/-}* âgées de 2 mois comparativement à des souris contrôles C57BL/10 (Schneider et al., 2013).

La quantité de la protéine SERCA1 est diminuée dans les muscles soleus et EDL de souris *mdx* mâles âgées de 2 mois alors qu'elle reste inchangée dans le tibialis antérieur (Ferretti et al., 2009). Cependant, deux autres études ne montrent pas de différence de quantité protéique de SERCA1 dans les muscles EDL de souris *mdx* mâles âgées de 6 mois (Horvath et al., 2016) (Schertzer et al., 2008).

Chez l'Homme myopathe de Duchenne, il a été montré que la quantité protéique de l'isoforme SERCA2a diminue de près de 60% dans le muscle quadriceps par rapport à des individus sains (Voit et al., 2017). L'expression des protéines SERCA1 et de la calsequestrine ne semblent à première vue que peu impactés (n=2/groupe) (Voit et al., 2017).

Depuis plus de 20 ans, la question de l'activité du canal SERCA dans la myopathie de Duchenne a été discutée. Dès 1996, Kargacin mesure la diminution de la vitesse maximale de capture du calcium par SERCA dans les muscles de souris *mdx* femelles âgées de 8 semaines (Kargacin and Kargacin, 1996). Plus récemment, il fut montré que l'activité de SERCA est significativement réduite dans les muscles soleus, quadriceps et diaphragme des souris *mdx*

âgées de 2 mois comparativement à des souris contrôles C57BL/10 (Schneider et al., 2013). De manière cohérente, la diminution de l'activité maximale de SERCA est significativement plus importante dans le modèle sévère de dystrophie *mdx/utr^{-/-}* que dans le modèle modéré *mdx* à l'âge de 2 mois (Schneider et al., 2013). Une équipe indépendante confirme que l'activité maximale de SERCA mesurée dans le diaphragme de souris *mdx* mâles âgées de 10 et 30 semaines, est inférieure à celle de souris contrôles C57BL/10 (Gehrig et al., 2012). Cependant, ces résultats sont nuancés par d'autres publications scientifiques. Actant certes la perte de liaison de SERCA pour l'ion calcique, il n'est pas relevé d'altération de l'activité de SERCA au sein de microsomes issus des muscles du dos et des jambes de souris *mdx* de 8 semaines (Culligan et al., 2002). Une autre étude ne fait pas état de différence d'activité de SERCA dans le muscle *soleus* entre des souris mâles C57BL/10 et des C57BL/10*mdx* âgés de 4 et 11 semaines (Divet et al., 2005).

Il a été montré que la chaperonne Hsp72 se lie à SERCA afin de maintenir son activité dans des conditions de stress inflammatoire (Tupling et al., 2004). L'augmentation de l'expression de la Hsp72 ou son activation pharmacologique par un traitement de 7 semaines au BGP-15 permet la restauration de l'activité SERCA et l'amélioration musculaire visualisée tant sur le plan histologique que fonctionnel de souris *mdx* et *mdx/utr^{-/-}* mâles (Gehrig et al., 2012). De plus, la surexpression de SERCA1 dans le muscle squelettique de souris *mdx* améliore la libération calcique suite à une stimulation électrique du *flexor digitorum brevis* ainsi que leur phénotype musculaire général (taux de créatine kinase, nombre de fibres centro-nuclées, fibrose) (Goonasekera et al., 2011). Ces résultats sont confirmés dans le modèle de souris *mdx* et *mdx/utr^{-/-}* âgées de 3 mois (Mázala et al., 2015).

Pour expliquer cette perte d'activité de SERCA, diverses hypothèses ont été avancées. En premier lieu, le stress oxydant eu égard au fait que la capacité contractile des fibres issues du muscle du diaphragme de souris *mdx* est davantage affectée par un stress oxydant induit par un traitement au peroxyde d'hydrogène que des fibres extraites de muscles contrôles (Lafoux et al., 2006). Ceci s'associe à une diminution plus importante de la recapture calcique par le réticulum sarcoplasmique (Lafoux et al., 2006).

En second lieu, la *de novo* lipogenèse réticulaire (partie 2) par une étude souligne la forte intrication de la diminution de l'activité de SERCA dans le muscle dystrophique avec l'altération de la *de novo* lipogenèse réticulaire (Paran et al., 2015). En effet, la *de novo* lipogenèse est diminuée dans le muscle du diaphragme de souris mâles *mdx-4Cv* de 3 mois comparativement à des souris contrôles C57BL/6J, ce qui est associé avec une modification importante du phospholipidome (Paran et al., 2015). La surexpression de trois gènes codant pour les enzymes de la lipogenèse Fatty Acid Synthase (FAS), Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) et Lipin1 restaure partiellement l'activité de SERCA chez des myotubes extraits des souris *mdx* (Paran et al., 2015).

3.2.4.5. Sarcolipine

La communauté scientifique s'accorde sur la hausse de l'expression de la sarcolipine, un petit peptide inhibiteur de SERCA, dans les modèles murins de la myopathie de Duchenne. En effet, la quantité protéique de sarcolipine est augmentée dans le muscle *soleus*, *quadriceps* et diaphragme de souris *mdx* âgées de 2 mois comparativement à des souris contrôles C57BL/10 (Schneider et al., 2013). Le même constat est observé dans des muscles EDL de souris *mdx* mâles âgées de 20-24 semaines (fold de 4,5) (Schertzer et al., 2008). De manière intéressante, le phénotype calcique est directement lié à la sévérité des symptômes

dystrophiques puisque les souris *mdx/utr^{-/-}* possèdent une quantité de sarcolipine encore plus importante que les souris *mdx* (fold 2,4) à l'âge de 2 mois (Schneider et al., 2013). Ce constat fut réalisé plus récemment par une autre équipe qui montre que l'expression de la sarcolipine est considérablement augmentée dans le muscle squelettique des souris *mdx* âgées de 3-4 mois (sans précision de sexe) (Voit et al., 2017). Là encore, l'expression de la sarcolipine est corrélée avec le degré de sévérité de la myopathie, les souris *mdx/utr^{-/-}* présentant un doublement de leur quantité de sarcolipine musculaire par rapport à des souris *mdx* (Voit et al., 2017).

Des souris *mdx* âgées de 20 semaines invalidées ou hétérozygotes pour la sarcolipine présentent une amélioration de leur phénotype musculaire dystrophique par rapport à des souris contrôles *mdx* (Tanihata et al., 2018). En effet, lorsque la masse du muscle *soleus* et le taux sérique de créatine kinase diminue, la performance au grip test et au tapis de course augmentent (Tanihata et al., 2018). Ces résultats sont confirmés dans le modèle plus sévère *mdx/utr^{-/-}* sur des souris mâles et femelles de 3-4 mois (Voit et al., 2017). L'activité de SERCA y est restaurée et la physiopathologie des muscles squelettiques (activité calpaïne, fibrose, nécrose et régénération) s'améliore (Voit et al., 2017). La force développée à un grip test augmente et les capacités contractiles de l'EDL et du diaphragme sont améliorés (Voit et al., 2017). Finalement, ces bénéfices confèrent une augmentation de la durée de vie de ces souris (Voit et al., 2017). Une infection de 12 semaines médiée par un rétrovirus permettant la diminution de l'expression de la sarcolipine (de l'ordre de 78%) via un short hairpin RNA (shRNA) récapitule ces effets bénéfiques chez des souris *mdx/utr^{-/-}* âgées d'un mois (Voit et al., 2017). A noter que l'invalidation totale de la sarcolipine dans ce modèle présente des effets bénéfiques minorés (Voit et al., 2017). Une étude va même plus loin en démontrant l'aggravation du phénotype musculaire de la souris *mdx* de 3 à 6 mois par la délétion totale de la sarcolipine (Fajardo et al., 2018). En témoignent l'augmentation du taux sérique de créatine kinase, la diminution de l'aire des fibres du diaphragme et du *soleus* ainsi que de l'activité physique totale mesurée par cage métabolique (Fajardo et al., 2018). Ceci souligne l'importance physiologique d'une expression protéique adéquate de la sarcolipine.

Chez l'Homme, des biopsies musculaires ont permis de montrer que les patients myopathes de Duchenne présentent une tendance à l'augmentation de l'expression de la sarcolipine dans leur muscle quadriceps (Voit et al., 2017).

La myoréguline, pourtant principal inhibiteur de SERCA dans le muscle squelettique sain (Anderson et al., 2015), n'a pas à ce jour été étudiée dans le contexte de la myopathie de Duchenne.

3.2.4.6. Contenu calcique réticulaire

L'altération fonctionnelle des canaux calciques réticulaires dans le contexte dystrophique laisse envisager une modification de la quantité calcique réticulaire et de la quantité ou de l'activité des protéines liant le calcium dans la lumière du réticulum endoplasmique.

La sarcalumenine (SAR), une protéine liant le calcium dans la lumière du réticulum endoplasmique est très diminuée (-70%) chez les souris *mdx* mâles à 6, 8 et 24 semaines comparativement aux souris contrôles (Dowling et al., 2004), soulignant une incapacité à retenir le calcium au sein réticulum endoplasmique. Il a par ailleurs été montré que la

sarcocalumenine interagit physiquement avec SERCA1 (Dowling et al., 2004) sans pour autant déterminer de quelle manière cette connexion pouvait ou non moduler l'activité du canal.

La quantité protéique de calséquestrine est augmentée dans le muscle du diaphragme (Barros Maranhão et al., 2015) et du tibialis antérieur (Barker et al., 2017) de souris *mdx* de 1 mois mais la différence avec les souris contrôles se perd à 2,5 mois (Barker et al., 2017), 5 et 8 mois (Barros Maranhão et al., 2015). D'autres travaux relèvent *a contrario* la diminution de la quantité protéique de la calséquestrine dans le diaphragme et le *soleus* de souris *mdx* mâles âgées de 2 mois mais ne note pas de différence dans le tibialis antérieur ni dans l'EDL (Pertille et al., 2010) (Ferretti et al., 2009). Dans le muscle quadriceps, il n'y a pas de variation d'expression protéique de la calséquestrine à 1, 5 et 8 mois (Barros Maranhão et al., 2015). L'absence de différence de quantité protéique de la calséquestrine est confirmée dans le muscle EDL de souris *mdx* mâles âgées de 6 mois (Horvath et al., 2016) (Schertzer et al., 2008). Plus tardivement, à 13 mois, une étude acte la diminution de la quantité protéique de calséquestrine dans le muscle du diaphragme de souris *mdx* (Maurício et al., 2017). Quant au modèle de souris *mdx/utr^{-/-}*, il présente un accroissement de l'expression de la calséquestrine musculaire à l'âge de 2 mois par rapport aux souris saines mais qui est non différent de souris *mdx* (Schneider et al., 2013).

La quantité de protéines « calséquestrine-like » (CLP, calsequestrin-like proteins) de 150, 170 et 220kDa est réduite dans les microsomes issus des muscles du dos et des jambes de souris *mdx* de 8 semaines alors que la quantité de calséquestrine reste au même niveau que les souris contrôles (Culligan et al., 2002).

L'expression protéique de la calmoduline, protéine liant le calcium dans le cytosol et le réticulum endoplasmique est diminuée dans le diaphragme et le tibialis antérieur de souris *mdx* mâles âgées de 2 mois (Pertille et al., 2010). Cependant, la même étude constate que la calmoduline est augmentée dans les muscles extra-oculaires et reste inchangée dans le *soleus* (Pertille et al., 2010). Malheureusement, la localisation de la calmoduline n'a à ce jour pas été étudiée dans ce contexte.

Au regard de la littérature, il est difficile de préjuger de la capacité de rétention calcique du réticulum endoplasmique. Toutefois, une étude souligne que la quantité calcique réticulaire totale n'est pas différente entre des souris mâles C57BL/10 et des C57BL/10*mdx* âgés de 4 et 11 semaines (Divet and Huchet-Cadiou, 2002).

3.2.4.7. Accumulation calcique cytosolique

La quantité calcique cytosolique est retrouvée augmentée de 25 à 140% dans les muscles de souris *mdx* (4 études) (Turner et al. 1988, 1991; Hopf et al. 1996; Tutdibi et al. 1999). La quantité calcique cytosolique des fibres isolées de muscles *flexor digitorum brevis*, estimée par marquage au Fura-2, est plus importante chez les souris *mdx* de 3 mois (Mázala et al., 2015). Mais surprenamment, ce n'est pas le cas dans le modèle *mdx/utr^{-/-}* (Mázala et al., 2015).

A l'âge de 13 mois, la quantité calcique totale contenue dans le muscle du diaphragme de souris *mdx* est plus importante par rapport aux contrôles (Maurício et al., 2017).

Des fibres isolées de muscles de fœtus humains de 12 semaines diagnostiqués pour la myopathie de Duchenne présentent déjà une accumulation anormale de calcium, telle que visualisée par marquage à l'alizarine red (Farini et al., 2016). La quantité de calcium intracellulaire y est en effet 4 fois plus importante que dans des biopsies musculaires de fœtus sains (Farini et al., 2016).

Le consensus scientifique sur ce point amena à la formulation de l'hypothèse calcique selon laquelle la toxicité calcique cytosolique participerait à la physiopathologie de la myopathie de Duchenne.

3.2.4.8. Activation des calpaïnes

Les calpaïnes sont des protéases cytosoliques dont l'activité est permise par l'élévation du calcium cytosolique.

Si à l'âge de 2 semaines, la quantité de calpaïnes est non différente entre souris *mdx* et contrôles C57Bl/6 (Spencer et al., 1995), dès 4 semaines, la quantité de m-calpaïne augmente dans les muscles du membre postérieur de la souris *mdx* (Spencer et al., 1995). A 14 semaines s'ajoute l'accroissement de la quantité des μ -calpaïnes (Spencer et al., 1995). Cependant, les augmentations semblent être dépendantes du muscle concerné. En effet, les souris *mdx* de 2 mois présentent une hausse de la quantité des m-calpaïnes dans le muscle *soleus* comparativement aux souris contrôles, quantité pourtant inchangée dans les muscles tibialis antérieur et EDL (Gokhin et al., 2014).

Quant à l'activité des calpaïnes, l'étude originelle démontre leur décroissement dans les muscles quadriceps et gastrocnémien de souris *mdx* âgées de 5 à 12 mois bien que la quantité de calpaïnes y soit augmentée (Spencer and Tidball, 1992). Au contraire, dans une autre étude, l'activité enzymatique des calpaïnes dans le muscle des souris *mdx* ne se distingue uniquement des muscles des souris contrôles que par la hausse de l'activité des μ -calpaïnes à 4 semaines (Spencer et al., 1995). Un retour au niveau de l'activité contrôle étant constaté à 14 semaines (Spencer et al., 1995). La localisation sarcolemmale des calpaïnes m et μ augmente dans les muscles des segments postérieurs des souris *mdx* âgées de 14 semaines par rapport à des souris contrôles (Spencer and Tidball, 1996).

La surexpression de la calpastatine, inhibiteur spécifique et endogène des calpaïnes m et μ (Gailly et al., 2007), dans le muscle squelettique de souris *mdx* mâles âgées de 3-4 semaines réduit significativement la nécrose et la régénération musculaire des triceps et quadriceps (Spencer and Mellgren, 2002).

L'analyse de la structure protéique de l'utrophine révèle la présence de 8 sites potentiels de clivage par les calpaïnes (Courdier-Fruh and Briguet, 2006). Dans les cellules musculaires issues de biopsies de patients DMD, les produits de clivage de l'utrophine prédits par l'analyse informatique sont retrouvés par western-blot, indiquant un clivage effectif de l'utrophine par les calpaïnes (Courdier-Fruh and Briguet, 2006). De plus, l'inhibition de l'activité des calpaïnes par les composés MDL-2817017 ou A-70525318 protège de la dégradation de l'utrophine (Courdier-Fruh and Briguet, 2006). Ainsi, ce résultat suggère que la toxicité calcique contribuerait à la fragilité sarcolemmale musculaire des myopathes.

3.2.5. Anomalies conformationnelles, stress réticulaire et réponse aux protéines mal-conformées

Les troubles de l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique observés dans le modèle *mdx* sont susceptibles de générer un stress réticulaire et la réponse aux protéines mal-conformées.

Le diaphragme de souris *mdx* mâles présente une augmentation de l'expression protéique de BiP à 4, 10 et 26 semaines (Pauly et al., 2017). Cette observation s'effectue aussi

dans le muscle EDL de souris *mdx* de 5 mois (Moorwood and Barton, 2014). Par ailleurs, il est rapporté que des souris *mdx* mâles âgées de 6 à 7 semaines présentent un accroissement significatif des niveaux d'ARNm de *Xbp1s* et *Atf6b* et de la quantité de protéines PERK, PDI, IRE1 α , GRP75, eIF2 α et p-eIF2 α dans le muscle gastrocnémien, sans toutefois de variation transcriptomique ou protéique de BiP (Hulmi et al., 2016). La phosphorylation de JNK, connue pour être activée par la voie IRE1 (cf. section 2), est accrue dans les muscles tibialis antérieur de souris *mdx* âgés de 5 mois (Moorwood and Barton, 2014).

Chez l'Homme, la quantité protéique de la chaperonne BIP est retrouvée accrue (entre 2 et 40 fois) dans les biopsies de muscles *quadriceps* de patients atteints de la myopathie de Duchenne âgés de 5 à 8 ans (Moorwood and Barton, 2014).

La réponse aux protéines mal-conformées est capable d'induire un ensemble de voies de dégradation protéique et de dégénérescence musculaire, nous émettons l'hypothèse que le stress du réticulum endoplasmique participe à la physiopathologie musculaire de la souris *mdx*.

3.2.6. MAMs

Les MAMs (interactions IP3R1-VDAC1 et IP3R1-GRP75 par *in situ* PLA, sans modifications de la quantité globale de ces protéines) sont diminuées dans le muscle *flexor digitorum brevis* des souris *mdx* âgées de 10 semaines et ceci est associé à un stress réticulaire accru par rapport à des souris contrôles C57BL6 (Pauly et al., 2017). Le traitement à la chaperonne chimique TUDCA (IP, 500mg/kg, 5 jours/7, 4 semaines) permet la restauration des connexions RE-mitochondries, de l'import calcique mitochondrial et améliore la contractilité du diaphragme de ces souris *mdx* (Pauly et al., 2017). Cependant et de manière surprenante, la diminution du stress réticulaire est non actée significativement par le traitement.

En outre, la structure et la dynamique du réseau mitochondrial sont altérées dans les fibres isolées de muscles *flexor digitorum brevis* de souris *mdx* âgées de 5 à 8 semaines (Valladares et al., 2018).

3.2.7. Altérations métaboliques

Entre 4 et 10 semaines, les souris *mdx* voient leur masse corporelle s'accroître plus que des souris contrôles (Quinn et al., 2013). A 10 semaines, la masse corporelle des souris *mdx* est significativement plus importante (*ca.* 23g) que celle des souris contrôles (*ca.* 17g) (Quinn et al., 2013). Par ailleurs, une étude clinique montre qu'un traitement à l'agoniste de Hsp72, le BGP-15 (200 et 400mg 1 fois/jour pendant 28 jours), décrit pour augmenter l'activité de SERCA dans le muscle squelettique de la souris dystrophique (Gehrig et al., 2012) augmente la capture musculaire de glucose de patients humains insulino-résistants (Literáti-Nagy et al., 2009).

Les patients myopathes de Duchenne sont également sujets à une augmentation de la masse grasse (McDonald et al., 2005) (Skalsky et al., 2009) (Willig et al., 1993) (Saure et al., 2018), entraînant une obésité qui impacte plus de 50% des malades à l'âge de 13 ans (Willig et al., 1993). 29% des patients myopathes de Duchenne âgés de moins de 18 ans sont insulino-résistants (Saure et al., 2018). Une cohorte composée sans restriction d'âge montre qu'au moins 37% des patients myopathes de Duchenne présente une hypertryglycémie, 18% sont hyperglycémiques et 54% insulino-résistants (Rodríguez-Cruz et al., 2016). De plus,

le taux de leptine circulant, corrélé avec la masse grasse, augmente avec l'âge chez ces patients (Rodríguez-Cruz et al., 2016).

Nous avons montré que l'accumulation ectopiques de lipides dans le muscle, en particulier les céramides, peuvent induire un stress réticulaire (cf. section 3.1.3.). De manière intéressante, l'inhibition de la synthèse des céramides par un traitement au GW4869 (100 μ M, 10 jours, IP) améliore le phénotype de dystrophie musculaire de la souris *mdx* âgée de 6 semaines (taux sérique de créatine kinase, incorporation de la sonde Evans blue dans le tibialis antérieur et le diaphragme) (Matsuzaka et al., 2016).

3.2.8. Apoptose

L'expression génique de *Bim* et *Bax* est significativement réduite dans les fibres issues du muscle *flexor digitorum brevis* de souris *mdx* âgées de 5 à 7 semaines alors que les niveaux d'expression de p53 upregulated modulator of apoptosis (*Puma*) et de *Bcl2* restent similaires aux contrôles sains. La quantité protéique de procaspase-12, mais pas sa forme clivée, est augmentée dans les muscles tibialis antérieur de souris *mdx* âgés de 5 mois par rapport à des souris contrôles de même âge (Moorwood and Barton, 2014). De plus, le clivage de la caspase 3 est observé dans des cellules satellites musculaires issues des muscles de membres postérieurs de souris *mdx* âgés de 12 semaines et cultivées *in vitro* pendant 3 générations (Zhang et al., 2016).

L'ablation de la caspase 12 diminue significativement la quantité de protéine chaperonne BiP dans le muscle EDL de souris *mdx* de 5 mois, mais l'augmente dans le muscle tibialis antérieur (Moorwood and Barton, 2014). De plus, la fonction musculaire de l'EDL, réduite chez les souris *mdx*, ne diffère plus des contrôles sains (Moorwood and Barton, 2014). Enfin, la surface des fibres et la masse de l'EDL sont restaurés à des valeurs similaires aux souris non dystrophiques (Moorwood and Barton, 2014). La dégénérescence des fibres du muscle EDL, estimée par le marquage des IgG, est réduite de façon certaine grâce à l'invalidation génique de la caspase 12 (Moorwood and Barton, 2014). La surexpression du facteur anti-apoptotique *bcl-2* restaure l'homéostasie calcique en réduisant l'entrée calcique mitochondriale et en augmentant la fréquence des pics calciques à la membrane plasmiques et améliore le taux de survie des myotubes issues d'EDL de souris *mdx* traitées à la staurosporine (Basset et al., 2006). De manière intéressante, la chélation de l'IP3 protège également de la mort cellulaire des myotubes de souris *mdx* induite par la staurosporine (Basset et al., 2006).

Alors que la quantité de procaspase-4 n'est pas différente dans les muscles quadriceps des patients myopathes de Duchenne par rapport aux patients contrôles, la forme clivée de la caspase 4 n'est détectée que dans les muscles des patients malades (Moorwood and Barton, 2014).

3.2.9. Anomalies contractiles

Les différentes anomalies décrites précédemment (3.2.1. à 3.2.8.) impactent négativement et de manière synergique la contraction musculaire. En effet, la contraction musculaire maximale du *soleus* et de l'EDL induite par une stimulation à la caféine se trouve être significativement réduite chez les souris C57BL/10*mdx* âgés de 4 et 11 semaines

comparativement à des souris contrôles C57BL/10 (Divet and Huchet-Cadiou, 2002). De plus, l'amplitude du pic calcique cytosolique en réponse à un potentiel d'action est diminuée (-26%) dans les fibres rapides issues de muscles EDL de souris *mdx* âgées de 7 à 14 semaines (sans précision de sexe) par rapport aux souris contrôles (Hollingworth et al., 2008). Ceci correspond à une moindre quantité calcique libérée par le potentiel d'action (-9%) chez les souris *mdx* (Hollingworth et al., 2008). Le pourcentage de troponine liée au calcium est légèrement mais significativement diminué dans les fibres rapides issues de muscles EDL de souris *mdx* (91% contre 96% dans les fibres contrôles) (Hollingworth et al., 2008). Ces paramètres sont associées à une perte de capacité contractile de l'EDL suite à une secousse simple chez la souris *mdx* de 8 semaines (-10%) (Chan et al., 2007) et de 12 semaines (-33%) (Louboutin et al., 1995). Par ailleurs, la contraction tétanique du muscle lombrical de la main provoque une perte progressive de la force (-50% après 9 contractions) chez la souris *mdx* âgée entre 5,2 et 13 mois (sans précision de sexe), perte non visualisée chez la souris contrôle (Claflin and Brooks, 2008). Ceci s'explique par l'absence du retour homéostatique au taux de calcium cytosolique basal entre deux contractions rapprochées chez la souris *mdx* (Claflin and Brooks, 2008). De manière intéressante, l'application d'un milieu pauvre en calcium empêche la perte de force dans ces conditions de stimulation tétanique (Claflin and Brooks, 2008), soulignant, s'il le fallait, la forte intrication entre le calcium cytosolique et la contraction musculaire. De plus, la libération calcique maximale induite par une dépolarisation sarcolemmale est fortement diminuée (67%) dans le muscle *flexor digitorum brevis* de souris *mdx* de 8 à 18 semaines (sans précision de sexe) (Woods et al., 2005). Cette différence ne s'explique pas par une altération de la sensibilité au courant électrique, le pourcentage de réponse calcique par rapport à l'amplitude maximale mesurée en fonction de l'intensité de la dépolarisation étant identique entre animaux dystrophiques et contrôles (Woods et al., 2005). Enfin, la force musculaire générée par l'EDL suite à une dépolarisation est drastiquement réduite chez les souris *mdx* mâles âgées de 20 à 24 semaines par rapport aux souris saines (Schertzer et al., 2008).

Les multiples atteintes réticulaires observées chez la souris font l'objet de la figure 31.

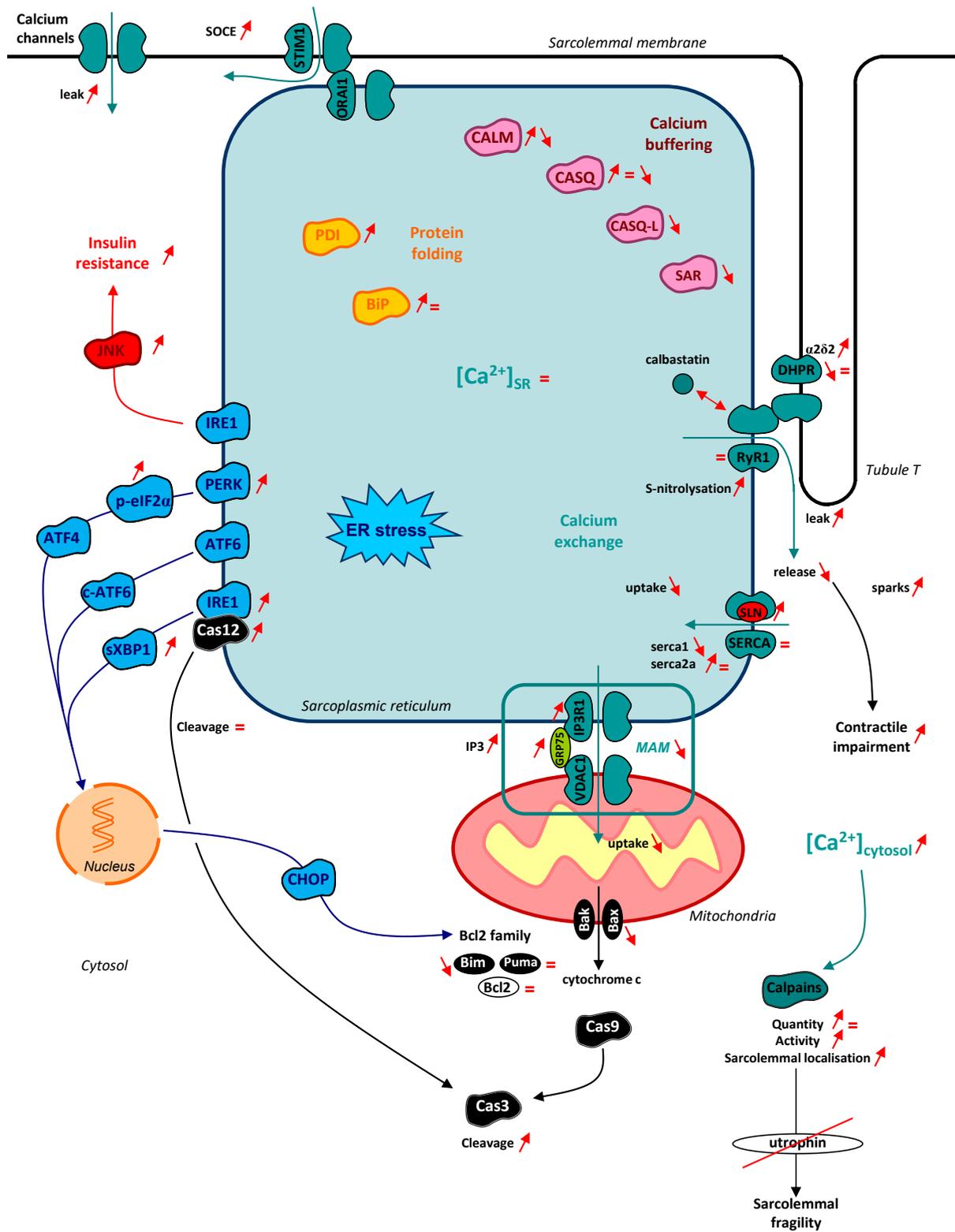


Figure 31 : Récapitulatif des atteintes de l'homéostasie calcique et réticulaires observées chez la souris *mdx*

3.2.10. Thérapies

Il n'existe à ce jour aucun traitement contre la myopathie de Duchenne, même si les avancées récentes de la thérapie génique entretiennent l'espoir des malades. L'objectif est la restauration de l'expression d'une forme fonctionnelle de la dystrophine au sein des muscles malades (mini ou microdystrophine), *via* des injections intramusculaires de virus (Chamberlain and Chamberlain, 2017). Néanmoins, les injections intramusculaires contribuent à la dégradation du muscle, d'autant plus chez des myopathes.

Les traitements aux corticostéroïdes permettent bien de limiter la perte de masse musculaire et d'augmenter les capacités ambulatoires mais ceux-ci amènent également nombre d'effets secondaires ; syndrome de Cushing, érythème, hirsutisme, augmentation de la masse corporelle, maux de tête et nasopharyngite (Griggs et al., 2016). (Reinig et al., 2017)

La piste de l'exercice physique est elle-même sujette à controverse. D'une part, il a été montré que l'exercice physique augmente les microruptures des fibres de souris myopathes (Spencer and Mellgren, 2002). D'autre part, l'accès libre à une activité physique 1 jour/2 pendant 8 semaines améliore la fonction et la pathologie musculaire de souris myopathes *mdx* femelles âgées de 17,5 mois (Kogelman et al., 2018). Ces résultats bénéfiques ont été retrouvés chez de jeunes patients humains chez qui la pratique de la bicyclette retarde l'altération de la fonction musculaire (Hyzewicz et al., 2015). A noter que des souris *mdx* de 6-7 semaines pouvant s'adonner à un exercice physique volontaire ne voient pas de modifications de l'expression protéique des marqueurs de stress réticulaire analysés (BIP, PDI, IRE1 α , eIF2 α , p-eIF2 α) dans leur muscle gastrocnémien comparativement à des souris *mdx* sédentaires (Hulmi et al., 2016).

Face à ce constat, émerge la nécessité d'identifier et de cibler, en dehors des sentiers battus traditionnels, de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'améliorer la fonction musculaire des patients humains myopathes de Duchenne, en ciblant en particulier les atteintes de l'homéostasie calcique et réticulaire.

4. LE RECEPTEUR NUCLEAIRE REV-ERB- α : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE POTENTIELLE

4.1. Rev-erb- α : un récepteur nucléaire répresseur de transcription, cible de ligands pharmacologiques

Identifié en 1989 par Mitchell Lazar (Lazar et al., 1989), le récepteur nucléaire Reverse strand of ERB α (Rev-erb- α) ou nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 (NR1D1) est un répresseur de transcription dont l'activité est modulable par son ligand naturel activateur l'hème (Raghuram et al., 2007) ou par des ligands pharmacologiques synthétiques (Kojetin and Burris, 2014).

La structure de Rev-erb- α (Kojetin and Burris, 2014) (Figure 32) se caractérise par la présence d'un domaine d'activation (Activation Function 1, AF1) indépendant de la fixation du ligand et liant des cofacteurs transcriptionnels au sein du domaine A/B en position N-terminale. Le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain, DBD, domaine C) permet l'association de Rev-erb- α avec sa séquence cible sur l'ADN ou Rev Response Element (RRE) de structure AGGTCA et généralement précédée par une séquence riche en A/T en 5'. Le DBD se présente en une structure particulière en forme de 2 doigts de zinc, autorisant son organisation en hélice α et l'interaction avec le grand sillon de la molécule d'ADN. Le DBD est relié au domaine de liaison au ligand (Ligand Binding Domain, LBD, domaine E) par une séquence charnière (domaine D). L'absence de domaine AF2 au sein du LBD, commun à la plupart des récepteurs nucléaires et impératif à la liaison de coactivateurs transcriptionnels, contraint Rev-erb- α au recrutement exclusif de corépresseurs de transcription tels que l'Histone Deacetylase 1 (HDAC1) et le Nuclear receptor Co-repressor 1 (NCoR1) (Yin and Lazar, 2005). Néanmoins, ce mode d'action canonique est remis en question par la découverte de gènes dont la liaison de Rev-erb- α sur leur promoteur accroît l'expression génique (Harding and Lazar, 1993) (Yang et al., 2016). L'action de Rev-erb- α s'effectue principalement de manière transcriptionnelle, sous forme de monomère ou d'homodimère mais Rev-erb- α agit également de manière non transcriptionnelle comme par exemple par son interaction avec des partenaires comme la O-GlcNAc transférase (OGT) (Berthier et al., 2018).

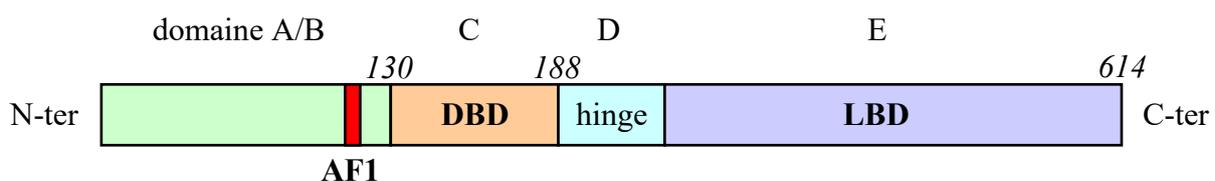


Figure 32 : Structure du récepteur nucléaire Rev-erb- α

Il existe une isoforme Rev-erb- β (Burke et al., 1996), qui présente une forte homologie de structure avec Rev-erb- α (Bonnelye et al., 1994) mais dont la fonction est à ce jour, moins décrite que celle de Rev-erb- α . Néanmoins, il est important de préciser que les ligands pharmacologiques (antagonistes ; SR8278 et agonistes ; SR9009, SR9011, GSK4112 par exemple) actuellement disponibles sur le marché qui ciblent Rev-erb- α modulent également l'activité de Rev-erb- β (Kojetin and Burris, 2014). La spécificité des agonistes envers les récepteurs Rev-erb est même remise en question (Trump et al., 2013). Dans l'attente du développement de ligands spécifiques du seul récepteur Rev-erb- α , les ligands offrent déjà des pistes thérapeutiques potentielles attractives. Citons pour exemple, l'utilisation de

l'antagoniste SR8278 qui pourrait trouver une relevance clinique dans le traitement des infarctus du myocarde. Une étude récente souligne en effet les conséquences post-opératoires négatives plus importantes chez des patients opérés le matin, au moment où l'expression de Rev-erb- α est maximale (Montaigne et al., 2018). Les effets bénéfiques du SR8278 dans ce contexte ont été déjà démontrés chez la souris (Montaigne et al., 2018).

4.2.Rev-erb- α , acteur du rythme circadien et régulateur du métabolisme

Les rythmes circadiens (du latin *circa*, environ et *dies*, le jour) contrôlent de nombreux paramètres physiologiques en autorisant l'adaptation du corps humain aux variations environnementales occasionnées par la photopériode terrestre de 24h (Duez et al., 2013). Les processus antagonistes inhérents aux alternances physiologiques veille/sommeil et prise alimentaire/jeûne sont ainsi régulés par les rythmes circadiens (Dibner and Schibler, 2015) (Figure 33).

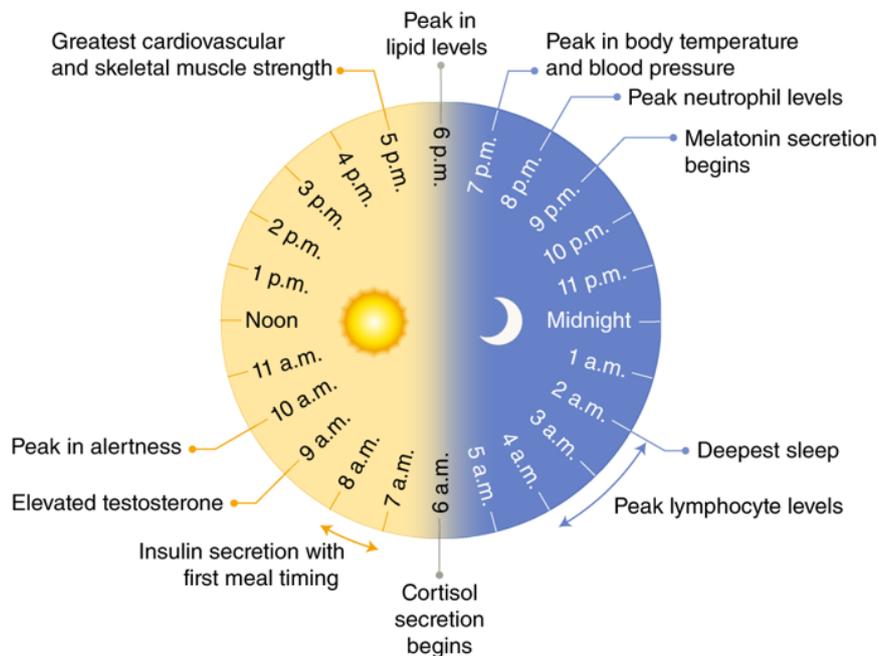


Figure 33 : Variations physiologiques générées par les rythmes circadiens (Masri and Sassone-Corsi, 2018)

L'horloge circadienne centrale siège dans le noyau suprachiasmatique hypothalamique et se compose de boucles d'autorégulation transcriptionnelle (Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2013) (Figure 34), identifiées par Rosbach, Hall et Young, Prix Nobel de Médecine 2017. La première boucle transcriptionnelle est menée par les protéines Brain and Muscle Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-like protein (ARNT)-Like protein-1 (BMAL1) et Circadian Locomotor Output Cycles Protein Kaput (CLOCK) qui forment un hétérodimère se fixant sur les séquences E-Box des promoteurs des gènes cibles Period (Per) et Cryptochrome (Cry) afin d'activer leur transcription. Une fois traduits, PER et CRY s'associent, transloquent dans le noyau et inhibent l'activité transcriptionnelle de BMAL1/CLOCK. L'AMPK et la casein kinase I epsilon (CKI ϵ) phosphorylent et dégradent PER et CRY, régulant ainsi le contrôle négatif sur le complexe BMAL1/CLOCK. De plus, Rev-erb- α et Retinoic acid-related orphan receptor α (ROR α), deux cibles transcriptionnelles

de BMAL1, réprime et active, respectivement, la transcription du gène *BMAL1*, formant la seconde boucle de régulation transcriptionnelle. ROR est un facteur de transcription activateur qui entre en compétition avec Rev-erb- α sur les mêmes éléments de réponse RRE ou ROR Response Elements (RORE) (Duez and Staels, 2009).

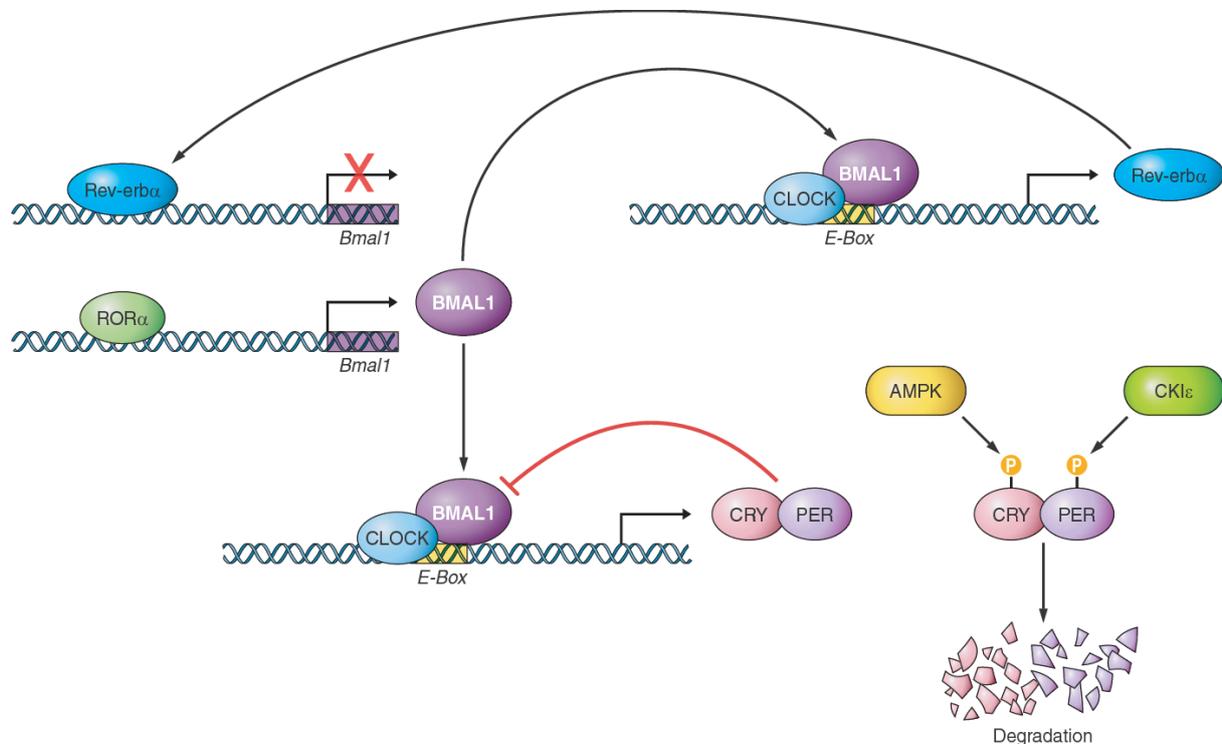


Figure 34 : Boucles de régulations transcriptionnelles de l'horloge biologique (Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2013)

Dans l'étude des rythmes circadiens, il est question des notions de zeitgeber (ZT, donneur de temps) et de circadian time (CT) (Vitaterna et al., 2001). Dans des conditions expérimentales d'alternance de 12h en lumière et 12h en obscurité, la lumière agit comme un zeitgeber c'est à dire un signal permettant de resynchroniser l'horloge centrale. ZT0 se réfère au début du jour dans un cycle entraîné et ZT12 est le début de la nuit. En l'absence de lumière, il existe une persistance des rythmes circadiens au cours du temps. Le CT est une notation normalisée sur 24 heures qui représente une estimation du temps subjectif de l'organisme. CT0 indique le début d'un jour subjectif, et CT 12 est le début d'une nuit subjective. Par exemple, le début du jour subjectif peut correspondre au début de l'activité physique volontaire.

Chez le rongeur, animal nocturne, les rythmes circadiens sont inversés par rapport à l'Homme et l'expression génique de Rev-erb- α est maximale à « zeitgeber time » 8 (ZT8, soit 8h après la transition obscurité/lumière) et se trouve à son minimum à ZT20 dans le muscle squelettique quadriceps (Yang et al., 2006) (Yang et al., 2012). L'expression de la protéine Rev-erb- α , correspond peu ou prou à la rythmicité de l'ARNm, avec un zénith à ZT6 (Koyanagi et al., 2006), et un nadir à ZT16 dans le muscle squelettique. En conditions d'obscurité constante, l'expression protéique de Rev-erb- α est maximale à CT8 (Guillaumond et al., 2005) et minimale à CT18. La délétion de Rev-erb- α chez la souris provoque une

réduction de la longueur de la période de l'activité physique volontaire d'environ 30 minutes dans l'obscurité constante (Preitner et al., 2002).

Si l'horloge centrale est synchronisée par la lumière extérieure *via* la rétine, les horloges périphériques sises au sein des organes métaboliques sont davantage synchronisées par l'alimentation (Duez and Staels, 2009) (Figure 35). Le lien entre métabolisme et horloge circadienne (pour revue, (Bass, 2012)) est permis par la sensibilité de la sirtuine 1 (SIRT1) et de l'AMPK au statut métabolique de l'organisme. En effet, SIRT1, une histone désacétylase de classe III, nécessite le NAD^+ comme cofacteur pour son activité enzymatique (Revollo et al., 2004). Produit du cycle de Krebs, de la glycolyse et de la β -oxydation des acides gras, le NADH est oxydé en NAD^+ par le complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale pendant la phosphorylation oxydative. Pendant le jeûne, les niveaux de NAD^+ augmentent et l'activité de SIRT1 est élevée (Rodgers et al., 2005). Le complexe BMAL1/CLOCK/SIRT1 active l'expression génique de la nicotinamide (NAM) phosphoribosyl transférase (NAMPT), enzyme catalysant la transformation du NAM en nicotinamide mononucleotide (NMN), NMN qui deviendra ensuite le NAD^+ par l'action des nicotinamide mononucleotide adenylyl transférases (NMNAT1, 2 et 3) (Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2009) (Figure 36). En parallèle, l'AMPK, activée en situation de jeûne, conduit à la phosphorylation et à la dégradation protéasomique de la protéine Cry (Lamia et al., 2009).

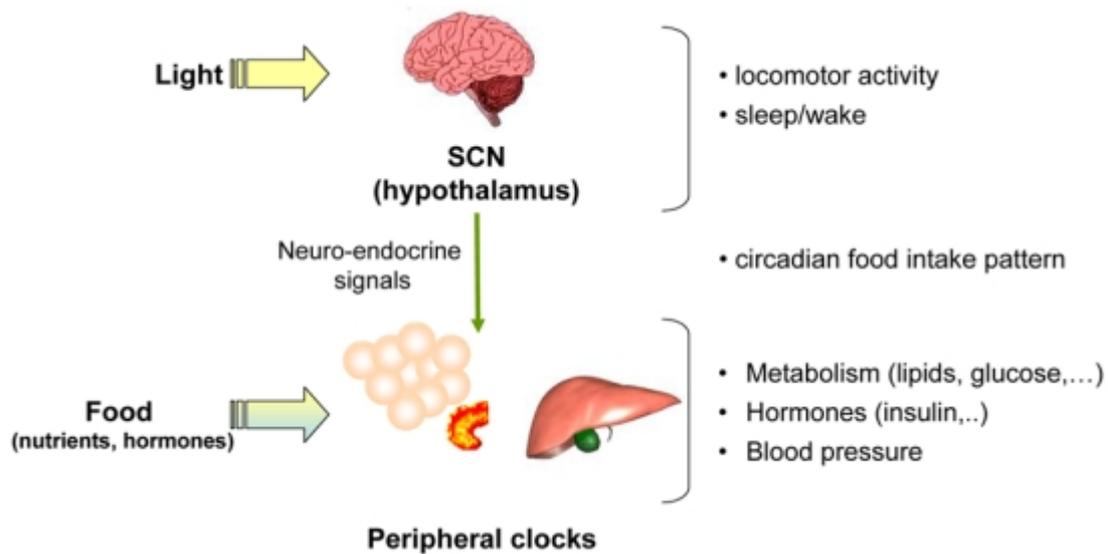


Figure 35 : Horloge centrale et horloges périphériques (Duez and Staels, 2009)

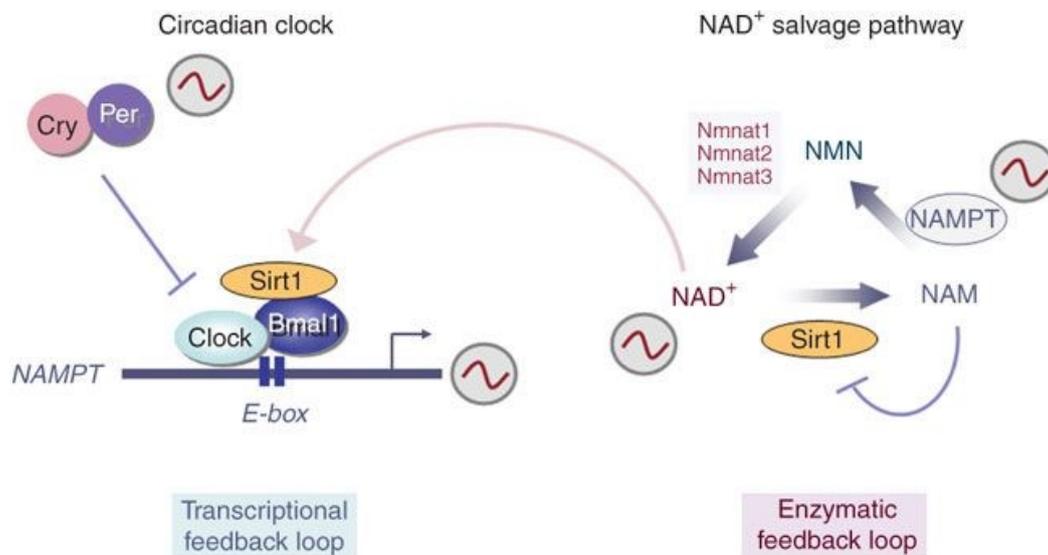


Figure 36 : Intrication moléculaire de l’horloge circadienne et du métabolisme par SIRT1 (Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2009)

Du fait de cette forte intrication, tout dérèglement de l’horloge biologique peut conduire à des perturbations métaboliques. En effet, il est démontré que les horaires postés prédisposent au développement du syndrome métabolique (Li et al., 2011). Ainsi, des souris invalidées pour Rev-erb- α présentent des paramètres métaboliques altérés (dyslipidémie, hyperglycémie, etc.) (Duez and Staels, 2009). De manière intéressante, un traitement avec l’un des agonistes des Rev-erb, le SR9009 en injection intrapéritonéale biquotidienne (100mg/kg à ZT0 et ZT12) améliore le statut métabolique (diminution de la masse corporelle, de la masse grasse, de la dyslipidémie et de l’hyperglycémie) de souris âgées de 20 semaines nourries durant 14 semaines avec un régime riche en graisses, *via* une augmentation de la dépense énergétique (augmentation de l’oxydation du glucose et des acides gras) en particulier au niveau des muscles squelettiques (Solt et al., 2012).

Au carrefour de l’horloge circadienne et du métabolisme, le récepteur nucléaire Rev-erb- α joue en parallèle une multitude d’autres fonctions physiologiques capitales (Everett and Lazar, 2014) (Figure 37) ; citons pour exemple la régulation de l’inflammasome Nucleotide Oligomerization Domain (NOD)-like receptor family, pyrin domain containing 3 (Nlrp3) par Rev-erb- α (Pourcet et al., 2018).

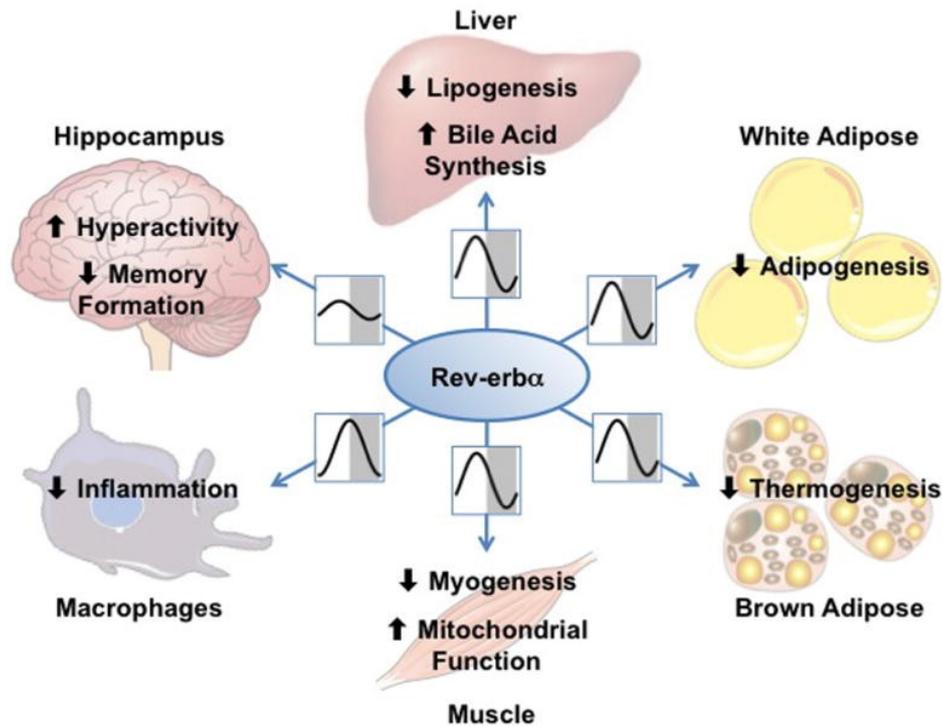


Figure 37 : Fonctions physiologiques de Rev-erb- α (Everett and Lazar, 2014)

4.3.Rev-erb- α et homéostasie calcique

Les liens éventuels unissant Rev-erb- α à l'homéostasie calcique sont très peu documentés et distants de notre sujet. Une étude montre que l'expression génique du canal calcique Cav1.2 est rythmique et est régulée par Rev-erb- α dans le cerveau (Schmutz et al., 2014). L'expression de Cav1.2 est indispensable aux variations circadiennes de l'activité locomotrice de la souris (Schmutz et al., 2014). Par ailleurs, l'agoniste des Rev-erb GSK4112 accroît la sécrétion de glucagon de cellules α -pancréatiques *via* une augmentation du calcium cytosolique en réponse à une stimulation avec une faible concentration de glucose (0,5mM) (Vieira et al., 2013). Le SR8278, antagoniste de Rev-erb, produit l'effet opposé (Vieira et al., 2013). Une forte concentration en glucose (11mM) entraîne une activation de la voie de signalisation AMPK/NAMPT/SIRT1 qui aboutit à l'expression de Rev-erb- α et à l'inhibition de la sécrétion de glucagon (Vieira et al., 2013). Le mécanisme d'action de Rev-erb- α sur la composante calcique de la sécrétion du glucagon n'a pas été exploré (Vieira et al., 2013). Dans le contexte du développement de la rétine, Rev-erb- α a été montré pour inhiber la transcription de la recoverine, une protéine liant le calcium (Mollema et al., 2011). Enfin, la délétion inductible de *bmall* spécifique au muscle squelettique induit l'augmentation de l'isoforme lente calséquestrine 2 et la diminution de l'isoforme rapide calmoduline 3 dans le muscle gastrocnémien (Hodge et al., 2015).

4.4.Rev-erb- α et stress réticulaire

L'expression des acteurs de l'UPR (ARNm de *sxbp1*, *bip*, et *chop*, protéine XBP1 & phosphorylation de IRE1) présente une rythmicité de 12h dans le foie de souris (Cretenet *et al.*, 2010). De manière intéressante, la mutation invalidatrice *clock Δ 19* du gène de l'horloge

clock diminue l'expression hépatique des gènes de l'UPR cités et annihile toute rythmicité (Cretenet et al., 2010), suggérant une régulation de l'UPR par l'horloge circadienne. Ces résultats sont étayés par les travaux de l'équipe de Yang qui démontre que Rev-erb- α se fixe sur le promoteur de CHOP afin d'activer sa transcription dans le foie, dans un contexte de stéatose hépatique induite par l'éthanol (Yang et al., 2016).

Inversement, l'UPR via l'activité endonucléasique d'IRE1 sur *Per1* est capable de moduler l'horloge circadienne dans une lignée humaine de glioblastome (Pluquet et al., 2013).

4.5.Rev-erb- α et apoptose

L'activation pharmacologique des Rev-erb par un traitement au SR9009 conduit à un accroissement notable de la létalité chez plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, comme en témoigne le clivage de la caspase 3 et les cassures de l'ADN spécifiques de l'apoptose détectées par le marquage Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) (Sulli et al., 2018). Le SR9009 entraîne une diminution de l'autophagie, phénomène capital pour la survie et la prolifération des cellules cancéreuses (Sulli et al., 2018). L'inhibition de l'autophagie par l'agoniste des Rev-erb déclenche la mort cellulaire par apoptose (Sulli et al., 2018). De fait, le SR9009 présente des propriétés anti-cancéreuses qui ont été testées *in vivo* sur des glioblastomes (Sulli et al., 2018). Le traitement au SR9009 (200mg/kg/jour pendant 6 jours) permet de réduire l'expression des gènes de l'autophagie, d'augmenter l'apoptose (TUNEL) et par conséquent de diminuer significativement la taille de la tumeur (Sulli et al., 2018). Enfin, la survie des souris se trouve prolongée (Sulli et al., 2018).

Aucune donnée n'est à ce jour disponible concernant un éventuel rôle de Rev-erb- α dans les voies de signalisation apoptotique dans le muscle squelettique. *In vivo*, les fibres musculaires apoptotiques sont rapidement phagocytées par les macrophages (Arnold et al., 2007). Par ailleurs, le muscle squelettique est un organe relativement protégé contre l'apoptose. Comparé aux autres tissus, celui-ci contient en effet une forte quantité d'inhibiteurs de caspases (Adhietty et al., 2007). Le processus apoptotique pourrait débiter, les caspases procédant à la dégradation des protéines ce qui altérerait la fibre musculaire, sans pour autant aller jusqu'à son terme. Le phénomène d'« *apoptosis interruptus* » est décrit dans le muscle cardiaque et caractérise une fibre musculaire non fonctionnelle qui garde sa place dans le muscle appelée fibre fantôme (Narula et al., 2001).

4.6.Rev-erb- α et fonction du muscle squelettique

L'expression génique de Rev-erb- α est importante dans le muscle squelettique (Forman et al., 1994). Le contenu en protéine Rev-erb- α , différent selon le types de muscle étudié, est particulièrement important dans les muscles soléaires (Woldt et al., 2013). De plus, il a été montré que l'expression génique de Rev-erb- α , très importante dans des myoblastes C2C12 en prolifération, diminue au cours de la différenciation myogénique (Downes et al., 1995). La surexpression de Rev-erb- α (5 à 10 fois) dans des myoblastes en prolifération empêche la différenciation musculaire en abrogeant l'expression du facteur pro-myogénique MyoD (Downes et al., 1995). L'inactivation des Rev-erb par un traitement à l'antagoniste SR2878 accélère la fusion des myotubes C2C12, lorsque le traitement à l'agoniste SR9009 produit l'effet miroir (Welch et al., 2017a). Rev-erb- α se fixe sur le promoteur des gènes promyogéniques *MyoD* et *Serum response factor (Srf)* (Welch et al., 2017a). Ainsi, un

traitement à l'antagoniste SR2878 chez la souris permet une meilleure réparation musculaire du *tibialis anterior* 8 et 15 jours une injection intramusculaire de cardiotoxine (Welch et al., 2017a). Ces données suggèrent un effet délétère de Rev-erb- α dans la fonction du muscle squelettique, ce qui est formellement contredit par d'autres travaux.

En effet, l'équipe d'Hélène Duez observe que les souris invalidées pour Rev-erb- α (KO total) présentent des performances réduites à l'exercice par rapport aux souris contrôles (Woldt et al., 2013). Ceci est associé avec un plus faible contenu mitochondrial musculaire et une fonction mitochondriale altérée qui s'expliquent par une diminution de la biogénèse mitochondriale (voie Ampk-Sirt1-Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (Pgc1 α)) et une augmentation de l'autophagie (Woldt et al., 2013). Un traitement au SR9009 (100mg/kg/jour) augmente les capacités des souris à l'exercice sur tapis roulant (temps et distance) (Woldt et al., 2013). Par ailleurs, Rev-erb- α s'avère également être un modulateur de la masse musculaire par sa capacité à infléchir la balance synthèse/dégradation protéique (Mayeuf-Louchart et al., 2017a). En effet, les souris invalidées pour Rev-erb- α (délétion totale) se caractérisent par une diminution de la taille des fibres musculaires ainsi que de la masse des muscles, qui trouvent leur origine dans la répression transcriptionnelle de Rev-erb- α liant les promoteurs de gènes catabolique (Muscle RING-finger protein-1, Murf1) et anti-anabolique (Branched chain amino acid transaminase 2, Bcat2) (Mayeuf-Louchart et al., 2017a). Par opposition, les myotubes surexprimant la protéine Rev-erb- α humaine ont un diamètre plus élevé (Mayeuf-Louchart et al., 2017a). Le traitement avec l'agoniste SR9009 permet en outre de protéger les muscles squelettiques contre la perte de masse musculaire induite par la dexaméthasone (Mayeuf-Louchart et al., 2017a).

4.7.Rev-erb- α et myopathies

Même si le débat reste ouvert entre partisans de l'activation et tenants de l'inactivation des récepteurs Rev-erb pour améliorer la fonction musculaire, les effets bénéfiques de la modulation de l'activité des Rev-erb dans le muscle squelettique observés de part et d'autre, justifient l'utilisation des ligands comme piste thérapeutique dans le cadre de pathologies musculaires comme les myopathies (Welch and Flaveny, 2017). Une étude récente démontre que l'inactivation des récepteurs Rev-erb améliore le phénotype musculaire de souris *mdx* (Welch et al., 2017b). En effet, un traitement de 6 semaines à l'antagoniste SR8278 (25mg/kg) augmente le pourcentage de masse maigre, induit les acteurs pro-myogéniques, promeut la biogénèse mitochondriale et l'orientation vers un phénotype oxydatif, diminue la fibrose du muscle gastrocnémien, accroît le nombre de cellules satellites et améliore la force musculaire des membres postérieurs et antérieurs développée au grip test de souris *mdx* âgées de 10 semaines (Welch et al., 2017b). Malheureusement, cette étude se consacre au modèle peu relevant de la souris *mdx*, n'explore pas l'homéostasie calcique et réticulaire, deux paramètres importants dans la myopathie de Duchenne (section 3.2.), ni la relevance chez le patient myopathe humain.

OBJECTIFS

Au regard des éléments développés dans la section 4 de notre introduction, le récepteur nucléaire Rev-erb- α représente une cible thérapeutique de premier choix dans le traitement des pathologies musculaires. Nous avons dans un premier temps défini le rôle putatif de Rev-erb- α dans la fonction du réticulum endoplasmique du muscle squelettique. Dans un second temps, nous nous sommes placés dans divers contextes pathologiques afin d'explorer les éventuels effets bénéfiques de la modulation de Rev-erb- α .

Nos travaux peuvent se décomposer en trois projets distincts mais complémentaires :

- 1) Rôle de Rev-erb- α dans la régulation de l'homéostasie calcique et de la réponse aux protéines mal-conformées dans un contexte physiologique et dans la myopathie de Duchenne.
- 2) Rôle de Rev-erb- α dans la régulation du stress réticulaire, de l'interaction RE-mitochondrie et l'induction de l'apoptose au cours de l'activation de la cellule satellite musculaire.
- 3) Rôle de Rev-erb- α dans l'insulinorésistance du muscle squelettique induite par un stress réticulaire.

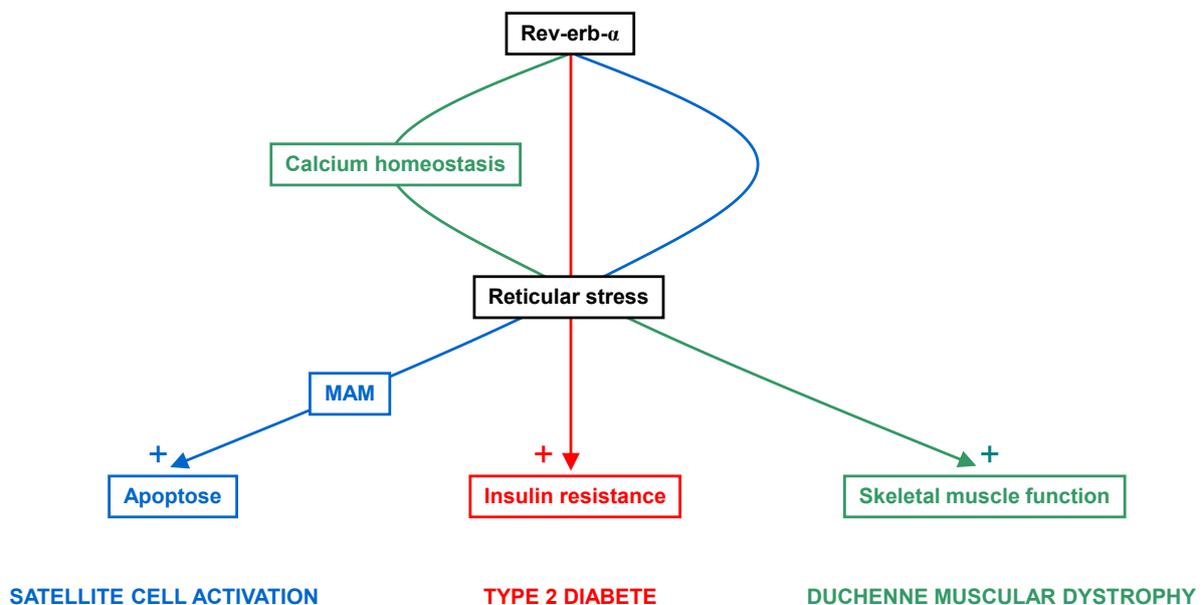


Figure 38 : Représentation schématique des travaux de thèse

MATERIEL ET METHODES

Cohorte humaine ABOS

Les données biologiques et les biopsies de patients obèses (IMC>30) ont été obtenues de la cohorte ABOS (Atlas Biologique de l'Obésité sévère). 20 obèses normoglycémiques et 20 obèses intolérants au glucose mais non diabétiques ont été sélectionnés au hasard, des paramètres biologiques ont été extraits de la base de données et des biopsies musculaires ont été obtenues pour étudier l'expression génétique et protéique. Les patients obèses ont été soumis à un test de tolérance au glucose par voie orale (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT, 75 g) ; les taux de glycémie et d'insuline ont été mesurés avant puis 30 et 120 minutes après l'ingestion de glucose.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'American Diabetes Association (ADA), l'altération de la tolérance au glucose sans diabète de type 2 est définie par une glycémie à jeun normale ou légèrement élevée et une glycémie 2 heures après un test oral de tolérance au glucose de 75g compris entre 140 et 199 mg/dL.

L'indice de Mastuda (Matsuda and DeFronzo, 1999), qui estime la sensibilité à l'insuline hépatique et musculaire, a été calculé comme suit : $10000/(\sqrt{G_0} \times I_0 \times G_{\text{mean}} \times I_{\text{mean}})$ où G_0 et I_0 indiquent respectivement la glycémie à jeun et les taux d'insuline (mg/dL et mIU/L), et G_{mean} et I_{mean} indiquent respectivement la glycémie moyenne et la concentration en insuline comprises entre 0 et 120 minutes pendant l'OGTT.

Les ARNm et protéines ont été analysées par Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR) et Western-blot. Selon les résultats du test de normalité Shapiro-Wilk, les comparaisons entre les patients obèses normoglycémiques et les patients obèses gluco-intolérants ont été effectuées à l'aide d'un test t bilatéral de Student dans le cas d'une distribution gaussienne ou d'un test de Mann-Whitney dans les autres cas.

Modèles animaux

Les expériences décrites ci-dessous ont reçues l'aval du comité d'éthique des Hauts de France. Les souris sont hébergées au sein de l'animalerie où elles suivent un cycle lumière/obscurité de 12h/12h et ont un accès libre à la nourriture et à l'eau.

Invalidation de Rev-erb- α et mutant DBD *in vivo*

Nous travaillons avec des souris invalidées pour Rev-erb- α (*Rev-erb- α ^{-/-}*) créées par Bjorn Vennström (Chomez et al., 2000). Les souris *Rev-erb- α ^{-/-}* ont une cassette β -geo remplaçant une partie de l'exon 2, l'intégralité des exons 3, 4 et 5 et une partie de l'exon 6 abolissant la fonction du gène. Les souris C57BL/6J sont rétrocroisées avec des souris de fond génétique SV129 pendant 8 générations. Les souris *Rev-erb- α ^{-/-}* et *Rev-erb- α ^{+/+}* sont issues de croisements entre souris hétérozygotes. Par ailleurs, nous disposons de souris pour lesquelles le domaine de liaison à l'ADN de Rev-erb- α est inactif spécifiquement dans le muscle squelettique et cardiaque grâce au promoteur de la Muscle Creatine Kinase (MCK) (*Rev-erb- α ^{fl/fl};MCK^{Cre/+}*) provenant de l'institut clinique de la souris (Illkirch, France) et caractérisées précédemment (Zhang et al., 2015). Lesdites souris sont comparées avec les animaux contrôles (*Rev-erb- α ^{fl/fl};MCK^{+/+}*) de même portée.

Surexpression de Rev-erb- α dans la cellule satellite musculaire

Des souris transgéniques pour Rev-erb- α sont générées par une transgénèse aléatoire (*Tg(Nr1d1)^{lox/+}*). La présence d'une queue de CAT-PolyA floxée entre le promoteur CAG et le gène *Nr1d1* empêche l'expression de ce dernier. Leur croisement avec des souris *Pax7^{CreERT2/+}* permet l'expression de la recombinaise Cre dans les cellules satellites (qui expriment Pax7) de manière inductible (Figure 39). 5 jours d'injection intrapéritonéale au tamoxifène lève l'inhibition de l'Heat Shock Protein (HSP) 90 sur la recombinaise Cre, permettant sa translocation au noyau, ce qui entraîne l'enlèvement de la queue de polyA floxée et finalement la surexpression spécifique de Rev-erb- α dans les cellules satellites du muscle squelettique. Les séquences Internal Ribosome Entry Site (IRES) et Nuclear Localization Signal (NLS) permettent respectivement l'initiation de la traduction de l'ARNm et l'adressage de la protéine au noyau. La présence d'un gène rapporteur (Green Fluorescent Protein, GFP) permet la sortie des cellules satellites qui surexpriment Rev-erb- α par tri cellulaire.

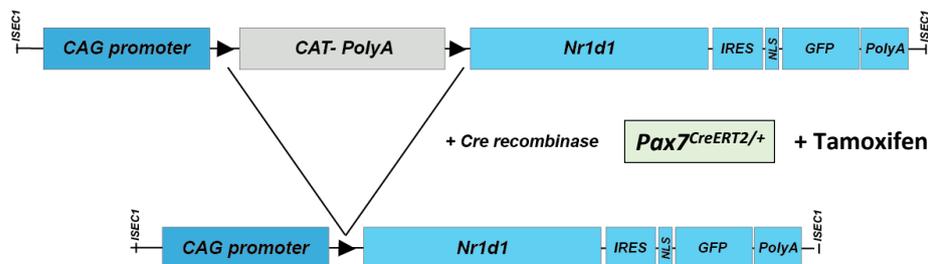


Figure 39 : Construction génétique permettant la surexpression de Rev-erb- α dans la cellule satellite

Sortie des cellules satellites par tri cellulaire

Les principaux muscles squelettiques de la souris sont prélevés, réunis dans 50mL de Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) à 4°C puis découpés finement à l'aide d'une paire de ciseaux. Après une centrifugation à 600g à 4°C de 5 min et l'élimination du surnageant résultant, nous reprenons le culot dans 20mL de solution de digestion (Dispase II, 3U/mL (Roche 4942078001) ; Collagenase A, 0,5U/mL (Roche) ; Bovine Serum Albumin (BSA) Serum 0,2% ; penicillin/streptomycine 100U/mL). Les échantillons sont soumis à agitation (70rpm) pour 1 heure dans le bain-marie à 37°C. Avec une pipette de 10mL, nous procédons à 10 allers-retours de la suspension avant une seconde incubation au bain-marie (paramétrages identiques). Au terme, nous complétons les tubes à 50mL avec du DMEM à 4°C et homogénéisons les échantillons par retournement 10 fois. Après passage de la suspension dans un filtre de 100 μ M et centrifugation à 600g pour 5 minutes à 4°C, le culot est repris dans 1mL de DMEM à 4°C par aspiration-refoulement à la pipette automatique. Le tube est complété à 50mL avec du DMEM à 4°C puis homogénéisé 10 fois par retournement. Suite au passage de la suspension dans un filtre de 70 μ M et une centrifugation à 50g de 5 minutes à 4°C, le surnageant contenant les cellules satellites est filtré (40 μ M) puis centrifugé

à 600g pour 5 minutes à 4°C. Enfin, suite à deux nouveaux rinçages au DMEM, les cellules sont reprises dans 500µL de tampon Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) (2mM ÉthylèneDiamineTétraAcétique (EDTA), 0.5% BSA in Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7,2). Par tri cellulaire (BD Influx), nous sélectionnons la population de cellules exprimant la GFP. Puis, les cellules sont mises en culture dans 39% de milieu DMEM (41965-039, Gibco), 39% de milieu F-12 (21765-029, Gibco), 20% de Sérum de Veau Foetal (SVF) et 2% d'ultrosor (15950-017, Gibco).

Protocole de blessure musculaire

Le muscle *tibialis anterior* des souris est blessé au moyen d'une injection de 30µL de notexine à 5µg/mL (Latoxan).

Activation pharmacologique des récepteurs Rev-erb chez des souris *mdx/utr*^{+/-}

Grâce à une collaboration avec le docteur France Piétri-Rouxel (Institut de Myologie, Paris), nous avons obtenu 18 souris males invalidées pour le gène de la dystrophine (*mdx*) et hétérozygote pour le gène de l'utrophine. A l'âge de l'apparition des premières atteintes musculaires (6 mois), nous procédons à l'injection quotidienne d'agoniste de Rev-erb-α SR9009 (100mg/kg) ou de DiMethylSulfOxyde (DMSO) pour les souris contrôles par voie intrapéritonéale à ZT8 pendant 21 jours. Reconstitué avec du DMSO (50mg/mL), le SR9009 est ensuite dilué à 20% dans une solution saline de crémaphore à 15% (Kolliphor, C5135, Sigma). Les souris sont placées dans des cages à roue autorisant une activité physique volontaire.

Induction d'un stress réticulaire *in vivo*

Après anesthésie de la souris par injection intra-péritonéale d'un mélange kétamine/xylazine, un muscle gastrocnémien est injecté par une solution de tunicamycine (30µg/30µL, T7765, Sigma, NaCl 9%, pH9) ou de thapsigargine (30µM/30µL, T9033, Sigma) lorsque le muscle controlatéral reçoit le même volume de solution saline. 24h après injection, les souris sont sacrifiées et les muscles gastrocnémiens sont prélevés pour congélation rapide dans l'azote.

Nous procédons à un jeûne de 24h comparativement à des souris nourries *ad libitum* puis collectons les muscles squelettiques des animaux.

Modèles cellulaires

Lignée cellulaire C2C12

Nous travaillons avec la lignée cellulaire de myoblastes murins C2C12 (CRL-1772, American Type Culture Collection (ATCC)) (Yaffe et Saxel, 1977), cultivée dans du milieu DMEM (41965039, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 0,4mg/mL de gentamycine.

Lorsque la confluence atteint les 80%, les myoblastes sont différenciés en myotubes en remplaçant le milieu de culture par du DMEM supplémenté avec 2% de sérum de cheval et 0,4% de gentamycine pendant 5 jours.

Surexpression de Rev-erb- α et la myoréguline

Les séquences codantes de Rev-erb- α humain (REV-ERB α) ou de la myoréguline de la souris (Mln) sont insérées dans un plasmide pBabe (Addgene) via les sites de restriction BamH1-Sall1. Les plasmides REV-ERB α , Mln ou le plasmide vide pBabe sont transfectés dans des cellules Phoenix en utilisant le lipide cationique RPR. Puis le surnageant des cultures de cellules Phoenix est incubé avec les cellules C2C12, permettant leur infection par les rétrovirus. La sélection des cellules infectées se réalise par un traitement de 15 jours à la puromycine pour les REV-ERB α et à la néomycine pour les Mln.

Myotubes humains sains

Les études sur myoblastes humains sont menées par l'équipe du docteur Jennifer Rieusset (Laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition (CarMeN), Lyon, France). La culture primaire de myotubes humains est initiée à partir de cellules satellites issues d'une biopsie musculaire du *vastus lateralis* de donneurs volontaires durant des actes chirurgicaux à l'hôpital Edouard Herriot (Lyon, France).

Myoblastes de patients myopathes de Duchenne

Des myoblastes de patients myopathes de Duchenne nous sont gracieusement donnés par la Myobank-Association Française de Myologie (AFM) (BB-0033-00012, Institut de Myologie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France). Cultivés dans du milieu DMEM supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal et 0,2% de primocine, les myoblastes sont différenciés par l'ajout du milieu de différenciation à 2% de sérum de cheval. Les myotubes humains sont utilisés pour expériences entre les passages 4 et 10.

Traitements *in vitro*

Induction aiguë du stress réticulaire

Les cellules sont soumises à un stress réticulaire chimique via la tunicamycine, inhibiteur de la N-glycosylation (1 μ g/mL, 18h, DMSO) ou à la thapsigargine, l'inhibiteur de SERCA (1 μ M, 18h, DMSO). Dans le cadre de l'étude du processus apoptotique, nous appliquons des durées de traitements plus longues (jusqu'à 48h).

Inhibition des MAMs

Les cellules sont prétraitées 24h avec le rouge de ruthénium (5 μ M, Eau), la cyclosporine A (1 μ M, DMSO) ou la xestospongine (1 μ M, DMSO). Le traitement est associé avec la tunicamycine.

Privation de nutriments

Les cellules sont privées de milieu de culture par un traitement au PBS de 3h permettant d'induire un stress réticulaire comme décrit dans la littérature (Paul et al., 2012).

Déplétion chronique en calcium réticulaire

Les myoblastes C2C12 sont soumis à un traitement d'une faible dose de thapsigargine (100nM) 1h/jour pendant 10 jours.

Modulation pharmacologique des Rev-erb

Les cultures sont traitées 24h avec les ligands synthétiques de Rev-erb- α afin d'obtenir son activation via l'agoniste SR9009 (10 μ M) ou son inactivation via l'antagoniste SR8278 (10 μ M). Nous employons également l'hémine, agoniste naturel de Rev-erb- α (6 μ M, 40h)

Propriétés contractiles du muscle gastrocnémien *in situ*

Les expériences sont réalisées grâce à une collaboration avec l'équipe de Bruno Bastide (Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société, UREPSSS, Lille). Les souris sont anesthésiées au moyen d'une injection intrapéritonéale de sodium pentobarbital (60mg/kg). Les muscles de la patte arrière droite dénervés, exception faite du muscle gastrocnémien qui est isolé des tissus environnants. Le tendon d'Achille est sectionné puis ligaturé. La jambe est ensuite fixée dans des conditions isométriques puis est immergée dans un bain d'huile de paraffine thermostaté à 37°C. La jambe est immobilisée de manière à maintenir le muscle gastrocnémien dans une position horizontale. Ce dernier est ensuite connecté à un capteur de force au niveau du tendon d'Achille (Grass FT 10, Grass Instruments, West Warwick, RI, USA). La longueur du muscle est ajustée pour produire la tension maximale isométrique. Les électrodes de stimulation et de référence (platine revêtu de téflon) sont maintenues au moyen de micromanipulateurs. Les contractions sont induites par la stimulation du nerf du gastrocnémien (0,2 pulses/ms) au double du voltage minimal nécessaire pour obtenir la réponse maximale convulsive. L'électrode de référence est insérée dans la masse du muscle adjacent dénervé. Les paramètres suivants sont enregistrés : une contraction maximale unique à partir de laquelle sont mesurés la tension maximale de la contraction, le temps d'arrivée au pic et le temps de demi-relaxation. La relation tension / fréquence (pour des fréquences de stimulation allant de 16 à 100 Hz) permet la détermination de la tension tétanique maximale P0 obtenue pour une fréquence de 100 Hz de stimulation et de l'indice de fatigue P40 / P0 (rapport de la tension tétanique à 40 Hz sur P0)

***In situ* PLA**

Les expériences d'*in situ* PLA sont réalisées par l'équipe du Docteur Jennifer Rieusset (CaRMEN, Lyon). L'*in situ* PLA réalisée par le kit Duolink II (Olink Bioscience) permet la détection, la visualisation et la quantification des interactions protéiques inférieures à 40nm sous la forme d'un marquage ponctiforme par microscopie. Les cellules sont fixées à l'aide de 4% de paraformaldéhyde durant 10 minutes puis perméabilisées grâce à 0,1% de Triton X-100 pendant 15 minutes à température ambiante. La suite des opérations s'effectue selon le protocole établi (Tubbs and Rieusset, 2016). A son terme, les préparations sont montées dans du milieu Duolink II contenant du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) 18 (Eurogentec) puis analysées avec un microscope Zeiss inversé à fluorescence équipé d'un ApoTome utilisant le programme AxioVision. Les signaux sont quantifiés par le logiciel BlobFinder (Centre for Image Analysis, Uppsala University) puis exprimés en nombre de marquage ponctiforme par noyaux relativement à la condition contrôle. Les expériences sont réalisées trois fois avec 5 champs analysés par condition.

Cytométrie en flux

Identification des cellules hypoploïdes par marquage à l'iodure de propidium

Les cellules mortes présentent un ADN dégradé (hypoploïdie). Nous caractérisons cette population par le marquage stœchiométrique de l'ADN à l'iodure de propidium (IP), un intercalant de l'ADN. Nous collectons le milieu de culture contenant les cellules mortes en suspension dans un tube à hémolyse à 4°C. Après récupération des cellules adhérentes, l'ensemble des cellules est centrifugé pendant 5 minutes à 150 g et à 4°C. Après deux rinçages au PBS, nous ajoutons 1 mL d'éthanol à 70% à 4°C goutte à goutte, afin de fixer les cellules sans former d'agglomérats. Les échantillons sont incubés une nuit à 4°C puis centrifugés 7 minutes à 1600 g et à 4°C. L'éthanol est ôté, et nous incubons les cellules avec 500 µL d'une solution de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) contenant 50 µg/mL d'IP (J66764, Alfa aesar, λ_{ex} . 438 nm, λ_{em} . 517 nm) et 0,5 mg/mL de RNase A (EN0531, Life Technologies) sous agitation à l'obscurité pendant 30 minutes. L'ARN dégradé et l'ADN marqué, les cellules sont analysées en cytométrie en flux (PE-Texas red). Par le module cycle cellulaire du logiciel d'analyse FlowJo, nous déterminons la proportion de cellules hypoploïdes (ou subG1) au sein de la population.

Caractérisation de l'apoptose par marquage des phosphatidylsérines à l'annexine V

Les cellules apoptotiques se caractérisent par une externalisation des phosphatidylsérines depuis le feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique, détectables par l'annexine V, associée à un maintien de l'intégrité membranaire. Les cellules en nécrose, *a contrario*, sont immédiatement perméables et positives à l'IP et à l'annexine V. Les cellules sont collectées après décollement à la trypsine. Après centrifugation et 2 rinçages au PBS, nous ajoutons un volume de tampon de liaison (10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 14 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4, 4°C) permettant l'obtention d'une suspension à 1 million de cellules/mL. En suivant les recommandations du fournisseur, 100 µL sont incubés à température ambiante sous agitation et à l'obscurité avec 15 µL d'une solution contenant 1/3 d'Annexine V (BD V450, 560506, λ_{ex} . 406 nm, λ_{em} . 450 nm) et 2/3 d'une solution d'IP à 50 µg/mL. Nous ajoutons 400 µL de tampon de liaison et analysons les échantillons au cytomètre. Le contrôle positif est traité 1h avant la collecte des cellules avec 100 µM de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour induire l'apoptose.

Estimation de la quantité de réticulum endoplasmique et de mitochondries par marquage au RE tracker et au Mitotracker

Les cultures sont incubées à l'obscurité et à 37°C 30 minutes avec du milieu contenant 5 µM de RE Tracker Green (E34251, Life Technologies, λ_{ex} . 587nm, λ_{em} . 615nm) ou 10 minutes dans du milieu contenant 200 nM de Mitotracker Green FM (M7514 Life Technologies, λ_{ex} . 490 nm, λ_{em} . 516 nm). Après rinçage et décollement, les cellules sont transférées dans un tube à hémolyse. Suite à deux rinçages au PBS, les cellules sont reprises dans 500 µL de PBS contenant 2 mM d'EDTA et analysées au cytomètre de flux.

Estimation du contenu en peroxyde d'hydrogène par marquage à la dichlorofluorescéine

Après décollement à la trypsine, les cellules sont incubées 15 minutes dans du milieu contenant 10 μM de 2',7'- dichlorofluorescéine (DCFH-DA, D6883, 4091-99-0, Sigma) à l'obscurité et à 37°C. La fluorescence (λ_{ex} . 504 nm, λ_{em} . 529 nm) est proportionnelle au contenu cellulaire en peroxyde d'hydrogène. Un puits traité 1h avec 100 μM d' H_2O_2 constitue le contrôle positif de l'expérience.

Transfert calcique vers la mitochondrie

Nous caractérisons le transfert calcique du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie par le suivi du calcium mitochondrial au cours du temps au moyen de la sonde calcique mitochondriale Rhod-2. Pour ce faire, les cellules sont décollées à la trypsine puis incubées pendant 30 minutes à l'obscurité et à 37°C dans du milieu de culture avec 2 μM de sonde Rhod-2 AM (R1245-MP, ThermoFischer Scientific, λ_{ex} 552 nm, λ_{em} 581 nm) en présence ou non des inhibiteurs des MAMs. Après rinçage, les cellules sont suspendues dans du milieu de culture contenant à nouveau l'éventuel traitement puis analysées à hauteur de 200 événements/seconde en cytométrie en flux. Nous enregistrons l'intensité de fluorescence au cours du temps puis ajoutons après 2 minutes 30 de l'histamine (10mM, H_2O) ou de la tunicamycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DMSO) afin d'induire le transfert calcique du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie. L'enregistrement se prolonge jusqu'à la stabilisation du signal (environ 8 minutes). Les données sont analysées au moyen du logiciel WinMDI.

Dosage de l'activité enzymatique de la caspase 3

A 4°C, les cultures cellulaires sont rincées deux fois avec du PBS froid. Nous déposons 100 μL par boîte de Pétri de tampon « caspases » (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS), 10% glycérol, 10 mM Dithiothreitol (DTT), pH 7,32, puis extemporanément aprotinine 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptine 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et pepstatine A 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Après décollement, les cellules sont introduites dans un Potter afin de rompre les membranes plasmiques et libérer le contenu cytoplasmique. Après 15 minutes de centrifugation à 15000 g et à 4°C, nous récupérons le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques dont les caspases. A l'aide du dosage protéique par la méthode de Bradford, nous déposons à 4°C le volume d'échantillon contenant 100 μg de protéines dans les puits d'une plaque 96 puits opaque. Nous complétons le volume à 95 μL à l'aide de tampon « caspases » et ajoutons 10 mM de substrat pour la caspase 3 (Ac-DEVD-AMC, #13402, AAT BIOQUEST, λ_{ex} . 380 nm, λ_{em} . 437 nm). Le clivage du substrat par la caspase activée engendre une fluorescence proportionnelle à l'activité de l'enzyme et est mesurée par spectrophotométrie à 37°C. Une mesure de l'intensité de fluorescence est réalisée toutes les 5 minutes pendant 1h30 permettant l'obtention de la cinétique de clivage du substrat, reflet du degré d'activation de l'enzyme. Nous comparons les coefficients directeurs de ces droites. Les valeurs sont exprimées en unité relative de fluorescence. $\text{min}^{-1} \cdot 100 \mu\text{g}$ de protéines $^{-1}$.

Marquage TUNEL

Le marquage TUNEL est spécifique des cassures apoptotiques de l'ADN. Les muscles gastrocnémiens prélevés sont cryoconservés à l'aide d'isopentane puis coupés au cryostat à 12 μm d'épaisseur. Les coupes sont incubées 15 minutes avec une solution de fixation fraîchement préparée (PBS contenant 4% de paraformaldéhyde, pH 7,4). Après 3 rinçages au

PBS de 5 minutes, les échantillons biologiques sont perméabilisés pendant 20 minutes à l'aide d'une solution de PBS contenant 0,1% de Triton X-100. Après trois rinçages, les sites de liaison sont bloqués pendant 45 minutes avec du PBS contenant 5% de sérum de cheval. Un contrôle positif est réalisé en incubant une coupe avec 50 µL de DNase I (#EN0521, Thermo Scientific) pendant 10 minutes pour créer des cassures de l'ADN. Nous incubons les échantillons biologiques 1 heure à 37°C avec 50 µL d'une solution de marquage contenant l'enzyme terminal-deoxynucleotidyl-transférase et les nucléotides marqués à la fluorescéine (*In Situ Cell Death Detection Kit*, 11 684 817 910, Roche). L'enzyme catalyse la polymérisation des nucléotides marqués à la fluorescéine aux extrémités 3'-OH libres de l'ADN (λ_{ex} . 450-500 nm, λ_{em} . 515-565 nm). Nous procédons ensuite à 3 rinçages et incubons en chambre humide l'anticorps primaire anti-Laminine α -2 au 1/250ème (sc-59854, Santa Cruz) pour le marquage de la lame basale des tissus. Après 3 rinçages, nous déposons la solution de blocage puis l'anticorps secondaire au 1/500ème (Alexa A-21434, Life Technologies, λ_{ex} . 555 nm, λ_{em} . 565 nm) et le contremarquage des noyaux avec 50 µg/mL du colorant de l'ADN Hoechst (λ_{ex} . 350nm, λ_{em} . 450-90nm) pendant 45 minutes en chambre humide à l'abri de la lumière. Suite à 3 derniers rinçages, les lames sont montées avec du glycérol sous lamelle et photographiées au microscope à épifluorescence au grossissement X100.

Dans le cadre d'un marquage TUNEL sur les cellules satellites surexprimant Rev-erb- α , l'expression concomitante de la GFP contraint la conversion du signal fluorescent en couleur du spectre visible. Ainsi, après le marquage à la fluorescéine, nous incubons les échantillons avec un anticorps anti-fluorescéine associé à une peroxydase (*In Situ Cell Death Detection Kit*, 11 684 817 910, Roche) pendant 30 minutes à 37°C. L'enzyme catalyse la conversion du substrat de la peroxydase (D4293, Sigma) en un marquage noir.

Etude de l'expression génique par RTqPCR

Extraction d'ARN

Extraction d'ARN cellulaire

L'extraction d'ARN des cellules se fait par la méthode TRIzol basée sur le protocole développé par Invitrogen. Le milieu de culture est aspiré et les cellules sont lavées avec 500 µL de PBS. Les cellules sont lysées avec 300 µL de réactif TRIzol (15596018, Invitrogen) puis transférées en tube. Nous laissons incubé 5 minutes. Nous ajoutons 60 µL de chloroforme, vortexons et incubons 2 minutes à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 18000 g et à 4°C et nous récupérons la phase supérieure aqueuse.

Extraction d'ARN tissulaire

25 mg de muscle gastrocnémien est homogénéisé (Polytron PT3000, 2000 rpm) pendant 20 secondes à 4°C dans 3 mL de tampon « guanidine » (isothiocyanate de guanidine 4 M, EDTA pH8 10 mM, Tris-HCl pH7,5 50 mM, β -mercaptoéthanol 1,4%). Nous ajoutons 300 µL d'acétate de sodium pH4,0 2 M, 3 mL de phénol saturé et 1,2 mL de mélange chloroforme/alcool isoamylique (49/1, V/V). Nous agitons vigoureusement pendant 10 secondes et incubons à 4°C pendant 15 minutes. La suite s'opère à 4°C. Nous centrifugeons 10 minutes à 950 g. Nous ajoutons 3 mL d'isopropanol au surnageant, vortexons et laissons précipiter pendant 1h. Nous centrifugeons les échantillons 20 minutes à 6500 g. Le surnageant est éliminé et les culots sont repris dans 500 µL de tampon « guanidine ».

Partie commune

Nous ajoutons 500 µL d'isopropanol à la phase aqueuse obtenue et laissons précipiter pendant 1h. Les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 18000 g. De la même manière, le culot d'ARN est ensuite lavé avec 500 µL d'éthanol 70%, puis séché au speed-vac pendant 5 minutes. Le culot est repris dans 20 µL d'eau, placé 10 minutes à 65°C puis remis à 4°C. Les échantillons sont dilués au 1/250ème pour dosage au Nanodrop.

Rétro-transcription (RT)

Afin de dégrader l'ADN génomique contaminant, nous incubons 1 µg d'ARN en présence de DNase I (#EN0521, Thermo Scientific) dans son tampon de fonctionnement (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂) à 37°C pendant 30 minutes. L'ajout d'EDTA (2,5 mM) au mélange suivi d'une incubation de 10 minutes à 65°C arrête la réaction enzymatique. La rétrotranscription de l'ARNm en ADN complémentaire est réalisée par le kit « high-capacity cDNA reverse transcription » (4368814, Life Technologies). Le programme thermique de la RétroTranscription (RT) est le suivant : 10 minutes à 25°C, 2 heures à 37°C, 5 minutes à 85°C puis maintien à 4°C.

Réaction de polymérisation en chaîne et analyse quantitative des résultats

Nous utilisons le kit SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix (600882, Agilent Technologies) suivant les recommandations du fabricant. Au moyen des amorces spécifiques (Tableau 3), le gène d'intérêt est amplifié par la Taq (*Thermus aquaticus*) polymérase grâce au programme thermique suivant : 3 min à 95°C pour activer la polymérase, suivi de 40 cycles alternant 5 à 20 secondes à 95°C pour dénaturer l'ADN double-brin et 20 secondes à 60°C pour hybrider les amorces et opérer l'élongation.

Gène	Amorce sens 5'→3'	Amorce antisens 3'→5'
<i>bip</i>	TGCAGCAGGACATCAAGTTC	TACGCCTCAGCAGTCTCCTT
<i>atf6</i>	TGGGTTCGGATATCGCTGTG	GGTTCTCTGACACCACCTCG
<i>atf4</i>	GTGGCCAAGCACTTGAAACC	GGAAAAGGCATCCTCCTTGC
<i>xbplu</i>	GAGCAGCAAGTGGTGGATTT	CCGTGAGTTTTCTCCCGTAA
<i>xbpls</i>	GAGTCCGCAGCAGGTG	GTGTCAGAGTCCATGGGA
<i>grp94</i>	GACCTTCGGGTTCGTCAGAG	AGCCTTCTCGGCTTTTACCC
<i>gadd34</i>	AGAGGCGGCTCAGATTGTTT	GAAGTGTACCTTCCGAGCTT
<i>bim</i>	AGTGCAATGGATCAGTTGGAGA	AGTTGTACCAGGCATCACCG
<i>noxa</i>	ACATAACTGTGGTTCTGGCGCA	ACTCGTCCTTCAAGTCTGCTGG
<i>chop</i>	CCTAGCTTGGCTGACAGAGG	CTGCTCCTTCTCCTTCATGC
<i>mln</i>	GTTGCACCCCTGAACAGAACCA	CCTCAGGAGGTAGCAGGTAGCA
<i>ppia</i>	GCATACGGGTCTGGCATCTTGTC C	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTG C
<i>serca1</i>	AAGGAGCCCAGATCAACAGGCA	ACTCCCACAGAGACTTGCCTTCT C
<i>serca2</i>	GCCATCAGCCAAGTCTCCACAT	AGCTGGCTGCACACCTAAACAA
<i>ryr1</i>	ACGTACAGTCAGGTGGCTCAGA	CCAGCACAAATGAGGTCTGGTC

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées

Nous vérifions l'efficacité de PCR et déterminons la zone de linéarité correspondant à 1 dilution de RT. Nous déterminons le cycle d'amplification pour lequel la fluorescence dépasse le seuil de positivité. Nous normalisons ensuite l'expression des gènes d'intérêt par rapport à celle du gène de ménage *ppia*.

Fractionnement cellulaire

Le fractionnement est réalisé suivant le protocole établi sur cellules hépatiques (Wieckowski et al., 2009) avec les ajustements décrits ci-après (Figure 40).

Nous travaillons avec 10 boîtes (⊙ 10cm) de culture de C2C12 différenciées pendant 5 jours. Les cellules sont rincées au PBS sans calcium puis décollées à la trypsine. Nous ajoutons du milieu de culture et centrifugeons 5 minutes à 600g et à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 1mL de tampon IB1 froid (225mM mannitol, 75mM sucrose, 0.1mM Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (EGTA), 30mM Tris-HCl pH 7.4). Les suspensions cellulaires sont lysées à 4°C dans un dounce où nous procédons à 50 allers-retours avec le piston « lâche » puis des cycles de 50 allers-retours avec le piston « serré » jusqu'à atteindre la lyse d'environ 70% des cellules, visualisée sous microscope. Le lysat est centrifugé 5 minutes à 600g à 4°C. Le surnageant est séparé et placé dans un nouveau tube. Le culot subit une nouvelle lyse au dounce avec le piston serré et une nouvelle centrifugation. A terme, les surnageants issus des deux lyses sont réunis puis à nouveau centrifugés. Le surnageant résultant correspond à l'homogénat cellulaire. Une centrifugation de 10 minutes à 7000g à 4°C permet la séparation du culot contenant les mitochondries et les MAMs et du surnageant contenant le réticulum endoplasmique.

Purification du réticulum endoplasmique

Le surnageant est ultracentrifugé (Rotor Ti 100.3, Ultracentrifugeuse TL-100, Beckman-Coulter) 30 minutes à 20000g et à 4°C. Le surnageant résultant subit une deuxième ultracentrifugation identique afin de purifier la fraction. Enfin, après élimination de l'éventuel culot résiduel, le surnageant est ultracentrifugé 1h à 100000g à 4°C. Le réticulum endoplasmique que constitue le culot est repris dans 150µL de tampon RadioImmunoPrecipitation Assay (RIPA, R0278, Sigma).

Purification des mitochondries et des MAMs

Le culot est repris dans 1mL de tampon IB2 (225mM mannitol, 75mM sucrose and 30mM Tris-HCl pH 7.4) puis centrifugé 10 minutes à 10000g et à 4°C. Le culot est rincé à nouveau dans du tampon IB2 puis repris dans 1mL de tampon mitochondria resuspending buffer (MRB), 250mM mannitol, 5mM HEPES (pH 7.4) and 0.5-mM EGTA) permettant l'obtention de la fraction microsomale brute (mitochondries et MAMs). Dans un tube à ultracentrifugation (344059), nous ajoutons 8mL de milieu Percoll (225mM mannitol, 25mM HEPES (pH 7.4), 1mM EGTA et 30% Percoll (vol/vol)) puis déposons délicatement la fraction microsomale brute complétée de 4,5mL de milieu MRB afin d'atteindre le volume minimal requis. Les échantillons sont ultracentrifugés à 95000g pendant 30 minutes à 4°C au moyen d'un rotor à balance (SW 41 Ti Swinging-Bucket Rotor, ultracentrifugeuse XL-70, Beckman Coulter). Au moyen d'une pipette Pasteur, nous collectons la phase MAM, correspondant à une bande opaque et diffuse au milieu du tube, puis le culot constitué des mitochondries. Les échantillons sont ensuite repris dans 1mL de tampon MRB et soumis à une centrifugation de 6300g pendant 10 minutes à 4°C.

Isolation des MAMs

Le surnageant contenant les MAMs est ultracentrifugé à 100000g pendant 1h à 4°C. L'anneau de MAM présent au-dessus du culot de percoll est récupéré au moyen d'une pipette Pasteur puis repris dans 150µL de tampon RIPA.

Isolation de la fraction mitochondriale pure

Le culot est repris dans 1mL de tampon MRB puis centrifugé à 6300g pour 10 minutes à 4°C. Après un ultime rinçage au MRB, le culot correspondant à la fraction mitochondriale pure est suspendue dans 150µL de tampon RIPA.

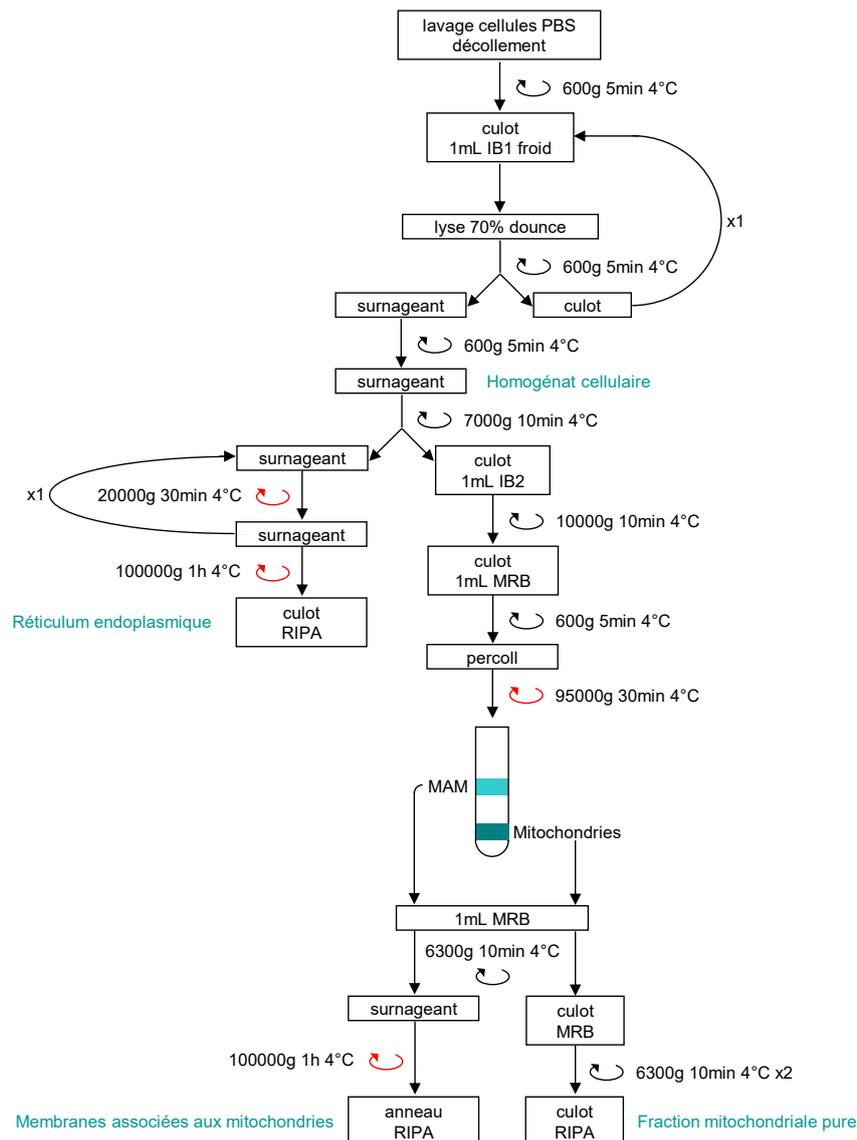


Figure 40 : Les étapes du fractionnement cellulaire

A l'issue du fractionnement cellulaire, nous procédons à un western-blot (section suivante) permettant la détection et la quantification relative des canaux calciques réticulaires IP3R1 et mitochondrial VDAC1 au sein des différentes fractions isolées. A vue de normalisation, la quantité de protéines IP3R1 et VDAC1 présente dans les MAMs est exprimée par rapport à la quantité de ces mêmes protéines détectée dans l'homogénat.

Etude protéique par Western-blot

Extraction et dosage protéique

Nous plaçons les cultures à 4°C et procédons à deux rinçages avec du PBS froid. Nous déposons ensuite 100 µL de tampon de lyse (#9803, Cell signaling) contenant un mélange d'antiprotéases. A 4°C, nous décollons les cellules puis centrifugeons le lysat 15 minutes à 15000 g. Le surnageant est dilué au dixième pour dosage par la méthode de Bradford. 30 µg de protéines sont dilués dans une solution dénaturante (Tris-HCl pH 6,8 0,5 M, glycérol 10%, sodium dodécylsulfate (SDS) 2%, bleu de bromophénol 0,02%, β-mercaptoéthanol 0,5%) et dénaturés pendant 5 minutes à 95°C.

Electrophorèse et transfert

Selon la taille des protéines d'intérêt, leur séparation se réalise sur gel à gradient de 4-12% Tris-glycine (P04125BOX, Invitrogen) ou 3-8% Tris-Acetate (EA03785BOX, Invitrogen). L'électrophorèse se déroule pendant 30 minutes à un voltage de 90 volts dans le tampon recommandé par le fournisseur du gel. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (926-31092, Eurobio). Le transfert se déroule dans le tampon éponyme (Tris-Glycine à 20% d'éthanol 96°) à 150mA, à 4°C, durant 2 heures.

Immunodétection, révélation et quantification

Les sites potentiels de fixation non spécifiques des anticorps sont saturés par une solution de Tris-Buffered saline (TBS) à 5% de BSA pendant 1 heure. Les membranes sont mises en contact sur la nuit à 4°C et sous agitation, avec les anticorps primaires (Tableau 4) dilués dans la solution de TBS à 5% de BSA contenant 0,01% Tween 20.

Anticorps primaire			Poids moléculaire (kDa)
Référence	Cible	Dilution	
Novus NB100-2323	P-IRE-1	1/1000	110
Novus NB100-2324	t-IRE-1	1/1000	110
Santa Cruz 575	CHOP	1/1000	29
Abcam 21685	BIP	1/1000	78
Novus NBP1-40256	ATF6 clivée	1/1000	55
Abcam 15895	VDAC1	1/1000	31
Cell signaling 8568	IP3R1	1/1000	320
Abcam 62484	Caspase-12	1/1000	Procaspase 55 Forme clivée 39
Cell Signaling 5174	GAPDH	1/1000	37

Tableau 4 : Caractéristiques des anticorps utilisés

Après 3 rinçages de 15 minutes au TBS-0,01% Tween, les membranes sont incubées pendant 1 heure, à température ambiante et sous agitation avec l'anticorps secondaire anti-lapin ou souris couplé à la Horseradish peroxydase (Santa Cruz) ou couplé à des fluorophores

(Licor), dilués au 1/10000^{ème} dans la solution de TBS-BSA-Tween. A l'issue de 3 rinçages, nous déposons le volume de peroxydase (enhanced chemiluminescence, ECL, Kits Thermo ou Millipore) permettant de recouvrir la membrane et laissons agir 5 minutes à l'obscurité. Nous révélons le résultat par autoradiographie. Pour les anticorps fluorescents, les membranes sont scannées et analysées avec le logiciel Odyssey CLX et Image Studio (Licor Biosciences). Dans les deux cas, nous quantifions l'intensité des bandes par le logiciel d'analyse Image Studio. Les résultats sont normalisés par la protéine de ménage Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et exprimés par rapport à la condition contrôle.

Activité de SERCA sur microsomes

Les muscles gastrocnémiens fraîchement prélevés ou conservés 24h dans la solution de pelage (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) 10mM, potassium propionate 170mM, magnésium acétate 2,5mM, K₂EGTA 5mM, ATP 2,5mM, [(E)-[3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-ylidene]amino] N-phenylcarbamate (PUGNAc) 50µM) à 4°C puis au-delà dans la solution de conservation (Solution de pelage 50%, Glycérol 50%) à -20°C, sont homogénéisés à 4°C à l'aide d'un Polytron (Kinematica) dans le tampon éponyme (Tris-HCl pH7 1M, sucrose 8%, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1mM, DTT 2mM). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 1300g à 4°C pendant 10 minutes afin d'éliminer les noyaux. Suite à une deuxième centrifugation de 20 minutes à 20000g à 4°C, le surnageant correspond à la fraction enrichie en microsomes. Le volume d'échantillon contenant 150µg de protéines est ensuite complété jusqu'à 2mL avec du tampon de capture calcique (CaCl₂ 120µM, EGTA 150µM, Tris-HCl 30mM pH7, KCl 100mM, NaN₃ 5mM, MgCl₂ 6mM, oxalate 10mM) puis placé dans la chambre de 2 mL de l'Oxygraph-2k (Oroboros Instruments) équipé du module fluorescence LED2. La sonde calcique Calcium green (1µM, C3010MP, ThermoFischer) et de l'ATP (5mM) sont ajoutés et l'intensité de fluorescence émise est mesurée au cours du temps (λ_{ex} 506nm, λ_{em} 531nm). Des pulses calciques (10µM ou 50µM) sont injectées dans les chambres. Finalement, nous ajoutons de la thapsigargine (1µM) afin de nous assurer que nous mesurons bien la recapture calcique dépendante de SERCA. L'éventuelle activité résiduelle de capture calcique non SERCA-dépendante est soustraite à l'activité totale.

Quantification du contenu calcique réticulaire par microplaques

Les myoblastes humains et les C2C12 sont ensemencées dans des microplaques 96 puits puis différenciées pendant 4 jours. Puis, le milieu est remplacé pendant 24h par du tampon Locke's pauvre en calcium (NaCl 154mM, NaHCO₃ 4mM, KCl 5mM, CaCl₂ 0.1mM, MgCl₂ 1mM, Glucose 5mM, HEPES 10mM, pH7,4), comme décrit précédemment (Brandmann). Les myotubes sont ensuite incubés dans du tampon Locke's sans calcium avec la sonde Fluo4-AM (λ_{ex} 490nm, λ_{em} 516nm) pendant 30 minutes à 37°C et 5% de CO₂ permettant le marquage du calcium cytosolique. Après 2 rinçages avec du tampon Locke's contenant 2,3mM de calcium, nous ajoutons 1µM de thapsigargine afin de vidanger totalement le réticulum endoplasmique. L'intensité de fluorescence est immédiatement enregistrée et ce toutes les 10 secondes pendant 5 minutes grâce à un lecteur de microplaques (Infinite 200 pro, Tecan), afin d'estimer la hausse du contenu calcique réticulaire jusqu'à la stabilisation (5minutes). L'augmentation de la fluorescence cytosolique est proportionnelle de la quantité de calcium initialement contenue dans le réticulum endoplasmique.

Etude de l'homéostasie calcique par imagerie confocale

Cette étude est menée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Natalya Prevarskaya. Les myoblastes C2C12 sont ensemencées à hauteur de 200000 cellules dans des boîtes p35 à fond lamelle en verre (Ibidi) puis différenciées pendant 5 jours. Les myotubes sont ensuite incubés avec 1,5µL de sonde calcique ratiométrique cytosolique Fura 2-AM (F1221, Invitrogen, aliquot de 50µg dilué dans 12µL d'un mélange 50/50 de DMSO et d'acide pluronique) pendant 15 minutes à 37°C et à l'obscurité. Au terme, les cellules sont rincées à trois reprises dans du tampon externe (140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 5mM Glucose, 10mM HEPES, pH 7.4) puis incubée dans du tampon sans calcium. L'acquisition est réalisée via le microscope Nikon Eclipse Ti doté d'un monochromateur (Polychrome IV, TILL Photonics GmbH) autorisant une excitation alternative à 340 et 380nm et d'une caméra CCD (QImaging) enregistrant l'intensité de fluorescence à 510nm. Les cellules sont sélectionnées sur le logiciel MetaFluor 7.7.5.0 (Molecular Devices Corp.) et le ratio 340nm/380nm est mesuré au sein de chaque cellule au cours du temps. Après 100 secondes d'acquisition de la fluorescence cytosolique basale, nous ajoutons 1µM de thapsigargine, concentration suffisante pour vidanger complètement le calcium du réticulum endoplasmique et enregistrons pour 400 nouvelles secondes.

Quantification protéique par immunofluorescence

Les myotubes C2C12 et les coupes de muscles d'épaisseur 12µm sont fixés 10 minutes avec une solution de formaline à 4% puis perméabilisées 20 minutes à 4°C avec une solution de Triton X-100 à 0,1%. Après 4 rinçages au PBS, l'incubation avec une solution de PBS à 5% de sérum de cheval permet la saturation des sites potentiels de liaison. Les anticorps primaires ciblant BiP (1/1000^{ème}, 21685, abcam), la dystrophine (1/250^{ème}, 7164, abcam), la laminine 2-α (1/250^{ème}, 59854, Santa Cruz Biotechnology) sont incubés sur la nuit à 4°C. Après 4 rinçages au PBS, les échantillons sont mis 45 en présence des anticorps secondaires couplés à un fluorophore (Alexa-Fluor A21428, A21427 et A21472, Life Technologies) ainsi que du Hoechst (50µg/mL, H3570, Invitrogen), marqueur de l'ADN, 45 minutes à l'obscurité. Nous utilisons du milieu de montage limitant la perte de fluorescence (S3023, Dako). Les échantillons sont ensuite observés au microscope confocal (LSM 880, Zeiss) au grossissement 400x. L'intensité moyenne du signal de BiP est mesurée en utilisant le logiciel ImageJ.

Quantification de la taille des fibres

La macro MuscleJ (Mayeuf-Louchart et al., 2018) sur Fiji est utilisée pour caractériser le diamètre des fibres, la présence et le nombre de noyaux au sein des fibres centro-nuclées ainsi que l'intensité de la protéine myosine embryonnaire.

Etude histologique du muscle squelettique

Les coupes de muscles squelettiques (sections de 12µm) sont marquées durant 1 minute avec de l'hématoxyline/éosine. Après de multiples rinçages à l'eau ionisée et montage en Mowiol, les coupes sont photographiées grâce à l'Axioscan Z1.

Immunoprécipitation de la chromatine

Les muscles gastrocnémiens issus de souris sauvages C57/B16 sont homogénéisés dans le tampon LB1 (HEPES-KOH 10mM pH7.5, NP-40 0.5%, MgCl₂ 5mM, DTT 500μM, cytochalasin B 3μg/mL, protase inhibitor cocktail) et « cross-linkés » avec 1% de paraformaldéhyde pour 10 minutes à température ambiante. La chromatine est lysée pendant 90 minutes avec le Bioruptor (Diagenode) à 4°C puis concentrée avec la colonne centricon 10kDa (Millipore). 50μg de chromatine sont ensuite immunoprécipités sur la nuit à 4°C avec l'anticorps ciblant Rev-erb-α (13418S, Cell Signaling). Puis, nous ajoutons de la BSA/yeast tRNA-blocked Protein A/G dynabeads (Invitrogen) sous agitation à 4°C pour 6h. Après rinçage, le cross-linking est réversé en incubant la chromatine précipitée sur la nuit à 65°C. L'ADN est purifié à l'aide du QIAquick PCR purification kit (Qiagen) puis analysé par qPCR en utilisant le kit Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent) et les amorces spécifiques (Tableau 5).

Cible	5'-3'	3'-5'
<i>mfn -6.7</i>	GCAGGACATCTCTGACACC	TCAGAGTTCTCTGGCTTTCAG
<i>mfn -5.4</i>	GGCCAGATCTGCTTTAGTATG	CAGGGTGGCTACATTACTCA
<i>mfn -1.4</i>	TATCTGATACGCAGGTTATCTG	GGGAGAGGGTGTGCAAGTTA
<i>bmal1</i>	GAAAGTAGGTTAGTGGTGCGAC	CAAGTCCGGCGCGGGTAAACAG
<i>slc5a1</i>	ACATATTCAGAGACCCATT	CACAATGACCTGATCCGTA

Tableau 5 : Amorces utilisées en Chromatine Immunoprécipitation (ChIP)

Oxygraphie

Nous utilisons un Oroboros Oxygraph-2k comme moyen d'évaluation de la respiration mitochondriale, reflet de la fonction de cet organe. La fonction de la chaîne respiratoire réside en l'oxydation de NADH, H⁺ et Flavin Adénine Dinucléotide (FAD)H₂, donneurs d'électrons issus des réactions cataboliques, par les complexes I et II et la réduction du dioxygène en eau par le complexe IV, afin de créer une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Ce gradient électrochimique permet la production d'énergie sous forme d'ATP via l'ATP synthase (parfois appelée complexe V de la chaîne respiratoire) : c'est le mécanisme de phosphorylation oxydative (Figure 41).

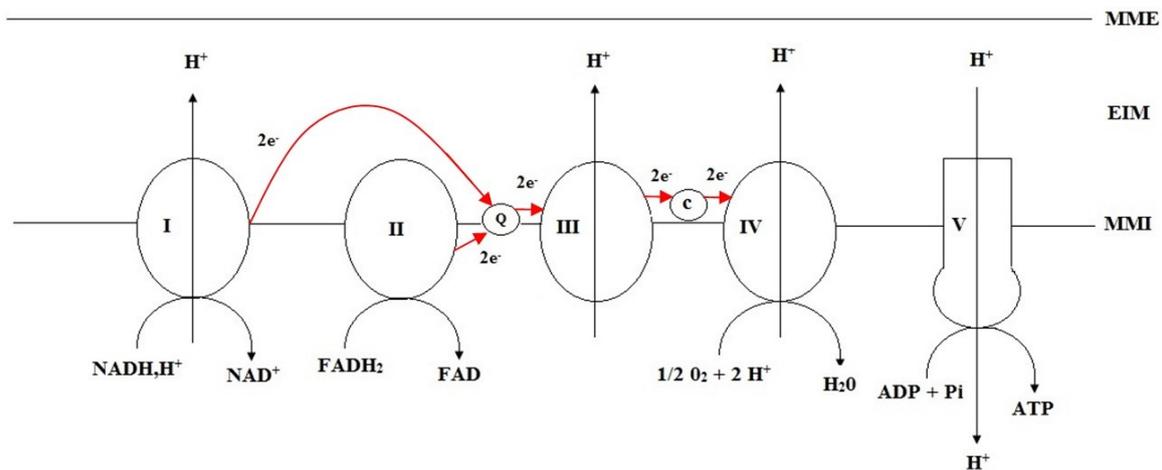


Figure 41 : Chaîne respiratoire mitochondriale
Cytochrome c (c), Ubiquinone (Q), Membrane mitochondriale externe (MME) et interne (MMI). Espace intermembranaire mitochondrial (EIM)

Les cellules sont décollées, rincées au PBS et mises en suspension à une concentration de 1 million de cellules/mL. 2 mL de cette suspension cellulaire sont introduits au sein de la chambre de l'oxygraphe. Dans ce compartiment hermétique, les cellules, de par leur respiration, vont consommer le dioxygène dissous dans le milieu. Des électrodes polarographiques sensibles au dioxygène (principe des électrodes de type Clark) communiquent ces variations de concentration au logiciel informatique d'analyse Datlab, qui déduit instantanément la consommation de dioxygène des cellules. Après évaluation de la respiration basale, nous ajoutons au cœur de la chambre divers modulateurs de la chaîne respiratoire au moyen de micro-seringues : (1) 2,5 μM d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase, pour quantifier la part de la production d'ATP par rapport à la fuite de protons, (2) des apports de 1 μM de Carbonyl Cyanide m-Chloro-Phenyl hydrazone (CCCP), un découpleur éliminant le gradient électrochimique, répétés jusqu'à atteindre la respiration maximale, (3) 100 μM d'azide de sodium, un inhibiteur du complexe IV arrêtant toute respiration mitochondriale afin de quantifier la respiration non-mitochondriale (Figure 42). Après soustraction de cette dernière, nous calculons le Respiratory Control Ratio (RCR) qui correspond au rapport respiration maximale/respiration minimale. Ainsi, le RCR représente la part de la capacité maximale de la chaîne respiratoire par rapport à la respiration liée à la fuite de protons.

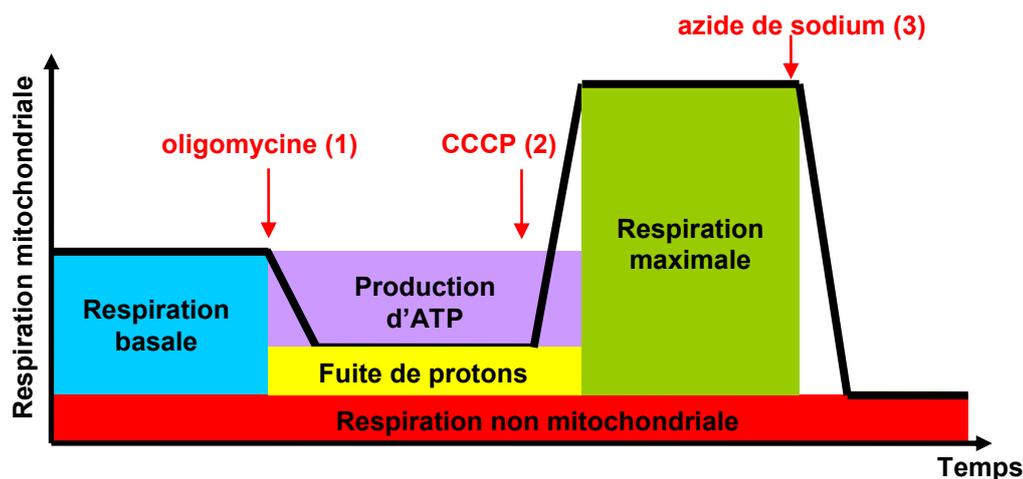


Figure 42 : Modulation de la chaîne respiratoire mitochondriale
Capture de glucose

Les myotubes C2C12 cultivés en plaque 6 puits sont privés de sérum pour 2h (DMEM 25mM glucose, 2mM glutamine) puis incubés avec 1mL de tampon Krebs-Ringer-HEPES-glucose-glutamine (KRH) (136mM NaCl, 4,7mM KCl, 1,25mM CaCl₂, 1,25mM MgSO₄, 10mM HEPES, pH 7,4) contenant 100nM d'insuline à 37°C pendant 30 minutes puis avec du 2-deoxy-D-[2,6-3H]glucose (0,33 µCi/mL ; activité finale spécifique 6,7 µCi/µmol) pendant 5 minutes supplémentaires. La capture de glucose est arrêtée par trois rinçages rapides avec du tampon KRH à 4°C. Puis les cellules sont solubilisées dans 1mL de NaOH 0,1M et neutralisées (50µL d'HCl concentré). La radioactivité est déterminée par comptage à scintillation liquide.

Présentation des résultats et analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de graphiques où l'histogramme ou la courbe symbolise la valeur moyenne et la barre d'erreur l'erreur standard de la moyenne (Standard Error of the Mean, SEM). Pour conclure à l'existence de différences significatives, les tests statistiques adaptés sont réalisés via le logiciel GraphPad Prism. Selon le nombre de groupes et de paramètres à comparer, nous appliquons des analyses paramétriques par le test t de Student en bilatéral ou par one-way ou two-ways ANOVA suivies du test *post-hoc* de Bonferroni ou de Tukey. Sur les graphiques, les étoiles signalent les différences significatives entre deux conditions inférieures au risque de 5% (*), 1% (**) ou 0,1% (***)

RESULTATS

Projet 1 : Rev-erb- α améliore l'homéostasie calcique et la réponse aux protéines mal-conformées en réprimant l'expression de la myoréguline dans le muscle squelettique

Rev-erb- α améliore l'homéostasie calcique réticulaire dans les cellules musculaires

Nous avons d'abord déterminé si Rev-erb- α contrôle l'homéostasie calcique du réticulum sarcoplasmique. Des microsomes musculaires, c'est-à-dire des vésicules sarcoplasmiques, ont été préparés à partir de souris *Rev-erba*^{-/-} et de souris contrôles sauvages (*Rev-erba*^{+/+}). La capacité de pompage calcique réticulaire a été mesurée au cours du temps après l'ajout de calcium ou de thapsigargine (TG), un inhibiteur de l'activité SERCA (Lytton et al., 1991) en utilisant une sonde calcique fluorescente. Le coefficient directeur de la pente de la diminution de la fluorescence, c'est-à-dire l'absorption calcique réticulaire dépendante de SERCA, est significativement réduit chez les souris *Rev-erba*^{-/-} comparativement aux souris *Rev-erba*^{+/+}, révélant une réduction de l'activité de SERCA en absence de Rev-erb- α (Figures 43a et 43b). *A contrario*, un traitement à l'agoniste SR9009 des récepteurs Rev-erb accroît l'activité de SERCA dans le muscle squelettique (Figures 43c et 43d).

La libération passive de calcium par le réticulum endoplasmique au moyen de thapsigargine nous permet d'estimer la quantité calcique initialement présente dans la lumière du réticulum endoplasmique. Pour ce faire, des myotubes C2C12 différenciés surexprimant la protéine Rev-erb- α humaine (REV-ERB α) ou contrôle (pBabe) furent chargés avec la sonde calcique cytosolique ratiométrique Fura2-AM afin d'estimer le contenu calcique cytosolique basal puis stimulées avec de la thapsigargine. Menées en collaboration avec Kateryna Kondratska du laboratoire de Natalya Prevarskaya, ces expériences ont permis de montrer que le calcium basal cytosolique est diminué dans les cellules surexprimant REV-ERB α mais que l'élévation de fluorescence générée par l'addition de thapsigargine, à savoir le contenu calcique réticulaire, est plus important que chez les myotubes contrôles (Figures 43e, f et g). Nous confirmons ce résultat à l'aide d'une méthode plus rapide avec un lecteur fluorimétrique et l'utilisation de la sonde Fluo4-AM (Figure 43h et i).

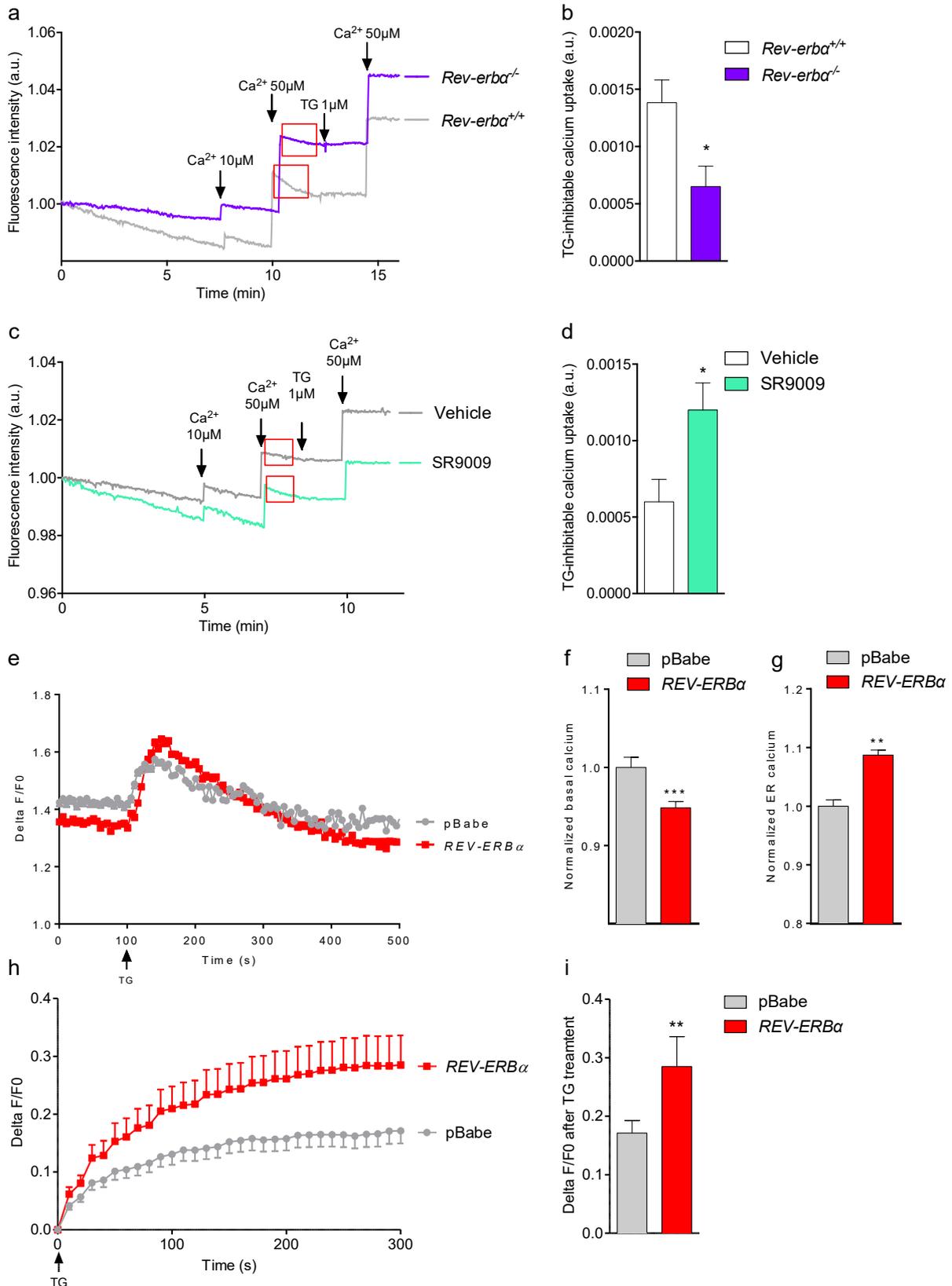


Figure 43 : Rev-erb- α améliore l'homéostasie calcique réticulaire dans les cellules musculaires
 (a) Courbes représentatives du pompage calcique dépendant de SERCA dans la fraction microsomale issues de muscle de souris contrôle *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-}. La sonde calcique fluorescente calcium green se lie au calcium extra-microsomal. La diminution de la

fluorescence au cours du temps indique la capture calcique par la fraction microsomale. Les flèches indiquent l'addition de solution calcique (10 μ M ou 50 μ M) ou de thapsigargine (TG, 1 μ M) injections. Les rectangles rouges délimitent la région considérée pour calculer la pente de diminution.

(b) Le coefficient de la pente de diminution de la fluorescence au cours du temps indique la capacité de capture calcique réalisée par SERCA dans la fraction microsomale de muscles issus de souris *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-}. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM, n=6, *p<0.05 vs. *Rev-erba*^{+/+}.

(c) Courbes représentatives du pompage calcique dépendant de SERCA dans la fraction microsomale issues de muscle de souris traitées au SR9009 (100mg/kg) ou au DMSO.

(d) Capacité de capture calcique réalisée par SERCA dans la fraction microsomale de muscles issus de souris traitées au SR9009 (100mg/kg) ou au DMSO. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM, n=6, *p<0.05 vs. DMSO.

(e) Courbes de la variation de la quantité calcique cytosolique avant et après l'addition de thapsigargine (TG, 1 μ M) dans des myotubes C2C12 pBabe ou *REV-ERB α* . La quantité calcique cytosolique est mesurée à l'aide de la sonde calcique ratiométrique Fura2-AM. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM, n=21.

(f) Quantité calcique cytosolique basale. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM, n=21, ***p<0.001 vs. pBabe.

(g) Quantité calcique réticulaire, qui correspond à la mesure de l'aire sous la courbe suite à l'ajout de thapsigargine (1 μ M). Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM, n=21, **p<0.001 vs. pBabe.

(h) Libération du contenu calcique réticulaire par l'addition de thapsigargine (TG, 1 μ M) dans les myotubes pBabe et *REV-ERB α* . Les cellules sont chargées avec la sonde calcique cytosolique fluorescente Fluo4-AM. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM, n=10.

(i) Ratio $\delta F/F_0$ normalisé par rapport aux valeurs du contrôle et obtenu 5 minutes après l'addition de la thapsigargine. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM, n=10, **p<0.01 vs. pBabe.

Rev-erb- α augmente la réponse aux protéines mal-conformées induite par un stress réticulaire

Ayant démontré que Rev-erb- α module l'activité de SERCA et le contenu calcique réticulaire et sachant que le contenu calcique réticulaire conditionne la réponse aux protéines mal-conformées (section 2. de l'introduction), nous avons testé *in vivo* si la carence en Rev-erba pouvait avoir un impact sur la réponse aux protéines mal-conformées induite par un stress réticulaire. Pour ce faire, nous procédons à une injection intramusculaire de tunicamycine (TN), un inhibiteur de la N-glycosylation (Heifetz et al., 1979) qui induit l'activation de l'UPR visualisée par l'augmentation de l'expression génique de *Bip*, *Gadd34*, *Xbp1s* et *Chop* (Figure 44a) ainsi que l'expression protéique de BiP, ATF6 et CHOP (Figure 44b-f), par rapport au muscle controlatéral de la même souris injectée avec une solution saline. De manière intéressante, les souris *Rev-erba*^{-/-} présentent une réponse significativement plus faible à l'injection de tunicamycine que les contrôles *Rev-erba*^{+/+} sur les acteurs de l'UPR étudiés (Figure 44a-f).

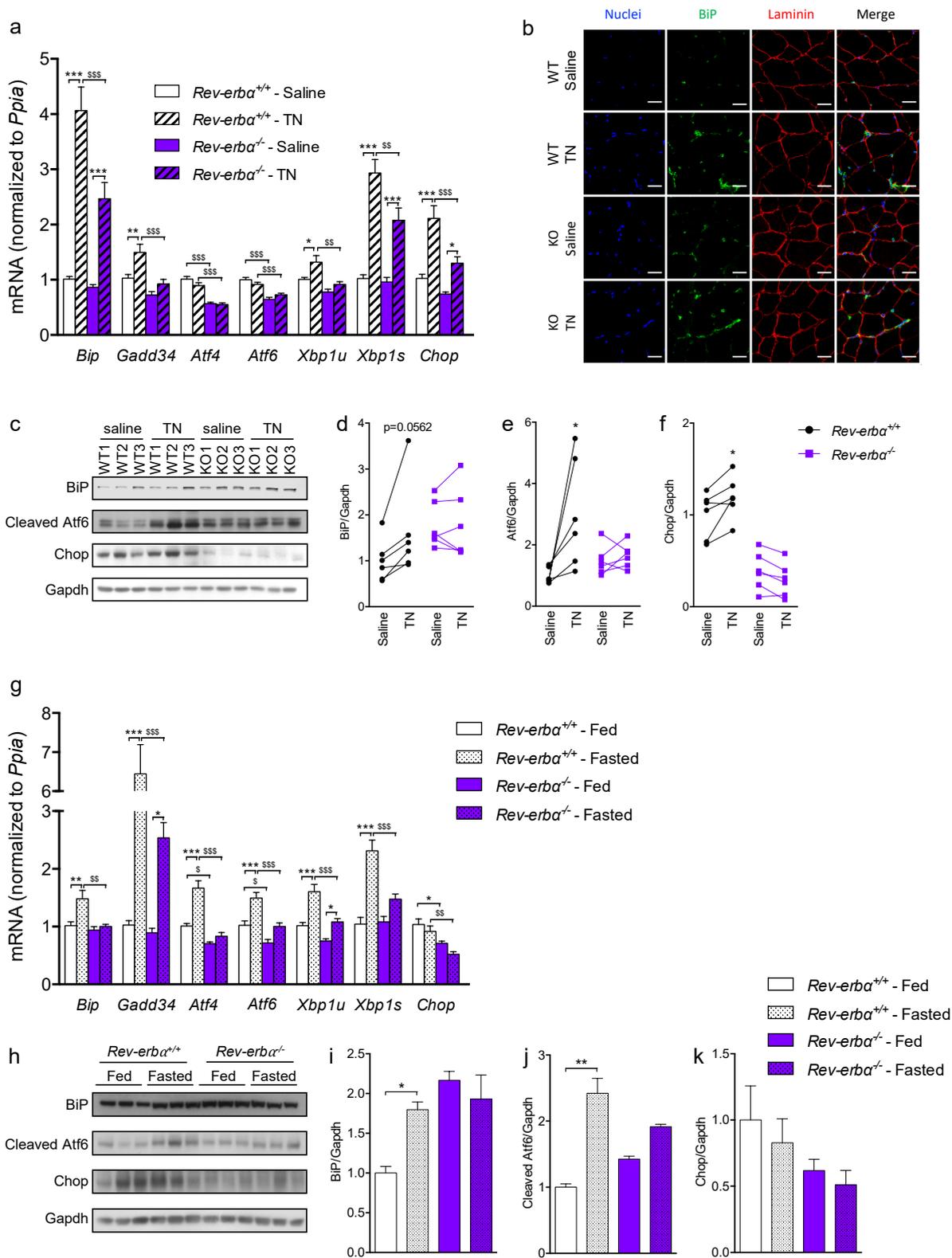


Figure 44 : L'inactivation de Rev-erb- α réduit la réponse aux protéines mal-conformées induite par un stress réticulaire dans le muscle squelettique de la souris.

(a) RT-qPCR des gènes de l'UPR dans le muscle gastrocnémien de souris *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-} injectées avec une solution saline dans une patte et une solution de tunicamycine dans la patte controlatérale. Les muscles squelettiques sont collectés 24h après injection. L'expression des gènes est normalisée par rapport au gène *peptidylprolyl isomerase A (ppia)*

codant pour la cyclophiline A. Les données sont présentées avec la moyenne \pm SEM, $n=12$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. saline, \$ $p<0.05$, \$\$ $p<0.01$, \$\$\$ $p<0.001$ vs. les souris *Rev-erba*^{+/+}.

(b) Sections de muscles gastrocnémiens issus de souris *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-} injectées avec la solution saline ou de tunicamycine dans la patte controlatérale. Un marquage par immunofluorescence est réalisé avec l'intercalant de l'ADN Hoechst (Bleu), BiP (vert), laminine (rouge). Le grossissement est de 400x. La barre d'échelle représente 25 μ m.

(c) Western-blots représentatifs de BiP, ATF6 clivé et CHOP dans le muscles gastrocnémiens issues de souris *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-} injectées avec la solution saline ou de tunicamycine dans la patte controlatérale. Les observations en apparié permettent de comparer les effets de la tunicamycine sur le muscle controlatéral injecté avec la solution contrôle. WT1 se réfère à la souris *Rev-erba*^{+/+} #1 et KO1 à la souris *Rev-erba*^{-/-} #1.

(d), (e) et (f) sont les quantifications de BIP, ATF6 clivé et CHOP, respectivement, normalisés par la GAPDH. $n=6$, * $p<0.05$ vs. saline.

(g) Expression relative des gènes de l'UPR dans le muscle gastrocnémien issu de souris *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-} soumises à un jeûne de 24h ou nourries *ad libitum*. Les données sont présentées avec la moyenne \pm SEM. $n=9$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. les souris nourries, \$ $p<0.05$, \$\$ $p<0.01$, \$\$\$ $p<0.001$ vs. les souris *Rev-erba*^{+/+}.

(h) Western-blots représentatifs et quantification de BiP (i), ATF6 clivé (j) et CHOP (k) dans les dans le muscle gastrocnémien issu de souris *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-} soumises à un jeûne de 24h ou nourries *ad libitum*. $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. les souris nourries.

Similairement, les cellules C2C12 prétraitées avec de faibles doses de thapsigargine pendant 10 jours, imitant ainsi l'appauvrissement calcique réticulaire chronique (Figure 45a-b) des souris *Rev-erba*^{-/-}, présentent une réponse plus faible à la tunicamycine, distinguée par la moindre induction de l'expression génique et protéique des acteurs de l'UPR par la tunicamycine (Figure 45c-l).

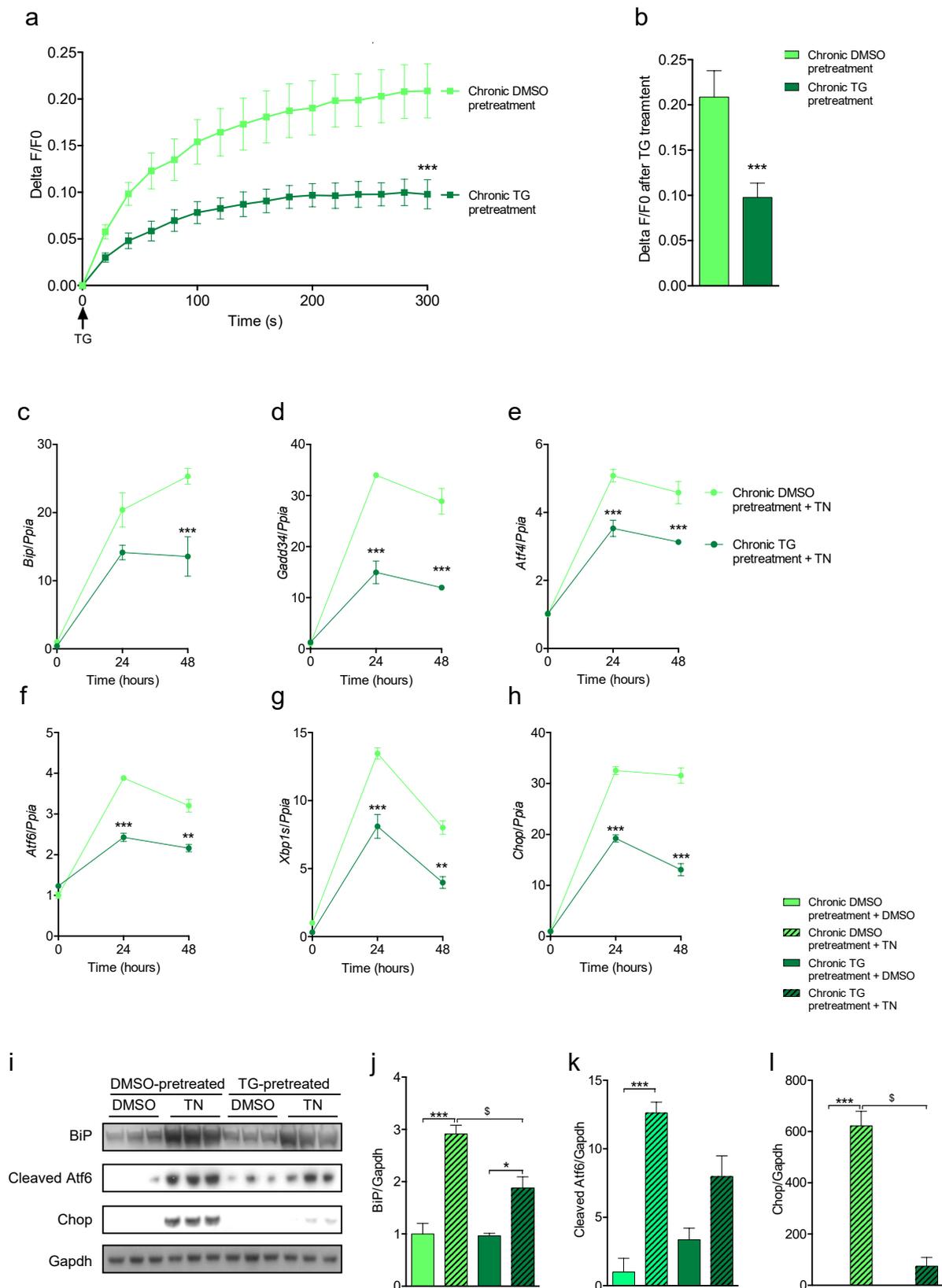


Figure 45 : La diminution chronique du contenu calcique réticulaire minore la réponse aux protéines mal-conformées suite à un stress réticulaire.

(a) Libération calcique réticulaire induite par la thapsigargine (1 μ M) dans des myotubes C2C12 prétraités pendant 15 jours avec du DMSO ou de la thapsigargine (TG, 100nM, 1h/jour), n=15.

(b) Ratio Delta F/F0 ratio obtenu 5 minutes après la thapsigargine dans des myotubes C2C12 prétraités pendant 15 jours avec du DMSO ou de la thapsigargine (TG, 100nM, 1h/jour), n=15. Les données sont exprimées avec la moyenne \pm SEM. n=15, ***p<0.001 vs. les C2C12 prétraitées chroniquement au DMSO.

(c-h) Analyse par RT-qPCR de *Bip*, *Gadd34*, *Atf4*, *Atf6*, *XBPIs*, et *Chop* dans des myotubes C2C12 prétraités pendant 15 jours avec du DMSO ou de la thapsigargine (TG, 100nM, 1h/jour) et stimulés avec de la tunicamycine (1 μ g/mL, 16h, TN) ou du DMSO. L'axe du temps représente la durée depuis laquelle le dernier prétraitement à la thapsigargine a été réalisé. L'expression génique est normalisée par la cyclophiline A (*Ppia*). Les données sont exprimées avec la moyenne \pm SEM. n=6, **p<0.01, ***p<0.001 vs. les myotubes C2C12 prétraités chroniquement au DMSO.

(i) Western-blots représentatifs de BIP, ATF6 clivé et CHOP dans des myotubes C2C12 prétraités pendant 15 jours avec du DMSO ou de la thapsigargine (TG, 100nM, 1h/jour) et stimulés avec de la tunicamycine (1 μ g/mL, 16h, TN) ou du DMSO. Le GAPDH est utilisé comme contrôle de charge.

(j-m) Quantification des western-blots de BiP, ATF6 clivé et CHOP, normalisés par le GAPDH. Les données sont exprimées avec la moyenne \pm SEM. n=3, *p<0.05, ***p<0.001 vs. les myotubes C2C12 stimulés au DMSO, \$p<0.05, vs. les cellules prétraitées chroniquement au DMSO.

Pour déterminer si Rev-erb- α agit de manière autonome sur les cellules musculaires, l'UPR a été examiné *in vitro* sur des myotubes différenciés dérivés de cellules musculaires satellites, isolées de souris invalidées pour Rev-erb α ou de souris contrôles, puis traités à la tunicamycine. Conformément aux résultats obtenus *in vivo*, la suppression de Rev-erb α provoque une diminution de l'activation de l'UPR par rapport aux cellules de type sauvage (Figure 46).

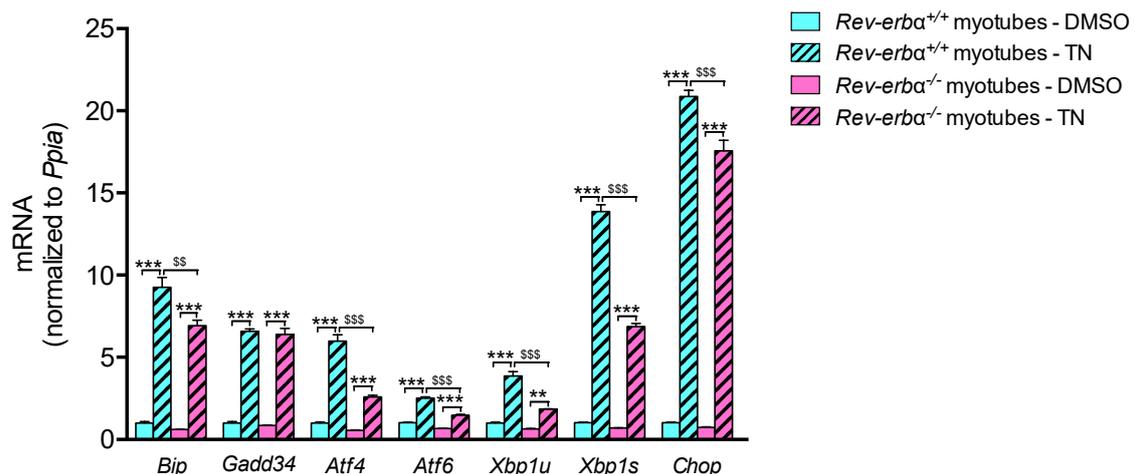


Figure 46 : L'UPR induite par un stress réticulaire est diminuée chez les myotubes issues de cellules satellites de souris *Rev-erba*^{-/-}.

Les cellules satellites sont isolées de muscles *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-}, amplifiées et différenciées en myotubes. Puis, la tunicamycine est ajoutée pour induire l'UPR. Les données

représentent la moyenne \pm SEM, n=3, **p<0.01, ***p<0.001 vs. les cellules incubées avec le DMSO, \$\$p<0.01, \$\$\$p<0.001 vs. les cellules *Rev-erba*^{+/+} traitées à la tunicamycine.

D'autre part, les souris ont été soumises à un jeûne de 24 heures, qui est connu pour activer l'UPR (Paul et al., 2012). Comme prévu, les trois branches de signalisation de l'UPR menées par PERK, IRE1 et ATF6 sont activées chez les souris *Rev-erba*^{+/+}, tant au niveau de l'ARNm (Figure 44g) que des protéines (Figure 44h-k). En revanche, l'induction de l'UPR est beaucoup plus faible chez les souris *Rev-erba*^{-/-} (Figure 44g-k).

Pour déterminer si *Rev-erb- α* est suffisant pour moduler l'UPR, des myotubes contrôles pBabe ou REV-ERB α surexprimant C2C12 ont été traités avec de la tunicamycine ou privés de ressources nutritionnelles pendant 3 heures par un traitement PBS. Le traitement à la tunicamycine déclenche l'expression des gènes et des protéines liés à l'UPR de manière plus importante chez les cellules surexprimant REV-ERB α par rapport aux contrôles (Figure 47a-f). De même, l'activation de l'UPR induite par la privation de nutriments *in vitro* est exacerbée par la surexpression de REV-ERB α par rapport aux pBabe (Figure 47g-k). De plus, l'activation des récepteurs *Rev-erb* avec le SR9009 conduit à une plus grande induction de *Bip*, *Gadd34*, *Atf4*, *Xbp1s* et *Chop* suite au traitement tunicamycine comparativement aux cellules traitées par au DMSO (Figure 48).

Ces données identifient *Rev-erb- α* comme modulateur de la réponse de l'UPR induite par le stress réticulaire dans le muscle squelettique.

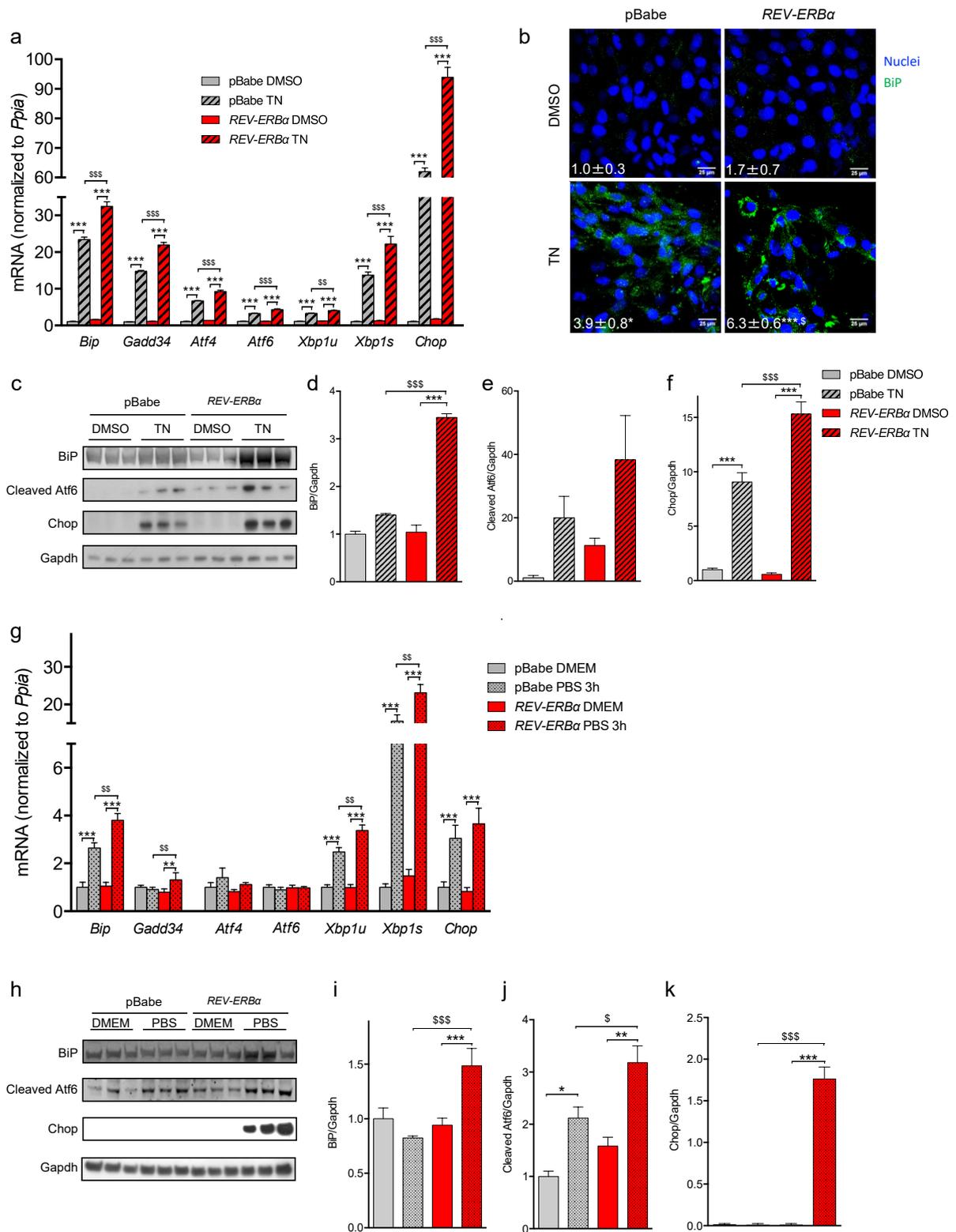


Figure 47 : La surexpression de Rev-erb- α amplifie l'UPR induite par un stress réticulaire *in vitro*

(a) RT-qPCR des gènes de l'UPR induit par une stimulation à la tunicamycine (TN, 1 μ g/mL, 16 heures) dans les myotubes C2C12 pBabe et REV-ERB α . Les données représentent la moyenne \pm SEM. n=6, ***p<0.001 vs. les cellules stimulées au DMSO, §§p<0.01, \$\$\$p<0.001 vs. les cellules REV-ERB α traitées à la tunicamycine.

(b) Photographies représentatives de myotubes pBabe et *REV-ERB α* traités au DMSO ou à la tunicamycine (TN, 1 μ g/mL, 16 heures). La protéine BiP (marquage vert) est augmentée dans les pBabe traités à la tunicamycine par rapport aux cellules traitées au DMSO. Un accroissement plus important du marquage BiP est observé dans les *REV-ERB α* traitées à la tunicamycine. Le noyau est marqué par le Hoechst et apparaît en bleu. Le grossissement est de 400x. La barre d'échelle représente 25 μ m.

(c) Western-blots représentatifs et quantification de BiP (d), ATF6 clivé (e) et CHOP (f) respectivement et normalisés par rapport au GAPDH. Les données représentent la moyenne \pm SEM. n=6 pour l'expression génique, n=3 pour l'expression protéique, ***p<0.001 vs. la condition DMSO respective, \$\$p<0.01, \$\$\$p<0.001 vs. les cellules pBabe traitées à la tunicamycine.

(g) RT-qPCR des gènes de l'UPR chez les myotubes pBabe et *REV-ERB α* maintenus dans le milieu de culture ou incubés dans du PBS pour 3h.

(h) Western-blots représentatifs et quantification de BiP (i), ATF6 clivé (j) et CHOP (k), respectivement et normalisés par rapport au GAPDH. Les données représentent la moyenne \pm SEM. n=12 pour l'expression génique, n=3 pour l'expression protéique. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. la condition DMSO respective, \$\$p<0.01, \$\$\$p<0.001 vs. les cellules pBabe traitées à la tunicamycine.

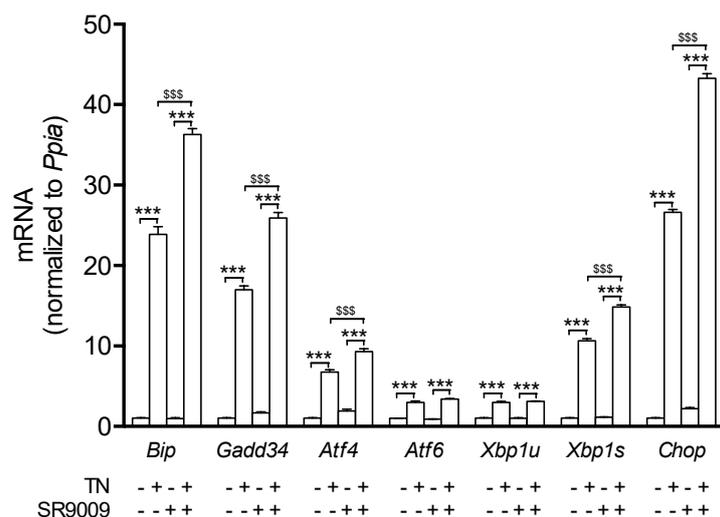


Figure 48 : L'activation pharmacologique des récepteurs Rev-erb amplifie l'UPR induite par un stress réticulaire.

L'expression des gènes de l'UPR est réalisée sur des C2C12 prétraitées ou non avec l'agoniste SR9009 des Rev-erb puis traitées ou non avec de la tunicamycine. Les données représentent la moyenne \pm SEM. n=3, ***p<0.001 vs. les cellules contrôles, \$\$\$p<0.001 vs. les cellules traitées à la tunicamycine.

La modulation de l'UPR par Rev-erb- α dépend de l'homéostasie calcique via la régulation de la myoréguline

Nous nous sommes demandé si la modulation de l'UPR par Rev-erb- α dépend de sa capacité à contrôler l'homéostasie calcique réticulaire. Une injection intramusculaire de thapsigargine a été réalisée chez les souris *Rev-erba*^{-/-} et *Rev-erba*^{+/+} pour vidanger les réserves de calcium réticulaire, lissant ainsi les différences de contenu calcique réticulaire

existants entre souris *Rev-erba*^{-/-} et *Rev-erba*^{+/+}. Par ailleurs, l'injection de thapsigargine active l'UPR, mais contrairement aux expériences réalisées avec la tunicamycine (Figure 44a-e), l'induction est identique entre animaux *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-} (Figure 49a). De même, l'activation de l'UPR déclenchée par la thapsigargine est identique entre les cellules pBabe et surexprimant REV-ERB α (Figure 49b) ce qui indique que Rev-erb- α module l'UPR induite par le stress réticulaire par son action sur les réserves de calcium.

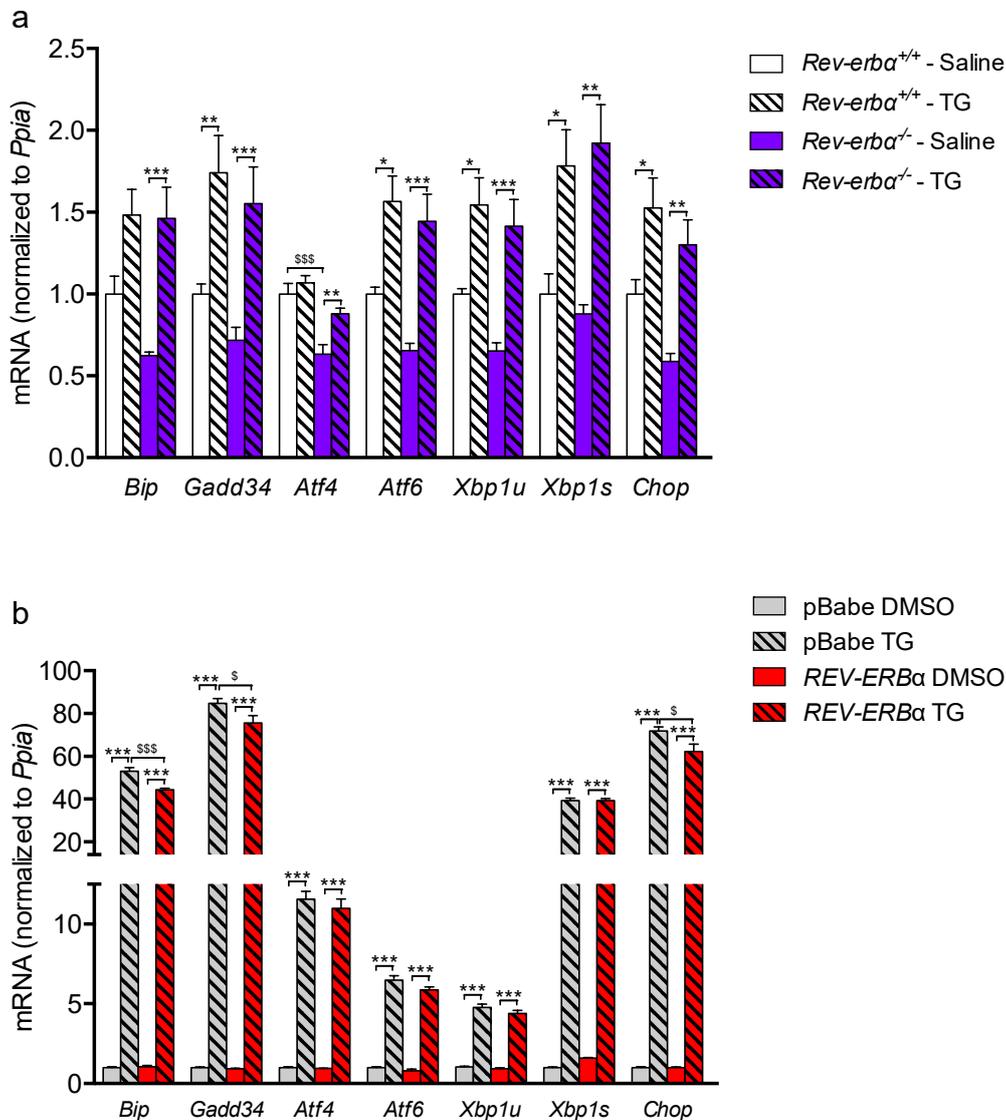


Figure 49 : La déplétion calcique du reticulum endoplasmique par la thapsigargine abolit l'effet de Rev-erb- α sur l'UPR.

(a) Expression génique des acteurs de l'UPR dans le muscle gastrocnémien de souris *Rev-erba*^{-/-} et *Rev-erba*^{+/+} ayant subi une injection de solution saline dans un muscle et de thapsigargine (TG) dans le muscle controlatéral. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM, n=12, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. l'injection saline, \$p<0.05, \$\$p<0.01, \$\$\$p<0.001 vs. les souris *Rev-erba*^{+/+}.

(b) Expression génique des acteurs de l'UPR dans les myotubes C2C12 pBabe et *REV-ERB α* traités avec le DMSO ou la thapsigargine (TG, 1 μ M, 16 heures). Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM, n=6, ***p<0.001 vs. DMSO, \$p<0.05, \$\$\$p<0.001 vs. les myotubes *REV-ERB α* .

Etant donné que l'homéostasie calcique du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique est principalement contrôlée par RyR1 et SERCA, nous avons déterminé si Rev-erb- α contrôle leur expression génique. L'expression des gènes *Ryr1*, *Serca1* et *Serca2* est identique entre les souris *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-} (Figure 50a-c) ainsi qu'entre les cellules pBabe et surexprimant REV-ERB α (Figure 50d-f). Cependant, l'activité de la protéine SERCA est principalement régulée par la myoréguline (Mln) (Anderson et al., 2015), un inhibiteur de SERCA spécifique des muscles squelettiques récemment identifié. Il est intéressant de noter que l'expression de la myoréguline est régulée à la hausse de près de 50 % chez les souris *Rev-erba*^{-/-} par rapport aux souris contrôle (Figure 50g). De plus, le traitement *in vivo* avec l'agoniste SR9009 entraîne une diminution de l'expression de la myoréguline (Figure 50h). De façon cohérente, la surexpression de REV-ERB α et l'activation pharmacologique avec l'agoniste SR9009 diminuent l'expression de la myoréguline dans les myotubes C2C12 (Figure 50i-j), alors que le traitement des cellules avec l'antagoniste SR8278 accroît l'expression de la myoréguline (Figure 50k).

Pour tester si la liaison directe de Rev-erb- α à l'ADN est nécessaire à la régulation du gène *Mln*, nous avons utilisé des souris exprimant un mutant de Rev-erb- α qui possède un domaine de liaison à l'ADN (DBD), et ce de manière spécifique au muscle squelettique (Zhang et al., 2015). Comme nous l'avons observé chez les souris *Rev-erba*^{-/-}, l'expression de la myoréguline est plus élevée chez les souris mutantes que chez les souris sauvages (Figure 50l), ce qui signifie que l'effet de Rev-erb- α requiert sa liaison à l'ADN *in vivo*. Une analyse *in silico* a permis d'identifier au moins trois éléments de réponse de Rev-erb (RevRE) localisés à 1,4kb, 5,4kb et 6,7 kb en amont du site du début de transcription de la myoréguline (figure 50m). Nous avons ensuite démontré par des expériences de ChIP-qPCR que Rev-erb- α occupe ces trois régions dans le muscle squelettique (Figure 50m). Dans l'ensemble, ces données révèlent que Rev-erb- α réprime l'expression du gène codant pour la myoréguline en se liant directement à trois sites spécifiques RevRE dans le promoteur de la myoréguline, contrôlant ainsi l'activité de recapture calcique par SERCA.

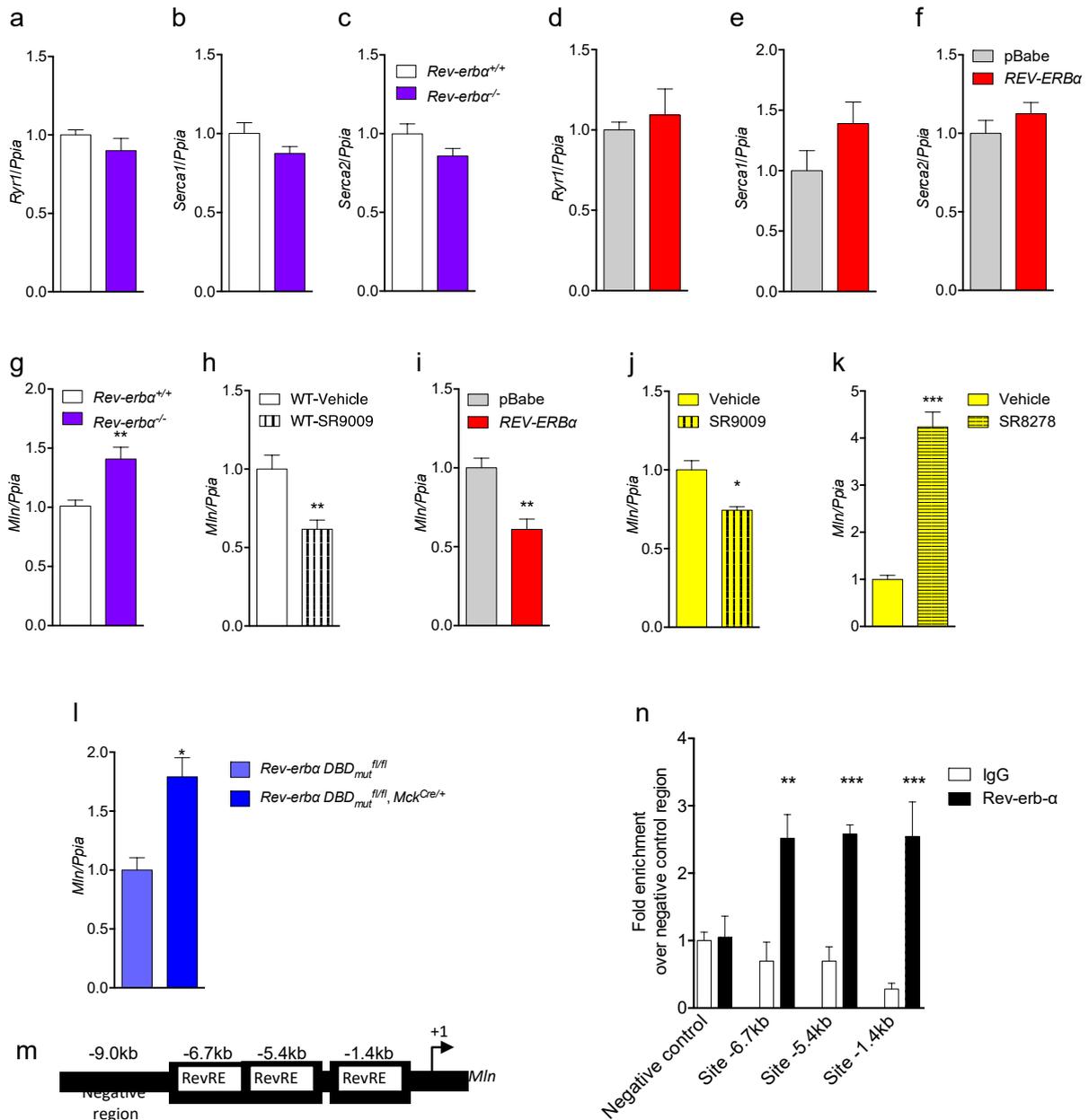


Figure 50 : Rev-erb- α réprime l'expression de la myoréguline par une liaison directe sur son promoteur.

(a) Expression de *RyR1*, (b) *Serca1* et (c) *Serca2* dans les muscles gastrocnémiens de souris *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-}.

(d) Expression de *RyR1*, (e) *Serca1* et (f) *Serca2* dans les myotubes C2C12 pBabe et *REV-ERBa*.

Expression de la myoréguline dans (g) les muscles gastrocnémiens de souris *Rev-erba*^{+/+} et *Rev-erba*^{-/-} (n=6, **p<0.01 comparé au *Rev-erba*^{+/+}), (h) les muscles gastrocnémiens issus de souris traitées au SR9009 ou au DMSO (n=5, **p<0.01 comparé au DMSO), (i) les myotubes C2C12 pBabe et *REV-ERBa* (n=5, **p<0.01 comparé au pBabe), les myotubes C2C12 traités (j) à l'agoniste SR9009 (10 μ M), (k) à l'antagoniste SR8278 (10 μ M) (n=6, *p<0.05, ***p<0.001 comparé aux cellules respectives traitées au DMSO).

(l) La surexpression spécifique du muscle d'un isoforme mutée de Rev-erb- α dans son domaine de liaison à l'ADN (*Rev-erba* *DBD*_{mut}^{fl/fl}, *MCK*^{Cre/+}), qui agit comme un dominant

négalif, augmente l'expression génique de la myoréguline par rapport aux souris contrôles *Rev-erba^{fl/fl}*, n=3-5, *p<0.05 vs. *Rev-erba DBD_{mut}^{fl/fl}*.

(m) Représentation schématique du promoteur de la myoréguline indiquant la présence de trois sites putatifs de liaison de Rev-erb- α , les Rev-erb- α Response Elements (RevRE), localisés à ~1.4, ~5.4kb et ~6.7kb en amont du site d'initiation de la transcription.

(n) L'analyse par Chromatin Immunoprécipitation (ChIP) *via* l'utilisation d'anticorps anti-Rev-erb- α ou contrôle Immunoglobulin G (IgG) et d'amorces spécifiques qui ciblent les trois sites putatifs identifiés ou une région contrôle négative à ~9kb en amont du site d'initiation de la transcription. n=6-8.

Tous les résultats présentés dans cette figure le sont sous forme de moyenne \pm SEM.

La surexpression de myoréguline rétablit une réponse UPR standard dans les cellules surexprimant Rev-erb- α

Pour déterminer si la répression de la myoréguline par Rev-erb- α est directement responsable de la modulation de l'UPR, nous avons généré un vecteur viral permettant la surexpression de la myoréguline, conduisant ainsi à une concentration en calcium réticulaire réduite par rapport aux cellules pBabe témoins (Figure 51a-b). Comme cela fut observé en présence d'un appauvrissement chronique en calcium (Figure 45), la baisse du contenu calcique réticulaire par la myoréguline est associée à une diminution de l'UPR induite par le stress réticulaire à la tunicamycine, visualisé par une expression génique plus faible de *Bip*, *Atf6* et *Xbp1s* (Figure 51c) et une diminution de l'induction des protéines BiP, ATF6 clivée et CHOP (Figure 51d). Il est intéressant de noter que la surexpression de la myoréguline normalise la teneur en calcium réticulaire dans les cellules surexprimant REV-ERB α en le ramenant au niveau observé dans les cellules pBabe (Figure 52a-b). De même, la surexpression de la myoréguline réduit l'exacerbation de la réponse UPR occasionnée par la surexpression en REV-ERB α tant sur le plan de l'expression génique (Figure 52c-h) que protéique (Figure 52i-m) des acteurs de l'UPR. Ainsi, ces données démontrent que Rev-erb- α module l'UPR *via* sa régulation de l'homéostasie calcique par la myoréguline.

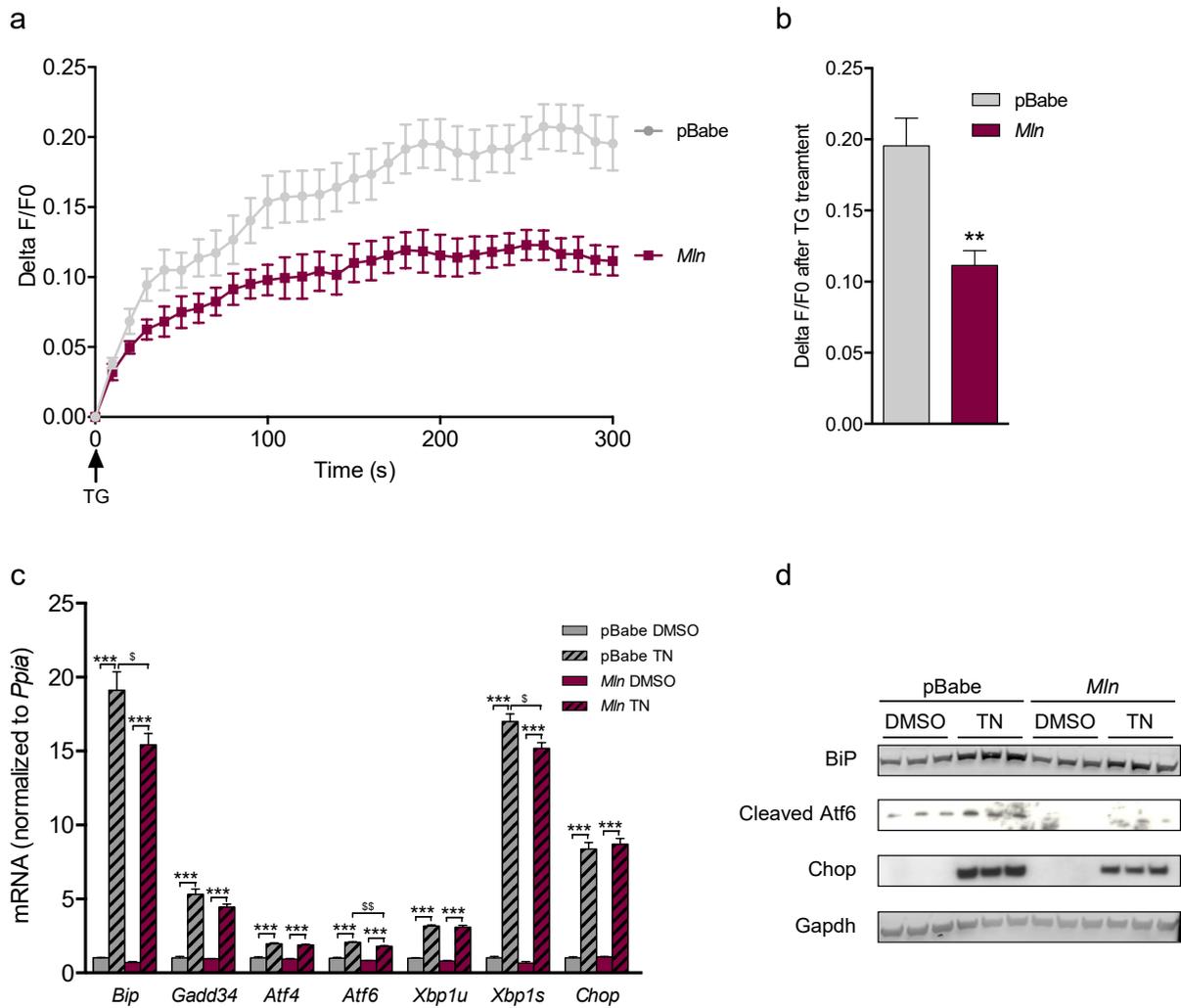


Figure 51 : La surexpression de la myoréguline réduit le contenu calcique réticulaire et l'UPR en réponse à une stimulation à la tunicamycine.

(a) Libération calcique du contenu calcique réticulaire par la thapsigargine dans les myotubes C2C12 pBabe et Mln. Les résultats sont exprimés en moyenne de $\delta F/F0 \pm SEM$, $n=7$.

(b) $\delta F/F0$ après 5 minutes de traitement à la thapsigargine dans les myotubes C2C12 pBabe et Mln. Les graphiques représentent la moyenne $\pm SEM$, $n=7$, $**p<0.01$ vs. pBabe.

(c) RTqPCR des gènes de l'UPR dans les myotubes C2C12 pBabe et Mln traitées au DMSO ou à la tunicamycine. $n=6$, $***p<0.001$ vs. DMSO, $\$p<0.05$, $$$p<0.01$ vs. pBabe TN.

(d) Western-blots représentatifs de BiP, ATF6 clivé et CHOP. GAPDH est utilisé comme contrôle de charge.

Figure 52 : La surexpression de la myoréguline abolit l'exacerbation de l'UPR induit par un traitement à la tunicamycine.

(a) Libération calcique du contenu réticulaire au cours du temps suite à une stimulation à la thapsigargine dans les myotubes pBabe, *REV-ERB α* et *REV-ERB α /Mln*. Les résultats sont représentés avec la moyenne \pm SEM du $\delta F/F_0$, n=6.

(b) $\delta F/F_0$ mesuré 5 minutes après l'addition de thapsigargine dans les myotubes pBabe, *REV-ERB α* et *REV-ERB α /Mln*. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM du $\delta F/F_0$, n=6, ***p<0.001 vs. *REV-ERB α* , \$p<0.05 vs. *REV-ERB α /Mln*.

(c-h) Analyse par RTqPCR de l'expression de *Bip*, *Gadd34*, *Atf4*, *Atf6*, *XBPIs* et *Chop* dans les myotubes pBabe, *REV-ERB α* et *REV-ERB α /Mln* traitées au DMSO ou à la tunicamycine. L'expression génique est normalisée par rapport à la cyclophiline A (*Ppia*). Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM, n=6, ***p<0.001 vs. DMSO, \$\$\$p<0.001 vs. *REV-ERB α* ou *REV-ERB α /Mln* traités à la tunicamycine.

(i) Western-blots représentatifs de BiP, ATF6 clivé et CHOP dans les myotubes pBabe, *REV-ERB α* et *REV-ERB α /Mln* traitées au DMSO ou à la tunicamycine. GAPDH est utilisé comme contrôle de charge.

(j-m) Quantification des western-blots de BiP, ATF6 clivé et CHOP, normalisés par rapport au GAPDH. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM, n=6 pour BiP, n3 pour CHOP et ATF6 clivé, ***p<0.001 vs. pBabe DMSO, \$p<0.05, \$\$p<0.01, \$\$\$p<0.001 vs. *REV-ERB α* ou *REV-ERB α /Mln* traités à la tunicamycine.

L'activation pharmacologique des récepteurs Rev-erb améliore l'homéostasie calcique et l'UPR dans les cellules musculaires issues de patients myopathes de Duchenne

De même que nous l'avons observé dans nos souris *Rev-erba*^{-/-}, l'altération de l'homéostasie calcique est une caractéristique de la myopathie (Vallejo-Illarramendi et al., 2014). Nous avons observé que les cellules musculaires issues de patients myopathes de Duchenne libèrent deux fois moins de calcium que les myoblastes témoins humains (Figure 53a-b) et expriment moins de myoréguline (Figure 53c). De plus, comparativement aux témoins, l'expression de REV-ERB- α est réduite d'environ 30 % dans les cellules DMD (Figure 53d). Nous avons voulu vérifier si l'activation pharmacologique des récepteurs REV-ERB par le SR9009 pouvait améliorer l'homéostasie calcique. Une teneur en calcium plus élevée a été mesurée de façon significative dans les myotubes traités au SR9009 par rapport aux myotubes traités par le DMSO (Figure 53e-f). Ceci s'accompagne d'une réduction significative de l'expression de la myoréguline (Figure 53g) ainsi que d'une induction plus élevée de la réponse UPR lors d'un stress réticulaire induit par la tunicamycine (Figure 53h-k).

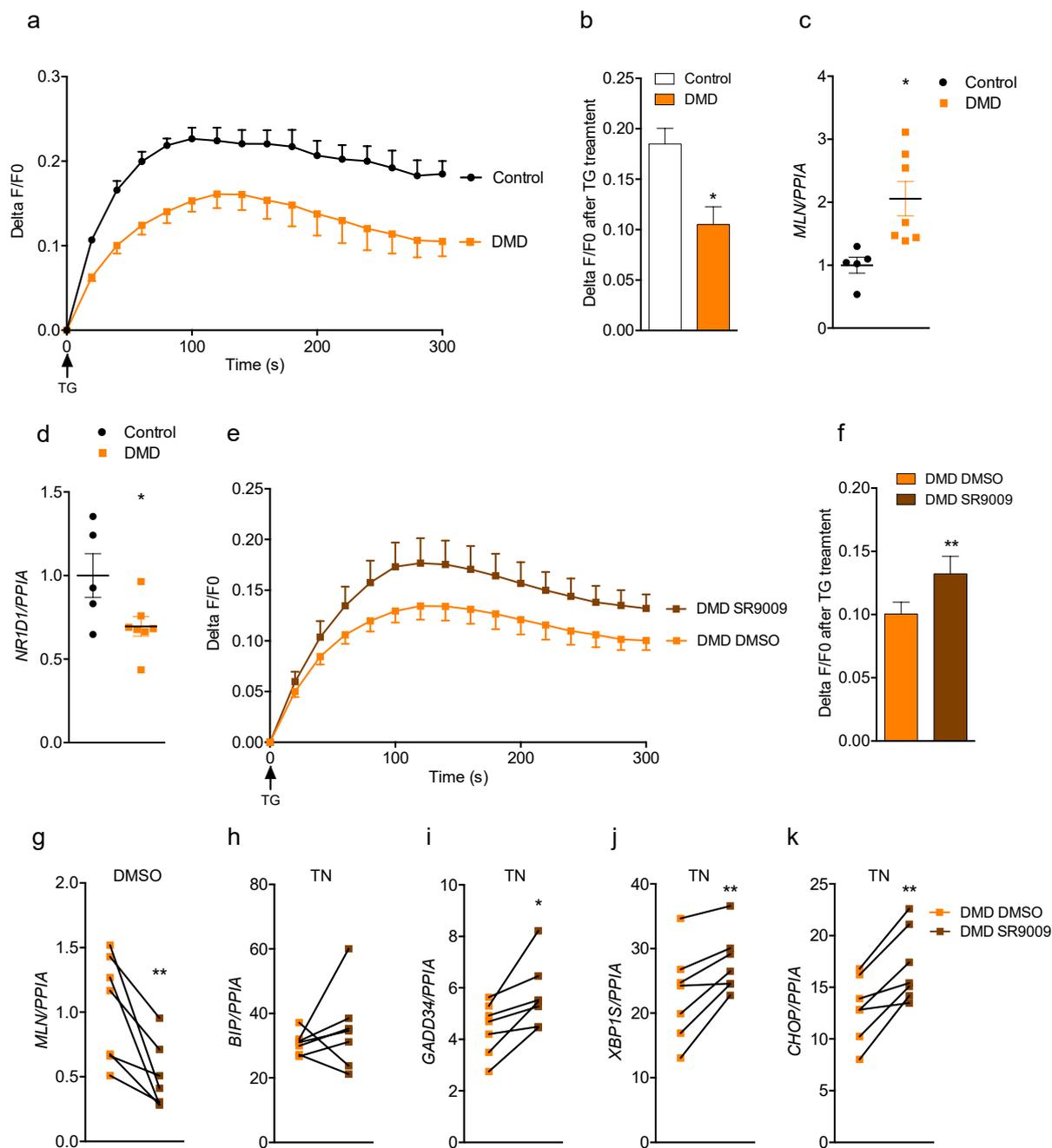


Figure 53 : L'activation pharmacologique des récepteurs Rev-erb améliore l'homéostasie calcique et l'UPR dans les cellules musculaires issues de patients myopathes de Duchenne.

(a) Libération calcique du contenu réticulaire au cours du temps suite à une stimulation à la thapsigargine dans les myotubes de patients sains et de patients myopathes de Duchenne. Les résultats sont représentés avec la moyenne \pm SEM du $\delta F/F_0$, $n=3-4$.

(b) $\delta F/F_0$ mesuré 5 minutes après l'addition de thapsigargine dans les myotubes de patients sains et de patients myopathes de Duchenne. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM du $\delta F/F_0$, $n=3-4$, $*p<0.05$ vs. myotubes de patients contrôles.

(c-d) Analyse par RTqPCR de l'expression de *MLN* et *NR1D1* dans les myotubes de patients sains et de patients myopathes de Duchenne. L'expression génique est normalisée par rapport à la cyclophiline A (*PPIA*). Les résultats sont représentés avec la moyenne \pm SEM du $\delta F/F_0$, $n=3-4$, $*p<0.05$ vs. myotubes de patients contrôles.

(e) Libération calcique du contenu réticulaire au cours du temps suite à une stimulation à la thapsigargine dans les myotubes de patients myopathes de Duchenne traités au DMSO ou au SR9009. Les résultats sont représentés avec la moyenne \pm SEM du $\delta F/F_0$, n=7.

(f) $\delta F/F_0$ mesuré 5 minutes après l'addition de thapsigargine dans les myotubes de patients myopathes de Duchenne traités au DMSO ou au SR9009. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM du $\delta F/F_0$, n=7, **p<0.01 vs. myotubes traités au DMSO.

(g) Analyse par RTqPCR de l'expression de *MLN* dans les myotubes de patients myopathes de Duchenne traités au DMSO ou au SR9009. L'expression génique est normalisée par rapport à la cyclophiline A (*PPIA*). Les résultats sont représentés avec la moyenne \pm SEM du $\delta F/F_0$, n=7, **p<0.01 vs. myotubes traités au DMSO.

(h-k) Analyse par RTqPCR de l'expression de *BIP*, *GADD34*, *XBPI5* et *CHOP* dans les myotubes de patients myopathes de Duchenne traités au DMSO ou au SR9009. L'expression génique est normalisée par rapport à la cyclophiline A (*PPIA*). Les résultats sont représentés avec la moyenne \pm SEM du $\delta F/F_0$, n=7, *p<0.05, **p<0.01 vs. myotubes traités au DMSO.

L'activation pharmacologiques des récepteurs Rev-erb tend à améliorer la fonction des muscles squelettiques dans le modèle de souris de la myopathie de Duchenne *mdx/utr*^{+/-}

Eu égard la controverse actuelle à l'encontre des souris *mdx* comme étant un modèle trop faible pour récapituler le phénotype de la myopathie de Duchenne humaine, nous décidons de travailler sur des souris *mdx/utr*^{+/-}, un modèle plus sévère de la myopathie de Duchenne. Les souris sont soumises à une injection intrapéritonéale de SR9009 (100mg/kg) ou de DMSO par jour pendant 20 jours. Le traitement au SR9009 réduit l'expression de la myoréguline (Figure 54a) et, par conséquent, une augmentation de l'activité du SERCA semble être observée (Figure 54b). De plus, la section transversale du tibialis antérieur révèle que l'aire des fibres (Cross Sectional Area, CSA) semble être augmentée par le traitement SR9009 (Figure 54c) ainsi que l'aire des fibres centronucléées (Centro Nuclei Fiber, CNF) (Figure 54d), ce qui suggère une meilleure régénération musculaire par le SR9009. La tension musculaire du muscle gastrocnémien traité au SR9009 en réponse à une stimulation simple (Figure 54e) ainsi que la résistance à la fatigue (Figure 54f) ne sont pas statistiquement significativement différentes des contrôles malgré une tendance à l'accroissement. Le SR9009 augmente tout de même la capacité du muscle gastrocnémien à contracter ses fibres lentes pendant un tétanos, lorsque seule une tendance est observée pour des fréquences de stimulation plus élevées (Figure 54g).

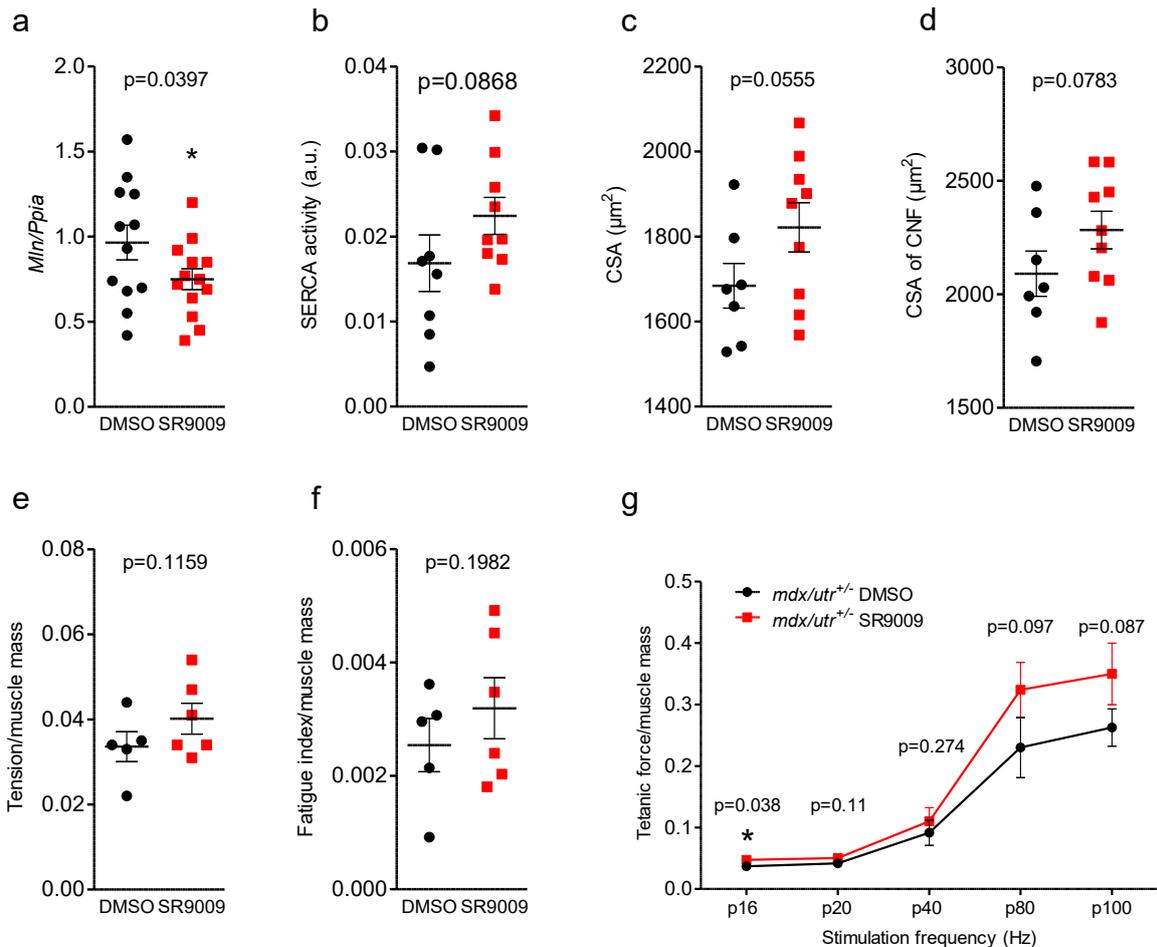


Figure 54 : L'activation pharmacologiques des récepteurs Rev-erb tend à améliorer la fonction des muscles squelettiques dans le modèle de souris de la myopathie de Duchenne *mdx/utr*^{+/-}.

(a) Analyse par RTqPCR de l'expression de *MLN* dans les souris *mdx/utr*^{+/-} traitées au DMSO ou au SR9009. L'expression génique est normalisée par rapport à la cyclophiline A (*PPIA*). Les résultats sont représentés avec la moyenne \pm SEM du $\delta F/F_0$, $n=13$, * $p<0.05$ vs. souris traitées au DMSO.

(b) Le coefficient de la pente de diminution de la fluorescence au cours du temps indique la capacité de capture calcique réalisée par SERCA dans la fraction microsomale de muscles issus de souris *mdx/utr*^{+/-} traitées au DMSO ou au SR9009. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM, $n=12$.

(c) Aire globale des fibres musculaires et (d) des fibres centro-nuclées de muscles issus de souris *mdx/utr*^{+/-} traitées au DMSO ou au SR9009 mesurée par la macro MuscleJ. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM, $n=9$.

(e) Contraction musculaire du gastrocnémien obtenue suite à une stimulation simple, (f) indice de fatigue et (g) réponse téτανique pour des stimulations de fréquence croissantes des muscles gastrocnémiens de souris *mdx/utr*^{+/-} traitées au DMSO ou au SR9009. Les valeurs sont normalisées par rapport à la masse des muscles squelettiques. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM, $n=5-6$, * $p<0.05$ vs. souris traitées au DMSO.

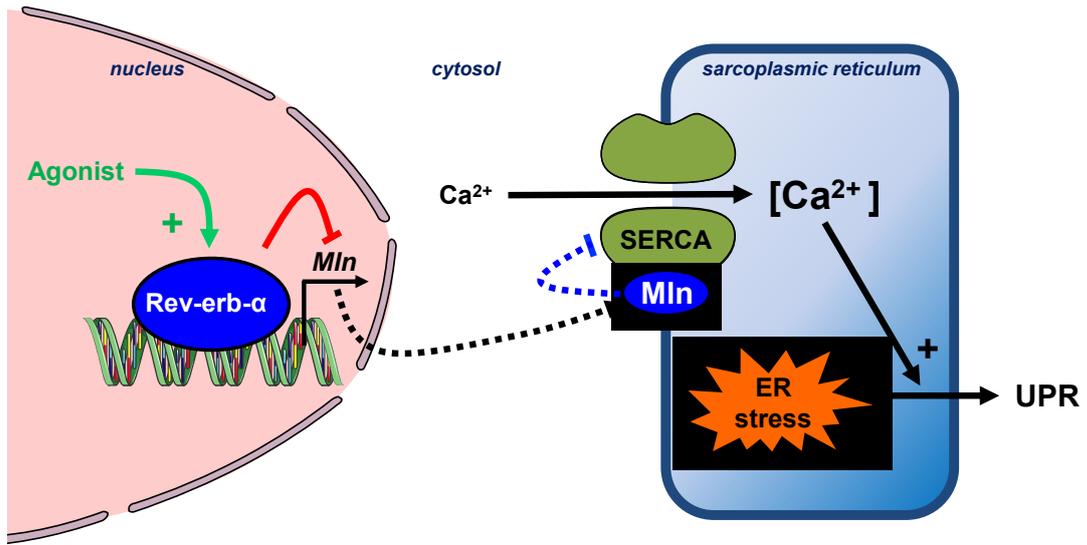


Figure 55 : Résumé graphique des résultats du projet 1

Projet 2 : L'augmentation des MAMs par Rev-erb- α contrôle le destin de la cellule satellite musculaire via l'accroissement de l'apoptose induite par le stress réticulaire

La surexpression de Rev-erb- α exacerbe l'apoptose induite par un stress réticulaire dans les cellules C2C12

Nous avons montré dans le projet 1 que Rev-erb- α exacerbe la réponse aux protéines mal-conformées dans le muscle squelettique et les myotubes C2C12. Etant donné que l'UPR est susceptible d'activer le processus apoptotique (Hetz, 2012), nous avons regardé si le traitement à la tunicamycine utilisé est susceptible d'induire la mort cellulaire par apoptose. Premièrement, nous réalisons un comarquage à l'annexine V et à l'IP (Figure 56a). L'annexine V marque les phosphatidylsérines de la membrane plasmique qui sont externalisés aux stades précoces de l'apoptose. L'iodure de propidium, un intercalant de l'ADN, pénètre les cellules nécrotiques ou en phase tardive d'apoptose, qui présentent une perméabilité membranaire. Nous constatons que le traitement à la tunicamycine provoque une augmentation de la proportion de cellules C2C12 en phase précoce d'apoptose (Annexine V+, IP-). De même, l'activité de la caspase 3 (Figure 56b) et le clivage des caspases 12 et 3 est induit après 24h de traitement tunicamycine (Figure 56c) De manière intéressante, la surexpression de Rev-erb- α exacerbe le phénotype d'apoptose sur les paramètres étudiés (Figure a-c). De plus, nous nous sommes intéressés à la quantité d'ADN des cellules C2C12 par un marquage stœchiométrique à l'iodure de propidium sur cellules fixées. Les cellules mortes présentent un ADN dégradé et se trouvent en phase sub-G1 du cycle cellulaire. Le traitement à la tunicamycine entraîne une augmentation progressive de la proportion de cellules en phase sub-G1 au cours du temps et de manière dose dépendante (Figure 56d-e). Là encore, la surexpression de Rev-erb- α confère un accroissement de la quantité de la mort cellulaire des cellules C2C12 au traitement tunicamycine. De manière intéressante, nous démontrons que l'exacerbation de la mort cellulaire par Rev-erb- α est dépendante du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie, puisque l'induction de l'apoptose par l'étoposide ou la staurosporine n'est pas modulée par Rev-erb- α (Figure 57).

En définitive, nous concluons que la surexpression en Rev-erb- α exacerbe l'apoptose induite par un stress réticulaire dans des cellules musculaires C2C12.

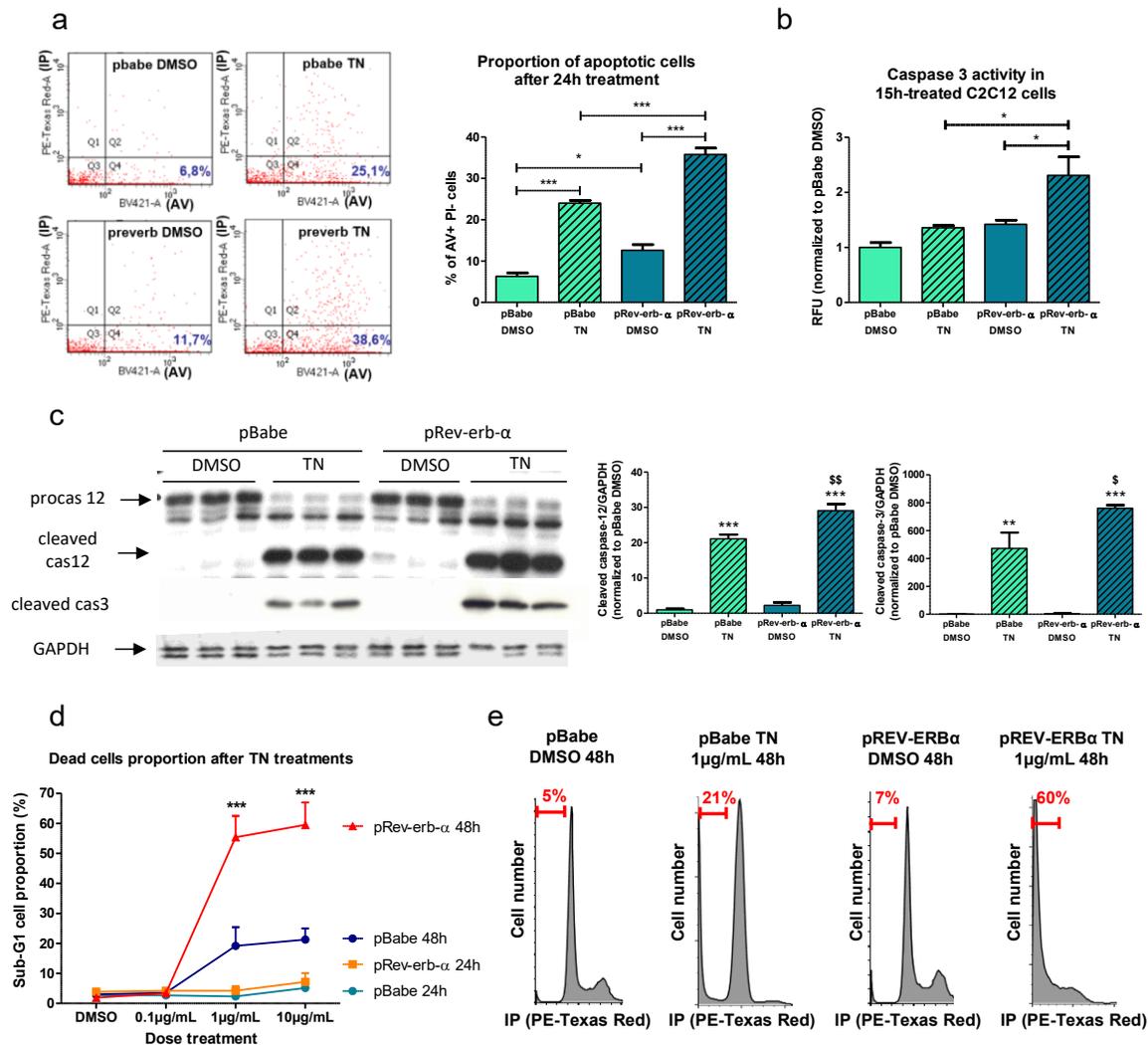


Figure 56 : La surexpression de Rev-erb- α exacerbe l'apoptose induite par un stress réticulaire dans les cellules C2C12.

(a) Répartition caractéristique des myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb- α selon les marquages annexine V (AV) et iodure de propidium (IP) après 24h de traitement DMSO ou tunicamycine (TN, 1 μ g/mL). A gauche, les graphiques représentent l'intensité de fluorescence PE-Texas Red-A (IP) en fonction de l'intensité de fluorescence BV-421 (AV). Les pourcentages indiquent les cellules présentes dans le cadran Q4 (AV+, IP-), qui se trouvent en phase d'apoptose précoce. A droite, le graphique représente la proportion de myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb- α en phase précoce d'apoptose après 24h de traitement DMSO ou tunicamycine (1 μ g/mL). Le graphique représente la moyenne \pm SEM, (n=3)x3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

(b) Dosage de l'activité enzymatique de la caspase 3 dans le myotubes C2C12 pBabe et pRev-erb- α traités au DMSO ou à la tunicamycine (1 μ g/mL, 15h), quantifiée par spectrophotométrie. Le graphique représente la moyenne \pm SEM, n=3, *p<0.05.

(c) Western-blots caractéristiques et quantification de la caspase 12 native, clivée et de la caspase 3 clivée, normalisées par rapport au GAPDH dans les myotubes C2C12 pBabe et pRev-erb- α traités à la tunicamycine (1 μ g/mL, 20h) ou au DMSO. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM, n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

(d) Proportion de myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb- α en phase sub-G1 selon la dose et la durée du traitement au DMSO ou à la tunicamycine. Les courbes représentent la moyenne \pm SEM, (n=3)x3, ***p<0.001 par rapport aux pBabe TN de même concentration.

(e) Profils représentatifs de cycle cellulaire après 48h de traitement tunicamycine (1 μ g/mL) de myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb- α . Le segment identifie la population de cellules en phase sub-G1.

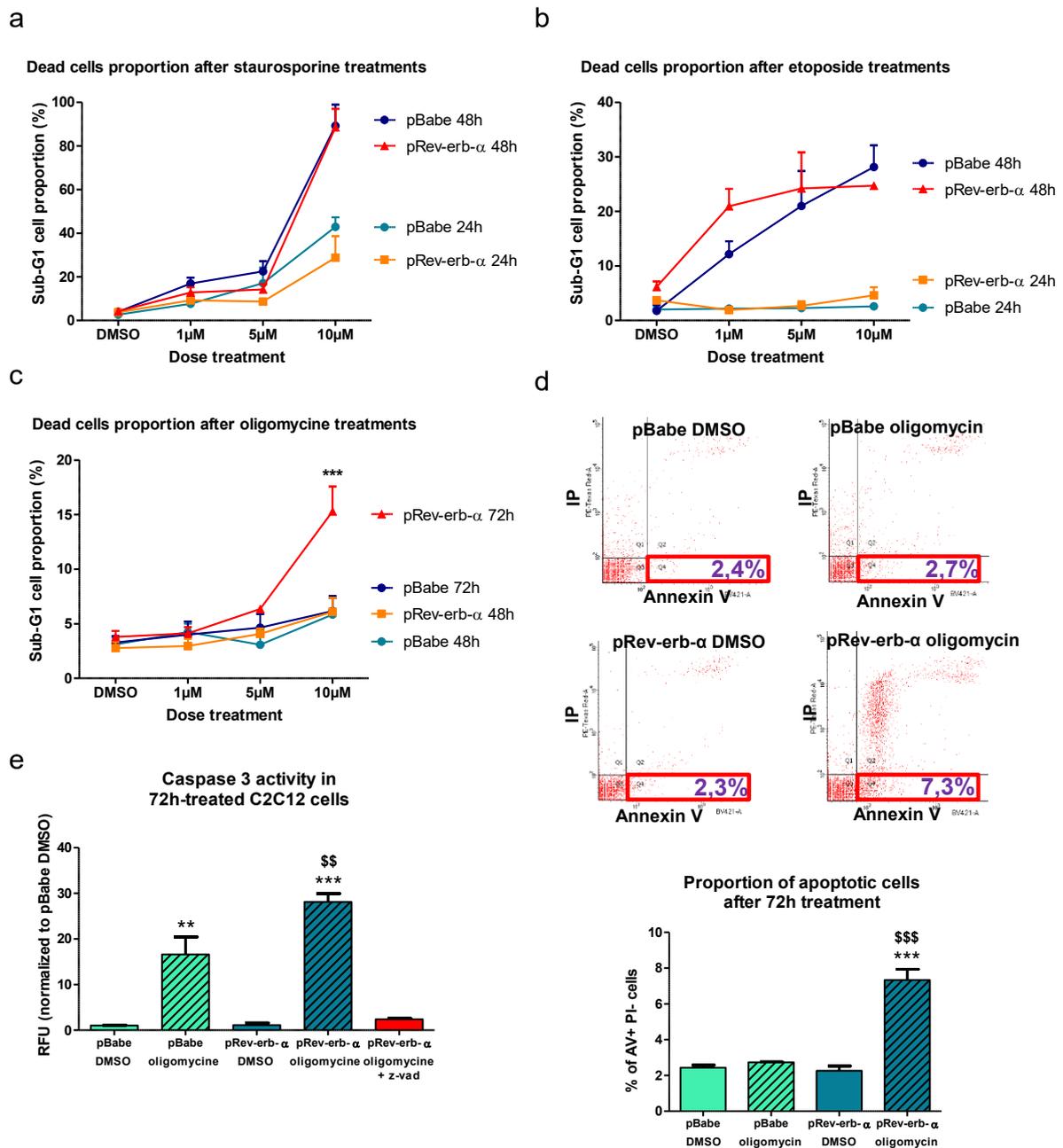


Figure 57 : L'exacerbation de la mort cellulaire par Rev-erb- α est dépendante d'un stress réticulaire ou mitochondrial.

Proportion de myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb- α en phase sub-G1 selon la dose et la durée du traitement (a) à la staurosporine, (b) à l'étoposide, (c) à l'oligomycine ou au DMSO. Les courbes représentent la moyenne \pm SEM, (n=3)x3, ***p<0.001 par rapport aux pBabe oligomycine de même concentration.

(d) Répartition caractéristique des myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb- α selon les marquages annexine V (AV) et iodure de propidium (IP) après 72h de traitement DMSO ou oligomycine (10 μ M). En haut, les graphiques représentent l'intensité de fluorescence PE-Texas Red-A (IP) en fonction de l'intensité de fluorescence BV-421 (AV). Les pourcentages indiquent les cellules présentes dans le cadran Q4 (AV+, IP-), qui se trouvent en phase d'apoptose précoce. En bas, le graphique représente la proportion de myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb- α en phase précoce d'apoptose après 72h de traitement DMSO ou oligomycine (10 μ M). Le graphique représente la moyenne \pm SEM, (n=3)x3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

(e) Dosage de l'activité enzymatique de la caspase 3 dans les myotubes C2C12 pBabe et pRev-erb- α traités au DMSO ou à l'oligomycine (10 μ M, 72h), quantifiée par spectrophotométrie. L'inhibiteur de l'activité des caspase z-vad est utilisé pour justifier de la spécificité du dosage effectué. Le graphique représente la moyenne \pm SEM, n=3, **p<0.01, ***p<0.001 vs DMSO respectif, \$\$p<0.01 vs. pBabe oligomycine.

La surexpression de Rev-erb- α exacerbe l'UPR et l'apoptose au cours de l'activation de la cellule satellite musculaire

La variation transitoire du niveau de stress réticulaire est un processus déterminant dans l'activation de la cellule satellite (Xiong et al., 2017) (Zismanov et al., 2016) (voir introduction section 2.8.2). Nous avons généré un modèle de souris transgénique qui permet la surexpression de Rev-erb- α spécifiquement dans la cellule satellite musculaire (Figure 39). Nous obtenons une surexpression de Rev-erb- α de l'ordre de x6 (Figure 58a). Par ailleurs, nous constatons que la surexpression de Rev-erb- α augmente ou tend à augmenter l'expression génique des acteurs de l'UPR 4h après activation (Figure 58b-g). Par immunofluorescence, nous avons quantifié la protéine BiP. De manière intéressante, nous observons une élévation progressive de la quantité de la protéine BiP au cours de l'activation de la cellule satellite (Figure 58h). Les cellules satellites qui surexpriment Rev-erb- α se caractérisent par un niveau élevé constant de la protéine BiP, significativement supérieur aux contrôles à 4h et identique au-delà. De plus, après 24h de culture, les cellules satellites qui surexpriment Rev-erb- α présentent une apoptose plus marquée, visualisée par le marquage TUNEL, révélateur des cassures apoptotiques de l'ADN (Figure 58i).

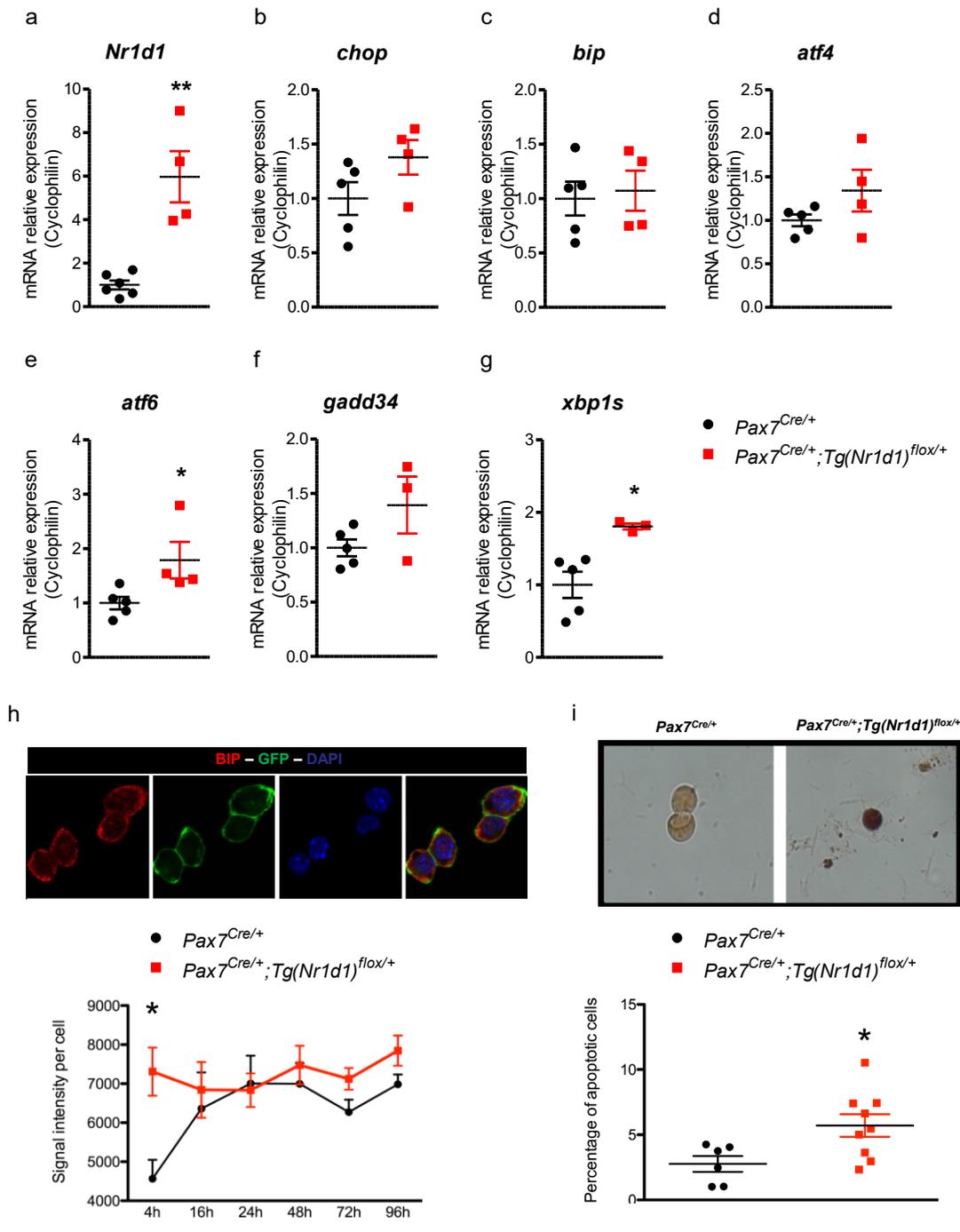


Figure 58 : La surexpression de Rev-erb- α exacerbe l'UPR et l'apoptose au cours de l'activation de la cellule satellite musculaire.

(a-g) Analyse par RTqPCR de l'expression de *nr1d1*, *chop*, *bip*, *atf4*, *atf6*, *gadd34* et *xbp1s* dans les cellules satellites musculaires issues de muscles *Pax7^{Cre/+}* et *Pax7^{Cre/+};Tg(nr1d1)^{lox/+}*, 4h après activation. L'expression génique est normalisée par rapport à la cyclophiline A (*PPIA*). Les résultats sont représentés en nuages de points avec la moyenne \pm SEM, n=4-5, *p<0.05, **p<0.01 vs. *Pax7^{Cre/+}*.

(h) Photographies représentatives des marquages en immunofluorescence de BiP (rouge), GFP (vert) et Dapi (bleu) et quantification du signal de BiP/cellule satellite issues de muscles *Pax7^{Cre/+}* et *Pax7^{Cre/+};Tg(nr1d1)^{lox/+}* au cours de leur activation au moyen du logiciel imageJ. Le graphique représente la moyenne \pm SEM, n=4-5, *p<0.05, **p<0.01 vs. *Pax7^{Cre/+}*.

(i) Photographies représentatives des marquages TUNEL et quantification des cellules TUNEL+ manuellement et en aveugle. Les résultats sont représentés en nuages de points avec la moyenne \pm SEM, n=6-9, *p<0.05 vs. Pax7^{Cre/+}.

La surexpression de Rev-erb- α augmente les MAMs et le transfert calcique du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie

Le stress réticulaire est susceptible d'induire la mort cellulaire par apoptose au moyen de 3 origines synergiques ; activation de la caspase 12, induction de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par l'action de CHOP sur la famille bcl2 et transfert calcique du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie. La surexpression de Rev-erb- α affecte la mitochondrie en conditions de stress réticulaire. En effet, nous constatons que les cellules C2C12 surexprimant Rev-erb- α présentent davantage d'altérations mitochondriales (perte du contenu cellulaire en mitochondries, diminution de la respiration mitochondriale et augmentation de la quantité de ROS) suite à un traitement tunicamycine que les contrôles (Figure 59a-c). En outre, nous avons montré que Rev-erb- α augmente le contenu calcique réticulaire (Figure 43). Nous constatons ici que l'entrée calcique du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie, induit par la tunicamycine, est augmentée par Rev-erb- α (Figure 60a-b). Sachant que le transfert calcique entre les deux organites se déroule en partie au sein des MAMs, nous avons procédé à un fractionnement cellulaire nous permettant de purifier la fraction MAM. La quantité de protéines IP3R1 et de VDAC1 tend à être accrue au sein de la fraction MAM issue de cellules C2C12 surexprimant Rev-erb- α (Figure 60c), alors que la quantité globale d'IP3R1 et de VDAC1 n'est pas impactée (Figure 61). De plus, par une collaboration avec Jennifer Rieusset (CarMeN, Lyon), nous avons montré que l'interaction physique entre IP3R1 et VDAC1, visualisée par *in situ* PLA, est augmenté par la surexpression de Rev-erb- α dans des myotubes C2C12 (Figure 60d) ainsi que dans des myotubes humains infectés avec un AAV permettant la surexpression de Rev-erb- α (Figure 60e). Enfin, par une stimulation à l'histamine, activateur du canal IP3R1, nous constatons que l'augmentation du transfert calcique mitochondrial est exacerbé par Rev-erb- α (Figure 60f), traduisant que Rev-erb- α augmente non seulement l'interaction physique mais aussi l'interaction fonctionnelle entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie.

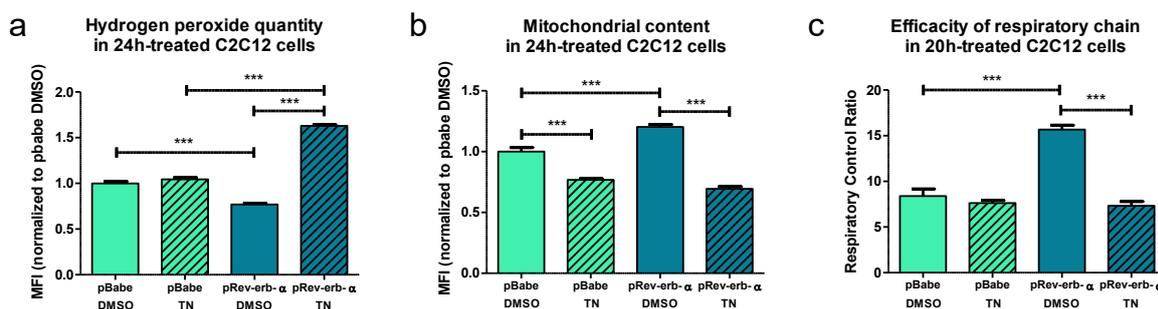


Figure 59 : La surexpression de Rev-erb- α exacerbe les altérations mitochondriales induites par un stress réticulaire.

(a) Contenu cellulaire en peroxyde d'hydrogène des myoblastes pBabe et pRev-erb- α , traités à la tunicamycine (1 μ g/mL, 20h) ou au DMSO, estimé par marquage au DCFH-DA et analysé par cytométrie en flux. Le graphique représente la moyenne \pm SEM, (n=3)x3, ***p<0.001.

(b) Contenu cellulaire en mitochondries des myoblastes pBabe et pRev-erb- α , traités à la tunicamycine (1 μ g/mL, 20h) ou au DMSO, et estimé par marquage au Mitotracker et analysé par cytométrie en flux. Le graphique représente la moyenne \pm SEM, (n=3)x3, ***p<0.001.

(c) Efficacité de la chaîne respiratoire des myotubes pBabe et pRev-erb- α , différenciés 5 jours et traités à la tunicamycine (1 μ g/mL, 20h) ou au DMSO, analysée par oxygraphie. Le graphique représente la moyenne \pm SEM, n=6, ***p<0.001.

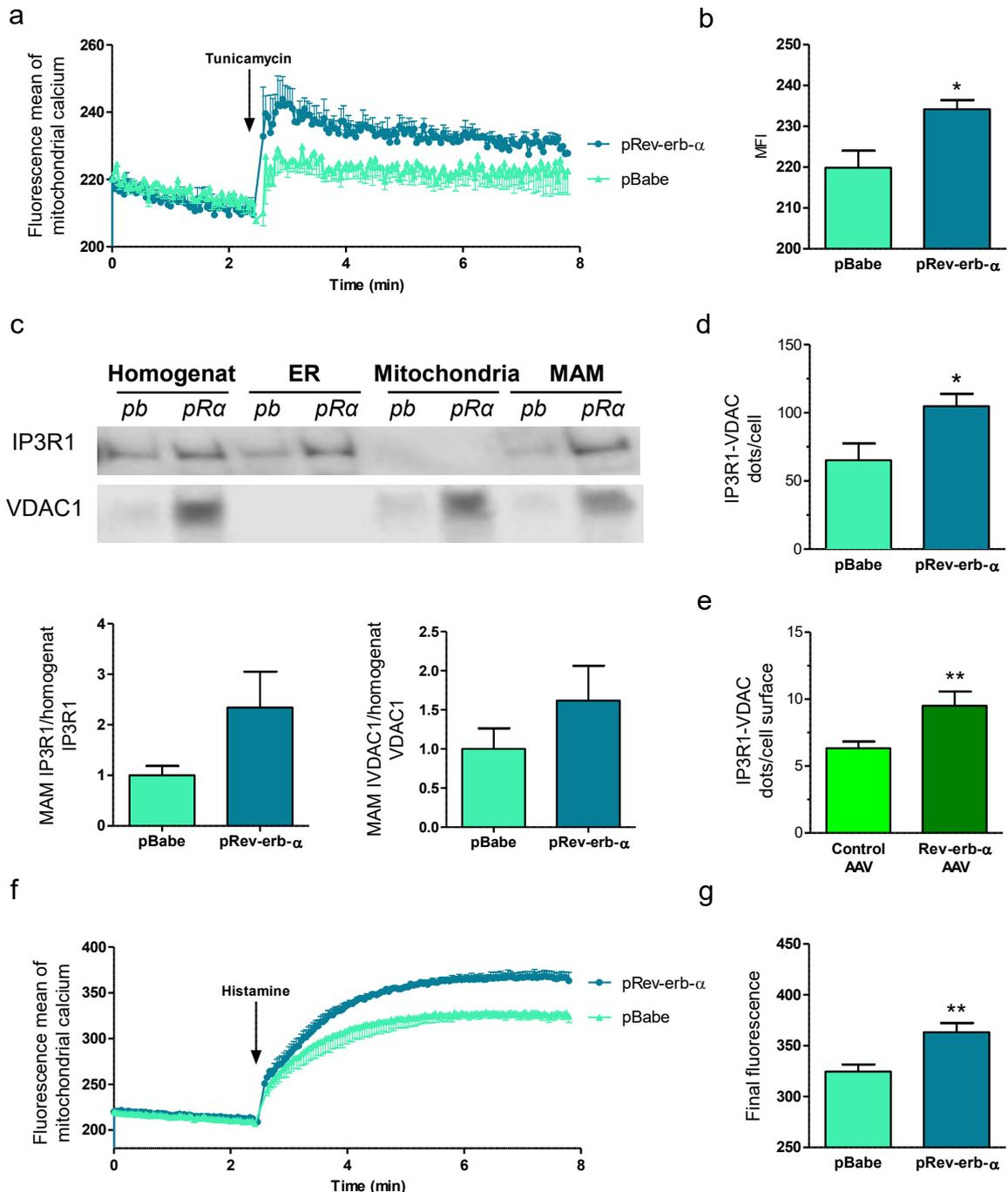


Figure 60 : La surexpression de Rev-erb- α augmente les MAMs et le transfert calcique du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie

(a) Enregistrement en temps réel du contenu calcique mitochondrial grâce à la sonde calcique Rhod2-AM avant et après une stimulation par la tunicamycine (50 μ g/mL) dans des myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb- α . La courbe représente la moyenne \pm SEM, n=5.

(b) Contenu calcique mitochondrial 5 minutes après un traitement à la tunicamycine (50µg/mL) dans des myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb-α. Le graphique représente la moyenne ± SEM, n=5, *p<0.05.

(c) Western-blot représentatif d'IP3R1 et de VDAC1 dans les différentes fractions cellulaires issues de myotubes C2C12 pBabe et pRev-erb-α et quantification d'IP3R1 et de VDAC1 dans la fraction MAM, valeur normalisée par la quantité présente dans l'homogénat. Le pRev-erb-α est exprimée en fonction du pBabe. Le graphique représente la moyenne ± SEM, n=3.

(d-e) Quantification des interactions IP3R1 et VDAC1 par *in situ* PLA dans des myotubes pBabe et Rev-erb-α ainsi que dans des myotubes humains infectés avec un AAV contrôle ou un AAV Rev-erb-α. Le graphique représente la moyenne ± SEM, n=3.

(f) Enregistrement en temps réel du contenu calcique mitochondrial grâce à la sonde calcique Rhod2-AM avant et après une stimulation par l'histamine (10mM) dans des myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb-α. La courbe représente la moyenne ± SEM, n=4

(g) Contenu calcique mitochondrial 5 minutes après un traitement à l'histamine (10mM) dans des myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb-α. Le graphique représente la moyenne ± SEM, n=4, **p<0.01.

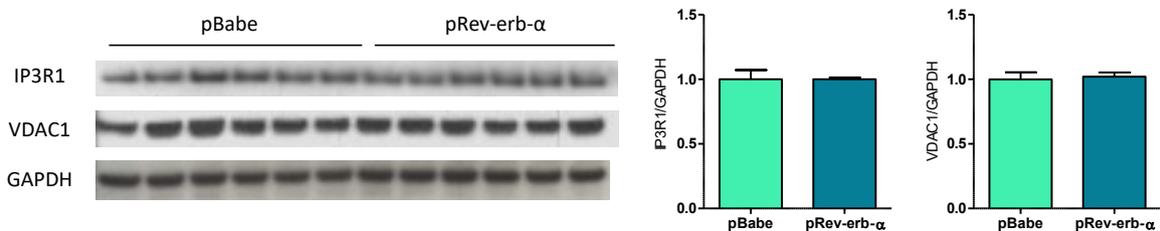


Figure 61 : Rev-erb-α ne modifie pas la quantité globale de protéines IP3R1 et VDAC1 Western-blot représentatif et quantification d'IP3R1 et de VDAC1 dans les myotubes pBabe et pRev-erb-α. Les graphiques représentent la moyenne ± SEM, n=6.

L'inhibition des MAMs contrecarre l'effet pro-apoptotique de Rev-erb-α

Afin de déterminer si l'effet de Rev-erb-α est dépendant des MAMs, nous avons traitées les cellules satellites après sortie au FACS avec des inhibiteurs des MAMs cyclosporine A, xestospongine ou rouge de ruthénium. Par un marquage TUNEL, nous constatons que l'exacerbation de l'apoptose induite par la surexpression de Rev-erb-α est significativement réduite par la xestospongine, un inhibiteur d'IP3R1 (Figure 62a). En ce qui concerne la cyclosporine A et le rouge de ruthénium, nous relevons une tendance à la diminution (Figure 62b-c).

De même, les myoblastes C2C12 prétraitées avec les inhibiteurs des MAMs avant l'induction de l'UPR par la tunicamycine voient le transfert calcique du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie tendre à se réduire (Figure 63a-c) et la mort cellulaire diminuer significativement (Figure 63d-f). De manière intéressante, les effets exacerbateurs de la surexpression de Rev-erb-α sont partiellement réduits voir totalement dans le cadre du rouge de ruthénium.

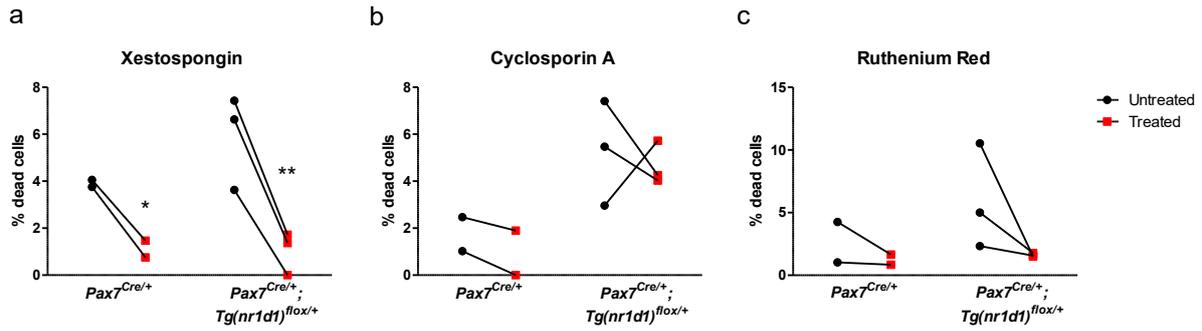


Figure 62 : L'inhibition des MAMs contrecarre l'effet pro-apoptotique de Rev-erb- α dans les cellules satellites activées.

Proportion des cellules satellites issues de muscles *Pax7^{Cre/+}* et *Pax7^{Cre/+};Tg(nr1d1)^{lox/+}* positives au marquage TUNEL. Les cellules sont mises en culture 4h après leur activation et traitées pendant 24h avec les inhibiteurs des MAMs xestospongine (1 μ M, DMSO), rouge de ruthénium (5 μ M, eau) ou cyclosporine A (1 μ M) avant la fixation pour le marquage TUNEL. La quantification des cellules positives s'est faite en aveugle et le résultat a été confirmé par plusieurs expérimentateurs. Nous avons comparé en apparié la condition non traitée et traitée avec l'inhibiteur des MAMs pour les cellules satellites issues d'un même animal, n=2-4, *p<0.05, **p<0.01 vs. condition traitée au DMSO.

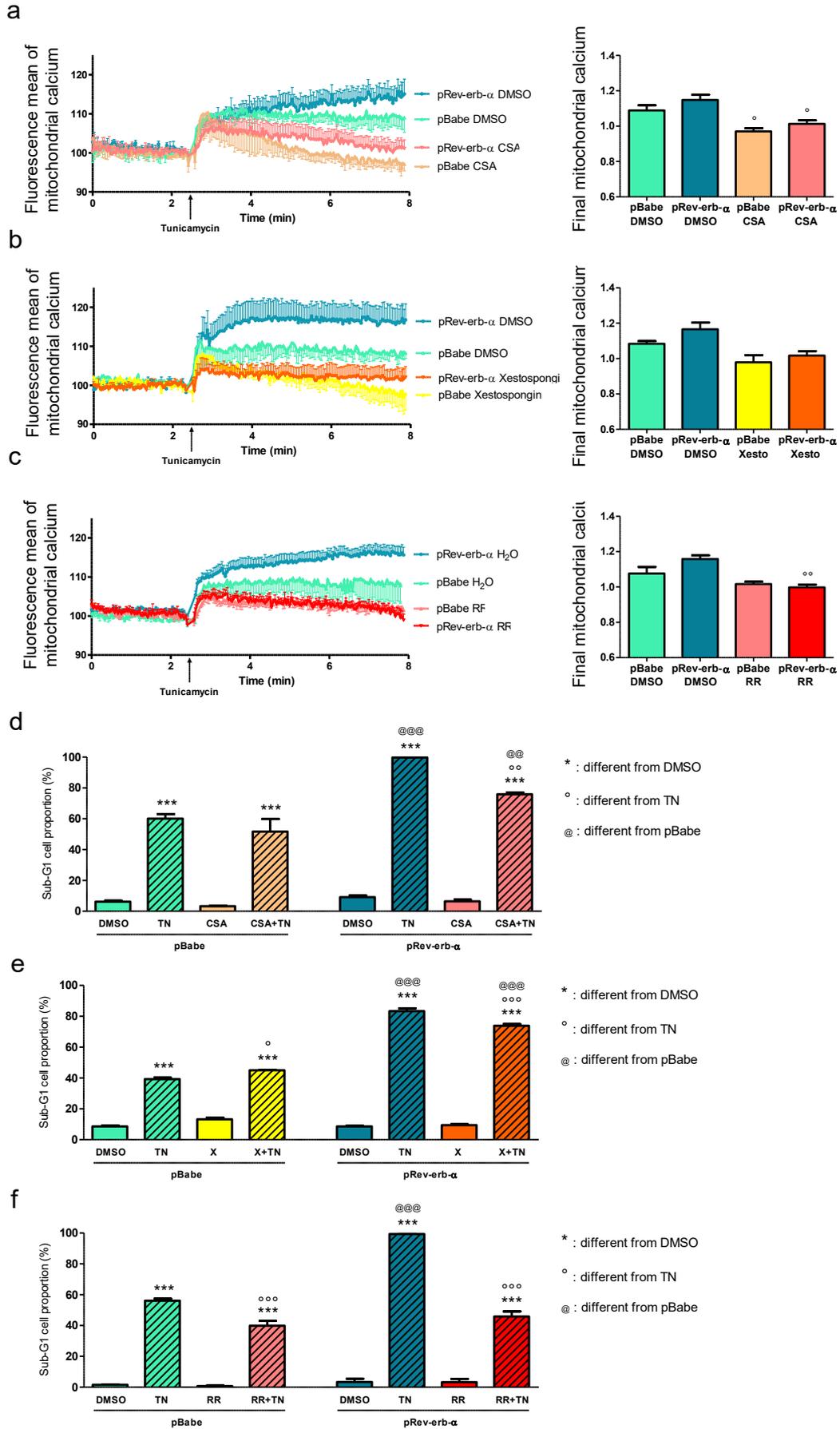


Figure 63 : L'inhibition des MAMs contrecarre l'effet pro-apoptotique de Rev-erb- α dans les myoblastes C2C12.

Enregistrement en temps réel du contenu calcique mitochondrial grâce à la sonde calcique Rhod2-AM avant et après une stimulation à la tunicamycine (50 μ g/mL) dans des myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb- α . Les cellules sont prétraitées (24h) et cotraitées avec un inhibiteur des MAMs ; (a) la cyclosporine A (CSA, 1 μ M, DMSO), (b) de la xestospongine (X, Xesto, 1 μ M, DMSO), (c) du rouge de ruthénium (RR, 5 μ M, eau) ou son diluant. La courbe représente la moyenne \pm SEM, n=3-5. L'histogramme représente le contenu calcique mitochondrial après 5 minutes de traitement à la tunicamycine (50 μ g/mL), n=3-5, **p<0.01.

Pourcentage de myoblastes C2C12 pBabe et pRev-erb- α en phase sub-G1, évaluée par marquage à l'iodure de propidium en cytométrie en flux. Les myoblastes sont traités au DMSO ou à la tunicamycine (1 μ g/mL, 48h) préalablement (24h) et concomitamment avec de (d) la cyclosporine A (CSA, 1 μ M, DMSO), (e) de la xestospongine (X, Xesto, 1 μ M, DMSO), (f) du rouge de ruthénium (RR, 5 μ M, eau) ou la solution contrôle respective. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM, n=3.

Projet 3 : Expression différentielle des acteurs de l'UPR dans le muscle squelettique selon le statut glycémique de patients obèses

Ségrégation de la cohorte d'obèse selon le statut glycémique

L'étude a été conçue pour obtenir deux sous-groupes de patients ayant un IMC > 30 : l'un avec une homéostasie glycémique normale, l'autre avec une homéostasie altérée du glucose. Comme le montre la figure X, en l'absence de différences significatives entre les groupes sur les critères sexe, âge, IMC et hémoglobine glyquée (Hb1Ac), la glycémie à jeun et la glycémie mesurée deux heures après un test oral de tolérance au glucose sont significativement plus élevées dans le groupe intolérant au glucose que dans le groupe normoglycémique. De même, l'indice de Matsuda est diminué de façon marquée dans le groupe de patients intolérants au glucose, ce qui signifie une altération de la sensibilité périphérique à l'insuline.

	Glucose tolerant	Glucose intolérant	p-value (test)
Age (years)	35 [27-44]	38.5 [27.3-49]	0.459 (U test)
Gender (male/female)	3/18	4/17	1.0 (Z test)
BMI (kg/m ²)	45.3 [42.4-50.0]	42.8 [41.2-46.0]	0.136 (U test)
Weight (kg)	126.5 [108.5-150.5]	126.5 [110.1-132.8]	0.622 (U test)
Fasting blood glucose (mmol/L)	4.78 (0.39)	5.28 (0.38)	<0.0001 (t test)
HbA1c (%)	5.57 (0.33)	5.68 (0.32)	0.236 (t test)
Matsuda	7.05 [3.36-10.19]	2.16 [1.53-3.23]	<0.001 (U test)
Blood glucose 120 min (mmol/L)	5.3 [4.8-6.8]	8.2 [8.0-8.7]	<0.0001 (U test)

Tableau 6 : Caractéristiques métaboliques de la cohorte d'obèses

Les marqueurs de stress réticulaire sont exprimés différemment en fonction de l'état de tolérance au glucose du muscle squelettique

Nous avons mesuré l'expression protéique de la chaperonne réticulaire principale BiP ; Nous constatons que celle-ci est augmenté significativement dans le muscle abdominal des patients intolérants au glucose, comparativement au groupe contrôle seul (Figure 64a). Ceci est associé avec une diminution significative de l'expression génique des acteurs de l'UPR *BIP*, *ATF6* et *XBPIU* alors que seule une tendance est observée pour *XBPI5* et *CHOP* (Figure 64c-h). *ATF4* quant à lui tend à être accru (Figure 64e).

Les paramètres métaboliques sont en corrélation avec les gènes de l'UPR

Afin de déterminer si ces changements dans l'expression des gènes sont corrélés aux caractéristiques métaboliques, nous effectuons une corrélation de Pearson (Figure 65). Alors que *BIP*, *ATF4* et *XBPIU* ne présentent aucune corrélation avec les caractéristiques des patients, les taux d'HbA1c sont corrélés aux taux d'ARNm d'*ATF6* et *XBPI5*. De plus, l'expression génique d'*ATF6* et de *CHOP* est corrélée négativement avec la glycémie à 120 minutes et positivement avec l'indice Matsuda.

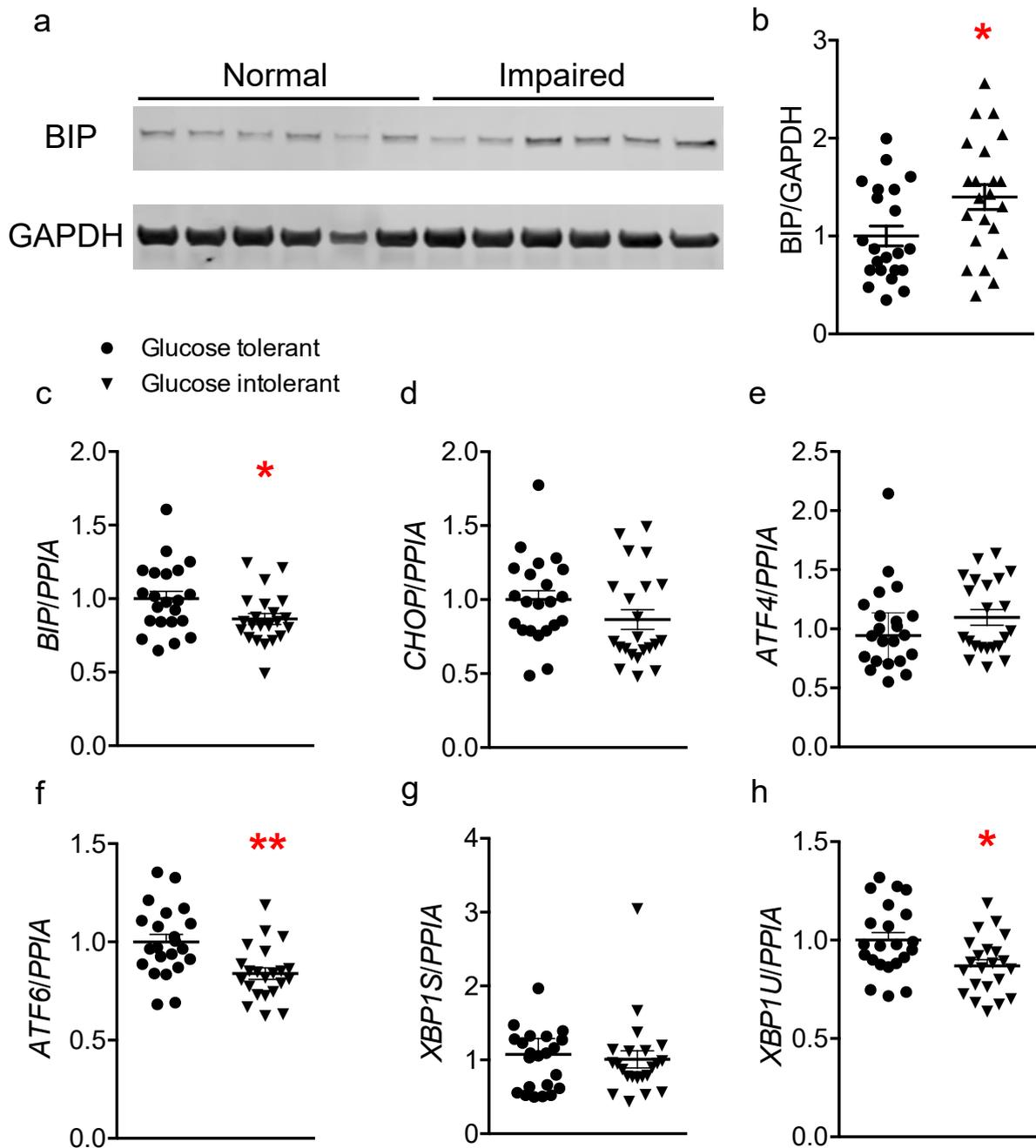


Figure 64 : Les marqueurs de stress réticulaire sont exprimés différemment en fonction de l'état de tolérance au glucose du muscle squelettique.

(a) Western-blot représentatif de BiP dans les biopsies musculaires abdominales de patients normoglycémiques et intolérants au glucose.

(b) Quantification de la protéine BiP dans les biopsies musculaires abdominales de patients normoglycémiques et intolérants au glucose. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM, n=24, *p<0.05 vs. patients normoglycémiques.

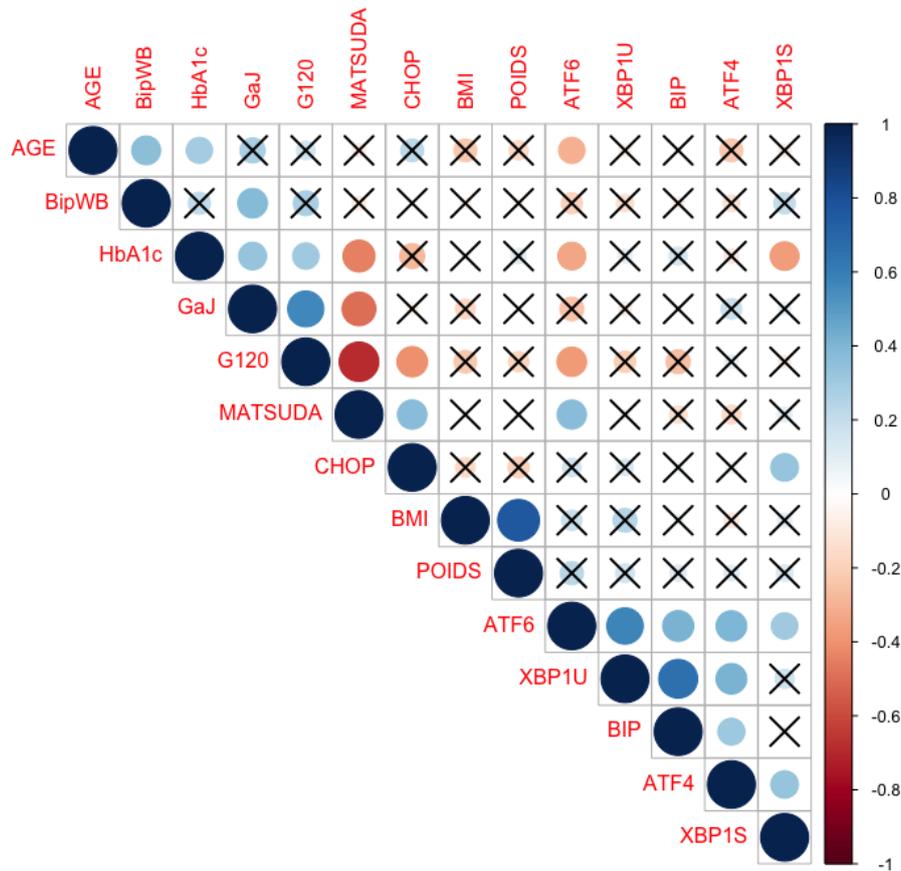


Figure 65 : Les paramètres métaboliques sont en corrélation avec les gènes de l'UPR. Les couleurs bleu et rouge représentent respectivement les corrélations positives et négatives. Au plus le cercle est grand, au plus la corrélation est forte. Les cercles ciblés d'une croix symbolisent les corrélations qui n'atteignent pas la significativité, n=44.

DISCUSSION

Effets bénéfiques de l'activation des Rev-erb dans les souris *mdx/utr*^{+/-}

Nous avons soumis les souris *mdx/utr*^{+/-} à un traitement à l'agoniste SR9009 des récepteurs Rev-erb, qui parvient à améliorer substantiellement le phénotype calcique, histologique et la contractilité musculaire (Figure 54).

Nombre de ces résultats n'atteignent pas la significativité statistique. C'est pourquoi, forts de nos premiers résultats encourageants, nous avons réalisé une expérience complémentaire sur de nouvelles souris *mdx/utr*^{+/-} (n=4/groupe), qui est au jour de la finalisation de ce manuscrit, en cours d'analyse. Nous avons adjoint dans cette nouvelle série 2 souris non injectées sur les conseils de France Piétri-Rouxel, les doses de DMSO injectées, certes impératives à la solubilisation et à l'administration *in vivo* du SR9009, peuvent selon son expérience et la littérature (Worthley and Schott, 1969) être délétères.

Les effets obtenus, bien que souvent significatifs, restent toutefois d'ampleur limitée. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'activation de Rev-erb- α ne joue pas sur l'origine de la myopathie de Duchenne, à savoir l'absence de dystrophine fonctionnelle, mais modestement et uniquement sur quelques-unes des conséquences de cette absence. Nous avons en effet identifié que Rev-erb- α améliore l'homéostasie calcique, la contractilité musculaire et plus largement le phénotype musculaire des souris *mdx/utr*^{+/-}. Le traitement avec l'agoniste SR9009 des Rev-erb pourrait être utilisé en association avec d'autres thérapies (Cordova et al., 2018) et en particulier la thérapie génique.

L'expression de Rev-erb- α est circadienne et il est de sorte impératif d'appliquer le traitement à l'agoniste lorsque la protéine est présente. En nous basant sur les données disponibles dans la littérature (Koyanagi et al., 2006) et sur nos propres informations issues d'expériences circadiennes, nous avons décidé de procéder à l'injection intrapéritonéale de SR9009 au zénith de l'expression protéique de Rev-erb- α , c'est-à-dire à ZT8. Cependant, ceci se base sur des données obtenues sur des souris saines et aucunement sur des souris myopathes. La littérature scientifique est extrêmement pauvre quant aux éventuelles perturbations des rythmes circadiens dans le cadre de la myopathie de Duchenne à l'exception d'un article. En effet, les variations circadiennes de la fréquence cardiaque sont altérées chez les patients myopathes de Duchenne et ce, de manière proportionnelle à la sévérité de la pathologie (Yotsukura et al., 1995). Les patients les plus atteints présentent même une abolition totale des rythmes circadiens de la fréquence cardiaque (Yotsukura et al., 1995). Ce manque de données ne signifie pas pour autant absence de relation. Par souci de temps et de disponibilité en souris, nous n'avons pas pu réaliser une étude circadienne de l'expression de Rev-erb- α dans le modèle *mdx/utr*^{+/-}. Cependant, nous avons montré que Rev-erb- α est toujours exprimé dans les muscles squelettiques des souris *mdx/utr*^{+/-} à ZT8 ainsi que dans les myoblastes non synchronisés issues de myopathes de Duchenne (Figure 53), même si dans ce dernier cas l'expression de Rev-erb- α est diminuée de l'ordre de 30%. Cette expression de Rev-erb- α loin d'être résiduelle justifie l'utilisation d'un agoniste des Rev-erb, qui pourrait en quelque sorte compenser la baisse de quantité de Rev-erb- α par une activation plus importante.

Nous n'avons volontairement pas utilisé de contrôles sains dans notre expérience sur souris *mdx/utr*^{+/-}. Notre objectif étant essentiellement d'étudier le pouvoir pharmacologique de Rev-erb- α dans un contexte relevant de myopathie de Duchenne. Néanmoins, la myopathie de Duchenne est une maladie évolutive et nous avons pu constater une grande hétérogénéité entre les phénotypes musculaires des souris.

Sur les conseils de France Piétri-Rouxel, de qui nous tenons les souris *mdx/utr*^{+/-}, nous avons commencé le traitement à l'agoniste SR9009 à l'âge de 6 mois, âge qui correspond à l'apparition des premières atteintes musculaires selon son expertise.

Du fait de la mesure de la contraction musculaire *in situ*, notre protocole expérimental n'a pas permis d'estimer la capacité de réponse à un stress réticulaire du muscle squelettique des souris myopathes traitées au SR9009. Il faudrait pour ce faire procéder à une injection à la tunicamycine, un exercice intense (avec toutes les limites que cela génère dans ce modèle de dégénérescence musculaire) ou un jeûne, trois stimuli qui auraient pu mettre en péril la bonne mesure de la contraction musculaire. Des expériences spécialement dédiées à cet objectif devront être programmées pour répondre à cette interrogation. Cependant, nous avons pu tester la capacité de réponse à un stress réticulaire sur les myotubes issus de patients myopathes de Duchenne, qui apparaît significativement augmentée par le traitement au SR9009.

L'utrophine, protéine analogue à la dystrophine est ciblée et dégradée par les calpaïnes (Courdier-Fruh and Briguet, 2006). La dégradation de l'utrophine participe à la fragilisation sarcolemmale et à l'aggravation de la dégénérescence musculaire. Les souris *mdx/utr*^{+/-} conservent une expression, certes réduite, de l'utrophine. Le traitement au SR9009 améliore l'activité de SERCA dans les muscles des souris *mdx/utr*^{+/-}, c'est-à-dire la recapture calcique du cytosol vers le réticulum endoplasmique (Figure 54). En conséquence, le contenu calcique réticulaire s'en voit augmenté (Figure 53). Or, nous avons montré que l'augmentation de la concentration calcique réticulaire est associée à une diminution de la concentration calcique cytosolique chez les myotubes surexprimant REV-ERB α (Figure 43). Ainsi, en imaginant que le même processus se produise dans les muscles des souris myopathes *mdx/utr*^{+/-} traitées au SR9009, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une réduction de l'activité des calpaïnes et donc d'une moindre dégradation de l'utrophine, ce qui pourrait participer au rétablissement du phénotype musculaire observé (Figure 54). Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de procéder au dosage de l'activité des calpaïnes, à cause de l'incompatibilité de conservation des muscles squelettiques avec le protocole expérimental de dosage des calpaïnes que nous avons testé (kit ab65308, abcam).

Les travaux précédents de l'équipe ont montré que Rev-erb- α améliore les performances à l'exercice des souris saines en augmentant la biogénèse et la fonction mitochondriale ainsi qu'en diminuant le processus de dégradation protéique et d'organite par autophagie (Woldt et al., 2013). Nous n'avons pas étudié ces phénomènes dans le cadre de notre étude sur souris *mdx/utr*^{+/-} traitées au SR9009, même si nous pouvons hypothétiquement mais légitimement supposer qu'une part non négligeable des effets bénéfiques observés trouvent leur origine dans ce mécanisme d'action de Rev-erb- α déjà identifié.

En complément et en amont de la mesure *in situ* de la force musculaire développée qui a été réalisé en phase terminale par Bruno Bastide et Valérie Montel, nous avons désiré mettre en place un protocole d'évaluation des capacités musculaires tout au long du traitement. Ceci dans l'objectif (i) de suivre l'évolution de l'amélioration physique tout au long du traitement et si besoin d'en moduler la durée et (ii) de considérer chaque souris comme son propre contrôle et de fait de lisser l'hétérogénéité interindividuelle. Nous nous sommes pour ce faire basé sur le protocole DMD_M.2.1.005, disponible sur le site <http://www.treat-nmd.eu>, qui consiste à mesurer la durée pendant laquelle la souris parvient à se maintenir sur un grillage en position inversée. Malheureusement, nous avons constaté une très forte hétérogénéité dans les résultats obtenus entre les différents individus, indépendamment du traitement SR9009 ou

DMSO (données non présentées), rendant toute interprétation impossible. Les exemples du protocole avaient pris en compte plusieurs dizaines de souris pour aboutir à un résultat cohérent et une différence nette entre souris saines et souris *mdx*. En outre, le relevé du nombre de tours de roue réalisé par les souris dans les cages d'activité n'a pas montré d'accroissement significatif par le traitement au SR9009. Or, nous savons que l'exercice physique génère un stress réticulaire qui est nécessaire à l'adaptation du muscle à l'exercice (Wu et al., 2011). Notre résultat tendrait à supposer que le stress réticulaire généré par l'exercice n'est pas différent entre souris *mdx/utr^{+/-}* traitées au SR9009 ou au DMSO, puisque la quantité d'exercice en elle-même n'est pas différente. Nous avons montré que l'activation de *Rev-erb-α* génère une réponse UPR plus importante au regard d'une induction de stress réticulaire identique. Ainsi, nous pouvons supposer que les effets bénéfiques du SR9009 peuvent en partie s'expliquer par une meilleure capacité à prendre en charge le stress réticulaire chronique, inhérent à la pathologie de la myopathie, ainsi que le stress réticulaire généré au cours des périodes d'activité et d'exercice de l'animal. D'autre part, l'aspect volontaire de l'exercice pourrait en lui-même poser problème. L'administration de SR9009 entraîne une modification des rythmes circadiens et du comportement locomoteur de souris saines (Solt et al., 2012). En effet, l'injection de l'agoniste SR9011 ou SR9009 induit de manière dose-dépendante la réduction de l'activité locomotrice volontaire, mesurée à l'aide de cage à roues, au cours de la période d'obscurité chez la souris (Solt et al., 2012).

Nos données constatant l'amélioration du phénotype musculaire par le traitement à l'agoniste SR9009 entrent en complète contradiction avec les travaux de l'équipe du Pr. Burris (Welch et al., 2017c), par ailleurs contributeur aux papiers soulignant l'effet positif de l'activation pharmacologique de *Rev-erb-α* dans le muscle squelettique de souris saines (Woldt et al., 2013). En effet, ceux-ci observent une amélioration du phénotype musculaire de souris *mdx* par le traitement à l'antagoniste. Les modèles animaux d'étude diffèrent et l'effet de la modulation de *Rev-erb-α* pourrait très bien être dépendant du degré de sévérité de la pathologie. Suivant cette hypothèse, notre modèle plus proche de la myopathie de Duchenne humaine constituerait un avantage certain. De plus, ces travaux ne sont pas intéressés à l'homéostasie calcique.

Processus apoptotique dans le muscle squelettique

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction (section 4.5.), le muscle squelettique est un organe particulièrement protégé contre l'apoptose, en tout cas, considérée d'un point de vue terminal. Nous avons en effet failli à mettre en évidence la présence de caspase 3 clivée ou de marquage TUNEL dans le muscle squelettique suite à une injection de tunicamycine de 24 ou 48h ainsi que dans les muscles issus de souris nourries avec un régime riche en graisses (données non présentées). Cependant, nous mettons en évidence, une augmentation de la localisation nucléaire de l'endonucléase G, signe d'une dégradation de l'ADN nucléaire, spécifique de l'apoptose, dans les muscles squelettiques injectés à la tunicamycine pendant 48 heures et issus de souris *Rev-erb-α^{+/+}* (données non présentées). De manière intéressante, nous montrons que la délétion en *Rev-erb-α* ne provoque pas d'augmentation du nombre de noyaux positifs à l'endonucléase G (données non présentées). Ce résultat est confirmé par la moindre induction de l'activité de la caspase 3 (Figure 66b) et des gènes pro-apoptotiques *bim* et *noxa*, (données non présentées), résultat à mettre en parallèle de la plus faible réponse à l'UPR constatée dans les souris *Rev-erb-α^{-/-}*, de laquelle il n'est probablement qu'une simple conséquence. Malheureusement, ces données ont été obtenues sur un nombre de souris peu

élevé et nécessitent impérativement une confirmation sur une quantité plus conséquente d'animaux.

Régulation circadienne de l'homéostasie calcique et du stress réticulaire

Eu égard au rôle prépondérant de Rev-erb- α dans l'établissement et la régulation des rythmes circadiens, notre étude présente assurément des lacunes dans l'évaluation de ce processus physiologique. L'étude des rythmes circadiens nécessite une logistique développée ainsi que des besoins humains et en souris conséquents du fait des points réguliers à réaliser sur une période de 24h (généralement tous les 4 heures).

Néanmoins, dans le cadre d'expériences à l'échelle de notre équipe, nous avons pu tester les différents paramètres qui retenaient notre intérêt sur un plan circadien. C'est ainsi que nous avons testé la rythmicité circadienne de l'activité de SERCA dans le muscle squelettique de la souris saine avec une mesure toutes les 4h (n=6/point). Nous constatons pour la première fois que l'activité de SERCA est circadienne, avec un nadir à ZT0 et un zénith à ZT8 (Figure 66). De manière intéressante et attendue, l'expression de la myoréguline est en cycle inversée par rapport à l'activité de SERCA (données non présentées).

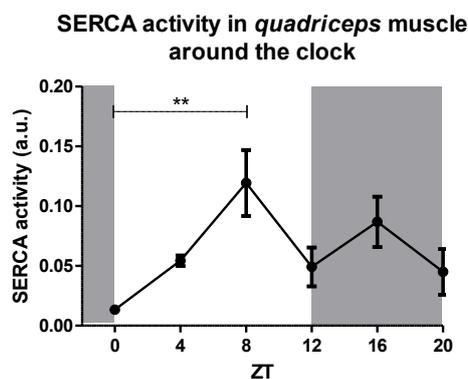


Figure 66 : Variations circadiennes de l'activité de SERCA dans le muscle squelettique.

Le coefficient de la pente de diminution de la fluorescence au cours du temps indique la capacité de capture calcique réalisée par SERCA dans la fraction microsomale de muscles quadriceps issus de souris sacrifiées à différents ZT. La courbe représente la moyenne \pm SEM, n=6.

De même, nous avons montré que l'expression des gènes de l'UPR cycle sur une durée de 24h et ce, en l'absence de stimulation inductrice de stress réticulaire (Figure 67). Nous observons que la rythmicité des acteurs de l'UPR se rapproche à celle de *bmal1* est peu ou prou inversée avec celle de *nr1d1* (Figure 67). Ces résultats sont à mettre en perspective avec la rythmicité infradienne (12h) des acteurs de l'UPR observée dans le foie (Cretenet et al., 2010). De manière intéressante, l'inactivation de Rev-erb- α impacte la rythmicité de ces acteurs (Figure 67).

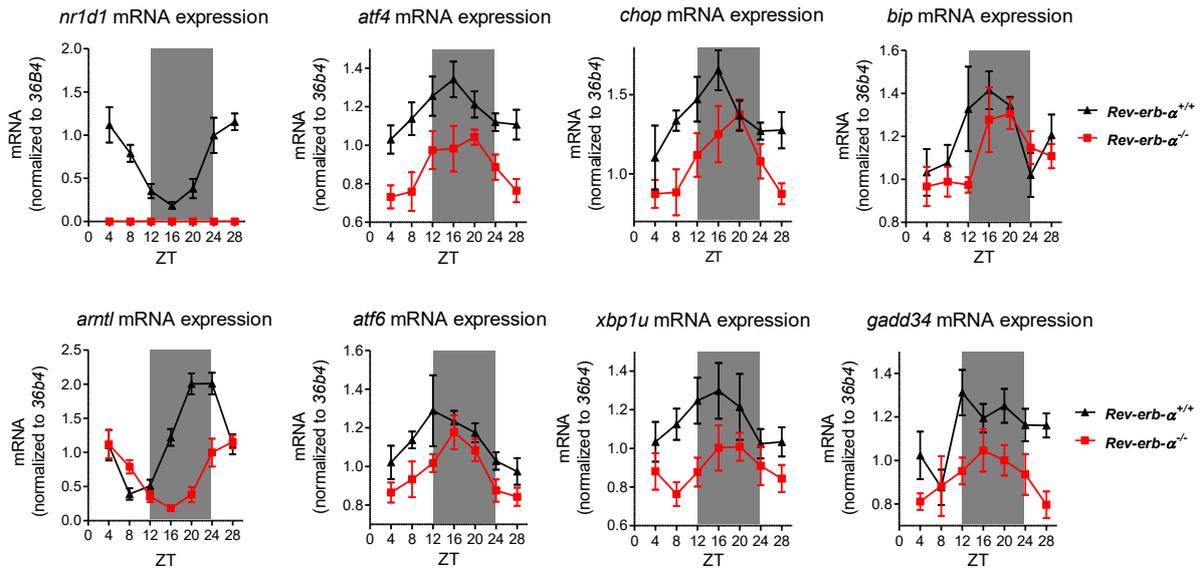


Figure 67 : Variations circadiennes de l'expression des *nr1d1*, *bmall* et des gènes de l'UPR. RTqPCR de *nr1d1*, de sa cible *bmall* ainsi que des acteurs de l'UPR *atf4*, *chop*, *atf6*, *bip*, *xbp1u*, *gadd34* dans le muscle squelettique de la souris *Rev-erb-α^{+/+}* et *Rev-erb-α^{-/-}* sacrifiées toutes les 4h sur une durée totale de 28h. Les courbes représentent la moyenne \pm SEM, n=6-8.

Il est impossible de moduler les acteurs des boucles de régulation transcriptionnelle de l'horloge circadienne sans affecter les rythmes circadiens qu'ils contrôlent. Ainsi, se pose la question de l'origine des effets de la modulation de *Rev-erb-α* : sont-ce des conséquences totalement indépendantes ou au contraire partiellement dues à la dérégulation de l'horloge circadienne ? Il existe une horloge circadienne dans le muscle squelettique (pour revue (Mayeuf-Louchart et al., 2017b)). Cependant, nous avons obtenu des résultats solides sur les modèles non synchronisés et par conséquent exempts de rythmicité circadienne qui valident la dimension non circadienne des effets de *Rev-erb-α*. Afin de visualiser l'impact seul du bouleversement des rythmes circadiens, il serait possible d'effectuer des déphasages ou expériences de décalage horaire (jetlag) et d'observer la variation de l'homéostasie calcique ou réticulaire. Néanmoins, cela ne fut pas notre objectif assumé lors de cette étude, nous nous sommes bornés à considérer *Rev-erb-α* comme une cible thérapeutique potentielle dans le cadre de pathologies musculaires.

Rôle éventuel de *Rev-erb-β* et spécificité des ligands des *Rev-erb*

Notre étude ne s'est pas focalisée du tout sur un éventuel rôle de *Rev-erb-β*. Il est possible que *Rev-erb-β* puisse compenser les effets de la modulation de *Rev-erb-α*. En effet, nous avons par exemple constaté que la délétion de *Rev-erb-α* dans les modèles murins entraîne une augmentation de l'expression de *Rev-erb-β*. *Rev-erb-β* semble partager des rôles communs avec *Rev-erb-α* (Cho et al., 2012). En effet, à l'instar de *Rev-erb-α*, *Rev-erb-β* régule la myogenèse des cellules C2C12 (Burke et al., 1996) et la régénération musculaire (Welch et al., 2017a). Ainsi, les effets du SR9009 pourraient s'expliquer par une action synergique de *Rev-erb-α* et de *Rev-erb-β*. Par ailleurs, il a été montré que *Rev-erb-β* réprime l'expression de *Rev-erb-α* en se fixant sur son promoteur (Ramakrishnan et al., 2009). Outre son rôle de doublure et de régulateur de *Rev-erb-α*, *Rev-erb-β* semble également posséder des

fonctions propres notamment sur le métabolisme des lipides et sur l'inflammation par la modulation spécifique de l'expression génique de *sterol regulatory element-binding protein (Srebp)-1c*, *apolipoprotein C-III (apoCIII)*, *alpha-fetoprotein (Afp)*, *fatty acid binding protein 4 (Fabp4)*, *Il-6*, *myostatin* et *N-Myc* (Ramakrishnan et al., 2009). Il est établi que l'agoniste SR9009 est à la fois un ligand du récepteur Rev-erb- α et de Rev-erb- β (Kojetin and Burris, 2014). Il nous est dès lors impossible de distinguer l'origine des effets observés. Néanmoins, les résultats obtenus sur nos modèles animaux de modulation de l'expression de Rev-erb- α sont très largement cohérents avec les effets du SR9009 constatés. Dans le futur, l'utilisation de ligands spécifiques de Rev-erb- α ou de Rev-erb- β permettrait de régler cette problématique. Eu égard aux vastes rôles de Rev-erb- α dans les différents organes, l'injection de ligand dans la circulation sanguine générale pourrait conduire à une myriade d'autres effets non désirés et pas nécessairement bénéfiques. Notre étude sur souris *mdx/utr*^{+/-} ne s'est pas intéressée à d'autres organes que les muscles squelettiques. Ainsi, la spécificité tissulaire des futurs ligands Rev-erb est également un paramètre ô combien critique à considérer.

L'UPR, un processus bénéfique ou délétère ?

L'UPR est un phénomène physiologique qui, d'un premier objectif de restauration de l'homéostasie réticulaire, peut en cas d'échec s'orienter vers des conséquences délétères.

Les souris invalidées pour Rev-erb- α présentent une activité de SERCA réduite qui est associée à une réduction de la réponse à l'UPR suite à une stimulation à la tunicamycine ou à un jeûne (Figures 43 et 44). Ces observations sont, à notre sens, révélatrices d'une situation d'hormèse réticulaire. En effet, nous avons constaté que la modulation de l'activité de SERCA module le contenu calcique réticulaire (Figure 45). L'activité des chaperonnes est largement dépendante de la quantité calcique réticulaire (Lièvreumont et al., 1997). Ainsi, une baisse modérée de la quantité calcique réticulaire pourrait entraîner un stress chronique du réticulum et une réponse UPR de faible ampleur. Ceci conduirait à la production de chaperonnes, comme BiP afin de régler homéostatiquement la modeste situation problématique. Nous avons constaté que l'inactivation de Rev-erb- α entraîne justement une augmentation significative de la quantité de protéine BIP à l'état basal (Figure 68). De plus, la diminution chronique du contenu calcique réticulaire par un traitement chronique à la thapsigargine conduit à une baisse de la réponse à la tunicamycine dans les C2C12, qui est associée à une tendance à l'augmentation de la quantité de protéine BIP. Or, en conditions basales, c'est la fixation de la protéine BIP aux trois protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique, IRE1, PERK et ATF6, qui empêche l'activation des voies de signalisation de l'UPR (Hetz et al., 2015). Ainsi, l'augmentation de la quantité de protéine BiP pourrait éteindre les voies de signalisation de l'UPR en l'absence de stress réticulaire, constat réalisé chez les souris invalidées pour Rev-erb- α qui présentent une réduction de l'expression génique des acteurs de l'UPR (données non présentées). L'hormèse réticulaire obtenue conditionnerait la capacité de réponse à un stress réticulaire plus intense. De notre point de vue, la plus forte présence de BiP (i) dans la lumière réticulaire entrainerait une meilleure gestion d'un stress réticulaire aigu et (ii) auprès d'IRE1, PERK et ATF6 permettrait l'extinction des voies de signalisation et en définitive la moindre réponse aux protéines mal-conformées constatées. Par ailleurs, sans l'avoir testé, nous pouvons aisément imaginer que les autres protéines chaperonnes (Grp94, ORP150 *etc.*) participent en synergie à l'hormèse réticulaire.

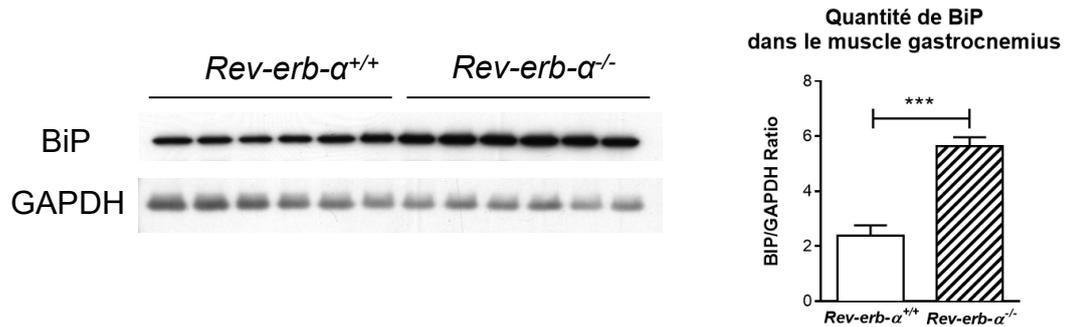


Figure 68 : La quantité de protéine BiP est significativement augmentée par l'inactivation génétique de *Rev-erb-α* *in vivo*.

Western-blot représentatif et quantification de BiP dans les muscles gastrocnémiens de souris *Rev-erb-α*^{+/+} et *Rev-erb-α*^{-/-}. Les histogrammes représentent la moyenne ± SEM, n=6, ***p<0.001 vs. *Rev-erb-α*^{+/+}.

Une autre question est de savoir si cette hormone réticulaire, à savoir la diminution de la réponse UPR est bénéfique ou délétère. Afin de déterminer les conséquences de l'UPR, nous avons mis au point le test Proteostat permettant la quantification des agrégats protéiques au sein du réticulum endoplasmique. Par cytométrie en flux, nous constatons que la quantité d'agrégats est augmentée par un traitement à la tunicamycine de 24h et que *Rev-erb-α* exacerbe le processus (données non présentées). Le protéostat s'avère être ici un marqueur des effets délétères, ce contexte ne permettant pas d'explorer la capacité résolvative puisque les cellules meurent peu de temps après. Il serait intéressant de tester la résorption des agrégats protéiques dans un contexte d'induction du stress réticulaire moins drastique qui favoriserait l'aspect résolvatif de l'UPR. Pour distinguer les effets bénéfiques, nous avons à résoudre une équation insoluble, véritable quadrature du cercle : un stress modéré conduit à l'hormone réticulaire et un stress plus intense provoque la mort cellulaire par apoptose. Un point de vue serait de considérer que seule la survie cellulaire importe puisqu'elle est révélatrice des capacités d'adaptation de la cellule à son environnement.

Nous avons vainement cherché à établir un critère de lecture physiologique de la réponse UPR. Deux études indiquent qu'un prétraitement avec un inducteur de stress réticulaire (tunicamycine ou thapsigargine) permettent d'accroître considérablement et spectaculairement la différenciation de myoblastes C2C12 et particulièrement leur fusion (Nakanishi et al., 2005) (Nakanishi et al., 2007). Nous avons procédé à des expériences préliminaires ayant permis de reproduire ces résultats à l'aide d'un prétraitement à la tunicamycine. Par ailleurs, la surexpression en *Rev-erb-α* augmente le degré de fusion des myotubes par rapport aux myotubes contrôles (données non présentées). Cependant, l'immense hétérogénéité des fibres obtenues (de 1 noyau à plusieurs dizaines) rend impossible, périlleuse ou orientée toute tentative de comptabilisation. La focalisation sans ambages sur les myotubes les plus massifs par Nakanishi et son équipe (Nakanishi et al., 2007) fait fi du phénotype de la grande majorité des myotubes, beaucoup moins fusionnés et hétéroclites.

Nous avons tenté de procéder à la différenciation des myoblastes issus de patients contrôles et myopathes de Duchenne. Alors que l'induction de la différenciation amène à la génération de fibres plurinucléés dans les myotubes issus de patients sains, ce n'est pas le cas dans les myoblastes de patients myopathes de Duchenne (données non présentées). Le

prétraitement à la tunicamycine n'a non plus permis d'induire une fusion de ces myoblastes. Cette observation a coupé court à nos ambitions dans la réalisation de cet objectif.

Les 3 voies de signalisation de l'UPR présentent des spécificités propres (Okada et al., 2002). Tout au long de notre étude, nous avons systématiquement observé une réponse UPR impliquant les trois voies de signalisation de l'UPR, même si dans le cas de stress modérés (jeûne, privation de nutriments), certains gènes étudiés ne sont que peu voire pas induits. De plus, la modulation de l'expression de la myoréguline ou de Rev-erb- α impacte les trois voies de signalisation de l'UPR de la même manière. Ainsi, au risque d'être réducteur, nous avons considéré l'UPR, dans le cadre spécifique de cette étude, comme une réponse globale homéostatique ou délétère.

Nous avons testé d'autres protocoles d'induction du stress réticulaire dans le muscle squelettique comme par exemple l'exercice physique. En effet, celui-ci génère un stress réticulaire visualisé par l'activation des voies de l'UPR. Comme constaté précédemment, les souris invalidées pour Rev-erb- α répondent de manière moins conséquente (données non présentées). Au-delà, le stress réticulaire et l'activation de l'UPR sont des phénomènes retrouvés dans de nombreuses pathologies comme la cachexie dans un contexte de cancer (Porporato, 2016) ou la sarcopénie dans le cadre du vieillissement (Deldicque, 2013). La réduction du stress réticulaire par des moyens pharmacologiques parvient à exercer des effets bénéfiques dans de nombreux contextes pathologiques, comme récemment au sein de la myopathie oculopharyngéale (Malerba et al.).

Régulation de SERCA et myopathie de Duchenne

La sarcolipine est considérablement augmentée dans les muscles squelettiques des souris *mdx* et *mdx/utr*^{-/-} (Schneider et al., 2013) par rapport à des souris saines, résultat que nous avons confirmé au laboratoire sur les souris *mdx/utr*^{+/-} alors que la myoréguline ne subit qu'une hausse modérée de son expression génique (données non présentées). L'absence d'anticorps fiable ciblant la myoréguline, protéine découverte en 2015 seulement, ne permet pas de contrôler son expression protéique. L'invalidation de la sarcolipine dans le modèle de souris *mdx* parvient à restaurer remarquablement le phénotype musculaire (Voit et al., 2017), information qui tendrait à minorer le rôle potentiel de la myoréguline dans ce contexte particulier. Nous avons mené une analyse *in silico* du promoteur de la sarcolipine qui ne révèle pas l'existence de sites de liaison de Rev-erb- α (RRE) (données non présentées). Cependant, nous montrons que l'expression génique de la myoréguline est augmentée dans les cellules issues de patients myopathes de Duchenne (Figure 53) et que le traitement au SR9009 contrecarre cet accroissement (Figure 53). De plus, les résultats bénéfiques obtenus avec le traitement au SR9009 chez les souris *mdx/utr*^{+/-} sont associés avec la diminution de l'expression de la myoréguline par rapport au groupe contrôle (Figure 54).

Mécanisme(s) d'action de Rev-erb- α

Nos résultats montrent que la surexpression de la myoréguline parvient à restaurer complètement le contenu calcique réticulaire des myotubes pREV-ERB α au même niveau que celui des myotubes pBabe (Figure 52). Néanmoins, la restauration de la réponse UPR par la surexpression de la myoréguline n'est pas complète, ce qui suggère des effets additionnels de Rev-erb- α non encore identifiés. Cependant, l'effet de Rev-erb- α sur la réponse UPR est

perdu suite à un traitement à la thapsigargine qui provoque une annihilation des différences calciques réticulaires. Ainsi, les effets additionnels de Rev-erb- α trouvent probablement leur origine dans la modulation des acteurs de l'homéostasie calcique, comme par exemple celle des acteurs du tampon calcique comme la calséquestrine, la calréticuline ou la calnexine, pour ne citer que les principales, qui n'ont pas été testées dans le cadre de nos travaux.

Un papier montre que Rev-erb- α se lie sur le promoteur de CHOP afin d'inhiber sa transcription dans le foie (Yang et al., 2016). Ceci ne semble pas se vérifier dans le muscle squelettique. Premièrement, nos résultats indiquent que l'expression de *Chop* n'est pas modulée par Rev-erb- α en l'absence de stress réticulaire. Deuxièmement, l'analyse *in silico* du promoteur de *Chop* ne montre pas de sites potentiels de liaison de Rev-erb- α (données non présentées).

Rev-erb- α , UPR et statut métabolique du muscle squelettique

L'étude de la cohorte ABOS nous montre que les acteurs de l'UPR sont exprimés différemment dans le muscle squelettique selon le statut de tolérance au glucose de patients obèses. La hausse de la protéine BIP associée à la diminution des voies de signalisation de l'UPR en aval correspond aux caractéristiques de l'hormèse réticulaire que nous avons identifiées dans les souris invalidées pour Rev-erb- α . De plus, le stress réticulaire est connu pour induire la perte de sensibilité à l'insuline du muscle squelettique (Boulinguez et al., 2017). Ayant démontré que Rev-erb- α module la réponse au stress réticulaire, nous nous sommes demandés si Rev-erb- α pouvait agir sur la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique. Pour ce faire, nous avons mené un certain nombre d'expériences sur souris et cellules C2C12. Ainsi, la phosphorylation d'Akt semble diminuée (Figure 69a-b) et la capture du glucose (Figure 69c) est réduite par la surexpression de Rev-erb- α suite à une stimulation à l'insuline. Un traitement à la tunicamycine de 24h induit la baisse de la capture du glucose dans les cellules contrôles pBabe mais, et c'est intéressant, de manière plus importante dans les myotubes surexprimant Rev-erb- α (Figure 69c).

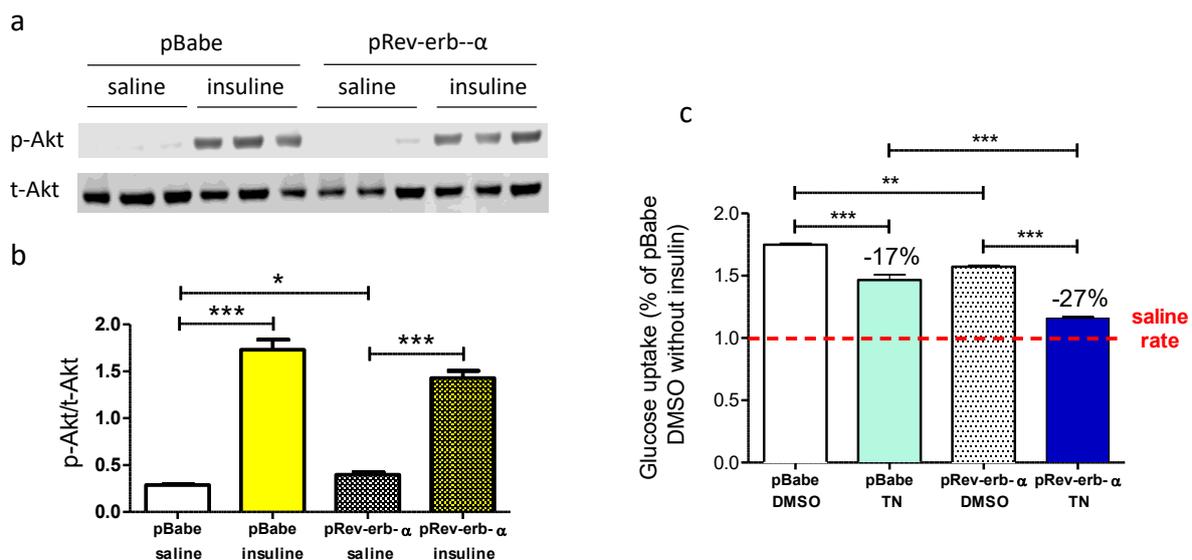


Figure 69 : Rev-erb- α réduit la sensibilité à l'insuline des myotubes en l'absence et en présence d'un stress réticulaire.

(a) Western-blot représentatif de la phosphorylation de la protéine Akt (p-Akt) dans les myotubes C2C12 pBabe et pRev-erb- α , privés de sérum pendant 3h et traités à l'insuline (100nM, 15 minutes) ou avec une solution saline de même volume. La protéine totale (t-Akt) est utilisée comme protéine de ménage, n=3.

(b) Quantification du western-blot sous la forme ratio Akt-p/t-Akt. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM, n=6, *p<0.05, ***p<0.001.

(c) Capture de glucose mesurée par utilisation de glucose radiomarqué chez les myotubes pBabe et pRev-erb- α traités 20h à la tunicamycine (TN, 1 μ g/mL) ou au DMSO, puis stimulés à l'insuline (100nM, 15 minutes). Les résultats des groupes stimulés à l'insuline sont exprimés relativement à la valeur du contrôle non stimulé, n=3.

En parallèle, nous avons soumis des souris *Rev-erb- α ^{+/+}* et *Rev-erb- α ^{-/-}* de fond génétique pro-atérogénique d'inactivation du récepteur au Low-Density Lipoprotein *LDLR^{-/-}* à un régime riche (45%, high-fat diet, HFD, D12451, Research Diets) ou pauvre (10%, low-fat diet, LFD, D12450J, Research Diets) en graisses de 20 semaines. Le régime riche en graisses parvient à induire une légère induction de l'UPR dans le muscle squelettique de la souris *Rev-erb- α ^{+/+}* (données non présentées). De manière intéressante, les souris invalidées pour *Rev-erb- α* présentent une réponse nettement plus faible, d'autant plus faible qu'elle ne concerne pas tous les acteurs de l'UPR (données non présentées). Malheureusement, malgré la prise de masse corporelle conséquente occasionnée par le régime riche en graisses, les souris ne présentent pas de signe d'intolérance au glucose (OGTT) ou de résistance à l'insuline globale (Insulin Tolerance Test, ITT) ou musculaire (étude de la phosphorylation d'Akt suite à une injection intrapéritonéale d'insuline non concluants, données non présentées). Ceci peut trouver une explication dans le fond génétique des souris employées, mélange de C57Bl/6 et de SV129 ; ce dernier étant relativement peu propice aux explorations métaboliques (Funkat et al., 2004).

Rev-erb- α augmente les MAMs et, il semblerait d'après nos premiers résultats, réduit l'insulino-sensibilité du muscle squelettique. Cette association va à l'encontre des données obtenues par Jennifer Rieusset qui démontrent que les MAMs améliorent la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique (Tubbs et al., 2018). Nous pouvons imaginer que les facteurs contrôlant cette régulation dépassent le modeste effet qu'aurait *Rev-erb- α* dans le processus.

Rev-erb- α et régénération musculaire

Nous avons montré que l'exacerbation du *Rev-erb- α* provoque l'apoptose de la cellule satellite activée par le maintien d'un stress réticulaire élevé et le renforcement des interactions mitochondries-réticulum endoplasmique. Dans le cadre de blessures répétées, nous pouvons émettre l'hypothèse que la perte progressive des cellules satellites occasionnées par la surexpression de *Rev-erb- α* pourrait à terme impacter la capacité de régénération du muscle squelettique. Des résultats préliminaires soulignent qu'à la suite de 2 blessures, il existerait une tendance à une diminution de l'aire des fibres et de la fusion myogénique (données non présentées) chez les animaux surexprimant *Rev-erb- α* dans les cellules satellites musculaires. Le contexte du vieillissement est associée à la perte du nombre de cellules satellites musculaires (Brack and Muñoz-Cánoves, 2016). L'inhibition de l'activité de *Rev-erb- α* dans ce contexte pourrait permettre de conserver le pool de cellules satellites (Figure 70)

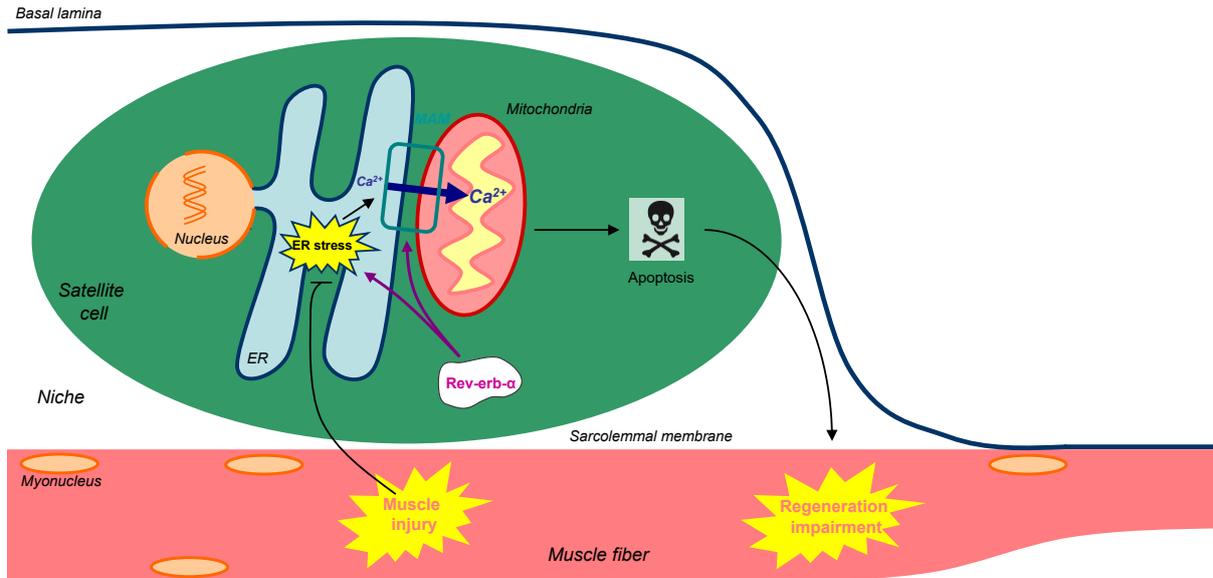


Figure 70 : Modèle hypothétique de la régulation du destin de la cellule satellite par Rev-erb- α .

Rev-erb- α et MAMs

Nous montrons que Rev-erb- α augmente l'interaction physique et fonctionnelle entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie. Nous n'avons pas déterminé par quel moyen l'effet de Rev-erb- α pourrait s'exercer. La recherche du mécanisme de Rev-erb- α s'inscrit dans les perspectives impératives de ce travail.

Pour démontrer le rôle de Rev-erb- α , nous avons utilisé des inhibiteurs des MAMs (Figures 62-63). Malheureusement, les effets de ces molécules ne se bornent pas à la séparation physique du réticulum endoplasmique et des mitochondries et possèdent des rôles canoniques, en particulier anti-apoptotiques. Le rouge de ruthénium est un inhibiteur du MCU et donc de l'entrée calcique mitochondriale. La xestospongine est un inhibiteur de l'activité d'IP3R1 et par conséquent de la sortie calcique réticulaire. La cyclosporine A est un inhibiteur de la cyclophiline D, lui-même inhibiteur de l'ouverture du pore de transition mitochondriale, et de fait de l'induction de l'apoptose par la voie mitochondriale. Cependant, les trois inhibiteurs, malgré leurs rôles canoniques différents, provoquent la perte similaire du phénotype généré par la surexpression de Rev-erb- α (Figure 63). Pour s'extraire de tout effet non MAM-dépendant, nous travaillons actuellement avec un adénovirus permettant la surexpression de FATE1, une protéine liant le réticulum endoplasmique et la mitochondrie qui est suffisamment volumineux pour séparer physiquement les deux organites. De manière intéressante, FATE1 est une protéine exprimée dans le cadre du cancer des testicules et qui n'est pas retrouvée dans le muscle squelettique, nous permettant à première vue d'exclure l'existence d'effets indépendants des MAMs (Tubbs et al., 2018).

BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Hamad, S., Arbel, N., Calo, D., Arzoine, L., Israelson, A., Keinan, N., Ben-Romano, R., Friedman, O., and Shoshan-Barmatz, V. (2009). The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *J. Cell Sci.* *122*, 1906–1916.
- Adams, J.M., Pratipanawatr, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R.A., Sullards, M.C., and Mandarino, L.J. (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* *53*, 25–31.
- Adhihetty, P.J., O’Leary, M.F.N., Chabi, B., Wicks, K.L., and Hood, D.A. (2007). Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 *102*, 1143–1151.
- Ait Mou, Y., Bollensdorff, C., Cazorla, O., Magdi, Y., and de Tombe, P.P. (2015). Exploring cardiac biophysical properties. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* *2015*, 10.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol. CB* *7*, 261–269.
- Algenstaedt, P., Antonetti, D.A., Yaffe, M.B., and Kahn, C.R. (1997). Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca²⁺-ATPases in muscle and heart. *J. Biol. Chem.* *272*, 23696–23702.
- Allard, B. (2006). Sarcolemmal ion channels in dystrophin-deficient skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *27*, 367–373.
- Allard, B. (2018). From excitation to intracellular Ca²⁺ movements in skeletal muscle: Basic aspects and related clinical disorders. *Neuromuscul. Disord.* *28*, 394–401.
- Anderson, D.J., and Hetzer, M.W. (2007). Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1160–1166.
- Anderson, D.M., Anderson, K.M., Chang, C.-L., Makarewich, C.A., Nelson, B.R., McAnally, J.R., Kasaragod, P., Shelton, J.M., Liou, J., Bassel-Duby, R., et al. (2015). A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell* *160*, 595–606.
- Anderson, D.M., Makarewich, C.A., Anderson, K.M., Shelton, J.M., Bezprozvannaya, S., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2016). Widespread control of calcium signaling by a family of SERCA-inhibiting micropeptides. *Sci. Signal.* *9*, ra119.
- Arbel, N., and Shoshan-Barmatz, V. (2010). Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with Bcl-2 to prevent antiapoptotic activity. *J. Biol. Chem.* *285*, 6053–6062.
- Arbel, N., Ben-Hail, D., and Shoshan-Barmatz, V. (2012). Mediation of the Antiapoptotic Activity of Bcl-xL Protein upon Interaction with VDAC1 Protein. *J. Biol. Chem.* *287*, 23152–23161.
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* *204*, 1057–1069.

- Arruda, A.P., Pers, B.M., Parlakgöl, G., Güney, E., Inouye, K., and Hotamisligil, G.S. (2014). Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat. Med.* *20*, 1427–1435.
- Au, Y. (2004). The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *61*, 3016–3033.
- Autry, J.M., Rubin, J.E., Svensson, B., Li, J., and Thomas, D.D. (2012). Nucleotide Activation of the Ca-ATPase. *J. Biol. Chem.* *287*, 39070–39082.
- Baradaran, R., Wang, C., Siliciano, A.F., and Long, S.B. (2018). Cryo-EM structures of fungal and metazoan mitochondrial calcium uniporters. *Nature* *559*, 580–584.
- Barker, R.G., Horvath, D., van der Poel, C., and Murphy, R.M. (2017). Benefits of Prenatal Taurine Supplementation in Preventing the Onset of Acute Damage in the Mdx Mouse. *PLoS Curr.* *9*.
- Barros Maranhão, J., de Oliveira Moreira, D., Maurício, A.F., de Carvalho, S.C., Ferretti, R., Pereira, J.A., Santo Neto, H., and Marques, M.J. (2015). Changes in calsequestrin, TNF- α , TGF- β and MyoD levels during the progression of skeletal muscle dystrophy in mdx mice: a comparative analysis of the quadriceps, diaphragm and intrinsic laryngeal muscles. *Int. J. Exp. Pathol.* *96*, 285–293.
- Bass, J. (2012). Circadian topology of metabolism. *Nature* *491*, 348–356.
- Basset, O., Boittin, F.-X., Cognard, C., Constantin, B., and Ruegg, U.T. (2006). Bcl-2 overexpression prevents calcium overload and subsequent apoptosis in dystrophic myotubes. *Biochem. J.* *395*, 267–276.
- Báthori, G., Csordás, G., Garcia-Perez, C., Davies, E., and Hajnóczky, G. (2006). Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *J. Biol. Chem.* *281*, 17347–17358.
- Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., et al. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* *476*, 341–345.
- Baumann, C.W., Kwak, D., Liu, H.M., and Thompson, L.V. (2016). Age-induced oxidative stress: how does it influence skeletal muscle quantity and quality? *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *121*, 1047–1052.
- Baviera, A.M., Zanon, N.M., Carvalho Navegantes, L.C., Migliorini, R.H., and do Carmo Kettelhut, I. (2007). Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *292*, E702-708.
- Baviera, A.M., Zanon, N.M., Navegantes, L.C.C., Migliorini, R.H., and Kettelhut, I.C. (2008). Chemical sympathectomy further increases muscle protein degradation of acutely diabetic rats. *Muscle Nerve* *38*, 1027–1035.

- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vonnrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M., and Zeth, K. (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15370–15375.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., Matecki, S., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat. Med.* *15*, 325–330.
- Berridge, M.J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* *32*, 235–249.
- Berthier, A., Vinod, M., Porez, G., Steenackers, A., Alexandre, J., Yamakawa, N., Gheeraert, C., Ploton, M., Maréchal, X., Dubois-Chevalier, J., et al. (2018). Combinatorial regulation of hepatic cytoplasmic signaling and nuclear transcriptional events by the OGT/REV-ERB α complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E11033–E11042.
- Bohnert, K.R., McMillan, J.D., and Kumar, A. (2018). Emerging roles of ER stress and unfolded protein response pathways in skeletal muscle health and disease. *J. Cell. Physiol.* *233*, 67–78.
- Bonnelye, E., Vanacker, J.M., Desbiens, X., Begue, A., Stehelin, D., and Laudet, V. (1994). Rev-erb beta, a new member of the nuclear receptor superfamily, is expressed in the nervous system during chicken development. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *5*, 1357–1365.
- Boulinguez, A., Staels, B., Duez, H., and Lancel, S. (2017). Mitochondria and endoplasmic reticulum: targets for a better insulin sensitivity in skeletal muscle? *Biochim. Biophys. Acta.*
- Brack, A.S., and Muñoz-Cánoves, P. (2016). The ins and outs of muscle stem cell aging. *Skelet. Muscle* *6*.
- Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., et al. (2013). Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *301*, 215–290.
- Buchan, J.R., and Parker, R. (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell* *36*, 932–941.
- Burke, L., Downes, M., Carozzi, A., Giguère, V., and Muscat, G.E. (1996). Transcriptional repression by the orphan steroid receptor RVR/Rev-erb beta is dependent on the signature motif and helix 5 in the E region: functional evidence for a biological role of RVR in myogenesis. *Nucleic Acids Res.* *24*, 3481–3489.
- Busutil, R., Espallardo, O., Torres, A., Martínez-Galdeano, L., Zozaya, N., and Hidalgo-Vega, Á. (2017). The impact of obesity on health-related quality of life in Spain. *Health Qual. Life Outcomes* *15*, 197.
- Calderón, J.C., Bolaños, P., and Caputo, C. (2014). The excitation–contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophys. Rev.* *6*, 133–160.
- Capogrosso, R.F., Mantuano, P., Uaesoontrachoon, K., Cozzoli, A., Giustino, A., Dow, T., Srinivassane, S., Filipovic, M., Bell, C., Vandermeulen, J., et al. (2018). Ryanodine channel

complex stabilizer compound S48168/ARM210 as a disease modifier in dystrophin-deficient mdx mice: proof-of-concept study and independent validation of efficacy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 1025–1043.

Capote, J., DiFranco, M., and Vergara, J.L. (2010). Excitation-contraction coupling alterations in mdx and utrophin/dystrophin double knockout mice: a comparative study. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C1077-1086.

Chalfant, C., and Del Poeta, M. (2010). Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules.

Chamberlain, J.R., and Chamberlain, J.S. (2017). Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* 25, 1125–1131.

Chan, D.C., Gan, S.K., Wong, A.T.Y., Barrett, P.H.R., and Watts, G.F. (2014). Association between skeletal muscle fat content and very-low-density lipoprotein-apolipoprotein B-100 transport in obesity: effect of weight loss. *Diabetes Obes. Metab.* 16, 994–1000.

Chan, S., Head, S.I., and Morley, J.W. (2007). Branched fibers in dystrophic mdx muscle are associated with a loss of force following lengthening contractions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293, C985-992.

Chavez, J.A., Knotts, T.A., Wang, L.-P., Li, G., Dobrowsky, R.T., Florant, G.L., and Summers, S.A. (2003). A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 278, 10297–10303.

Chawla, J. (2011). Stepwise Approach to Myopathy in Systemic Disease. *Front. Neurol.* 2.

Cho, H., Zhao, X., Hatori, M., Yu, R.T., Barish, G.D., Lam, M.T., Chong, L.-W., DiTacchio, L., Atkins, A.R., Glass, C.K., et al. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature* 485, 123–127.

Chomez, P., Neveu, I., Mansén, A., Kiesler, E., Larsson, L., Vennström, B., and Arenas, E. (2000). Increased cell death and delayed development in the cerebellum of mice lacking the rev-erbA(alpha) orphan receptor. *Dev. Camb. Engl.* 127, 1489–1498.

Ciapaite, J., van den Berg, S.A., Houten, S.M., Nicolay, K., van Dijk, K.W., and Jeneson, J.A. (2015). Fiber-type-specific sensitivities and phenotypic adaptations to dietary fat overload differentially impact fast- versus slow-twitch muscle contractile function in C57BL/6J mice. *J. Nutr. Biochem.* 26, 155–164.

Claflin, D.R., and Brooks, S.V. (2008). Direct observation of failing fibers in muscles of dystrophic mice provides mechanistic insight into muscular dystrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, C651-658.

Coe, H., and Michalak, M. (2009). Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen. Physiol. Biophys.* 28 *Spec No Focus*, F96–F103.

Cooper, R.N., Tajbakhsh, S., Mouly, V., Cossu, G., Buckingham, M., and Butler-Browne, G.S. (1999). In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci* 112, 2895–2901.

- Cordova, G., Negroni, E., Cabello-Verrugio, C., Mouly, V., and Trollet, C. (2018). Combined Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy to Optimize Treatment Efficacy. *Front. Genet.* *9*, 114.
- Cornelison, D.D., and Wold, B.J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* *191*, 270–283.
- Cornelison, D.D.W., Olwin, B.B., Rudnicki, M.A., and Wold, B.J. (2000). MyoD^{-/-} Satellite Cells in Single-Fiber Culture Are Differentiation Defective and MRF4 Deficient. *Dev. Biol.* *224*, 122–137.
- Corsi, A.K., and Schekman, R. (1996). Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *271*, 30299–30302.
- Cortez, L., and Sim, V. (2014). The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion* *8*.
- Courcier-Fruh, I., and Briguet, A. (2006). Utrophin is a calpain substrate in muscle cells. *Muscle Nerve* *33*, 753–759.
- Cretenet, G., Le Clech, M., and Gachon, F. (2010). Circadian clock-coordinated 12 Hr period rhythmic activation of the IRE1 α pathway controls lipid metabolism in mouse liver. *Cell Metab.* *11*, 47–57.
- Culligan, K., Banville, N., Dowling, P., and Ohlendieck, K. (2002). Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *92*, 435–445.
- Cully, T.R., and Launikonis, B.S. (2016). Leaky ryanodine receptors delay the activation of store overload-induced Ca²⁺ release, a mechanism underlying malignant hyperthermia-like events in dystrophic muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *310*, C673-680.
- Dayal, A., Schrötter, K., Pan, Y., Föhr, K., Melzer, W., and Grabner, M. (2017). The Ca²⁺ influx through the mammalian skeletal muscle dihydropyridine receptor is irrelevant for muscle performance. *Nat. Commun.* *8*, 475.
- De Meis, L., and Hasselbach, W. (1971). Acetyl phosphate as substrate for Ca²⁺ uptake in skeletal muscle microsomes. Inhibition by alkali ions. *J. Biol. Chem.* *246*, 4759–4763.
- De Pinto, V., Guarino, F., Guarnera, A., Messina, A., Reina, S., Tomasello, F.M., Palermo, V., and Mazzoni, C. (2010). Characterization of human VDAC isoforms: a peculiar function for VDAC3? *Biochim. Biophys. Acta* *1797*, 1268–1275.
- De Stefani, D., Bononi, A., Romagnoli, A., Messina, A., De Pinto, V., Pinton, P., and Rizzuto, R. (2012). VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. *Cell Death Differ.* *19*, 267–273.
- De Stefani, D., Patron, M., and Rizzuto, R. (2015). Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1853*, 2006–2011.

- Deconinck, A.E., Rafael, J.A., Skinner, J.A., Brown, S.C., Potter, A.C., Metzinger, L., Watt, D.J., Dickson, J.G., Tinsley, J.M., and Davies, K.E. (1997). Utrophin-Dystrophin-Deficient Mice as a Model for Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell* 90, 717–727.
- Dee, K., Freer, M., Mei, Y., and Weyman, C.M. (2002). Apoptosis coincident with the differentiation of skeletal myoblasts is delayed by caspase 3 inhibition and abrogated by MEK-independent constitutive Ras signaling. *Cell Death Differ.* 9, 209–218.
- Dejeans, N., Tajeddine, N., Beck, R., Verrax, J., Taper, H., Gailly, P., and Calderon, P.B. (2010). Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1221–1230.
- Deldicque, L. (2013). Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle: any contribution to sarcopenia? *Front. Physiol.* 4, 236.
- Deldicque, L., Bertrand, L., Patton, A., Francaux, M., and Baar, K. (2011a). ER stress induces anabolic resistance in muscle cells through PKB-induced blockade of mTORC1. *PloS One* 6, e20993.
- Deldicque, L., Van Proeyen, K., Francaux, M., and Hespel, P. (2011b). The unfolded protein response in human skeletal muscle is not involved in the onset of glucose tolerance impairment induced by a fat-rich diet. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111, 1553–1558.
- Di Meo, S., Iossa, S., and Venditti, P. (2017). Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training. *J. Endocrinol.* 234, R159–R181.
- Dibner, C., and Schibler, U. (2015). Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *J. Intern. Med.* 277, 513–527.
- Divet, A., and Huchet-Cadiou, C. (2002). Sarcoplasmic reticulum function in slow- and fast-twitch skeletal muscles from mdx mice. *Pflugers Arch.* 444, 634–643.
- Divet, A., Lompré, A.-M., and Huchet-Cadiou, C. (2005). Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, on skeletal muscles from normal and mdx mice. *Acta Physiol. Scand.* 184, 173–186.
- Doghman-Bouguerra, M., Granatiero, V., Sbiera, S., Sbiera, I., Lacas-Gervais, S., Brau, F., Fassnacht, M., Rizzuto, R., and Lalli, E. (2016). FATE1 antagonizes calcium- and drug-induced apoptosis by uncoupling ER and mitochondria. *EMBO Rep.* 17, 1264–1280.
- Dowling, P., Doran, P., and Ohlendieck, K. (2004). Drastic reduction of sarcalumenin in Dp427 (dystrophin of 427 kDa)-deficient fibres indicates that abnormal calcium handling plays a key role in muscular dystrophy. *Biochem. J.* 379, 479–488.
- Downes, M., Carozzi, A.J., and Muscat, G.E. (1995). Constitutive expression of the orphan receptor, Rev-erbA alpha, inhibits muscle differentiation and abrogates the expression of the myoD gene family. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 9, 1666–1678.
- Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J.L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S.R., and Mitch, W.E. (2004). Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J. Clin. Invest.* 113, 115–123.

- Duez, H., and Staels, B. (2009). Rev-erb-alpha: an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 107, 1972–1980.
- Duez, H., Sebti, Y., and Staels, B. (2013). [Circadian rhythmicity and metabolism: integration of metabolic and environmental signals]. *Med. Sci. MS* 29, 772–777.
- Dupont-Versteegden, E.E., Strotman, B.A., Gurley, C.M., Gaddy, D., Knox, M., Fluckey, J.D., and Peterson, C.A. (2006). Nuclear translocation of EndoG at the initiation of disuse muscle atrophy and apoptosis is specific to myonuclei. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R1730-1740.
- Eckel-Mahan, K., and Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 462–467.
- Eckel-Mahan, K., and Sassone-Corsi, P. (2013). Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol. Rev.* 93, 107–135.
- Edwards, J.N., Friedrich, O., Cully, T.R., von Wegner, F., Murphy, R.M., and Launikonis, B.S. (2010). Upregulation of store-operated Ca²⁺ entry in dystrophic mdx mouse muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299, C42-50.
- Eibschutz, B., Lopaschuk, G.D., McNeill, J.H., and Katz, S. (1984). Ca²⁺-transport in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum of the chronically diabetic rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 45, 301–304.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- English, A.R., and Voeltz, G.K. (2013). Endoplasmic Reticulum Structure and Interconnections with Other Organelles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- English, A.R., Zurek, N., and Voeltz, G.K. (2009). Peripheral ER structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 596–602.
- Eshima, H., Tamura, Y., Kakehi, S., Kurebayashi, N., Murayama, T., Nakamura, K., Kakigi, R., Okada, T., Sakurai, T., Kawamori, R., et al. (2017). Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force in mouse fast-twitch skeletal muscle. *Physiol. Rep.* 5.
- Espinosa, A., Henríquez-Olguín, C., and Jaimovich, E. (2016). Reactive oxygen species and calcium signals in skeletal muscle: A crosstalk involved in both normal signaling and disease. *Cell Calcium* 60, 172–179.
- Everett, L.J., and Lazar, M.A. (2014). Nuclear receptor Rev-erba: up, down, and all around. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 25, 586–592.
- Fajardo, V.A., Chambers, P.J., Juracic, E.S., Rietze, B.A., Gamu, D., Bellissimo, C., Kwon, F., Quadriatero, J., and Russell Tupling, A. (2018). Sarcolipin deletion in mdx mice impairs calcineurin signalling and worsens dystrophic pathology. *Hum. Mol. Genet.*
- Farini, A., Sitzia, C., Cassinelli, L., Colleoni, F., Parolini, D., Giovanella, U., Maciotta, S., Colombo, A., Meregalli, M., and Torrente, Y. (2016). Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)-

dependent Ca²⁺ signaling mediates delayed myogenesis in Duchenne muscular dystrophy fetal muscle. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 658–669.

Fernando, P., Kelly, J.F., Balazsi, K., Slack, R.S., and Megeney, L.A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11025–11030.

Ferretti, R., Marques, M.J., Pertille, A., and Santo Neto, H. (2009). Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca²⁺-ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient mdx mice. *Muscle Nerve* *39*, 609–615.

Fong, P.Y., Turner, P.R., Denetclaw, W.F., and Steinhardt, R.A. (1990). Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science* *250*, 673–676.

Forman, B.M., Chen, J., Blumberg, B., Kliewer, S.A., Henshaw, R., Ong, E.S., and Evans, R.M. (1994). Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *8*, 1253–1261.

Forouhi, N.G., and Wareham, N.J. (2014). Epidemiology of diabetes. *Med. Abingdon Engl. UK Ed* *42*, 698–702.

Franco, A., and Lansman, J.B. (1990). Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* *344*, 670–673.

Frangioudakis, G., Garrard, J., Raddatz, K., Nadler, J.L., Mitchell, T.W., and Schmitz-Peiffer, C. (2010). Saturated- and n-6 polyunsaturated-fat diets each induce ceramide accumulation in mouse skeletal muscle: reversal and improvement of glucose tolerance by lipid metabolism inhibitors. *Endocrinology* *151*, 4187–4196.

Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J., and Voeltz, G.K. (2010). ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* *190*, 363–375.

Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.* *96*, 183–195.

Funkat, A., Massa, C.M., Jovanovska, V., Proietto, J., and Andrikopoulos, S. (2004). Metabolic Adaptations of Three Inbred Strains of Mice (C57BL/6, DBA/2, and 129T2) in Response to a High-Fat Diet. *J. Nutr.* *134*, 3264–3269.

Gailly, P., De Backer, F., Van Schoor, M., and Gillis, J.M. (2007). In situ measurements of calpain activity in isolated muscle fibres from normal and dystrophin-lacking mdx mice. *J. Physiol.* *582*, 1261–1275.

Gallot, Y.S., Bohnert, K.R., Straughn, A.R., Xiong, G., Hindi, S.M., and Kumar, A. (2018). PERK regulates skeletal muscle mass and contractile function in adult mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* fj201800683RR.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death:

recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541.

Ganguly, P.K., Mathur, S., Gupta, M.P., Beamish, R.E., and Dhalla, N.S. (1986). Calcium pump activity of sarcoplasmic reticulum in diabetic rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 251, E515-523.

Ganguly, P.K., Taira, Y., Elimban, V., Roy, M., and Dhalla, N.S. (1987). Altered contractile proteins in skeletal muscle of diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 253, E395-400.

García-Pérez, C., Hajnóczky, G., and Csordás, G. (2008). Physical coupling supports the local Ca²⁺ transfer between sarcoplasmic reticulum subdomains and the mitochondria in heart muscle. *J. Biol. Chem.* 283, 32771–32780.

Garcia-Vicencio, S., Coudeyre, E., Kluka, V., Cardenoux, C., Jegu, A.-G., Fourot, A.-V., Ratel, S., and Martin, V. (2016). The bigger, the stronger? Insights from muscle architecture and nervous characteristics in obese adolescent girls. *Int. J. Obes.* 2005 40, 245–251.

Garry, D.J., Meeson, A., Elterman, J., Zhao, Y., Yang, P., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2000). Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5416–5421.

Gault, C.R., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* 688, 1–23.

Gehrig, S.M., van der Poel, C., Sayer, T.A., Schertzer, J.D., Henstridge, D.C., Church, J.E., Lamon, S., Russell, A.P., Davies, K.E., Febbraio, M.A., et al. (2012). Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature* 484, 394–398.

Gincel, D., Zaid, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem. J.* 358, 147–155.

Giorgi, C., Missiroli, S., Patergnani, S., Duszynski, J., Wieckowski, M.R., and Pinton, P. (2015). Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 995–1019.

Gokhin, D.S., Tierney, M.T., Sui, Z., Sacco, A., and Fowler, V.M. (2014). Calpain-mediated proteolysis of tropomodulin isoforms leads to thin filament elongation in dystrophic skeletal muscle. *Mol. Biol. Cell* 25, 852–865.

Goonasekera, S.A., Lam, C.K., Millay, D.P., Sargent, M.A., Hajjar, R.J., Kranias, E.G., and Molkentin, J.D. (2011). Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 121, 1044–1052.

Goonasekera, S.A., Davis, J., Kwong, J.Q., Accornero, F., Wei-LaPierre, L., Sargent, M.A., Dirksen, R.T., and Molkentin, J.D. (2014). Enhanced Ca²⁺ influx from STIM1-Orai1 induces muscle pathology in mouse models of muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3706–3715.

Griggs, R.C., Miller, J.P., Greenberg, C.R., Fehlings, D.L., Pestronk, A., Mendell, J.R., Moxley, R.T., King, W., Kissel, J.T., Cwik, V., et al. (2016). Efficacy and safety of

deflazacort vs prednisone and placebo for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 87, 2123–2131.

Grigoriev, I., Gouveia, S.M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J.T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M.O., Putney, J.W., Hoogenraad, C.C., et al. (2008). STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr. Biol. CB* 18, 177–182.

Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., and Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J. Biol. Rhythms* 20, 391–403.

Gurevich, D.B., Nguyen, P.D., Siegel, A.L., Ehrlich, O.V., Sonntag, C., Phan, J.M.N., Berger, S., Ratnayake, D., Hersey, L., Berger, J., et al. (2016). Asymmetric division of clonal muscle stem cells coordinates muscle regeneration in vivo. *Science* 353, aad9969.

Gutpell, K.M., Hrinivich, W.T., and Hoffman, L.M. (2015). Skeletal muscle fibrosis in the mdx/utrn^{+/-} mouse validates its suitability as a murine model of Duchenne muscular dystrophy. *PloS One* 10, e0117306.

Hage Hassan, R., Hainault, I., Vilquin, J.-T., Samama, C., Lasnier, F., Ferré, P., Fougelle, F., and Hajduch, E. (2012). Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells. *Diabetologia* 55, 204–214.

Hales, C.M., Carroll, M.D., Fryar, C.D., and Ogden, C.L. (2017). Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2015-2016. *NCHS Data Brief* 1–8.

Hara, H., Kamiya, T., and Adachi, T. (2011). Endoplasmic reticulum stress inducers provide protection against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity. *Neurochem. Int.* 58, 35–43.

Harding, H.P., and Lazar, M.A. (1993). The orphan receptor Rev-ErbA alpha activates transcription via a novel response element. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3113–3121.

Hawke, T.J., and Garry, D.J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 91, 534–551.

Hayashi, T., and Fujimoto, M. (2010). Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction. *Mol. Pharmacol.* 77, 517–528.

Hayashi, T., and Su, T.-P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell* 131, 596–610.

Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., and Su, T.-P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* 19, 81–88.

Heifetz, A., Keenan, R.W., and Elbein, A.D. (1979). Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry* 18, 2186–2192.

Henderson, C.A., Gomez, C.G., Novak, S.M., Mi-Mi, L., and Gregorio, C.C. (2017). Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr. Physiol.* 7, 891–944.

- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 89–102.
- Hetz, C., Chevet, E., and Harding, H.P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 703–719.
- Hetz, C., Chevet, E., and Oakes, S.A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat. Cell Biol.* *17*, 829–838.
- Hidalgo, C., Bull, R., Behrens, M.I., and Donoso, P. (2004). Redox regulation of RyR-mediated Ca²⁺ release in muscle and neurons. *Biol. Res.* *37*, 539–552.
- Hill, M., Wernig, A., and Goldspink, G. (2003). Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *J. Anat.* *203*, 89–99.
- Hirschberg, K., Rodger, J., and Futerman, A.H. (1993). The long-chain sphingoid base of sphingolipids is acylated at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum in rat liver. *Biochem. J.* *290* (Pt 3), 751–757.
- Hodge, B.A., Wen, Y., Riley, L.A., Zhang, X., England, J.H., Harfmann, B.D., Schroder, E.A., and Esser, K.A. (2015). The endogenous molecular clock orchestrates the temporal separation of substrate metabolism in skeletal muscle. *Skelet. Muscle* *5*.
- Hollingworth, S., Zeiger, U., and Baylor, S.M. (2008). Comparison of the myoplasmic calcium transient elicited by an action potential in intact fibres of mdx and normal mice. *J. Physiol.* *586*, 5063–5075.
- Holloszy, J.O. (2003). A forty-year memoir of research on the regulation of glucose transport into muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *284*, E453–467.
- Horvath, D.M., Murphy, R.M., Mollica, J.P., Hayes, A., and Goodman, C.A. (2016). The effect of taurine and β -alanine supplementation on taurine transporter protein and fatigue resistance in skeletal muscle from mdx mice. *Amino Acids* *48*, 2635–2645.
- Hruby, A., and Hu, F.B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *PharmacoEconomics* *33*, 673–689.
- Hu, J., Shibata, Y., Zhu, P.-P., Voss, C., Rismanchi, N., Prinz, W.A., Rapoport, T.A., and Blackstone, C. (2009). A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell* *138*, 549–561.
- Hulmi, J.J., Hentilä, J., DeRuisseau, K.C., Oliveira, B.M., Papaioannou, K.G., Autio, R., Kujala, U.M., Ritvos, O., Kainulainen, H., Korkmaz, A., et al. (2016). Effects of muscular dystrophy, exercise and blocking activin receptor IIB ligands on the unfolded protein response and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* *99*, 308–322.
- Huxley, H.E. (1966). The fine structure of striated muscle and its functional significance. *Harvey Lect.* *60*, 85–118.
- Hwang, S.-L., Li, X., Lee, J.-Y., and Chang, H.W. (2012). Improved insulin sensitivity by rapamycin is associated with reduction of mTOR and S6K1 activities in L6 myotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *418*, 402–407.

- Hwang, S.-L., Yang, J.H., Jeong, Y.-T., Kim, Y.D., Li, X., Lu, Y., Chang, Y.-C., Son, K.H., and Chang, H.W. (2013a). Tanshinone IIA improves endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance through AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *430*, 1246–1252.
- Hwang, S.-L., Jeong, Y.-T., Li, X., Kim, Y.D., Lu, Y., Chang, Y.-C., Lee, I.-K., and Chang, H.W. (2013b). Inhibitory cross-talk between the AMPK and ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* *169*, 69–81.
- Hyzewicz, J., Ruegg, U.T., and Takeda, S. (2015). Comparison of Experimental Protocols of Physical Exercise for mdx Mice and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *J. Neuromuscul. Dis.* *2*, 325–342.
- Ijuin, T., Hatano, N., Hosooka, T., and Takenawa, T. (2015). Regulation of insulin signaling in skeletal muscle by PIP3 phosphatase, SKIP, and endoplasmic reticulum molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 3192–3201.
- Ijuin, T., Hosooka, T., and Takenawa, T. (2016). Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Phosphatase SKIP Links Endoplasmic Reticulum Stress in Skeletal Muscle to Insulin Resistance. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 108–118.
- Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A., and Wernig, A. (1994). Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *199*, 326–337.
- Ivanova, H., Vervliet, T., Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H., and Bultynck, G. (2014). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 2164–2183.
- Jeong, Y.-T., Kim, Y.D., Jung, Y.-M., Park, D.-C., Lee, D.-S., Ku, S.-K., Li, X., Lu, Y., Chao, G.H., Kim, K.-J., et al. (2013). Low molecular weight fucoidan improves endoplasmic reticulum stress-reduced insulin sensitivity through AMP-activated protein kinase activation in L6 myotubes and restores lipid homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Mol. Pharmacol.* *84*, 147–157.
- Kamdar, F., and Garry, D.J. (2016). Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* *67*, 2533–2546.
- Kargacin, M.E., and Kargacin, G.J. (1996). The sarcoplasmic reticulum calcium pump is functionally altered in dystrophic muscle. *Biochim. Biophys. Acta* *1290*, 4–8.
- Kars, M., Yang, L., Gregor, M.F., Mohammed, B.S., Pietka, T.A., Finck, B.N., Patterson, B.W., Horton, J.D., Mittendorfer, B., Hotamisligil, G.S., et al. (2010). Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes* *59*, 1899–1905.
- Kenner, K.A., Anyanwu, E., Olefsky, J.M., and Kusari, J. (1996). Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling. *J. Biol. Chem.* *271*, 19810–19816.

- Kieny, P., Chollet, S., Delalande, P., Le Fort, M., Magot, A., Pereon, Y., and Perrouin Verbe, B. (2013). Evolution of life expectancy of patients with Duchenne muscular dystrophy at AFM Yolaine de Kepper centre between 1981 and 2011. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* *56*, 443–454.
- Kimura, I., Tsuneki, H., Dezaki, K., and Kimura, M. (1995). Diabetic state-induced rapid inactivation of noncontractile Ca²⁺ mobilization operated by nicotinic acetylcholine receptor in mouse diaphragm muscle. *Br. J. Pharmacol.* *116*, 2685–2690.
- Kimura, M., Kimura, I., Nakamura, T., and Nojima, H. (1988). Diabetic state-induced modification of resting membrane potential and conductance in diaphragm muscle of alloxan and diabetic KK-CAY mice. *Diabetologia* *31*, 103–107.
- Kobayashi, S., Fujihara, M., Hoshino, N., Kimura, I., and Kimura, M. (1989). Diabetic state-induced activation of calcium-activated neutral proteinase in mouse skeletal muscle. *Endocrinol. Jpn.* *36*, 833–844.
- Kogelman, B., Putker, K., Hulsker, M., Tanganyika-de Winter, C., van der Weerd, L., Aartsma-Rus, A., and van Putten, M. (2018). Voluntary exercise improves muscle function and does not exacerbate muscle and heart pathology in aged Duchenne muscular dystrophy mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *125*, 29–38.
- Koh, H.-J., Toyoda, T., Didesch, M.M., Lee, M.-Y., Sleeman, M.W., Kulkarni, R.N., Musi, N., Hirshman, M.F., and Goodyear, L.J. (2013). Tribbles 3 Mediates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Nat. Commun.* *4*, 1871.
- Kojetin, D.J., and Burris, T.P. (2014). REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 197–216.
- Kopach, O., Kruglikov, I., Pivneva, T., Voitenko, N., and Fedirko, N. (2008). Functional coupling between ryanodine receptors, mitochondria and Ca(2+) ATPases in rat submandibular acinar cells. *Cell Calcium* *43*, 469–481.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* *14*, 230–239.
- Koyanagi, S., Okazawa, S., Kuramoto, Y., Ushijima, K., Shimeno, H., Soeda, S., Okamura, H., and Ohdo, S. (2006). Chronic Treatment with Prednisolone Represses the Circadian Oscillation of Clock Gene Expression in Mouse Peripheral Tissues. *Mol. Endocrinol.* *20*, 573–583.
- Kuznetsov, G., Brostrom, M.A., and Brostrom, C.O. (1992). Demonstration of a calcium requirement for secretory protein processing and export. Differential effects of calcium and dithiothreitol. *J. Biol. Chem.* *267*, 3932–3939.
- Kwak, H.J., Choi, H.-E., Jang, J., Park, S.K., Bae, Y.-A., and Cheon, H.G. (2016). Bortezomib attenuates palmitic acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in myotubes via AMPK dependent mechanism. *Cell. Signal.* *28*, 788–797.

- Lafoux, A., Divet, A., Gervier, P., and Huchet-Cadiou, C. (2006). Greater susceptibility of the sarcoplasmic reticulum to H₂O₂ injuries in diaphragm muscle from mdx mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *318*, 1359–1367.
- Lamia, K.A., Sachdeva, U.M., DiTacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., Vasquez, D.S., Jugulon, H., Panda, S., Shaw, R.J., et al. (2009). AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* *326*, 437–440.
- Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S., Thepenier, V., François, V., Le Guiner, C., Goubin, H., Dutilleul, M., Guigand, L., et al. (2014). Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PloS One* *9*, e110371.
- Lazar, M.A., Hodin, R.A., Darling, D.S., and Chin, W.W. (1989). A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA alpha transcriptional unit. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 1128–1136.
- Levine, B.T., and Levine, A.B. (2006). *Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease* (Wiley-Blackwell).
- L'honoré, A., Commère, P.-H., Negroni, E., Pallafacchina, G., Friguet, B., Drouin, J., Buckingham, M., and Montarras, D. (2018). The role of Pitx2 and Pitx3 in muscle stem cells gives new insights into P38 α MAP kinase and redox regulation of muscle regeneration. *ELife* *7*.
- Li, Y., Sato, Y., and Yamaguchi, N. (2011). Shift work and the risk of metabolic syndrome: a nested case-control study. *Int. J. Occup. Environ. Health* *17*, 154–160.
- Li, Y., Guo, Y., Tang, J., Jiang, J., and Chen, Z. (2014). New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *46*, 629–640.
- Lièvreumont, J.P., Rizzuto, R., Hendershot, L., and Meldolesi, J. (1997). BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* *272*, 30873–30879.
- Liong, S., and Lappas, M. (2016). Endoplasmic reticulum stress regulates inflammation and insulin resistance in skeletal muscle from pregnant women. *Mol. Cell. Endocrinol.* *425*, 11–25.
- Literáti-Nagy, B., Kulcsár, E., Literáti-Nagy, Z., Buday, B., Péterfai, E., Horváth, T., Tory, K., Kolonics, A., Fleming, A., Mandl, J., et al. (2009). Improvement of insulin sensitivity by a novel drug, BGP-15, in insulin-resistant patients: a proof of concept randomized double-blind clinical trial. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* *41*, 374–380.
- López-Crisosto, C., Bravo-Sagua, R., Rodriguez-Peña, M., Mera, C., Castro, P.F., Quest, A.F.G., Rothermel, B.A., Cifuentes, M., and Lavandero, S. (2015). ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases. *Biochim. Biophys. Acta* *1852*, 2096–2105.
- Louboutin, J.P., Fichter-Gagnepain, V., Pastoret, C., Thaon, E., Noireaud, J., Sébille, A., and Fardeau, M. (1995). Morphological and functional study of extensor digitorum longus muscle regeneration after iterative crush lesions in mdx mouse. *Neuromuscul. Disord. NMD* *5*, 489–500.

- van Lunteren, E. (1996). Effects of genetic obesity on rat upper airway muscle and diaphragm contractile properties. *Eur. Respir. J.* 9, 2139–2144.
- Lytton, J., Westlin, M., and Hanley, M.R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 266, 17067–17071.
- Machado, L., Esteves de Lima, J., Fabre, O., Proux, C., Legendre, R., Szegedi, A., Varet, H., Ingerslev, L.R., Barrès, R., Relaix, F., et al. (2017). In Situ Fixation Redefines Quiescence and Early Activation of Skeletal Muscle Stem Cells. *Cell Rep.* 21, 1982–1993.
- Mackey, A.L., and Kjaer, M. (2017). The breaking and making of healthy adult human skeletal muscle in vivo. *Skelet. Muscle* 7.
- Madesh, M., and Hajnóczky, G. (2001). VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J. Cell Biol.* 155, 1003–1015.
- Malerba, A., Roth, F., Harish, P., Dhiab, J., Lu-Nguyen, N., Cappellari, O., Jarmin, S., Mahoudeau, A., Ythier, V., Lainé, J., et al. Pharmacological modulation of the ER stress response ameliorates oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*
- Marchand, E., Constantin, B., Vandebrouck, C., Raymond, G., and Cognard, C. (2001). Calcium homeostasis and cell death in Sol8 dystrophin-deficient cell line in culture. *Cell Calcium* 29, 85–96.
- Marette, A., Liu, Y., and Sweeney, G. (2014). Skeletal muscle glucose metabolism and inflammation in the development of the metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 15, 299–305.
- Masri, S., and Sassone-Corsi, P. (2018). The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms. *Nat. Med.* 24, 1795.
- Matsakas, A., Prosdocimo, D.A., Mitchell, R., Collins-Hooper, H., Giallourou, N., Swann, J.R., Potter, P., Epting, T., Jain, M.K., and Patel, K. (2015). Investigating mechanisms underpinning the detrimental impact of a high-fat diet in the developing and adult hypermuscular myostatin null mouse. *Skelet. Muscle* 5, 38.
- Matsuda, M., and DeFronzo, R.A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22, 1462–1470.
- Matsunaga, S., Inashima, S., Yamada, T., Watanabe, H., Hazama, T., and Wada, M. (2003). Oxidation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflugers Arch.* 446, 394–399.
- Matsuzaka, Y., Tanihata, J., Komaki, H., Ishiyama, A., Oya, Y., Rüegg, U., Takeda, S.-I., and Hashido, K. (2016). Characterization and Functional Analysis of Extracellular Vesicles and Muscle-Abundant miRNAs (miR-1, miR-133a, and miR-206) in C2C12 Myocytes and mdx Mice. *PloS One* 11, e0167811.

- Maurício, A.F., de Carvalho, S.C., Santo Neto, H., and Marques, M.J. (2017). Effects of dietary omega-3 on dystrophic cardiac and diaphragm muscles as evaluated by ¹H magnetic resonance spectroscopy: Metabolic profile and calcium-related proteins. *Clin. Nutr. ESPEN* 20, 60–67.
- Mauro, A. (1961). SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493–495.
- Mayeuf, A., and Relaix, F. (2011). [Notch pathway: from development to regeneration of skeletal muscle]. *Med. Sci. MS* 27, 521–526.
- Mayeuf-Louchart, A., Thorel, Q., Delhaye, S., Beauchamp, J., Duhem, C., Danckaert, A., Lancel, S., Pourcet, B., Woldt, E., Boulinguez, A., et al. (2017a). Rev-erb- α regulates atrophy-related genes to control skeletal muscle mass. *Sci. Rep.* 7, 14383.
- Mayeuf-Louchart, A., Zecchin, M., Staels, B., and Duez, H. (2017b). Circadian control of metabolism and pathological consequences of clock perturbations. *Biochimie* 143, 42–50.
- Mayeuf-Louchart, A., Hardy, D., Thorel, Q., Roux, P., Gueniot, L., Briand, D., Mazeraud, A., Bouglé, A., Shorte, S.L., Staels, B., et al. (2018). MuscleJ: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool. *Skelet. Muscle* 8, 25.
- Mázala, D.A.G., Pratt, S.J.P., Chen, D., Molkentin, J.D., Lovering, R.M., and Chin, E.R. (2015). SERCA1 overexpression minimizes skeletal muscle damage in dystrophic mouse models. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308, C699-709.
- McDonald, A.A., Hebert, S.L., Kunz, M.D., Ralles, S.J., and McLoon, L.K. (2015). Disease course in mdx:utrophin \pm mice: comparison of three mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Physiol. Rep.* 3.
- McDonald, C.M., Carter, G.T., Abresch, R.T., Widman, L., Styne, D.M., Warden, N., and Kilmer, D.D. (2005). Body composition and water compartment measurements in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 84, 483–491.
- Mendes, C.C.P., Gomes, D.A., Thompson, M., Souto, N.C., Goes, T.S., Goes, A.M., Rodrigues, M.A., Gomez, M.V., Nathanson, M.H., and Leite, M.F. (2005). The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 40892–40900.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., and Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 417, 651–666.
- Moat, S.J., Bradley, D.M., Salmon, R., Clarke, A., and Hartley, L. (2013). Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 21, 1049–1053.
- Mollema, N.J., Yuan, Y., Jelcick, A.S., Sachs, A.J., von Alpen, D., Schorderet, D., Escher, P., and Haider, N.B. (2011). Nuclear Receptor Rev-erb Alpha (Nr1d1) Functions in Concert with Nr2e3 to Regulate Transcriptional Networks in the Retina. *PLoS ONE* 6.

- Mollereau, B. (2013). Establishing Links Between ER-Hormesis and Cancer. *Mol. Cell. Biol.* *MCB.00315-13*.
- Mollereau, B., Manié, S., and Napoletano, F. (2014). Getting the better of ER stress. *J. Cell Commun. Signal.* *8*, 311–321.
- Montaigne, D., Marechal, X., Modine, T., Coisne, A., Mouton, S., Fayad, G., Ninni, S., Klein, C., Ortmans, S., Seunes, C., et al. (2018). Daytime variation of perioperative myocardial injury in cardiac surgery and its prevention by Rev-Erb α antagonism: a single-centre propensity-matched cohort study and a randomised study. *Lancet Lond. Engl.* *391*, 59–69.
- Moorwood, C., and Barton, E.R. (2014). Caspase-12 ablation preserves muscle function in the mdx mouse. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 5325–5341.
- Morales, J.A., and Mahajan, K. (2018). Dystrophinopathies. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Morgan, J.E., and Partridge, T.A. (2003). Muscle satellite cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 1151–1156.
- Muoio, D.M., and Newgard, C.B. (2006). Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 367–401.
- Murphy, R.M., Larkins, N.T., Mollica, J.P., Beard, N.A., and Lamb, G.D. (2009). Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca²⁺ storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. *J. Physiol.* *587*, 443–460.
- Müssig, K., Fiedler, H., Staiger, H., Weigert, C., Lehmann, R., Schleicher, E.D., and Häring, H.-U. (2005). Insulin-induced stimulation of JNK and the PI 3-kinase/mTOR pathway leads to phosphorylation of serine 318 of IRS-1 in C2C12 myotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *335*, 819–825.
- Myhill, N., Lynes, E.M., Nanji, J.A., Blagoveshchenskaya, A.D., Fei, H., Carmine Simmen, K., Cooper, T.J., Thomas, G., and Simmen, T. (2008). The subcellular distribution of calnexin is mediated by PACS-2. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2777–2788.
- Nakagawa, M., Kobayashi, S., Kimura, I., and Kimura, M. (1989). Diabetic state-induced modification of Ca, Mg, Fe and Zn content of skeletal, cardiac and smooth muscles. *Endocrinol. Jpn.* *36*, 795–807.
- Nakanishi, K., Sudo, T., and Morishima, N. (2005). Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *J. Cell Biol.* *169*, 555–560.
- Nakanishi, K., Dohmae, N., and Morishima, N. (2007). Endoplasmic reticulum stress increases myofiber formation in vitro. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *21*, 2994–3003.
- Narula, J., Arbustini, E., Chandrashekar, Y., and Schwaiger, M. (2001). Apoptosis and the systolic dysfunction in congestive heart failure. Story of apoptosis interruptus and zombie myocytes. *Cardiol. Clin.* *19*, 113–126.

- Neagoe, C., Opitz, C.A., Makarenko, I., and Linke, W.A. (2003). Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *24*, 175–189.
- Nelson, B.R., Makarewich, C.A., Anderson, D.M., Winders, B.R., Troupes, C.D., Wu, F., Reese, A.L., McAnally, J.R., Chen, X., Kavalali, E.T., et al. (2016). A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science* *351*, 271–275.
- Ni, M., and Lee, A.S. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* *581*, 3641–3651.
- Nikonov, A.V., and Kreibich, G. (2003). Organization of translocon complexes in ER membranes. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 1253–1256.
- Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M., and Mori, K. (2002). Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* *366*, 585–594.
- Olguin, H.C., Yang, Z., Tapscott, S.J., and Olwin, B.B. (2007). Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol* *177*, 769–779.
- Ouyang, Z., Li, W., Meng, Q., Zhang, Q., Wang, X., Elgehama, A., Wu, X., Shen, Y., Sun, Y., Wu, X., et al. (2017). A natural compound jaceosidin ameliorates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance via upregulation of SERCA2b. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *89*, 1286–1296.
- Ozawa, K., Miyazaki, M., Matsuhisa, M., Takano, K., Nakatani, Y., Hatazaki, M., Tamatani, T., Yamagata, K., Miyagawa, J., Kitao, Y., et al. (2005). The Endoplasmic Reticulum Chaperone Improves Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. *Diabetes* *54*, 657–663.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* *306*, 457–461.
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Görgün, C.Z., and Hotamisligil, G.S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* *313*, 1137–1140.
- Panzhinskiy, E., Hua, Y., Culver, B., Ren, J., and Nair, S. (2013a). Endoplasmic reticulum stress upregulates protein tyrosine phosphatase 1B and impairs glucose uptake in cultured myotubes. *Diabetologia* *56*, 598–607.
- Panzhinskiy, E., Ren, J., and Nair, S. (2013b). Protein Tyrosine Phosphatase 1B and Insulin Resistance: Role of Endoplasmic Reticulum Stress/Reactive Oxygen Species/Nuclear Factor Kappa B Axis. *PLoS ONE* *8*.
- Paran, C.W., Zou, K., Ferrara, P.J., Song, H., Turk, J., and Funai, K. (2015). Lipogenesis mitigates dysregulated sarcoplasmic reticulum calcium uptake in muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* *1851*, 1530–1538.

- Park, S., Choi, J., Nam, T., Ku, J., and Jeong, K. (2016). Anti-diabetic effect of 3-hydroxy-2-naphthoic acid, an endoplasmic reticulum stress-reducing chemical chaperone. *Eur. J. Pharmacol.* *779*, 157–167.
- Patterson, R.L., Boehning, D., and Snyder, S.H. (2004). Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors as Signal Integrators. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 437–465.
- Paul, P.K., Bhatnagar, S., Mishra, V., Srivastava, S., Darnay, B.G., Choi, Y., and Kumar, A. (2012). The E3 Ubiquitin Ligase TRAF6 Intercedes in Starvation-Induced Skeletal Muscle Atrophy through Multiple Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 1248–1259.
- Pauly, M., Daussin, F., Burelle, Y., Li, T., Godin, R., Fauconnier, J., Koechlin-Ramonatxo, C., Hugon, G., Lacampagne, A., Coisy-Quivy, M., et al. (2012). AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. *Am. J. Pathol.* *181*, 583–592.
- Pauly, M., Angebault-Prouteau, C., Dridi, H., Notarnicola, C., Scheuermann, V., Lacampagne, A., Matecki, S., and Fauconnier, J. (2017). ER stress disturbs SR/ER-mitochondria Ca²⁺ transfer: Implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1863*, 2229–2239.
- Pertille, A., de Carvalho, C.L.T., Matsumura, C.Y., Neto, H.S., and Marques, M.J. (2010). Calcium-binding proteins in skeletal muscles of the mdx mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. *Int. J. Exp. Pathol.* *91*, 63–71.
- Petersen, M.C., and Shulman, G.I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* *98*, 2133–2223.
- Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 69–82.
- Pluquet, O., Pourtier, A., and Abbadie, C. (2015). The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *308*, C415-425.
- Porporato, P.E. (2016). Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis* *5*, e200.
- Pourcet, B., Zecchin, M., Ferri, L., Beauchamp, J., Sitaula, S., Billon, C., Delhay, S., Vanhoutte, J., Mayeuf-Louchart, A., Thorel, Q., et al. (2018). Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1 Regulates Circadian Activity of NLRP3 Inflammasome to Reduce the Severity of Fulminant Hepatitis in Mice. *Gastroenterology* *154*, 1449-1464.e20.
- Powell, D.J., Hajduch, E., Kular, G., and Hundal, H.S. (2003). Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKC ζ -dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7794–7808.
- Prado, C.M.M., Lieffers, J.R., McCargar, L.J., Reiman, T., Sawyer, M.B., Martin, L., and Baracos, V.E. (2008). Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *Lancet Oncol.* *9*, 629–635.

- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell* 110, 251–260.
- Qiu, R., and Lewis, R.S. (2019). Structural features of STIM and Orai underlying store-operated calcium entry. *Curr. Opin. Cell Biol.* 57, 90–98.
- Quinn, J.L., Huynh, T., Uaesoontrachoon, K., Tatem, K., Phadke, A., Van der Meulen, J.H., Yu, Q., and Nagaraju, K. (2013). Effects of Dantrolene Therapy on Disease Phenotype in Dystrophin Deficient mdx Mice. *PLoS Curr.* 5.
- Raciti, G.A., Iadicicco, C., Ulianich, L., Vind, B.F., Gaster, M., Andreozzi, F., Longo, M., Teperino, R., Ungaro, P., Di Jeso, B., et al. (2010). Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress affects GLUT4 expression via activating transcription factor 6 in rat and human skeletal muscle cells. *Diabetologia* 53, 955–965.
- Rácz, G., Szabó, A., Vér, A., and Zádor, E. (2009). The slow sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase declines independently of slow myosin in soleus muscle of diabetic rats. *Acta Biochim. Pol.* 56, 487–493.
- Raghuram, S., Stayrook, K.R., Huang, P., Rogers, P.M., Nosie, A.K., McClure, D.B., Burris, L.L., Khorasanizadeh, S., Burris, T.P., and Rastinejad, F. (2007). Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1207–1213.
- Ramakrishnan, S.N., Lau, P., Crowther, L.M., Cleasby, M.E., Millard, S., Leong, G.M., Cooney, G.J., and Muscat, G.E.O. (2009). Rev-erb beta regulates the Srebp-1c promoter and mRNA expression in skeletal muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 654–659.
- Rebbeck, R.T., Karunasekara, Y., Board, P.G., Beard, N.A., Casarotto, M.G., and Dulhunty, A.F. (2014). Skeletal muscle excitation-contraction coupling: who are the dancing partners? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 48, 28–38.
- Reinig, A.M., Mirzaei, S., and Berlau, D.J. (2017). Advances in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: New and Emerging Pharmacotherapies. *Pharmacotherapy* 37, 492–499.
- Relaix, F., and Marcelle, C. (2009). Muscle stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 748–753.
- Relaix, F., and Zammit, P.S. (2012). Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* 139, 2845–2856.
- Revollo, J.R., Grimm, A.A., and Imai, S. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 279, 50754–50763.
- Rieusset, J. (2018). The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: an update. *Cell Death Dis.* 9, 388.
- Rieusset, J., Chauvin, M.-A., Durand, A., Bravard, A., Laugerette, F., Michalski, M.-C., and Vidal, H. (2012). Reduction of endoplasmic reticulum stress using chemical chaperones or

Grp78 overexpression does not protect muscle cells from palmitate-induced insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 439–445.

Rieusset, J., Fauconnier, J., Paillard, M., Belaidi, E., Tubbs, E., Chauvin, M.-A., Durand, A., Bravard, A., Teixeira, G., Bartosch, B., et al. (2016). Disruption of calcium transfer from ER to mitochondria links alterations of mitochondria-associated ER membrane integrity to hepatic insulin resistance. *Diabetologia* 59, 614–623.

Rigamonti, E., Zordan, P., Sciorati, C., Rovere-Querini, P., and Brunelli, S. (2014). Macrophage Plasticity in Skeletal Muscle Repair.

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763–1766.

Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 434, 113–118.

Rodríguez-Cruz, M., Cruz-Guzmán, O.R., Escobar, R.E., and López-Alarcón, M. (2016). Leptin and metabolic syndrome in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Acta Neurol. Scand.* 133, 253–260.

Rutkowski, D.T., and Kaufman, R.J. (2007). That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem. Sci.* 32, 469–476.

Sacchetto, R., Bertipaglia, I., Giannetti, S., Cendron, L., Mascarello, F., Damiani, E., Carafoli, E., and Zanotti, G. (2012). Crystal structure of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) from bovine muscle. *J. Struct. Biol.* 178, 38–44.

Salminen, A., and Kaarniranta, K. (2010). ER stress and hormetic regulation of the aging process. *Ageing Res. Rev.* 9, 211–217.

Salvadó, L., Coll, T., Gómez-Foix, A.M., Salmerón, E., Barroso, E., Palomer, X., and Vázquez-Carrera, M. (2013). Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* 56, 1372–1382.

Salvadó, L., Barroso, E., Gómez-Foix, A.M., Palomer, X., Michalik, L., Wahli, W., and Vázquez-Carrera, M. (2014). PPAR β/δ prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* 57, 2126–2135.

Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* 126, 12–22.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101.

Saure, C., Caminiti, C., Weglinski, J., de Castro Perez, F., and Monges, S. (2018). Energy expenditure, body composition, and prevalence of metabolic disorders in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Diabetes Metab. Syndr.* 12, 81–85.

- Schaffer, J.E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr. Opin. Lipidol.* *14*, 281–287.
- Schertzer, J.D., van der Poel, C., Shavlakadze, T., Grounds, M.D., and Lynch, G.S. (2008). Muscle-specific overexpression of IGF-I improves E-C coupling in skeletal muscle fibers from dystrophic mdx mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *294*, C161-168.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* *91*, 1447–1531.
- Schmutz, I., Chavan, R., Ripperger, J.A., Maywood, E.S., Langwieser, N., Jurik, A., Stauffer, A., Delorme, J.E., Moosmang, S., Hastings, M.H., et al. (2014). A Specific Role for the REV-ERB α controlled L-type Voltage Gated Calcium Channel CaV1.2 in Resetting the Circadian Clock in the Late Night. *J. Biol. Rhythms* *29*, 288–298.
- Schneider, J.S., Shanmugam, M., Gonzalez, J.P., Lopez, H., Gordan, R., Fraidenraich, D., and Babu, G.J. (2013). Increased sarcolipin expression and decreased sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ uptake in skeletal muscles of mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *34*, 349–356.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* *102*, 777–786.
- Seebacher, F., Tallis, J., McShea, K., and James, R.S. (2017). Obesity-induced decreases in muscle performance are not reversed by weight loss. *Int. J. Obes.* *2005* *41*, 1271–1278.
- Shah, D.D., Singh, S.M., Dzieciatkowska, M., and Mallela, K.M.G. (2017). Biophysical analysis of the effect of chemical modification by 4-oxononanal on the structure, stability, and function of binding immunoglobulin protein (BiP). *PloS One* *12*, e0183975.
- Sheikh, F., Bang, M.-L., Lange, S., and Chen, J. (2007). “Z”eroing in on the Role of Cypher in Striated Muscle Function, Signaling, and Human Disease. *Trends Cardiovasc. Med.* *17*, 258–262.
- Shibata, Y., Voeltz, G.K., and Rapoport, T.A. (2006). Rough Sheets and Smooth Tubules. *Cell* *126*, 435–439.
- Shiraishi, H., Okamoto, H., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2006). ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J. Cell Sci.* *119*, 3958–3966.
- Shortreed, K.E., Krause, M.P., Huang, J.H., Dhanani, D., Moradi, J., Ceddia, R.B., and Hawke, T.J. (2009). Muscle-specific adaptations, impaired oxidative capacity and maintenance of contractile function characterize diet-induced obese mouse skeletal muscle. *PloS One* *4*, e7293.
- Shoshan-Barmatz, V., Krelin, Y., and Shteinfer-Kuzmine, A. (2018). VDAC1 functions in Ca²⁺ homeostasis and cell life and death in health and disease. *Cell Calcium* *69*, 81–100.
- Skalsky, A.J., Han, J.J., Abresch, R.T., Shin, C.S., and McDonald, C.M. (2009). Assessment of regional body composition with dual-energy X-ray absorptiometry in Duchenne muscular dystrophy: correlation of regional lean mass and quantitative strength. *Muscle Nerve* *39*, 647–651.

- Solt, L.A., Wang, Y., Banerjee, S., Hughes, T., Kojetin, D.J., Lundasen, T., Shin, Y., Liu, J., Cameron, M.D., Noel, R., et al. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* 485, 62–68.
- Spangenburg, E.E., and Booth, F.W. (2003). Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol. Scand.* 178, 413–424.
- Spencer, M.J., and Mellgren, R.L. (2002). Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2645–2655.
- Spencer, M.J., and Tidball, J.G. (1992). Calpain concentration is elevated although net calcium-dependent proteolysis is suppressed in dystrophin-deficient muscle. *Exp. Cell Res.* 203, 107–114.
- Spencer, M.J., and Tidball, J.G. (1996). Calpain translocation during muscle fiber necrosis and regeneration in dystrophin-deficient mice. *Exp. Cell Res.* 226, 264–272.
- Spencer, M.J., Croall, D.E., and Tidball, J.G. (1995). Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J. Biol. Chem.* 270, 10909–10914.
- Sugiyama, T., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. (2002). Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene* 21, 4944–4956.
- Sulli, G., Rommel, A., Wang, X., Kolar, M.J., Puca, F., Saghatelian, A., Plikus, M.V., Verma, I.M., and Panda, S. (2018). Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence. *Nature* 553, 351–355.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J. Cell Biol.* 175, 901–911.
- Szegezdi, E., Fitzgerald, U., and Samali, A. (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010, 186–194.
- Taira, Y., Ganguly, P.K., Panagia, V., and Dhalla, N.S. (1988). Increased SR phospholipid N-methylation in skeletal muscle of diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 255, E347-352.
- Taira, Y., Hata, T., Ganguly, P.K., Elimban, V., and Dhalla, N.S. (1991). Increased sarcolemmal Ca²⁺ transport activity in skeletal muscle of diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 260, E626-632.
- Tallis, J., Hill, C., James, R.S., Cox, V.M., and Seebacher, F. (2017). The effect of obesity on the contractile performance of isolated mouse soleus, EDL, and diaphragm muscles. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 122, 170–181.
- Tallis, J., James, R.S., and Seebacher, F. (2018). The effects of obesity on skeletal muscle contractile function. *J. Exp. Biol.* 221.
- Tanihata, J., Nagata, T., Ito, N., Saito, T., Nakamura, A., Minamisawa, S., Aoki, Y., Ruegg, U.T., and Takeda, S. (2018). Truncated dystrophin ameliorates the dystrophic phenotype of

mdx mice by reducing sarcolipin-mediated SERCA inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *505*, 51–59.

Tardif, N., Salles, J., Guillet, C., Tordjman, J., Reggio, S., Landrier, J.-F., Giraudet, C., Patrac, V., Bertrand-Michel, J., Migne, C., et al. (2014). Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 α activation. *Aging Cell* *13*, 1001–1011.

Taylor, C.W., and Tovey, S.C. (2010). IP(3) receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a004010.

Taylor, C.W., da Fonseca, P.C.A., and Morris, E.P. (2004). IP(3) receptors: the search for structure. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 210–219.

Teasdale, N., Simoneau, M., Corbeil, P., Handrigan, G., Tremblay, A., and Hue, O. (2013). Obesity Alters Balance and Movement Control. *Curr. Obes. Rep.* *2*, 235–240.

Terasaki, M., Chen, L.B., and Fujiwara, K. (1986). Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J. Cell Biol.* *103*, 1557–1568.

Theurey, P., and Rieusset, J. (2017). Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM* *28*, 32–45.

Theurey, P., Tubbs, E., Vial, G., Jacquemetton, J., Bendridi, N., Chauvin, M.-A., Alam, M.R., Le Romancer, M., Vidal, H., and Rieusset, J. (2016). Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver. *J. Mol. Cell Biol.* *8*, 129–143.

Thiebaud, D., Jacot, E., DeFronzo, R.A., Maeder, E., Jequier, E., and Felber, J.P. (1982). The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man. *Diabetes* *31*, 957–963.

Thomas, M.M., Trajcevski, K.E., Coleman, S.K., Jiang, M., Di Michele, J., O'Neill, H.M., Lally, J.S., Steinberg, G.R., and Hawke, T.J. (2014). Early oxidative shifts in mouse skeletal muscle morphology with high - fat diet consumption do not lead to functional improvements. *Physiol. Rep.* *2*.

Thrush, A.B., Harasim, E., Chabowski, A., Gulli, R., Stefanyk, L., and Dyck, D.J. (2011). A single prior bout of exercise protects against palmitate-induced insulin resistance despite an increase in total ceramide content. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *300*, R1200–1208.

Tjondrokoesoemo, A., Li, N., Lin, P.-H., Pan, Z., Ferrante, C.J., Shirokova, N., Brotto, M., Weisleder, N., and Ma, J. (2013). Type 1 Inositol (1,4,5)-Trisphosphate Receptor Activates Ryanodine Receptor 1 to Mediate Calcium Spark Signaling in Adult Mammalian Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* *288*, 2103–2109.

Trump, R.P., Bresciani, S., Cooper, A.W.J., Tellam, J.P., Wojno, J., Blaikley, J., Orband-Miller, L.A., Kashatus, J.A., Boudjelal, M., Dawson, H.C., et al. (2013). Optimized chemical probes for REV-ERB α . *J. Med. Chem.* *56*, 4729–4737.

Tubbs, E., and Rieusset, J. (2016). Study of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Interactions by In Situ Proximity Ligation Assay in Fixed Cells. *J. Vis. Exp. JoVE*.

Tubbs, E., Theurey, P., Vial, G., Bendridi, N., Bravard, A., Chauvin, M.-A., Ji-Cao, J., Zoulim, F., Bartosch, B., Ovize, M., et al. (2014). Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes* *63*, 3279–3294.

Tubbs, E., Chanon, S., Robert, M., Bendridi, N., Bidaux, G., Chauvin, M.-A., Ji-Cao, J., Durand, C., Gauvrit-Ramette, D., Vidal, H., et al. (2018). Disruption of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Integrity Contributes to Muscle Insulin Resistance in Mice and Humans. *Diabetes* *67*, 636–650.

Tupling, A.R., Gramolini, A.O., Duhamel, T.A., Kondo, H., Asahi, M., Tsuchiya, S.C., Borrelli, M.J., Lepock, J.R., Otsu, K., Hori, M., et al. (2004). HSP70 binds to the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a) and prevents thermal inactivation. *J. Biol. Chem.* *279*, 52382–52389.

Turpin, S.M., Lancaster, G.I., Darby, I., Febbraio, M.A., and Watt, M.J. (2006). Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *291*, E1341-1350.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* *287*, 664–666.

Ussher, J.R., Koves, T.R., Cadete, V.J.J., Zhang, L., Jaswal, J.S., Swyrd, S.J., Lopaschuk, D.G., Proctor, S.D., Keung, W., Muoio, D.M., et al. (2010). Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* *59*, 2453–2464.

Valladares, D., Almarza, G., Contreras, A., Pavez, M., Buvinic, S., Jaimovich, E., and Casas, M. (2013). Electrical stimuli are anti-apoptotic in skeletal muscle via extracellular ATP. Alteration of this signal in Mdx mice is a likely cause of dystrophy. *PLoS One* *8*, e75340.

Valladares, D., Utreras-Mendoza, Y., Campos, C., Morales, C., Diaz-Vegas, A., Contreras-Ferrat, A., Westermeier, F., Jaimovich, E., Marchi, S., Pinton, P., et al. (2018). IP3 receptor blockade restores autophagy and mitochondrial function in skeletal muscle fibers of dystrophic mice. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* *1864*, 3685–3695.

Vallejo-Illarramendi, A., Toral-Ojeda, I., Aldanondo, G., and López de Munain, A. (2014). Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Rev. Mol. Med.* *16*, e16.

Vannuvel, K., Renard, P., Raes, M., and Arnould, T. (2013). Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *J. Cell. Physiol.* *228*, 1802–1818.

Varma, V., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Nolen, G.T., Phanavanh, B., Starks, T., Gurley, C., Simpson, P., McGehee, R.E., Kern, P.A., et al. (2009). Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *296*, E1300-1310.

- Vieira, E., Marroquí, L., Figueroa, A.L.C., Merino, B., Fernandez-Ruiz, R., Nadal, A., Burris, T.P., Gomis, R., and Quesada, I. (2013). Involvement of the Clock Gene Rev-erb alpha in the Regulation of Glucagon Secretion in Pancreatic Alpha-Cells. *PLoS ONE* 8.
- Vitaterna, M.H., Takahashi, J.S., and Turek, F.W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* 25, 85–93.
- Voit, A., Patel, V., Pachon, R., Shah, V., Bakhutma, M., Kohlbrenner, E., McArdle, J.J., Dell'Italia, L.J., Mendell, J.R., Xie, L.-H., et al. (2017). Reducing sarcolipin expression mitigates Duchenne muscular dystrophy and associated cardiomyopathy in mice. *Nat. Commun.* 8, 1068.
- Wang, M., and Kaufman, R.J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529, 326–335.
- Wang, S.-H., Lee, A.C.-L., Chen, I.-J., Chang, N.-C., Wu, H.-C., Yu, H.-M., Chang, Y.-J., Lee, T.-W., Yu, J.-C., Yu, A.L., et al. (2016). Structure-based optimization of GRP78-binding peptides that enhances efficacy in cancer imaging and therapy. *Biomaterials* 94, 31–44.
- Wang, X., Weisleder, N., Collet, C., Zhou, J., Chu, Y., Hirata, Y., Zhao, X., Pan, Z., Brotto, M., Cheng, H., et al. (2005). Uncontrolled calcium sparks act as a dystrophic signal for mammalian skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 7, 525–530.
- Warmington, S.A., Tolan, R., and McBennett, S. (2000). Functional and histological characteristics of skeletal muscle and the effects of leptin in the genetically obese (*ob/ob*) mouse. *Int. J. Obes.* 24, 1040–1050.
- Waterman-Storer, C.M., and Salmon, E.D. (1998). Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr. Biol. CB* 8, 798–806.
- Watson, H. (2015). Biological membranes. *Essays Biochem.* 59, 43–69.
- Welch, R.D., and Flaveny, C.A. (2017). REV-ERB and ROR: therapeutic targets for treating myopathies. *Phys. Biol.* 14, 045002.
- Welch, R.D., Guo, C., Sengupta, M., Carpenter, K.J., Stephens, N.A., Arnett, S.A., Meyers, M.J., Sparks, L.M., Smith, S.R., Zhang, J., et al. (2017a). Rev-Erb co-regulates muscle regeneration via tethered interaction with the NF-Y cistrome. *Mol. Metab.* 6, 703–714.
- Welch, R.D., Billon, C., Valfort, A.-C., Burris, T.P., and Flaveny, C.A. (2017b). Pharmacological inhibition of REV-ERB stimulates differentiation, inhibits turnover and reduces fibrosis in dystrophic muscle. *Sci. Rep.* 7, 17142.
- Welch, R.D., Billon, C., Valfort, A.-C., Burris, T.P., and Flaveny, C.A. (2017c). Pharmacological inhibition of REV-ERB stimulates differentiation, inhibits turnover and reduces fibrosis in dystrophic muscle. *Sci. Rep.* 7.
- Weston, R.T., and Puthalakath, H. (2010). Endoplasmic reticulum stress and BCL-2 family members. *Adv. Exp. Med. Biol.* 687, 65–77.

- Wieckowski, M.R., Giorgi, C., Lebiezinska, M., Duszynski, J., and Pinton, P. (2009). Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat. Protoc.* *4*, 1582–1590.
- Willig, T.N., Carlier, L., Legrand, M., Rivière, H., and Navarro, J. (1993). Nutritional assessment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev. Med. Child Neurol.* *35*, 1074–1082.
- Wisniewska, M., Karlberg, T., Lehtiö, L., Johansson, I., Kotenyova, T., Moche, M., and Schüler, H. (2010). Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS One* *5*, e8625.
- Woldt, E., Sebti, Y., Solt, L.A., Duhem, C., Lancel, S., Eeckhoutte, J., Hesselink, M.K.C., Paquet, C., Delhay, S., Shin, Y., et al. (2013). Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat. Med.* *19*, 1039–1046.
- Woods, C.E., Novo, D., DiFranco, M., Capote, J., and Vergara, J.L. (2005). Propagation in the transverse tubular system and voltage dependence of calcium release in normal and mdx mouse muscle fibres. *J. Physiol.* *568*, 867–880.
- Worthley, E.G., and Schott, C.D. (1969). The toxicity of four concentrations of DMSO. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *15*, 275–281.
- Wu, J., and Kaufman, R.J. (2006). From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ.* *13*, 374–384.
- Wu, J., Ruas, J.L., Estall, J.L., Rasbach, K.A., Choi, J.H., Ye, L., Boström, P., Tyra, H.M., Crawford, R.W., Campbell, K.P., et al. (2011). The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1 α /ATF6 α complex. *Cell Metab.* *13*, 160–169.
- Wu, X., Cabanos, C., and Rapoport, T.A. (2018). Structure of the post-translational protein translocation machinery of the ER membrane. *Nature*.
- Xiong, G., Hindi, S.M., Mann, A.K., Gallot, Y.S., Bohnert, K.R., Cavener, D.R., Whittemore, S.R., and Kumar, A. (2017). The PERK arm of the unfolded protein response regulates satellite cell-mediated skeletal muscle regeneration. *ELife* *6*.
- Yamagata, H., Shimizu, S., Nishida, Y., Watanabe, Y., Craigen, W.J., and Tsujimoto, Y. (2009). Requirement of voltage-dependent anion channel 2 for pro-apoptotic activity of Bax. *Oncogene* *28*, 3563–3572.
- Yang, G., Jia, Z., Aoyagi, T., McClain, D., Mortensen, R.M., and Yang, T. (2012). Systemic PPAR γ Deletion Impairs Circadian Rhythms of Behavior and Metabolism. *PLOS ONE* *7*, e38117.
- Yang, X., Downes, M., Yu, R.T., Bookout, A.L., He, W., Straume, M., Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (2006). Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell* *126*, 801–810.

- Yang, Z., Tsuchiya, H., Zhang, Y., Lee, S., Liu, C., Huang, Y., Vargas, G.M., and Wang, L. (2016). REV-ERB α Activates C/EBP Homologous Protein to Control Small Heterodimer Partner-Mediated Oscillation of Alcoholic Fatty Liver. *Am. J. Pathol.* *186*, 2909–2920.
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F.R., Butler, A.E., and Sahebkar, A. (2018). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J. Cell. Physiol.*
- Ye, R., Jung, D.Y., Jun, J.Y., Li, J., Luo, S., Ko, H.J., Kim, J.K., and Lee, A.S. (2010). Grp78 heterozygosity promotes adaptive unfolded protein response and attenuates diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* *59*, 6–16.
- Yin, L., and Lazar, M.A. (2005). The orphan nuclear receptor Rev-erb α recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian Bmal1 gene. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *19*, 1452–1459.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* *93*, 23–67.
- Yoon, E.-K., Jeong, Y.-T., Li, X., Song-Cui, null, Park, D.-C., Kim, Y.-H., Kim, Y.D., Chang, H.W., Lee, S.-H., and Hwang, S.-L. (2013). Glyceollin improves endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance through CaMKK-AMPK pathway in L6 myotubes. *J. Nutr. Biochem.* *24*, 1053–1061.
- Yotsukura, M., Sasaki, K., Kachi, E., Sasaki, A., Ishihara, T., and Ishikawa, K. (1995). Circadian rhythm and variability of heart rate in Duchenne-type progressive muscular dystrophy. *Am. J. Cardiol.* *76*, 947–951.
- Yuzefovych, L.V., Solodushko, V.A., Wilson, G.L., and Rachek, L.I. (2012). Protection from palmitate-induced mitochondrial DNA damage prevents from mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and impaired insulin signaling in rat L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology* *153*, 92–100.
- Yuzefovych, L.V., Musiyenko, S.I., Wilson, G.L., and Rachek, L.I. (2013a). Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction, and Oxidative Stress Are Associated with Endoplasmic Reticulum Stress, Protein Degradation and Apoptosis in High Fat Diet-Induced Insulin Resistance Mice. *PLoS ONE* *8*.
- Yuzefovych, L.V., LeDoux, S.P., Wilson, G.L., and Rachek, L.I. (2013b). Mitochondrial DNA Damage via Augmented Oxidative Stress Regulates Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy: Crosstalk, Links and Signaling. *PLoS ONE* *8*, e83349.
- Zalk, R., Israelson, A., Garty, E.S., Azoulay-Zohar, H., and Shoshan-Barmatz, V. (2005). Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* *386*, 73–83.
- Zatz, M., Rapaport, D., Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Bortolini, E.R., Pavanello, R. de C., and Peres, C.A. (1991). Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* *102*, 190–196.
- Zemel, M.B., Sowers, J.R., Shehin, S., Walsh, M.F., and Levy, J. (1990). Impaired calcium metabolism associated with hypertension in Zucker obese rats. *Metabolism.* *39*, 704–708.

Zhang, H., Ryu, D., Wu, Y., Gariani, K., Wang, X., Luan, P., D'Amico, D., Ropelle, E.R., Lutolf, M.P., Aebersold, R., et al. (2016). NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science* 352, 1436–1443.

Zhang, Y., Fang, B., Emmett, M.J., Damle, M., Sun, Z., Feng, D., Armour, S.M., Remsberg, J.R., Jager, J., Soccio, R.E., et al. (2015). Discrete Functions of Nuclear Receptor Rev-erb α Couple Metabolism to the Clock. *Science* 348, 1488–1492.

Zhu, H., Bhattacharyya, B., Lin, H., and Gomez, C.M. (2011). Skeletal Muscle IP3R1 Receptors Amplify Physiological and Pathological Synaptic Calcium Signals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 15269–15283.

Zismanov, V., Chichkov, V., Colangelo, V., Jamet, S., Wang, S., Syme, A., Koromilas, A.E., and Crist, C. (2016). Phosphorylation of eIF2 α Is a Translational Control Mechanism Regulating Muscle Stem Cell Quiescence and Self-Renewal. *Cell Stem Cell* 18, 79–90.