

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE (446)

THESE

Présentée par

Samir BENSAID

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

SPECIALITE : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE - STAPS

**Mise en place de contre-mesures pour limiter la
perte protéique de cellules musculaires
squelettiques consécutive à l'hypoxie cellulaire.**

Soutenue le 24 septembre 2019 devant le jury composé de :

Mme Esther BARREIRO , Professeur, Université de Barcelone	Rapporteur
M Pascal POMIES , Chargé de recherche, Université de Montpellier	Rapporteur
M Hervé DUBOUCHAUD , Maitre de Conférences, Université de Grenoble	Examineur
M Frédéric Costes , Professeur, Université de Clermont-Ferrand	Président du jury
Mme Caroline Cieniewski-Bernard , Maitre de Conférences, Université de Lille	Co-directrice
Mme Claudine FABRE , Professeur, Université de Lille	Directrice de Thèse

Travail réalisé au sein de l'EA-7369 de l'Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société.

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir pris le temps d'examiner mon manuscrit et juger mon travail. **Dr Esther Barreiro** et **Dr Pascal Pomiès**, qui ont accepté d'être rapporteur de ce travail, qui depuis le début de cette aventure se sont intéressés à mes résultats et qui m'ont apporté leur point de vue extérieur qui m'a permis de mieux me situer dans mon projet de recherche. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance aux **Pr Costes Frédéric** et **Dr Hervé Dubouchaud** pour avoir accepté de prendre connaissance de mon travail et de le juger en tant qu'examineurs. Pour la plupart vous venez des quatre coins de la France et même d'Espagne, je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à mon travail et d'être présent à ma soutenance. Merci à tous.

J'adresse mes très sincères remerciements à ma directrice de thèse, le **Pr Claudine Fabre**. Je te suis reconnaissant pour tout le temps que tu as su m'accorder, ta franchise et ta sympathie pour moi. Même si ces quatre années n'ont pas toujours été simples, je te suis tellement reconnaissante de ne jamais m'avoir lâchée et de m'avoir toujours fait confiance même dans les moments les plus sombres de cette thèse. Merci d'avoir toujours eu confiance en mes compétences, d'avoir toujours écouté mes suggestions et de m'avoir formé au difficile métier de chercheur. Un grand merci.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma co-directrice de thèse, le **Dr Caroline Cieniewski-Bernard**, pour m'avoir co-encadré, formé et supporté tout au long de ces années. Tu as su me transmettre tes connaissances scientifiques et techniques. Tu m'as appris à être rigoureux et méthodique et c'est grâce à ton aide précieuse et tes remarques pertinentes que j'ai pu mener à bien ce travail de thèse. Merci de m'avoir donné le goût de la biologie moléculaire, grâce à toi la culture de cellules musculaires de type C2C12 n'a plus de secret pour moi. Nos rapports ont dépassé le cadre du laboratoire et je me réjouis des contacts humains que j'ai pu entretenir avec toi et ta famille, merci pour ces succulents repas de noëls (avec la note de 10/10 selon les critères d'un dîner presque parfait) et les cookies dans les moments d'écriture. Merci de ne m'avoir jamais laissé tomber malgré les situations difficiles que j'ai vécues. Je me considère chanceux de t'avoir eu à mes côtés lors de cette aventure.

Une très forte pensée au **Pr Serge Berthoin**. Serge, ma thèse ne serait probablement ce qu'elle ait si tu n'avais pas été là. Tu m'as toujours soutenue dès le moment où j'ai mis les pieds dans l'équipe de recherche. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée et pour être toujours rendu disponible lorsque j'ai eu besoin de conseils, qu'ils soient personnels ou professionnels. J'ai toujours apprécié nos discussions tard à Euraspport. Comme un mentor pour moi, tu as souvent été protecteur, parfois autoritaire (surtout quand je dépassais les horaires de fermeture du bâtiment ou faisait sonner l'alarme, oups), mais toujours bienveillant à mon égard. J'espère que tu seras fier du travail que j'ai accompli jusqu'ici.

Je remercie le **Pr Patrick Mucci** de m'avoir suivi tout au long de mon doctorat en tant que membre de mon comité de thèse. Nos discussions ont toujours été très enrichissantes et m'ont apporté un autre regard et de belles perspectives sur mes résultats. Merci à vous.

À ma gestionnaire administrative et financière de choc, **Justine Gamain**, je ne trouverai jamais les mots justes pour te remercier de tout ce que tu as fait pour moi. Comme une grande sœur, dès mon arrivée tu m'as prise sous ton aile, tu as toujours été disponible et de bons conseils avec moi, autant dans le cadre professionnel que personnel, je te remercie infiniment de ton aide si précieuse.

Je tiens à adresser un grand merci au **Dr Elsa Heyman**, je te suis reconnaissant du temps que tu as su m'accorder, je te remercie pour m'avoir fait bénéficier de ton savoir et ton expérience dans la recherche et dans la vie. J'ai énormément appris à tes côtés, surtout lors de nos séances de courses à pied. Ta compagnie et ta bonne humeur ont toujours été pour moi une source de bien-être. Ton soutien moral et tes qualités humaines m'ont énormément aidé dans ma vie professionnelle et personnelle, je t'en suis éternellement reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour moi. Plus qu'un collègue de travail, tu es pour moi une véritable amie et un exemple de réussite.

Au très chers **Dr Valérie Bougault, Dr Frédéric Daussin, Dr Julien Boissière, Dr François-Xavier Gamelin, Dr Georges Baquet** et **Dr Julien Aucouturier** qui ont largement contribué à ma formation au métier de chercheur. Je vous suis reconnaissant pour toutes l'aides, vos conseils scientifiques et votre estime que vous avez porté à mon travail. Un grand merci pour la confiance que vous m'avez accordée lors de mes enseignements.

Je tiens également à remercier le **Pr Bruno Bastide, Pr Marie-Hélène Canu, Pr Laurence Stevens** et le **Dr Erwan Dupont** pour m'avoir supporté pendant mon année de Master et ma première année de thèse, merci pour votre accueil, de votre bonne humeur.

Je remercie également l'équipe technique, **Valérie, Laetitia** et **Julie** d'avoir contribué de loin comme de près à l'aboutissement de ce travail dans une super ambiance. Un grand merci à **Annie** pour votre bonne humeur et votre inestimable aide dans la vie du laboratoire.

Un grand merci à la team du RDC, **Emilie, Virginie, Sylvain** et **Julien** pour votre disponibilité et gentillesse lors de mes questions sur l'administratif. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler et à partager des moments agréables avec vous. Sans oublier **Louis** pour tes anecdotes et blagues dont toi seul a le secret, c'est quand tu veux pour notre revanche au 21 !

Merci à **Fushia** et **Sarah** pour leurs rapidités et efficacités dans la gestion des emplois du temps. Un grand merci pour votre compréhension sur l'aménagement de mes heures d'enseignement.

Je remercie la **Région Hauts-de-France** pour avoir financé cette thèse en m'accordant une allocation d'excellence de recherche. Un merci tout particulier à **Mr François Delcroix** coordonnateur de l'école doctorale biologie santé de Lille, pour sa réactivité légendaire, son écoute et sa façon très calme de trouver une solution quel que soit le problème. Je vous dois beaucoup pour avoir réussi à résoudre nombreux de mes problèmes administratifs.

Un grand merci à mes compagnons de route les néo maîtres de conférences, docteurs, étudiants thésards bientôt docteurs et les nombreux étudiants stagiaires pour leur aide directe ou indirecte sur mes projets et pour avoir participé à l'agréable ambiance régnant dans le laboratoire, je vous souhaite beaucoup de réussite.

Je suis extrêmement reconnaissant aux doctorants qui m'ont précédé dans le laboratoire. **Semah**, mon super partenaire de sport et de douche, plus qu'un ami, je te remercie pour tous tes conseils fraternels,

pour ces longues discussions professionnelles et personnelles. **Matthias**, ton aide technique et théorique en biologie moléculaire ont été très précieuses dans la réussite de mes différents projets. Un grand merci pour le temps consacré à répondre à mes questions. J'espère que mon implication dans l'amélioration de tes performances physiques a permis de rembourser une partie de ma dette que j'ai envers toi. **Julien**, je te remercie d'avoir été présents au cours de mon Master et m'avoir donné tant de bon conseil. **Baptiste**, merci pour ton humour décalé qui participe grandement à la bonne ambiance de notre équipe. Je ne sais pas si je dois te remercier pour les nombreux surnoms que tu as eu en mon égard, Rolo le viking, Tahar Rahim, Edinson Cavani, Romain Duris, John Snow... j'en ai oublié c'est sûr. **Mehdi**, je te remercie pour ton implication dans mes différentes études, tes nombreux conseils statistiques, tu es notre référence « R », nos longues discussions ensemble me manqueront. **Agathe**, ma petite princesse, ma fidèle amie de la salle d'haltérophilie, je n'oublierai jamais ces moments passés avec toi à nous entraîner à soulever des barres toujours de plus en plus lourdes, c'était notre soupape de décompression du vendredi soir. Nous nous sommes encouragés mutuellement tout au long de notre thèse et je t'en remercie. **Charlotte**, ma petite agente secrète anglo-néerlandaise, l'incroyable rencontre avec mon contraire, sportive, sobre et relaxe comme moi. Notre humour, nos goûts musicaux (Vive Radio Nostalgie) et les hamburgers aux maroilles, on fait que nous nous sommes très vite bien entendu, avec des fous rire mémorable. Je te remercie pour ton aide si précieuse en salle de culture et ta bonne humeur au quotidien. **Élodie**, la tornade de l'équipe, tu m'as toujours impressionné par ton dynamisme et ton sens du management. Je te remercie pour tout tes petits cadeaux, ta compagnie et ta bonne humeur tout le temps que l'on a passé ensemble. **Sarah**, ma petite québécoise impertinente, merci pour t'avoir toujours rendu disponible pour moi, de m'avoir encouragé et soutenu dans les moments difficiles. **Clément**, mon frère « mon rhouia », je me souviendrai toujours de nos sessions nocturnes au laboratoire et à la bibliothèque que nous avons passé ensemble. Je te remercie pour tous les rires que l'on a eu dans les bons moments ton soutien dans les mauvais moments.

Au cours de ces quelques années passées au laboratoire, j'ai eu la chance de travailler et côtoyer des personnes qui sont devenues bien plus que de simples collègues.

Adrien, merci pour ta disponibilité et ton aide précieuse depuis mon arrivée. Je te remercie pour ton aide sur mes différents projets de recherche, de m'avoir accompagné lors de mes premiers pas dans un laboratoire. Merci pour ton soutien scientifique, ton aide technique, tes conseils, nos échanges de jour comme de nuit, nos pauses café à parler mécanique et nos soirées à faire du longboard ou réparer des motos. Merci partenaire.

Julie, je tiens à te remercier de tout cœur, celle qui a souffert autant que moi pendant cette thèse mais qui m'a pourtant toujours encouragé à aller jusqu'au bout de mes ambitions. Tu m'as tellement appris à la paillasse, tu as toujours été patiente envers moi, à l'écoute de mes moindres problèmes. Tu m'as accompagné dans tous les remous de cette thèse. Ton support, ta présence, tes idées et tes conseils ont été précieux pour moi à travers les hauts et les bas de la recherche, mais aussi dans la vie. Au cours de ces années s'est forgée bien plus qu'une relation de travail qui perdurera dans le temps. Merci mon petit chocolat à moi.

Je tiens à remercier tous mes amis **Victor, Gary et Héléne** mes amies de promo, merci pour tous les bons moments que l'on a passés ensemble et désolé pour le silence radio pendant de longue semaine, promis je ne recommencerai plus. Mes anciens collègues surveillants du collège Anatole France, **Émilie et Kévin** qui sont devenus avec le temps bien plus que des amis. **Robin, Jordan, Corentin et Romain** mes partenaires de souffrance à la salle de sport, merci pour tous les moments partagés ensemble qui ont été sources d'excellents souvenirs, indispensables bulles d'oxygène à ma survie au cours de cette thèse. Enfin je remercie tous mes frères de mon quartiers, **Redouane, Rachid, Totti, Pitch, Sofiane, Gaboune, Mousto, Abdel Nacer, Said, Najib, Mourad, Abderrahim, Fouad, Farouk,**

Raba... j'en ai oublié pardonner moi, merci pour tous les fous rires et les bons moments que l'on a passé ensemble.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et surtout à ma **maman**, sa confiance, sa tendresse, son amour me portent et me guident tous les jours. Elle a toujours été présente et m'a toujours soutenue dans les bons et les mauvais moments et cela quelques soient les choix que j'ai faits. Merci Yémma.

Résumé

L'exposition à une diminution du taux d'oxygène provoque d'importantes altérations musculaires, notamment une perte de masse résultant d'une perturbation des voies de signalisation régissant l'homéostasie protéique. Plus l'exposition est prolongée et la baisse du taux d'oxygène importantes, plus les répercussions cataboliques sont considérables, entraînant *in vivo* une atrophie musculaire sévère allant jusqu'à la cachexie. Même si les processus métaboliques de la cellule musculaire sous hypoxie sont aujourd'hui assez bien caractérisés, il n'existe pas de traitement ou contre-mesure(s) efficace(s) permettant de réverser l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie. De nouvelles investigations doivent donc être menées afin de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de restaurer l'homéostasie protéique en condition d'hypoxie.

L'objectif principal de cette thèse était d'établir, dans un modèle de cellules musculaires de type C2C12 différenciées en myotubes, l'impact de différentes contre-mesures à l'atrophie musculaire sur les voies de signalisation intracellulaires régulant l'homéostasie protéique mais aussi la morphologie des cellules. Il existe cependant différents modes d'induction de l'hypoxie cellulaire ; nous avons dans une première étude mis en évidence les divergences et/ou les points communs entre différents modes d'induction de l'hypoxie (physiologique *versus* chimique) couramment utilisés pour induire l'hypoxie dans des cellules en culture. Nos données ont montré que le chlorure de cobalt semble être, au contraire de la desferrioxamine, une méthode de référence chimique d'induction de l'hypoxie cellulaire pouvant suppléer une hypoxie physiologique à 4%.

Le manque d'oxygène étant le point initial à l'origine de la perte de masse musculaire, nous avons émis l'hypothèse qu'une période de réoxygénation pourrait être une contre-mesure efficace à l'atrophie musculaire consécutive à un stress hypoxique, cette période pouvant engendrer temporairement un rééquilibre de l'homéostasie protéique. Nous avons donc, dans une seconde étude, comparé la réoxygénation musculaire avec des contre-mesures usuelles à l'atrophie musculaire. L'analyse et la comparaison des contre-mesures à l'atrophie telles que la stimulation mécanique, la supplémentation en acides aminés branchés ou la réoxygénation cellulaire, nous a permis de démontrer qu'une période de réoxygénation des myotubes C2C12 sous hypoxie conduisait à la réactivation de l'une des voies principales de la protéosynthèse, la voie Akt-mTOR, par l'hyperphosphorylation des protéines clés telles que Akt, GSK-3 β , et tout particulièrement 4E-BP1 et P70S6K. De plus, le traitement par supplémentation en oxygène a eu pour effet de conserver un taux de maturité et un degré de différenciation des myotubes comparable au traitement par stimulation électrique des myotubes.

Enfin, nous avons supposé que la combinaison de la stimulation mécanique, associée à un apport en acides aminés branchés et une réoxygénation post-stimulation, permettrait de favoriser / potentialiser les réponses anaboliques. Les résultats obtenus dans le cadre de la troisième étude ont montré un impact plus important des traitements combinant la stimulation électrique avec une supplémentation en BCAAs et/ou une période de réoxygénation sur certaines protéines clés de l'homéostasie protéique et sur les paramètres morphologiques, et ce en comparaison avec des cellules traitées uniquement par stimulation électrique. De plus, seule l'intervention associant les trois contre-mesures à l'atrophie a réussi, sur le plan moléculaire, à conduire à une suractivation de la protéine mTOR, essentielle à la protéosynthèse.

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence les caractéristiques anabolisantes d'un traitement par réoxygénation sur des cellules musculaires squelettiques sous hypoxie, mais aussi et surtout l'impact bénéfique d'un traitement alliant plusieurs contre-mesures à l'atrophie musculaire. Les données issues de ce travail de thèse permettront à plus long terme de faire émerger de nouvelles stratégies thérapeutiques destinées à limiter, voire réverser l'atrophie musculaire induite par l'hypoxie.

Abréviations

AA : acide aminé
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
Akt : protéine kinase B
AMP : adénosine mono-phosphate
AMPK : AMP-activated protein kinase
ARN : acide ribonucléique messenger
Atg : autophagy-related gene
ATP : adénosine triphosphate
Atrogin-1 : atrophy gene-1
BCAA : acide aminé à chaîne branché
BNIP3 : BCL2 interacting protein 3
BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive
C : contrôle
Ca²⁺ : calcium
CoCl₂ : chlorure de cobalt
DFO : desferrioxamine
DMEM : dulbecco's modified eagle medium
eEF2 : eukaryotic elongation factor 2
eIF : eukaryotic Initiation Factor
eIF4E : eukaryotic Initiation Factor 4E
eIF4G : eukaryotic Initiation Factor 4G
eIF4F : eukaryotic Initiation Factor 4F
ERK : extracellular signal-regulated kinases
FoxO : Forkhead box protein O
GDF-8 : growth differentiation factor 8
GDP-Rheb : guanosine diphosphate-Rheb
GSK-3 : glycogen synthase kinase 3
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HIF-1 : hypoxia-inducible factor-1
HRE : hypoxia responsive element
IGF-1 : insulin-like growth factor
LC3 : microtubule associated protein light chain 3
MAFbx : muscle atrophy f-box
MGF : mechanical growth factor
MLC : myosin regulatory light chain
MRF : myogenic regulatory factor
mTOR : mammalian target of rapamycin
mTORC : mTOR complex
MTT : méthylthiazoletétrazolium
MuRF1 : muscle specific ring finger 1
MyHC : myosin heavy chain

MyoG : myogénine
Myf5 : myogenic factor 5
N₂ : azote
NF-κB : nuclear factor-kappa B
NRF : nuclear respiratory factor
O₂ : oxygène
O₂⁻ : anion superoxide
P70S6K : ribosomal protein S6 kinase
Pax7 : Paired box 7
PDK1 : 3-phosphoinositide-dependent kinase-1
PGC-1α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PHD : prolyl hydroxylase
PI3K : phosphatidyl Inositol-3-OH kinase)
PIPs : phosphatidylinositol Phosphates
PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-diphosphate)
PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5- triphosphate)
PLD : phospholipases D
Raptor : regulatory associated protein of mTOR
REDD1 : regulated in development and DNA damage responses 1
Rheb : Ras homolog enriched in brain
Rictor : rapamycin-insentitive companion of mTOR
ROS : espèces réactives de l'oxygène
rpS6 : ribosomal protein S6
SE : stimulation électrique
SF : stain-free
SOD : superoxide dismutase
TGF β : transforming growth factors β
Tm : tropomyosine
Tn : troponine
TSC : tuberous sclerosis complex
UPS : système ubiquitine proteasome
VEGF : vascular endothelial growth factor
VHL : von hippel lindau protein
VPS34 : vacuolar protein sorting 34
4E-BP1 : eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1

Listes des figures

Figure 1 : Structure du muscle squelettique et organisation de la fibre musculaire (modifiée d'après Tortora, 2017).

Figure 2 : Structure générale de l'unité fonctionnelle du muscle lorsque le muscle est relâché (A) ou contracté (B) (modifiée d'après Mescher, 2013).

Figure 3 : Structure et organisation des filaments épais (chaîne lourde) de myosine.

Figure 4 : Modèle de l'organisation moléculaire des troponines (Tn), de la tropomyosine et de l'actine dans le filament fin du muscle squelettique et modification de la conformation du complexe troponine-tropomyosine modulé par la présence calcium (Ca^{++}).

Figure 5 : Schéma de l'unité motrice et de la jonction neuromusculaire.

Figure 6 : Naissance et propagation du potentiel d'action.

Figure 7 : Les différentes étapes moléculaires de l'interaction entre l'actine et la myosine, menant à la contraction et au raccourcissement de sarcomère (d'après Frontera et Ochala, 2015).

Figure 8 : Coupe transversale d'un muscle squelettique observé au microscope optique après précipitation du produit de la réaction ATPase des filaments épais de myosine.

Figure 9 : Effets d'un entraînement de type résistance ou endurance sur le système musculaire.

Figure 10 : Représentation schématique de la myogenèse et des différents facteurs de transcription impliqués (d'après Zanou & Gaily, 2013).

Figure 11 : Transcription de l'ARNm à partir de l'ADN nucléaire.

Figure 12 : Processus de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.

Figure 13 : Elongation et traduction de l'ARNm par le complexe ribosomal.

Figure 14 : Schématisation de la cascade de la voie de signalisation PI3K / Akt / mTOR.

Figure 15 : Représentation schématique des complexes mTOR.

Figure 16 : Activation du complexe mTORC1 au niveau de la membrane lysosomale par les acides aminés et les facteurs de croissance (d'après Dibble et al., 2015).

Figure 17 : Schéma général présentant les cibles de mTOR et leur rôle dans la régulation des étapes traductionnelles et de la biogenèse ribosomale.

Figure 18 : Les différentes phases de la voie autophagique (d'après Mizushima et al., 2008).

Figure 19 : Représentation schématique du système de dégradation ubiquitine-protéasome.

Figure 20 : Rôle des facteurs de transcription FoxOs dans les processus protéolytiques.

Figure 21 : Rôle de l'AMPK sur la régulation de mTORC1 et facteur de transcription FoxO.

Figure 22 : Schéma de la voie de signalisation de la myostatine.

Figure 23 : La voie de la myostatine dans la régulation de l'homéostasie protéique (d'après Sartori et al., 2014).

Figure 24 : Schématisation de la régulation de HIF-1 α en fonction de niveau d'oxygène intracellulaire.

Figure 25 : Régulation de la voie Akt / mTOR et de la voie de l'hypoxie via l'AMPK lors d'un stress cellulaire.

Figure 26 : Schématisation du mécanisme de synthèse de l'ATP issu de de la chaîne de transport des électrons

Figure 27 : Conséquence d'une exposition à l'hypoxie sur la typologie des fibres musculaires de patients BPCO (d'après Kapchinsky et al., 2018).

Figure 28 : Section transversale des muscles de la cuisse par tomographie d'un sujet sain (A) et d'un patient BPCO, avec des mensurations de 118,5 cm² et 79,6 cm² respectivement (d'après Bernard et al., 1998).

Figure 29 : Impact de l'hypoxie sur les cellules musculaires du gastrocnémien de rat colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (d'après Chaudhary et al., 2012).

Figure 30 : Schéma illustrant la modulation de l'action de l'IGF1 dans des cellules musculaires lors de la normoxie ou de l'hypoxie.

Figure 31 : Impact de l'hypoxie sur la régulation des voies de signalisation responsables de la dégradation des protéines et des mitochondries.

Figure 32 : (A) Représentation schématique de la culture de cellules musculaires squelettiques de type C2C12.

Figure 33 : Dispositif de l'induction de l'hypoxie physiologique.

Figure 34 : Dispositif d'électrostimulation cellulaire (Dish, IonOptix, Dublin, Irlande).

Figure 35 : Représentation schématique du protocole d'application des différents modes d'induction de l'hypoxie de cellules musculaires C2C12 différenciées en myotubes.

Figure 36 : Mesure de la viabilité cellulaire *via* le test MTT après traitement au CoCl_2 et DFO à différents concentrations (50, 100, 200, 400 μM), à 24h (A), 48h (B) et 72h (C) après traitement de cellules musculaires C2C12.

Figure 37 : Effet de l'hypoxie physiologique (4% O_2) et des agents chimiques mimétiques de l'hypoxie (CoCl_2 et DFO) sur l'expression de HIF-1 α .

Figure 38 : Impact de différentes méthodes d'induction d'hypoxie sur l'inhibition de la voie de synthèse des protéines Akt-mTOR.

Figure 39 : Impact de différentes méthodes d'induction d'hypoxie sur les marqueurs de dégradation des protéines dans les myotubes C2C12.

Figure 40 : L'exposition à une hypoxie physiologique ou chimique réprime les facteurs de régulation de la différenciation des myotubes C2C12.

Figure 41 : Atrophie des cellules C2C12 exposées à une privation d'oxygène ou après une induction de l'hypoxie par agent chimique mimétique de l'hypoxie.

Figure 42 : Réduction de la teneur totale en protéines des myotubes C2C12 soumis aux traitements par hypoxie.

Figure 43 : Représentation schématique du protocole d'application et de mesures des différentes contre-mesures à l'atrophie sur des cellules musculaires C2C12 sous hypoxie.

Figure 44 : Test de stimulations électriques de différentes intensités sur l'activation des protéines Akt (A) et AMPK (B).

Figure 45 : Photographie du tapis de myotubes C2C12 sur boîte de Pétri marqués au May-Grünwald-Giemsa à la suite de stimulations électriques de différentes intensités (10, 20, 30, et 40 V).

Figure 46 : Test d'une supplémentation par un seul ou plusieurs BCAAs sur l'activation des protéines mTOR (A) et P70S6K (B).

Figure 47 : Impact des différentes contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie sur la voie de synthèse des protéines Akt-mTOR.

Figure 48 : La réoxygénation de cellules C2C12 sous hypoxie entraîne l'hyper-phosphorylation des protéines responsables de la néosynthèse protéique.

Figure 49 : Augmentation de la phosphorylation de FoxO des cellules C2C12 sous hypoxie à la suite d'un traitement par stimulation électrique.

Figure 50 : Réduction des systèmes d'autophagie et d'ubiquitine-protéasome à travers le temps (2h et 24h) pour les cellules C2C12 traitées par stimulation électrique et supplémenté en BCAAs.

Figure 51 : Limitation de l'atrophie des myotubes C2C12 sous hypoxie à la suite des traitements par stimulation électrique et réoxygénation cellulaire.

Figure 52 : La teneur totale en protéines est plus élevée pour les myotubes C2C12 sous hypoxie traités par stimulation électrique ou par réoxygénation jusqu'à 48h après traitement.

Figure 53 : Représentation schématique des différentes conditions et combinaisons de traitement appliquées aux cellules C2C12 sous hypoxie.

Figure 54 : Impact des différentes combinaisons de contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie sur la voie de synthèse Akt-mTOR dans des cellules C2C12 sous hypoxie.

Figure 55 : Effets des différentes combinaisons de contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie sur les effecteurs de mTOR (4E-BP1 et P70S6K).

Figure 56 : Augmentation de la phosphorylation de FoxO des cellules C2C12 sous hypoxie à la suite d'un traitement par stimulation électrique seul.

Figure 57 : Réduction des systèmes d'autophagie et d'ubiquitine-protéasome à travers le temps (2h et 24h) pour les cellules C2C12 traitées par stimulation électrique et supplémentées en BCAAs.

Figure 58 : Maturation des myotubes C2C12 sous hypoxie à la suite de différentes combinaisons de contre-mesures à l'atrophie musculaire.

Figure 59 : Représentation schématique des impacts de l'hypoxie physiologique (4% O₂) et des agents mimétiques de l'hypoxie (CoCl₂ et DFO) sur la régulation de l'homéostasie protéique (c'est-à-dire l'équilibre entre la synthèse et la dégradation protéiques) et la morphologie des myotubes.

Figure 60 : Représentation schématique des effets moléculaires et morphologiques à la d'un traitement par stimulation électrique ou par supplémentation en BCAAs ou par des cellules musculaires squelettiques C2C12 sous hypoxies.

Figure 61 : Représentation schématique des effets moléculaires et morphologiques d'un traitement combinant stimulation électrique suivi d'une supplémentation en BCAAs et une période de réoxygénation sur des cellules musculaires squelettiques C2C12 sous hypoxies.

Figure 62 : Représentation schématique des effets moléculaires et morphologiques d'un traitement par stimulation électrique seul ou l'alliance de la stimulation électrique suivi d'une supplémentation en BCAAs ou une période de réoxygénation, sur des cellules musculaires squelettiques C2C12 sous hypoxies.

Listes des tableaux

Tableau I : Caractéristiques des différents types de fibres présents dans les muscles des Mammifères (d'après Gundersen, 2011).

Tableau II : Conditions d'électrophorèse et de transfert sur membranes utilisées, optimisées pour chaque anticorps utilisé dans cette étude.

Tableau III : Conditions d'incubation des anticorps primaires et secondaires.

Table des matières

Contexte scientifique.....	1
Revue de bibliographie.....	4
I. Le muscle strié squelettique.....	5
I.1. Anatomie, structure et composition du muscle strié squelettique	5
I.1.1. La fibre musculaire	5
I.1.2. La myofibrille	5
I.1.3. Le sarcomère	7
I.1.4. Les myofilaments.....	8
I.2. Le mécanisme de la contraction musculaire	9
I.2.1. L’Innervation.....	9
I.2.2. Le potentiel d’action.....	10
I.2.3. Le rôle du calcium.....	10
I.2.4. Le cycle du pont actine-myosine	11
I.3. Le phénotype et les propriétés métaboliques des différentes fibres musculaires	12
I.3.1. Les fibres de type I.....	12
I.3.2. Les fibres de type IIB	13
I.3.3. Les fibres intermédiaires de type IIA.....	14
II. La plasticité musculaire	15
II.1. L’hypertrophie musculaire	15
II.1.1. La stimulation mécanique	16
II.2. L’atrophie musculaire	20
II.2.1. L’inactivité	21
II.3. La plasticité musculaire et nutrition.....	21
II.3.1. La plasticité musculaire et nutrition.....	22
II.3.2. L’alimentation nutritionnelle.....	22
II.4. Les hormones et plasticité musculaire	23
II.4.1. L’hormone thyroïdienne.....	23
II.4.2. Les hormones stéroïdiennes androgènes	24
II.4.3. Les glucocorticoïdes	24
III. La régulation de la masse du muscle squelettique	26

III.1. La myogenèse	26
III.1.1. Les mécanismes généraux de la myogenèse.....	27
III.2. L'anabolisme protéique.....	28
III.2.1. Les étapes de la synthèse d'une protéine	28
III.2.2. La voie de protéosynthèse : PI3K / Akt / mTOR	31
III.3. Le catabolisme protéique	42
III.3.1. Le système d'autophagie lysosomale.....	42
III.3.2. Le système ubiquitine-protéasome.....	43
III.3.3. Les facteurs de transcription FoxO.....	45
III.3.4. AMPK	46
III.3.5. La myostatine	48
III.3.6. Les calpaïnes.....	51
IV. Les réponses cellulaires à l'hypoxie	53
IV.1. Les adaptations moléculaires à l'hypoxie	53
IV.1.1. HIF-1	53
IV.1.2. REDD1.....	56
IV.1.3. AMPK et hypoxie	56
IV.1.4. La mitochondrie et le stress oxydant.....	57
IV.2. Les adaptations du muscle squelettique en hypoxie	59
IV.2.1. Le dysfonctionnement et la perte de cellules musculaires squelettiques.....	59
IV.2.2. Les effets de l'hypoxie sur la myogenèse.....	63
IV.2.3. L'influence de l'hypoxie sur la protéosynthèse.....	63
IV.2.4. La régulation des systèmes protéolytiques en hypoxie	65
IV.3. La modulation de l'état nutritionnel en hypoxie	67
V. Les contre-mesures à l'atrophie musculaire résultante de l'hypoxie	69
V.1. L'activité physique et l'inversion typologique en environnement hypoxique.....	69
V.1.1. L'activité physique et la stimulation des facteurs de l'hypertrophie.....	69
V.1.2. L'inhibition des processus d'atrophie	70
V.2. La supplémentation nutritionnelle dans le traitement de l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie.....	71
V.3. Hypoxie et oxygénation.....	72
V.3.1. Le traitement de l'hypoxie par oxygénothérapie.....	72
V.3.2. La restauration de la voie de synthèse des protéines en hypoxie	73
Objectifs scientifiques	75

Matériels et méthodes	80
I Culture cellulaire	81
I.1. Choix du modèle : cellules musculaires de type C2C12 différenciées en myotubes	81
I.2. Protocole	81
II Induction de l'hypoxie cellulaire	82
II.1. Hypoxie physiologique	82
II.2. Hypoxie chimique	83
III Stress mécanique	84
IV Supplémentation en acide aminé	85
V Extraction et dosage protéique.....	85
V.1. Extraction protéique	85
V.2. Dosage de protéines.....	85
VI Quantification des signaux protéiques par Western blot	85
VI.1. Préparation des échantillons.....	85
VI.2. Electrophorèse SDS-PAGE	86
VI.3. Transfert des protéines sur membrane	86
VI.4.2. Etape d'incubation des anticorps primaires et secondaires	87
VI.4.3. Quantification du signal	87
VI.4.4. Décrochage de l'anticorps primaire	87
VII. Morphologie cellulaire	90
VII.1. Principe.....	90
VII.2. Protocole de marquage May Grünwald / Giemsa.....	90
VII.3. Acquisition des images.....	90
VIII Quantité de protéine totale	90
IX Viabilité cellulaire - test au MTT : Méthylthiazoletétrazolium.....	91
X Analyse statistique	91
Résultats	92
Etude I : Impact de différentes méthodes d'induction de l'hypoxie cellulaire : place des agents mimétiques de l'hypoxie comme modèle d'induction de l'hypoxie cellulaire à travers l'analyse de l'homéostasie protéique et la morphologie des cellules musculaires squelettiques C2C12 différenciées en myotubes.....	93
I. Contexte et objectif.....	93
II. Protocole de l'étude	94
III. Résultats	96
III.1. Mise au point de l'induction de l'hypoxie cellulaire par traitement chimique	96

III.2. Effets de l'hypoxie physiologique ou chimique sur la voie de signalisation Akt / mTOR..	99
III.3. Effets de l'hypoxie physiologique ou chimique sur les régulateurs des voies de dégradation protéique.....	101
III.4. Effets de l'hypoxie physiologique ou chimique sur les facteurs régulateurs de la myogenèse.....	103
III.5. Effets de l'hypoxie physiologique ou chimique sur la morphologie et la teneur en protéines des myotubes.....	104
IV. Conclusion de l'étude I.....	106
Etude II : La stimulation mécanique, la supplémentation en acides aminés ou l'oxygénation dans la limitation de l'atrophie de cellules musculaires sous hypoxie.....	108
I. Contexte et objectif.....	108
II. Protocole de l'étude.....	110
III. Résultats.....	114
III.1. Effets de la stimulation électrique, de la supplémentation en BCAAs ou de la réoxygénation cellulaire sur la voie de signalisation Akt-mTOR.....	114
III.2. Effets de la stimulation électrique, de la supplémentation en BCAAs ou de la réoxygénation cellulaire sur les facteurs de transcription FoxOs et les systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome.	117
III.3. Effets de la stimulation électrique, de la supplémentation en BCAAs ou de la réoxygénation cellulaire sur la morphologie et la teneur en protéines des myotubes.	120
IV. Conclusion de l'étude II.....	123
Etude III : Effets additionnels de la stimulation mécanique, de la supplémentation en acides aminés et d'une période d'oxygénation vis-à-vis de l'atrophie des myotubes induite par l'hypoxie.....	124
I. Contexte et objectif.....	124
II. Protocole de l'étude.....	125
III. Résultats.....	126
III.1. Effets de l'association des contre-mesures à l'atrophie musculaire (stimulation électrique, supplémentation en BCAAs et réoxygénation) consécutive à l'hypoxie, sur la voie de signalisation Akt-mTOR.....	126
III.2. Effets de l'association des contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie sur les facteurs de transcription FoxOs et les systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome.....	129
III.3. Effet de l'association des contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie sur la morphologie de myotubes C2C12 hypoxiques.	132
IV. Conclusion de l'étude III.....	135
Discussion générale.....	136
Etude I : Impact de différentes méthodes d'induction de l'hypoxie cellulaire	137

Etude II : La stimulation mécanique, la supplémentation en acides aminés ou la réoxygénation dans la limitation de l'atrophie de cellules musculaires sous hypoxie.	142
Etude III : La stimulation mécanique, la supplémentation en acides aminés ou l'oxygénation dans la limitation de l'atrophie de cellules musculaires sous hypoxie.	146
Perspectives.....	151
1. Approfondir l'impact des différentes combinaisons de contre-mesures sur les voies de signalisation régulatrices de l'homéostasie protéique.....	152
2. Déterminer l'influence des contre-mesures à l'atrophie musculaire sur l'activité mitochondriale et la production de stress oxydant consécutives à l'hypoxie sur les voies de signalisation en lien avec l'homéostasie protéique	153
3. Approfondir les effets des différentes combinaisons de contre-mesures sur un modèle rongeur en hypoxie	153
Références bibliographiques.....	156

Contexte scientifique

Le muscle strié squelettique est un tissu contractile excitable dont la fonction principale est de mouvoir des parties du corps par le biais de mouvements volontaires ou réflexes. Le corps humain est composé de près de 600 muscles squelettiques représentant 40 à 45% de la masse corporelle totale d'un individu sain. Outre ses fonctions dans la locomotion, le maintien postural et la respiration, le muscle squelettique joue un rôle important dans le métabolisme énergétique. Le muscle est un fort consommateur de glucose ; il a la capacité de dégrader le glucose *via* la glycolyse afin de fournir l'énergie nécessaire à son bon fonctionnement, ou alors de stocker le glucose en glycogène *via* la glycogénèse.

La taille et le volume des muscles squelettiques varient selon leurs fonctions, et le tissu musculaire squelettique est considéré comme l'un des tissus possédant l'une des plus grandes capacités de plasticité, pouvant modifier sa masse en réaction à différents stimuli. Ainsi, la pratique régulière d'une activité physique intense et prolongée engendrera une augmentation de la masse musculaire (hypertrophie musculaire) ; à l'inverse, une période d'inactivité induira une perte de masse musculaire (atrophie musculaire). Une application successive de contraintes mécaniques sur le muscle agit directement sur l'équilibre de la balance entre les processus d'anabolisme et de catabolisme protéique. Au niveau cellulaire, l'hypertrophie musculaire est le reflet d'une balance protéique positive, c'est-à-dire une activation des voies responsables de la synthèse des protéines au détriment des processus protéolytiques. Au contraire, une atrophie musculaire est le résultat d'une suractivation de la dégradation des protéines en comparaison aux divers processus impliqués dans la synthèse protéique. La modulation de cette balance protéique est régie par divers facteurs endogènes ou exogènes, tels que le stress mécanique, l'état nutritionnel, ainsi que divers facteurs métaboliques et hormonaux. L'excès ou le déficit de l'un de ces facteurs engendre inévitablement une perturbation de l'homéostasie protéique, c'est-à-dire l'équilibre entre la synthèse et la dégradation protéiques, avec pour conséquence une variation de la masse musculaire.

Avec le glycogène, l'oxygène (O_2) est un élément essentiel du fonctionnement des processus aérobie et oxydatifs de la cellule. Au sein de la littérature scientifique, le rôle et l'importance de l' O_2 dans la modulation de la masse musculaire sont bien souvent sous-estimés. Des recherches ont démontré que la variation du taux d' O_2 au niveau des tissus musculaires, et tout particulièrement un déficit en O_2 (hypoxie), provoque un dysfonctionnement du développement et de la croissance musculaires (Chaillou et al., 2016 ; Koning et al., 2011 ; Launay et al, 2010). Chez l'homme, l'hypoxie est un phénomène rencontré lors de séjour à moyenne et très haute altitude (on parlera alors d'hypoxie environnementale), mais également lors de maladies aiguës ou chroniques, telles que les pathologies cardiaques (infarctus, ischémie et insuffisance cardiaque) ainsi que des pathologies respiratoires (emphysème, fibrose, apnée du sommeil, broncho-pneumopathie chronique obstructive ou BPCO).

Afin d'illustrer l'importance de l'hypoxie dans le dysfonctionnement musculaire et ses conséquences, l'exemple de la BPCO est une excellente illustration. Bien que ce soit une pathologie d'origine respiratoire, la BPCO entraîne des altérations à la fois qualitatives, quantitatives et fonctionnelles du tissu musculaire. Ces modifications entraînent, dans des formes modérées à sévères de la BPCO, une atrophie musculaire responsable d'une dégradation de l'autonomie, de la qualité de vie et d'une élévation alarmante du taux de mortalité (Marquis et al., 2002 ; Patel et al., 2014). Face à cet alarmant constat, le réentraînement à l'effort est un outil indispensable à toute prise en charge

thérapeutique chez ces patients, avec des niveaux de preuves élevés. Cependant, il reste un grand nombre de sujets touchés par cette pathologie restant insensibles à ce type de protocole de réentraînement musculaire. De nombreux praticiens, cliniciens et chercheurs ont placé cette défaillance du système musculaire au cœur des futurs traitements thérapeutiques pour ces patients dans la mesure où une importante atrophie musculaire est le premier facteur de risque de mortalité/morbidité avant la fonction respiratoire (Maltais et al., 2014 ; Patel et al., 2014). À ce jour, plusieurs hypothèses restent inexploitées ou insuffisamment abouties pour comprendre totalement les mécanismes complexes induits par l'hypoxie au sein du système musculaire. Pourtant, une meilleure compréhension de ces mécanismes intracellulaires permettrait de mettre en exergue de nouvelles stratégies thérapeutiques et donc de permettre, à terme, une meilleure prise en charge des patients BPCO, notamment les plus sévèrement touchés.

Le travail présenté dans ce manuscrit vise (i) à mieux comprendre et (ii) à contrer les effets délétères de l'hypoxie sur l'homéostasie protéique, ces travaux étant effectués sur des cellules musculaires en culture. L'objectif principal de ce projet de thèse est d'analyser et d'évaluer le potentiel d'une ou de l'association de plusieurs contre-mesures à l'atrophie musculaire, telles que le stress mécanique, la supplémentation nutritionnelle et/ou la réoxygénation de cellules musculaires atrophiées consécutivement à une exposition à des taux O₂ bien inférieurs à la normale. Pour mener à bien ce projet, il nous a fallu tout d'abord mettre en évidence les points communs et/ou les divergences entre différents modes d'induction de l'hypoxie sur un modèle de cellules musculaires en culture. Avant d'exposer la méthodologie et l'ensemble des résultats de nos différentes études, une revue de littérature sera exposée. Nous aborderons dans un premier temps une description détaillée de la structure et du fonctionnement du muscle strié squelettique. Nous examinerons ensuite les différents processus régulant la masse musculaire et l'homéostasie protéique. Un chapitre sera consacré aux adaptations de la cellule musculaire dans un milieu hypoxique. Enfin, nous analyserons les différents types de contre-mesures potentielles à l'atrophie musculaire en lien avec l'hypoxie.

Revue de bibliographie

I. Le muscle strié squelettique

I.1. Anatomie, structure et composition du muscle strié squelettique

Le muscle squelettique est un organe composé de longues cellules striées et plurinucléées appelées fibres musculaires, se rassemblant parallèlement entre elles pour former des faisceaux de fibres musculaires, ces derniers se rattachant à l'os par des tendons constitués de collagène et de tissu fibreux hautement résistants. Fibres, faisceaux et muscle sont entourés par différentes enveloppes de tissu conjonctif. Chaque fibre est ainsi recouverte par une fine couche de tissu conjonctif appelée endomysium ; les faisceaux musculaires, composés d'une dizaine à plusieurs milliers de fibres musculaires regroupées parallèlement, sont quant à eux entourés par le pérимysium. L'ensemble des faisceaux est entouré par un tissu conjonctif externe appelé épimysium, ce dernier étant constitué majoritairement de collagène ; il est le prolongement du tendon permettant la liaison à l'os. Ces couches de tissus conjonctifs ont un rôle de protection et de support structural des différents composants du muscle squelettique (Tortora & Derrickson, 2017) (**Figure 1**).

Un réseau vascularisé dense et développé parcourt l'ensemble du tissu conjonctif, de l'épimysium au pérимysium. Les vaisseaux sanguins sont organisés en une multitude de capillaires assurant la vascularisation de l'endomysium et ainsi l'approvisionnement indispensable en oxygène et nutriments de chaque fibre musculaire (Tortora & Derrickson, 2017) (**Figure 1**). L'ensemble du tissu conjonctif est richement innervé ; les nerfs arrivent au pérимysium et se terminent en ramification pour donner la jonction neuromusculaire. L'unité motrice, composée d'un motoneurone et des fibres musculaires qu'il innerve, assure la transmission du signal nerveux indispensable à la contraction musculaire (Hall & Sanes, 1993) (**Figure 1**).

I.1.1. La fibre musculaire

Le muscle strié squelettique est constitué de nombreuses fibres musculaires disposées parallèlement entre elles, la fibre musculaire étant l'unité cellulaire du muscle. Sur le plan anatomique, la fibre musculaire est une longue cellule cylindrique, pouvant mesurer entre 10 et 100 μm de diamètre et une centaine de micromètres à plusieurs dizaines de millimètres de longueur. Aussi appelée myofibre, elle est entourée d'une membrane plasmique, le sarcolemme (Tortora & Derrickson, 2017) (**Figure 1**). Ce dernier abrite le sarcoplasme contenant les nombreux noyaux cellulaires accolés à la membrane plasmique, les mitochondries nécessaires à la production d'énergie et le réticulum sarcoplasmique, compartiment de stockage du calcium. Enfin, chaque fibre musculaire est composée d'une centaine de faisceaux de filaments contractiles, les myofibrilles.

I.1.2. La myofibrille

L'espace intracellulaire contenant le cytoplasme de la fibre musculaire est occupé principalement par les myofibrilles, regroupées parallèlement entre elles et parcourant toute la longueur de la fibre. Pouvant mesurer entre 1 et 2 μm de diamètre, les myofibrilles sont le fondement

de la propriété contractile de la fibre musculaire (Tortora & Derrickson, 2017) (Figure 1). Plusieurs éléments nécessaires à la contraction musculaire sont directement en contact avec les myofibrilles.

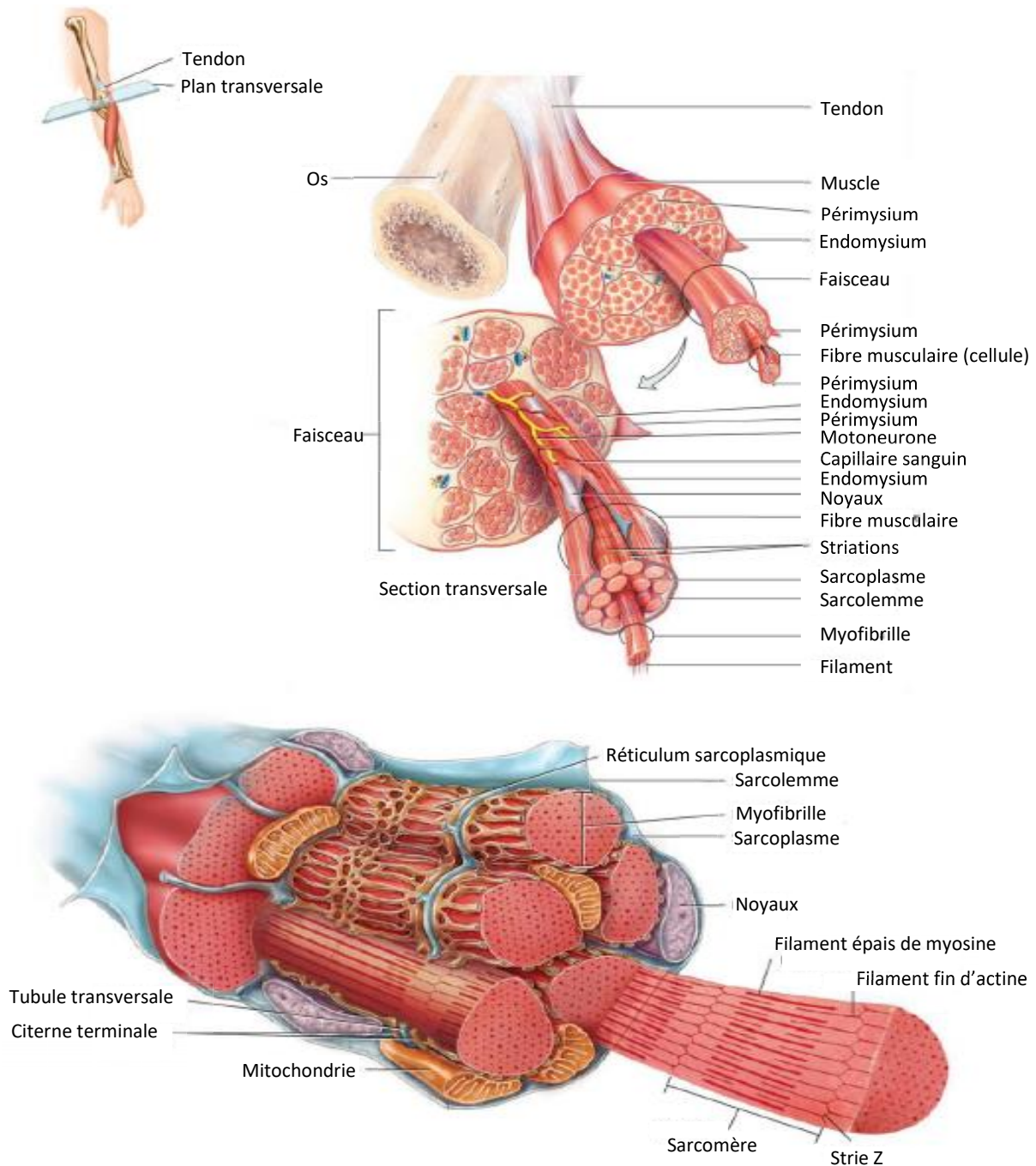


Figure 1 : Structure du muscle squelettique et organisation de la fibre musculaire (modifiée d'après Tortora, 2017).

Les mitochondries permettent la production d'énergie comme l'ATP, indispensable à la contraction des myofibrilles (Davydov et al., 1973). On trouve également accolés aux myofibrilles les tubules transversaux (Figure 1) ; aussi appelés tubules T, ce sont des invaginations du sarcolemme permettant la conduction de l'excitabilité de la membrane des fibres musculaires (Block et al., 1988). Les myofibrilles sont recouvertes par le réticulum sarcoplasmique participant au stockage, à la libération

et à la recapture du calcium. Ce dernier est concentré spécifiquement au sein de citernes terminales disposées aux extrémités du réticulum sarcoplasmique (Block et al., 1988). L'arrangement est tel qu'un tubule T est entouré par deux citernes terminales, formation appelée la triade. Afin d'assurer les propriétés contractiles de la fibre musculaire, les myofibrilles sont constituées d'une répétition en série de sous-unités contractiles appelées sarcomères.

I.1.3. Le sarcomère

Le sarcomère représente l'unité contractile de base de la fibre musculaire. Il est composé de myofilaments fins d'actine et de myofilaments épais de myosine, ces protéines contractiles permettant le glissement de ces deux filaments l'un sur l'autre, donnant ainsi au sarcomère la faculté de se contracter (**Figure 2**). Un sarcomère est délimité par l'espace compris entre deux stries Z consécutives, correspondant à une zone dense en microscopie électronique. De part et d'autre des stries Z, la bande I (isotrope ou bande claire) est faiblement colorée au microscope et est riche en filaments d'actine. La bande A (anisotrope ou bande sombre) constitue la partie du sarcomère où se superposent à la fois les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine. La zone H est une zone de la bande A où seuls les filaments épais de myosine sont présents. Au centre du sarcomère, la ligne M correspond à la région où les filaments épais de myosine sont liés parallèlement entre eux. La structuration spécifique et régulière des myofilaments fins et épais en succession de stries et de bandes confère au sarcomère la caractéristique de striation propre aux muscles striés. Au sein du sarcomère, les filaments fins et épais sont disposés à proximité l'un de l'autre permettant leur interaction afin de produire une contraction musculaire (**Figure 2**).

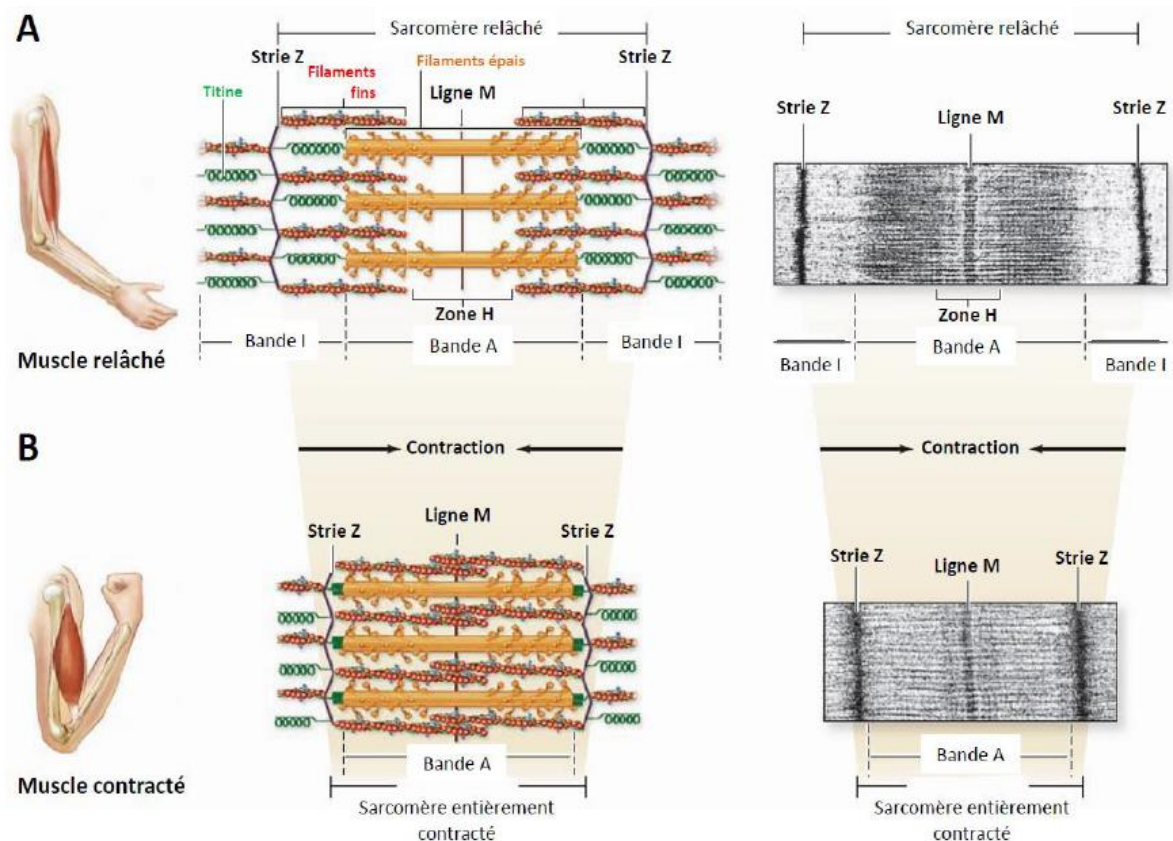


Figure 2 : Structure générale de l'unité fonctionnelle du muscle lorsque le muscle est relâché (A) ou contracté (B) (modifiée d'après Mescher, 2013).

I.1.4. Les myofilaments

I.1.4.1 Les myofilaments épais

La myosine est la protéine principale formant les myofilaments épais ; elle est constituée de deux chaînes lourdes de myosine auxquelles sont associées deux paires de chaînes légères. Les chaînes lourdes de myosine ont leurs queues enroulées en double hélice l'une sur l'autre, se terminant par deux têtes globulaires (Craig et Woodhead, 2006) (Figure 3). Ces têtes, correspondant à l'extrémité N-terminale des chaînes lourdes de myosine, sont associées aux chaînes légères de myosine et possèdent des sites de liaison avec l'actine et l'ATP, essentiels à la formation des ponts entre les myofilaments épais et fins (Gelfi et al., 2011) (Figure 3). Les extrémités C-terminales des chaînes lourdes de myosine vont constituer les queues de myosine, qui se lient parallèlement entre elles en s'ancrant au centre du sarcomère au niveau de la ligne M. Les têtes de myosine opposées l'une à l'autre sont orientées en direction de la ligne Z (Figure 3). Les chaînes légères sont composées de deux chaînes légères régulatrices (phosphorylables ou MLC2) et de deux chaînes légères essentielles (non phosphorylables ou MLC1). Un duo de chaque chaîne (régulatrice et essentielle) est situé au niveau de la base de chacune des têtes de myosine (Warrick & Spudich, 1987) (Figure 3). Les chaînes légères de myosine régulent l'activité contractile par le contrôle du mouvement de la tête de myosine, permettant ainsi son interaction avec l'actine.

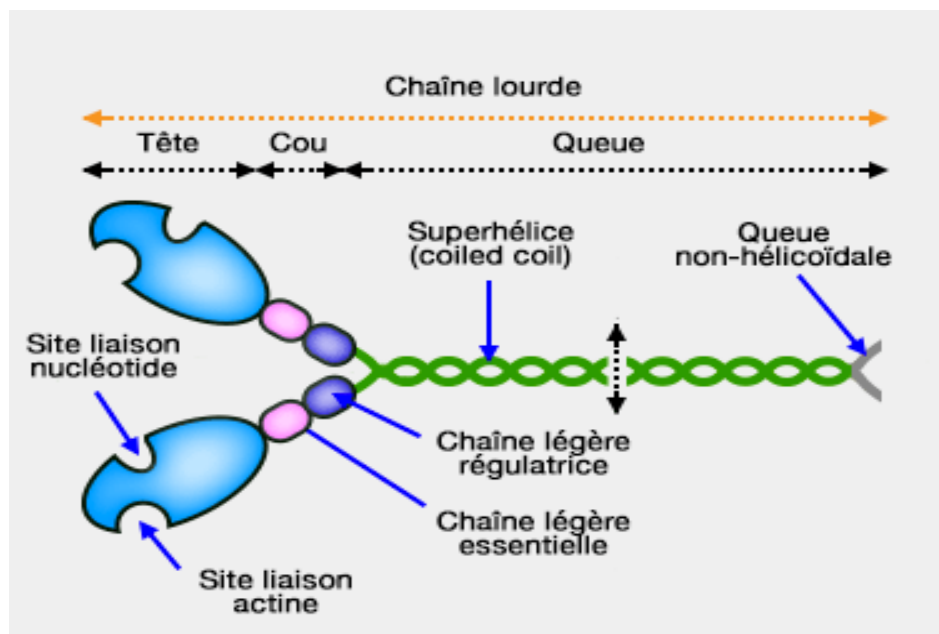


Figure 3 : Structure et organisation des filaments épais (chaîne lourde) de myosine.

I.1.4.2. Les myofilaments fins

Les myofilaments fins d'actine sont attachés au niveau de la strie Z jusqu'au centre du sarcomère (Figure 2). Les filaments fins sont composés de deux chaînes d'actine assemblées en spirale pour former une double hélice. Au centre du sillon de la spirale d'actine se trouve un filament de tropomyosine masquant les sites de liaison entre l'actine et la myosine, s'opposant ainsi à leur

interaction (Flicker et al., 1982). Le complexe des troponines est constitué de 3 sous-unités : la troponine T, qui fixe le complexe des troponines à la tropomyosine (Schachat et al., 1987) (Figure 4) ; la troponine I, se liant à l'actine de manière à limiter le contact actine-myosine et ce à de faibles concentrations calciques (rendant ainsi impossible la formation du pont actine-myosine responsable de la contraction du sarcomère) (Gomes et al., 2002) ; et enfin, la troponine C, ayant une forte affinité pour le calcium issu du réticulum sarcoplasmique. Un fort taux calcique au niveau sarcoplasmique va entraîner un renforcement de l'interaction entre la troponine C et la troponine I, réduisant alors sa connexion avec l'actine. Ce changement de configuration permet de lever l'inhibition de la troponine I sur la liaison de l'actine avec la myosine en permettant de positionner la tropomyosine de façon à démasquer le site d'interaction entre l'actine et la myosine (Gomes et al., 2002).

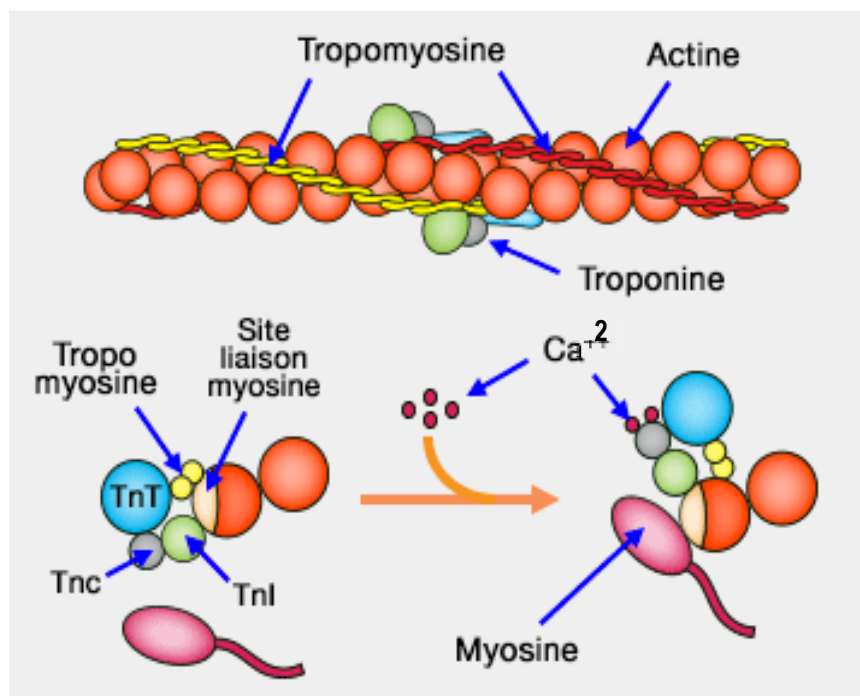


Figure 4 : Modèle de l'organisation moléculaire des troponines (Tn), de la tropomyosine et de l'actine dans le filament fin du muscle squelettique et modification de la conformation du complexe troponine-tropomyosine modulé par la présence calcium (Ca⁺⁺).

Après avoir décrit l'organisation structurale et la composition du sarcomère, considéré comme l'unité contractile de la fibre musculaire, nous allons aborder plus en détail les différentes étapes de la contraction musculaire.

1.2. Le mécanisme de la contraction musculaire

1.2.1. L'Innervation

L'interaction entre le système nerveux et les fibres musculaires est indispensable à la contraction musculaire. Chaque fibre musculaire est reliée à un neurone moteur ou motoneurone, lequel innerve une multitude de fibres musculaires par l'intermédiaire de ses branches axonales. A l'extrémité de chaque branche axonale, la transmission du signal nerveux vers la fibre musculaire se

fera par la jonction neuromusculaire. L'ensemble des fibres musculaires innervées par le même motoneurone constitue une unité motrice (**Figure 5**).

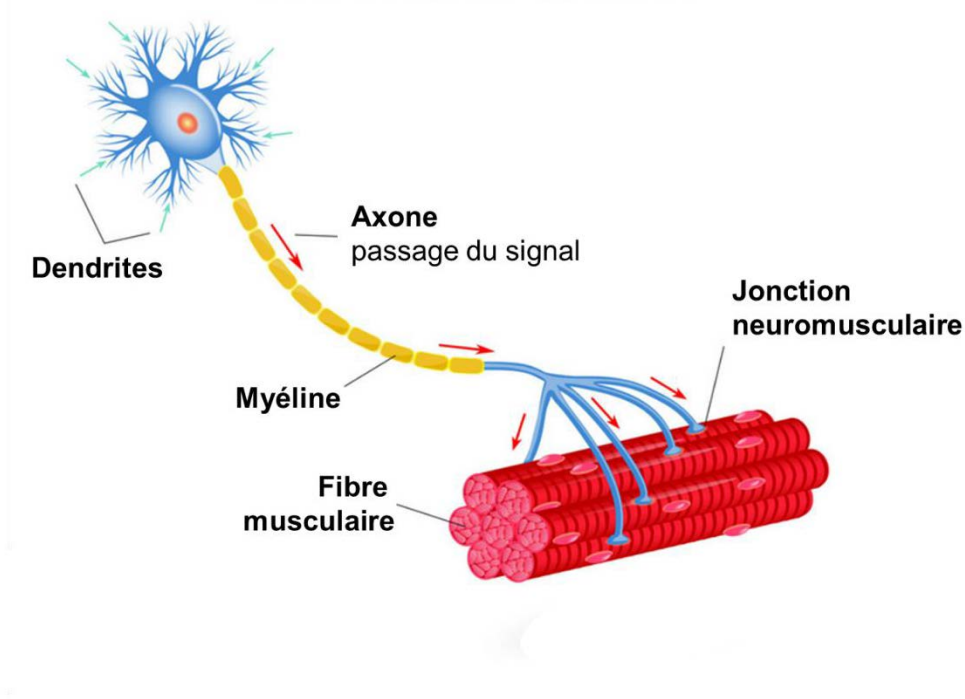


Figure 5 : Schéma de l'unité motrice et de la jonction neuromusculaire. Les flèches bleues représentent la stimulation du motoneurone, les flèches rouges représentent la direction du signal nerveux (potentiel d'action). Le signal nerveux circule à travers l'axone, long prolongement qui émerge du corps cellulaire du neurone. L'axone est recouvert de la gaine de myéline qui permet une conduction 20 fois plus rapide.

1.2.2. Le potentiel d'action

Le système nerveux central envoie un influx nerveux *via* les motoneurones jusqu'à la jonction neuromusculaire permettant la libération de l'acétylcholine par les boutons terminaux de l'axone. Ce neuromédiateur se propage au niveau de la fente synaptique pour se fixer sur son récepteur situé sur la membrane plasmique de la fibre musculaire, entraînant un changement de conformation du récepteur-canal, les flux sodiques et potassiques au niveau de la plaque motrice conduisant à une dépolarisation de la membrane de la fibre musculaire. Cette dépolarisation appelée potentiel d'action se propage le long du sarcolemme puis des tubules transverses jusqu'à atteindre le réticulum sarcoplasmique, provoquant ainsi la libération du calcium (Ca^{2+}) *via* des canaux calciques vers le cytoplasme (Jayasinghe & Launikonis, 2013) (**Figure 6**).

1.2.3. Le rôle du calcium

L'état de repos musculaire est caractérisé par une faible concentration intracellulaire en Ca^{2+} , le filament de tropomyosine se situant au centre du sillon de la spirale d'actine, masquant par l'intermédiaire de la troponine I les sites de liaison de la myosine à l'actine (Tripet et al., 1997) (**Figure 4**). L'élévation du taux de Ca^{2+} intracellulaire est l'un des éléments clés de la contraction du muscle squelettique. Une fois le calcium libéré du réticulum sarcoplasmique, il se lie à la troponine C, entraînant un renforcement de la liaison entre les trois sous-unités de troponines, provoquant ainsi

une modification de conformation du complexe troponine-tropomyosine (**Figure 4**). La tropomyosine se déplace de sa position bloquante par l'intermédiaire de la troponine T de façon à libérer les sites de fixation entre les têtes de myosine et les myofilaments d'actine. La fixation du Ca^{2+} sur la troponine C engendre également une délocalisation de la troponine I de sa position inhibitrice sur l'actine. La migration à la fois de la tropomyosine et de la troponine I aura pour conséquence une fixation totale de la tête de myosine à l'actine (Tripet et al., 1997) (**Figure 4**). Ce pont actine-myosine rendu possible grâce à l'ion Ca^{2+} permet d'initier le raccourcissement des sarcomères conduisant à la contraction musculaire.

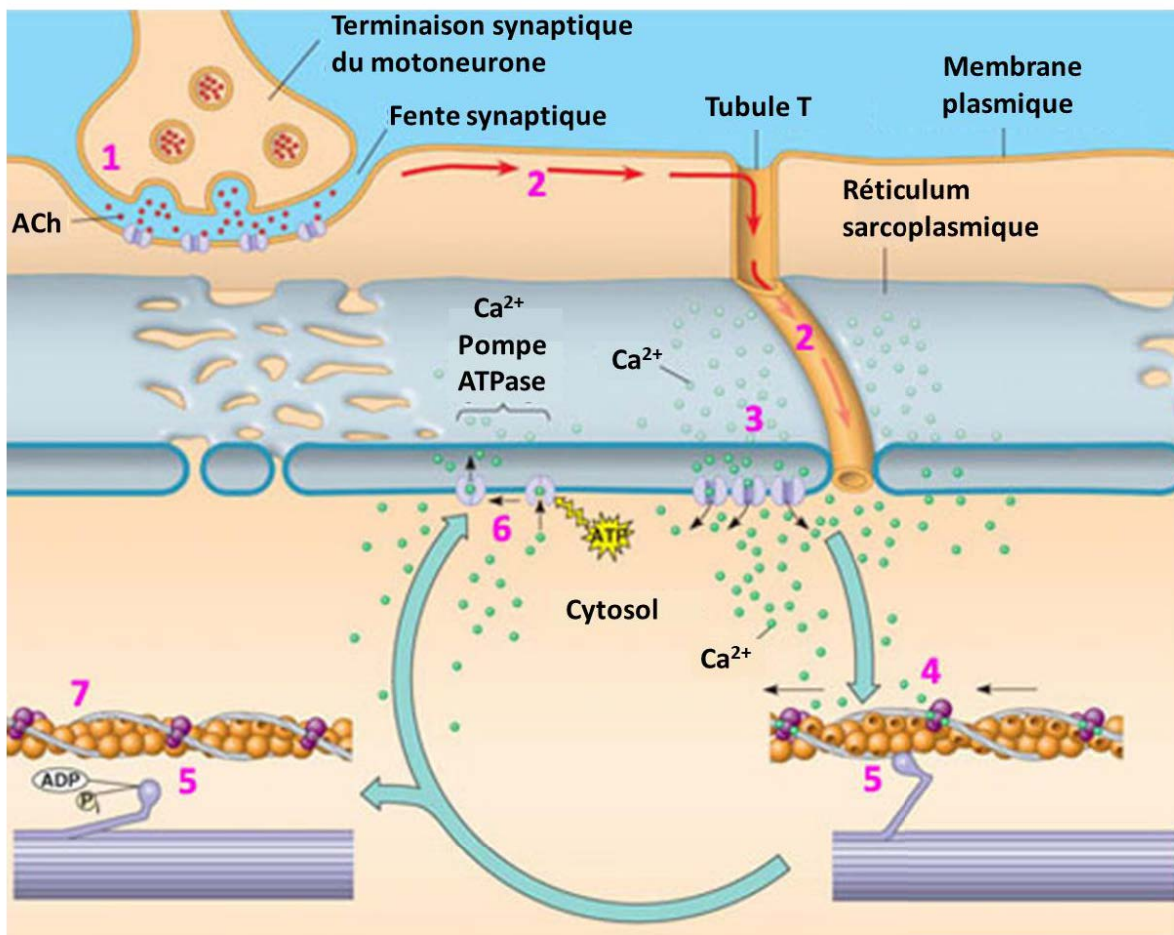


Figure 6 : Naissance et propagation du potentiel d'action. 1) L'acétylcholine libérée du motoneurone se propage à travers la fente synaptique et se lie à son à récepteur situé sur la membrane plasmique. 2) Le potentiel d'action se propage le long de la membrane plasmique et des tubules T. 3) Le potentiel d'action déclenche la libération des ions calcium Ca^{2+} présents dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. 4) La concentration des ions Ca^{2+} augmente à l'intérieur du sarcoplasme. 5) La contraction va se déclencher par glissement des filaments, les filaments fins (actine) étant tirés vers le centre du sarcomère par les têtes de myosine des filaments épais. 6) Après la fin du potentiel d'action, le Ca^{2+} est recapté dans le réticulum sarcoplasmique. 7) Les ponts actine-myosine vont se rompre, permettant ainsi le relâchement des fibres musculaires.

1.2.4. Le cycle du pont actine-myosine

La fixation du calcium sur la troponine C, provoquant le démasquage des sites de liaison de la myosine à l'actine, permet aux têtes de myosine de se lier aux filaments d'actine avec un angle de 45° et ainsi initier les différentes étapes du cycle attachement-détachement de la myosine sur l'actine (**Figure 7**). Par la suite, une molécule d'ATP se fixe sur la tête de myosine, entraînant une diminution

de l'affinité de la myosine à l'actine et la dissociation du pont actine-myosine. L'activité ATPase de la tête de myosine entraîne l'hydrolyse de l'ATP en une molécule d'adénosine diphosphate (ADP) et d'un phosphate inorganique (Pi). Cette transformation de l'ATP provoque un basculement de la tête de myosine de 45° à 90° et la liaison de cette même tête de myosine sur un autre site de fixation du filament d'actine, créant ainsi un nouveau pont actine-myosine. La libération de l'ADP et du Pi induit une inclinaison de 90° à 45° de la tête de myosine, entraînant avec elle le déplacement de l'actine en direction de la ligne M du sarcomère (**Figures 2 et 7**). En effet, les filaments fins d'actine se rapprochent de plus en plus de la ligne M (centre du sarcomère), entraînant ainsi un raccourcissement des bandes I et un rapprochement des stries Z avec une disparition des zones claires. Même si le sarcomère rétrécit lors du glissement des filaments d'actine et de myosine, la longueur de ces derniers reste inchangée ; seul le degré de chevauchement varie (**Figure 2B**) (Frontera et Ochala, 2015).

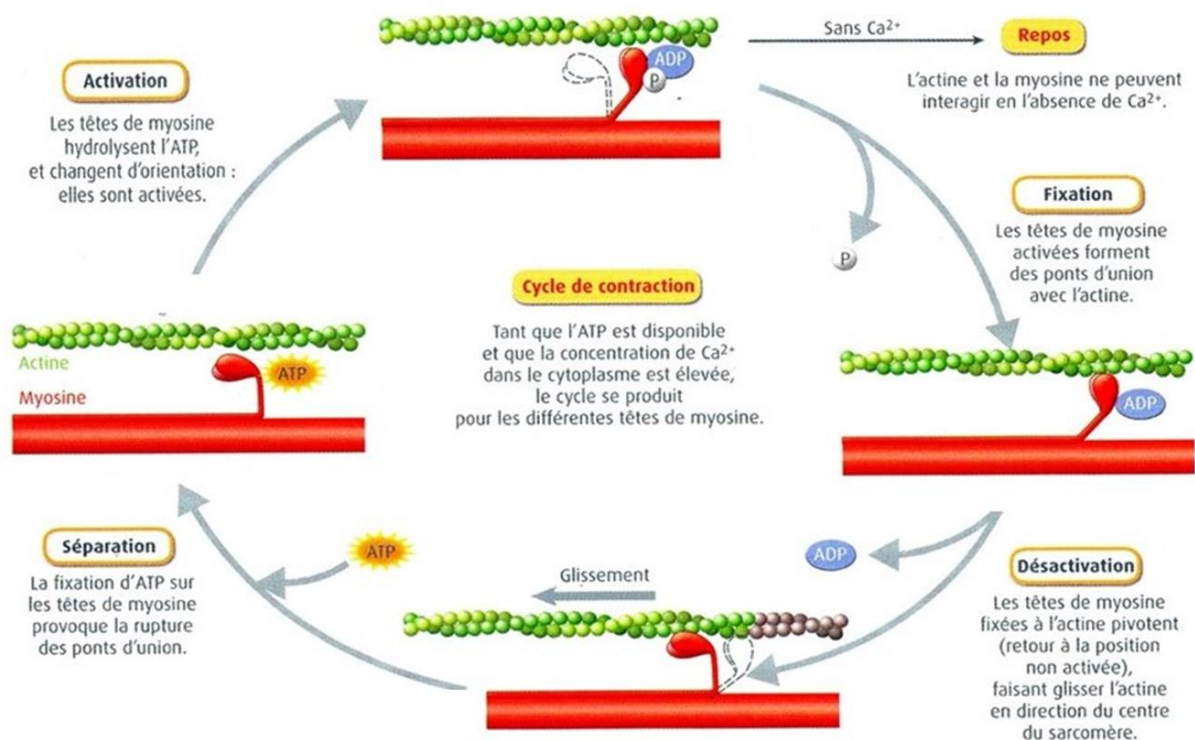


Figure 7 : Les différentes étapes moléculaires de l'interaction entre l'actine et la myosine, menant à la contraction et au raccourcissement de sarcomère (d'après Frontera et Ochala, 2015).

1.3. Le phénotype et les propriétés métaboliques des différentes fibres musculaires

La constitution typologique de chaque muscle squelettique est adaptée à sa fonction, comme le maintien de la posture, la locomotion ou la respiration.... On dénombre couramment trois types de fibres musculaires (lente, rapide et intermédiaire) que l'on peut classer en fonction de leur caractéristique de couleur (rouge ou blanche) (**Figure 8**), de leur vitesse de raccourcissement (lente ou rapide) et de leur propriétés métaboliques (oxydative ou glycolytique). L'ensemble de ces propriétés confère au muscle sa spécificité physiologique, avec une prédominance spécifique d'un type de fibres musculaires.

1.3.1. Les fibres de type I

Les fibres de type I de petit diamètre sont qualifiées de fibres lentes ; elles sont stimulées par un motoneurone à basse fréquence (entre 10 et 20Hz) et sont caractérisées par une contraction lente de longue durée allant de 50 à 100 ms. Elles constituent principalement les muscles demandant une activité contractile prolongée, comme les muscles responsables du maintien de la posture. Les fibres de type I se démarquent également par un réseau capillaire sanguin très développé, leur donnant cette couleur rouge caractéristique (**Figure 8**), et permettant un stockage riche en myoglobine assurant un apport rapide en oxygène ([Kushmerick et al., 1992](#)) (**Tableau I**). Ce type de fibre se caractérise par des molécules de myosine présentant une faible activité ATPasique, d'où la vitesse de contraction lente. On observe également un nombre important de mitochondries caractérisant un métabolisme oxydatif aérobie prédominant ([Krustrup et al., 2004](#)). Leur métabolisme oxydatif allié à un fort rendement énergétique leur confère une résistance à la fatigue ([Kamei et al., 2004](#)).

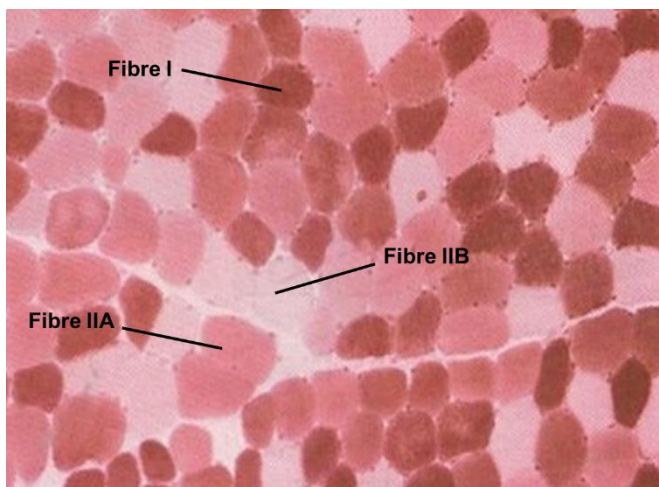


Figure 8 : Coupe transversale d'un muscle squelettique observé au microscope optique après précipitation du produit de la réaction ATPase des filaments épais de myosine. Les différences teintes de colorations correspondent à l'activité ATPase spécifique à chaque type de fibre : les fibres rouges représentent le type I, les fibres roses représentent le type IIA, et les fibres blanches représentent le type IIB.

1.3.2. Les fibres de type IIB

Les fibres de types IIB ont un diamètre supérieur aux fibres de type I ; elles sont stimulées par leurs motoneurones sur de haute fréquence (au-delà à 100Hz) et sur une durée de contraction relativement courte (inférieure à 40 ms). Bien que ce type de fibres présente une capacité de contraction rapide, elles sont peu durantes. Elles sont principalement utilisées lors de mouvements volontaires réclamant force et vivacité ([Schwaller et al., 1999](#)) (**Tableau I**). Les fibres IIB comportent un réseau de capillaire sanguin moins dense, avec très peu de myoglobine, donnant leur apparence blanche contrairement aux fibres de types I (**Figure 8**). Fibres au métabolisme glycolytique prédominant, leur faible capacité oxydative et leur haute teneur en glycogène permettent de produire plus rapidement de l'ATP *via* la glycolyse anaérobie ; la production d'acide lactique ainsi que la production moindre d'ATP (en comparaison à la production d'ATP issue du cycle de Krebs et celui de la chaîne de transport des électrons du système aérobie des fibres de type I) sont ainsi responsables de la fatigabilité des fibres de type IIB ([Krustrup et al., 2004](#)) (**Tableau I**). De plus, les fibres IIB sont constituées de chaîne lourde de myosine avec une forte activité ATPasique, responsable de la production d'une contraction rapide.

I.3.3. Les fibres intermédiaires de type IIA

Les fibres de type IIA sont richement approvisionnées en myoglobine, présentent un grand nombre de mitochondries tout en possédant une forte capacité glycolytique (**Tableau I**). Leur métabolisme mixte et leur activité mitochondriale placent les fibres de type IIA entre les fibres de types I et IIB, leur permettant ainsi de produire une contraction à la fois rapide et pouvant durer dans le temps (Schiaffino & Reggiani, 2011).




Type de fibre		I	IIa	IIb
Caractéristiques morphologiques et structurales	Diamètre de la fibre	Petit	Grand	
	Vascularisation	Riche	Faible	
	Nombre de mitochondries	Elevé	Faible	
	Taille des unités motrices	Petite	Grande	
	Dimension du réticulum sarcoplasmique	Petite	Grande	
	Couleur			
Propriétés fonctionnelles	Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
	Force de contraction	Faible	Elevée	
	Résistance à la fatigue	Elevée	Faible	
Caractéristiques métaboliques	Métabolisme	Oxydatif aérobie	Mixte	Glycolytique anaérobie
	Contenu en myoglobine	Elevé	Faible	
	Réserve en glycogène	Faible	Elevée	
	Réserve en triglycérides	Elevée	Faible	

Tableau I : Caractéristiques des différents types de fibres présents dans les muscles des Mammifères (d'après Gundersen, 2011).

II. La plasticité musculaire

Un muscle n'est pas constitué de fibres musculaires d'une seule et même nature, mais résulte de l'association de deux ou trois types de fibres différentes. Les proportions entre chaque type de fibre au sein d'un même muscle diffèrent en fonction de la contraction musculaire à produire, conférant ainsi au muscle sa spécificité en fonction du type de fibre prédominant. Le typage, la taille ou le volume d'un muscle n'est pas fixe lors de son développement mais est influencé par différents processus physiologiques ou pathologiques dépendants eux-mêmes d'un contexte environnemental (altitude), mode de vie (activité physique régulière ou inactivité physique), régime alimentaire (hyper protéiné ou carences en protéines) et taux d'hormones circulants.

Il est à noter que l'activité physique permet de conditionner le phénotype des fibres musculaires ; ainsi, une activité contractile contre une grande résistance entraîne une transformation partielle des fibres de type I en faveur des fibres de types IIB. De même, une activité physique dite d'endurance favorise la transition des fibres de type IIB vers des fibres de type I et IIA (Kryger & Andersen, 2007). On observe également un changement sur le plan métabolique avec une évolution des fibres au métabolisme glycolytique vers un métabolisme oxydatif (Röckl et al., 2007 ; Simoneau & Bouchard, 1989). Au contraire, l'hypoactivité, telle qu'une immobilisation ou un alitement prolongé, provoque en particulier une atrophie des fibres de type I, additionnée d'une transition des fibres lentes vers des fibres rapides.

La masse musculaire squelettique est régulée par un contrôle dynamique des processus de synthèse et de dégradation des protéines. Au niveau moléculaire, le bilan protéique, c'est-à-dire le ratio entre la synthèse et la dégradation des protéines, ne fonctionne pas comme une opération binaire (synthèse ou dégradation), mais est plutôt comme une somme de plusieurs processus fonctionnant selon des réseaux de signalisation intracellulaires hautement interconnectés. La coordination de l'ensemble de ces réseaux de signalisation est appelée « homéostasie protéique » (Morimoto et al., 2014). Le contrôle de l'homéostasie protéique est complexe et dynamique et se traduit par des changements phénotypiques au fil du temps. Chaque étape ou processus des voies de signalisation responsables de la synthèse ou de la dégradation des protéines a un impact sur l'homéostasie protéique. Un stress exogène ou endogène peut entraîner un déséquilibre de la balance synthèse / dégradation en faveur soit de l'anabolisme ou du catabolisme musculaire.

II.1. L'hypertrophie musculaire

Au cours de l'activité physique régulière, les muscles subissent des facteurs de stress spécifiques pouvant à la fois perturber l'homéostasie, les composants structurels et fonctionnels du muscle par des ajustements hormonaux, l'activation neuronale et des perturbations métaboliques (Flück & Hoppeler, 2003). Au cours de l'exercice, l'ensemble de ces changements physiologiques varie en fonction de l'intensité, du temps et de la fréquence de la pratique sportive. Avec l'entraînement en force, le stress et la charge mécanique sont dominants, tandis que pendant un exercice d'endurance, le stress mécanique est faible mais les perturbations métaboliques qui en découlent peuvent être importantes et prolongées. Ces stress subis pendant l'activité physique, quel que soit le type d'activité, sont limités dans le temps. Cependant, ils ont déclenché une série d'événements moléculaires au sein des cellules musculaires qui visent à préparer et adapter le muscle à des événements futurs similaires.

Ces adaptations spécifiques au stress mécanique subi, améliorent les performances et les rendements des muscles striés squelettiques sollicités à condition que l'exercice soit régulier et répété dans le temps comme lors de l'entraînement physique.

II.1.1. La stimulation mécanique

Nous avons présenté précédemment (paragraphe I.3.) que les fibres musculaires sont fractionnées en plusieurs types de fibres, de nature et de caractéristiques différentes, leurs caractéristiques pouvant évoluer dans certaines conditions comme la pratique régulière d'une activité physique. L'objectif des programmes d'entraînement physique est de développer des habiletés spécifiques propres à la pratique grâce à la plasticité musculaire, pour ainsi augmenter la performance globale de l'individu.

L'entraînement physique, par des stimulations mécaniques répétées, améliore de manière globale les performances physiques, et ce en partie grâce à une augmentation du diamètre des fibres musculaires grâce à un processus appelé « hypertrophie ». L'augmentation de la taille des muscles squelettiques, liée notamment à la pratique d'exercices de résistance, est due à une augmentation de la surface transversale des fibres musculaires individuelles. Des études chez les rongeurs ont mis en évidence que l'augmentation de la taille musculaire était associée à une augmentation du nombre de fibres musculaires ; ce processus est appelé « hyperplasie » (McCall et al., 1996 ; Tamaki et al., 1997). Afin de décrire l'ensemble des facteurs régulateurs de la plasticité du muscle squelettique, nous commencerons par examiner les fondement physiologiques et morphologiques de l'hypertrophie musculaire consécutive à une activité physique d'endurance et de résistance. Nous examinerons ensuite la variabilité de la plasticité musculaire face à l'inactivité physique, face à des variations du régime alimentaire ou suite à des changements de la régulation hormonale.

II.1.1.1. L'impact de l'entraînement aérobic sur les capacités oxydatives

L'entraînement en aérobic se caractérise au niveau musculaire par la capacité à maintenir une intensité de contraction permettant d'accomplir un effort prolongé. Ce type de contraction repose principalement sur la faculté de la cellule à synthétiser de l'ATP de manière aérobic ; ceci sous-entend un apport et une utilisation de l'O₂ de façon optimale par la cellule musculaire lors de l'effort. Des études ont montré que le pourcentage de fibres de type I peut être augmenté en fonction du type d'entraînement pratiqué (Wilson et al., 2012). Ainsi, un travail sur ergocycle à une intensité de 70% de la puissance maximale aérobic pendant 30 min, cinq fois par semaine pendant 6 semaines, conduit à une augmentation de 12% du pourcentage de fibres de type I (Howald et al., 1985), tandis qu'un entraînement par intermittence de haute intensité en course à pied (sprint) provoque une conversion des fibres à contraction lente en fibres à contraction rapide (Sjodin & Jansson, 1993). La pratique régulière d'une activité physique de type endurance engendre donc des adaptations qui permettent au muscle squelettique d'acquérir un métabolisme énergétique à prédominance oxydative (Durante et al., 2002) (Figure 9), résultant d'une augmentation de l'expression de protéines musculaires en lien avec le métabolisme oxydatif (Durante et al., 2002 ; Gundersen, 2011).

Lors d'un effort physique de longue durée, on constate une importante consommation d'ATP ; cette diminution du taux d'ATP intracellulaire provoque une perturbation du ratio AMP/ATP, avec pour

conséquence l'activation du senseur énergétique de la cellule, la protéine AMPK (voir paragraphe III.3.4.). Lors de l'exercice, l'AMPK inhibe tout d'abord les voies et fonctions cellulaires fortes consommatrices d'ATP, telles que la protéosynthèse et la lipogenèse (Dreyer et al., 2006 ; Richter & Ruderman, 2009). Puis, dans un second temps, la stimulation de l'AMPK permet une élévation des capacités oxydatives de la cellule, en privilégiant l'oxydation des acides gras au lieu des glucides (Dzamko et al., 2008 ; Lee et al., 2006) tout en favorisant la biogenèse mitochondriale (Irrcher et al., 2003 ; O'Neill et al., 2011 ; Zong et al., 2002) (Figure 9). Des études ont montré une augmentation du volume et de la taille des mitochondries et de l'activité mitochondriale à la suite d'un réentraînement en endurance (Hawley, 2002 ; Hood, 2009 ; Irrcher et al., 2003). L'entraînement en endurance engendre un accroissement de l'angiogenèse et un remodelage important du réseau capillaire du muscle squelettique (McAllister et al., 2005) (Figure 9). Ces adaptations mitochondriales et capillaires confèrent aux régions musculaires richement pourvues en fibres de type I une forte capacité oxydative (Laughlin et al., 2008 ; Rossiter et al., 2005).

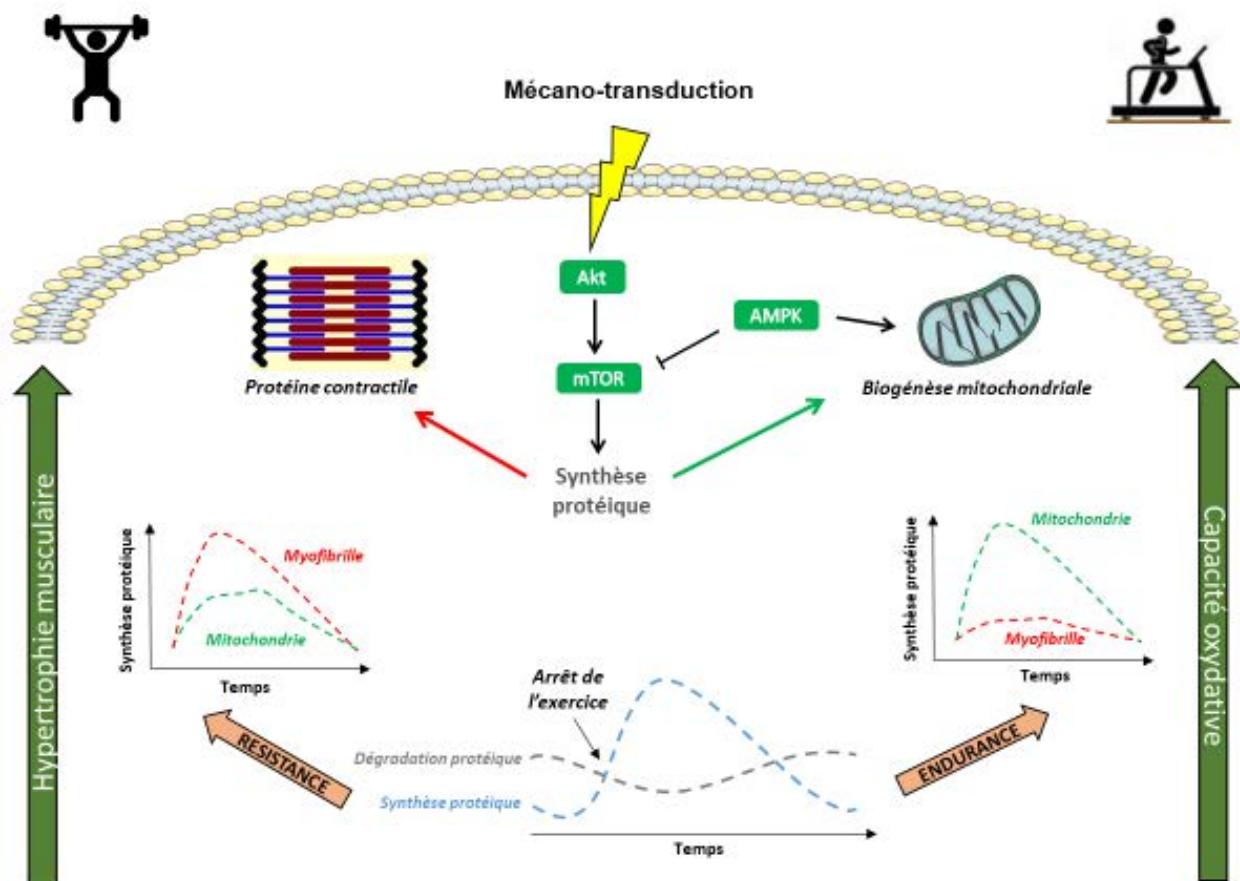


Figure 9 : Effets d'un entraînement de type résistance ou endurance sur le système musculaire. Schématisation de la cascade des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la synthèse des protéines du muscle myofibrillaire et biogenèse mitochondriale (flèche et trait discontinu rouge représente la synthèse myofibrillaire ; flèche et trait discontinu vert représente la synthèse mitochondriale).

II.1.1.2. L'impact de l'entraînement en résistance sur la masse musculaire

Contrairement aux activités d'endurance, l'entraînement en résistance initie principalement des changements au niveau structural du muscle. Il est bien établi que la contraction musculaire contre résistance conduit de manière systématique à une augmentation du volume et de la force musculaires. Des études montrent que des exercices en résistance à haute intensité induisent au niveau du quadriceps une augmentation de la masse maigre, un accroissement de la section transversale des fibres musculaires, et un important développement de la force musculaire avec une élévation de la contraction volontaire maximale et de l'activité électromyographique (Seynnes et al., 2007 ; Verdijk et al., 2009) (**Figure 9**). À la suite d'un entraînement en force, les adaptations structurales du muscle s'opèrent principalement sur les fibres de type II : leur surface de section transversale augmente, caractérisant une hypertrophie des fibres, leur donnant la capacité de résister à des contraintes de plus en plus élevées (Campos et al., 2002 ; Kryger et al., 2007 ; Verdijk et al., 2009).

Lorsque le muscle squelettique subit une contrainte mécanique de haute intensité, ce stress aura pour conséquence de générer des stimuli au niveau des cellules musculaires constituant les myofibrilles. Cette stimulation provoque une suractivation des facteurs myogéniques, entraînant l'augmentation de la quantité de protéines contractiles myofibrillaires, telles que l'actine et la myosine, ce qui permet d'accroître le nombre de sarcomères au sein de la fibre musculaire à la suite de cette activité physique en résistance (Kosek et al., 2006 ; Paul et al., 2002 ; Toigo et al., 2006) (**Figure 9**). La croissance musculaire induite par les exercices de force est directement liée à l'activation des voies de signalisation régulant l'anabolisme au sein des cellules musculaires, l'hypertrophie musculaire se traduisant inévitablement par le déplacement de l'homéostasie protéique en faveur des voies de protéosynthèse et au détriment des voies de signalisation régulant la dégradation des protéines (Schoenfeld, 2010).

La voie de signalisation PI3K / Akt / mTOR a été identifiée comme étant l'une des voies les plus stimulées à la suite d'un entraînement en force (voir paragraphe : III.2.2.) (Bodine, 2006 ; Lim et al., 2017 ; Ma et al., 2013 ; Sasai et al., 2010). En amont de la voie de synthèse PI3K / Akt / mTOR se trouve l'IGF-1, considéré comme l'un des facteurs de croissance ayant le plus d'impact sur l'hypertrophie du muscle squelettique. Durant l'activité physique, la quantité d'IGF-1 présent dans le muscle est plus élevée tandis que ses récepteurs (IGF1-1R) sont plus sensibles (Adams & McCue, 1998 ; Chen et al., 2017a) (**Figure 9**). En période de post-entraînement, les taux d'IGF-1 et la sensibilité de ses récepteurs restent très élevés dans le muscle, et les effets myogéniques résultant de cette voie de signalisation restent observables jusqu'à 72 heures après la fin de l'activité physique (Chen et al., 2017a ; McKay et al., 2008 ; Nassis et al., 2005).

Une étude de Léger et ses collaborateurs (2006) réalisée chez l'homme montre qu'à la suite d'un entraînement en résistance, une hypertrophie musculaire se développe, associée à une hyperphosphorylation des protéines Akt, GSK-3 β et mTOR ; cependant, les auteurs n'ont pas observé de changement du niveau de phosphorylation des protéines P70S6K et 4E-BP1 en aval de mTOR (l'ensemble de ces protéines majeures de la voie Akt / mTOR seront détaillées dans le paragraphe III.2.2.3.) (Leger et al., 2006). Au contraire, d'autres études n'ont montré aucune modification de Akt, tandis que mTOR et P70S6K étaient activées suite à un protocole de force chez

l'homme (Burd et al., 2010 ; Terzis et al., 2010). Cette discordance d'activation des protéines de la voie de synthèse résulterait des différences dans l'exécution des protocoles, le choix des exercices, le moment de la journée où sont réalisés les exercices, le type de muscle mesuré et surtout le temps écoulé entre la fin du protocole de force et le moment des prélèvements musculaires pour l'analyse, l'ensemble de ces paramètres pouvant sérieusement influencer les données et les interprétations qui en découlent.

Chez l'homme, à la suite d'un protocole de réentraînement en force de longue durée (2 mois), on peut observer conjointement une activation de la voie Akt / mTOR et une diminution d'expression du facteur de transcription FoxO1 au niveau nucléaire (voir paragraphe : III.3.3.) (Léger et al., 2006). Une étude menée chez le rongeur a analysé les effets moléculaires d'un entraînement chronique (3 mois) en résistance ; les données révèlent que l'expression des atrogènes spécifiques du muscle squelettique, MAFbx et MuRF-1 (voir paragraphe : III.3.2.), est significativement diminuée dans le groupe de rats ayant suivi les séances d'exercice en résistance (Zanchi et al., 2009). Ces données démontrent qu'une activité physique de force peut à la fois influencer la régulation des processus anaboliques et cataboliques de la cellule musculaire. Ces adaptations sont la conséquence d'un entraînement en résistance sur le long terme, les effets cumulatifs de chaque séance entraînant un solide changement de l'équilibre de l'homéostasie protéique en faveur de la synthèse des protéines.

Avec FoxO, la myostatine est l'autre régulateur négatif de la masse musculaire, la surexpression de celui-ci engendrant une importante atrophie musculaire (voir paragraphe : III.3.3.) (Baumann et al., 2003 ; Dasarathy et al., 2004 ; Rodriguez et al., 2014). De nombreuses études ont démontré que l'entraînement en force est associé à une régulation négative de l'expression de la myostatine (Heinemeier et al., 2007 ; Kim et al., 2005 ; Rodriguez et al., 2014 ; Roth et al., 2003) (Figure 9). Les exercices en force et de haute intensité, pratiqués sur une longue période ou de manière aigue, répriment de façon importante les taux d'ARNm codant pour la myostatine, que ce soit chez l'homme (Roth et al., 2003 ; Kim et al., 2005) ou l'animal (Heinemeier et al., 2007). Si FoxO et la myostatine, deux des éléments clés des processus de protéolyse, sont réprimées lors d'exercices physiques en résistance, cela suggère l'existence d'une corrélation entre l'hypertrophie musculaire induite par l'activité physique de type force et la sous-expression des facteurs et protéines clés des différentes voies de protéolyse musculaire.

II.1.1.3. L'impact d'une contraction artificielle sur la cellule musculaire

Comme nous l'avons vu précédemment, les effets de différentes modalités d'entraînement, comprenant des exercices de résistance ou d'endurance ont fait l'objet de nombreuses études notamment dans l'analyse des mécanismes d'adaptations moléculaires et métaboliques de la cellule musculaire, à la suite de ce type de stimulations (Verdijk et al., 2009 ; Wilson et al., 2012). De ce fait, plusieurs approches *in vitro* utilisant des cellules de muscles squelettiques en culture issues de lignée cellulaire ou de biopsie chez l'homme ou le rongeur, ont été utilisées dans l'investigation de ces différents mécanismes physiologiques observés à l'exercice (Lambernd et al., 2012 ; Tarum et al., 2017). Plusieurs études ont mis en évidence que les contractions musculaires artificielles issues des protocoles et programmes de stimulation mécanique par impulsions électriques *in vitro* sont très proches des effets et adaptations observés *in vivo* (Nedachi et al., 2008 ; Manabe et al., 2012). Les différents systèmes d'appareillage existant à ce jour permettent d'intervenir sur plusieurs paramètres

de contraction de la cellule musculaire squelettique tels que l'intensité, la fréquence et la durée de contraction. A la suite d'un programme de stimulation électrique sur cellule musculaire mise en culture, des études ont pu observer, similairement à l'homme (Manabe et al., 2012), une libération du calcium, une réduction de la concentration d'ATP lors de la contraction musculaire, une sensibilité à l'insuline et une capacité oxydative augmentées plusieurs heures après l'arrêt de la stimulation électrique (Nedachi et al., 2008 ; Lambernd et al., 2012). Une étude de Tarum et ses collaborateurs ont pu montrer, suite à un protocole de stimulation électrique de cellules musculaires humaines issues du vaste latéral, un phénomène d'hypertrophie sur ces cellules. Démonstré par une hyper-phosphorylation des protéines de la voie de synthèse PI3K / Akt / mTOR (mTOR et 4E-BP1 notamment), associée à une augmentation du diamètre des myotubes, synonyme d'hypertrophie musculaire. De plus, les auteurs précisent que la durée suivant le programme de stimulation électrique (ce qui correspondrait à la période de repos post-entraînement en résistance *in vivo*) est cruciale dans l'induction de modifications morphologiques, telles que la promotion de l'hypertrophie des cellules musculaires squelettiques (Tarum et al., 2017). L'ensemble de ces données suggèrent que les protocoles de stimulation mécanique par impulsions électriques de modèles *in vitro* sont des modèles pertinents dans l'étude des changements moléculaires, métaboliques et morphologiques de la cellule musculaire squelettique en réponse à l'exercice.

L'activité physique permet de conditionner le phénotype des fibres musculaires ; ainsi, une activité contractile contre une grande résistance entraîne une transformation partielle des fibres de type I en faveur des fibres de types IIB. Au contraire, une activité physique dite d'endurance favorise la transition des fibres de type IIB vers des fibres de type I et IIA (Kryger & Andersen, 2007). On observe également un changement sur le plan métabolique avec une évolution des fibres au métabolisme glycolytique vers un métabolisme oxydatif (Röckl et al., 2007 ; Simoneau & Bouchard, 1989). Les données exposées précédemment indiquent que l'entraînement physique est capable d'activer les protéines clés de la protéosynthèse tout en atténuant les voies de signalisation associées à la dégradation protéique (Bowen et al., 2015 ; Gould et al., 2013 ; Snijders et al., 2009). L'exercice physique représente donc l'un des moyens d'intervention pouvant atténuer ou même inverser les mécanismes d'atrophie musculaire observés dans certaines pathologies.

II.2. L'atrophie musculaire

Les mécanismes responsables de la perte de masse musculaire observée dans la sédentarité, l'alitement, le vieillissement ou encore la cachexie... peuvent être multifactoriels, avec pour ligne de mire des perturbations moléculaires qui influencent directement le contrôle de la synthèse et de la dégradation des protéines des cellules musculaires. La dégradation des protéines au sein du muscle est un processus indispensable dans le cycle du renouvellement des cellules. Cependant, on parlera d'atrophie musculaire dès lors que la dégradation des protéines est accrue et supérieure au taux de synthèse, ce qui entraîne non seulement une réduction de la masse musculaire, mais également une modification de la typologie musculaire, avec une inversion des fibres musculaires (lent <=> rapide) (Ciciliot et al., 2013). D'autres hypothèses évoquent une capacité amoindrie du muscle à régénérer ses cellules, ainsi qu'un trouble du système contractile (Aagaard et al., 2010 ; Zhang et al., 2010). Par conséquent, l'atrophie musculaire altère le tissu musculaire à la fois sur le plan structurel (diminution du volume musculaire) mais aussi fonctionnel avec une perturbation des propriétés contractiles du muscle.

II.2.1. L'inactivité

Bien que le terme « désentraînement » puisse être utilisé de manière appropriée pour indiquer l'adaptation structurelle et fonctionnelle qui suit l'interruption d'un programme d'entraînement, le terme de « déconditionnement » fait référence à un niveau d'activité en dessous du niveau de base journalier recommandé. Cette hypoactivité peut être observée à la suite de problème de santé ; ainsi, le fait de rester au lit lors d'une convalescence, ou encore l'immobilisation d'un membre dans un plâtre sont des causes fréquentes de déconditionnement et sont suivies d'une diminution de force et de masse musculaire (Franssen et al., 2002). Au niveau physiologique, la notion de déconditionnement se réfère à une réduction de la capillarisation et de l'activité oxydative des fibres musculaires. L'hypoactivité sévère, telle qu'un alitement prolongé, entraîne une importante perte musculaire, de l'ordre de 3% à 5% de la masse maigre du sujet par semaine (de Boer et al., 2007). Lors d'un test de force / vitesse auprès de sujets alités après plusieurs semaines, on observe une diminution de la puissance musculaire proportionnelle à la perte de la masse musculaire (Ferretti et al., 2001). L'atrophie musculaire, c'est-à-dire la diminution de la surface transversale des fibres musculaires, mais également la perte de force et de puissance, touche principalement les fibres lentes (Trappe et al., 2004). Ces dernières présentent une réduction de leur tension, c'est-à-dire une diminution de la force en fonction de la surface de la section transversale des fibres, indiquant un remodelage des myofibrilles (Trappe et al., 2004). La diminution de l'activité journalière engendre en plus d'une diminution de la proportion de fibres lentes, une transition des fibres musculaires lentes à rapides (Gallagher et al., 2005). La réduction de l'intensité et du temps d'activité sont les principaux facteurs responsables des modifications moléculaires intracellulaires menant à une atrophie musculaire. Cette atrophie musculaire résulterait d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines. Bien que les deux systèmes cataboliques majeurs, l'autophagie et l'ubiquitine protéasome, soient activés et contribuent à la progression de l'atrophie, une diminution de la synthèse protéique ne peut être exclue (Brocca et al., 2012).

II.3. La plasticité musculaire et nutrition

Des études rapportent que la quantité et la nature des aliments ingérés sont des facteurs déterminants dans le contrôle de la masse musculaire (Holm et al., 2008 ; Scott et al., 2010). Une augmentation de la prise alimentaire journalière au-dessus des valeurs de base calculées en fonction du besoin métabolique et de l'activité physique propres à chaque individu, influera sur l'équilibre du bilan énergétique, provoquant une action concomitante en faveur des voies de synthèse (lipogénèse, glycogénèse et protéosynthèse). Au contraire, une sous-alimentation place l'organisme dans un état de déficit énergétique ; les processus anaboliques sont peu à peu inhibés, alors que les voies cataboliques seront fortement stimulées dans le but d'approvisionner l'organisme en substrats énergétiques issus des stocks endogènes. Ce processus compensatoire se traduit par une élévation de l'ensemble des voies de dégradation (lipolyse, glycolyse et protéolyse).

II.3.1. La plasticité musculaire et nutrition

II.3.1.1. Le jeûne

La privation volontaire d'absorption de tout substrat énergétique lors d'une période donnée, correspondant à un jeûne alimentaire, provoque au niveau musculaire une atrophie. Les protéines musculaires sont dégradées *via* une suractivation des systèmes d'autophagie et du protéasome, due en majeure partie à une augmentation de la sécrétion de glucocorticoïdes (McGhee et al., 2009). Dans le même temps, une réduction de l'activité de protéosynthèse est observée, expliquée par la diminution d'activation de la voie de signalisation Akt / mTOR et par la stimulation de l'AMPK, un senseur métabolique ayant pour rôle de réprimer la voie anabolisante lors de carence énergétique (McGhee et al., 2009).

II.3.2. L'alimentation nutritionnelle

II.3.2.1. L'alimentation riche en acides gras

En cas d'excès de nutriments, et en particulier les lipides, les réserves en adipocytes (tissu adipeux) ne peuvent pas stocker l'ensemble des lipides ingérés, qui seront donc redirigés vers d'autres tissus comme le muscle squelettique, entraînant une lipotoxicité et des perturbations importantes de l'utilisation du glucose. Chez les souris et l'homme, une accumulation excessive de tissu adipeux provoque une diminution de la masse musculaire, appelée obésité sarcopénique. Les souris dépourvues de leptine, hormone de la satiété, deviennent obèses et présentent une réduction de la masse maigre, comparable à celle observée chez l'homme souffrant d'obésité morbide (Kemp et al., 2009). La majeure partie des individus obèses présentent une diminution du ratio de fibre de type I / fibre de type II, et ce en faveur des fibres glycolytiques (Tanner et al., 2002). Outre les changements typologiques, une exposition à long terme à une quantité trop importante d'acides gras compromet également la fonction musculaire. Que ce soit chez l'homme obèse ou chez des souris soumises à un régime riche en graisse, il y a une forte tendance à une réduction de la force musculaire (Shortreed et al., 2009).

II.3.2.2. L'alimentation riche en acides aminés

L'ingestion d'une quantité suffisante de protéines d'origine animale ou végétale et d'acides aminés essentiels peut jouer un rôle important dans les adaptations musculaires. Par exemple, chez les hommes jeunes, il a été démontré que la supplémentation en protéines combinée à un entraînement en résistance augmentait de manière significative la masse maigre et la surface de la section transversale des fibres musculaires par rapport à un placebo non énergétique ou glucidique (Hartman et al., 2007 ; Jose et al., 2010). Une étude chez l'homme a comparé une supplémentation riche en protéines *versus* glucides, consommés avant et après un exercice de résistance pendant 14 semaines. Les résultats ont révélé que seul le groupe ayant ingéré le supplément protéique présentait une hypertrophie des fibres musculaires de type I et II, avec une augmentation de 20% et 25%, respectivement (Andersen et al., 2005). Une autre étude a également comparé l'impact sur la morphologie musculaire de deux sources de protéines, le lactosérum (protéine animale) *versus* le soja (protéine végétale), pris après un entraînement en résistance sur un programme de 12 semaines. Seule

la supplémentation en protéines d'origine animale a permis d'augmenter la masse maigre et la surface de section transversale des fibres de type II (Hartman et al., 2007).

Au niveau moléculaire, on dénombre 20 acides aminés dits standards ; 9 parmi eux sont dits essentiels pour le corps humain, du fait que l'organisme est incapable de les synthétiser par lui-même, et devant donc être forcément apportés par l'alimentation. Les acides aminés sont les éléments indispensables dans la fabrication d'une protéine par le ribosome, suite à la traduction de l'ARN messager. L'ingestion de protéines ou d'acides aminés essentiels branchés entraîne l'activation des protéines clés de la voie de synthèse des protéines PI3K / Akt / mTOR (Jewell et al., 2013 ; Sancak et al., 2008, 2010). À l'inverse, la pénurie en acides aminés est fatalement associée à une diminution considérable de la synthèse des protéines musculaires (Kimball & Jefferson, 2006 ; Martinet et al., 2005). En ce sens, plusieurs études ont montré qu'un régime alimentaire carencé en protéines et en acides aminés altère les processus de protéosynthèse, avec une inhibition avérée des effecteurs de mTOR, ainsi que des protéines P70S6K et 4E-BP1 (Gallinetti et al., 2013 ; Hara et al., 1998 ; Ma et al., 2015).

Des recherches sur l'impact des différents acides aminés sur la synthèse protéique révèlent que les acides aminés branchés (BCAA, Branched Chain Amino Acids), tels que la valine, l'isoleucine et tout particulièrement la leucine, sont les acides aminés ayant un impact majeur sur l'anabolisme protéique. La leucine a été mentionnée comme étant l'acide aminé ayant le plus haut pouvoir de stimulation de la synthèse protéique, avec une efficacité supérieure à tous les autres acides aminés (Churchward-Venne et al., 2012 ; Norton et al., 2009 ; Stark et al., 2012). Des protocoles menés chez l'homme comparant l'ingestion de boisson richement supplémentée en acides aminés essentiels branchés ou en leucine seule révèlent que les sujets ayant consommé la leucine présentaient des taux de synthèse protéique plus élevés que le groupe supplémenté en acides aminés essentiels (Dreyer et al., 2006 ; Koopman et al., 2005). De nombreux protocoles de recherche réalisés *in vivo* (que ce soit par ingestion ou par injection) et *in vitro* rapportent qu'à des concentrations élevées, les trois BCAAs (leucine, isoleucine et valine) provoquent une hyper-phosphorylation de mTOR et de ses cibles en aval, 4E-BP1 et P70S6K, permettant un accroissement important des taux de synthèse de protéines dans les muscles squelettiques (Atherton et al., 2010 ; Chen et al., 2011b ; Gran & Cameron-Smith, 2011 ; Neishabouri et al ; 2015).

II.4. Les hormones et plasticité musculaire

II.4.1. L'hormone thyroïdienne

Les variations de l'hormone thyroïdienne (hypothyroïdie et hyperthyroïdie) influencent le phénotype des fibres musculaires. Dans ce processus de transition, l'hormone thyroïdienne favorise un passage des fibres lentes à rapides ; inversement, l'hypothyroïdie est associée à une redistribution majoritairement lente des fibres musculaires (Ciciliot et al., 2013). La transition consécutive à un changement de l'état thyroïdien dépend fortement de la composition initiale du type de fibre du muscle. Par exemple, en réponse à la transition de fibre rapide à lente induite par l'hypothyroïdie chez le rat (Ciciliot et al., 2013), l'expression de MyHC-2A est diminuée dans le soléaire, muscle postural composé majoritairement de fibres musculaires de type I et IIA, alors qu'elle est augmentée dans les muscles comme le long extenseur des orteils (EDL, *Extensor digitorum longus*) ou le tibial antérieur

(TA, *Tibialis anterior*), muscles composés fortement de fibres de type IIB. Il est intéressant de noter que les effets des variations des hormones thyroïdiennes peuvent interagir avec les actions d'autres facteurs responsables d'un changement de la typologie musculaire. Par exemple, l'hyperthyroïdie peut contrecarrer le passage de fibre rapide à fibre lente induit par une stimulation mécanique chronique à basse fréquence (Hamalainen et al., 1996 ; Kirschbaum et al., 1990), tandis que l'hypothyroïdie peut renforcer les effets de la stimulation mécanique (Kirschbaum et al., 1990). L'expression des isoformes de la myosine, marqueurs clés du type de fibre musculaire, est l'une des cibles des hormones thyroïdiennes (Pette, D., & Staron, 2000).

Autre que le phénotype, la contraction musculaire est profondément influencée par les hormones thyroïdiennes. Ces effets fonctionnels sont le résultat de modifications moléculaires qui impliquent des protéines telles que la myosine ou les protéines de régulation des filaments fins (tropomyosine et complexe de troponine). Le principal mode d'action des hormones thyroïdiennes est la régulation de la transcription des gènes par l'intermédiaire de l'action des récepteurs nucléaires (Harvey et al., 2002). Un grand nombre de gènes spécifiques aux muscles contiennent des promoteurs sensibles en réponse aux hormones thyroïdiennes (Clement et al., 2002), par exemple les gènes codant pour les isoformes de pompe calcique (SERCA), des enzymes métaboliques, le transporteur de glucose GLUT4, des protéines mitochondriales, les récepteurs β -adrénergiques, ou encore les isoformes de MyHC (Clement et al., 2002).

II.4.2. Les hormones stéroïdiennes androgènes

La testostérone est un stéroïde androgène avec de puissants effets anaboliques. L'action de la testostérone sur les muscles squelettiques entraîne une augmentation de la taille des fibres musculaires, et l'hypertrophie musculaire est la principale raison de son utilisation pharmacologique. La testostérone et l'ensemble des stéroïdes sont utilisés pour augmenter la masse maigre, réduire la masse grasse, améliorer les performances, mais aussi supporter des périodes d'entraînement intensif (Kadi et al., 2008). Il a été mis en évidence chez l'homme une relation entre la concentration plasmatique en testostérone avec la masse, la taille et la force musculaires. Des études ont montré que la testostérone est capable d'induire une augmentation significative de la masse musculaire uniquement en l'associant avec un exercice de résistance (Wilkinson et al., 2006). La testostérone induit une hypertrophie des fibres musculaires de type I et de type II. L'augmentation de la synthèse des protéines est le principal mécanisme par lequel la testostérone induit une augmentation de la taille des fibres musculaires. L'activité des transporteurs membranaires des acides aminés de la cellule musculaire est inchangée, ce qui suggère une réutilisation accrue des acides aminés intracellulaires. Un aspect important du mécanisme par lequel la testostérone induit une hyperplasie des fibres musculaires est la promotion de la myogenèse, basé sur l'activation des cellules satellites, prolifération et différenciation des cellules musculaires (Kadi et al., 2008).

II.4.3. Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des hormones appartenant à la classe stéroïdienne. Les actions pléthores des glucocorticoïdes vont du contrôle de la réponse immunitaire et inflammatoire à la stimulation du métabolisme et à la régulation de l'activité du système nerveux central (Rhen & Cidlowski, 2005). L'administration exogène pour des raisons thérapeutiques ou la surproduction

endogène de glucocorticoïdes entraîne au niveau de la balance protéique, une diminution du taux de synthèse des protéines et une suractivation des voies de signalisation responsables de la dégradation des protéines, avec pour conséquence une atrophie musculaire (Lofberg et al., 2002). Les glucocorticoïdes inhibent la voie de synthèse des protéines en agissant principalement sur la phosphorylation de la protéine de liaison 4E-BP1 à eIF4E et de la protéine ribosomale S6 kinase 1 (S6K1), deux protéines jouant un rôle clé dans le mécanisme de synthèse des protéines en contrôlant la traduction de l'ARNm (Dennis et al., 2002). Parallèlement à cette inhibition de la protéosynthèse, les glucocorticoïdes stimulent la protéolyse dans le muscle squelettique par l'activation des principaux systèmes protéolytiques cellulaires, notamment le système ubiquitine-protéasome, le système lysosomal (cathepsine) et le système dépendant du calcium (calpaïnes) (Hasselgren, 1999). L'atrophie des fibres musculaires de type II est davantage prononcée que celle des fibres de type I (Ciciliot et al., 2013). Chez l'homme et l'animal, les conséquences de l'action prolongée des glucocorticoïdes sur les muscles squelettiques sont caractérisées par une atrophie des fibres qui affecte principalement les fibres rapides, par un changement de l'expression d'isoforme de la myosine rapide à lente, et par l'hétérogénéité de la section transversale des fibres avec l'apparition de fibres musculaires atrophiques et nécrotiques (Ciciliot et al., 2013). Ce changement phénotypique associé à la perte de fibres musculaires est corrélé à la diminution des performances et à la faiblesse musculaire (Riso et al., 2008).

En résumé, les muscles squelettiques ont la capacité de modifier leurs propriétés structurelles et fonctionnelles, afin d'effectuer de nouvelles tâches ou de répondre à de nouvelles contraintes. La plasticité des fibres musculaires peut survenir à la suite de différentes variations environnementales, mécaniques, métaboliques et hormonales. Les perturbations moléculaires issues de ces variations peuvent être détectées par de multiples capteurs, sarcomériques, métaboliques ou des récepteurs membranaires. La stimulation de ces capteurs déclenche des cascades de voies de signalisation intracellulaires pouvant entraîner des modifications de la taille (hypertrophie et atrophie) et du type de fibre (transition phénotypique). Les changements de taille des fibres musculaires traduisent un déséquilibre de la balance protéique, avec soit une hypertrophie musculaire résultant d'une activation de la protéosynthèse et d'une réduction importante de la protéolyse, ou inversement dans le cas de l'atrophie musculaire. Les changements de phénotypes musculaires traduisent d'une reprogrammation de la transcription des gènes conduisant à un remodelage des propriétés contractiles des fibres (transition entre un phénotype lent et rapide) ou du profil métabolique (transition entre un métabolisme glycolytique et oxydatif).

III. La régulation de la masse du muscle squelettique

III.1. La myogenèse

La formation et le développement des fibres musculaires sont assurés par le processus de myogenèse. Le point de départ de la myogenèse correspond aux cellules souches mononucléées appelées cellules satellites, majoritairement quiescentes et localisées en périphérie des fibres musculaires (Le Grand & Rudnicki, 2007). Ces cellules satellites vont être par la suite, être activées par des facteurs de transcription ayant pour conséquence la sortie de leur état de quiescence (**Figure 10**). Suite à leur activation en myoblastes (cellules mononucléées), les cellules entrent dans une phase de prolifération avant de sortir du cycle cellulaire pour fusionner entre elles et se différencier en myotubes (cellules plurinucléées) (Andrés & Walsh, 1996) (**Figure 10**). Cette fusion dite primaire donne naissance à des myotubes contenant très peu de noyaux. Les myoblastes n'ayant pas fusionné entre eux s'associent avec des myotubes préformés, cette fusion secondaire donnant ainsi des myotubes matures ayant un contenu en noyaux plus important (Andrés & Walsh, 1996). Au niveau morphologique, l'indice de fusion peut nous renseigner sur le taux de différenciation cellulaire. C'est le rapport entre le nombre de noyaux à l'intérieur des myotubes et l'ensemble des noyaux dans le périmètre d'analyse. Enfin, la toute dernière étape de la myogenèse est la spécialisation des myotubes en fibres musculaires fonctionnelles, comportant une succession d'unités excitables et contractiles. Ces fibres musculaires matures concentrent des cellules souches disponibles à la fois pour la croissance et la régénération du système musculaire. Le développement du muscle squelettique relève de deux étapes importantes de la myogenèse, la prolifération et la différenciation cellulaires, toutes deux contrôlées par les facteurs de transcriptions myogéniques.

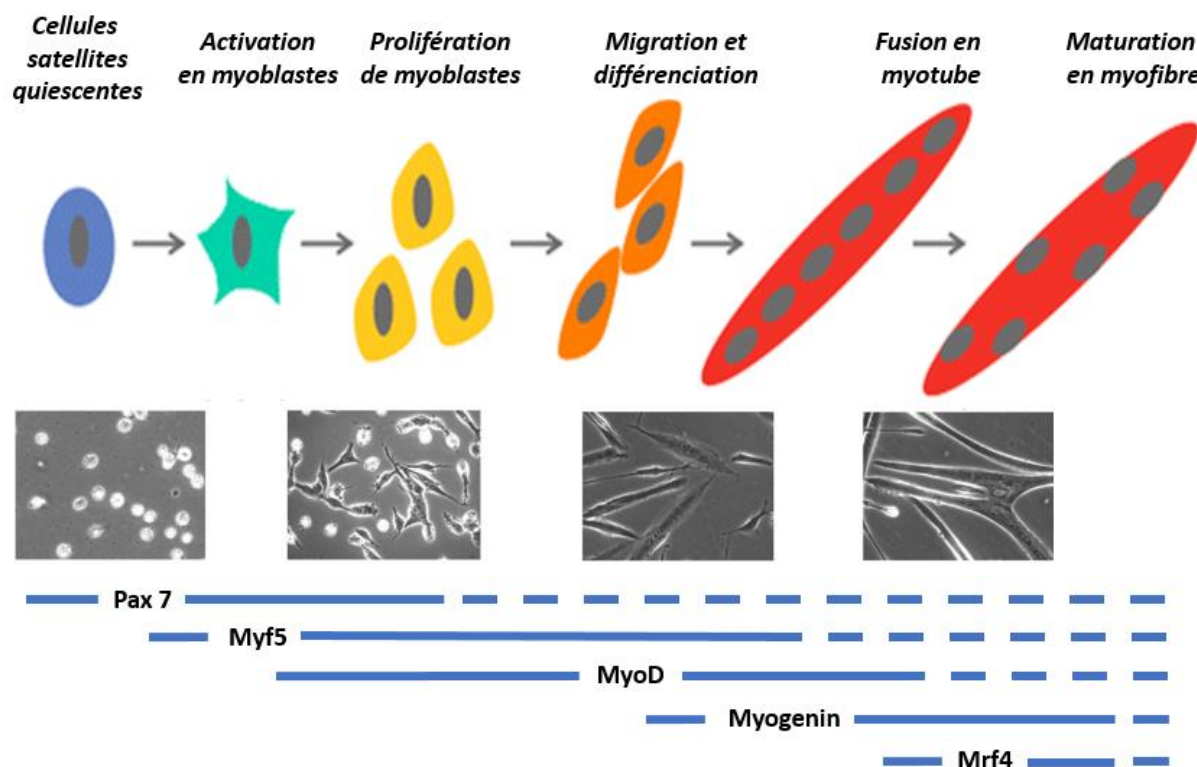


Figure 10 : Représentation schématique de la myogenèse et des différents facteurs de transcription impliqués (d'après Zanou & Gaily, 2013).

III.1.1. Les mécanismes généraux de la myogenèse

La spécialisation des cellules satellites en cellules musculaires nécessite l'action du facteur de transcription Pax 7 (Paired box 7). En aval de Pax 7, la famille des MRF (*Myogenic Regulatory Factor*) regroupe des facteurs de transcription clés et spécifiques du développement du muscle squelettique, considérés comme des marqueurs de la spécialisation terminale de la cellule musculaire (Pownall et al., 2002) (**Figure 10**). De plus, les MRF sont impliqués dans chaque phase de la myogenèse, que ce soit la spécialisation des cellules satellites en myoblastes ou la différenciation des myoblastes en myotubes (Le Grand & Rudnicki, 2007). Les MRF correspondent aux facteurs de transcription suivants : MyoD, Myf5, la myogénine (MyoG), et MRF4.

Contrairement à Pax 7, les facteurs de transcription myogéniques MyoD et Myf5 sont exprimés pendant les premières phases de la myogenèse. Le facteur Myf-5, exprimé précocement, contrôle la prolifération des cellules satellites, alors que MyoD est à l'origine de l'arrêt de la phase proliférative précédant la différenciation cellulaire (Pownall et al., 2002) (**Figure 10**). L'expression de Pax 7, Myf-5 et MyoD, joue un rôle crucial dans la formation des cellules musculaires, par la différenciation des cellules satellites en myoblastes (Le Grand & Rudnicki, 2007 ; Zammit et al., 2006).

Des études *in vitro* sur des cellules musculaires n'exprimant plus Myf5 montrent une diminution importante du nombre de myoblastes, tandis que la perte de MyoD induit le maintien de l'état de quiescence des cellules satellites, permis par une élévation de la prolifération cellulaire au lieu de la différenciation myogénique (Megeney et al., 1996 ; Rudnicki et al., 1993 ; Sabourin et al., 1999). Les myoblastes mononucléés, déterminés et allongés, devenus des myocytes à la suite de l'expression des facteurs myogéniques primaires (MyoD et Mrf-5), s'alignent et fusionnent pour former des cellules plurinucléées appelées myotubes (**Figure 10**). La migration et l'agglomération des myoblastes sont des prérequis cruciaux à l'étape de fusion en vue de la formation de myotubes ; il est à noter que l'action des molécules d'adhésion de la famille des cadhérines jouent un rôle majeur dans la fusion efficace des myoblastes (Hollnagel et al., 2002). Les facteurs de différenciation MyoG et MRF4 ne sont pas impliqués dans le développement ou le renouvellement des cellules satellites, mais leur expression plus tardive dans la myogenèse est une étape capitale dans la différenciation terminale des myotubes et la détermination des futures fibres musculaires matures (Gayraud-Morel et al., 2007). Une étude menée sur des souris présentant un défaut d'expression post-natale de MyoG a montré que ces souris présentaient une masse musculaire réduite, suggérant ainsi que l'absence de MyoG inhibe la différenciation des myoblastes et la croissance tissulaire (Knapp et al., 2006). En toute fin de processus, les noyaux situés au centre de la myofibre vont se délocaliser vers sa périphérie.

Les différentes phases de la myogenèse sont influencées par d'autres facteurs que les MRF. Ainsi, les facteurs de croissance tels que IGF-1 (Insulin-like growth factor) sont des effecteurs de la prolifération cellulaire (Engert et al., 1996). On note également des protéines inhibitrices de la myogenèse, comme la myostatine qui agit comme un régulateur négatif en inhibant les facteurs prolifératifs et les facteurs de différenciation cellulaire (Ríos et al., 2002). La formation et la croissance musculaires sont également influencées par des voies de signalisation intracellulaires responsables à la fois de la synthèse et la dégradation des protéines, élément fondamental au bon développement du muscle squelettique.

III.2. L'anabolisme protéique

III.2.1. Les étapes de la synthèse d'une protéine

III.2.1.1. La transcription de l'ADN

A l'origine du processus de synthèse d'une protéine se trouve l'ADN, contenant l'information indispensable dont la cellule a besoin pour synthétiser des protéines. Cette information génétique, ce code, sera tout d'abord répliqué lors d'une étape appelée transcription. Lors de ce processus, l'information contenue dans le brin d'ADN sera reproduite en une nouvelle molécule contenant majoritairement l'information originaire du segment d'ADN copié : c'est l'ARN messager (ARNm) (Cramer & Woodhead) (Figure 11). La transcription réalisée à l'intérieur du noyau est permise par l'intermédiaire d'une enzyme appelée ARN polymérase ; cette enzyme a la capacité de synthétiser

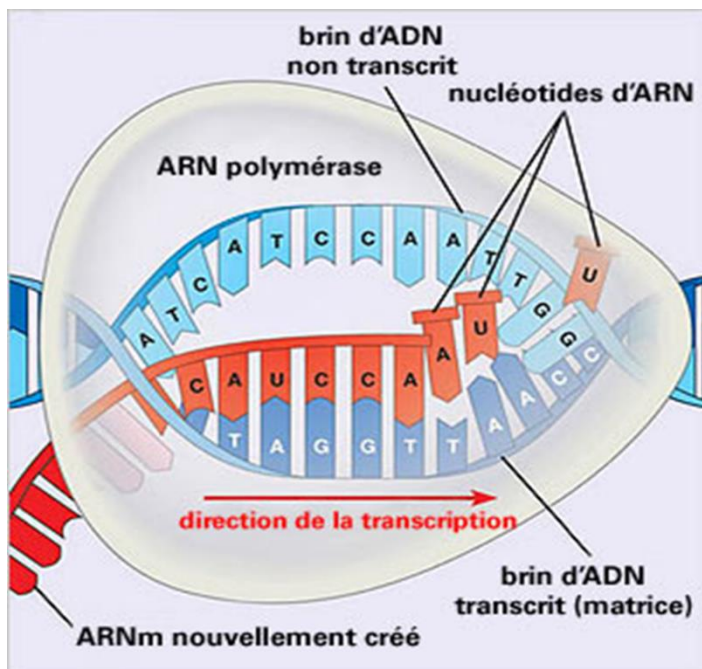


Figure 11 : Transcription de l'ARNm à partir de l'ADN nucléaire.

l'ARNm en faisant correspondre des bases azotées (adénine, uracile, guanine et cytosine) complémentaires au brin d'ADN original. Des facteurs de transcription sont également nécessaires afin de spécifier à l'ARN polymérase la séquence précise de l'ADN à copier (Cramer & Woodhead) (Figure 11). L'ARNm nouvellement constitué pourra ensuite sortir du noyau afin de servir de matrice, de plan pour la synthèse des protéines par les ribosomes, organites cellulaires ayant la faculté de traduire l'information de l'ARNm en protéine qui pourra alors exercer sa fonction au sein de la cellule.

III.2.1.2. La traduction de l'ARN

La traduction de l'ARNm, dernier stade de la synthèse protéique, peut être divisée en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. La traduction consiste à lier à partir de l'ARNm localisé dans le cytoplasme, des acides aminés les uns aux autres afin de former une chaîne polypeptidique, base de la protéine. L'information contenue dans l'ARNm est décryptée sous forme de codons, correspondant à la séquence de trois nucléotides consécutifs, chaque codon représentant un acide aminé (Fabian et al., 2010). La traduction dépend de deux composants primordiaux : les ribosomes et les ARN de transfert (ARNt), éléments que nous détaillerons lors de la description des différentes étapes de la traduction. La synthèse des protéines se produit au sein d'un ribosome, composé d'une petite (40S) et une grande (60S) sous-unité formant le complexe 80S (Pena et al., 2017) (Figure 12). La phase d'initiation consiste à assembler l'ARNm au niveau de son codon d'initiation (AUG) à la sous-unité 40S du complexe ribosomal ; l'ARNt va ensuite se lier au codon d'initiation de

l'ARNm. Le complexe d'initiation 40S se lie à la sous-unité 60S pour former le complexe ribosomal 80S actif, capable d'initier l'assemblage des acides aminés (**Figure 12**). Par la suite, l'ARNt en relation avec le complexe ribosomal mature agit comme un traducteur entre l'ARNm et la protéine en formation, en apportant l'ensemble des acides aminés spécifiques codés par les codons de l'ARNm (Fabian et al., 2010) (**Figure 13**).

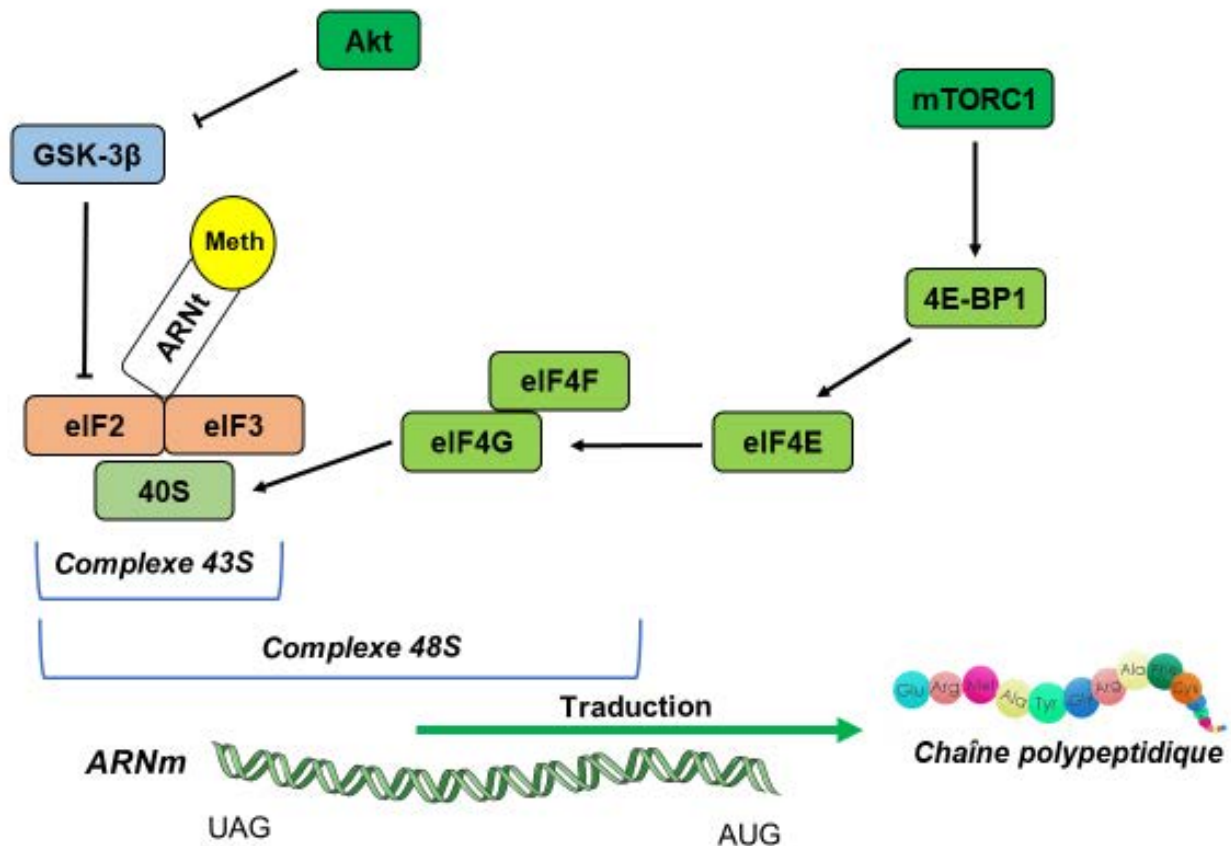


Figure 12 : Processus de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.

L'étape d'initiation est régulée par plusieurs protéines et facteurs d'initiation. Le complexe de pré-initiation 43S, regroupant la sous-unité ribosomale 40S et des facteurs d'initiation eIF2 et eIF3 (eukaryotic Initiation Factor 2 et 3) (**Figure 12**), permet la fixation de la sous-unité 40S du ribosome avec des ARNt porteur d'une méthionine, cette dernière étant l'acide aminé initiatique de la synthèse protéique. Le recrutement du complexe 43S avec l'ARNm est conditionné selon un ensemble de facteurs d'initiation de la traduction constituant le complexe eIF4F (eukaryotic Initiation Factor 4F). Celui-ci est composé d'une protéine de fixation et d'une protéine de structure : eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) et eIF4G (eukaryotic Initiation Factor 4G), respectivement (**Figure 12**). Pour que le complexe eIF4F soit fonctionnel, il est nécessaire que la protéine eIF4E se désunisse de son répresseur, la protéine 4E-BP1 (Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1), afin d'interagir avec eIF4G, ce qui lui permettra dans un second temps de s'unir avec la sous-unité ribosomale 40S du complexe de pré-initiation 43S (Fabian et al., 2010). L'interaction du complexe 43S et de eIF4F forme le complexe 48S, entraînant l'initiation de la traduction de l'ARNm sur son codon d'initiation AUG (**Figure 12**). Certaines

étapes de l'initiation de la traduction sont sous le contrôle de voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la régulation de la synthèse protéique.

Lors de la phase d'élongation, l'ensemble des codons formant l'ARNm sont traduits dans leur intégralité par le complexe ribosomal, les ARNt permettant l'assemblage des acides aminés correspondant aux codons. Ces acides aminés seront liés de manière covalente par des liaisons peptidiques afin de former une chaîne polypeptidique (**Figure 13**). Le facteur d'élongation eEF2 (Eukaryotic elongation factor 2) est une protéine essentielle dans le contrôle de la phase d'élongation, car le facteur eEF2 favorise la translocation (déplacement) du ribosome le long de l'ARNm.

La dernière étape de la traduction, la terminaison, intervient lorsque le complexe ribosomal atteint l'un des trois codons stop (UAA, UAG ou UGA), signe d'une traduction complète ; aucun ARNt n'est capable de décrypter ces codons stop ; la traduction de l'ARNm prend fin (**Figure 13**). Des facteurs de libération agissent sur la protéine nouvellement constituée : une réaction d'hydrolyse s'opère au niveau du dernier acide aminé de la chaîne polypeptidique, séparant celle-ci de l'ARNt, permettant ainsi à la protéine de se détacher du ribosome et entraînant également la séparation du complexe ribosomal à l'origine du processus de traduction (Ogle et al., 2001).

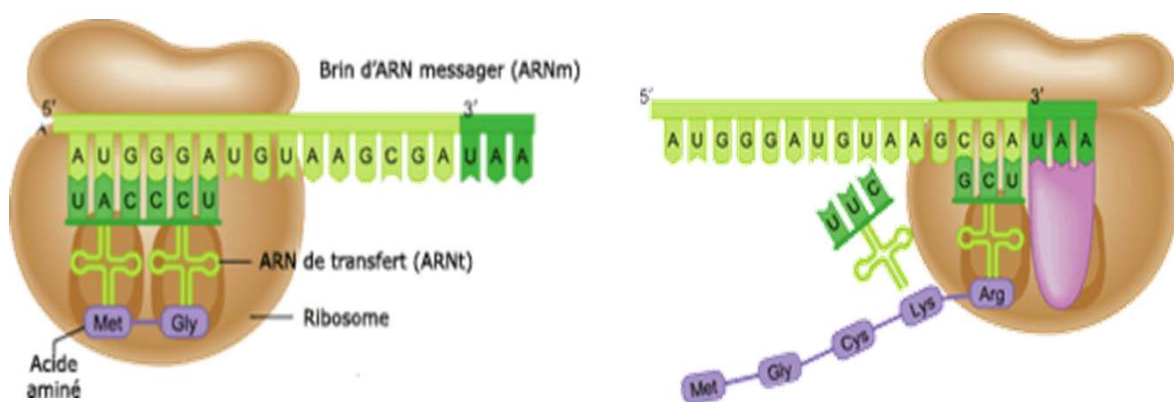


Figure 13 : Elongation et traduction de l'ARNm par le complexe ribosomal.

Ainsi, des protéines clés de la voie de synthèse des protéines sont capables de contrôler la traduction protéique, comme la protéine mTOR (mammalian Target of Rapamycin) qui régule la phosphorylation de la protéine 4E-BP1, ou encore la protéine Akt (protéine kinase B), régulant l'inhibition du facteur d'initiation eIF2 *via* la protéine GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) (**Figure 12**). On peut noter également, le facteur eEF2 également sous la dépendance de protéines clés de signalisation intracellulaire impliquée dans la voie de synthèse des protéines, telles que mTOR et P70S6K (ribosomal protein S6 kinase) (Bodine et al., 2001 ; Rommel et al., 2001). Après avoir passé en revue les différentes étapes du processus de biosynthèse protéique, nous allons nous intéresser à l'une des voies de signalisation intracellulaire jouant un rôle majeur dans la régulation de la synthèse des protéines : la voie Pi3K / Akt / mTOR.

III.2.2. La voie de protéosynthèse : PI3K / Akt / mTOR

III.2.2.1. PI3K

La PI3K (Phosphatidyl Inositol-3-OH kinase) est une kinase participant à l'activation de multiples processus cellulaires, tels que la prolifération et la différenciation cellulaires, ou encore la synthèse protéique. Les principaux activateurs de la voie PI3K / Akt sont les facteurs de croissance comme l'IGF-1, peptide de 7 kDa environ possédant un très grand nombre de récepteurs au niveau de la membrane des cellules musculaires. Les récepteurs du facteur de croissance IGF-1 font partie de la classe des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase intrinsèque. La liaison de l'IGF-1 sur son récepteur provoque l'activation de l'activité tyrosine kinase, occasionnant une autophosphorylation du récepteur, créant ainsi au niveau de la surface interne de la membrane cellulaire des sites de recrutement de la PI3K (Harrington et al., 2005). Par la suite, la PI3K phosphoryle les PIPs (Phosphatidylinositol Phosphates) localisés dans la membrane cellulaire, transformant le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) (Czech, 2000). Ce dernier agit comme un site de recrutement de deux kinases : la kinase phosphoinositide-dépendante 1 (PDK1) qui, par phosphorylation, active la seconde kinase recrutée à la membrane par l'intermédiaire du PIP3, la protéine kinase B (Akt) (Figure 14).

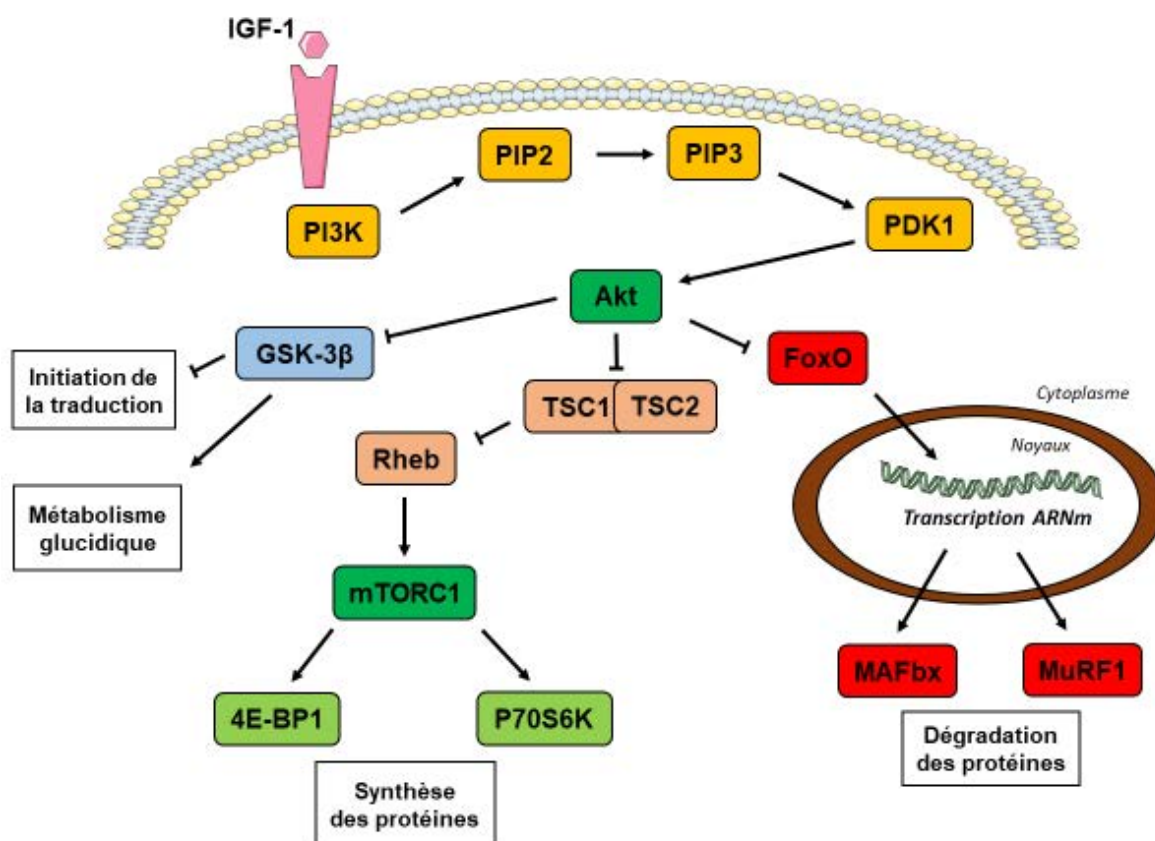


Figure 14 : Schématisation de la cascade de la voie de signalisation PI3K / Akt / mTOR.

L'IGF-1 est considéré comme l'un des principaux régulateurs positifs de la voie de signalisation de synthèse protéique, conduisant à une hypertrophie des cellules du muscle squelettique. Les effets anabolisants de l'IGF-1 ont été observés *in vitro* sur des cellules musculaires en culture différenciées

en myotubes, l'ajout d'IGF-I exogène entraînant une augmentation du diamètre des myotubes et une teneur en protéines plus élevée (Rommel et al., 2001 ; Vyas et al., 2002). Chez le rongeur, un traitement à l'IGF-1 par transplantation de pompe provoque un accroissement de leur masse musculaire (Adams et McCue, 1998), résultat également retrouvé sur des souris génétiquement modifiées avec une surexpression d'IGF-1 (Barton, 2006 ; Musaro et al., 2001). La liaison de l'IGF-1 avec son récepteur entraîne, par l'intermédiaire de PI3K, l'activation en aval de nombreuses cascades de signalisation, et tout particulièrement l'une des voie clé de la synthèse des protéines : la voie Akt / mTOR (Figure 14).

III.2.2.2. Akt

La protéine Akt, également connue sous le nom de protéine kinase B (PKB), est une sérine / thréonine kinase régulée par les facteurs de croissance et est une cible clé en aval de PI3K (Song et al., 2005). La famille Akt est composée de trois isoformes : Akt1, Akt2 et Akt3, également connues sous les noms de PKB α , PKB β et PKB γ respectivement (Gonzalez & McGraw, 2009). L'activation de PI3K entraîne la production de PIP3 au niveau de la membrane plasmique ; ce dernier fonctionne comme un site d'accueil pour PDK1 et Akt, provoquant ainsi, l'activation et la phosphorylation de Akt sur la thréonine 308 (Engelman et al., 2006). Une fois activée, Akt se déplace vers le cytoplasme, où un certain nombre de cibles en aval sont phosphorylées et ainsi activées ou inhibées afin de fournir un signal anabolisant protégeant les cellules de l'apoptose induite par divers stress, et induisant ainsi de nombreux effets métaboliques (Kim et al., 2001). La voie de signalisation PI3K / Akt est principalement axée sur la régulation de diverses fonctions physiologiques au sein de la cellule, telles que la synthèse protéique, l'inhibition de l'apoptose, l'angiogenèse, le métabolisme, la survie, la prolifération et la croissance cellulaires (Aksamitiene et al., 2012 ; Markman et al., 2010 ; Yuan et al., 2005) (Figure 14).

Dans un modèle de souris transgénique inductible, la suractivation de la protéine Akt sur une durée de 3 semaines a induit une hypertrophie musculaire marquée avec une augmentation d'environ 50% de la masse musculaire des souris adultes, ainsi qu'un accroissement de la force des fléchisseurs plantaires de la cheville (Blaauw et al., 2009). Au contraire, la non-expression d'Akt conduit à une forte diminution de la taille des fibres musculaires squelettiques (Bodine et al., 2001). Des études chez l'homme ont montré une suractivation de la protéine Akt à la suite d'une activité physique en résistance occasionnant une hypertrophie musculaire (Bodine et al., 2001 ; Lai et al., 2004 ; Stitt et al., 2004), et à l'inverse, une régulation à la baisse chez des personnes en hypoactivité ou en alitement prolongé, conduisant à une perte de masse ou atrophie musculaire (Bostock et al., 2013).

L'activation d'Akt tient donc une place majeure dans la régulation et le développement de la masse musculaire par l'intermédiaire de son action dans cette voie de protéosynthèse. La protéine Akt a plusieurs effecteurs jouant tous un rôle important dans la régulation de l'hypertrophie musculaire ; elle active notamment l'un des complexes clés de la voie de synthèse des protéines, mTORC1 (mTOR complex 1), de manière indirecte en phosphorylant la protéine TSC2 (Tuberous sclerosis 1) sur les résidus Ser939 et Thr1462, suscitant une inactivation du complexe TSC1 / TSC2 (Huang & Manning, 2009) (Figure 14). Akt active également mTORC1 de manière indépendante à TSC1 / TSC2, en phosphorylant et en provoquant la dissociation de la sous-unité raptor avec PRAS40, un inhibiteur de mTORC1 (Sancak et al., 2007).

Au-delà de son rôle anabolisant sur le muscle squelettique, la phosphorylation de la protéine kinase Akt a pour conséquence un contrôle négatif de l'activité nucléaire et transcriptionnelle des facteurs de transcription FoxO1 et FoxO3 (Tzivion et al., 2011 ; Zhang et al., 2011) (**Figure 14**). Il a été observé que l'activation de la voie de PI3K / Akt / mTOR par le facteur de croissance IGF-1 a pour conséquence la phosphorylation de FoxO3 par Akt, et ce sur ses deux résidus Thr32 et Ser253 induisant son exclusion nucléaire et sa séquestration cytoplasmique. Cette inhibition par Akt passe d'une part par l'exclusion de FoxO du noyau, ce qui empêche FoxO de se lier aux séquences d'ADN cibles, notamment les gènes codant pour les atrogènes (Zhang et al., 2011) (**Figure 14**). Plusieurs études ont montré *in vitro*, dans un modèle cellulaire de myotubes atrophiés traités par l'IGF-1, une réduction de l'expression des gènes ou protéines liée au système protéolytique ubiquitine-protéasome, notamment MAFbx et MuRF1 (Sanchez et al., 2014 ; Stitt et al., 2004).

Ces différentes données confèrent à la protéine Akt un rôle important dans la régulation de l'homéostasie protéique au sein de la cellule musculaire ; son activation entraîne conjointement la phosphorylation de TSC2, levant ainsi son inhibition sur la protéine mTOR, et la phosphorylation de FoxO1 et FoxO3, inhibant leur action de transcription de gènes spécifiques de la protéolyse musculaire. Par conséquent, Akt est considéré comme étant l'un des principaux régulateurs négatifs des voies protéolytiques tout en étant un facteur clé des voies de protéosynthèse (**Figure 14**).

III.2.2.3. mTOR

La protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), en réponse à des signaux extra- et intracellulaires, régule des fonctions clés de la cellule telles que la croissance, la survie, la prolifération ou encore le métabolisme cellulaire. Elle est surtout un élément central dans la voie de synthèse des protéines, notamment par son contrôle de la traduction protéique (Huang &ingar, 2014). La protéine mTOR est en relation avec plusieurs protéines partenaires régulant son activation ou son inhibition ; elle exerce notamment son activité au sein de deux complexes multiprotéiques, nommés mTORC1, sensibles à la rapamycine, et mTORC2, résistant à la rapamycine (Laplante, M., & Sabatini, 2009) (**Figure 14**). Les complexes mTORC1 et mTORC2 contiennent plusieurs composants communs : la kinase mTOR jouant le rôle de composé catalytique central, la protéine d'échafaudage mLST8, la sous-unité régulatrice DEPTOR et le complexe Tti1 / Tel2, important dans l'assemblage et la stabilité du complexe mTOR (**Figure 15**). Il est à noter que chaque complexe héberge des sous-unités distinctes qui contribuent à la spécificité dans l'utilisation des substrats, à la localisation intracellulaire et à la régulation spécifique complexe. mTORC1 est défini par son association avec Raptor (Regulatory associated protein of mTOR), ayant une fonction stabilisatrice du complexe et permettant également le recrutement spécifique des substrats de mTORC1 (Kim et al., 2002). mTORC2 est quant à lui constitué des sous-unités Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR) et mSin1 (**Figure 15**). Des cellules déficitaires en Rictor ont permis de montrer que cette protéine est indispensable à l'assemblage, la stabilité, le recrutement spécifique des substrats et la localisation intracellulaire (Sarbasov et al., 2004). mSin1 est également nécessaire pour la localisation intracellulaire de mTORC2 au niveau de la membrane plasmique. En particulier, mSin1 est un régulateur négatif clé de l'activité de la kinase mTORC2 jusqu'à ce que l'activation de PI3K recrute mSin1, et par conséquent mTORC2, à la membrane plasmique où l'inhibition de mTORC2 médiée par Sin1 est levée (Liu et al., 2015). Des preuves biochimiques et structurelles suggèrent que mTORC1 et mTORC2 peuvent exister sous forme de dimères (Wullschleger et al., 2005).

Différentes études réalisées sur des rongeurs transgéniques montrent une implication importante de mTOR, et notamment du complexe mTORC1, dans la régulation de la masse musculaire. L'inactivation de mTOR au niveau musculaire conduit à une myopathie sévère, entraînant une mort prématurée (Rissson et al., 2009), la perte de mTOR exacerbant les caractéristiques myopathiques à la fois dans les muscles lents (oxydatifs) et rapides (glycolytiques) (Rissson et al., 2009). Il a été rapporté que l'inactivation du gène Raptor entraîne à elle seule une augmentation de l'atrophie musculaire et une dystrophie prononcée chez la souris (Bentzinger et al., 2008), soutenant donc le rôle clé du complexe mTORC1 dans le maintien de la masse musculaire. Une étude utilisant un modèle murin d'immobilisation des membres postérieurs ainsi qu'un traitement pharmacologique à la rapamycine (inhibant l'activation de mTOR), donne lieu à une importante réduction de la formation du complexe eIF4F (un facteur d'initiation de la traduction), une diminution de la synthèse protéique globale et une perte de la masse musculaire (You et al., 2015). Cependant, la modulation de mTOR n'est pas restreinte à Raptor et Rictor. On peut en effet observer une importante corrélation entre le taux d'acides aminés et l'activation de mTOR par l'intermédiaire de la petite protéine GTPase Rheb (Ras homolog enriched in brain), l'une des protéines régulatrices de mTOR.

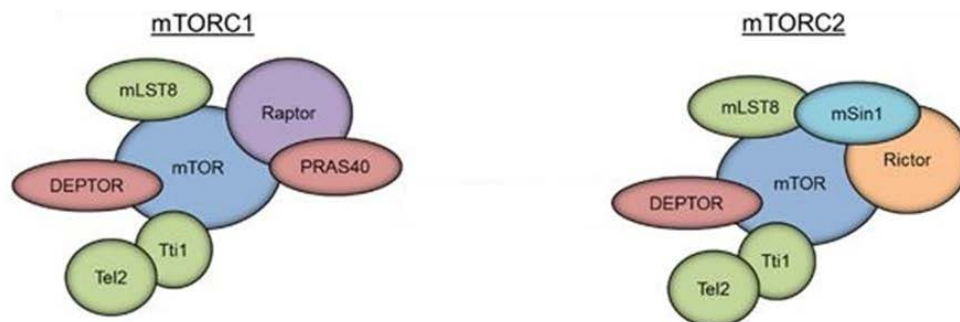


Figure 15 : Représentation schématique des complexes mTOR. mTORC1 et mTORC2 partage les kinase mTOR, mLST8, Tti / Tel2, DEPTOR (d'après Kim et al., 2017).

III.2.2.3.1. Les régulateurs de mTOR

La petite protéine GTPase-Rheb est présente dans la cellule sous deux formes : GDP-Rheb (Guanosine diphosphate-Rheb) et GTP-Rheb (Guanosine triphosphate-Rheb) ; cette dernière est reconnue pour être un activateur de la protéine mTOR (Long et al., 2005 ; Laplante & Sabatini, 2009). Des études *in vitro* montrent que la surexpression de GTP-Rheb entraîne une hyper-phosphorylation de mTORC1, jouant ainsi un rôle de régulateur positif de la voie de synthèse des protéines (Sato et al., 2008 ; Inoki et al., 2003a). Une étude a montré au niveau cellulaire (cellules HEK293) que la surexpression du complexe TSC1 / TSC2 provoque une diminution de la forme active de Rheb, GTP-Rheb, bloquant son rôle d'activateur de mTORC1 et faisant de TSC1 / TSC2 un inhibiteur de la protéine mTOR (Inoki et al., 2003b). La stimulation *via* les facteurs de croissance induit l'activation de PI3K / Akt, provoquant par la suite, la phosphorylation de TSC2 sur plusieurs sites (Ser939 et Thr1432), conduisant à un blocage de l'association entre TSC1 et TSC2 (Dibble et al., 2012 ; Huang & Mannig, 2009). La phosphorylation de TSC2 initiée par Akt entraîne une dissociation du complexe TSC1 / TSC2 de la membrane lysosomale, permettant à la protéine Rheb de s'associer au GTP, de se lier à mTORC1 et de l'activer (Menon et al., 2014) (Figure 16). La levée de l'inhibition du complexe TSC1 / TSC2 sur Rheb entraîne une migration de la forme inactive de mTORC1 du cytoplasme vers la membrane lysosomale,

pour y être activé par une GTPase. Sur cette même membrane lysosomale se trouvent la famille Rags, constituée de quatre protéines Rag (RagA, RagB, RagC, RagD), comprenant deux types d'isoformes Rag A/B lié au GTP et associé Rag C/D au GDP qui fonctionnent comme un hétérodimère (par exemple entre les isoformes A et C) (Sancak et al., 2008). Les Rags s'associent au lysosome par leur interaction avec le complexe Ragulator fixé à la membrane. En condition anabolisante, Rag A/B se lie activement au GTP entraînant un rapprochement de mTORC1 vers la membrane lysosomale *via* sa sous-unité Raptor (Sancak et al., 2010) (**Figure 16**).

III.2.2.3.1.1. Les acides aminés

Des études réalisées chez le rongeur ainsi que sur des cellules musculaires en culture ont révélé que les acides aminés sont nécessaires pour stimuler et activer la synthèse des protéines, ce processus impliquant notamment le complexe mTORC1 (Atherton et al., 2010 ; Drummond & Rasmussen et al., 2008). D'autres études plus anciennes ont confirmé *in vitro* qu'un mélange des 20 acides aminés entraîne une phosphorylation de mTOR, ce dernier étant suractivé lorsque les acides aminés étaient combinés à un facteur de croissance, comme l'IGF-1 (Kim et al., 2008a ; Sancak et al., 2008). L'analyse mécanistique a révélé que les acides aminés régulent la localisation intracellulaire de mTORC1 (Sancak et al., 2008 ; Sancak et al., 2010). Lorsque des cellules en culture sont privées en acides aminés, on peut observer la protéine mTORC1 diffuse dans l'ensemble du cytoplasme. Au contraire, la supplémentation en acides aminés entraîne un déplacement rapide de mTORC1 vers la surface lysosomale, lui permettant ainsi d'interagir avec la petite GTPase-Rheb (**Figure 16**) (Sancak et al., 2008). Ainsi, il semble que les acides aminés aient pour principale action de changer la localisation de mTOR afin de mettre en contact le complexe mTORC1 avec son activateur Rheb (Jewell et al., 2013).

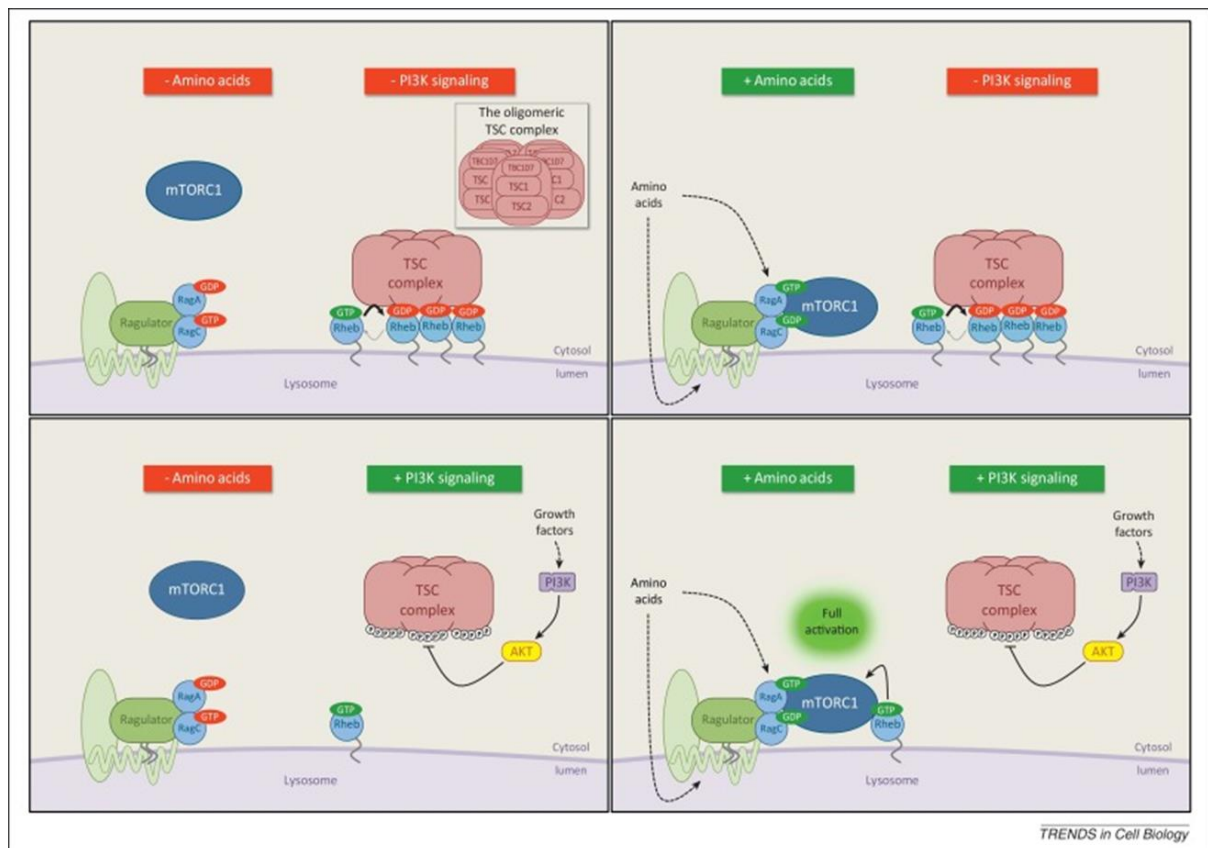


Figure 16 : Activation du complexe mTORC1 au niveau de la membrane lysosomale par les acides aminés et les facteurs de croissance (d’après Dibble et al., 2015).

Des études ont permis d’émettre l’hypothèse que l’action des acides aminés avait un impact sur la relation du complexe TSC1 / TSC2 et la protéine Rheb (Bar-Peled & Sabatini, 2014). Cependant, le développement de souris knock-out en TSC2 montre que l’état d’activation de mTORC1 est resté sensible à une modification des niveaux d’acides aminés intracellulaires de fibroblastes de souris, mettant en évidence une voie alternative de stimulation (Smith et al., 2005). Cette voie alternative est centrée sur les GTPases Rag, qui constituent la base moléculaire de la signalisation des acides aminés vers mTORC1 (Figure 16) (Bar-Peled & Sabatini, 2014). Les GTPases Rag sont situées en aval des acides aminés et, en leur absence, mTORC1 ne peut pas être transloquer vers la membrane lysosomale, son site d’activation (Bar-Peled & Sabatini, 2014). Les Rags se localisent également sur la membrane lysosomale et ont la capacité de recruter la sous-unité raptor du complexe mTORC1 et ce de manière dépendante des acides aminés (Sancak et al., 2010). Lors d’une déprivation en acides aminés, la molécule Rag A / B liée à un GDP est la forme la plus abondante ; le GDP est rapidement échangé contre un GTP après ajout d’acides aminés, permettant ainsi l’activation de mTORC1 (Figure 16) (Sancak et al., 2008). Cette connexion entre acides aminés et la protéine Rag A / B place donc les acides aminés comme l’un des activateurs principaux de mTORC1.

III. 2.2.3.1.2. Les facteurs de croissances

En amont de l’un des principaux inhibiteurs de mTOR, le complexe TSC1 / TSC2, des facteurs de croissance tels que l’IGF-1 activent la protéine PI3K, phosphorylant directement TSC1 / TSC2 pour

l'inactiver et donc lever l'inhibition de mTORC1 (Inoki et al., 2002). Les cytokines pro-inflammatoires, telles que le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), activent mTORC1 par un mécanisme sensiblement similaire aux facteurs de croissance, I κ B kinase β (IKK β) phosphorylant TSC1 et provoquant ainsi l'inhibition de TSC1 / TSC2 (Lee et al., 2007). Enfin, la voie canonique Wnt, un important régulateur de la croissance, de la prolifération et de la différenciation cellulaires active également mTORC1 *via* une inhibition indirecte de TSC1 / TSC2, la voie Wnt inhibant GSK-3 β , qui normalement phosphoryle et favorise l'activité de TSC2 (Inoki et al., 2006).

III. 2.2.3.1.3. La contraction musculaire et mécano-transduction

La stimulation mécanique observée lors d'une contraction musculaire est un puissant stimulus et activateur de la synthèse protéique dans le muscle squelettique. Cette relation a été clairement observée et démontrée sur plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro*, à l'aide de différents modes de stimulation mécanique (endurance, résistance, stimulation électrique et étirement) (Bodine et al., 2001 ; Hornberger et al., 2004 ; Manabe et al., 2012 ; Nedachi et al., 2008). Des études ont montré qu'à la suite d'une stimulation mécanique, mTOR pouvait être activée par des mécanismes dépendants de la protéine Akt (Léger et al., 2006), et ce de manière aiguë ou chronique. En particulier, lors d'une stimulation mécanique continue, les voies de signalisation sont activées directement par la stimulation mécanique ou par des facteurs circulants libérés par le muscle squelettique pendant ou à la suite de la contraction musculaire, tels que l'IGF-1 ou les MGF (Mechanical Growth Factor). Ces facteurs de croissance libérés par le muscle squelettique suite à une stimulation électrique sont à la base de l'activation de la voie de synthèse PI3K / Akt / mTOR (Rommel et al., 2001 ; Bodine et al., 2001).

Des études ont mis en évidence que ces facteurs de croissance conduisent à une activation tardive de la voie de synthèse PI3K / Akt / mTOR, une augmentation de l'expression des ARNm de l'IGF-1 et des MGF étant observée 2 à 3 heures après une séance d'entraînement de type résistance (Hameed et al., 2003 ; Haddad et Adams 2002). En revanche, l'activation de mTOR à la suite d'une forte contraction du muscle squelettique ne semble pas dépendre des protéines PI3K / Akt (Hornberger et al., 2006). En effet, une étude de Hornberger et al., (2006) a montré que l'activation de P70S6K (une cible en aval de mTOR) à la suite d'une stimulation mécanique n'était pas perturbée même en présence de wortmanine, un inhibiteur de la PI3K. De plus, le même auteur avait quelques années auparavant mis en évidence que chez des souris KO pour Akt (Akt^{-/-}), mTOR restait sensible et activable suite à une succession de contractions – étirements par intermittence (Hornberger et al., 2004). Plusieurs études ont montré qu'à la suite d'une stimulation mécanique, les protéines mTOR et P70S6K étaient activées alors que Akt n'observait aucun changement de phosphorylation ou d'expression, suggérant ainsi que lors de stimuli intense, mTOR est activée, non pas par Akt, mais par des voies alternatives (Eliasson et al., 2006 ; Fujita et al., 2007 ; Mascher et al., 2007).

Le muscle squelettique est intrinsèquement un tissu sensible à tout type de stimulation mécanique. Les médiateurs intracellulaires sensibles aux stimuli mécaniques sont susceptibles de favoriser les processus de transduction du signal liés aux voies de synthèse des protéines, et de stimuler le remodelage et les réponses adaptatives métaboliques au sein du muscle squelettique. La compréhension de la mécano-transduction autour de mTORC1, c'est-à-dire le mécanisme par lequel les cellules convertissent les signaux mécaniques en réponses biologiques sont à ce jour en cours d'investigation (Lee et al., 2017). Notamment, l'acide phosphatidique, un messenger lipidique, semble

jouer un rôle dans plusieurs systèmes de signalisation intracellulaires, son activation influençant notamment la mitogenèse, les processus de sécrétion et la réorganisation du cytosquelette (Yoon, 2017). L'activation de l'acide phosphatidique dépend de l'activité de la phospholipase D (PLD), qui hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique et en choline (Hong et al., 2001). Une fois synthétisé, l'acide phosphatidique se lie à mTOR et active P70S6K (Menon et al., 2017). Une étude *in vitro* sur des muscles squelettiques de souris soumis à une stimulation mécanique a montré une augmentation de la concentration de la PLD, permettant la formation de l'acide phosphatidique, ainsi que l'activation de P70S6K (Hornberger et Chien, 2006). Dans cette même étude, les auteurs ont utilisé un inhibiteur de la PLD, ce qui a provoqué une neutralisation de l'activation de P70S6K lors de stimulations électriques, et ce de manière dose-dépendante (Hornberger et Chien, 2006). Ces données ont fourni des informations cohérentes sur le fait que la stimulation mécanique a le potentiel d'activer la voie mTOR/P70S6K par l'augmentation de la concentration intracellulaire en acide phosphatidique. Sur le plan mécanistique, on sait que les protéines de structures telles que l' α -actinine et la β -actine inhibent l'activité de la PLD (Lee et al., 2001). De plus, la PLD est située proche de ces protéines de structure et des disques Z du sarcomère, ce dernier étant un élément essentiel dans la transmission de la force le long du sarcomère lors d'une contraction musculaire. Cette configuration laisse à supposer que la proximité de ces différents éléments régulateurs pourrait constituer l'une des voies d'activation mécanique de l'acide phosphatidique (Park et al., 2000). La stimulation mécanique pourrait entraîner une dissociation physique entre la PLD et l' α -actinine et/ou la β -actine, ce qui renforcerait davantage l'hypothèse que l'acide phosphatidique puisse être un médiateur mécano-chimique de la contraction du muscle squelettique dépendante (Hornberger et Chien, 2006), mais cette hypothèse reste encore à être confirmée à ce jour.

III. 2.2.3.2. Les effecteurs de mTORC1

III. 2.2.3.2.1. 4E-BP1

L'étape d'initiation de la traduction de l'ARNm est une phase cruciale dans la synthèse protéique. L'interaction entre les protéines eIF4E et eIF4G, toutes deux des facteurs d'initiation de la traduction, est régulée par la protéine 4E-BP1 (Moerke et al., 2007) (**Figure 17**). Cette dernière a la capacité de se lier à eIF4E, et ce sur le même site de fixation que eIF4G, perturbant ainsi leur interaction avec le complexe eIF4F indispensable à leur assemblage avec la sous-unité ribosomale 40S. Cette compétition entre 4E-BP1 et eIF4G a pour conséquence une inhibition de la traduction de l'ARNm (Choo et al., 2008). La protéine mTOR a la capacité de réguler l'initiation de la traduction en contrôlant l'état d'activation de la protéine 4E-BP1 (Fingar et al., 2004 ; Garami et al., 2003 ; Nojima et al., 2003). L'hyper-phosphorylation de 4E-BP1 entraîne une dissociation de celle-ci avec eIF4E, permettant son interaction avec eIF4G et la formation du complexe eIF4F, synonyme d'initiation de la traduction (**Figure 17**). Au contraire, une diminution de l'activation de mTOR entraîne une diminution de l'activation de la protéine mTOR qui conduit à une liaison accrue de 4E-BP1 à eIF4E (Hara et al., 1997) (**Figure 17**). Avec la protéine 4E-BP1, mTOR contrôle une autre cible, la protéine S6Kinase (Ribosomal protein S6 kinase beta-1), aussi appelée P70S6K.

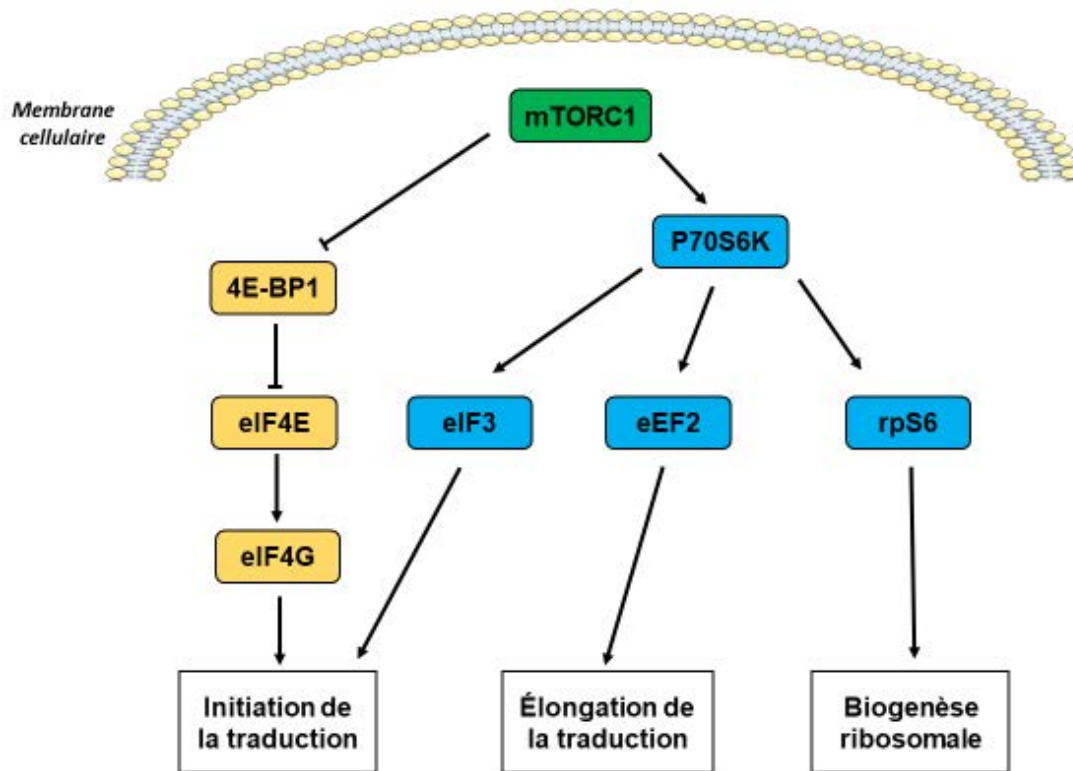


Figure 17 : Schéma général présentant les cibles de mTOR et leur rôle dans la régulation des étapes traductionnelles et de la biogenèse ribosomale.

III. 2.2.3.2.2. P70S6K

Cette protéine kinase a la propriété d'être un régulateur positif de la traduction des ARNm et de la biogenèse ribosomale (Jastrzebski et al., 2007 ; Magnuson et al., 2012). Après avoir été activée par phosphorylation par le complexe mTORC1 (Zanchi et al., 2008) (Figure 17), P70S6K entraîne à son tour l'activation de la protéine ribosomale S6 (rpS6) faisant partie de la sous-unité ribosomale 40S du complexe 43S, élément de la machinerie traductionnelle. L'activation de rpS6 provoque une augmentation du recrutement d'ARNm possédant une séquence 5'TOP (terminal oligopyrimidine tract) favorisant la traduction de l'ARNm (Pende et al., 2004). Ces ARNm, impliqués dans la croissance cellulaire, ont notamment la propriété de coder pour les composants de l'appareil traductionnel comme les protéines ribosomales, le facteur d'initiation eIF3 du complexe de pré-initiation et le facteur d'élongation eEF2. L'absence du gène codant pour la protéine P70S6K provoque *in vitro* des myotubes non matures et sous-développés, avec une diminution accrue de leur taille et de leur diamètre, suggérant que ce défaut de croissance initié par la délétion de P70S6K soit un élément important dans la régulation de l'homéostasie protéique (Ohanna et al., 2005).

III.2.2.3.3. mTOR et autophagie

L'augmentation de la concentration en acide aminé intracellulaire stimule non seulement la synthèse des protéines, mais également la répression de l'un des systèmes principaux de la dégradation cellulaire, l'autophagie. Ce dernier sera exposé dans la partie III.3.1. ; brièvement, l'autophagie consiste à séquestrer une partie du cytoplasme à l'intérieur d'une structure à double membrane appelée autophagosome. Cette structure fusionne ensuite avec les membranes lysosomales où les composants cytoplasmiques peuvent être dégradés. La famille des protéines Atg contrôle les principales étapes de l'autophagie, c'est-à-dire, l'initiation, la maturation de l'autophagosome, la fusion et la dégradation par les lysosomes (Sandri et al., 2013). Les acides aminés et les facteurs de croissance sont les principaux régulateurs physiologiques de l'autophagie chez les mammifères. Les voies qu'ils utilisent pour réguler l'autophagie sont en partie identique à celle utilisée pour la synthèse des protéines (Sengupta et al., 2010). Par conséquent, il a été démontré que la protéine mTOR, hautement impliquée dans l'homéostasie cellulaire, participe à la régulation de l'autophagie dans le muscle squelettique (Jung et al., 2010). En présence de nutriments, en particulier les acides aminés, et de facteurs de croissance, mTOR inhibe fortement l'initiation de l'autophagie. De nombreuses protéines sont nécessaires à l'activation du processus d'autophagie, notamment le complexe protéique ULK1 / Atg13 / FIP200, jouant un rôle important dans la formation de l'autophagosome (Sengupta et al., 2010). Sur la base de l'état nutritionnel de la cellule, mTOR régule l'autophagie en interagissant avec le complexe protéique ULK1 / Atg13 (Figure 18). La phosphorylation de ULK1 et Atg13 par mTORC1 réduisent l'activité de la kinase ULK1 sur l'initiation de l'autophagie (Kim et al., 2011).

Des études utilisant la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, ou l'ARNi (ARN d'interférence) à l'encontre de mTOR, ont montré que l'inhibition de celui-ci n'était pas suffisante pour modifier le signal autophagique dans la cellule musculaire (Mammucari et al., 2008 ; Sandri, 2010). Cependant, l'inactivation du complexe mTORC2, insensible à la rapamycine, entraîne une augmentation de l'autophagie, par le biais d'une élévation de la translocation et de l'activation de FoxO3, facteur clé de la transcription dans l'expression de gènes liés à l'autophagie et à la dégradation protéasomale dans le muscle (Mammucari et al., 2008). Ces études soulignent le rôle de mTOR dans le contrôle de l'autophagie du muscle squelettique et mettent en évidence l'interaction complexe entre mTOR et la régulation de l'autophagie dans la fonte musculaire. L'ensemble de ces études et revues ont abouti à la conclusion que la protéine mTOR ne régule que 10% du système d'autophagie dans les muscles squelettiques (Neel et al., 2013 ; Sandri, 2010). En revanche, il a été rapporté que la protéine Akt située en amont de mTOR, contrôle environ 50% de l'autophagie du muscle squelettique (Neel et al., 2013 ; Zhao et al., 2007).

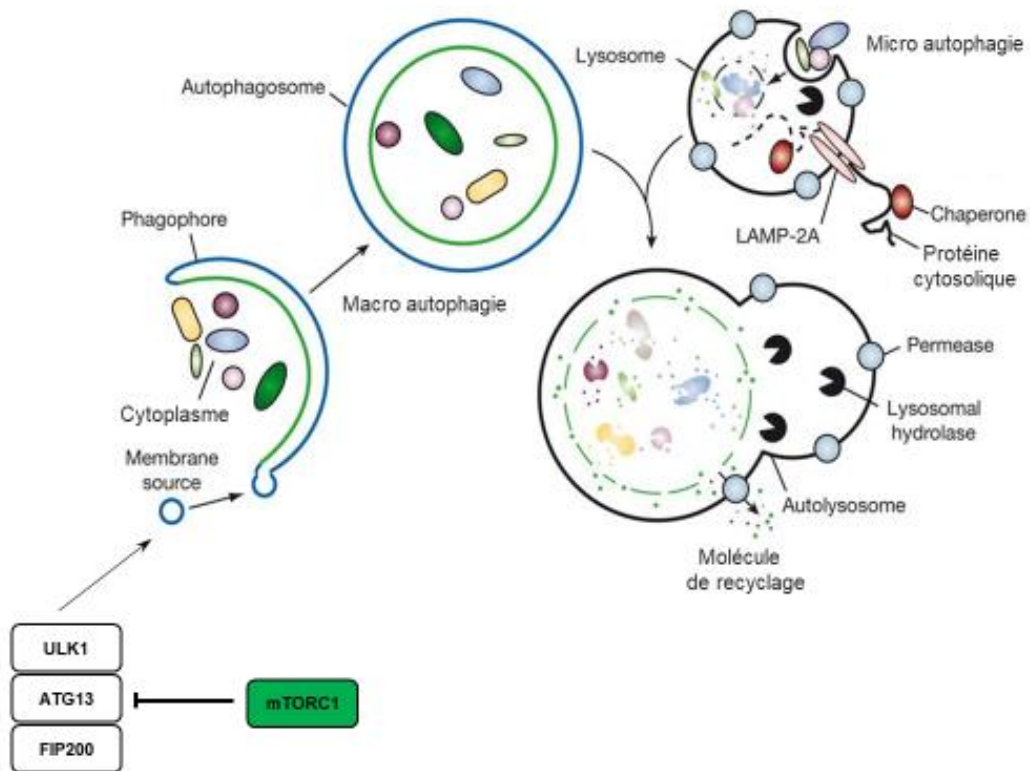


Figure 18 : Les différents phases de la voie autophagique (d'après Mizushima et al., 2008). Permease : transporteur membranaire ; LAMP-2 (Lysosomal-associated membrane protein) : marqueur membranaire.

III.2.2.4. GSK-3 β

La protéine GSK-3 (Glycogen-synthase kinase-3) est connue sous ses deux isoformes : GSK-3 α et GSK-3 β . Cette dernière est une kinase active dans son état basal (non phosphorylé), et inhibée lors de la phosphorylation sur sa sérine Ser9 (Grimes & Jope, 2001). Impliquée à la fois dans le métabolisme glucidique, le transport du glucose et l'inhibition de la glycogénèse (Cohen & Frame, 2001), GSK-3 β participe également à la régulation négative de la traduction par la phosphorylation du facteur de transcription eIF2, ce qui conduit à son inhibition (Welsh et al., 1997) (Figure 14). La voie Pi3K / Akt est l'une des voies de signalisation qui induit l'inhibition de GSK-3 β . Ainsi, la phosphorylation de GSK-3 β par la protéine kinase Akt permet de restaurer l'activité de eIF2 et par conséquent l'initiation de la synthèse protéique (Figure 14). Il a été montré que des souris atteintes de dystrophie myotonique, une maladie neuromusculaire caractérisée par une atrophie des muscles squelettiques, présentent un fort taux de GSK-3 β stable et actif. De plus, la suppression de l'expression de GSK-3 β réduit considérablement l'atrophie et la faiblesse musculaire (Jones et al., 2012). Une recherche *in vitro* sur des myoblastes en culture montre que l'expression des MRF induite par l'IGF-1 est facilitée par l'inactivation de GSK-3 β (van der Velden et al., 2008). Enfin, des cellules musculaires C2C12 traitées par l'IGF-1 présentent une augmentation de la phosphorylation de GSK-3 β , menant à des répercussions positives sur la taille et le diamètre des myotubes ; ces données suggèrent donc que

l'inhibition de GSK-3 β par la voie de synthèse IGF-1 / PI3K / Akt contribue à une hypertrophie musculaire (Vyas et al., 2002).

La voie de signalisation PI3K / Akt / mTOR est donc l'une des voies principales régulant la synthèse protéique chez l'homme et le rongeur (Glass, 2010 ; Otto & Patel, 2010 ; Sandri et al., 2013 ; Sasai et al., 2010). La forme active d'Akt dans le muscle squelettique conduit à une hyperphosphorylation de mTORC1, entraînant une croissance et un développement rapide des cellules du muscle squelettique. Le complexe mTORC1 peut être activé par divers stimuli, tels que l'apport nutritionnel (acides aminés), des facteurs de croissance (IGF-1) et la stimulation mécanique (mécano-transduction). mTORC1 a un effet direct sur la machinerie traductionnelle et la synthèse des protéines, en régulant l'inhibition de l'étape d'initiation de la traduction de l'ARNm en phosphorylant et inhibant la protéine 4E-BP1 liée à eIF4E. De plus, mTORC1 module également la biogenèse des ribosomes par la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 kinase (P70S6K). En plus de son rôle dans la traduction des ARNm, cette voie de signalisation est également impliquée dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique, et joue même un rôle important dans la modulation des différentes voies de dégradation des protéines (Bader et al., 2005 ; Ersahin et al., 2015 ; Heras-Sandoval et al., 2014). Ainsi toute intervention exogène (activité physique ou supplémentation en acide aminés) ayant pour objectif d'entraîner une hypertrophie musculaire, devra impérativement impacter positivement la voie PI3K / Akt / mTOR. De plus, l'analyse moléculaire de cette voie peut être un bon indicateur de l'action anabolisante exercé par un traitement sur les cellules musculaires squelettiques.

III.3. Le catabolisme protéique

Les voies cataboliques tiennent une place fondamentale dans le cycle du renouvellement cellulaire ; elles interviennent notamment dans l'élimination des protéines et organites altérés ou dysfonctionnels. Les champs d'action des différents processus cataboliques ne se résument pas uniquement à la gestion des dommages cellulaires. L'un des stimuli le plus puissant et le plus étudié est la dénutrition. Ce stress cellulaire provoqué par le manque de substrat(s) énergétique(s) pousse la cellule à « s'autodégrader » pour réutiliser ces propres constituants. On retrouve également une suractivation des voies cataboliques lors de la mobilisation de divers stocks d'énergie cellulaire (glycolyse et lipolyse). Nous allons présenter les processus majeurs impliqués dans la dégradation protéique musculaire : le système autophagie-lysosomale, le système ubiquitine-protéasome et les calpaïnes.

III.3.1. Le système d'autophagie lysosomale

Le processus de protéolyse lysosomale est majoritairement assuré par différentes enzymes lysosomales appelées cathepsines. Les cathepsines B, D, H et L sont présentes et actives dans le muscle squelettique ; elles ont la particularité de concentrer leur action de dégradation spécifiquement sur les protéines membranaires et myofibrillaires (chaînes de myosine et d'actine) (Bechet et al., 2005 ; Deval et al., 2001 ; Kubo et al., 2002). Ce processus cellulaire de dégradation par l'intermédiaire du lysosome repose sur différents mécanismes destinés à acheminer les substrats cytoplasmiques dans les lysosomes (**Figure 18**). L'autophagie « emploie » des protéines chaperonnes, permettant de reconnaître exclusivement des protéines cytosoliques possédant une séquence peptidique bien définie (Arndt et al., 2010). Dans la micro-autophagie, le lysosome incorpore directement la protéine

ou les composants cellulaires à dégrader *via* des invaginations au niveau de sa membrane (Müller et al., 2000 ; Sahu et al., 2011). La macro-autophagie est un processus d'agrégation reposant sur l'englobement de protéines, organites ou partie entière du cytoplasme par un phagosome pour former une vésicule cytosolique composée d'une double membrane appelée autophagosome (Elmore, 2007 ; He & Klionsky et al., 2009 ; Xie & Klionsky et al., 2007) (**Figure 18**). Ce dernier va par la suite fusionner avec le lysosome pour former un autophagolysosome, dans lequel le contenu enzymatique permettra l'hydrolyse des composants et substrats (glycogène, protéines, ribosomes, mitochondries et autres organites cellulaires...) à dégrader (He & Klionsky et al., 2009).

Les produits issus de la dégradation lysosomale, retournent dans le cytosol pour y servir de substrat à la synthèse de nouvelles molécules nécessaires à l'homéostasie cellulaire. Des études ont permis de mettre en évidence un certain nombre de gènes dits *Atg* (Autophagy-related gene) et les protéines résultantes de l'expression de ces gènes impliquées dans le contrôle de l'autophagie. Parmi ces protéines, il a été démontré que *Atg6* (Autophagy-related gene 6), aussi appelée Beclin-1, est une protéine « plateforme » participant au recrutement de différents partenaires protéiques nécessaires à la formation de l'autophagosome (Glick et al., 2010 ; Kang et al., 2011 ; Sun et al., 2009). La protéine LC3 (microtubule associated protein light chain 3) joue un rôle dans l'initiation et la séquestration des organites cytoplasmiques par le phagophore donnant naissance à l'autophagosome (Kuma et al., 2007 ; Tanida et al., 2008). BNIP3 est une protéine localisée au niveau de la membrane mitochondriale où elle joue un rôle clé dans la mitophagie (dégradation mitochondriale) grâce à son interaction avec la protéine LC3 (Settembre & Ballabio, 2014). L'ensemble de ces protéines impliquées dans l'autophagie est principalement sous le contrôle de facteurs de transcription de la famille FoxOs (Forkhead box protein O) (Mammucari et al., 2007 ; Milan et al., 2015 ; Zhao et al., 2007). Ces derniers activent également une autre voie catabolique et protéolytique spécifique au muscle squelettique, le système ubiquitine-protéasome.

III.3.2. Le système ubiquitine-protéasome

Le système de dégradation ubiquitine-protéasome (UPS) est l'une des voies protéolytiques prédominantes dans la dégradation des protéines et l'atrophie musculaire (Attaix et al., 2005 ; Milan et al., 2015 ; Sandri, 2013). La voie UPS est invariablement sollicitée lors de situations cataboliques, telles que le jeûne, la dénutrition ou l'inactivité prolongée (Csibi et al., 2008). La grande majorité des protéines constituant une cellule peuvent être dégradées par ce système protéolytique, et en particulier les protéines contractiles, essentielles à la constitution et fonctionnement du sarcomère. L'omniprésence de la voie UPS dans le cycle de renouvellement des cellules témoigne de son importance dans la régulation de l'homéostasie cellulaire (Lecker et al., 1999 ; Sandri et al., 2013).

La dégradation par ce système protéolytique repose sur un processus organisé en deux étapes. Dans un premier temps, les substrats cibles à dégrader sont marqués par l'ubiquitine : c'est la polyubiquitination des substrats. Dans un second temps, les protéines cibles associées à une chaîne de polyubiquitine sont reconnues et dégradées en peptides par le protéasome 26S (**Figure 19**). Celui-ci est constitué d'un complexe central protéolytique 20S, auquel s'associent à ses extrémités deux complexes régulateurs 19S ayant pour fonction la reconnaissance et le recrutement des substrats ubiquitinés (Adams et al., 2003). L'ubiquitination des protéines cibles implique l'intervention et la coopération de trois enzymes. L'enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme) permet l'activation de

l'ubiquitine en se fixant à elle par une liaison covalente. Une fois l'ubiquitine activée, elle est transférée sur une enzyme de conjugaison E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) par une trans-estérification. L'enzyme E3 ligase permet l'association de l'ubiquitine sur un résidu de lysine de la protéine à dégrader. Il existe un très grand nombre d'enzymes E3 ligases (plus d'un millier), permettant la reconnaissance d'un très grand nombre de protéines cibles. Enfin, une phase d'élongation de la chaîne polyubiquitine est nécessaire pour que la protéine ainsi marquée soit reconnue par le protéasome 26S (Schulman & Harper, 2009) (Figure 19). La chaîne de polyubiquitine est ensuite recyclée ou éliminée par l'action d'enzymes de désubiquitination, les ubiquitine isopeptidases, qui suppriment les liaisons d'ubiquitine (Lam et al., 1997). Parmi la multitude d'enzymes E3 ligases, des études ont mis en évidence deux gènes codant pour des E3 ubiquitine-ligases spécifiques du muscle squelettique et fortement impliquées dans l'atrophie musculaire : MuRF1 (Muscle Specific Ring Finger 1) et MAFbx (Muscle Atrophy F-box) aussi connue sous le nom d'Atrogin-1 (Atrophy gene-1) (Bodine et al., 2001). Ces E3 ubiquitine ligases se lient spécifiquement aux protéines contractiles des myofibrilles, entraînant leur dégradation par le système UPS (Bodine & Baehr, 2014).

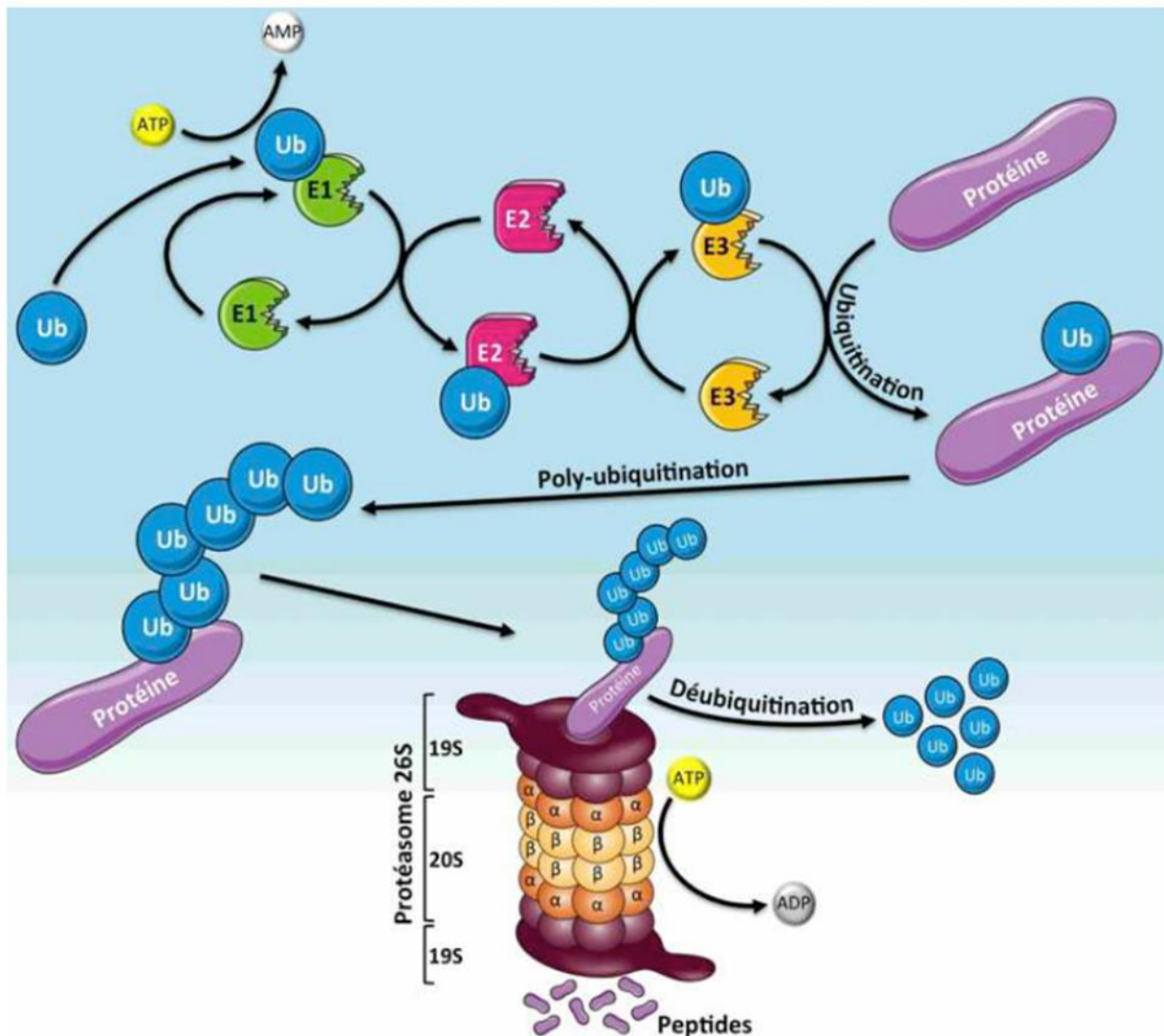


Figure 19 : Représentation schématique du système de dégradation ubiquitine-protéasome.

Ainsi, MuRF1 a été identifiée comme étant un marqueur spécifique de la dégradation des protéines myofibrillaires, puisqu'elle est impliquée dans l'ubiquitination de l'actine (Polge et al., 2011), des chaînes lourdes et légères de myosine (Clarke et al., 2007), et de la troponine I (Kedar et al., 2004). L'action de MAFbx est spécifique de la répression des processus de différenciation et d'initiation de la synthèse protéique, puisqu'elle joue un rôle important dans la dégradation du facteur de myogenèse MyoD (Tintignac et al., 2005) et du facteur d'initiation de la traduction eIF3 (Lagrand-Cantaloube et al., 2008).

Tout comme les protéines de l'autophagie (Beclin-1, BNIP3 et LC3), les protéines MAFbx et MuRF1 sont régulées par les facteurs de transcription de la famille FoxO (Milan et al., 2015) (Figure 20) ; des études ont notamment montré que la surexpression de FoxO1 et FoxO3 dans des cas d'immobilisation (Reed et al., 2011), de malnutrition (Koyama et al., 2014) ou de dénervation (Stitt et al., 2004) entraîne une atrophie musculaire marquée *via* ces deux voies cataboliques.

III.3.3. Les facteurs de transcription FoxO

De nombreuses études portant sur les gènes impliqués dans l'atrophie musculaire ont permis d'identifier différents facteurs de transcription comme étant à l'origine de la régulation des atrogènes activés dans les différentes conditions cataboliques (Foletta et al., 2011 ; Sandri et al., 2004). Parmi la famille des facteurs de transcription FoxO, comptant 4 membres (FoxO1, FoxO3, FoxO4 et FoxO6), les facteurs FoxO1 et FoxO3 jouent un rôle prépondérant dans la régulation des atrogènes, codant à la fois pour les protéines des systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome (Sandri et al., 2004, Stitt et al., 2004). Sous sa forme phosphorylée, le facteur de transcription FoxO est séquestré dans le cytoplasme ; cela a pour conséquence l'inhibition de sa translocation, et FoxO perd ainsi sa faculté à se fixer sur l'ADN pour promouvoir la néosynthèse des atrogènes. En revanche, lorsque la protéine FoxO est sous sa forme non phosphorylée, elle migre du cytoplasme vers le compartiment nucléaire où elle va activer la transcription des gènes cibles impliqués dans la protéolyse spécifique du muscle squelettique (Milan et al., 2015) (Figure 20).

Les gènes codant pour la formation des ubiquitines ligases (MAFbx et MuRF1), couramment utilisées comme marqueur de l'atrophie, ont été très tôt identifiés comme cible de FoxO (Bodine et al., 2001 ; Foletta et al., 2011). *In vitro*, la surexpression de FoxO3 au sein de cellules musculaires C2C12 différenciées en myotubes conduit à une suractivation de la protéolyse lysosomale (Zaho et al., 2007). D'autres études ont mis en évidence que les gènes codant pour la formation de l'autophagosome (Beclin-1 et LC3) sont également sous l'influence de FoxO (Milan et al., 2015). Ainsi, chez des souris présentant une atrophie musculaire à la suite d'une dénervation ou de jeûne, on observe une augmentation concomitante de l'activation de FoxO3 et de l'expression des gènes liés à l'autophagie (Beclin-1 et LC3) (Zhao et al., 2007). Une étude sur des souris knockout de FoxO1 induit une importante diminution de l'induction des E3 ubiquitine ligases et donc de la protéolyse, conduisant à une augmentation de masse musculaire notable chez les souris KO, suggérant ainsi le rôle majeur de FoxO1 dans la régulation de la protéolyse liée au système d'ubiquitine (Xu et al., 2012).

FoxO impacte également la voie de synthèse protéique en inhibant certaines protéines clés de la protéosynthèse. En effet, à partir de myotubes C2C12 surexprimant le gène codant pour le facteur de transcription FoxO1, Southgate et ses collaborateurs ont observé une inhibition significative de l'activation de mTOR, associée à une réduction de la phosphorylation de 4E-BP1 et de P70S6K (Southgate et al., 2007). Une étude montre que FoxO1 a la capacité de transcrire le gène codant pour la protéine Sestrin3 (Sesn3), un régulateur de mTOR sensible à l'état nutritionnel de la cellule. Sesn3 va à son tour inhiber l'activité de mTORC1 par l'intermédiaire de TSC2, ce qui fait de FoxO1 un inhibiteur indirect de mTORC1 (Chen et al., 2010a). La double action du facteur de transcription FoxO sur les voies de synthèse et de dégradation des protéines, fait de lui un facteur important de la régulation de l'homéostasie protéique au même titre que la protéine Akt (Figure 20). FoxO entraîne également la surexpression de la myostatine, un facteur de croissance ayant pour fonction de promouvoir l'atrophie musculaire (Allen & Unterman, 2007).

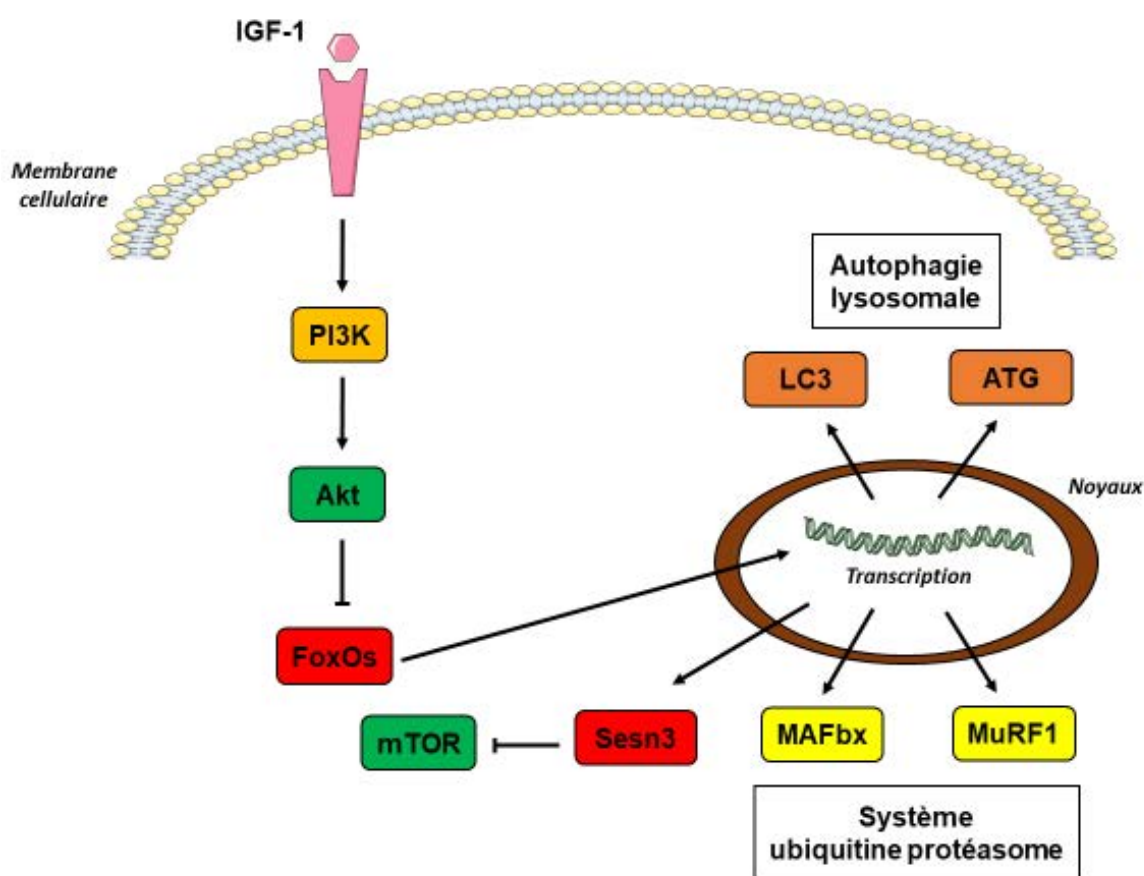


Figure 20 : Rôle des facteurs de transcription FoxOs dans les processus protéolytiques.

III.3.4. AMPK

L'homéostasie protéique est extrêmement sensible au déséquilibre énergétique et métabolique de la cellule. Les voies anaboliques, et en particulier la voie de synthèse des protéines, sont des processus demandant une importante consommation d'énergie. En effet, la traduction de l'ARNm et l'assemblage des acides aminés par les complexes ribosomiques sont dépendants d'une grande quantité de molécule d'ATP (Princiotta et al., 2003). Lors d'une diminution du taux d'ATP intracellulaire, cela engendre une élévation de la concentration d'AMP (Adénosine Mono-Phosphate) et donc un changement du ratio AMP/ATP induisant l'activation de la protéine AMPK (AMP-activated

proteïn kinase) (Emerling et al., 2009 ; Hahn-Windgassen et al., 2005). L'AMPK, considérée comme le senseur du statut énergétique de la cellule, est sollicitée dès lors que le niveau d'ATP cytosolique atteint un faible niveau de concentration, occasionnant de la part de l'AMPK une répression de l'ensemble des processus anaboliques tels que la voie de synthèse des protéines par une inhibition de l'activité du complexe mTORC1 (Bolster et al., 2002) (Figure 21).

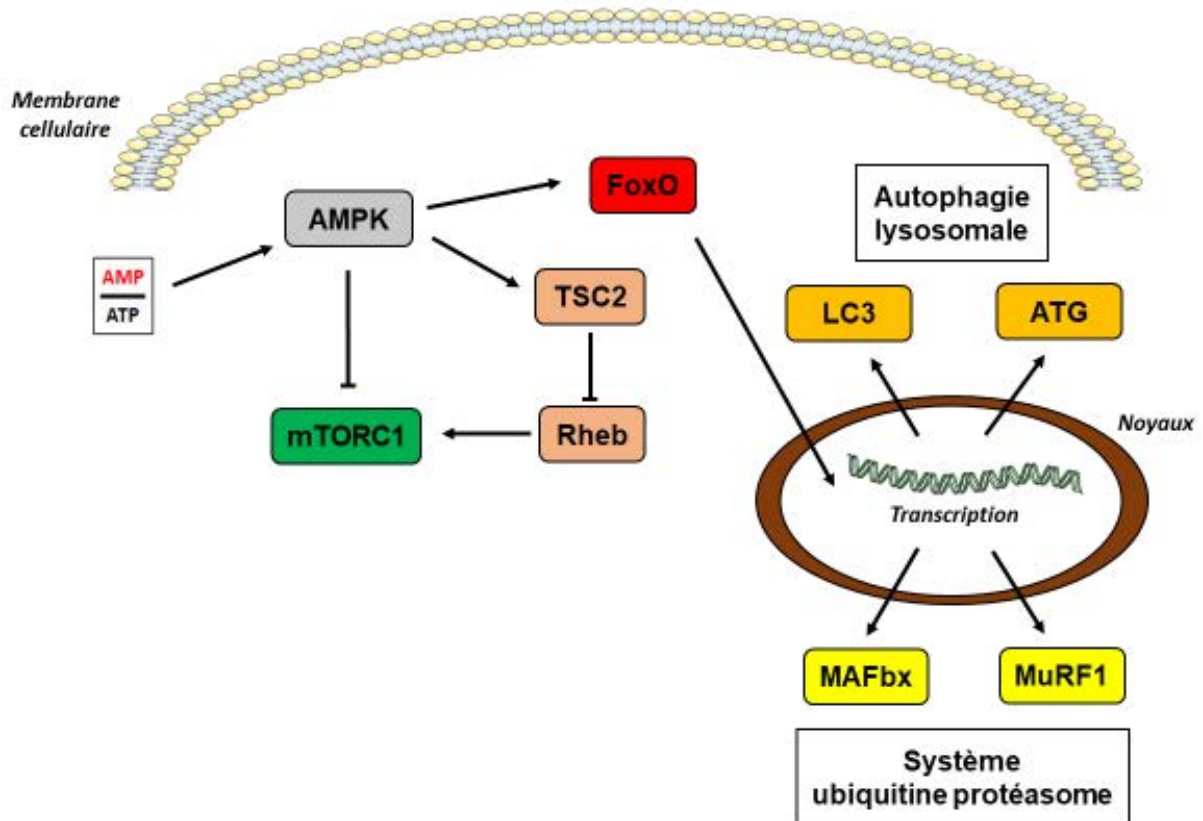


Figure 21 : Rôle de l'AMPK sur la régulation de mTORC1 et facteur de transcription FoxO.

Des études ont observé qu'à la suite d'une suractivation de l'AMPK par l'utilisation d'un puissant activateur de l'APMK, le AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribonucleoside), la phosphorylation de P70S6K, protéine cible en aval de mTOR, diminue de manière importante, provoquant ainsi une réduction de l'activité de la protéosynthèse (Kimura et al., 2003 ; Williamson, et al., 2006). La protéine mTOR est régulée négativement par l'AMPK, et ce de manière directe ; en effet, il a été montré que l'AMPK a la faculté de phosphoryler mTOR du complexe mTORC1 sur son site Thr2446, induisant la réduction de son état d'activation, diminuant donc la phosphorylation de ses effecteurs (Cheng, et al., 2004). L'AMPK exerce également un rétrocontrôle indirect *via* la phosphorylation de TSC2 sur son site Ser1345, inhibiteur de mTOR (Inoki, et al., 2003a) (Figure 21). Le retour d'un taux d'ATP normal au niveau de la cellule entraîne une levée d'inhibition de l'AMPK sur sa cible mTOR permettant le réveil de la protéosynthèse *via* l'activité de mTORC1 (Mouinier et al., 2015).

L'action de l'AMPK ne se limite pas seulement à l'inhibition de mTOR, puisque comme Akt, elle régule également le facteur de transcription privilégié des voies protéolytique : FoxO (Nakashima & Yakabe, 2007 ; Sanchez et al., 2012) (Figure 21). Cependant, au contraire d'Akt, l'AMPK régule

positivement FoxO3 par phosphorylation sur ses différents sites activateurs (Ser413 et Ser588) (Greer et al., 2007). L'utilisation d'activateurs pharmacologiques de l'AMPK, tels que AICAR ou la metformine, entraîne une suractivation de FoxO1 et FoxO3, ainsi que la surexpression de MAFbx et de MuRF1, les E3 ubiquitine ligase spécifiques du muscle squelettique, conduisant à une atrophie musculaire caractérisée par une importante protéolyse myofibrillaire (Nystrom et al., 2008). Cette même étude montre que l'emploi d'un inhibiteur de l'AMPK, le composé C, altère les effets induits par l'activateur AICAR en réduisant considérablement l'expression des ARNm de FoxO ; ces données suggèrent donc une forte régulation de l'AMPK sur les facteurs de transcription FoxO (Nystrom et al., 2008).

En plus de son action sur le système UPS (Nakashima et al., 2007), l'AMPK joue également un rôle dans la stimulation de l'autophagie ; sous les effets transcriptionnels de FoxO3, on observe une surexpression des protéines liées à la formation de l'autophagosome : Beclin-1 et LC3-II (Bujak et al., 2015 ; Fritzen et al., 2016). L'activation de l'AMPK est également associée à une relocalisation nucléaire de FoxO3 et une inhibition de mTOR (Sanchez et al., 2012). L'AMPK tient un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire de par ses fonctions de senseur énergétique de la cellule, mais tient également une position clé au carrefour des voies de signalisation, confirmant son statut de régulateur de l'homéostasie protéique.

En résumé, au niveau cellulaire, l'atrophie musculaire est associée à une diminution du diamètre des myotubes, eux-mêmes associés à une réduction de la teneur totale en protéines myofibrillaires. Cette perte du contenu protéique est la conséquence d'un dérèglement de l'homéostasie et du renouvellement protéiques, caractérisé par un déclin des voies de signalisation responsables de la protéosynthèse en faveur des voies protéolytiques. Au sein de la cellule musculaire, les facteurs de transcription FoxO sont des médiateurs clés de la réponse catabolique au cours de la phase d'atrophie. FoxO active et coordonne les deux mécanismes protéolytiques principaux de la cellule, à savoir les systèmes d'autophagie et d'ubiquitine-protéasome. Les facteurs de transcription FoxOs sont régulés par plusieurs protéines clés possédant une double fonction de régulation à travers les voies de signalisation de protéosynthèse et protéolyse constituant l'homéostasie protéique. L'AMPK et Akt ont des effets opposés sur la relocalisation et l'activation de FoxO. Alors que Akt inhibe FoxO1 et FoxO3 par phosphorylation, l'AMPK phosphoryle FoxO3 sur ses sites activateurs, lui permettant d'accomplir son rôle de transcripteur d'atrogènes, à l'origine de l'activation des systèmes d'autophagie-lysosomale et d'ubiquitine-protéasome.

III.3.5. La myostatine

La myostatine, aussi connue sous le nom de GDF-8 (Growth differentiation factor 8) est un membre de la famille GDF, elle-même sous-groupe de la famille des facteurs de croissance TGF β (Transforming Growth Factors β). C'est une glycoprotéine exprimée spécifiquement par le muscle squelettique (Elkasrawy et al., 2010). La liaison de la myostatine à son récepteur transmembranaire, l'activine de type II (ActRII), provoque un recrutement et une activation par phosphorylation des ALKs 4 et 5 (Activine receptor Like Kinases) qui sont des récepteurs de l'activine de type I (ActRI) (Figure 22). L'activation de ces récepteurs entraîne la phosphorylation des protéines SMAD2 et SMAD3 ; une fois phosphorylées, les SMAD 2 et 3 s'associent pour former un complexe avec SMAD4. Ces protéines SMAD activées ont la faculté de se transloquer dans le noyau afin d'activer et inhiber un certain nombre de gènes cibles contrôlant l'homéostasie protéique (Figure 22). La myostatine est un puissant

régulateur négatif de la croissance et de la masse musculaire squelettique (Rodriguez et al., 2014 ; Sandri et al., 2008). L'augmentation de son expression a été observée lors de conditions physiopathologiques conduisant à une perte importante de la masse musculaire, alors que son invalidation génétique entraîne une hypertrophie musculaire à outrance (Parsosn et al., 2006 ; Schuelke et al., 2004). L'étude des mécanismes de signalisation de la myostatine a permis de la considérer comme un régulateur clé dans l'homéostasie protéique du muscle squelettique (Rodriguez et al., 2014).

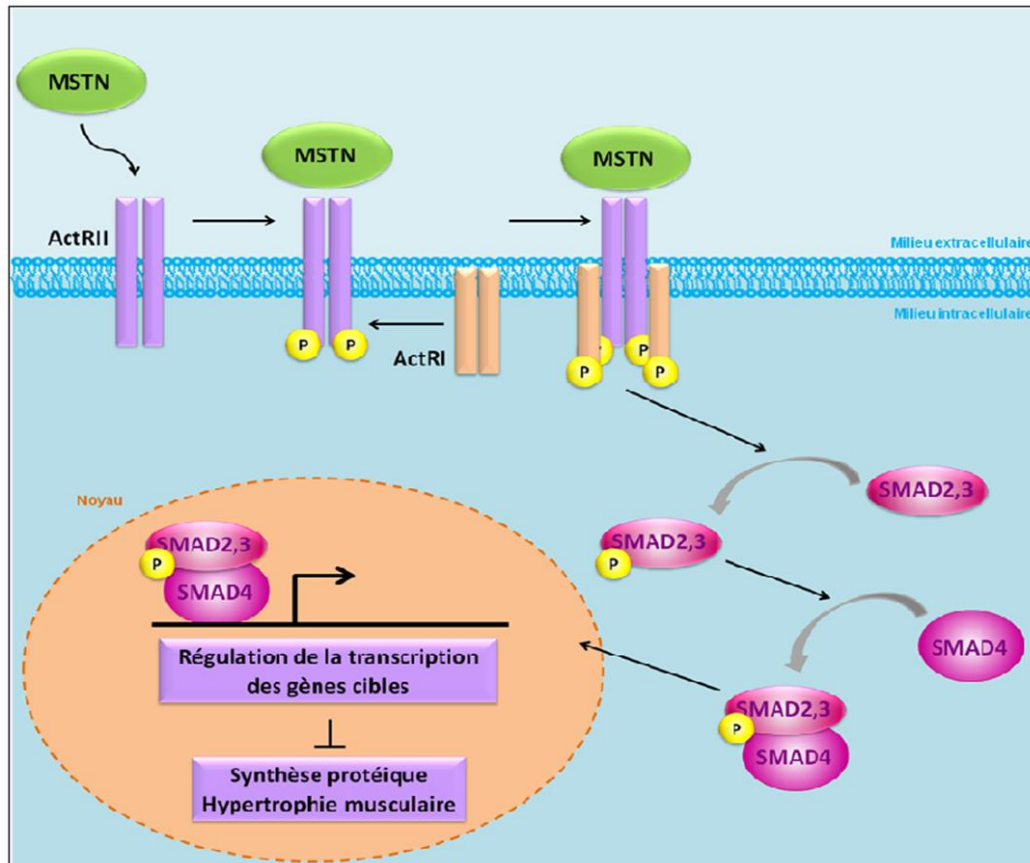


Figure 22 : Schéma de la voie de signalisation de la myostatine.

La myostatine a la capacité de réguler l'expression de gènes cibles directement impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules musculaires. En présence de myostatine, les myoblastes C2C12 montrent une réduction de leur capacité proliférative (Taylor et al., 2001). La myostatine entraîne une stabilisation des cellules satellites dans leur état de quiescence provoquant une réduction importante du nombre de myoblastes (McFarlane et al., 2008). Au contraire, les cellules musculaires présentant une suppression du gène codant pour la myostatine observent une hausse de la prolifération des myoblastes (McCroskery et al., 2003). En plus de l'inhibition de la prolifération, la myostatine module négativement l'étape de différenciation myogénique, étape où les myoblastes fusionnent entre eux afin de former des myotubes matures. La surexpression de la myostatine dans des cellules C2C12 engendre une modulation négative des facteurs régulateurs spécifiques de la myogenèse, tels que Pax7, MyoD et la myogénine, facteurs primordiaux à la différenciation et à la maturation des cellules musculaires (Amthor et al., 2006 ; Durieux et al., 2007 ; Langley et al., 2002 ; McFarlane et al., 2008) (Figure 23). À l'inverse, les souris auxquelles un anticorps anti-myostatine a été administré ont une élévation accrue de la force et de la

masse musculaires comparativement à leurs homologues non traitées (Whittemore et al., 2003), associées à une hausse de la phosphorylation des protéines P70S6K et 4E-BP1 (Welle et al., 2009). Ces données démontrent que la myostatine agit en tant que régulateur négatif de la croissance et de la maturation du muscle squelettique, et suggèrent que la suppression de la myostatine aurait pour conséquence l'absence d'un rétro-contrôle négatif à l'hypertrophie musculaire.

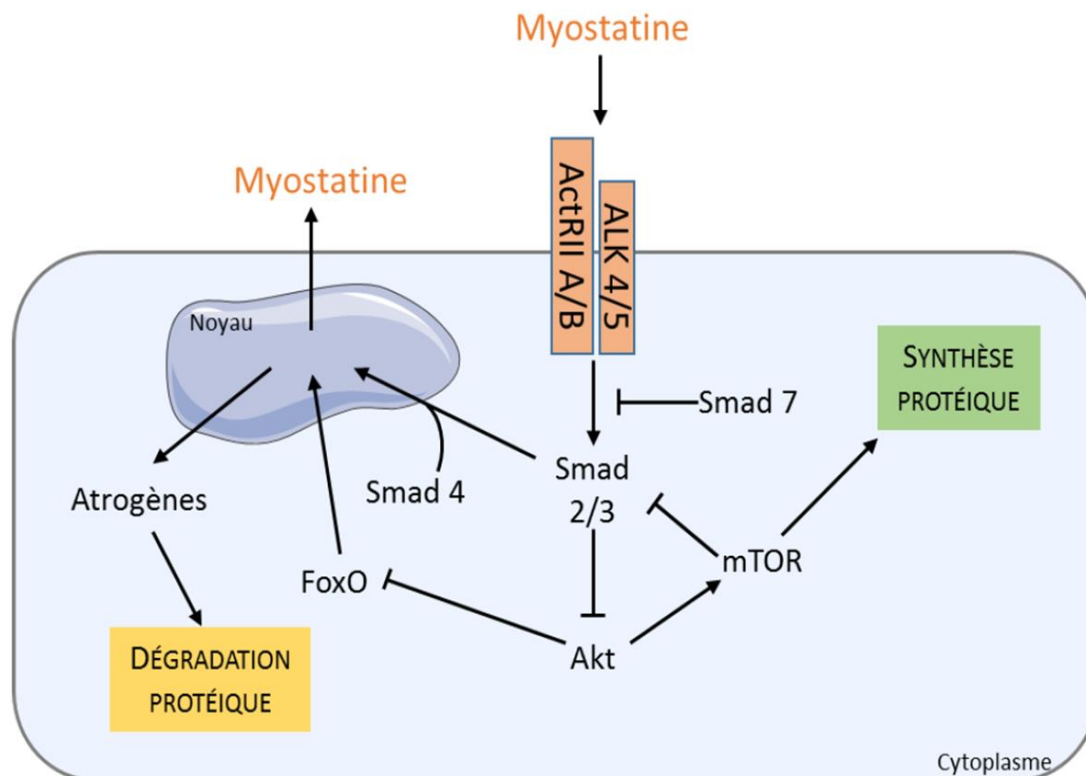


Figure 23 : La voie de la myostatine dans la régulation de l'homéostasie protéique (d'après Sartori et al., 2014).

Au-delà de son implication dans la myogenèse, la myostatine joue également un rôle important dans la régulation de la voie de synthèse des protéines PI3K / Akt / mTOR (Amirouche et al., 2008 ; Glass, 2010 ; Li et al., 2008 ; Trendelenburg et al., 2009) (Figure 23). On observe chez des souris présentant une absence de myostatine des muscles squelettiques hypertrophiés associés à une augmentation de l'activation des protéines Akt et mTOR (Morissette et al., 2009). Au contraire, la surexpression de la myostatine chez le rat agit comme un régulateur négatif de plusieurs protéines de la voie de synthèse, avec une diminution de la phosphorylation d'Akt, de P70S6K et de 4E-BP1 (Amirouche et al., 2008). Lors d'une étude *in vitro* effectuée à partir de cellules musculaires issues de souris knock-out de la myostatine, l'analyse morphologique révèle une augmentation significative du diamètre des myotubes associée à une activation plus importante des protéines Akt, mTOR et P70S6K (Rodriguez et al., 2011). En revanche, le traitement des myotubes par la myostatine entraîne une diminution de leur diamètre (McFarlane et al., 2006). L'ensemble de ces données suggèrent que la délétion ou la surexpression de la myostatine joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'homéostasie protéique. De plus, chez l'homme, il a été rapporté que la pratique d'un exercice de résistance, connu comme étant l'une des modalités d'entraînement permettant d'engendrer un maximum d'hypertrophie musculaire, entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour la myostatine (Laurentino et al., 2012).

Si un rôle d'inhibiteur de la synthèse protéique est donné à la myostatine, son action vis-à-vis des voies protéolytiques reste encore controversée. Allen et Unterman ont mis en évidence dans des cellules musculaires en culture que la myostatine contenait des sites de liaison spécifique à FoxO1 (Allen & Unterman, 2007), alors que d'autres chercheurs mettent en avant une activation indirecte de FoxO par l'intermédiaire de l'inhibition de la protéine Akt (Elkina et al., 2011 ; McFarlane, et al., 2006) (Figure 23). Toujours dans un modèle de cellules musculaires C2C12 en culture, il a été démontré que la myostatine conduit à une inhibition de la voie PI3K / Akt / mTOR, à l'activation de FoxO1 et à l'augmentation de l'expression de MAFbx et MuRF-1 (McFarlane et al., 2006). A l'inverse, des souris déficientes en myostatine montrent une diminution de l'expression de MAFbx et MuRF-1, suggérant une baisse concomitante de l'activité du système ubiquitine-protéasome (Gilson et al., 2007).

Combinées, ces données indiquent que la myostatine régule négativement l'activité de la voie PI3K / Akt / mTOR et agit comme un répresseur de l'initiation de la traduction des ARNm par l'inhibition des protéines 4E-BP1 et P70S6K (Amirouche et al., 2008). Même si de nombreuses études révèlent que la surexpression de la myostatine au sein de la cellule musculaire entraîne conjointement une suractivation de FoxO et une surexpression de MAFbx et MuRF-1 (Allen & Unterman, 2007 ; Gilson et al., 2007), le rôle exact de la myostatine dans la modulation des mécanismes de protéosynthèse et de protéolyse régulant l'homéostasie protéique reste encore à éclaircir.

III.3.6. Les calpaïnes

Les calpaïnes sont des protéases à cystéine, non-lysosomales, et dépendantes du calcium. On compte 14 calpaïnes différentes dans l'organisme, les calpaïnes 1, 2 et 3 étant principalement exprimées dans la cellule musculaire (Lin et al., 1997). A partir d'études *in vivo* et *in vitro*, il a été démontré que les calpaïnes sont impliquées dans le remodelage cytosquelettique *via* la régulation de la fixation des protéines cytosquelettiques à la membrane plasmique (Mazères et al., 2006). Une étude sur des myotubes de souris a montré que la déficience en calpaïne 3 entraînait une désorganisation sarcomérique, suggérant donc un rôle important de cette calpaïne dans le remodelage du sarcomère (Kramerova et al., 2004). D'autre part, une mutation du gène codant pour la calpaïne 3 a été associée à la dystrophie musculaire (Charton et al., 2015). Plusieurs études ont montré qu'une activation anormalement accrue des calpaïnes musculaires étaient couramment observée dans des conditions atrophiques telles que l'inactivité, la dénervation et l'hypoxie (Chaudhary et al., 2012 ; Huang, J & Xiaoping, 2016 ; Matsumoto et al., 2014). Il a été constaté que dans des conditions d'atrophie avancée, des souris traitées par la calpastatine, un inhibiteur endogène de la calpaïne 2, réduit significativement la dégradation des protéines (Purintrapiban et al., 2003). De plus, la surexpression de la calpastatine a empêché la transition des isoformes de myosine lente à rapide (Fischer et al., 2001).

Il a été rapporté que dans l'atrophie musculaire, l'augmentation des concentrations de calcium était associée à une surexpression des calpaïnes (Huang, J & Xiaoping, 2016). Les calpaïnes inactives présentes dans le cytosol se transloquent vers les membranes en réponse à une augmentation du taux de calcium intracellulaire. Puis au niveau de la membrane, les calpaïnes sont activées en présence de calcium et de phospholipides. Les calpaïnes activées dégradent les protéines situées au niveau de la membrane et du cytosol par hydrolyse (Huang, J & Xiaoping, 2016). Lors de la fonte musculaire, le site préférentiel de la protéolyse de calpaïnes semble se situer au niveau de la ligne Z, située de part et d'autre du sarcomère. Une fois activées, les calpaïnes sont capables de cliver rapidement les protéines

cytosquelettiques telles que la titine et la desmine au niveau de la ligne Z. D'autre part, les calpaïnes sont également capables de cliver rapidement des protéines sarcomériques telles que les troponines T et I, la tropomyosine et la protéine C, la myosine et l'actine. Ces protéines pourront ensuite être ubiquitinées et dégradées en peptides par les protéasomes (Huang, J & Xiaoping, 2016).

La régulation de la masse musculaire est le résultat d'un équilibre dynamique entre les voies de signalisation stimulant la synthèse et la dégradation protéiques. Cet équilibre est régulé de manière coordonnée par les voies de signalisation stimulant soit la protéosynthèse par l'intermédiaire des protéines telles que Akt et mTOR, ou la protéolyse par le facteur de transcription FoxO. Ce dernier est à l'origine de l'activation des deux systèmes majeurs de la dégradation cellulaire : les systèmes de l'autophagie-lysosomale et ubiquitine-protéasome. De nombreuses études ont révélé que plusieurs protéines telles que Akt, AMPK, FoxO et la myostatine interfèrent de manière directe ou indirecte avec les voies de signalisation de protéosynthèse et protéolyse, jouant ainsi un rôle crucial dans la régulation et le contrôle de l'homéostasie protéique. Cependant, il est bien établi que la suractivation ou l'inhibition de l'une des deux voies constitutives de l'homéostasie protéique entraîne inévitablement un basculement de la balance entre synthèse et dégradation protéiques, provoquant par conséquent soit une hypertrophie couramment observée à la suite d'une activité physique en résistance, soit une atrophie observée lors de diverses pathologies ou de situations de stress métabolique telles que la dénutrition, l'inflammation, le stress oxydatif ou encore l'hypoxie cellulaire.

IV. Les réponses cellulaires à l'hypoxie

La réduction de la disponibilité en O₂ est définie comme un état d'hypoxie. Elle peut être due à une exposition prolongée à une faible pression partielle en O₂, observée chez les personnes vivant en altitude, ou touchées par des pathologies cardiovasculaires ou respiratoires (Clarkson et al., 2005 ; Eckert et al., 2007 ; Kent et al., 2011). Au niveau de la mer, la pression partielle de l'air ambiant est de 150 mmHg ; le transport de l'O₂ de l'air ambiant vers les tissus tels que les muscles squelettiques entraîne une nette diminution de la pression en O₂. Chez l'homme, le passage de l'O₂ des voies aériennes supérieures, des bronches, des alvéoles puis de la barrière alvéo-capillaire jusqu'au sang artériel fait diminuer la pression en O₂ à 105mmHg et atteint 35 mmHg soit 5% O₂ dans le muscle squelettique (Richardson et al., 2006). L'hypoxie cellulaire correspond à toute diminution du taux d'O₂ au sein des tissus de l'organisme, ce taux devenant bien inférieur au besoin normal de la cellule. Un taux entre 4-6% O₂ est considéré comme un environnement en normoxie (normal), entre 4-2% O₂, on parle d'une hypoxie dite physiologique (modérée), en-deçà de 2% O₂ une hypoxie pathologique, et un taux d'O₂ inférieur à 1% est qualifié d'hypoxie extrême (Chaillou et al., 2016 ; Deldique et al., 2013 ; Richardson et al., 2006). Cette hypoxie est considérée au niveau cellulaire comme un important facteur de stress métabolique (Majmundar et al., 2010 ; Liu et al., 2006). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* montrent que les muscles squelettiques chroniquement exposés à l'hypoxie subissent des conséquences néfastes sur leur développement (Chaudhary et al., 2012 ; Man et al., 2009). Nous allons, lors de ce chapitre, passer en revue les principaux mécanismes et conséquences de l'hypoxie au sein de la cellule musculaire squelettique.

IV.1. Les adaptations moléculaires à l'hypoxie

Au sein des fibres musculaires comme dans toutes les cellules, les mécanismes détectant les variations de la pression partielle d'oxygène activent des processus adaptatifs qui favorisent la survie lorsque la disponibilité en oxygène est faible. Les mitochondries sont considérées comme l'un des éléments centraux dans la détection des variations de l'O₂ *via* une libération accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) de la chaîne de transport d'électrons en réponse à une hypoxie. Les ROS libérées dans des conditions hypoxiques agissent comme des agents de signalisation qui activent diverses voies de signalisation intracellulaires, et notamment la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α (Sabharwal et al., 2014 ; Sullivan et al., 2013).

IV.1.1. HIF-1

Les fluctuations d'exposition et de disponibilité de l'O₂ au sein de la cellule nécessite un processus adaptatif dans le but de rétablir l'équilibre énergétique et l'homéostasie de la cellule, indispensables au bon fonctionnement cellulaire. Le régulateur central responsable de l'induction des mécanismes permettant l'adaptation à la variation du taux d'O₂ tissulaire est le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1), constitué de deux sous-unités : HIF-1 α et HIF-1 β (Iyer et al., 1998 ; Semenza et al., 1998). Lors d'une défaillance de l'apport d'oxygène dans l'organisme, l'action transcriptionnelle de HIF-1 α favorise l'expression de différents gènes ayant la faculté de promouvoir le transport de l'O₂ et la diffusion de celui-ci au sein des différents tissus, organes ou régions de l'organisme faiblement approvisionnés en O₂.

Localisé dans le cytoplasme, HIF-1 α a la particularité de posséder une demi-vie très courte en condition de normoxie. En présence d'oxygène, HIF-1 α est instable et est rapidement dégradé par le protéasome (Semenza et al., 2001) (**Figure 24**). Ce mécanisme de dégradation est hautement dépendant de la présence d'O₂ et de fer permettant aux prolyl-hydroxylases (PHD) d'hydroxyler les résidus proline des domaines protéiques ODDD (Oxygen-dependent Degradation Domain) responsables du processus de protéolyse de HIF-1 α . Cette réaction d'hydroxylation par les PHD entraîne la liaison de HIF-1 α avec un groupe hydroxyle (-OH) et sa reconnaissance avec la protéine VHL (Von Hippel Lindau protein), entraînant sa polyubiquitination suivie de sa dégradation par le protéasome 26S (Lee et al., 2004).

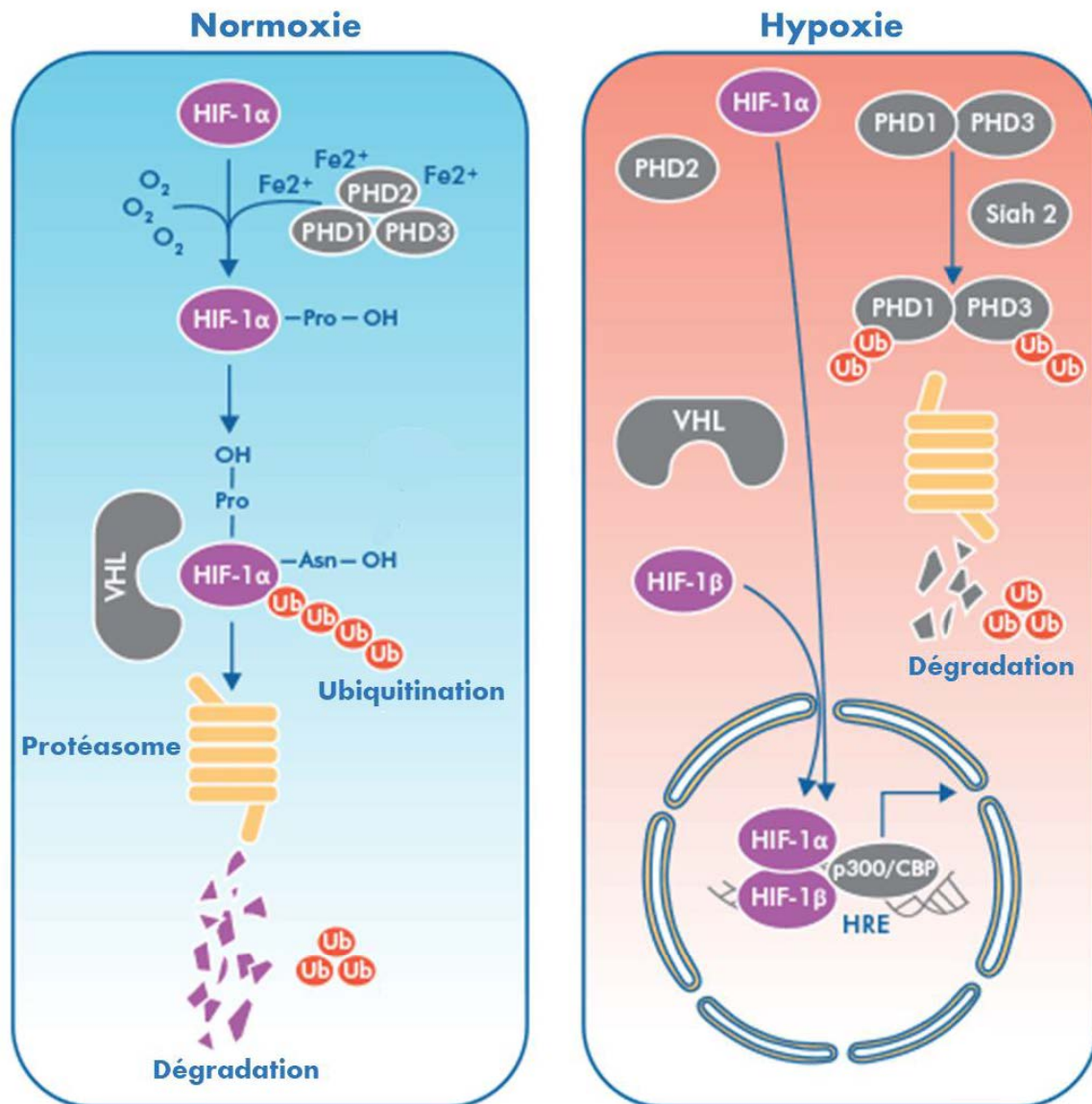


Figure 24 : Schématisation de la régulation de HIF-1 α en fonction de niveau d'oxygène intracellulaire.

La déplétion de la molécule d'O₂ au sein du compartiment cellulaire provoque une défaillance de la capacité d'hydroxylation des PHD, permettant ainsi la stabilisation de HIF-1 α . Ce dernier est alors transloqué au niveau du noyau, se lie à un cofacteur (P300/CBP) et forme un dimère actif avec la sous-unité HIF-1 β (Semenza et al., 2001) (**Figure 24**). Localisé exclusivement dans le noyau, la stabilité de

HIF1- β n'est pas dépendante du niveau d'O₂ intracellulaire au contraire de son homologue α . Cependant, la formation de l'hétérodimère HIF-1 α / HIF-1 β est indispensable à la constitution et à l'activation transcriptionnelle du facteur de transcription HIF-1 (Adams et al., 2009) (Figure 24). Dans des conditions hypoxiques sévères, le manque d'O₂ est probablement suffisant pour inhiber la réaction d'hydroxylation, alors que dans des conditions hypoxiques légères, la production mitochondriale de ROS est nécessaire pour supprimer l'activité des prolines-hydroxylases. On peut noter que l'activation de HIF-1 est permise également par l'emploi de chélateur de fer, tel que le chlorure de cobalt ou la desferrioxamine, ayant la faculté d'entrer en compétition avec le Fe²⁺ et par conséquent inhiber l'activité hydroxylase des PHD, cofacteur indispensable à la réaction d'hydroxylation de HIF-1 α (Epstein et al., 2001).

L'activation de HIF-1 entraîne la transcription et la surexpression de nombreux gènes cibles et sensibles à l'hypoxie, possédant une séquence promotrice commune que l'on nomme HRE (Hypoxia Responsive Element) (Greijer et al., 2004). En réponse à l'hypoxie, on peut ainsi observer une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'érythropoïèse (EPO), permettant d'accroître la formation de globules rouges, l'élévation du taux d'érythrocytes améliorant considérablement le transport de l'O₂ aux tissus (Grimm et al., 2002). Plusieurs études ont démontré qu'à la suite d'un stress hypoxique, HIF-1 favorise la transcription de gènes impliqués dans l'angiogenèse (Jung et al., 2005 ; Risau, 1997 ; Semenza et al., 2002), tels que le VEGF (Vascular endothelial growth factor). Le VEGF est l'une des protéines pro-angiogéniques les plus importantes du processus d'angiogenèse ; il conduit à l'augmentation de la densité du réseau capillaire dans la zone hypoxique ou non vascularisée, permettant ainsi la diminution de la distance de diffusion de l'O₂, facilitant ainsi l'approvisionnement cellulaire en O₂ (Ahluwalia et al., 2012 ; Ferrara et al., 2003).

La diminution du niveau d'O₂ tissulaire a pour conséquence, une transformation du métabolisme de la cellule. En hypoxie, la voie métabolique aérobie du glucose se transforme en une glycolyse anaérobie (Webster et al., 2003, Kim et al., 2006). De plus, on observe *in vitro* que les cellules hypoxiques ont un accroissement de l'expression des enzymes glycolytiques et des transporteurs de glucose, les GLUT (Wood et al., 2007). L'hypoxie, par l'intermédiaire de HIF-1, favorise la surproduction d'ATP *via* la glycolyse anaérobie afin de compenser partiellement les demandes d'énergie cellulaire (Denko et al., 2008 ; Kim et al., 2006). Des recherches sur des souris knock-out en HIF-1 α montrent un profond changement de leur métabolisme, avec basculement vers un métabolisme majoritairement oxydatif, alors que les souris déficientes en prolyl hydroxylase présentent des taux plus élevés en HIF-1 α , associé à un métabolisme principalement glycolytique (Aragones et al., 2008). Des auteurs ont émis l'hypothèse que l'impact de la signalisation de HIF-1 peut aller au-delà d'une adaptation métabolique provoquée par l'hypoxie, et jouerait également un rôle dans la définition du type et de la taille de la fibre musculaire. Une étude menée sur des rats exposés à un environnement normoxique (21% O₂) montre que les taux de HIF-1 α sont plus élevés au sein des muscles rapides que dans les muscles lents. De plus, les auteurs ont observé qu'une stimulation électrique répétée, de haute fréquence et d'intensité élevée, reproduisant une contraction typique de muscles rapides, entraînait une augmentation du taux de HIF-1 α dans le soléaire, composé majoritairement de fibres lentes. Au contraire, une stimulation électrique de longue durée, de basse fréquence et de faible intensité, typique de contraction que l'on retrouve dans les muscles lents, entraîne une réduction du taux de HIF-1 α du muscle EDL, composé principalement de fibres rapides (Lunde et al., 2011).

IV.1.2. REDD1

En hypoxie, la protéine REDD1 (Regulated in Development and DNA Damage responses 1), jouant un rôle crucial dans la régulation de la survie cellulaire et la prolifération des cellules cancéreuses, a été identifiée comme étant une cible transcriptionnelle de HIF-1 (Figure 25), (Pouysségur et al., 2006 ; Sahra et al., 2011). Au niveau de la cellule musculaire, REDD1 est principalement impliquée dans l'inhibition de la protéine mTOR (Sofer et al., 2005) (Figure 25). *In vitro*, Brugarolas et ses collaborateurs ont montré que la baisse d'activation de mTOR consécutive à un stress hypoxique est dépendante d'une surexpression de REDD1. De plus, l'abrogation du gène codant pour la protéine REDD1 n'entraîne aucune régulation négative de mTOR et de ses effecteurs 4E-BP1 et P70S6K lors de l'hypoxie (Brugarolas et al., 2004), alors qu'au contraire, la surexpression de REDD1 favorise l'activation de TSC2, provoquant une inhibition de l'activation de mTOR et de P70S6K (Brugarolas et al., 2004 ; DeYoung et al., 2008 ; Favier et al., 2010). Bien que de nombreuses preuves suggèrent que REDD1 soit associée à la régulation négative de la voie de synthèse des protéines, l'ensemble des interactions entre REDD1 et les mécanismes de l'atrophie musculaire reste encore à être élucidé.

IV.1.3. AMPK et hypoxie

Nous avons vu précédemment que l'AMPK est le senseur de l'état énergétique de la cellule (Hardie et al., 2006). Cette protéine est extrêmement sensible au ratio AMP/ATP et également aux stress métaboliques tels que l'absence de substrat (dénutrition), les chocs thermiques ou l'hypoxie (Hardie et al., 2012 ; Kemp et al., 1999). De nombreuses études ont fait le lien entre l'activation de l'AMPK et la diminution du niveau d'O₂ intracellulaire (Emerling et al., 2009 ; Nagata et al., 2003 ; Papandreou et al., 2008 ; Wadley et al., 2006) (Figure 25). Cependant, cette interaction entre l'AMPK et l'hypoxie a été principalement mise en évidence lors de recherches menées sur l'inhibition de la prolifération de cellules tumorales par induction d'un stress hypoxique (Hu et al., 2012 ; Luo et al., 2010 ; Papandreou et al., 2008), et très peu de recherches se sont intéressées à l'existence de ce lien dans les cellules musculaires. Une étude *in vitro* sur des cellules HNSCC (Head and neck squamous cell carcinoma) a montré qu'une hypoxie prolongée entraîne un épuisement du niveau énergétique de la cellule se manifestant par une baisse du taux d'ATP, provoquant ainsi l'activation de l'AMPK (Figure 25). Dans cette même étude, les auteurs ont observé que lorsque ces mêmes cellules sont prétraitées avec un puissant inhibiteur de l'AMPK, cela engendre une importante sous-expression de REDD1 et ce en réponse à un épisode d'hypoxie prolongé (Schneider et al., 2008). Ces résultats mettent en avant un possible mécanisme interactionnel entre l'AMPK et REDD1 lors d'un épisode d'hypoxie, dans lequel l'AMPK jouerait un rôle dans la régulation de l'expression de REDD1.

Bien que le rôle de l'AMPK dans l'inhibition de mTOR *via* l'activation de son inhibiteur TSC2 en condition d'hypoxie soit avéré *in vitro* (Brugarolas et al., 2004 ; Liu, et al., 2006 ; Schneider, et al., 2008), ces données restent encore très controversées dans les modèles *in vivo* (Chen et al., 2010b ; Favier et al., 2010). L'ensemble de la compréhension des mécanismes par lesquels l'AMPK régule négativement la voie de synthèse en hypoxie reste encore à être élucidé. L'une des explications de ce processus serait l'augmentation du stress oxydant et des ROS dont la principale source au niveau cellulaire est la mitochondrie (Clanton, 2007), pouvant moduler l'activation de l'AMPK lors d'un stress hypoxique (Emerling et al., 2009 ; Mungai et al., 2011).

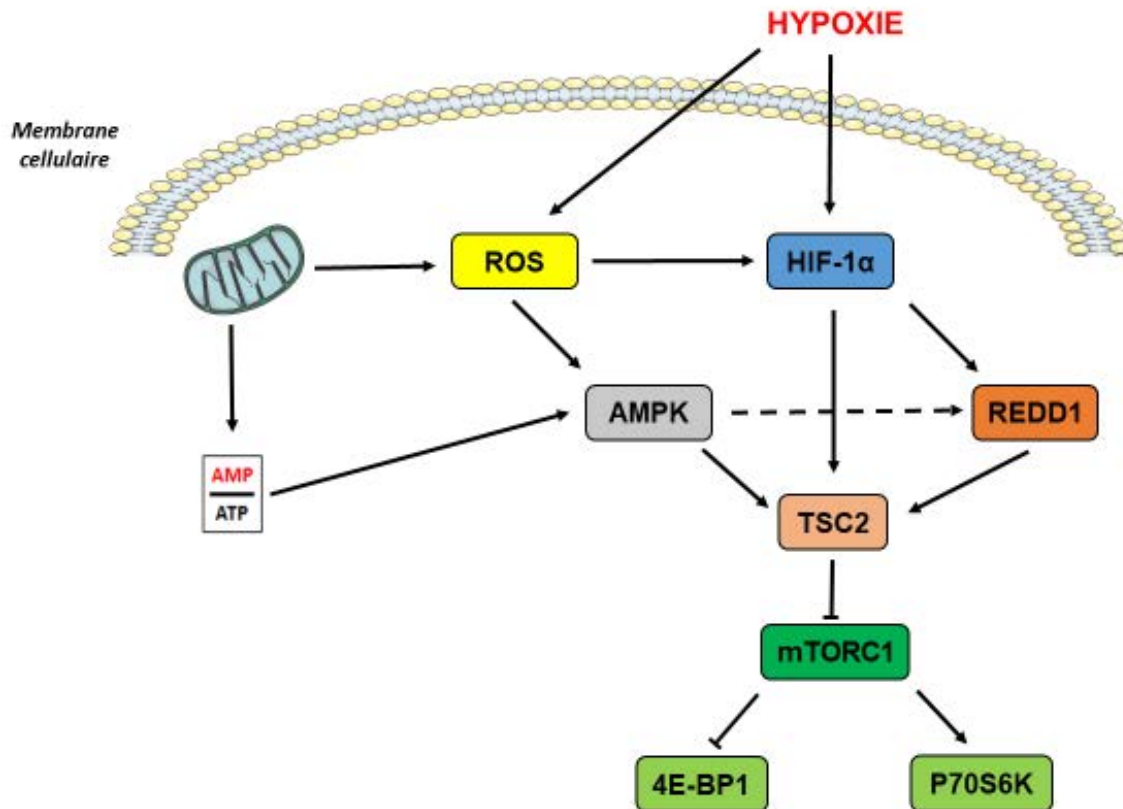


Figure 25 : Régulation de la voie Akt / mTOR et de la voie de l'hypoxie via l'AMPK lors d'un stress cellulaire.

IV.1.4. La mitochondrie et le stress oxydant

IV.1.4.1. La chaîne de transport des électrons

L'une des fonctions principales de la mitochondrie est la production d'ATP, énergie indispensable à de nombreuses réactions biologiques de la cellule (Griffiths & Rutter, 2009 ; Stump et al., 2003). Son rôle de producteur d'énergie lui permet de participer de manière directe et indirecte à de nombreux processus intracellulaires, tels que la contraction musculaire, la régulation de nombreuses enzymes, ou encore les modifications post-traductionnelles (notamment la phosphorylation). La chaîne de transport des électrons, localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, est composée de cinq complexes multiprotéiques (Figure 26). Les complexes mitochondriaux I et II utilisent les électrons transportés par le NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et la FADH₂ (Flavin Adénine Dinucléotide), issus du cycle Krebs (Hirst, 2013). Les électrons sont ensuite transférés vers le complexe III par l'intermédiaire du coenzyme Q, puis transférés au cytochrome C, agissant comme une navette pour amener les électrons vers le complexe IV. Ce dernier utilise les électrons en provenance du cytochrome C afin de catalyser la réduction de l'O₂ moléculaire en H₂O. Le transfert des électrons entre les complexes I, III et IV s'accompagne d'un déplacement de protons H⁺ de la matrice intra-mitochondriale vers l'espace intermembranaire, générant ainsi un gradient électrochimique permettant au complexe V d'utiliser cette énergie pour phosphoryler la

molécule d'ADP en ATP par l'intermédiaire de l'ATP synthase (complexe V mitochondrial) (Hirst, 2013) (Figure 26).

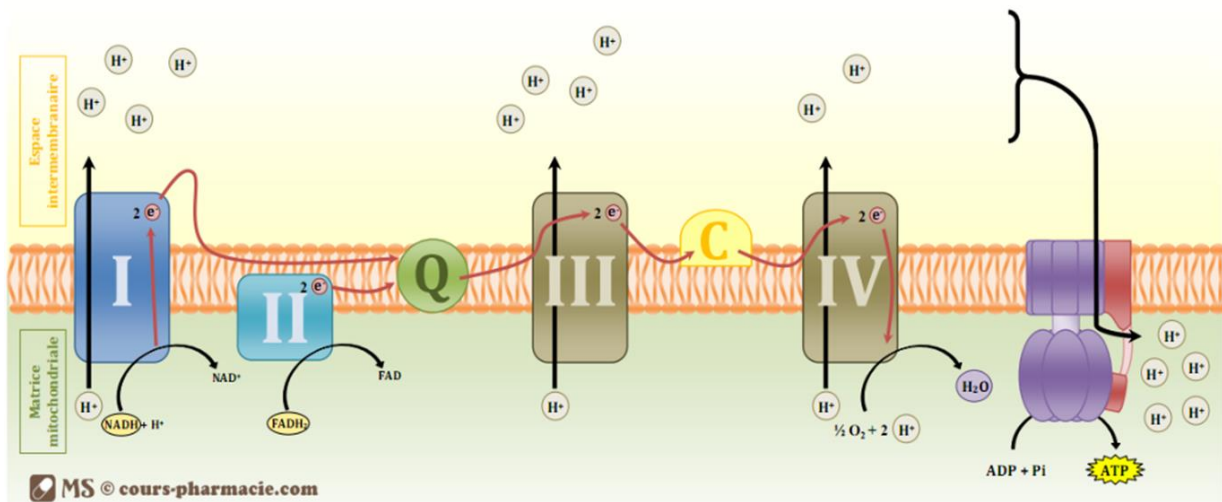


Figure 26 : Schématisation du mécanisme de synthèse de l'ATP issu de de la chaîne de transport des électrons (d'après cours-pharmacie.com).

L'oxygène moléculaire sert à acheminer les électrons entre chaque complexe, jusqu'à ce que l'O₂ soit transformé en H₂O par le complexe IV (Figure 26). Les ROS sont alors produits par les différents complexes de la chaîne de transport des électrons (Murphy, 2009). Les complexes I, II et III contiennent des sites par lesquels les électrons peuvent réduire l'O₂ ; cependant cette réduction de l'O₂ est incomplète, entraînant la formation d'un anion superoxyde (O₂⁻). L'O₂⁻ est le ROS primaire formé par la mitochondrie et est converti en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par l'action de la superoxyde dismutase (SOD) (Brand et al., 2004). Par la suite, la glutathion peroxydase (GPX) catalyse la transformation de deux molécules d'H₂O₂ en H₂O et O₂. On peut noter que les complexes I et II produisent uniquement du superoxyde localisé dans la matrice mitochondriale, alors que le complexe III forme du superoxyde à la fois dans la matrice et dans l'espace intermembranaire. Les ROS produits dans l'espace intermembranaire peuvent avoir une influence sur les voies de signalisation cytosoliques. Les ROS font partie intégrante de plusieurs voies cellulaires, même si les ROS excessifs ou mal localisés endommagent les cellules. Les ROS fonctionnent comme des molécules de signalisation qui régulent des processus tels que la stabilisation de HIF-1, l'activité transcriptionnelle de NF-κB, la production de pièges extracellulaires par neutrophiles (NETs) et la stimulation de l'autophagie (McCubrey et al., 2006 ; Ray et al., 2012).

IV.1.4.2. La perturbation de l'activité mitochondriale en hypoxie

L'O₂ est un élément essentiel dans le métabolisme aérobie en raison de son rôle central dans la production d'ATP par les mitochondries. L'hypoxie cellulaire engendre des adaptations avec pour objectif d'augmenter l'apport d'O₂ vers les tissus hypoxiques (angiogenèse), tout en diminuant simultanément les processus cellulaires consommateurs d'ATP (Bunn et al., 1996 ; Semenza et al., 2001 ; Wenger, 2002). Dans les nombreuses adaptations cellulaires à l'hypoxie, il a été observé une surproduction de ROS mitochondriaux. Des études *in vitro* sur différents types cellulaires ont montré que l'hypoxie accélère et augmente la production des ROS par la chaîne de transport des électrons mitochondriaux (Bell et al., 2007 ; Chandel et al., 1998 ; Emerling et al., 2009 ; Guzy et al., 2005) (Figure

25. Cette formation de ROS est principalement issue du complexe III (Chen et al., 2003), les ROS étant produits dans l'espace intermembranaire des mitochondries et dans le cytoplasme, ces ROS pouvant influencer sur différentes voies de signalisation intracellulaires (Chen et al., 2011a ; Hamanaka & Chandel, 2010 ; Sena & Chandel, 2012) (Figure 25). De plus, une étude a permis de mettre en évidence une interaction entre la surproduction de ROS en provenance de complexe III et l'augmentation de la stabilisation de HIF-1 α . À l'opposé, les cellules en hypoxie pour lesquelles la biogénèse mitochondriale a été bloquée montrent une réduction significative de la stabilisation de HIF-1 α (Chandel et al., 2000 ; Guzy et al., 2005). Enfin, il a été observé qu'en normoxie, l'ajout de H₂O₂ exogène augmente la stabilisation de HIF-1 α (Chandel et al., 2000) et active dans le même temps la protéine AMPK (Emerling et al., 2009) (Figure 25).

La diminution du taux d'O₂ intracellulaire entraîne une pléiade de processus et mécanismes adaptatifs permettant à la cellule de faire face à ce stress hypoxique. La stabilisation rapide de HIF-1 en hypoxie et son large champ d'action lui confère le statut de régulateur clé de l'hypoxie. Ce facteur de transcription a la faculté de promouvoir de nombreux gènes possédant une séquence HRE, responsables entre autres d'accroître la production de globules rouges et la densité du réseau capillaire afin d'augmenter le transport et l'approvisionnement de l'O₂ au sein des cellules, tissus et régions de l'organisme sous hypoxie. HIF-1 est également considéré comme un répresseur des voies responsables de la croissance cellulaire ; en particulier, l'activation de sa cible, REDD1, conduit à un défaut d'activation de la voie de synthèse des protéines via l'inhibition de mTOR. L'inhibition des voies anaboliques de la cellule de la part de HIF-1 et de la protéine AMPK a pour but de réduire l'ensemble des processus et mécanismes cellulaires à forte dépendance de la molécule d'ATP. La production d'ATP issue de la mitochondrie se trouve considérablement réduite en hypoxie. La mitochondrie semble donc avoir la propriété d'être un senseur de l'hypoxie, de par sa capacité à produire et libérer des ROS dans le cytosol, ces ROS mitochondriaux étant par la suite responsables de l'initiation de la stabilisation de HIF-1 α lors de l'hypoxie. Contre l'ensemble de ces facteurs d'adaptation à l'hypoxie, en faveur de la protéosynthèse, serait-il l'une des clés de la limitation de l'atrophie musculaire en hypoxie ?

IV.2. Les adaptations du muscle squelettique en hypoxie

La réduction du taux d'O₂ intracellulaire provoque de nombreuses adaptations, telles que la stabilisation du facteur de transcription HIF-1, la surexpression du gène REDD1, l'activation de l'AMPK et la surproduction de ROS mitochondriaux (Figure 25). L'ensemble de ces changements va conduire à la mise en place de plusieurs mécanismes ayant pour objectif un ralentissement, une modération des voies anaboliques et de croissance cellulaire lors d'un stress hypoxique. Nous allons à présent nous focaliser sur l'impact de l'hypoxie dans les différents processus de régulation et de développement de la cellule musculaire.

IV.2.1. Le dysfonctionnement et la perte de cellules musculaires squelettiques

La cohorte de données citées précédemment et tout particulièrement les recherches menées *in vitro* sur diverses lignées cellulaires, révèle qu'une importante réduction de la disponibilité en O₂ diminue le taux de synthèse des protéines et augmente la protéolyse (Bakker et al., 2007 ; Caron et al., 2009 ; Ren et al., 2010 ; Rodriguez et al., 2014). Hoppeler & Vogt mettent en avant que les fibres musculaires font partie des cellules de l'organisme les plus aptes à la gestion d'un appauvrissement en

O₂ (Hoppeler & Vogt, 2001), le muscle squelettique étant soumis à des périodes d'hypoxie transitoire lorsque l'organisme atteint ses limites dans l'approvisionnement de l'O₂ lors d'une activité physique d'endurance ou de résistance (Vogt et al., 2001). La baisse du taux d'O₂ tissulaire entraîne de nombreuses conséquences dans les mécanismes régissant la contraction musculaire.

La diminution de la production de l'ATP par la mitochondrie et la suractivation de la glycolyse anaérobie destinée à combler le faible rendement de la filière aérobie engendrent l'altération de l'appareil contractile des fibres musculaires en hypoxie (Carvalho et al., 1996 ; Hoppeler et al., 2003 ; Howlett & Hogan, 2007). En effet, les analyses de biopsies musculaires de patients souffrant d'hypoxémie chronique comme la BPCO montrent une disparition progressive des fibres de types I et une augmentation de la proportion des fibres de types II (de Oca et al., 2006 ; Man et al., 2009 ; Patel et al., 2014) (**Figure 27**). De nombreuses études ont montré que l'hypoxie induit un remodelage de la typologie musculaire avec notamment une transition d'un phénotype oxydatif vers un profil glycolytique anaérobie (de Oca et al., 2006 ; Nataneek et al., 2013 ; Man et al., 2009 ; Patel et al., 2014). On suppose que les répercussions de l'hypoxie sur l'ensemble des fibres musculaires affectent majoritairement les fibres de type I, conséquence de leurs propriétés oxydatives et leur forte dépendance à l'O₂ (Man et al., 2009). Cette transition des fibres lentes vers des fibres rapides est le manifeste d'une prédominance d'un métabolisme glycolytique à l'instar d'un métabolisme oxydatif. Cependant, une étude de Theije et ses collaborateurs montrent que les fibres de types II sont elles aussi sérieusement affectées par la privation d'O₂, causée par une réduction de la capacité de diffusion de l'O₂, un réseau capillaire amoindri et un épuisement des stocks de glycogène (Jakobsson et al., 1990 ; Jobin et al., 1998 ; de Theije et al., 2014). Lors d'une activité physique même modérée, les patients atteints de BPCO éprouvent une intolérance à l'effort. Ce symptôme est en partie lié aux modifications structurales et métaboliques des muscles squelettiques, le muscle devenant plus fatigable du fait des changements métaboliques (Mador et al., 2004 ; Man et al., 2003). De plus, ce changement de typologie musculaire s'accompagne d'une diminution de la masse musculaire caractérisée par une réduction de la section transversale des fibres musculaires (Gosker et al., 2002 ; Jakobsson et al., 1990 ; Jobin et al., 1998).

Quelle que soit la condition à l'origine de l'hypoxie (environnementale ou pathologique), on observe dans la majorité des cas une perte de masse musculaire plus ou moins importante, en fonction de la sévérité et du temps d'exposition à un stress hypoxique (Agustí et al., 2002 ; Netzer et al., 2008 ; Tschöp & Morrison, 2001). Plusieurs études menées en haute montagne révèlent que les alpinistes ou personnes résidant en altitude subissent, suite à cette exposition de longue durée à très haute altitude, une diminution du volume musculaire et une réduction de la section transversale des fibres musculaires (Hoppeler et al., 1990 ; Hoppeler et al., 2001 ; MacDougall et al., 1991 ; Mizuno et al., 2008). Hoppeler et al. observent une chute de la masse corporelle entre 5-10% et une diminution de 20% de la section transversale des fibres musculaires dans le vaste externe d'alpinistes lors d'un séjour de 8 semaines à plus de 5000m d'altitude (Hoppeler et al., 1990). Ces résultats sont également retrouvés chez des sujets ayant subi une décompression progressive durant 40 jours au sein d'une chambre hypobare simulant une ascension. Les résultats montrent une perte de masse musculaire de 13 à 15% et une réduction de 25% des surfaces transversales de fibre musculaire (MacDougall et al., 1991). Les chercheurs de ces études ont également observé une augmentation de la densité capillaire, permettant une amélioration du transport d'O₂ vers les muscles principalement sollicités (Hoppeler et al., 1990 ; MacDougall et al., 1991). Cependant, le rapport capillaires/fibres musculaires demeure

inchangé après une longue période d'hypoxie, suggérant que l'augmentation de la capillarisation est attribuée exclusivement à la réduction importante de la section transversale des fibres musculaires, conséquence directe de l'atrophie musculaire (Hoppeler et al., 2001, Mizuno et al., 2008).

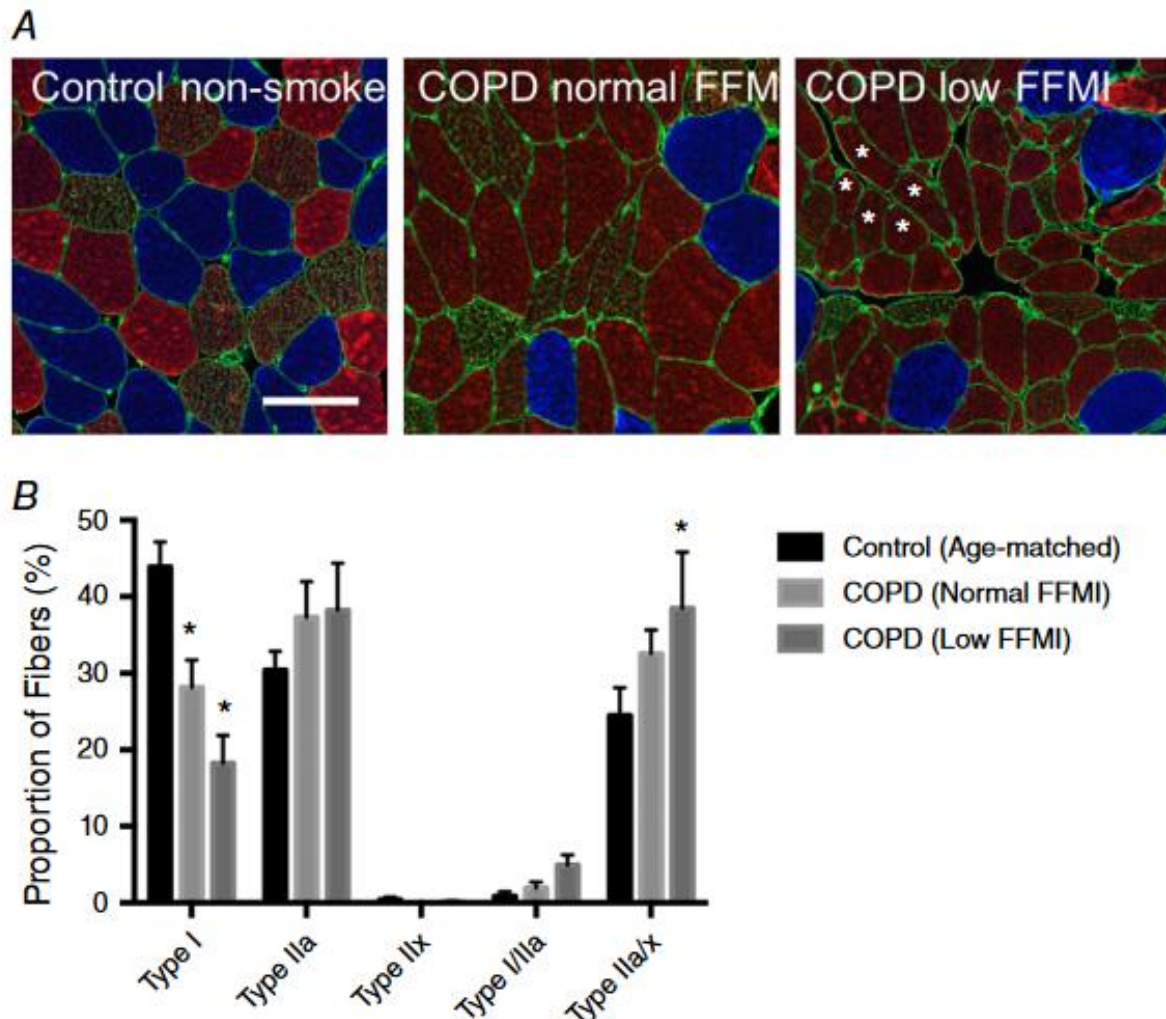


Figure 27 : Conséquence d'une exposition à l'hypoxie sur la typologie des fibres musculaires de patients BPCO (d'après Kapchinsky et al., 2018). (A) Marquage par immunofluorescence des fibres musculaire de type I (bleu), le type IIa (rouge) et le type IIx (vert) (barre = 100µm). (B) Analyse en % de la proportion du type de fibre musculaire. $P < 0,05$ vs Control. COPD (chronic obstructive pulmonary disease), FFMI (fat free mass index) (d'après Kapchinsky et al., 2018).

Un ensemble d'observations cliniques montre au niveau musculaire que les surfaces transversales des muscles squelettiques de patients BPCO sont inférieures de 25% en comparaison à des sujets sains (Gosker et al., 2002 ; Jakobsson et al., 1990 ; Jobin et al., 1998) (Figure 27). Contrairement au sujet sain exposé à une hypoxie d'altitude, les personnes BPCO voient le rapport capillaires/fibres musculaires diminué drastiquement, résultante d'une réduction concomitante de la densité des capillaires et de la masse musculaire (Hoppeler et al., 1990 ; Jobin et al., 1998). De nombreux travaux se sont intéressés aux mécanismes à l'origine de l'atrophie musculaire des patients BPCO, les hypothèses convergeant toutes vers un déséquilibre de l'homéostasie protéique au sein des cellules musculaires (Debigaré et al., 2003 ; Doucet et al., 2010 ; Puig-Vilanova et al., 2015 ; Testelmans et al., 2009), caractérisé par une réduction de la synthèse protéique et une recrudescence des

systèmes de dégradation des protéines spécifiques au muscle squelettique (Hussain et Sandri, 2012). Toutefois, les causes de l'atrophie musculaire des patients BPCO ne sont à ce jour pas complètement élucidées, de nombreux facteurs confondants devant être pris en compte comme l'hypoxémie, le stress oxydant, l'inflammation, la corticothérapie, la malnutrition, l'inactivité, le vieillissement, le tabagisme...

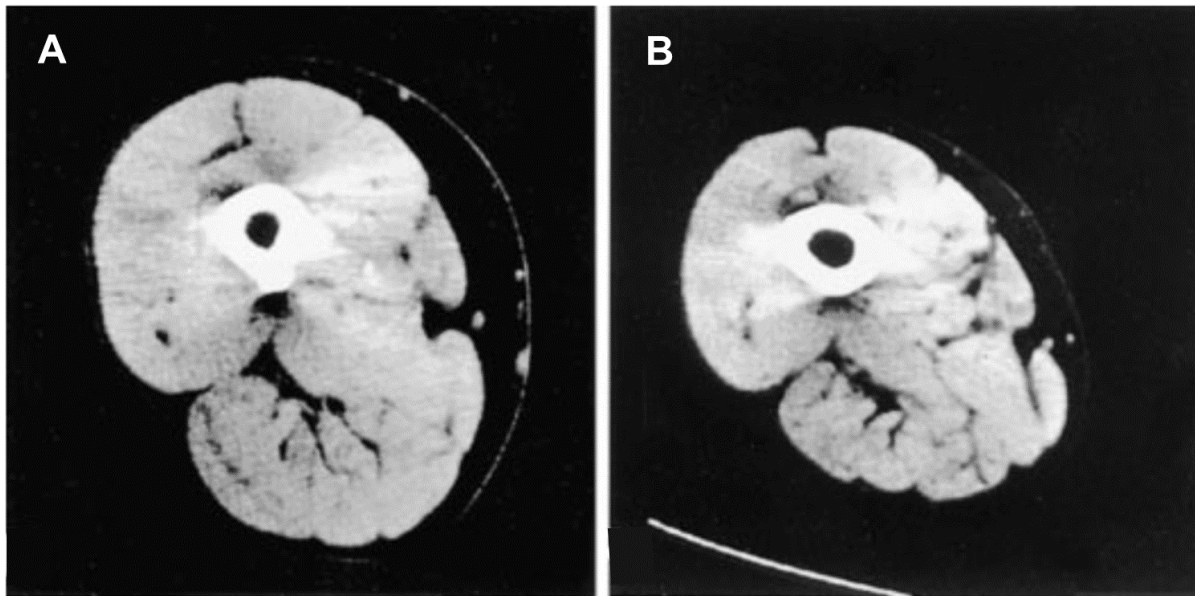


Figure 28 : Section transversale des muscles de la cuisse par tomographie d'un sujet sain (A) et d'un patient BPCO, avec des mensurations de 118,5 cm² et 79,6 cm² respectivement (d'après Bernard et al., 1998).

Plusieurs recherches menées sur le rongeur en hypoxie ont permis d'observer les conséquences directes de l'appauvrissement en O₂ sur la régulation de la masse musculaire (Chaillou et al., 2013 ; Chaudhary et al., 2012 ; Favier et al., 2010 ; Hayot et al., 2011). Une étude sur des rats mâles exposés à une hypoxie hypobare (diminution de la pression en O₂) simulé à 7,620m pendant 14 jours montre une perte de 30% du taux de protéines myofibrillaires associée à une augmentation du système UPS. Cette même étude observe également un taux de renouvellement protéique plus élevé, suggérant une augmentation concomitante de la synthèse et de la dégradation des protéines. Cependant, on note une protéosynthèse inférieure à la protéolyse, entraînant par conséquent une perte de la masse du muscle squelettique (Chaudhary et al., 2012) (Figure 29). De même, dans une autre étude effectuée chez le rat exposé à une hypoxie hypobare de 6,300m pendant 21 jours, la masse musculaire et la section transversale des fibres du soléaire étaient bien inférieures à celles des rats en condition normoxique (Favier et al., 2010).

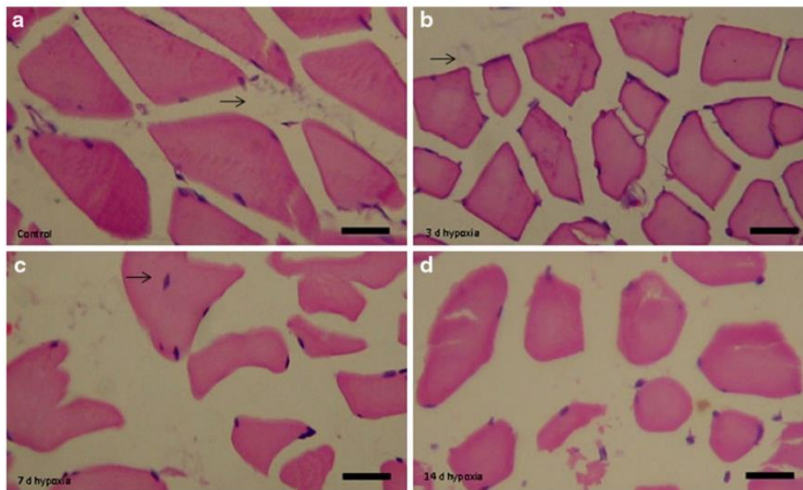


Figure 29 : Impact de l'hypoxie sur les cellules musculaires du gastrocnémien de rat colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (d'après Chaudhary et al., 2012). (A) groupe contrôle normoxie. (B) Exposition à une hypoxie de 3 jours. (C) Exposition à une hypoxie de 7 jours. (D) Exposition à une hypoxie de 14 jours. La flèche indique l'endomysium mince (barre = 10µm).

IV.2.2. Les effets de l'hypoxie sur la myogenèse

De nombreuses investigations portant sur les effets de l'hypoxie sur le mécanisme de la myogenèse ont été menées sur différents modèles cellulaires. Ainsi, des cellules de type C2C12 ou des myoblastes L6 cultivés en condition d'hypoxie (taux d'O₂ inférieur à 5%) sont caractérisées par une faible fusion des myoblastes en myotubes, associée à une réduction de l'expression de MHC traduisant un défaut de différenciation par comparaison aux cellules en condition de normoxie (Dicarlo et al., 2004 ; Majmundar et al., 2011 ; Hidalgo et al., 2014 ; Launay et al., 2010). De nombreuses études ont rapporté qu'une hypoxie caractérisée par un taux d'O₂ inférieur à 2% affectait négativement les MRFs tels que MyoD, Myf5 et myogénine (Dicarlo et al., 2004 ; Majmundar et al., 2011 ; Yun et al., 2005). Cette régulation négative de l'expression des MRFs initiée par l'hypoxie est réversible puisque MyoD et Myf5 retrouvent des valeurs basales lorsque les myoblastes initialement cultivés dans un milieu hypoxique sont exposés à un environnement de normoxie (Dicarlo et al., 2004). L'ensemble de ces données suggère que l'hypoxie est un facteur limitant de la myogenèse, bloquant le programme transcriptionnel myogénique et la différenciation terminale des myotubes.

IV.2.3. L'influence de l'hypoxie sur la protéosynthèse

Comme nous l'avons vu précédemment, l'IGF-1 est l'un des principaux facteurs de croissance activant la voie de signalisation PI3K / Akt / mTOR et donc la synthèse protéique (Latres et al., 2005 ; Rommel et al., 2001), mais il a également une influence positive sur les processus de prolifération des myoblastes et de différenciation myogénique des myotubes (Duan et al., 2010 ; Glass, 2003). Ren et ses collaborateurs rapportent que l'IGF-1 favorise la différenciation des myoblastes sous normoxie tandis qu'il stimule la prolifération cellulaire sous hypoxie (Ren et al., 2010) (Figure 30). Lors de l'hypoxie, il a été montré que l'inhibition de HIF-1α entraînait une modification de l'action mitogène, alors que la surexpression de HIF-1α en normoxie supprime la différenciation des myoblastes initiée normalement par l'IGF-1. Ces résultats suggèrent que le taux d'O₂ régule de manière différentielle l'action de l'IGF-1 (Ren et al., 2010). L'une des pistes évoquées expliquant cette défaillance d'activation de la voie Akt / mTOR par l'IGF-1 est un détournement de la liaison de l'IGF-1 avec son récepteur (IGF-1R). Ainsi, en condition d'hypoxie, l'interaction entre l'IGF-1 et son récepteur active de préférence la voie de signalisation ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 & 2) responsable de la

stimulation de la prolifération cellulaire au détriment de la voie PI3K / Akt / mTOR, inhibant ainsi la différenciation des myoblastes (Duan et al., 2010 ; Ren et al., 2010) (Figure 30). Cette défaillance entre l'IGF-1 avec son récepteur lors d'une privation d'O₂ affecte en conséquence nettement l'activation de Akt, régulateur clé du processus de protéosynthèse (Majmundar et al., 2011). Une autre étude *in vitro* sur des cellules musculaires C2C12 mises en culture dans un environnement limité en O₂ (1% d'O₂) montre que le stress cellulaire causé par l'hypoxie peut perturber la phosphorylation et l'expression de la protéine Akt et interférer négativement dans la machinerie de traduction de l'ARNm en protéine (Caron et al., 2009 ; Ren et al., 2010).

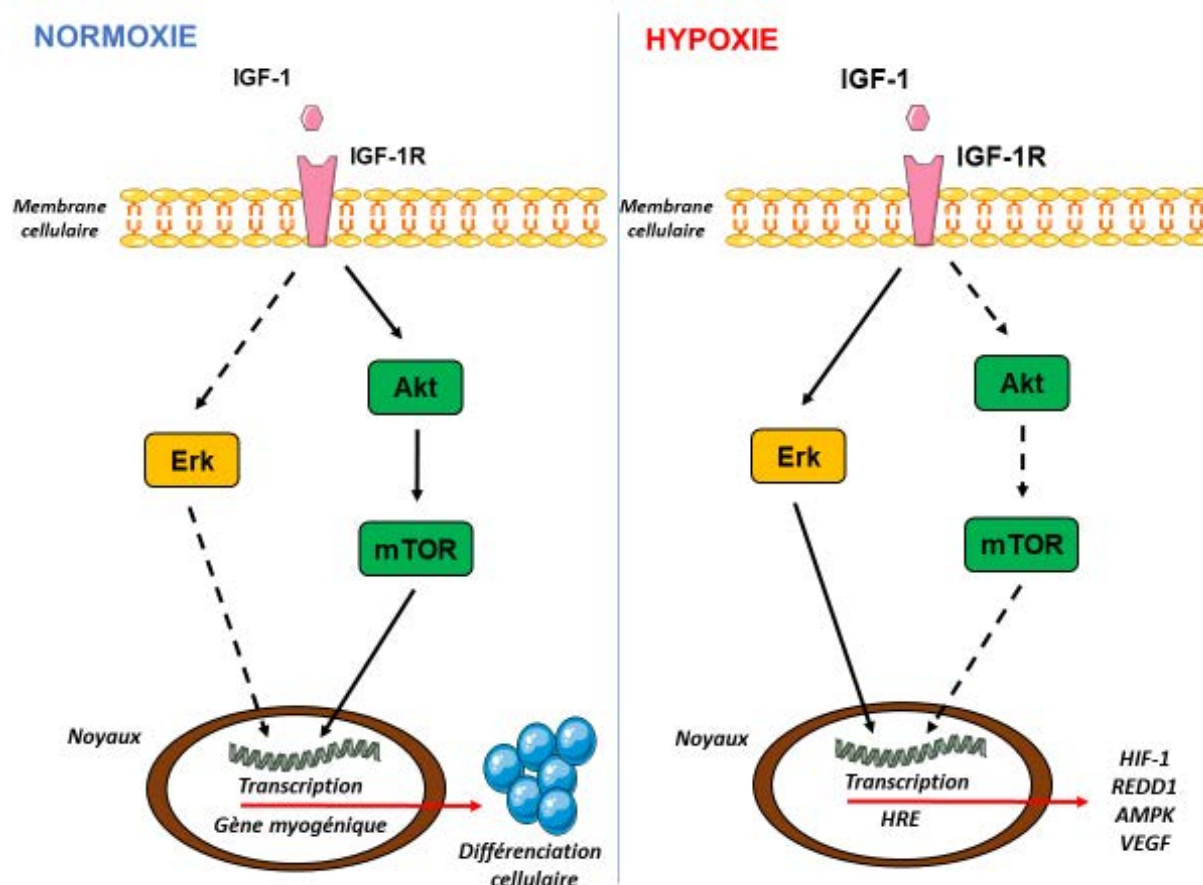


Figure 30 : Schéma illustrant la modulation de l'action de l'IGF1 dans des cellules musculaires lors de la normoxie ou de l'hypoxie.

L'activation des cibles en aval de la protéine Akt est également perturbée en hypoxie. Ainsi, la protéine GSK-3 β , normalement inhibée en normoxie, est hypo-phosphorylée en concordance avec la sous-activation de Akt dans des myotubes C2C12 exposés à 0,5% et 1% O₂ (Caron et al., 2009 ; Majmundar et al., 2011), occasionnant ainsi une inhibition du facteur d'initiation eIF2. De nombreuses études portant sur l'hypoxie *in vitro* et *in vivo* montrent également une diminution de l'activation de mTOR, autre effecteur de Akt (Arsham et al., 2003 ; Caron et al., 2009 ; Duan et al., 2010 ; Favier et al., 2010 ; Majmundar et al., 2011). Lors de la privation d'O₂, mTOR est inhibée de façon indirecte par le facteur de transcription HIF-1 α , la diminution de son activation étant notamment causée par l'AMPK et REDD1 (Brugarolas et al., 2004 ; DeYoung et al., 2008 ; Schneider et al., 2008) (Figure 25). Les données précédentes sur la réduction de l'activation de l'IGF-1, régulateur en amont de la voie Akt / mTOR, prend une part majeure dans l'inhibition de mTOR en hypoxie (Caron et al., 2009 ; Ren et al.,

2010). Les protéines 4E-BP1 et P70S6K, effecteurs de mTOR, sont également réprimées, avec des conséquences directes et néfastes sur les mécanismes de traduction des ARNm (Arsham et al., 2003 ; Liu et al., 2006, Wheaton et al., 2010). Concernant les facteurs d'initiation (eIF) et d'élongation (eEF) de la traduction, des études révèlent que eEF2, cible de l'AMPK, est phosphorylé et inhibé en hypoxie, provoquant l'arrêt de la phase d'élongation du processus traductionnel (Liu et al., 2006 ; Wheaton et al., 2010).

L'influence de l'hypoxie sur les cellules musculaires provoque des altérations de la croissance et du développement cellulaire par la défaillance de plusieurs processus responsables de la maturation des cellules musculaires. L'inhibition des facteurs de la myogenèse (MyoD, Myf5 et myogénine) conduit à un maintien des cellules satellites dans un état de quiescence, entraînant également une réduction de la différenciation des cellules musculaires. La voie de protéosynthèse PI3K / Akt / mTOR se trouve inhibée lors d'une diminution du taux d'O₂ intracellulaire. La défaillance interactionnelle entre l'IGF-1 et son récepteur provoque une sous-activation de la protéine Akt, engendrant un dysfonctionnement du processus de synthèse des protéines. L'absence de phosphorylation des protéines mTOR et GSK-3β a pour conséquence un affaiblissement de la machinerie traductionnelle permettant la formation de protéine à partir de la traduction de l'ARNm. Ainsi, la voie PI3K / Akt / mTOR étant inhibée en hypoxie, la réactivation de cette voie de signalisation se poserait-elle comme une condition sine qua non à un possible retour de l'homéostasie protéique dans le muscle squelettique en hypoxie ?

IV.2.4. La régulation des systèmes protéolytiques en hypoxie

Précédemment, nous avons exposé qu'une diminution du taux d'O₂ intracellulaire perturbait sérieusement les mécanismes moléculaires contrôlant la protéosynthèse. Il est également indispensable de s'intéresser à l'activation des voies de dégradation des protéines afin de saisir l'impact de l'hypoxie sur le dysfonctionnement de l'homéostasie protéique responsable de l'altération de la masse musculaire.

Les facteurs de transcription FoxOs sont des régulateurs importants dans l'adaptation et la survie de la cellule lorsque celle-ci est soumise à un stress. La réponse de la cellule musculaire à la privation d'O₂ au niveau protéolytique est une surexpression des facteurs de transcription FoxO1 et FoxO3a (Award et al., 2013 ; D'Hulst et al., 2013) (**Figure 31**). Une étude réalisée sur des jeunes adultes soumis à une hypoxie d'altitude modérée (1500m) révèle une hyper-phosphorylation de FoxO1 et FoxO3a (D'Hulst et al., 2013). Bakker et ses collaborateurs ont montré *in vitro* sur des fibroblastes de souris en hypoxie (1% O₂) que l'augmentation de l'expression de FoxO3a était dépendante de la stabilisation de HIF-1, suggérant que FoxO3a serait une cible en aval de HIF-1 et jouerait un rôle important dans l'adaptation de la cellule en réponse au stress hypoxique (Bakker et al., 2007 ; Jensen et al., 2011). FoxO3a est également un modulateur important d'un ensemble de gènes mitochondriaux. Une étude montre l'implication de FoxO3a dans le processus de mitophagie, indispensable et nécessaire à la diminution de la consommation d'O₂ et de la production de ROS de la mitochondrie en condition d'hypoxie, renforçant donc l'importance de FoxO3a dans l'adaptation métabolique et la résistance au stress hypoxique (Jensen et al., 2011).

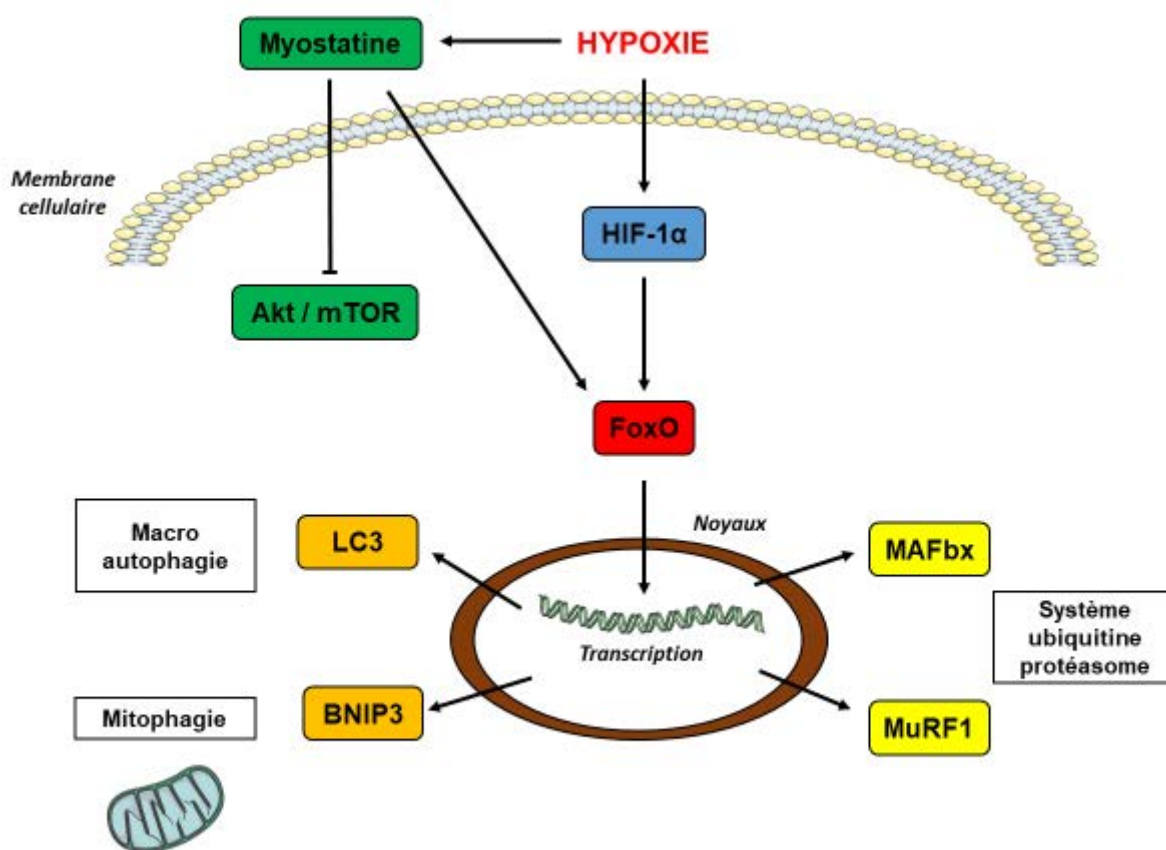


Figure 31 : Impact de l'hypoxie sur la régulation des voies de signalisation responsables de la dégradation des protéines et des mitochondries.

La diminution du nombre de mitochondries en condition de stress hypoxique est réalisée par un mécanisme d'autophagie spécifique à la mitochondrie (mitophagie) ; ce mécanisme implique la protéine pro-apoptotique BNIP3, localisée au niveau de la membrane mitochondriale (Mazure et al., 2010) (Figure 31). Chez les rongeurs, l'hypoxie induit une augmentation de la transcription du gène codant pour BNIP3 au sein des tissus musculaires, avec un accroissement de la mitophagie corrélée à la surexpression de BNIP3 (Band et al., 2009). *In vitro*, des études révèlent à travers plusieurs lignées cellulaires que la stabilisation de HIF-1α induit la surexpression de BNIP3 (Bellot et al., 2009 ; Guo et al., 2001 ; Mazure et al., 2010), données laissant à supposer que l'activation de BNIP3 dépendante de la stabilisation de HIF-1 est un mécanisme crucial dans le contrôle de la surproduction de ROS et l'adaptation cellulaire lors d'un stress hypoxique. Une autre étude sur des souris C57BL sous hypoxie (10% O₂) montre une élévation du niveau d'ARNm codant pour BNIP3 associé à une réduction de la biogenèse mitochondriale dans le gastrocnémien (Gamboa et Andrade, 2009). Ceci démontre que la réduction du nombre de mitochondries est une réponse cruciale à la survie cellulaire en condition d'hypoxie.

Des myotubes L6 exposés à une hypoxie de 1% O₂ présentent une surexpression du niveau d'ARNm de MAFbx (Caron et al., 2009) (Figure 31). *In vivo*, des rats soumis à une hypoxie sévère présentent une perte de masse musculaire associée à une suractivation du système UPS et des calpaïnes (Chaudhary et al., 2012). Une étude de Theije et ses collaborateurs comparant des souris

soumises à une restriction calorique et des souris sous hypoxie (8% O₂) a permis de mettre en évidence une expression accrue des ARNm de MAFbx et de MuRF1 en réponse à l'hypoxie, et ce de manière plus importante que les souris ayant subi une réduction alimentaire en condition de normoxie, mettant en avant une régulation positive du système UPS spécifique à l'hypoxie (de Theije et al., 2013).

Lors d'un appauvrissement en O₂, on observe au niveau intracellulaire une élévation de l'expression de la myostatine causant une atrophie musculaire (**Figure 31**), effet constaté *in vivo* chez le rat ou chez des patients hypoxémiques atteints de BPCO sévère (Hayot et al., 2011 ; Rodriguez et al., 2014). L'inhibition de la myostatine par suppression de son ARNm ou inhibition de ces récepteurs réduit considérablement l'atrophie musculaire induite par l'hypoxie, démontrant ainsi le rôle de la myostatine dans les processus protéolytiques du muscle squelettique liés aux adaptations à un stress hypoxique (Hayot et al., 2011).

IV.3. La modulation de l'état nutritionnel en hypoxie

On peut observer chez un très grand nombre de patients atteints de BPCO un dérèglement de la prise alimentaire. La perte d'appétit est un symptôme répandu chez les personnes souffrant de BPCO, les cas les plus sérieux d'anorexie étant associés aux patients présentant une forme cachectique de la maladie (Nordén et al., 2015 ; Koehler et al., 2007). Cette réduction volontaire de la prise alimentaire se retrouve renforcée lors des phases d'exacerbation aiguë des symptômes nécessitant généralement une hospitalisation (Koehler et al., 2007). Lors des premiers jours d'hospitalisation, on constate une perturbation de l'équilibre du bilan énergétique des patients avec une importante diminution de leur prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique au repos (Gea et al., 2018 ; Girón et al., 2009 ; Hallin et al., 2006). On retrouve également ce phénomène d'anorexie lors de situation d'hypoxie prolongée, comme lors d'expédition en haute altitude. Un grand nombre de sujets montrent un déficit énergétique croissant en fonction des paliers d'altitudes gravis, ceci principalement causé par une réduction de leur alimentation (Hammad & Travis ; 2006 ; Karl et al., 2018). Cette réelle perte d'appétit en haute altitude a conduit les chercheurs à émettre l'hypothèse selon laquelle la diminution du niveau d'O₂ jouerait un rôle crucial dans la modulation de la prise alimentaire (Raguso & Luthy, 2011).

Des études menées chez des rongeurs exposés à un environnement hypoxique montrent une altération de la prise alimentaire journalière en comparaison au groupe en normoxie (Iezon et al., 2016 ; Singh et al., 2001). Ces résultats se retrouvent également chez des patients atteints de BPCO sévères (Raguso & Luthy, 2011). Les conséquences d'une période prolongée de sous-nutrition sont une réduction de la masse musculaire, le défaut nutritionnel entraînant une atrophie musculaire associée à une perte de force et la capacité d'endurance du muscle squelettique (Vermeeren et al., 2006). Afin de mettre à jour les liens potentiels entre l'hypoxie, la perte d'appétit et l'atrophie musculaire, des protocoles de recherches ont utilisé des groupes de rongeurs exposés à un environnement normoxique avec une prise alimentaire similaire aux rongeurs hypoxiques. Les résultats ont révélé une perte de masse musculaire plus importante chez les rats sous hypoxie par rapport aux rats soumis à la restriction alimentaire (Bernier et al., 2012 ; de Theije et al., 2013 ; Hayot, et al., 2011). Les différents auteurs suggèrent que l'anorexie issue de l'hypoxie engendre une atrophie musculaire supérieure à la restriction alimentaire seule.

L'une des pistes explorées par les chercheurs pouvant expliquer la restriction calorique engendrée par l'hypoxie résiderait dans la modulation d'une hormone, la leptine. Cette dernière est une hormone dérivée des adipocytes, régulant négativement les mécanismes impliqués dans la prise alimentaire. Il a été observé que les patients atteints de BPCO présentaient un taux de leptine beaucoup plus élevé en comparaison aux sujets sains (Çalikoglu et al., 2004 ; Krommidas et al., 2010), de même que le rat exposé à un environnement hypoxique (Simler et al., 2006). Une autre étude montre une corrélation entre l'expression des gènes codant pour la leptine et le facteur de transcription de l'hypoxie, HIF-1 (Grosfeld et al., 2002). L'ensemble de ces données placent la réduction de l'O₂ comme « le facteur central » de l'atrophie musculaire.

En conclusion, lorsque l'organisme est soumis à un stress hypoxique chronique, ce dernier engendre un trouble de l'homéostasie de la cellule musculaire avec des conséquences sur le métabolisme, le phénotype et la croissance musculaires. Le défi de la cellule lors d'un tel stress est de mettre en place des mécanismes adaptatifs ayant pour but d'augmenter l'approvisionnement de l'O₂ des tissus en hypoxie et de réduire l'activité de l'ensemble des processus demandant une importante consommation d'énergie pour leur fonctionnement. Les actions de HIF-1, un facteur majeur dans la réponse adaptative à l'hypoxie répond exactement aux exigences de la cellule lors d'un tel stress. En hypoxie, la stabilisation de HIF-1 et de sa cible REDD1 en aval a pour conséquence une inhibition de l'une des voies de protéosynthèse (Akt / mTOR), la protéosynthèse étant parmi les processus métaboliques les plus coûteux en énergie (ATP) pour la cellule. Tout comme la myostatine en hypoxie, l'influence de HIF-1 ne se limite pas à une inhibition des voies de signalisation modulant l'anabolisme, puisque HIF-1 active les facteurs de transcriptions FoxO impliqués dans plusieurs processus protéolytiques (autophagie et système UPS). Cette double régulation de HIF-1 et de la myostatine provoque un déséquilibre de la balance entre synthèse et dégradation des protéines, et ce en faveur des voies cataboliques. L'O₂ reste un élément indispensable au bon fonctionnement de nombreux processus et mécanismes biochimiques de la cellule ; sa perte au niveau mitochondrial conduit à une perturbation du fonctionnement de la chaîne de transport des électrons, avec une perte de production d'ATP et une recrudescence de la formation de ROS mitochondriales. L'élévation du ratio AMP/ATP engendre l'activation de la protéine AMPK et accentue son rôle d'inhibiteur des voies de signalisation régulant la protéosynthèse. De plus, l'accumulation de ROS cytoplasmiques issues du complexe III de la chaîne des transports des électrons conduit à un renforcement de l'action de HIF-1. Une importante réduction du taux d'O₂ et une exposition de longue durée entraîne un déséquilibre de l'homéostasie protéique, avec une prédominance des voies cataboliques entraînant in vivo une importante réorganisation du tissu musculaire et une fonte musculaire. Au niveau pathologique, la cachexie musculaire que l'on peut observer chez certains patients atteints d'une pathologie respiratoire, telle que la BPCO, donne lieu à des enjeux cliniques ayant pour objectif de concevoir des traitements thérapeutiques avec pour but de pallier ce symptôme d'atrophie musculaire directement en lien avec le caractère hypoxique de ce type de pathologie.

V. Les contre-mesures à l’atrophie musculaire résultante de l’hypoxie

Nous avons constaté précédemment qu’une diminution de l’apport en O₂ au niveau des tissus musculaires (hypoxémie), que ce soit dans des conditions environnementales (haute altitude) ou pathologiques (BPCO, fibrose pulmonaire ou apnée du sommeil), entraîne à la fois une réduction de la protéosynthèse et une augmentation de la protéolyse contribuant à une atrophie musculaire chez les sujets (Raguso et al., 2004). L’exercice physique représente l’un des moyens d’intervention pouvant atténuer ou même inverser les mécanismes d’atrophie musculaire ; les données exposées en condition de normoxie indiquent que l’entraînement physique est capable d’activer les protéines clés de la protéosynthèse tout en atténuant les voies de signalisation associées à la dégradation protéique (Bowen et al., 2015 ; Gould et al., 2013 ; Snijders et al., 2009).

Contrairement aux sujets sains du même âge, les patients atteints de BPCO ont une activité locomotrice réduite (Troosters et al., 2010) ; ceci est une conséquence directe du dysfonctionnement de l’appareil musculaire et des changements structuraux de la fibre musculaire (Osthoff et al., 2013). Le degré d’altération du système musculaire est proportionnel à la perte de masse musculaire. L’atrophie musculaire est considérée par plusieurs cliniciens comme un symptôme de premier plan aux conséquences néfastes sur la qualité de vie, l’autonomie et l’espérance de vie des patients BPCO (Donaldson et al., 2012 ; Janssen et al., 2011 ; Vilaró et al., 2010). Au niveau musculaire, l’activité physique reste l’intervention thérapeutique la plus efficace ayant le potentiel d’inverser ou tout au moins de stabiliser l’atrophie musculaire chez les patients atteints de BPCO (De Brandt et al., 2016).

V.1. L’activité physique et l’inversion typologique en environnement hypoxique

On peut constater que les sujets atteints de BPCO ont une typologie musculaire déséquilibrée : ils présentent une proportion plus grande de fibres de type II comparativement aux fibres de type I, et par conséquent un métabolisme glycolytique prédominant, associé à une baisse des performances physiques et une intolérance à l’effort (Gosker et al., 2002 ; Guenette et al., 2014 ; O’Donnell et al., 2007). L’exercice physique recommandé et prescrit aux patients BPCO ne montre que partiellement un changement ou une inversion de la typologie musculaire (De Brandt et al., 2016). On peut observer que le réentraînement avec une forte consonance d’endurance, comme les exercices aérobies d’intensité élevée et les exercices intermittents de haute intensité, entraînent majoritairement une hypertrophie des fibres musculaires de type I et IIA, concomitante à une diminution du nombre de fibres de type IIB (Brønstad et al., 2012 ; Kortianou et al., 2010 ; Vogiatzis et al., 2010 ; Vogiatzis et al., 2011). Le développement de ces fibres au phénotype prédominant oxydatif est le plus répandu parmi les différents protocoles d’entraînement physique utilisés chez les patients BPCO (De Brandt et al., 2016).

V.1.1. L’activité physique et la stimulation des facteurs de l’hypertrophie

L’activité des cellules satellites et des facteurs de régulation myogénique jouent un rôle important dans la myogenèse, la régénération et la croissance musculaires. Une étude de Vogiatzis et ses collaborateurs met en évidence une discordance des effets d’un entraînement par intermittence entre les patients BPCO présentant une forme sévère ou au contraire une absence de cachexie musculaire. Cette étude rapporte que l’expression de l’ARNm et des protéines MyoD et myogénine,

impliquées dans les mécanismes de prolifération et de différenciation des cellules musculaires, se trouve plus élevée dans les muscles squelettiques des patients BPCO sans forme de cachexie (Vogiatzis et al., 2010).

Avec les facteurs de régulation de la myogenèse, la voie de signalisation de synthèse des protéines PI3K / Akt / mTOR est l’une des composantes essentielles de l’hypertrophie musculaire. L’étude de Costes et ses collaborateurs montrent que l’atteinte et la sévérité de la pathologie influencent considérablement les effets de l’entraînement physique sur la voie de synthèse des protéines. En effet, les protocoles d’entraînement appliqués aux sujets atteints de BPCO associée à une forme sévère d’hypoxémie et de cachexie ne sont pas en mesure d’induire une hypertrophie musculaire *via* l’activation des protéines clés de la voie PI3K / Akt / mTOR, en comparaison aux sujets BPCO non hypoxémiques et non cachectiques. Selon les auteurs, cette forme sévère de BPCO présente une résistance à l’activation des voies de protéosynthèse au sein du muscle squelettique (Costes et al., 2015 ; Vogiatzis et al., 2010), suggérant que le degré d’hypoxémie et d’atrophie musculaire du patient BPCO influe et perturbe de façon sérieuse la régulation des différents processus initiant l’hypertrophie du muscle squelettique. Cette suggestion peut être appuyée par l’analyse de la myostatine ; les patients non-cachectiques montrent une baisse de l’ARNm et de l’expression protéique de la myostatine à la suite d’un protocole d’entraînement physique par intermittence, alors que les patients BPCO cachectiques ne présentent aucune différence d’expression (Vogiatzis et al., 2010).

V.1.2. L’inhibition des processus d’atrophie

Nous avons vu dans un précédent chapitre (paragraphe IV.2.4.) que la réduction du niveau d’O₂ tissulaire, que ce soit dans un milieu *in vivo* et *in vitro*, favorise la translocation et l’activation des facteurs de transcription FoxOs régulant à la hausse les atrogènes (MAFbx et MuRF-1) impliqués dans la dégradation des protéines de l’appareil contractile (Attaix et al., 2005 ; Award et al., 2013 ; Caron et al., 2009 ; D’Hulst et al., 2013). Bien que l’expression de FoxO soit élevée chez les patients BPCO en comparaison au sujet sain (Debigaré et al., 2008 ; Doucet et al., 2010), aucun changement d’expression de FoxO1 et FoxO3 n’a été rapporté à la suite d’un entraînement en résistance chez les BPCO en comparaison à des sujets contrôles (Constantin et al., 2013). Le taux élevé d’expression de FoxO chez les patients BPCO et l’absence de variation de son expression même après un effort en résistance induit inévitablement l’accroissement des voies de signalisation modulant le catabolisme, telle que la voie de l’autophagie (Mammucari et al., 2007) et le système ubiquitine-protéasome (UPS) (Sandri et al., 2004). Les gènes Beclin-1 et LC3 initiant le processus d’autophagie n’ont montré aucun changement d’expression après un protocole de réentraînement combinant exercice aérobie et exercice de force chez les sujets BPCO (Costes et al., 2015), de même que l’expression de MAFbx et de MuRF-1, marqueurs protéiques du système UPS (Constantin et al., 2013 ; Costes et al., 2015). Cependant, on peut noter que les patients atteints de BPCO de forme non-cachectique observent une diminution de l’expression de MAFbx et de MuRF-1 à la suite d’un réentraînement aérobie de haute intensité (interval training) (Vogiatzis et al., 2010).

Les patients atteints de BPCO de forme hypoxémique et cachectique semblent être beaucoup moins sensibles aux entraînements physiques que les BPCO non cachectiques, l’expression de MAFbx et de MuRF-1 restant constamment élevée même après un programme d’entraînement combiné ou d’intermittence. Des études futures sur les processus myogéniques et moléculaires liés à la promotion

de l’hypertrophie musculaire sont fondamentales à la conception de nouvelles approches thérapeutiques faisant intervenir l’entraînement physique, la nutrition et la pharmacologie, visant à pallier les faibles adaptations musculaires induites par les programmes de réentraînement appliqués à ce jour.

L’entraînement physique auprès de patients atteints de BPCO provoque des adaptations bénéfiques au sein du muscle squelettique, tant sur la plasticité des fibres et l’hypertrophie musculaire. L’effort physique initie des stimulations agissant directement sur les voies régulant l’homéostasie protéique par l’activation des voies de signalisation de la protéosynthèse, favorisant l’hypertrophie musculaire. Un programme d’entraînement combiné en aérobie et en résistance semble être l’alternative apportant les meilleurs changements en termes de structure musculaire, avec une amélioration des proportions et tailles des fibres musculaires. Cependant, l’ensemble de ces données doit être confirmé lors d’études comptant un nombre plus large de patients, avec notamment une homogénéisation des protocoles d’entraînement, combiné à des analyses morphologiques pour mesurer l’évolution de la masse musculaire, mais également des analyses moléculaires pour affiner notre compréhension de la régulation des voies de synthèse et de dégradation des protéines. Le type d’exercice, la durée et l’intensité de l’effort contribuent collectivement à la stimulation et au degré d’activation des voies de signalisation et processus cibles de la régulation de l’homéostasie protéique musculaire. L’ensemble de ces paramètres doivent être pris en compte lors de la conception de protocoles de recherche et de programmes de réentraînement à visée thérapeutique. L’évolution et l’adaptation des programmes de réentraînement doit donc être en totale adéquation avec les caractéristiques de la pathologie et les besoins des patients.

V.2. La supplémentation nutritionnelle dans le traitement de l’atrophie musculaire consécutive à l’hypoxie.

Différents traitements par supplémentation nutritionnelle ont été mis en place afin de contrecarrer la dénutrition omniprésente dans un milieu appauvri en O₂. Des études cliniques menées sur des patients BPCO hospitalisés présentant soit une exacerbation aiguë de leurs symptômes (Mador et al., 2001), soit suivant un programme de réadaptation pulmonaire (Dal Negro et al., 2016), ont reçu une supplémentation en protéines par voie orale en plus de leur ration alimentation quotidienne. Les patients supplémentés ont augmenté leur masse corporelle, avec une élévation de la masse maigre en comparaison au groupe avec un régime standard. Une étude réalisée en haute altitude (3255m) auprès de jeunes alpinistes met en évidence l’influence d’une supplémentation de BCAAs (leucine et isoleucine) comme moyen efficace dans la perte de masse corporelle et musculaire liée à l’hypoxie d’altitude (Schena et al., 1992). Au bout de quelques jours, il a été observé une réduction significative à la fois de la prise alimentaire et de l’IMC pour l’ensemble des sujets du protocole. Cependant, le groupe ayant reçu une supplémentation quotidienne en BCAAs présentait une masse maigre plus importante par rapport au groupe placebo. De plus, les sections transversales des fibres musculaires du bras et de la cuisse avaient tendance à augmenter pour les sujets supplémentés, tandis qu’il y avait une réduction plus importante pour le groupe contrôle (Schena et al., 1992). Ces données montrent que la supplémentation en protéines ou BCAAs par voie orale en plus d’une alimentation normale peut prévenir la perte de masse musculaire au cours d’hypoxie chronique ou de l’exacerbation des symptômes liés à la BPCO (Gayan-Ramirez, 2018).

Nous avons évoqué précédemment (paragraphe II.3.2.2.) que chez le sujet sain, l’ingestion d’acides aminés et particulièrement les BCAAs, influe à la fois sur l’anabolisme musculaire par stimulation de la protéosynthèse via notamment l’activation de la protéine mTOR, et sur le catabolisme musculaire de par un effet négatif sur la protéolyse par l’inhibition du système ubiquitine-protéasome. Cette double action confère aux acides aminés un rôle clé dans la régulation de l’homéostasie protéique au sein de la cellule musculaire. Cependant les données montrent que le stress hypoxique altère les réponses bénéfiques de cet apport anabolique. Cependant, la supplémentation en BCAAs ou en protéines reste une stratégie anti-atrophique efficace permettant de limiter la perte de masse musculaire en stimulant la protéosynthèse et surtout en réprimant les facteurs de la protéolyse. De ce fait, la supplémentation en acides aminés peut être une potentialité thérapeutique sérieuse et efficace au déséquilibre de l’homéostasie protéique musculaire, permettant d’agir à la fois sur la protéosynthèse et la protéolyse musculaires.

V.3. Hypoxie et oxygénation

V.3.1. Le traitement de l’hypoxie par oxygénothérapie

L’introduction depuis les années 1980s de la supplémentation en O₂ comme agent thérapeutique auprès de patients souffrant de diverses pathologies pulmonaires (bronchite chronique, fibrose, emphysème...) a permis d’apporter une connaissance et une compréhension sur les effets néfastes de l’hypoxémie et de supporter l’impact bénéfique de l’oxygénothérapie auprès de ces patients. L’oxygénothérapie, dont le but premier serait de contrecarrer la réduction de l’apport d’O₂ au muscle lors de l’exercice chez les patients atteints de BPCO, a fait l’objet de nombreuses études (Emtner et al., 2003 ; Haidl et al., 2004 ; Kim et al., 2008 ; Stoller et al., 2010 ; Wadell et al., 2001).

Différents travaux ont montré que les patients hypoxémiques légers et modérés atteints de BPCO ayant reçu une administration aiguë d’oxygène lors d’exercices physiques présentaient une amélioration de leur capacité et performance musculaires. À la suite de ce traitement ponctuel, les sujets BPCO sévères montrent une augmentation de leur endurance et de la charge de travail, que ce soit au test de 6 minutes de marche avec une progression de la distance parcourue (Jolly et al., 2001) ou lors d’exercice sur ergocycle avec un accroissement du temps d’effort (Dean et al., 1992 ; Stoller et al., 2010). Toujours lors de l’exercice, l’ensemble de ces améliorations physiques sont accompagnées d’effets positifs sur le métabolisme aérobie (Emtner et al., 2003 ; Wadell et al., 2001). En effet, ces mêmes études constatent une diminution de la pression systolique ventriculaire, une réduction de la fréquence respiratoire et de la dyspnée, avec une meilleure teneur (saturation en oxygène) et utilisation de l’oxygène lors de l’activité physique (Emtner et al., 2003 ; Kim et al., 2008b ; Wadell et al., 2001). Bien que la grande majorité de ces résultats ait été retrouvée chez des patients développant une hypoxémie légère ou modérée, les mécanismes responsables de ces améliorations restent encore très mal connus jusqu’à ce jour (Kim et al., 2008b). De plus, des études sur les bénéfices musculaires de l’oxygénothérapie sur le long terme restent mineures et très controversées, les variations méthodologiques et la variabilité d’inclusion des patients ne permettant pas de tirer de conclusion quant à ce type de traitement (Lacasse et al., 2018).

Même si plusieurs études montrent les bienfaits de l’oxygénothérapie à travers l’amélioration des performances de patients souffrant d’hypoxémie chronique, l’utilisation de ce type de traitement

n’est pas sans risque. En effet, l’administration aiguë ou chronique de doses supra-physiologiques en oxygène entraînerait une surproduction et une rétention du dioxyde de carbone, ce phénomène d’hypercapnie ayant pour conséquence la mise en place d’une hyperventilation de repos et d’effort (Kim et al., 2018). En plus de l’hypercapnie, l’oxygénothérapie génère également un accroissement du stress oxydatif par une surproduction d’espèces réactives de l’oxygène (ROS), entraînant une détérioration et des lésions des tissus cellulaires (Carpagnano et al., 2004 ; Kent et al., 2011 ; Phillips et al., 2003). Cependant, une oxygénothérapie contrôlée diminue significativement les risques de déséquilibre respiratoire lié à l’hypercapnie, tout en atténuant les symptômes d’hyperfatigabilité et d’hypoactivité induits par l’hypoxémie (Kim et al., 2018).

V.3.2. La restauration de la voie de synthèse des protéines en hypoxie

Tout d’abord, il faut noter qu’il n’existe à ce jour aucune étude, ni protocole de recherche ayant entrepris d’étudier les possibilités de réverser l’inhibition de la protéosynthèse initiée par l’hypoxie par un traitement dit de réoxygénation, consistant à restaurer durant un temps donné la valeur basale de normoxie (21% O₂). L’ensemble des résultats qui seront présentés ci-après résultent principalement d’études *in vitro* effectuées sur des lignées de cellules non musculaires. Ces données nous serviront de base de réflexion dans la formulation d’hypothèses essayant de répondre à notre problématique générale : la perturbation de l’homéostasie protéique à la suite d’un stress en hypoxie.

Afin de tester les modulations de l’activité de la protéine mTOR lors d’une période d’hypoxie suivie d’une période de réoxygénation, Tan et Hagen ont cultivé des cellules embryonnaires rénales humaines (cellule HEK293) dans une chambre à hypoxie (1%O₂), ensuite replacées dans un incubateur conventionnel à un niveau d’oxygène de 21% O₂. Les résultats indiquent une réactivation rapide de mTOR lors de la réoxygénation, suggérant que cette réactivation instantanée de mTOR soit indépendante du facteur de transcription HIF-1 ou de sa cible transcriptionnelle REDD1 ; ces données suggèrent, de par la rapidité de réponse, que la réactivation de mTOR soit indépendante de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle indispensables à la synthèse d’une nouvelle protéine (Tan & Hagen, 2013). Pour confirmer cette hypothèse, les auteurs ont administré aux cellules des inhibiteurs de transcription (actinomycine D) et de traduction (cycloheximide). La réactivation de mTOR fut semblable avec et sans inhibiteur, ce qui implique donc une régulation uniquement post-traductionnelle de la protéine mTOR (Tan et Hagen, 2013). De plus, en aval de mTOR, l’hypoxie accentue l’association de 4E-BP1 avec eIF4E et supprime la phosphorylation de rpS6 (cible de P70S6K) inhibant ainsi les mécanismes traductionnels (Arsham et al., 2003). Cependant, l’hypo-phosphorylation de 4E-BP1 et P70S6K induite par une hypoxie de 1.5% O₂ a été réversée après 1 heure de réoxygénation à 21% O₂ (Arsham et al., 2003). Seule une étude de Di Carlo et ses collaborateurs sur des cellules musculaires C2C12 montre que le processus de myogenèse initialement inhibé en hypoxie peut être réactivé à la suite d’une période d’incubation en normoxie, la phase de réoxygénation ayant entraîné une augmentation de la formation de myotubes, témoignant donc de l’induction des processus de différenciation myogénique (Di Carlo et al., 2004). Nous pouvons noter toutefois qu’aucune de ces études n’ont entrepris de mesurer les voies de dégradation cellulaires après une période d’oxygénation, et les effets d’une supplémentation en oxygène sur les systèmes protéolytiques de la cellule musculaire restent encore à ce jour inconnus.

L’ensemble de ces données indiquent que la différenciation des cellules musculaires n’est pas réprimée irréversiblement par l’hypoxie, mais que les cellules conservent leurs caractéristiques et capacités de prolifération et de différenciation dès lors que les taux normaux d’O₂ sont rétablis. De plus, les variations des concentrations en O₂ régulent de manière dynamique l’activité de mTOR, induisant une activation rapide de mTOR et de ses cibles en aval (4E-BP1 et P70S6K) à la suite de période de réoxygénation. L’oxygénothérapie auprès de personne souffrant d’hypoxémie chronique semble montrer de réels bénéfices en terme de tolérance à l’effort. Ainsi, l’utilisation de l’oxygénothérapie dans la réactivation des voies anabolisantes, telles que la voie PI3K / Akt / mTOR, en vue d’une limitation de l’atrophie de cellules musculaires sous hypoxie, serait une nouveauté à ce jour.

Objectifs scientifiques

L'ensemble des données bibliographiques que nous avons évoquées précédemment mettent en évidence que l'exposition à une diminution du taux d'oxygène cause d'importantes altérations de la croissance et du développement de la masse musculaire. Ces faits ont été observés aussi bien chez l'homme sain lors d'ascensions ou de longs séjours en altitude, mais également lors de conditions pathologiques, telles que les maladies respiratoires (BPCO, fibrose, apnée de sommeil) ou ischémies cardiaques occasionnant une diminution de l'approvisionnement en O₂ de l'ensemble des tissus composant l'organisme. Les effets au niveau musculaire d'un tel stress hypoxique, outre la réduction de la masse musculaire, sont également d'ordre morphologique et métabolique, se caractérisant par une prédominance du phénotype musculaire rapide, conséquence d'une inversion typologique, et du passage d'un phénotype musculaire lent (oxydatif) à rapide (glycolytique). De plus, les capacités oxydatives et l'activité mitochondriale se trouvent perturbées en hypoxie, avec pour conséquence une diminution des performances et une intolérance à l'effort lors d'activités de longue durée.

Des études récentes, principalement menées *in vitro*, ont tenté de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de l'atrophie musculaire lors d'hypoxie chronique. La communauté scientifique travaillant sur cette problématique met en avant l'hypothèse qu'une dérégulation de l'équilibre entre les processus de protéosynthèse et de protéolyse serait principalement mise en cause dans l'atrophie musculaire. L'hypoxie cellulaire entraînerait une inhibition de la voie PI3K / Akt / mTOR, l'une des voies principales de la synthèse des protéines, et dans le même temps, une stimulation des facteurs de transcription FoxOs régulant les systèmes de dégradation cellulaire (systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome). La sous-activation de la protéosynthèse et la suractivation de la protéolyse sont les conséquences d'un processus adaptatif de la cellule en hypoxie, régies par des facteurs clés tel que HIF-1, REDD1 et AMPK, ayant pour but de limiter l'activité anabolique de la cellule.

Sur le plan clinique, il n'existe actuellement pas ou très peu de traitements efficaces dans la prise en charge de l'atrophie musculaire pour les patients souffrant de pathologies respiratoires avec des complications musculaires sévères occasionnant une cachexie. Nous avons évoqué lors de cette revue de littérature des interventions ponctuelles mises en place pour tenter de freiner le phénomène de déconditionnement et d'atrophie de ce type de patients. L'activité physique, notamment les exercices dits de force ou de résistance, ont fait leurs preuves comme inducteurs d'hypertrophie musculaire chez les sujets sains mais également des patients souffrant de BPCO non cachectiques. De même, la supplémentation nutritionnelle riche en acides aminés branchés (leucine, isoleucine et valine) permet de réduire les systèmes régulant la protéolyse et la fonte musculaire lors d'épisodes d'exacerbation et d'alitement prolongé. La supplémentation en oxygène est un traitement couramment utilisé chez les patients atteints de pathologies respiratoires et fortement déconditionnés ; l'oxygénothérapie à long terme était un moyen palliatif à la baisse de performance et d'intolérance à l'effort. De plus, des études *in vitro* ont pu observer à la suite d'une réoxygénation cellulaire, une réactivation des voies et systèmes anaboliques des cellules initialement cultivées dans un milieu appauvri en O₂.

Même si nous avons à ce jour cerné de sérieuses pistes dans la compréhension des processus métaboliques de la cellule musculaire sous hypoxie, l'ensemble des mécanismes moléculaires restent encore à être identifiés. De nouvelles investigations doivent donc être menées avec pour objectif la

compréhension et la mise en place de nouvelles prises en charge thérapeutique afin de restaurer l'homéostasie protéique en condition d'hypoxie.

A la suite de l'énoncé de l'ensemble des différents points bibliographique illustrant cette problématique, nous émettons l'hypothèse qu'il est possible de concentrer, combiner et donc potentiellement additionner les propriétés et les effets anabolisants de plusieurs traitements sur des cellules musculaires atrophiées à la suite d'un stress hypoxique. Á l'heure actuelle, aucune étude scientifique n'a entrepris d'associer des contre-mesures efficaces, comme la stimulation mécanique (contraction musculaire), la supplémentation en acides aminés et l'oxygénation afin de contrecarrer les effets délétères de l'hypoxie sur les voies de régulation impliquées dans l'homéostasie des cellules musculaires squelettiques.

L'objectif principal de mon travail de thèse est d'analyser l'évolution moléculaire et morphologique de la croissance des cellules musculaires soumises à une stimulation électrique, à une supplémentation en acides aminés et/ou une période d'oxygénation suite à une exposition à l'hypoxie. Ainsi mes travaux de thèse se sont articulés autour de 3 études, à savoir : (i) comparer les effets de différentes méthodes d'induction de l'hypoxie cellulaire ; (ii) comparer différentes contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie ; et enfin (iii) optimiser l'action thérapeutique par la combinaison de plusieurs contre-mesures à l'atrophie musculaire.

Etude I. Impact de différentes méthodes d'induction de l'hypoxie cellulaire : place des agents mimétiques de l'hypoxie comme modèle d'induction de l'hypoxie cellulaire à travers l'analyse de l'homéostasie protéique et la morphologie des cellules musculaires squelettiques C2C12 différenciées en myotubes.

Il existe dans la littérature une multitude de protocoles *in vitro* faisant appel à différents types et systèmes d'induction de l'hypoxie. Lors de notre revue de littérature portant sur les effets adaptatifs de la cellule en hypoxie, nous nous sommes aperçus qu'il existait d'importantes discordances entre la multitude de protocoles présents et les données moléculaires résultantes. Outre le type de cellule utilisée et le taux de réduction d'O₂ employé, il demeure deux modes d'induction de l'hypoxie cellulaire couramment utilisés.

La première modalité est l'hypoxie dite « physiologique » : les cellules sont placées dans un environnement appauvri en O₂ par l'intermédiaire d'un dispositif accolé à une chambre ou incubateur permettant de remplacer l'O₂ présent dans l'air ambiant par un gaz de substitution (azote). La seconde méthode est l'hypoxie dite « chimique », faisant appel à des substances telles que le chlorure de cobalt (CoCl₂) ou la desferrioxamine (DFO), ayant la propriété d'induire la stabilisation du facteur clé de l'hypoxie HIF-1 malgré le maintien des cellules dans un milieu de normoxie (21% O₂).

Même si l'hypoxie physiologique semble être la méthode d'induction de l'hypoxie la plus proche de ce que l'on peut retrouver in vivo, l'emploi d'un agent chimique mimant les effets d'une hypoxie réelle pose d'importantes questions concernant l'interprétation des répercussions cellulaires ou tissulaires de cette induction chimique, et de plus, il peut exister de possibles interactions avec l'application d'autres traitements sur ces cellules.

Ainsi l'objectif de cette première étude était de :

Mettre en évidence les divergences et/ou les points communs entre différents modes d'induction de l'hypoxie (physiologique versus chimique) sur les voies de signalisation régulant l'homéostasie protéique et la morphologie de cellules musculaires soumises à ces deux types d'induction.

Etude II : La stimulation mécanique, la supplémentation en acides aminés ou l'oxygénation dans la limitation de l'atrophie de cellules musculaires sous hypoxie.

Nous avons évoqué précédemment les nombreuses répercussions d'un stress hypoxique sur la croissance des cellules musculaires, causées notamment par une perturbation des voies de signalisation régissant l'homéostasie protéique. Plus l'exposition est prolongée et la baisse du taux d'O₂ importante, plus les répercussions cataboliques sont considérables, entraînant *in vivo* une atrophie musculaire sévère allant jusqu'à la cachexie.

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont tenté de contrecarrer ou tout au moins limiter cette fonte musculaire prononcée sous hypoxie. Les exercices physiques, notamment ceux de nature en charge et de résistance pratiqués lors de programmes de réhabilitation de personnes souffrant d'hypoxie chronique, entraînent à moyen et long termes une augmentation du nombre et du volume des fibres musculaires, synonyme d'hypertrophie musculaire. Nombreuses personnes atteintes par des pathologies respiratoires, avec pour l'un des symptômes principaux un déconditionnement et une atrophie musculaire prononcée, se voient prescrire en plus d'une alimentation riche en glucides et protéines, une supplémentation en acides aminés, ayant pour effet une réduction du catabolisme musculaire et un maintien, voire dans certains cas une augmentation, de leur masse musculaire. Même si ces traitements montrent des améliorations de la masse, leurs effets restent minimes en comparaison aux personnes non pathologiques, et spécifiques à certains patients touchés par une hypoxie modérée. De plus, l'exercice physique et la supplémentation nutritionnelle ne s'attaquent pas au problème central de l'hypoxie, à savoir le déficit de la molécule d'oxygène au sein de la cellule musculaire.

Bien que l'oxygénothérapie soit un traitement thérapeutique couramment utilisé dans la prise en charge de l'hypoxie chronique, chez l'homme, il n'existe aucune donnée sur les effets de la supplémentation en oxygène sur la régulation de la masse musculaire. De plus, le nombre de recherches *in vitro* portant sur les conséquences de l'oxygénation cellulaire à travers la myogenèse et la croissance des cellules musculaires consécutive à une hypoxie reste très limité.

Nous émettons l'hypothèse que l'oxygénation cellulaire serait une contre-mesure efficace à l'atrophie musculaire, suite à un épisode hypoxique. S'attaquer à l'élément central du stress hypoxique, en palliant la pénurie de l'oxygène par une période d'oxygénation, pourrait donc permettre d'annihiler transitoirement les effets négatifs de l'hypoxie sur la cellule musculaire. Nous supposons que le retour épisodique à un état de normoxie engendrera de manière momentanée une stabilité métabolique et un rééquilibrage de l'homéostasie protéique, permettant une réactivation bénéfique des voies de protéosynthèse et un affaiblissement des voies protéolytiques.

Ainsi l'objectif de cette seconde étude était de :

Analyser et comparer les effets de protocoles d'oxygénation, de stimulation électrique et de supplémentation en acides aminés branchés sur des myotubes C2C12 mis en culture sous hypoxie, à travers une analyse moléculaire des protéines régulatrices des voies de synthèse et de dégradation des protéines, ainsi que l'aspect morphologique des myotubes à la suite des différents traitements.

Etude III : Effets additionnels de la stimulation mécanique, de la supplémentation en acides aminés et d'une période d'oxygénation vis-à-vis de l'atrophie des myotubes induite par l'hypoxie.

La littérature nous confirme que la grande majorité des protocoles de recherche *in vivo* et *in vitro* dans la lutte contre les effets délétères de l'hypoxie dans la cellule musculaire s'articule autour d'un unique traitement, permettant au mieux d'obtenir des effets positifs sur un nombre limité de paramètres perturbés en hypoxie (physiologique, métabolique, morphologique, contractile...). Bien que ces traitements (stimulation mécanique, supplémentation nutritionnelle et oxygénothérapie) soient relativement efficaces de manière isolée, leurs effets bénéfiques sont fortement dépendants du niveau de l'hypoxie et du stade d'atrophie du sujet. Nombreux patients souffrant d'hypoxémie chronique consécutive à des maladies respiratoires associées à une perte de masse musculaire très importante, restent insensibles face à ces traitements.

Peu de recherche ont combiné l'association de plusieurs traitements thérapeutiques pour la prise en charge des patients hypoxémiques présentant une atrophie musculaire sévère. Il n'existe à ce jour aucune donnée dans la littérature faisant état de la mise en place d'un protocole alliant stimulation mécanique (contraction musculaire), supplémentation nutritionnelle et période d'oxygénation sur des cellules musculaires atrophiées à la suite d'un stress en hypoxie.

Nous supposons que la combinaison de la stimulation mécanique et la supplémentation en acides aminés branchés sera à même de réduire voire de contrer l'atrophie musculaire induite par l'hypoxie. De plus, nous pensons qu'il est primordial d'exploiter idéalement la période post-exercice connue pour être un moment de suractivation des voies de synthèse protéique. La stimulation mécanique, associée à un apport en acides aminés et une période d'oxygénation post-exercice, permettrait de favoriser (potentialiser) au mieux les réponses anaboliques tout en inhibant les effets délétères de l'hypoxie sur les voies de synthèse et de dégradation des protéines. Il serait ainsi possible d'optimiser au maximum les contre-mesures dont nous disposons actuellement dans la lutte contre l'atrophie musculaire induite par l'hypoxie.

L'objectif de cette troisième étude était de :

Tester sur des cellules musculaires C2C12 mises en culture dans un environnement hypoxique la combinaison de la stimulation électrique, de la supplémentation en acides aminés branchés et d'une période d'oxygénation post-exercice à travers les changements post-traductionnels des protéines clés des voies de synthèse et de dégradation protéiques. Cette étude portant sur l'atrophie et l'hypertrophie des cellules musculaires a été renforcée par une analyse morphologique précise des myotubes à la suite des différentes combinaisons de traitements.

Matériels et méthodes

I Culture cellulaire

I.1. Choix du modèle : cellules musculaires de type C2C12 différenciées en myotubes

Pour étudier les contre-mesures à l'atrophie du muscle squelettique liée à l'hypoxie, le choix d'un modèle *in vitro* a été privilégié plutôt qu'un modèle *in vivo*. A l'heure actuelle, aucune étude ne s'est concentrée sur la possibilité d'ajouter différents traitements dans le but de réverser l'atrophie musculaire consécutive à une période d'hypoxie. Le modèle cellulaire choisi pour notre étude permettra d'obtenir des données inédites sur lesquelles d'autres protocoles pourront élaborer de nouvelles stratégies et investigations thérapeutiques par la suite.

Le choix du modèle cellulaire présente l'avantage de tester de manière relativement « aisée » une multitude de conditions expérimentales. De plus, la culture cellulaire supprime l'influence potentielle d'éléments systémiques pouvant perturber l'analyse de l'homéostasie protéique sur les myotubes C2C12, comme par exemple l'influence de facteurs de croissance ou d'hormones tels que l'IGF-1, les interleukines, l'hormone de croissance ou encore l'insuline présents au sein de l'organisme. Ainsi, la culture cellulaire permet de mettre en évidence l'interaction spécifique entre la condition expérimentale (variable dépendante) avec la cellule musculaire. Enfin, elle nous permet également un important taux de reproductibilité inter-cultures (cellules provenant toutes d'une souche unique), et obtenir une grande population de myotubes à disposition.

L'ensemble des travaux de cette thèse a été mené sur des myotubes différenciés de type C2C12, dont l'obtention par culture cellulaire a été décrite à la figure 32. Les cellules C2C12, fournies par ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA), sont une lignée myoblastique immortalisée par l'équipe de Yaffe et Saxel en 1977, obtenue à partir d'un tissu musculaire squelettique extrait des membres postérieurs d'une souris C3H (Yaffe & Saxel 1977). À confluence, les myoblastes mononucléés, correspondant aux cellules prolifératives, ont été cultivés dans un milieu de différenciation afin que les cellules fusionnent pour former les myotubes plurinucléés, cellules au phénotype contractile et présentant des caractéristiques similaires aux cellules musculaires squelettiques *in vivo* (de Theije et al., 2013).

I.2. Protocole

Après décongélation, les cellules C2C12 ont étéensemencées dans des flasques dans un milieu de prolifération correspondant à du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco) et 1% d'antibiotiques/antimycotiques (Sigma), puis entreposées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Lorsque la confluence cellulaire atteint 80 à 90%, les cellules ont été rincées avec du DMEM/Hepes, puis les cellules adhérentes ont été récupérées par trypsination. Brièvement, les flasques ont été incubées pendant une dizaine de minutes en présence de trypsine et d'EDTA ; après neutralisation de la trypsine par ajout de milieu de prolifération, les cellules ont été centrifugées à 800 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé puis les cellules ont été re-suspendues dans du milieu de prolifération. La numération cellulaire a été réalisée à l'aide d'une cellule de Mallassez et de bleu trypan, permettant de différencier les cellules viables (non colorées) et non viables (colorées en bleues).

Le comptage sur cellule de Mallassez permet d'obtenir la concentration cellulaire (cellules/ml). Les cellules ont étéensemencées en boîte de Pétri à raison de 200 000 cellules /ml dans du milieu de prolifération. Lorsque les cellules sont à 90-95% de confluence, la différenciation des myoblastes en myotubes a été induite par le changement de milieu de prolifération par du milieu de fusion où le sérum de veau foetal a été remplacé par 2% de sérum de cheval inactivé par la chaleur (Gibco). Ce changement de milieu correspond au jour 0 de différenciation (**Figure 32**). Les milieux de culture ont été remplacés toutes les 48 heures, et la formation des myotubes a été évaluée chaque jour.

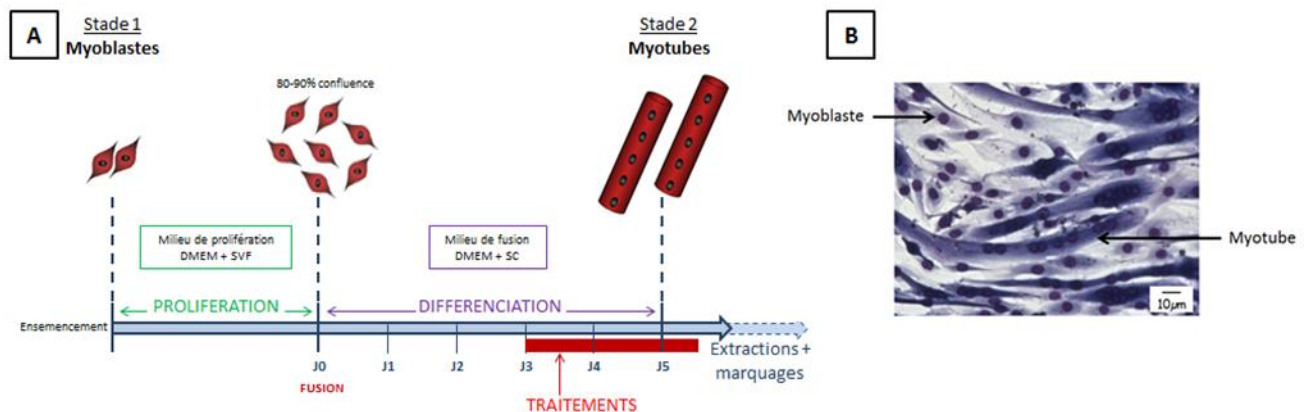


Figure 32 : (A) Représentation schématique de la culture de cellules musculaires squelettiques de type C2C12. Noter le stade 1 correspondant à la prolifération des myoblastes, suivi du stade 2 correspondant à la différenciation des cellules et la maturation des myotubes. SVF : Sérum de Veau Foetal ; SC : Sérum de cheval inactivé par la chaleur ; DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium. (B) Visualisation au microscope inversé (x20) de myoblastes et myotubes C2C12 après coloration May-Grünwald-Giemsa. Noter la morphologie particulière des myotubes, cellules plurinucléées et longiformes, contrairement aux myoblastes, cellules mononucléées et fusiformes.

II Induction de l'hypoxie cellulaire

Nos travaux de recherche ont porté sur deux types d'induction de l'hypoxie à savoir l'hypoxie physiologique et l'hypoxie chimique. Ces deux modèles sont présentés ci-dessous.

II.1. Hypoxie physiologique

Pour les expériences d'hypoxie physiologique, les cellules musculaires ont été placées dans une chambre hypoxique hermétique (BioSpherix, Lacona, NY), cette chambre étant elle-même placée dans un incubateur classique à une température de 37°C et 5% CO₂ (**Figure 33**). Une sonde à oxygène placée à l'intérieur de la chambre permet une connaissance précise du taux d'oxygène appliqué aux cellules, ce qui nous permet une variation précise du taux d'O₂ délivré au sein de la chambre afin d'être au plus proche des conditions d'hypoxie au sein de la cellule musculaire d'un modèle *in vivo* (Theije et al., 2013). Afin de recréer une condition d'hypoxie normobarique, le dispositif d'injection d'azote ProOx P110 (BioSpherix, Lacona, NY) couplé à la sonde d'oxygène permet d'obtenir des conditions de culture présentant une concentration en oxygène inférieure à 21% O₂ (**Figure 33**). Les conditions de normoxie ou de réoxygénation ont été effectuées dans un incubateur standard (21% O₂, 5% CO₂, 37°C).

In vitro, les protocoles de culture cellulaire faisant appel à une diminution de la concentration en oxygène sont nombreux. Cependant, l'extrapolation des données recueillies en culture cellulaire à l'organisme fait preuve d'un certain débat au sein de la communauté scientifique, et il reste encore à ce jour des questions ouvertes. Les conditions standard dans lesquelles les cellules sont généralement cultivées (21% O₂) doivent être considérées comme une condition d'hyperoxie, si nous comparons à ce que l'on rencontre *in vivo*. Richardson et ses collaborateurs ont mesuré la tension d'oxygène dans le muscle squelettique humain, qui avoisine 30-40mmHg en normoxie, ce qui correspond à peu près à 5% d'O₂ en culture cellulaire (Richardson et al., 2006). Ces données suggèrent ainsi que la concentration d'oxygène devrait être réduite à 5% O₂ afin d'obtenir une condition de normoxie physiologique. Par conséquent, toutes concentrations d'oxygène inférieures à 5% O₂ représentent des conditions hypoxiques (Deldicque & Francaux, 2013). Pour notre protocole, nous avons sélectionné une hypoxie de 4% O₂, juste en deçà des conditions de normoxie physiologique (5% O₂).

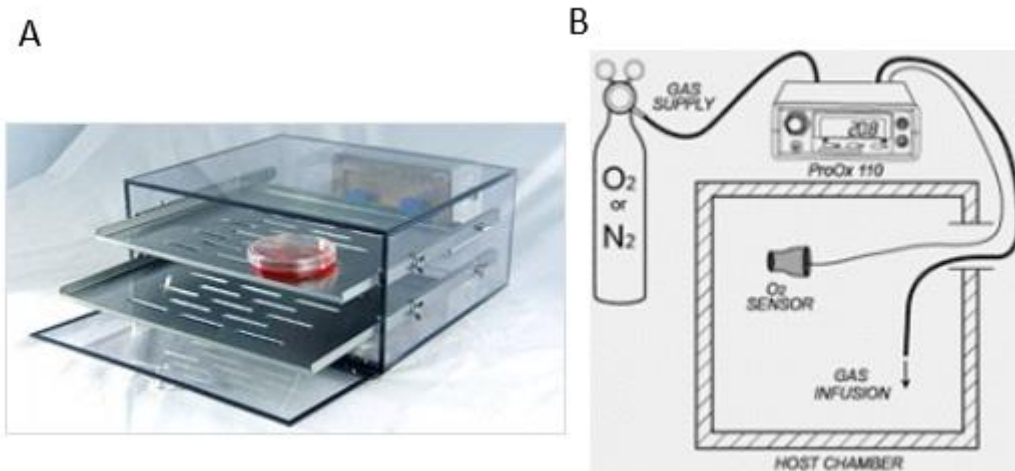


Figure 33 : Dispositif de l'induction de l'hypoxie physiologique. A : chambre hypoxique hermétique (BioSpherix, Lacona, NY). B : dispositif d'injection d'azote par l'intermédiaire du mixeur de gaz (ProOx P110), couplé à la sonde d'oxygène disposé à l'intérieur de la chambre.

II.2. Hypoxie chimique

La seconde approche d'hypoxie cellulaire a été induite chimiquement par l'utilisation d'agents mimétiques de l'hypoxie. D'après des données bibliographique, les inducteurs les plus utilisés sont le chlorure de cobalt (CoCl₂) et la desferrioxamine (DFO) (Karovic et al., 2007). Leur utilisation comme traitement pharmacologique par incorporation au milieu de culture provoque une stabilisation de HIF-1 α , qui ne sera donc pas dégradé par le protéasome, permettant ainsi d'induire les effets cellulaires de l'hypoxie lors que celles-ci sont constamment maintenues dans une condition de normoxie (21% O₂). Le CoCl₂ et la DFO miment donc l'hypoxie par la stabilisation de HIF-1 α en remplaçant le fer indispensable à l'hydroxylation de celui-ci en condition de normoxie. L'ion cobalt (Co²⁺) et le fort pouvoir chélateur de la DFO entrent en compétition avec le Fe²⁺, cofacteur indispensable au fonctionnement des prolyl hydroxylases (PHDs). Comparativement à l'hypoxie physiologique, le CoCl₂ induit une défaillance dans le mécanisme de la chaîne respiratoire de la mitochondrie entraînant une réduction de la synthèse d'ATP (Karovic et al., 2007) et une production de ROS mitochondriale comparable à l'hypoxie physiologique (Chandel et al., 1998). Outre la stabilisation de HIF-1 α , la DFO inhibe la croissance cellulaire comme l'hypoxie physiologique (Yoon et al., 2002). Les agents chimiques ont été dissous dans de l'eau ultrapure à une concentration de 50mM, puis dilués dans du milieu de

fusion pour atteindre une concentration finale de 200 μ M. Cette concentration de 200 μ M est la plus couramment utilisée dans les traitements des cellules musculaires à long terme, c'est-à-dire au moins 24h (Bedessem et al., 2015 ; Drager et al., 2015 ; Guo et al., 2006 ; Lei et al., 2011).

III Stress mécanique

De précédents travaux au sein du laboratoire ont montré qu'au 5^{ème} jour de différenciation, les myotubes présentent une structure mature des sarcomères, élément indispensable au bon fonctionnement de l'appareil contractile. Ce stade de différenciation est par conséquent approprié à l'étude des effets du stress mécanique sur les myotubes C2C12.

La stimulation électrique des myotubes, permettant l'induction d'un stress mécanique, a été appliquée par le biais d'un électro-stimulateur (C-Dish, IonOptix, Dublin, Irlande), permettant d'émettre des impulsions bipolaires à travers les électrodes en carbone du dispositif, les électrodes étant suspendues dans les milieux de culture cellulaire (**Figure 34**). Le générateur central permet de faire varier l'intensité (+/- 40 V), la durée (0,4 à 24 msec) et la fréquence (0,1 à 99 Hz) de contraction. Les contractions des myotubes ont été constatées par observation sous microscopie optique. Les impulsions électriques administrées aux cellules musculaires *in vitro* sont comparables aux effets observés lors d'une contraction musculaire à l'exercice chez l'animal ou l'homme (Manabe et al., 2012). Après 1h de stimulation, nous avons observé un changement de phosphorylation de protéines connues pour être activées lors d'une contraction du muscle squelettique, telles que AMPK et Akt (Myatake et al., 2016). Après chaque utilisation, les électrodes ont été trempées dans un bœcher d'eau distillée entre 1-2h, puis l'eau a été changée. Cette procédure de trempage a été répétée 3-4 fois ; enfin, les électrodes ont été soigneusement désinfectées à l'éthanol 70% et rincées à l'eau distillée avant utilisation.

A



B

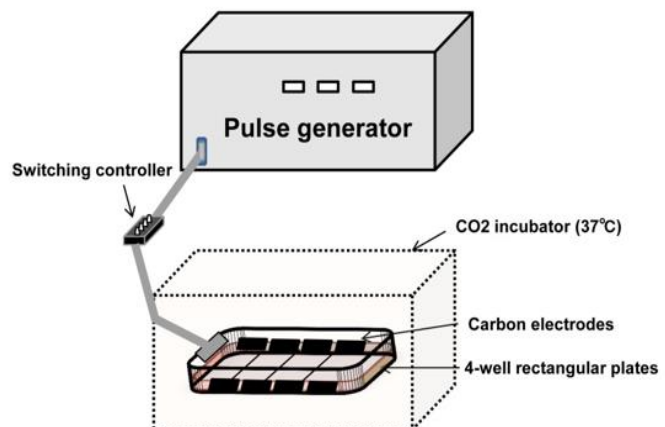


Figure 34 : Dispositif d'électrostimulation cellulaire (Dish, IonOptix, Dublin, Irlande). Montage expérimental du système de contraction des myotubes C2C12. Une (A) plaque à 6 puits contenant une paire d'électrodes de carbone pour chaque puits a été connectée à un (B) générateur d'impulsion électrique.

IV Supplémentation en acide aminé

Les cellules C2C12 ont été traitées avec différentes combinaisons d'acides aminés essentiels branchés : leucine seule, ou un mélange des trois acides aminés branchés (BCAAs : leucine, isoleucine et valine) à une concentration finale de 5mM (Atherton et al., 2010 ; Haegens et al., 2012 ; Yu et al., 2015). Les BCAAs ont été incorporés au milieu de culture de myotubes matures après 5 jours de différenciation.

V Extraction et dosage protéique

V.1. Extraction protéique

Les myotubes ont été rincés trois fois avec 2ml de PBS (Phosphate Buffered Saline) à 4°C. Puis, les cellules ont été décollées à l'aide de grattoir en plastique stérile (Cell scraper, VWR) dans 150µL de tampon de lyse RipA (10 mM Tris/HCl, pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1 % Triton X-100 ; 0,5% sodium deoxycholate ; 0,1 % SDS) auquel on ajoute des anti-protéases (Complete EDTA-free, Roche) et des anti-phosphatases (Phospho-Stop, Roche). Par la suite, les extraits protéiques ont été rapidement soumis à une étape de sonication (Ultra-sonic Cell Disruptor) et enfin une homogénéisation sous agitation lente pendant 1h à 4°C. Les extraits protéiques sont conservés à -20°C.

V.2. Dosage de protéines

L'estimation de la quantité de protéines des extraits cellulaires a été effectuée selon la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Une quantité de 2µl de chaque échantillon à doser a été prélevée et complétée à 800µL avec de l'eau ultrapure, auxquels on ajoute 200µL de réactif de Bradford (BioRad). On mesure la densité optique à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (SpectraMax M2) adapté aux plaques 96 puits. La concentration de protéines a été obtenue par l'intermédiaire d'une gamme étalon d'albumine sérique bovine (0 à 20µg) effectuée dans les mêmes conditions que les échantillons à doser.

VI Quantification des signaux protéiques par Western blot

VI.1. Préparation des échantillons

Le volume d'échantillon protéique à déposer en vue d'une séparation électrophorétique par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) a été déterminé à partir de la concentration protéique mesurée précédemment. La quantité de protéines pour chaque échantillon a été de 20µg par puits, que l'on dilue dans un tampon dénaturant, à savoir le tampon Laemmli (62,5 mM Tris Base ; 2% glycérol ; 0,02 % bleu de bromophénol ; 5 % β-mercaptoéthanol ; 10 % SDS ; pH 6,8). Les protéines ont été dénaturées à 95°C pendant 7min, puis déposées sur le gel.

VI.2. Electrophorèse SDS-PAGE

Les protéines dénaturées ont été séparées par SDS-PAGE ; les dépôts ont été réalisés sur minigels Stain-free (*TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit*, Biorad) dont la concentration de polyacrylamide a été choisie en fonction de la masse moléculaire de la protéine ciblée (**Tableau II**). La migration des protéines s'effectue à un voltage constant de 100V sur une durée de 90min dans un tampon de migration (25mM Tris base ; 0,2M glycine, 1% SDS). Tout le long de la migration, le front de bleu de bromophénol et un témoin de masse moléculaire, ajouté dans un puits de référence, permettent de contrôler la séparation des protéines. La technologie Stain-free (SF) utilise un composé trihalo dans le gel permettant de détecter par fluorescence les acides aminés tryptophanes de l'ensemble des protéines contenues dans l'échantillon. Après une exposition de 5 minutes aux UV *via* l'imageur ChemiDoc (Biorad), une image SF a permis de visualiser le protéome total de l'échantillon. Le système SF n'interfère aucunement avec les étapes en aval ou le transfert des protéines du gel à la membrane.

VI.3. Transfert des protéines sur membrane

A la suite de la séparation des protéines par électrophorèse, l'étape de transfert des protéines a été réalisée avec le système Trans Blot Turbo sur des membranes de nitrocellulose (*Trans-Blot® Turbo™*, Biorad). Le transfert a été réalisé grâce à un montage type sandwich constitué de papier Whatman trempé dans le tampon de transfert (Tampon de transfert Biorad, éthanol et eau ultra pure), du gel contenant les protéines séparées lors de la migration, d'une membrane en nitrocellulose et le tout a été maintenu à l'intérieur d'une cassette. Le transfert semi-sec a été effectué pendant 7, 10 ou 12 minutes à 25V en fonction du poids moléculaire de la protéine cible (**Tableau II**). A noter que lors de chaque étape du montage, il a été important d'éliminer toute bulle pouvant se former entre le gel et la membrane. La technologie Stain-free nous permet de vérifier la qualité de transfert des protéines du gel sur la membrane. La visualisation du protéome sur la membrane et l'absence de bandes protéiques sur le gel, nous assurent d'un transfert de qualité.

Protéine d'intérêt	Masse moléculaire (kDa)	% gels (acrylamide)	Quantité protéine (µg)	Transfert temps/voltage	
				Durée (min)	Voltage (V)
AMPK (Thr172)	62	7,5	20	10	25
Akt (ser473)	60	7,5	20	10	25
GSK-3β (Ser9)	46	7,5	20	7	25
HIF-1α	120	7,5	20	12	25
FoxO1 (Ser 256)	82	7,5	20	10	25
FoxO3a (Ser 253)	97	7,5	20	10	25
LC3	14-16	12	20	7	25
mTOR (Ser2448)	289	7,5	20	12	25
Myostatine	50	10	20	7	25
p70S6K1 (Thr389)	70	10	20	10	25
REDD1	28	12	20	7	25
Ubiquitine (P4D1)	Profile total	10	20	10	25

Tableau II : Conditions d'électrophorèse et de transfert sur membranes utilisées, optimisées pour chaque anticorps utilisé dans cette étude.

VI.4.2. Etape d'incubation des anticorps primaires et secondaires

Les membranes ont été incubées sur un agitateur à rouleaux à vitesse lente à 4°C pendant la nuit ou 2 heures à température ambiante avec un anticorps primaire spécifique à la protéine étudiée, dilué dans la solution de blocage à la concentration adéquate (**Tableau III**). Trois lavages de 10-15 minutes ont été effectués avec une solution de TBS-T à température ambiante, puis les membranes ont été incubées en présence d'un anticorps secondaire spécifique à l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation pendant 2 heures à température ambiante (**Tableau III**). Par la suite, les membranes ont été rincées dans une solution de TBS-T à cinq reprises pendant 10 minutes.

L'anticorps secondaire utilisé est couplé à une enzyme, la peroxydase, permettant de détecter les protéines ciblées par chemiluminescence. Les membranes ont été incubées avec une solution de détection ECL Clarity (Biorad), initiant la réaction catalytique de la peroxydase en présence de son substrat, le luminol, et d'eau oxygénée, produisant ainsi un signal lumineux. Les membranes ont été enveloppées d'un film transparent et déposées dans un imageur ChemiDoc MP pour l'acquisition des images. L'ensemble des protocoles expérimentaux par Western blot ont été optimisés pour la totalité des anticorps utilisés.

VI.4.3. Quantification du signal

L'ensemble des images obtenues ont été analysées et quantifiées par l'intermédiaire du logiciel Image Lab (Biorad). Les signaux protéiques ont été normalisés à la fois sur la quantification du protéome total acquis par SF et sur le signal d'un témoin interne permettant de supprimer de possibles variations inter-expérimentations. De plus, l'intensité moyenne du bruit de fond a été soustraite de la valeur mesurée pour chaque échantillon (Gürtler et al., 2013).

VI.4.4. Décrochage de l'anticorps primaire

Les membranes dont les protéines nécessitent une analyse de leurs formes phosphorylées et totales ont été déshybridées avec une solution de Western Reprobe (G-Biosciences) pendant 25 minutes à température ambiante. Les membranes ont été lavées trois fois 10 minutes au TBS-T, puis saturées avec une solution de blocage avant incubation de l'anticorps primaire spécifique à la forme totale de la protéine d'intérêt.

Protéine d'intérêt	Anticorps primaires						Anticorps secondaires				
	Référence	Source	Type	Dilution	Saturation Tampon/Temps	Incubation	Référence	Source	Dilution	Saturation Tampon/Temps	Incubation
Phospho-AMPK α (Thr172)	Cell Sig 2531	Rabbit	Polyclonal	1/1000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
AMPK α	Cell Sig 2532	Rabbit	Polyclonal	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/5000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
Phospho-Akt (ser473)	Cell Sig 9271	Rabbit	Polyclonal	1/1000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
Akt (pan) (11E7)	Cell Sig 4685	Rabbit	Polyclonal	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/5000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
Phospho-GSK-3 β (Ser9)	Cell Sig 9336	Rabbit	Polyclonal	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/5000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
GSK-3 β (27C10)	Cell Sig 9315	Rabbit	Polyclonal	1/5000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/10 000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
HIF-1 α	Bethyl A300-286A	Rabbit	Polyclonal	1/1000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
Phospho-FoxO1 (Ser 256)	Cell Sig 9461	Rabbit	Polyclonal	1/1000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
FoxO1 (C29H4)	Cell Sig 2880	Rabbit	Monoclonal	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/5000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
Phospho-FoxO3a (Ser 253)	Cell Sig 9466	Rabbit	Polyclonal	1/1000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
FoxO3a (75D8)	Cell Sig 2497	Rabbit	Monoclonal	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/5000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
LC3 A/B	Cell Sig 4108	Rabbit	Polyclonal	1/5000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/10 000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
Phospho-mTOR (Ser2448)	Cell Sig 2971	Rabbit	Polyclonal	1/1000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
mTOR	Cell Sig 2972	Rabbit	Polyclonal	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/5000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
Myostatine (GDF8)	Prot Tec 19142-1-AP	Rabbit	Polyclonal	1/1000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
Phospho-P70S6K1 (Thr389)	Cell Sig 9205	Rabbit	Polyclonal	1/1000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A

Protéine d'intérêt	Anticorps primaires						Anticorps secondaires				
	Référence	Source	Type	Dilution	Saturation Tampon/Temps	Incubation	Référence	Source	Dilution	Saturation Tampon/Temps	Incubation
P70S6K1	Cell Sig 9202	Rabbit	Polyclonal	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/5000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
REDD1	Prot Tec 10638-1-AP	Rabbit	Polyclonal	1/1000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7074	Rabbit	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A
Ubiquitine (P4D1)	Cell Sig 3936	Mouse	Monoclonal	1/2000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A	Cell Sig 7076	Mouse	1/5000	TBST + 5% lait	2h sur R.T à T.A

Tableau III : Conditions d'incubation des anticorps primaires et secondaires. R.T (rouleau tournant) ; T.A (température embyante)

VII. Morphologie cellulaire

VII.1. Principe

Afin d'évaluer l'action des différents traitements sur la morphologie des myotubes, un marquage au May-Grünwald (éosine – bleu de méthylène) (Sigma-Aldrich) et la Giemsa (éosine – azur de méthylène) (Sigma-Aldrich) a été réalisé. Cette technique de coloration a la propriété de se fixer sur les différents constituants cellulaires (noyau, cytoplasme, membrane) permettant aisément de différencier les myoblastes (cellules mononucléées) des myotubes (cellules plurinucléées).

VII.2. Protocole de marquage May Grünwald / Giemsa

Les cellules ont été lavées 3 fois par 5ml de PBS en vue d'éliminer la totalité du milieu de culture, puis les cellules ont été fixées au méthanol pendant 7 minutes. Après un nouveau cycle de lavages au PBS, les cellules ont été mises en présence consécutivement de la solution May-Grünwald et de Giemsa pendant 5 et 1 minutes respectivement. Enfin, les cellules ont été lavées à l'eau désionisée ; le nombre de lavages a été effectué en fonction de la coloration finale des cellules, la coloration étant régulièrement vérifiée sous microscope optique.

VII.3. Acquisition des images

Après avoir réalisé la coloration au May-Grünwald et Giemsa, les myotubes ont été visualisés en utilisant un microscope Leica DMLS équipé d'un logiciel vidéo (Ulead Video Studio). Les images ont été acquises au grossissement x10 à raison de 15 images choisies au hasard pour chaque condition expérimentale étudiée (chacune des conditions expérimentales sera développée dans les différentes études de la partie « Résultats ») ; la totalité des myotubes de chaque image a été analysée. Le diamètre moyen des myotubes, premier indicateur de l'homéostasie protéique, a été calculé à partir de 5 mesures prises sur la longueur du myotube. L'index de fusion permet d'évaluer la maturation des myotubes ; il correspond au nombre de noyaux inclus dans les myotubes, c'est-à-dire des myotubes avec au moins trois noyaux, sur le nombre total de noyaux dans le champ de vision. L'ensemble des analyses morphologiques a été réalisée en utilisant le logiciel ImageJ.

VIII Quantité de protéine totale

La quantité totale de protéines de chaque échantillon a été dosée en utilisant la méthode de Bradford (vu précédemment). La concentration protéique de l'échantillon (exprimée en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a été rapportée au volume total de l'échantillon (μl). Les résultats ont été exprimés en milligrammes de protéines par échantillon. Mise en relation avec les données morphologiques, la quantité en protéines a été un bon révélateur de l'état de la balance de l'homéostasie protéique (Caron et al., 2009).

IX Viabilité cellulaire - test au MTT : Méthylthiazoletétrazolium

Ce test de viabilité a permis de mesurer l'activité métabolique des cellules viables dans des conditions susceptibles d'engendrer un risque de cytotoxicité des cellules traitées. Lors de ce test, les cellules à l'état de myoblastes ont étéensemencées sur microplaques 96 puits à une densité de 100 000 cellules par ml, dans 200µl de milieu de culture par puits. À la suite des traitements opérés sur les myotubes, les plaques ont été rincées avec une solution de PBS afin d'éliminer le milieu de culture ; les cellules ont été incubées pendant 4h à 37°C en présence de 50 µg/puits de MTT (Sigma Aldrich). Le MTT traverse les membranes des cellules, permettant la transformation des sels de tétrazolium jaunâtres en formazan violet par le biais de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Les cristaux de formazan nouvellement formés pour chaque puits dépendent de la quantité de cellules vivantes. Après solubilisation avec 200µl/puits de DMSO, la quantité de sels de formazan formés par les cellules viables a été quantifiée par spectrophotométrie à une densité optique de 570nm. La viabilité cellulaire résultant de chaque traitement a été comparée à celle des cellules non-traitées.

X Analyse statistique

L'ensemble des traitements ont été effectués au moins en triplicatas biologiques ou en quadruplicatas provenant de 2 ou 3 cultures indépendantes. Toutes les données ont été présentées en moyenne ± SEM. Un test de normalité (Shapiro-Wilk test) a été réalisé sur l'ensemble des données. Les effets des conditions ont été testés par ANOVA à deux voies (conditions et temps). Si des effets principaux et/ou des interactions significatifs étaient observés avec l'ANOVA, des tests post-hoc multi rangs de Fisher ont été appliqués pour examiner des différences pour chaque paire spécifique. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque $P < 0,05$. Les statistiques ont été calculées à l'aide du logiciel Statistica 8.0.

Résultats

Etude I : Impact de différentes méthodes d'induction de l'hypoxie cellulaire : place des agents mimétiques de l'hypoxie comme modèle d'induction de l'hypoxie cellulaire à travers l'analyse de l'homéostasie protéique et la morphologie des cellules musculaires squelettiques C2C12 différenciées en myotubes.

I. Contexte et objectif

À ce jour, l'impact de l'hypoxie sur les voies de signalisation intracellulaires régulant l'homéostasie protéique, c'est-à-dire l'équilibre entre la synthèse et de la dégradation des protéines dans le muscle squelettique, reste encore à être élucidé. La compréhension mécanistique et moléculaire des liens existant entre la pénurie d'oxygène au niveau des tissus musculaires et le déséquilibre de la balance anabolisme/catabolisme protéiques est un enjeu majeur dans le développement de futurs traitements palliatifs visant à limiter ou réverser l'atrophie musculaire consécutive à une hypoxie chronique. De nombreuses équipes ont mené des investigations sur les répercussions néfastes de l'hypoxie sur les voies de signalisation régulant la synthèse et la dégradation des protéines à travers des modèles *in vitro* (c'est-à-dire des cellules musculaires mises en culture) tels que les myoblastes primaires humains ou des lignées cellulaires murines (cellules L6 ou cellules C2C12) (Caron et al., 2009 ; Koning et al., 2011 ; Launay et al., 2010 ; Martin et al., 2017a ; Pomiès et al 2015). En effet, l'homogénéité du matériel biologique issu de la culture cellulaire apporte de nombreux avantages dans l'étude des voies de signalisation intracellulaires. Les protocoles de recherche menés sur l'hypoxie musculaire reposant sur l'utilisation d'un modèle *in vitro* ont ainsi la possibilité de contrôler de manière précise de nombreuses conditions expérimentales, permettant ainsi de limiter au maximum les perturbations environnementales sur l'interprétation des résultats telles que le pH, la température, le taux d'humidité, et en particulier les concentrations des différents gaz (azote, oxygène et dioxyde de carbone), composant l'environnement cellulaire.

Afin de reproduire artificiellement un environnement appauvri en oxygène (<21% O₂), il existe plusieurs modalités. L'approche dite « physiologique » réside en deux concepts. Le premier consiste à réduire la disponibilité en O₂ par une diminution de la pression barométrique ; cette méthode, appelée aussi « hypoxie hypobare », peut être reproduite en laboratoire par l'intermédiaire d'une chambre ou d'un caisson hypobare. La seconde alternative, appelée « hypoxie normobarique », consiste à diminuer la quantité d'O₂ disponible dans l'air ambiant sans modifier la pression barométrique (Martin et al., 2017a ; de Theije et al., 2013). C'est cette méthode d'induction de l'hypoxie qui a été sélectionnée afin d'être comparée avec une autre approche expérimentale dite « hypoxie chimique ». Cette dernière méthode est basée sur l'administration de substances pharmacologiques telles que le chlorure de cobalt (CoCl₂) ou la desferrioxamine (DFO). Tout comme l'hypoxie *in vivo*, la privation physique en oxygène (hypoxie physiologique) ou l'emploi d'agents mimétiques de l'hypoxie (CoCl₂ et DFO) entraînent tous deux une hydroxylation de HIF-1 α , bloquant son ubiquitination et sa dégradation protéasomale, favorisant ainsi la stabilisation et l'activation de HIF-1 α (Dziegala et al., 2016 ; Karovic et al., 2007).

Bien que la méthode d'induction par hypoxie physiologique soit celle se rapprochant le plus d'une hypoxie observée *in vivo*, l'emploi de substances chimiques (CoCl₂ ou DFO) permettant de mimer

les effets d'une hypoxie physiologique (stabilisation de HIF-1) est fréquemment utilisé *in vitro*, donnant lieu à une pléthore de protocoles d'induction d'hypoxie tissulaire et cellulaire. Cette multiplicité du type d'induction de l'hypoxie a pour conséquence un nombre important de résultats et interprétations différents, avec pour effet une compréhension limitée et incomplète des répercussions de l'hypoxie sur les voies de signalisation intracellulaires. Même si les différentes méthodes d'induction de l'hypoxie engendrent une stabilisation de HIF-1 α , il demeure que ces procédés d'induction sont radicalement différents dans leurs approches et conceptions. De plus, il faut noter qu'à notre connaissance, aucune étude ne s'est consacrée à la comparaison des deux modes d'induction de l'hypoxie, tout particulièrement sur leurs éventuelles similitudes ou différences en terme d'impact sur l'activité des protéines modulant l'homéostasie protéique (synthèse et dégradation des protéines) et des facteurs de la myogenèse, et de leurs effets sur la morphologie des cellules musculaires squelettiques.

Le but de cette première étude est de déterminer les biens fondés de l'emploi de l'hypoxie chimique dans l'investigation des effets de l'hypoxie sur la cellule musculaire squelettique, et de mettre en évidence les points communs et/ou de divergences du CoCl₂ et de la DFO avec la méthode d'hypoxie de référence *in vitro*, à savoir l'hypoxie physiologique normobarique.

Afin de répondre à nos interrogations, nous avons, sur un modèle *in vitro* de myotubes C2C12, déterminé les effets du CoCl₂, de la DFO ou de la privation en O₂ sur l'homéostasie protéique, et leurs conséquences sur la morphologie des myotubes. Nous avons examiné les mécanismes moléculaires impliqués dans (i) la myogenèse par l'analyse des facteurs de différenciation comme la MHCII et la myogénine, (ii) la synthèse protéique par la mesure de l'activation de protéines clé de la voie PI3K / Akt / mTOR, telles que Akt, P70S6K et GSK3- β , mais également (iii) les différentes voies et systèmes de dégradation des protéines, avec le facteur de transcription FoxO1 et de ses deux systèmes effecteurs : l'autophagie lysosomale par la mesure du rapport LC3 II/I, et la dégradation protéasomale avec la quantification des protéines ubiquitinées. Enfin, les données obtenues à partir de l'analyse de l'état d'activation ou d'expression des protéines précédemment citées ont été corroborées avec les caractéristiques morphologiques des cellules musculaires en mesurant notamment le diamètre des myotubes, l'index de fusion, mais aussi en mesurant leur teneur en protéines.

II. Protocole de l'étude

Induction de l'hypoxie physiologique normobarique

Le taux d'oxygène sélectionné dans notre étude est de 4% O₂ ; ce niveau d'O₂ se situe sous la limite des 5% O₂ (30-40mmHg) considéré comme étant la valeur de normoxie tissulaire physiologique chez l'homme (Deldicque et al., 2013 ; Richardson et al., 2006). Bien que la majorité des études *in vitro* sur le muscle squelettique sous hypoxie se concentre entre des valeurs de 0,5 à 3% O₂, nous avons fait le choix délibéré d'un niveau d'oxygène de 4%, et ce en raison de la longue période d'exposition à l'hypoxie lors de notre protocole. L'analyse morphologique destinée à déterminer l'impact de l'hypoxie sur la maturation structurale des myotubes nous impose de maintenir les cellules C2C12 en culture sur des temps relativement importants, entre 48 et 72h après induction. Caron et ses collaborateurs ont mis en évidence qu'une exposition de 48h à 1% O₂ de myotubes (L6) semble être la limite de ce modèle dans l'étude de l'homéostasie protéique et morphologique en condition d'hypoxie (Caron et al., 2009).

Dès la phase d'ensemencement cellulaire et jusqu'au 4^{ème} jour de différenciation, les cellules musculaires sont cultivées dans un incubateur conventionnel contenant 21% O₂, 5% CO₂ et 74% N₂ à une température de 37°C. Par la suite, les cellules C2C12 sont placées en chambre hypoxique (BioSpherix, Lacona, NY), elle-même disposée à l'intérieur de l'incubateur. Le taux d'O₂ au sein de la chambre sera abaissé jusqu'à atteindre avec précision une hypoxie de 4% O₂, qui sera maintenue jusqu'au 7^{ème} jour de maturation, soit une durée d'exposition de 72h (**Figure 35**) (voir Matériels et méthodes, partie II).

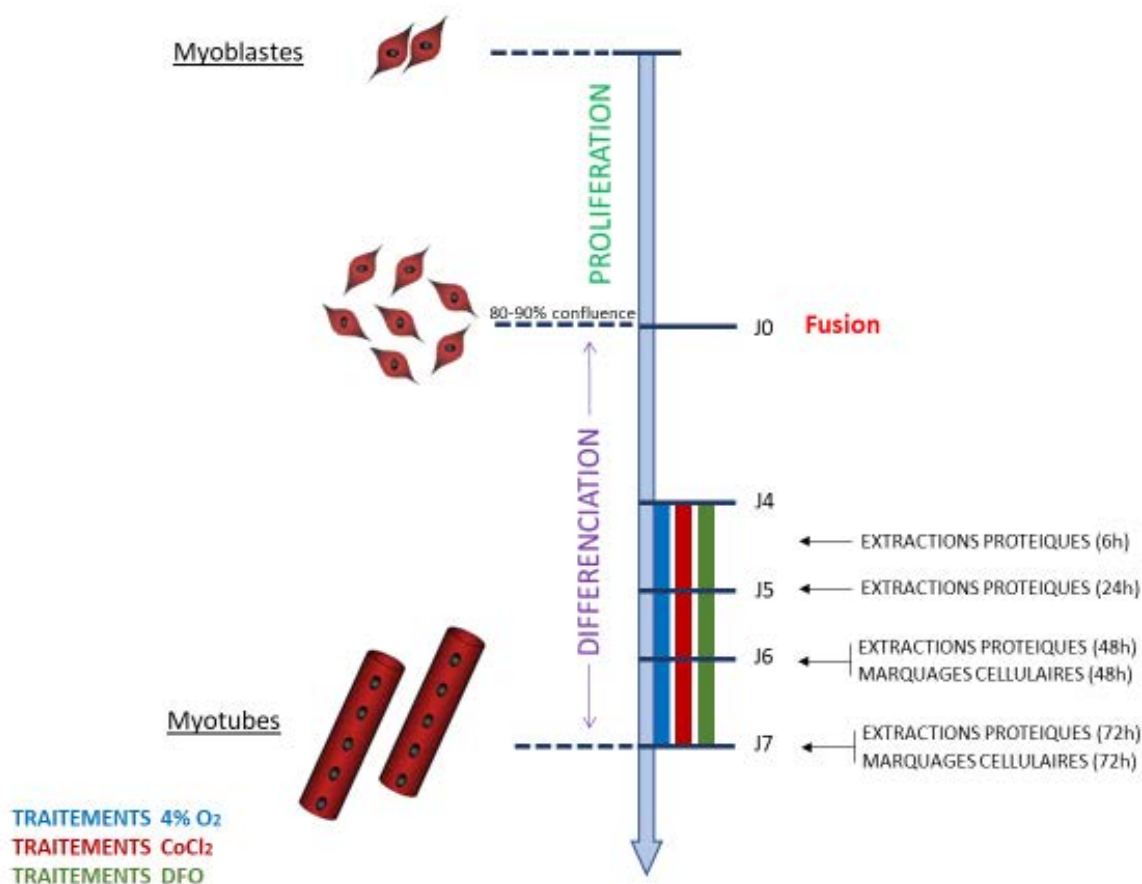


Figure 35 : Représentation schématique du protocole d'application des différents modes d'induction de l'hypoxie de cellules musculaires C2C12 différenciées en myotubes.

Induction de l'hypoxie chimique

Pareillement au protocole d'incubation de l'hypoxie physiologique, nous avons administré le CoCl₂ ou la DFO dilués dans le milieu de différenciation à une concentration finale de 200µM à partir du 4^{ème} jour de différenciation sur une durée de traitement de 72h (**Figure 35**). La concentration de 200µM a été déterminée d'après des recherches bibliographiques et ainsi que les travaux réalisés lors de mon Master 2 recherche. Nous avons déterminé qu'il existait un effet dose-réponse entre différentes concentrations des agents chimiques utilisés avec des effets cytotoxiques mesurés par l'intermédiaire d'un test de viabilité cellulaire au MTT. Les cellules musculaires C2C12 ont été exposées à plusieurs concentrations de CoCl₂ et de DFO (0, 50, 100, 200, 400 µM) et ce à des temps d'exposition différents (24h, 48h et 72h). De plus, le taux de viabilité de chaque concentration testée a été comparé à celui de l'hypoxie physiologique normobarique à 4% O₂.

Mesures effectuées

L'analyse moléculaire a été réalisée à la suite d'extractions cellulaires après 6h et 24h d'induction de l'hypoxie ; la technique de western blot a été utilisée afin de quantifier l'état d'activation et/ou l'expression des protéines de la voie de synthèse protéique, de la voie de dégradation des protéines et de facteurs de la myogenèse des cellules musculaires squelettiques. La mesure de la teneur en protéines de chaque échantillon a également été réalisée pour chacune des conditions, à 24h, 48h et 72h après induction de l'hypoxie. Enfin, par le biais d'un marquage des myotubes au May-Grünwald-Giemsa, nous avons analysé l'état de maturation et de différenciation des myotubes après 48h et 72h de traitement (**Figure 35**).

Analyses statistiques

L'ensemble des traitements ont été effectués au moins en quadruplicate biologique à partir de 2 ou 3 cultures indépendantes. Toutes les données sont présentées en moyenne \pm SEM. Un test de normalité (Shapiro-Wilk test) a été réalisé sur l'ensemble des données. Les effets des conditions (à savoir normoxie vs hypoxie physiologique vs CoCl_2 vs DFO) et des différents temps de mesures (24h vs 6h et 72h vs 48h) ont été testés par ANOVA à deux facteurs (conditions et temps). Si des effets principaux et/ou des interactions significatifs étaient observés avec l'ANOVA, des tests post-hoc multi ranges de Fisher ont été appliqués pour examiner des différences pour chaque paire spécifique. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque $P < 0,05$. Les statistiques ont été calculées à l'aide du logiciel Statistica 8.0.

III. Résultats

III.1. Mise au point de l'induction de l'hypoxie cellulaire par traitement chimique

III.1.1. Effet des inducteurs de l'hypoxie chimique sur la viabilité cellulaire des myotubes C2C12

Afin de sélectionner une concentration adéquate des agents chimiques mimétiques de l'hypoxie, nous avons mesuré le taux de viabilité cellulaire par l'intermédiaire d'un test de cytotoxicité au MTT pour chacune des concentrations testées (0, 50, 100, 200, 400 μM), et ce sur des périodes de traitement de 24h, 48h et 72h. Si nous nous référons à la standardisation internationale, un traitement pharmacologique *in vitro* est considéré comme cytotoxique dès lors que la quantité de cellules viables est en deçà du seuil de 80% (López-García et al., 2014).

Le CoCl_2 et la DFO ont affecté le taux de viabilité des cellules de manière dose- et temps-dépendants. En particulier, les cellules musculaires traitées à une concentration de 400 μM de CoCl_2 ($67,1 \pm 4,1\%$, $63,6 \pm 1,6\%$ et $53,7 \pm 2,2\%$ après 24h, 48h et 72h, respectivement) et DFO ($83,1 \pm 1,9\%$, $80 \pm 1,8\%$ et $70,4 \pm 3,1\%$ après 24h, 48h et 72h, respectivement) ont diminué de manière significative la viabilité cellulaire par rapport aux cellules non traitées ($P < 0.01$), et ce jusqu'à des valeurs inférieures au seuil de cytotoxicité (**Figure 36**). Comparativement, aux concentrations de 50 μM et 100 μM , quel que soit l'agent chimique utilisé, la viabilité reste toujours supérieure au seuil de cytotoxicité, même

au temps d'exposition le plus long (72h) (**Figure 36C**). On remarque que la concentration intermédiaire de 200 μ M de CoCl₂ et DFO a eu des effets sur les myotubes comparables à ceux exposés à une 4% O₂, avec un taux de viabilité cellulaire comprise entre 70 et 80% sur les trois temps d'exposition (**Figure 36**).

Aux vues de ces résultats et de la normalisation internationale concernant l'utilisation de substances chimiques, nous avons sélectionné la concentration de 200 μ M pour chacun des agents chimiques mimétiques de l'hypoxie utilisé dans notre protocole. Pour compléter et approuver notre choix de concentration, nous avons comparé les effets du CoCl₂ et DFO à une hypoxie de 4% O₂, par l'analyse du facteur de transcription HIF-1 α , régulateur principal des adaptations cellulaires sous hypoxie.

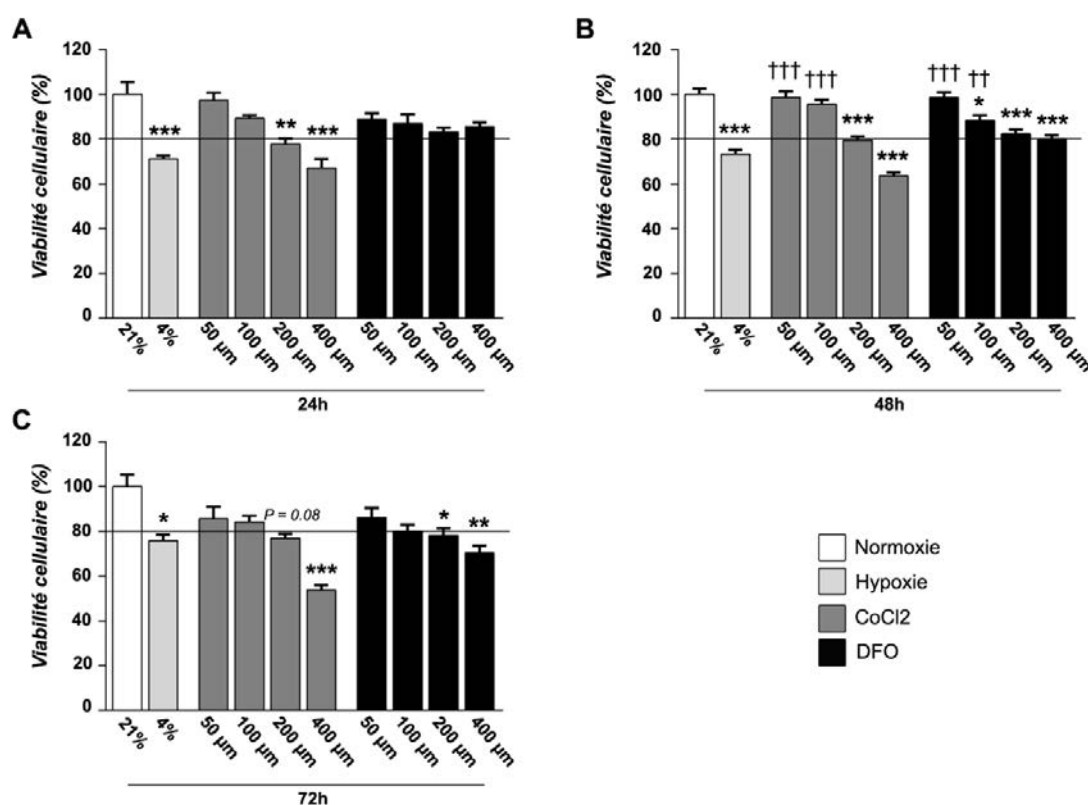


Figure 36 : Mesure de la viabilité cellulaire via le test MTT après traitement au CoCl₂ et DFO à différents concentrations (50, 100, 200, 400 μ M), à 24h (A), 48h (B) et 72h (C) après traitement de cellules musculaires C2C12. Les myotubes C2C12 ont été traités avec différentes concentrations de CoCl₂ et de DFO ; la viabilité des cellules a ensuite été évaluée par dosage au MTT 24h, 48h et 72h après l'induction. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, dérivées d'au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs significativement différentes de la condition contrôle (21% O₂) sont présentées par : * *P* < 0,05, ** *P* < 0,01, *** *P* < 0,001 ; les tendances sont indiquées par la valeur *P* spécifique. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂) sont présentées par : †† *P* < 0,01 ; ††† *P* < 0,001. La ligne continue indique le seuil de cytotoxicité (80%) (López-García et al., 2014).

III.1.2. HIF-1 α , marqueur de l'adaptation intracellulaire sous hypoxie

L'analyse par western blot a révélé que les cellules musculaires exposées à un taux de 4% O₂ présentent après 24h d'induction une augmentation significative de l'expression de HIF-1 α (2,69 \pm 0,31 u.a., *P* < 0,001) par rapport aux cellules contrôles sous normoxie (21% O₂) (**Figure 37**). Contrairement à l'hypoxie physiologique, les deux agents chimiques (CoCl₂ et DFO) à une concentration de 200 μ M

entraînent précocement une inhibition du processus de dégradation en normoxie de la protéine HIF-1 α ; dès 6h après leur administration, l'expression de HIF-1 α augmente significativement en comparaison aux cellules non traitées ($3,28 \pm 0,28$ et $2,8 \pm 0,41$ u.a., respectivement pour CoCl $_2$ et DFO, $P < 0,001$) (**Figure 37**). La stabilisation de HIF-1 α , provoquée à 6h par les deux agents chimiques, a été maintenue après 24h de traitement ($P < 0,001$) (**Figure 37**). Il est intéressant de noter que le niveau d'expression de HIF-1 α était sensiblement similaire à 24h, et ce quelle que soit la méthode d'induction de l'hypoxie utilisée par rapport aux cellules contrôle maintenue à 21% O $_2$ ($P < 0,001$) (**Figure 37**).

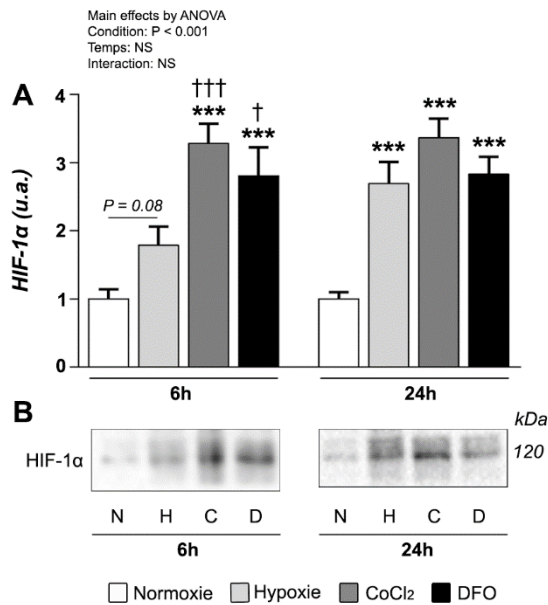


Figure 37 : Effet de l'hypoxie physiologique (4% O $_2$) et des agents chimiques mimétiques de l'hypoxie (CoCl $_2$ et DFO) sur l'expression de HIF-1 α . A : Analyse par Western blot de l'expression de HIF-1 α sur des myotubes de C2C12 exposés à la normoxie (21% O $_2$) (N), à l'hypoxie physiologique normobarique (4% O $_2$) (H) ou traités par des agents chimiques : CoCl $_2$ (C) ou DFO (D) à une concentration de 200 μ M pendant 6h ou 24h. B : Signaux obtenus par western blot à 6h ou 24h. Les valeurs significativement différentes de la condition contrôle (21% O $_2$; non traitée) sont présentées par : *** $P < 0,001$, les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O $_2$) sont présentées par : † $P < 0,05$; ††† $P < 0,001$. Les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique (n = 8 par condition).

En conclusion de nos données, les concentrations de 50 μ M, 100 μ M et 400 μ M employées lors de notre test n'ont pas été retenues pour le reste de notre étude. Bien que les concentrations de 50 μ M et 100 μ M permettent de maintenir un taux de viabilité au dessus du seuil de 80% de la standardisation internationale en comparaison à la concentration de 400 μ M, les effets sur la cytotoxicité des cellules C2C12 d'une concentration de 200 μ M (CoCl $_2$ et DFO) a été comparable à celle d'une hypoxie physiologique normobarique de 4% O $_2$. Par conséquent, notre choix s'est porté sur une concentration commune de 200 μ M de CoCl $_2$ et DFO, même si cette concentration en CoCl $_2$ induit des effets cellulaires proches du seuil de cytotoxicité après 48h et 72h de traitement. De nombreuses études utilisent cette concentration 200 μ M lorsque la durée des traitements excède 24h (Avila-George et al., 2017 ; Chen et al., 2017b ; Chen et al., 2018 ; Choy et al., 2010 ; Rovetta et al., 2013). Bien que la stabilisation de HIF-1 α soit plus rapide avec le CoCl $_2$ et la DFO par rapport à une réduction du taux d'oxygène (4%), après 24h de traitement, nos données révèlent une concordance entre les différents modes d'induction de l'hypoxie par rapport à l'expression de HIF-1 α . Après avoir étudié le facteur central de l'adaptation à l'hypoxie, nous nous sommes intéressés aux effets inhibiteurs de ce dernier sur l'une des voies principales de la protéosynthèse, la voie PI3K / Akt / mTOR.

III.2. Effets de l'hypoxie physiologique ou chimique sur la voie de signalisation Akt / mTOR

Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine Akt est un élément important de la voie de synthèse protéique PI3K / Akt / mTOR, et se tient également au carrefour des voies de protéosynthèse et de protéolyse, faisant de celle-ci l'un des facteurs centraux régulant l'homéostasie protéique (Calnan & Brunet, 2008 ; Schiaffino et al., 2013). Afin de mesurer l'influence de chaque type d'induction de l'hypoxie sur la voie de synthèse Akt / mTOR, nous avons quantifié les formes phosphorylées et totales de protéines clés de cette voie, telles que Akt, la protéine P70S6K (cible de mTOR) et la protéine GSK-3 β (inhibitrice du facteur d'initiation de la traduction eIF2b).

La quantification par western blot de l'activation de la protéine Akt indique que son taux de phosphorylation (ratio entre Akt phosphorylé sur le résidu Ser473 et Akt total (p-Akt / Akt)) ne montre aucune variation significative après 6h de traitement, que ce soit pour les cellules sous 4% O₂ ou traitées par agents chimiques (**Figure 38A**). En revanche, à 24h post-traitement, l'hypoxie physiologique (4% O₂) et CoCl₂ (200 μ M) ont entraîné toute deux une baisse du niveau d'activation d'Akt ($0,41 \pm 0,05$ u.a. et $0,33 \pm 0,06$ u.a., respectivement, $P < 0,01$). Contrairement au CoCl₂, les cellules C2C12 traitées par la DFO présentent un taux de phosphorylation d'Akt proche de celui de la normoxie ($1,1 \pm 0,36$ u.a.) et supérieur à celui des cellules sous hypoxie physiologique ($P < 0,01$) (**Figure 38A**). Nous avons également choisi d'étudier la protéine GSK-3 β ; à l'inverse de Akt, protéine promotrice de la protéosynthèse, GSK-3 β tient un rôle d'inhibiteur de la voie de protéosynthèse, GSK-3 β étant phosphorylé et inhibé principalement par Akt (Bodine et al., 2001 ; Léger et al., 2006). Nos données indiquent une hypo-phosphorylation de la protéine GSK-3 β après 6h ($0,83 \pm 0,05$ u.a., $P < 0,05$) et 24h ($0,72 \pm 0,03$ u.a., $P < 0,01$) d'exposition à l'hypoxie physiologique (4% O₂), en comparaison aux cellules sous normoxie (21% O₂) (**Figure 38B**). Les cellules C2C12 traitées à 6h par du CoCl₂ ont montré une augmentation du ratio p-GSK-3 β / GSK-3 β par rapport à la normoxie ($P < 0,05$) et à l'hypoxie physiologique (4% O₂) ($P < 0,001$), alors que 24h après incorporation, ce même traitement a entraîné une diminution de l'activation de GSK-3 β ($0,79 \pm 0,12$ u.a., $P < 0,05$). Les cellules musculaires C2C12 traitées par la DFO n'ont montré que peu de variation du ratio p-GSK-3 β / GSK-3 β par rapport aux valeurs de normoxie à 6h et 24h post-traitement. Nous pouvons également noter qu'après 24h de traitement, les cellules traitées par la DFO ont observé un niveau d'activation supérieur à celui de la condition 4% O₂ ($P < 0,01$).

Par la suite, nous avons mesuré l'un des effecteurs de mTOR, la protéine P70S6K, reconnue comme une kinase régulatrice de la protéine ribosomale S6 (Pullen & Thomas, 1997). Aucune variation de l'activation de P70S6K n'a été observée après 6h de traitement pour l'ensemble des méthodes d'induction de l'hypoxie employées par rapport aux cellules non traitées (**Figure 38C**). En revanche, une hypoxie de 4% O₂ ou un traitement au CoCl₂ après 24h d'exposition entraînent une baisse significative du taux de phosphorylation de P70S6K en comparaison aux cellules contrôles non traitées (21%O₂) ($0,86 \pm 0,02$ u.a., $P < 0,05$ et $0,73 \pm 0,03$ u.a., $P < 0,001$, respectivement) (**Figure 38C**). Contrairement à son homologue pharmacologique, la DFO n'occasionne aucun changement du niveau d'activation de P70S6K en comparaison aux conditions 4% O₂ et CoCl₂, que ce soit à 6h et 24h d'exposition. De manière comparable aux protéines Akt et GSK-3 β , les cellules traitées par la DFO ont observé un ratio p-P70S6K / P70S6K significativement supérieur aux cellules musculaires sous hypoxie physiologique (4% O₂), que ce soit à 6h et 24h post-traitement ($P < 0,05$) (**Figure 38C**).

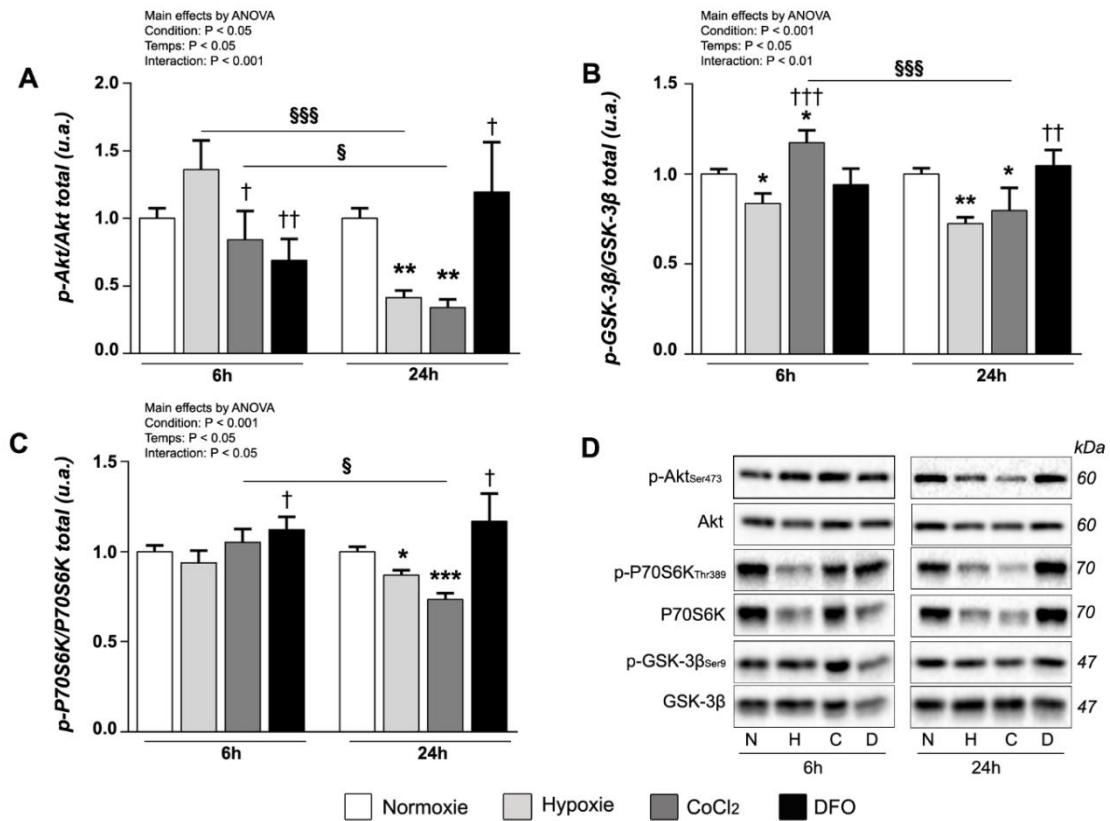


Figure 38 : Impact de différentes méthodes d'induction d'hypoxie sur l'inhibition de la voie de synthèse des protéines Akt-mTOR. L'état d'activation de la voie de synthèse des protéines est déterminé par Western blot dans les myotubes C2C12 sous normoxie (21% O₂) (N), hypoxie (4% O₂) (H) ou traitée par des agents chimiques mimétiques de l'hypoxie : CoCl₂ (C) ou DFO (D) à une concentration de 200 μM pendant 6h ou 24h. **A** : Ratio p^{Ser473}Akt / Akt total après 6 ou 24h de traitement. **B** : Ratio p^{Thr389}P70S6K / P70S6K total. **C** : Ratio p^{Ser9}GSK-3β / GSK-3β total. **D** : Signaux représentatifs des protéines d'intérêt après 6 ou 24 heures d'induction de l'hypoxie. Les valeurs significativement différentes de la condition contrôle (21% O₂ ; non traitée) sont présentées par : * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂) sont présentées par : † P < 0,05 ; †† P < 0,01 ; ††† P < 0,001. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 6h) sont présentées par : § P < 0.05, §§§ P < 0.001 (n = 12 par condition).

L'induction de l'hypoxie cellulaire par réduction de l'O₂ ou par l'intermédiaire du CoCl₂ induisent une sous-activation de la voie Akt / mTOR. Les cellules musculaires C2C12 traitées par la DFO ne présentent en revanche que peu d'effet sur Akt, P70S6K et GSK-3β après 6h et 24h de traitement ; au contraire, le CoCl₂ et l'hypoxie physiologique à 4% occasionnent tous deux une hypo-phosphorylation de ces protéines, notamment après 24h d'exposition. Après avoir constaté des similitudes entre les conditions 4% O₂ et CoCl₂ et des différences entre les agents mimétiques de l'hypoxie (CoCl₂ et DFO) sur la voie de protéosynthèse Akt / mTOR, nous allons analyser et comparer l'impact de ces traitements sur les voies de dégradation des protéines.

III.3. Effets de l'hypoxie physiologique ou chimique sur les régulateurs des voies de dégradation protéique

FoxO1, un membre de la famille des protéines FoxO, est l'un des principaux précurseurs de l'activation de plusieurs voies de dégradation dans le muscle squelettique (Xu et al., 2017). FoxO1 a pour cible principale deux systèmes de dégradation des protéines au sein de la cellule musculaire : l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome. Afin d'observer l'impact de chacun des modes d'induction de l'hypoxie sur les voies de dégradation des protéines, il nous a semblé crucial de mesurer avant tout l'état de phosphorylation de la protéine FoxO1 indiquant sa localisation cellulaire, de la protéine LC3 indispensable à la formation de l'autophagosome, et enfin les protéines ubiquitinées, l'ubiquitine étant nécessaire à la reconnaissance des molécules à dégrader par le protéasome.

Après 6h d'induction de l'hypoxie (hypoxie physiologique ou chimique), seul le traitement au CoCl_2 a entraîné une diminution significative du ratio p-FoxO1 / FoxO1 par rapport aux cellules C2C12 contrôle ($0,67 \pm 0,05$ u.a., $p < 0,05$). On constate que l'impact du CoCl_2 sur l'état de phosphorylation de la protéine FoxO1 se prolonge et s'accroît après 24h de traitement ($0,57 \pm 0,2$ u.a., $P < 0,01$) (**Figure 39A**). Concernant l'hypoxie physiologique à 4% O_2 , seule l'exposition de longue durée (24h) des cellules musculaires a affecté le niveau de phosphorylation de FoxO1 ($0,56 \pm 0,09$ u.a., $P < 0,01$), et ce dans des proportions similaires à la valeur de la condition CoCl_2 en comparaison aux cellules normoxiques (21% O_2) non traitées (**Figure 39A**).

L'autophagie a été analysée à l'aide de l'expression de deux marqueurs impliqués dans la biogenèse des autophagosomes, LC3-I et sa forme lipidique, LC3-II. Le ratio entre ces deux formes de LC3 nous renseigne sur l'état d'activation de cette voie de dégradation des protéines. La quantification par western blot a montré que l'hypoxie physiologique (4% O_2) initiait une augmentation de l'expression de LC3-II en comparaison à la condition de normoxie, mais également par rapport aux deux inducteurs chimiques de l'hypoxie ; ces effets ont été observés sur les deux temps d'incubation utilisés dans notre étude (6h et 24h, $P < 0,001$) (**Figure 39B**). Parallèlement à l'hypo-phosphorylation de FoxO1 après 24h d'induction, nous avons quantifié une augmentation du ratio LC3-II / LC3-I pour les cellules C2C12 sous 4% O_2 ($2,58 \pm 0,24$ u.a., $P < 0,001$) et pour les cellules exposées au CoCl_2 ($1,65 \pm 0,17$ u.a., $P < 0,01$) (**Figure 39B**). On peut noter que le traitement par la DFO n'a entraîné aucune modification de la forme LC3-II, que ce soit après 6h ou 24h de d'incubation, tout comme les cellules musculaires en condition de normoxie (**Figure 39E**).

Afin de compléter notre analyse sur l'impact des différents modes d'induction de l'hypoxie cellulaire, nous avons analysé la totalité des protéines ubiquitinées à la suite des traitements. Nos données indiquent que l'ubiquitination des protéines des myotubes C2C12 sous hypoxie physiologique ou chimique ne variait pas après 6h d'exposition, comparativement aux cellules contrôles non traitées (**Figure 39C**). Le seul traitement ayant entraîné une augmentation du taux d'ubiquitination a été le CoCl_2 après 24h de traitement ($2,1 \pm 0,31$ u.a., $P < 0,001$), en comparaison aux cellules contrôles et aux cellules exposées à l'hypoxie physiologique (**Figure 39C**). Parallèlement à son homologue chimique, la DFO n'a entraîné aucun changement du niveau d'ubiquitination des protéines, avec un profil d'ubiquitination similaire à celui des conditions contrôle et 4% O_2 (**Figure 39E**).

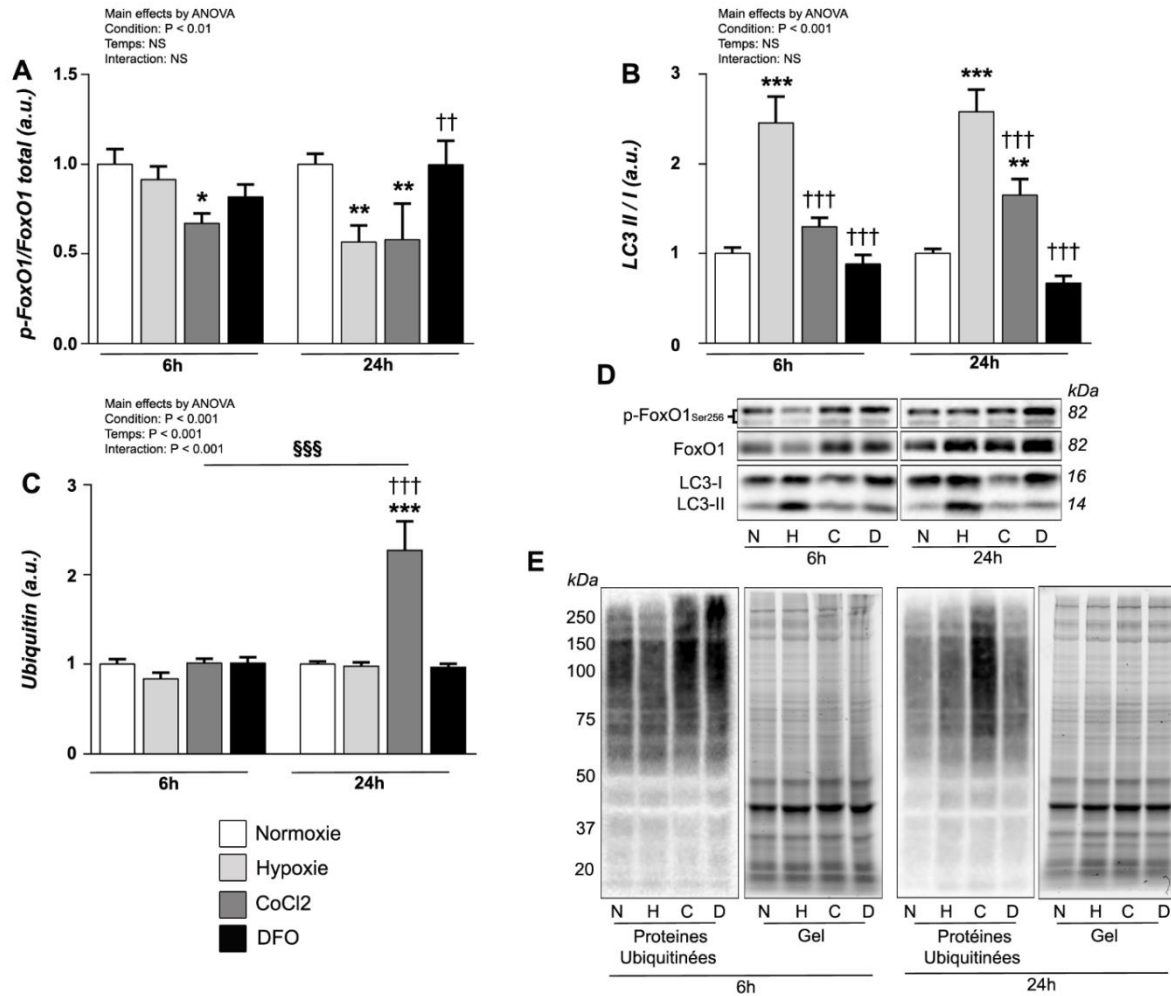


Figure 39 : Impact de différentes méthodes d'induction d'hypoxie sur les marqueurs de dégradation des protéines dans les myotubes C2C12. Quantification de l'état de phosphorylation du facteur de transcription FoxO1 et de l'expression de protéines clés impliquées dans les systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome, déterminées par Western blot dans des myotubes C2C12 sous normoxie (21% O₂) (N), hypoxie (4% O₂) (H) ou traitée par agents chimique mimétiques de l'hypoxie : CoCl₂ (C) ou DFO (D) à une concentration de 200 μM pendant 6h ou 24h. **A** : Ratio p_{Ser256}FoxO1 / FoxO1 total après 6h ou 24h de traitement. **B** : Ratio entre les protéines LC3 II et LC3I. **C** : Quantification des protéines conjuguées à l'ubiquitine. **D** : Signaux représentatifs des protéines d'intérêt après induction de l'hypoxie. **E** : Signaux représentatifs des protéines ubiquitinées. Les valeurs significativement différentes de la condition contrôle (21% O₂ ; non traitée) sont présentées par : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂) sont présentées par : †† $P < 0,01$; ††† $P < 0,001$. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 6h) sont présentées par : §§§ $P < 0.001$ (n = 12 par condition).

Tout comme les protéines clés de la voie de synthèse protéique mesurées précédemment, un déficit en O₂ et l'exposition des cellules au CoCl₂ provoquent des modifications des voies de dégradation des protéines dans les cellules C2C12. Un temps d'exposition relativement long à l'échelle cellulaire, c'est-à-dire 24h, occasionne les perturbations néfastes les plus importantes pour les cellules, avec une hypo-phosphorylation de FoxO1, et une activation des systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome. Nos résultats montrent que, à la fois l'hypoxie physiologique (4% O₂) et chimique (CoCl₂) influence les voies de synthèse et de dégradation des protéines. En est-il de même pour la myogénèse ?

III.4. Effets de l'hypoxie physiologique ou chimique sur les facteurs régulateurs de la myogénèse.

Après avoir analysé les principales voies de signalisation de l'homéostasie protéique, nous sommes intéressés à l'expression de protéines impliquées dans la différenciation et la maturation cellulaires, telles qu'une isoforme de la chaîne lourde de la myosine (MHC II) et les facteurs de régulation myogéniques (MRF). L'expression coordonnée de ces derniers est essentielle au bon développement des fibres musculaires.

Afin d'apporter d'avantage d'informations sur l'impact de chaque mode d'induction de l'hypoxie sur les voies intracellulaires responsables du développement de la cellule musculaire, nous avons quantifié l'un des marqueurs myogéniques en charge de la différenciation des myotubes par l'analyse de l'expression de la myogénine et d'un des marqueurs de la différenciation la protéine MHC de type II. Nos résultats ont montré que seule l'hypoxie physiologique (4% O₂) diminue l'expression de la MHCII entre 6h et 24h de traitement (24h vs 6h, $P < 0,05$). Contrairement à la DFO, l'expression de la myogénine a été réduite dans les myotubes cultivés 4% O₂ ($0,4 \pm 0,05$ au, à 24h, $P < 0,001$) ou traités par le CoCl₂ ($0,55 \pm 0,04$ au, à 6h, $P < 0,001$) en comparaison aux cellules contrôles (**Figure 40**).

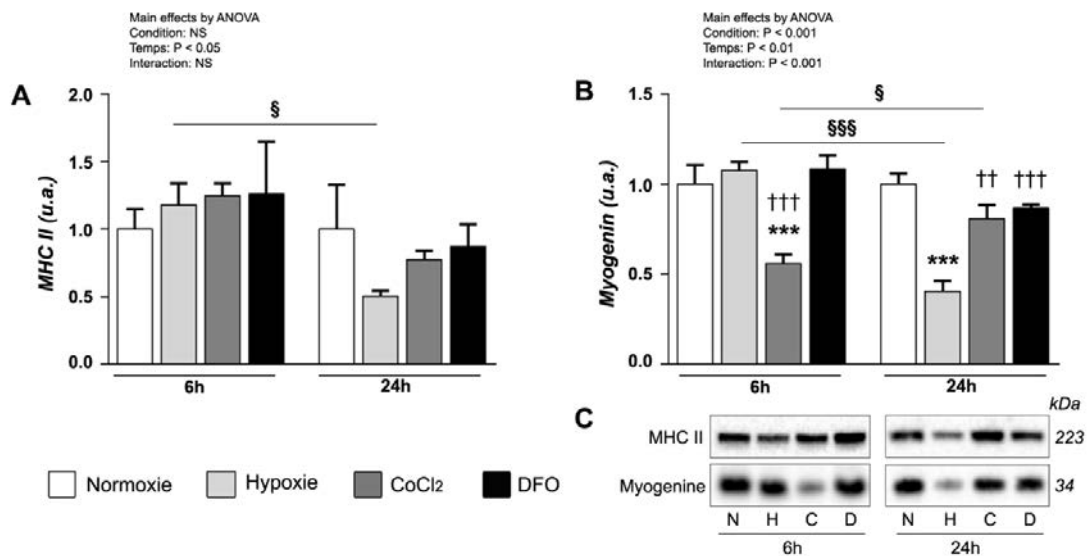


Figure 40 : L'exposition à une hypoxie physiologique ou chimique réprime les facteurs de régulation de la différenciation des myotubes C2C12. Le niveau d'expression de la chaîne lourde de Myosine de type II (MHCII) et de la myogénine a été déterminé par Western blot dans des myotubes de C2C12 sous normoxie (21% O₂) (N), hypoxie (4% O₂) (H) ou traitée par les agents chimiques inducteurs de l'hypoxie : CoCl₂ (C) ou DFO (D) à une concentration de 200µM pendant 6h ou 24h. **A** : Quantification de la protéine MHCII. **B** : Quantification de la myogénine. **C** : Signaux représentatifs des protéines d'intérêt après 6h ou 24h après induction de l'hypoxie. Les valeurs significativement différentes de la condition contrôle (21% O₂ ; non traitée) sont présentées par : *** $P < 0,001$. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂) sont présentées par : ++ $P < 0,01$; +++ $P < 0,001$. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 6h) sont présentées par : § $P < 0,05$; §§§ $P < 0,001$. (n = 4 par condition).

L'ensemble de ces données au niveau moléculaire montrent bien que quelle que soit la nature d'induction de l'hypoxie (physiologique ou chimique) utilisée sur les cellules musculaires, certaines voies de signalisation régulatrices de l'homéostasie protéique et la différenciation cellulaire peuvent s'en trouver perturbées. À la suite de nos investigations sur l'emploi de ces deux types de méthodes d'hypoxie cellulaire et de leur impact au niveau intracellulaire, une analyse morphologique des myotubes et la mesure de la teneur en protéines des myotubes ont été réalisées pour chacune des conditions d'hypoxie.

III.5. Effets de l'hypoxie physiologique ou chimique sur la morphologie et la teneur en protéines des myotubes.

Après une période de prolifération, les myoblastes C2C12 subissent l'influence de facteurs de la myogenèse, entraînant ainsi la formation de myotubes plurinucléés. Le calcul de l'index de fusion, correspondant à la détermination du ratio entre le nombre de noyaux incorporés dans les myotubes et le nombre total de noyaux présent dans l'échantillon, est couramment utilisée pour quantifier le niveau de différenciation des cellules musculaires (Veliça & Brume, 2011). Outre l'index de fusion, le recensement du nombre de noyaux par myotube, le nombre de myotubes (contenant au moins 3 noyaux) et le diamètre des myotubes nous permettent de quantifier l'état de différenciation et le degré de maturation des myotubes C2C12.

L'analyse morphologique des myotubes a révélé une réduction significative du diamètre des myotubes pour les cellules musculaires exposées à une hypoxie de 4% O₂ ($15,61 \pm 0,32 \mu\text{m}$, $P < 0,001$) et traitées au CoCl₂ ($15,36 \pm 0,33 \mu\text{m}$, $P < 0,001$), 48h après le début des traitements, comparativement aux cellules C2C12 sous normoxie et non traitées ($18,06 \pm 0,47 \mu\text{m}$) (**Figure 41B**). De plus, les mesures morphologiques des myotubes 72h post-traitements nous ont révélé une exacerbation de la diminution du diamètre des myotubes pour les conditions 4% O₂ et CoCl₂ (48h vs 72h, $P < 0,001$). En revanche, les myotubes traités par DFO ont un diamètre sensiblement identique à celui des cellules contrôle, que ce soit à 48h ou à 72h d'hypoxie. De plus, le diamètre des myotubes sous DFO a été significativement supérieur à celui des cellules exposées à une hypoxie physiologique, 72h après induction ($12,41 \pm 0,3 \mu\text{m}$ et $15,55 \pm 0,15 \mu\text{m}$, 4% O₂ et DFO, $P < 0,001$) (**Figure 41B**). La privation d'oxygène des myotubes C2C12 a entraîné après 72h d'exposition une diminution simultanée du nombre de myotubes et du nombre de noyaux par myotube, et ce en comparaison avec les cellules musculaires contrôles sous normoxie ($P < 0,05$) (**Figure 41C et 41D**). Quel que soit le type d'induction de l'hypoxie utilisé, l'analyse de l'indice de fusion myogénique ne semble montrer aucune variation importante entre les conditions expérimentales et la condition contrôle. On peut noter que les myotubes exposés à 4% O₂ ont observé une diminution de 9% ($P = 0,09$) et 8% de leur taux de fusion, après 48h et 72h d'exposition, par rapport aux cellules sous normoxie (21 %O₂) (**Figure 41E**).

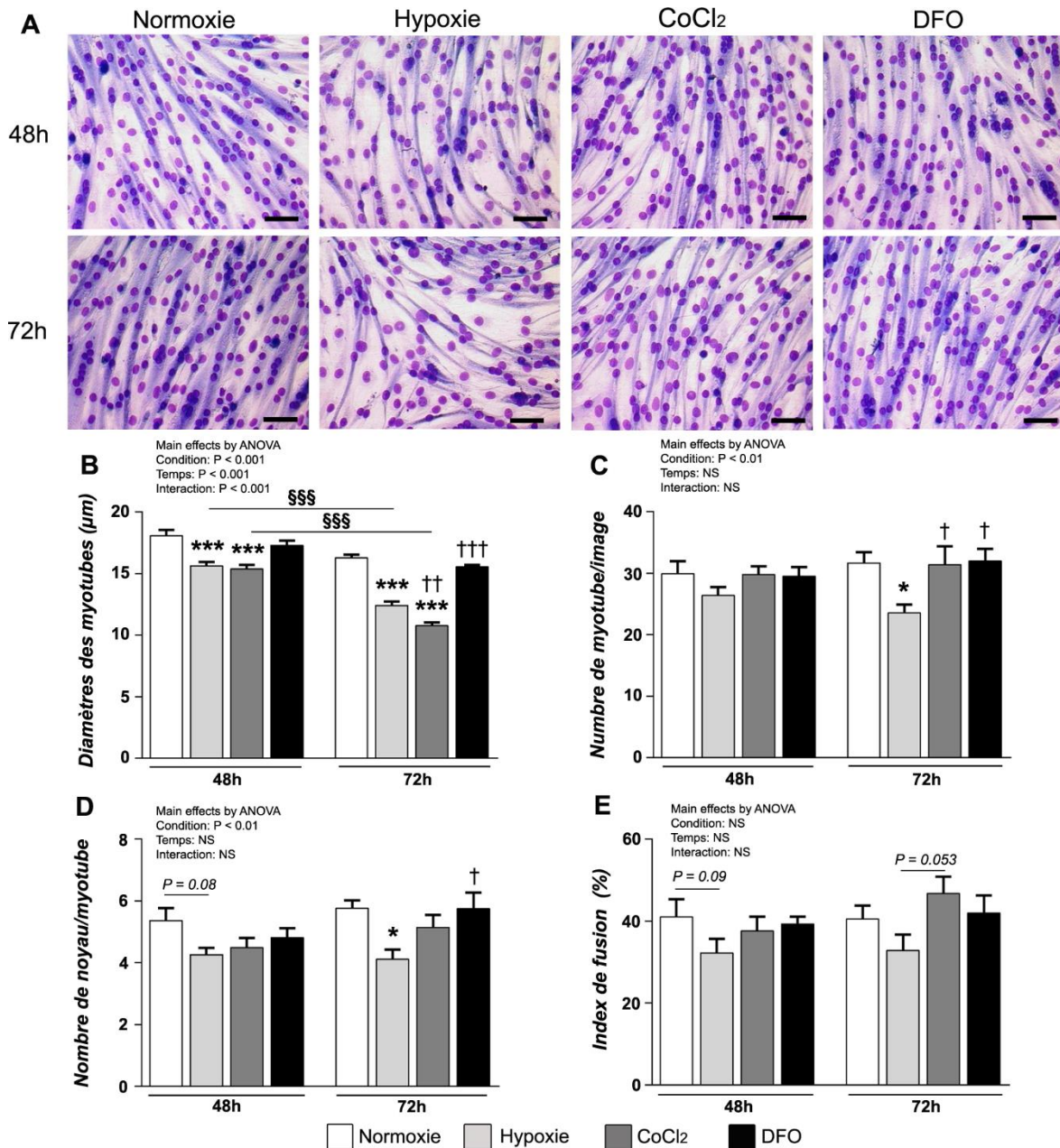


Figure 41 : Atrophie des cellules C2C12 exposées à une privation d'oxygène ou après une induction de l'hypoxie par agent chimique mimétique de l'hypoxie. **A** : Images représentatives de myotubes C2C12 sous normoxie (21% O₂), hypoxie physiologique normobare (4% O₂) ou traités par des agents chimiques : CoCl₂ ou DFO à une concentration de 200 μM pendant 48h ou 72h. Les images ont été acquises dans un agrandissement x20. Barre d'échelle = 100 μm . **B** : Mesure du diamètre des myotubes à 48h et 72h post-traitement, exprimée en μm . **C** : Analyse du nombre de myotubes par image. **D** : Analyse du nombre de noyaux par myotubes. **E** : Analyse de l'indice de fusion myogénique de myotubes en culture, exprimé en pourcentage. Les valeurs significativement différentes de la condition contrôle (21% O₂; non traitée) sont présentées par : * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂) sont présentées par : † $P < 0,05$; †† $P < 0,01$; ††† $P < 0,001$. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 6h) sont présentées par : §§§ $P < 0.001$. Les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique (n = 6 par condition).

Après avoir réalisé l'analyse morphologique des myotubes, nous avons examiné les variations de la teneur totale en protéines pour chacune des conditions d'hypoxie. La condition hypoxie physiologique a entraîné une importante réduction de la quantité totale de protéines, et ce de manière dépendante du temps d'exposition après 24h ($0,4 \pm 0,01 \text{ mg}$, $P < 0,01$) et 48h ($0,37 \pm 0,01 \text{ mg}$, $P <$

0,001), cette diminution étant exacerbée à 72h post-traitement ($0,16 \pm 0,01$ mg, $P < 0,001$) (**Figure 42**). Comme l'hypoxie physiologique, les cellules C2C12 traitées au CoCl_2 ont montré une diminution significative de la quantité totale de protéines ($0,4 \pm 0,01$ et $0,39 \pm 0,01$ mg, à 48h et 72h, respectivement, $P < 0,001$). Cependant, il convient de noter que le contenu protéique des myotubes était significativement plus élevé pour les cellules traitées aux CoCl_2 par rapport aux cellules exposées à 4% O_2 , 72h post-traitement ($P < 0,001$) (**Figure 42**). Les myotubes C2C12 traités à la DFO n'ont présenté aucun changement de leur teneur totale en protéines par rapport aux cellules de contrôle non traitées, et une quantité de protéines totales significativement plus élevée en comparaison à la condition d'hypoxie physiologique à 24h, 48h et 72h post-traitement ($P < 0,001$).

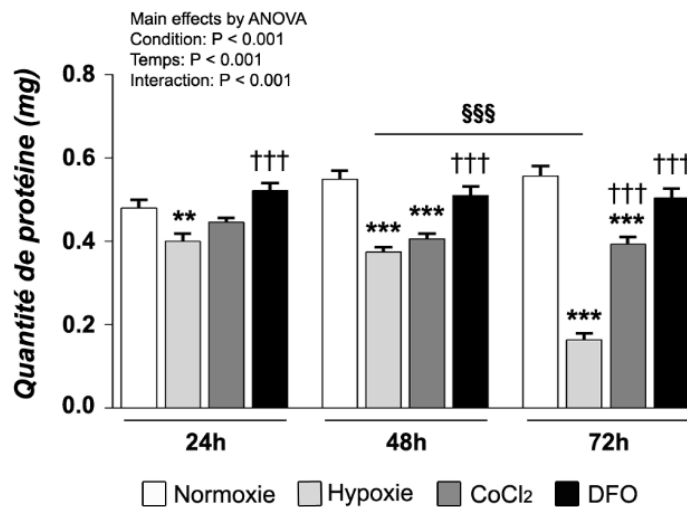


Figure 42 : Réduction de la teneur totale en protéines des myotubes C2C12 soumis aux traitements par hypoxie. Teneur totale en protéines (mg) des myotubes C2C12 exposés à la normoxie (21% O_2) (N), à l'hypoxie normobarique (4% O_2) (H) ou traités par des agents chimiques mimétiques de l'hypoxie : CoCl_2 (C) ou DFO (D) à une concentration de $200\mu\text{M}$ pendant 24h, 48h ou 72h. Les valeurs significativement différentes de la condition contrôle (21% O_2 ; non traitée) sont présentées par : ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O_2) sont présentées par : ††† $P < 0,001$. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 6h) sont présentées par : §§§ $P < 0,001$ (n = 12 par condition).

IV. Conclusion de l'étude I

Les analyses sur le plan macromoléculaire (morphologie des myotubes et teneur totale en protéines) ont permis de nous révéler les réelles conséquences de chacun des types d'induction de l'hypoxie sur les cellules musculaires C2C12. Conformément aux données recueillies au niveau des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'homéostasie protéique, l'exposition prolongée à une hypoxie physiologique normobarique de 4% O_2 entraîne des conséquences néfastes sur la différenciation et la maturation des myotubes C2C12 en culture. Concernant les effets des agents chimiques mimétiques de l'hypoxie (CoCl_2 et DFO), nos données ont montré que le CoCl_2 semble être, sur différents points (moléculaires et morphologiques), le candidat idéal pour suppléer la méthode de référence d'induction de l'hypoxie cellulaire. Toutefois, on peut noter de légères différences des effets cellulaires entre l'hypoxie physiologique et le CoCl_2 , notamment en termes de puissance d'impact et d'effet dans le temps. Contrairement au CoCl_2 , et malgré une augmentation de la stabilisation de HIF-1 α , le traitement à la DFO à une concentration de $200\mu\text{M}$, n'a eu que peu d'effet sur les cellules

Résultats – Etude 1

musculaires C2C12, avec des valeurs très souvent proches de celle retrouvées en normoxie, et ce quel que soit les temps d'exposition.

Cette première étude, a permis de mettre en évidence les similitudes et divergences entre différents modèles d'induction de l'hypoxie in vitro. Ce comparatif, basé sur des critères tels que l'homéostasie protéique, la différenciation et la maturation des myotubes, donne de solides éléments de réponses quant au choix du type d'induction de l'hypoxie, mais surtout dans l'analyse et l'interprétation des résultats basés sur l'application de l'une ou l'autre méthode d'induction de l'hypoxie cellulaire (physiologique ou chimique).

Cette étude a fait l'objet d'une publication scientifique dans la revue internationale Journal of Physiology and Biochemistry, le titre de l'article est « Impact of different methods of induction of cellular hypoxia: focus on protein homeostasis signaling pathways and morphology of C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes. »

Etude II : La stimulation mécanique, la supplémentation en acides aminés ou l'oxygénation dans la limitation de l'atrophie de cellules musculaires sous hypoxie.

I. Contexte et objectif

La diminution de l'apport en oxygène au sein du muscle squelettique peut être observée dans différentes conditions, par exemple lors d'une expédition en haute altitude ; la raréfaction de l'oxygène en fonction de l'altitude gravis expose l'organisme à une pénurie d'oxygène, de plus en plus importante et néfaste avec l'altitude (perte de 10% de la pression en O₂ tous les 1000 mètres). Les atteintes des fonctions respiratoires, comme observées dans la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), peuvent dans certaines formes sévères de la maladie entraîner une importante diminution de l'apport en O₂ à l'ensemble des organes du corps, dont le muscle (Kent et al., 2011 ; Levett et al., 2012). Ces deux formes d'hypoxie (environnementale et pathologique) ont toutes deux comme point commun des adaptations négatives du muscle squelettique, provoquant au niveau de la cellule musculaire un déséquilibre des voies moléculaires régulatrices impliquées dans l'homéostasie protéique, avec pour conséquence une activation exacerbée des voies cataboliques, un changement de typologie de fibres musculaires (fibres de type I → type II) et une atrophie musculaire prononcée (Costes et al., 2015 ; Langen et al., 2013). La compréhension des mécanismes de l'hypoxie sur l'atrophie musculaire, et les moyens permettant de contrer les impacts délétères de l'hypoxie sur le système musculaire restent encore à ce jour des enjeux majeurs de recherche.

Nous avons vu précédemment (revue de littérature) que l'exercice physique, notamment en résistance, est l'un des moyens les plus efficaces pour engendrer une augmentation du nombre et du volume des fibres musculaires. En effet, il est reconnu que la pratique d'exercices physiques, de façon chronique, conduit à une hypertrophie musculaire de par l'activation des voies de signalisation impliquées dans la synthèse des protéines, telle que la voie PI3K / Akt / mTOR. Cependant, de nombreuses études ont montré que l'exercice physique utilisé comme moyen thérapeutique auprès de personnes souffrant d'hypoxie chronique entraîne certes des améliorations du système musculaire (performance et masse musculaires), mais de manière systématiquement moins prononcée en comparaison aux sujets contrôles, c'est-à-dire des sujets non pathologiques ou des patients BPCO non hypoxiques (Costes et al., 2015 ; Vivodtzev et al., 2012). Un autre moyen connu pour lutter contre l'atrophie musculaire ou engendrer une hypertrophie musculaire est la supplémentation nutritionnelle. Une alimentation riche en protéines, en particulier en acides aminés essentiels branchés (BCAA), entraîne au niveau du muscle squelettique une activation des voies anabolisantes (Duan et al., 2017). Il n'y a que récemment qu'une supplémentation en BCAA additionnée à la ration alimentaire quotidienne des patients a émergé dans la prise en charge de la perte de masse musculaire résultante d'une dénutrition et de l'inactivité provoquées par l'hypoxie chronique (Dal Negro et al., 2016). Bien que ce moyen thérapeutique soit naissant, et que ces effets soient significatifs uniquement lors d'une prescription à très long terme (au moins 6 mois), plusieurs questions restent encore sans réponse concernant l'impact moléculaire de la supplémentation en acide aminé sur des cellules musculaires appauvries en oxygène.

Les personnes souffrant de BPCO à des stades avancés de la maladie (stade III ou IV) sont pour la grande majorité, voire la totalité, sous oxygénothérapie. La supplémentation en oxygène a été et reste toujours à ce jour un moyen efficace permettant de retarder la fatigue musculaire précoce chez les personnes atteintes d'hypoxémie chronique sévère (Maltais et al., 2014). Des études sur la supplémentation en oxygène ont montré une amélioration de la tolérance à l'effort et de la performance physique des patients (Emtner et al., 2003 ; Maltais et al., 2001). La compréhension de l'amélioration de la fonction musculaire à la suite d'une prise en charge par oxygénothérapie reste extrêmement limitée à ce jour, notamment les adaptations moléculaires des cellules musculaires squelettiques sous hypoxie à la suite d'une supplémentation aiguë ou chronique en oxygène. Par ailleurs, il n'existe dans la littérature aucune donnée concernant l'impact de la supplémentation en oxygène sur les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie protéique de la cellule musculaire squelettique, voies de signalisation que l'on sait être fortement perturbées en hypoxie. Au contraire des deux autres contre-mesures à l'atrophie musculaire précédemment citées (exercice physique et supplémentation en BCAA), l'oxygénothérapie s'attaque au problème central de l'hypoxie, à savoir la réduction du niveau d'oxygène intracellulaire, dont l'absence cause une inhibition des voies anaboliques et une suractivation des voies cataboliques dans la cellule musculaire squelettique. À ce titre, la supplémentation en oxygène pourrait-elle aussi être utilisée et prescrite, non seulement comme un moyen permettant d'améliorer la performance et la fonction musculaires, mais également comme une contre-mesure possible à l'atrophie musculaire consécutive à un stress hypoxique ?

Le but de cette seconde étude est donc de déterminer si l'oxygénothérapie peut impacter positivement les voies de signalisation régulatrices de l'homéostasie protéique, synonyme d'hypertrophie, de cellules musculaires squelettiques sous hypoxie, en analysant et en comparant les effets d'un traitement par stimulation mécanique, par supplémentation nutritionnelle ou par oxygénothérapie. Nous avons analysé les mécanismes moléculaires impliqués dans l'une des voies principales de la synthèse protéique par la mesure de l'activation de protéines clés de la voie PI3K-Akt-mTOR, telles que Akt, mTOR, 4E-BP1, P70S6K, et GSK3- β ; nous avons également considéré les différentes voies et systèmes de dégradation des protéines, avec les facteurs de transcription FoxO1 et FoxO3a, l'autophagie lysosomale de par la mesure du rapport LC3 II/I et le système ubiquitine-protéasome avec la quantification des protéines ubiquitinées. Pour finir, l'ensemble des données obtenues à partir de l'analyse de l'état d'activation ou d'expression des protéines précédemment citées, ont été corroborées avec les caractéristiques morphologiques des cellules musculaires en mesurant notamment le diamètre des myotubes et leur teneur en protéines.

II. Protocole de l'étude

Induction de l'hypoxie physiologique normobarique

L'induction de l'hypoxie physiologique s'est opérée de la même manière que dans l'étude I ; afin de recréer un environnement pauvre en oxygène, une chambre à hypoxie placée dans un incubateur conventionnel a été utilisée. Le passage de la normoxie à hypoxie s'est effectué par un remplacement de l'oxygène présent dans la chambre par un gaz de substitution, l'azote (N₂), *via* un contrôleur d'oxygène (ProOx P110, BioSpherix, Lacona, NY). Au quatrième jour de différenciation, les myotubes initialement en culture dans un milieu de normoxie (21% O₂) ont été transférés à l'intérieur de la chambre à hypoxie (4% O₂), et y ont été maintenus jusqu'à la fin du protocole d'étude (**Figure 43**).

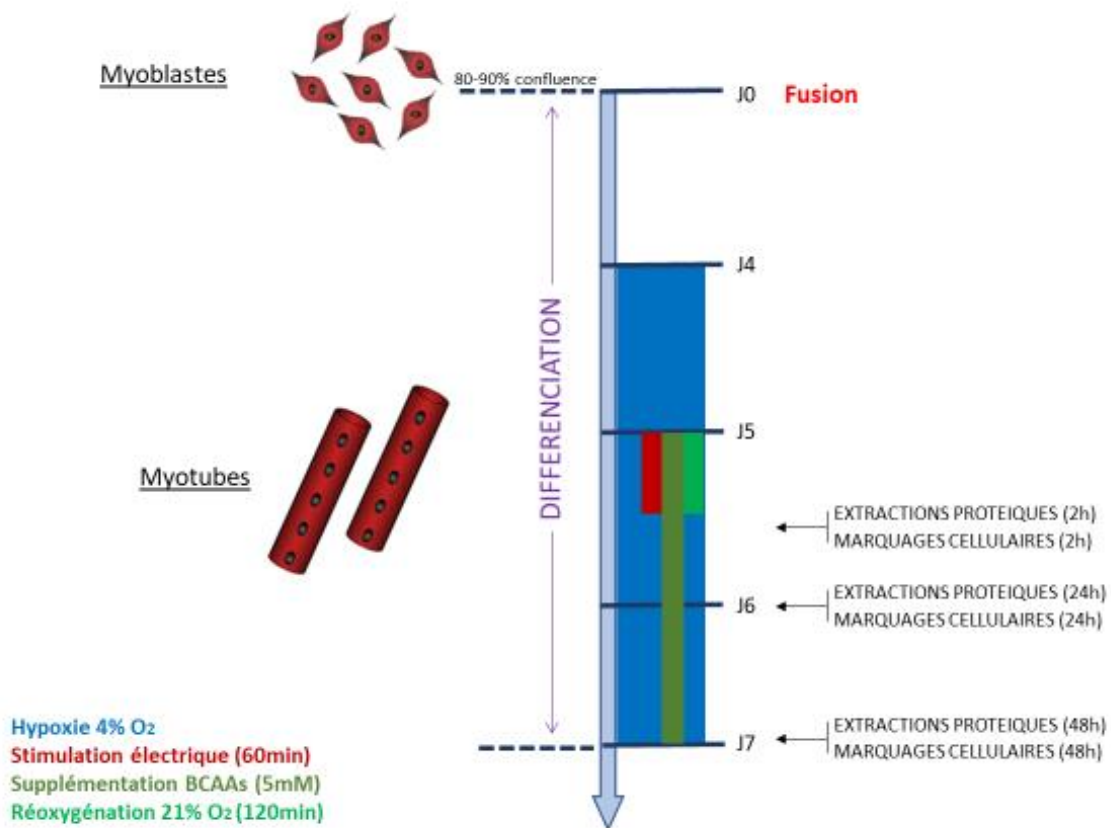


Figure 43 : Représentation schématique du protocole d'application et de mesures des différentes contre-mesures à l'atrophie sur des cellules musculaires C2C12 sous hypoxie. J : jour de différenciation des myotubes, % : taux d'oxygène administré aux cellules musculaires C2C12 différenciées en myotubes.

Stimulation mécanique des cellules musculaires par stimulation électrique

La stimulation mécanique des cellules musculaires C1C12 a été appliquée par l'intermédiaire d'un électro-stimulateur (C-Dish, IonOptix, Dublin, Irlande). Le dispositif contenant les boîtes de Pétri est rattaché à un générateur d'impulsion électrique (C-PACE EP) et a été entreposé à l'intérieur de la chambre à hypoxie tout au long de la période de stimulation électrique. Le programme de stimulation

utilisé dans notre étude est le suivant : intensité de 30 V, fréquence de 1 Hz (soit une contraction par seconde), et une durée de contraction de 3ms (soit un intervalle de repos de 997 ms), sur une durée totale de 60 minutes. Le choix de ces paramètres fait suite aux données recueillies dans la bibliographie (Manabe et al., 2012, Miyatake et al., 2015 ; Nedachi et al., 2008) et aux nombreux tests réalisés lors de mon Master 2 Recherche. Afin d’affiner notre programme de stimulation, nous avons notamment testé les effets de plusieurs intensités (10 V, 20 V, 30 V et 40 V) sur les protéines Akt (protéine centrale de la voie PI3K / Akt) et AMPK (protéine senseur de la contraction musculaire). Bien que la plus haute intensité de notre test (40 V) entraîne une suractivation des protéines Akt et AMPK en comparaison aux intensités inférieures (10 V et 20 V) (Figure 44), l’application d’une intensité de 40 V provoque un décollement excessif des myotubes initialement fixés sur la surface de la boîte de Pétri (Figure 45), rendant par conséquent non exploitable l’analyse morphologique faisant suite à la coloration des cellules par May-Grünwald-Giemsa. La stimulation électrique des cellules C2C12 a été réalisée sur des myotubes matures différenciés à 5 jours, temps nécessaire pour que l’appareil contractile soit en place pour répondre aux stimulations électriques. À noter qu’avant et après chaque stimulation électrique, le milieu de culture est changé. En effet, il a été observé lors de la mise au point du programme d’électro-stimulation au sein de notre laboratoire, que la contraction répétée des myotubes sur une longue durée entraîne une diminution importante du pH du milieu cellulaire, pouvant être nocif pour les myotubes. Dans la mesure où les extractions protéiques sont effectuée 24h post-stimulation et les marquages cellulaires 24h et 48h post-stimulation électrique, nous avons décidé de changer le milieu de culture après chaque stimulation électrique.

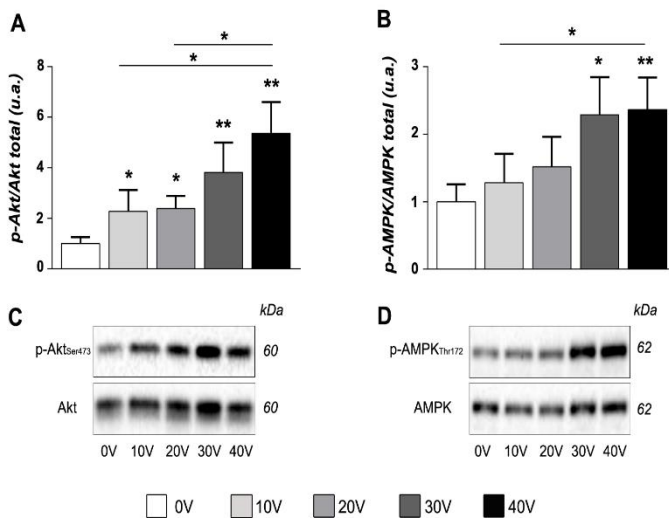


Figure 44 : Test de stimulations électriques de différentes intensités sur l’activation des protéines Akt (A) et AMPK (B). La quantification est réalisée par l’analyse des signaux obtenus par western blot (C) et (D). Les myotubes C2C12 sous normoxie (21% O₂) ont été stimulés électriquement au 5^{ème} jour de différenciation par différentes intensités (10 V, 20 V, 30 V et 40 V) pendant 60 min, et les protéines extraites pour analyse 1h post-stimulation. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM, dérivées d’au moins 2 expériences indépendantes réalisées sur 6 échantillons. Les données significativement différentes par rapport à la condition contrôle sont présentées : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

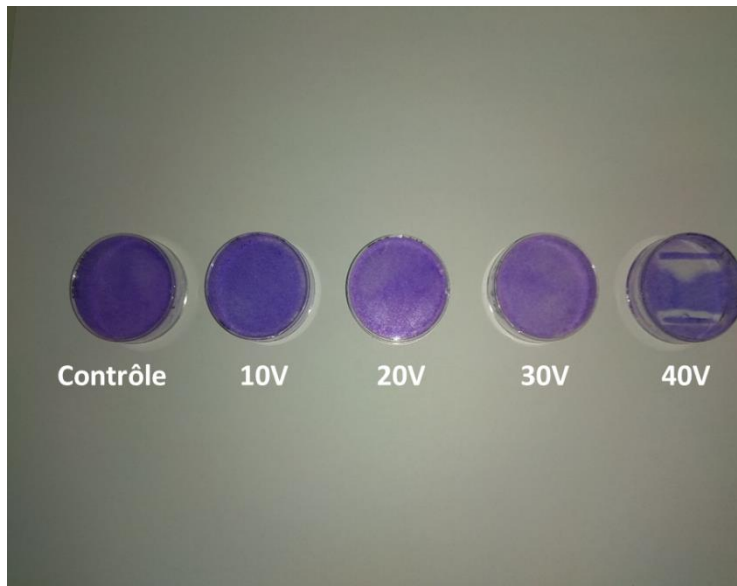


Figure 45 : Photographie du tapis de myotubes C2C12 sur boîte de Pétri marqués au May-Grünwald-Giemsa à la suite de stimulations électriques de différentes intensités (10, 20, 30, et 40 V).

Supplémentation en acides aminés

D'après les données bibliographiques, la mise en place de notre protocole de supplémentation en acides aminés des cellules musculaires C2C12 sous hypoxie s'est concentrée sur l'emploi d'un unique ou de plusieurs acides aminés branchés (BCAAs : leucine, isoleucine et valine). Chez l'homme, les données de la littérature font mention d'une supériorité des effets de la leucine sur l'activation de la protéine mTOR par rapport à ses deux homologues BCAAs (isoleucine et valine) (Dreyer et al., 2006 ; Koopman et al., 2005). Afin de sélectionner le meilleur traitement, nous avons testé sur des cellules C2C12 en normoxie (21% O₂), les effets de la leucine seule et d'un mélange de BCAAs (leucine, isoleucine et valine) à une concentration de 5mM, sur l'une des cibles intracellulaires privilégiées des acides aminés, la protéine mTOR, et de son effecteur P70S6K. Les BCAAs ont été additionnés au milieu de culture de myotubes matures après 5 jours de différenciation, et les protéines ont été extraites 2h et 24h après l'administration des BCAAs. La concentration de 5mM est le résultat de tests préliminaires réalisés au laboratoire et d'après des données bibliographiques (Duan et al., 2017 ; Mao et al., 2011). Les résultats par immunoblot ont révélé une augmentation de l'activation de la protéine P70S6K à 2h pour les deux types de traitements en comparaison aux cellules contrôles non traitées ($P < 0,001$). En revanche, après 24h de traitement, seule la combinaison des trois BCAAs a entraîné une hyperphosphorylation de P70S6K par rapport à la condition contrôle et à la condition leucine seule ($P < 0,05$) (Figure 46).

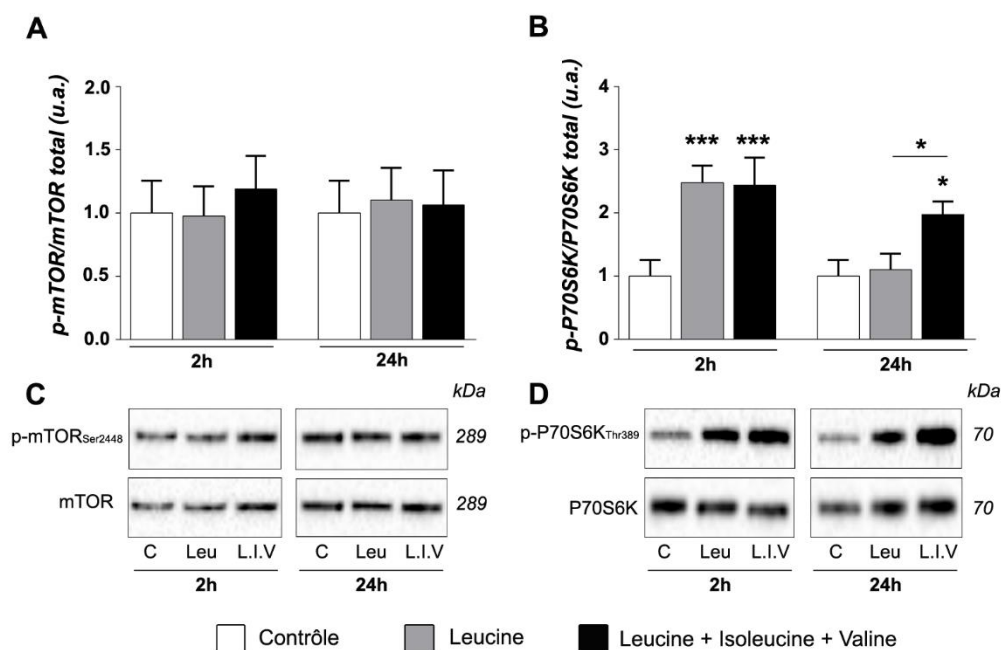


Figure 46 : Test d'une supplémentation par un seul ou plusieurs BCAAs sur l'activation des protéines mTOR (A) et P70S6K (B). La quantification est réalisée par l'analyse des signaux obtenus par western blot (C) et (D). Les myotubes C2C12 sous normoxie (21% O₂) ont été supplémentés par un seul BCAA (leucine) ou un mélange de BCAAs (leucine, isoleucine et valine) à une concentration de 5 mM au 5^{ème} jour de différenciation ; les protéines ont été extraites 2h et 6h post-traitement. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM, dérivées d'au moins 2 expériences indépendantes réalisées sur 6 échantillons. Les données significativement différentes par rapport à la condition contrôle sont présentées : * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. Les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique. Le nombre de cultures indépendantes est de $N = 2$ et le nombre de valeurs recueillies par condition est de $n = 6$. (C : contrôle ; Leu : leucine ; L.I.V : combinaison leucine, isoleucine et valine).

Bien que les acides aminés ne soient pas des éléments cytotoxiques reconnus, l'ajout d'une substance, quelle qu'elle soit, peut potentiellement engendrer un effet de saturation du métabolisme de la cellule ou perturber l'homéostasie cellulaire, pouvant ainsi entraîner des effets délétères sur la survie cellulaire. Comme le montre le test de viabilité, la supplémentation en BCAA (leucine seule, ou mélange des BCAAs à une concentration de 5 mM) ne présente aucune cytotoxicité pour la cellule C2C12 après 24h et 48h de traitement (résultats non présentés). Au vu de ces données, nous avons opté pour l'enrichissement du milieu de culture des cellules musculaires C2C12 au 5^{ème} de jour de différenciation par un mélange de BCAAs (leucine, isoleucine et valine) à une concentration de 5mM.

Réoxygénation cellulaire

Dans des conditions standards de culture cellulaire, les cellules sont cultivées dans une atmosphère composée de 5% CO₂ et 95% d'air ambiant, soit un pourcentage d'oxygène de 21% (valeur de normoxie), à une pression d'oxygène (PO₂) de 149 mmHg (Richardson et al., 2006). Or, chez l'homme en normoxie, la tension en oxygène présente dans le muscle squelettique avoisine 30-40 mmHg, correspondant à une valeur de 5% O₂ (Deldicque et al., 2013). Par conséquent, un niveau d'oxygène de 21% appliqué aux cellules en culture ne peut être qualifié comme valeur de normoxie, mais considéré comme de l'hyperoxie (Chaillou et al., 2016). Cependant, pour des raisons méthodologiques et techniques, les conditions environnementales de cellules en culture ne peuvent être modifiées, quel que soit le type de cellules mises en culture, chaque étape constituant le protocole

de culture cellulaire suivant des normes précises et devant être respectées par la communauté scientifique internationale. Dans notre étude, le niveau d'oxygène standard (21%) utilisé lors de la culture cellulaire est considéré comme étant le niveau de normoxie des cellules C2C12. C'est cette valeur de 21% O₂ qui a été utilisée dans notre traitement de réoxygénation cellulaire. En effet, au 5^{ème} jour de différenciation cellulaire, les cellules C2C12 préalablement exposées dans la chambre à hypoxie durant 24h à 4% O₂ sont transférées dans un environnement « standard » de culture au sein de l'incubateur principal, à un taux d'oxygène de 21% O₂, sur une durée de 120 min. À la fin de cette période de réoxygénation cellulaire, le milieu de différenciation des cellules a été changé, puis les cellules sont replacées dans la chambre à hypoxie (4% O₂) jusqu'à la fin du protocole (**Figure 43**).

Mesures et temps d'analyses

L'analyse moléculaire a été réalisée 2h et 24h après la fin de la période de stimulation électrique (60 min) et de réoxygénation (120 min), ou suite au traitement par les BCAAs. La technique de western blot a été utilisée afin de quantifier l'état de phosphorylation et/ou l'expression des protéines de la voie de synthèse PI3K-Akt-mTOR (Akt ; mTOR ; 4E-BP1 ; P70S6K ; GSK-3 β) et voies de dégradation des protéines (FoxO1 ; FoxO3a ; LC3 ; protéines ubiquitinées). Nous avons également mesuré la teneur en protéines de chaque échantillon pour chacune des conditions 2h, 24h et 48h post-traitement. Enfin, par le biais d'un marquage des myotubes au May-Grünwald-Giemsa, nous avons analysé l'état de maturation et de différenciation des myotubes à 2h (J5), 24h (J6) et 48h (J7) après application des différents traitements (**Figure 43**).

Analyses statistiques

L'ensemble des traitements ont été effectués au moins en triplicatas biologiques ou en quadruplicatas provenant de 2 ou 3 cultures indépendantes. Toutes les données sont présentées en moyenne \pm SEM. Un test de normalité (Shapiro-Wilk test) a été réalisé sur l'ensemble des données. Les effets des conditions (c'est-à-dire hypoxie vs stimulation électrique vs supplémentation en BCAAs vs réoxygénation) et les durées (24h vs 2h et 48h vs 24h) ont été testés par ANOVA à deux voies (conditions et temps). Si des effets principaux et/ou des interactions significatifs étaient observés avec l'ANOVA, des tests post-hoc multi rangs de Fisher ont été appliqués pour examiner des différences pour chaque paire spécifique. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque $P < 0,05$. Les statistiques ont été calculées à l'aide du logiciel Statistica 8.0.

III. Résultats

III.1. Effets de la stimulation électrique, de la supplémentation en BCAAs ou de la réoxygénation cellulaire sur la voie de signalisation Akt-mTOR

Afin d'évaluer l'influence sur la voie PI3K-Akt-mTOR (et donc l'anabolisme protéique) de chacun des traitements testés dans cette étude, nous avons quantifié les formes phosphorylées et totales des protéines Akt, GSK-3 β , ainsi que mTOR et ses effecteurs : 4E-BP1 et P70S6K. L'activation par phosphorylation de ces derniers entraîne respectivement l'augmentation de la traduction de l'ARNm par les ribosomes et la biogénèse ribosomale.

Les analyses par Western blot nous ont révélé que chacun des traitements appliqués sur les myotubes C2C12 après 24h d'hypoxie ont entraîné une activation de la protéine Akt, que ce soit pour les cellules traitées par stimulation électrique ($5,8 \pm 5,47$ u.a., $P < 0,001$), supplémentation BCAAs ($3,21 \pm 3,6$ u.a., $P < 0,05$) ou réoxygénation ($3,04 \pm 3,6$ u.a., $P < 0,05$) par rapport aux cellules hypoxiques (4% O₂ ; non traitées), à 2h post-traitement (**Figure 47A**). Bien que le ratio p-Akt / Akt diminue, à moyen terme, pour les traitements par stimulation électrique (24h vs 2h, $P < 0,01$) ou par réoxygénation (24h vs 2h, $P < 0,05$), seuls les effets résultant de l'électrostimulation ont persisté 24h post-stimulation ($2,95 \pm 2,16$ u.a. $P < 0,001$) en comparaison à la condition 4% O₂ seul (**Figure 47A**). Après 2h de traitement, la protéine GSK-3 β présente une hyper-phosphorylation dans les cellules C2C12 sous hypoxie traitées par stimulation électrique ($1,35 \pm 0,38$ u.a., $P < 0,05$) ou réoxygénation ($1,51 \pm 0,54$ u.a., $P < 0,001$). Par la suite, ces mêmes conditions ont mené, 24h post-traitement, à une réduction du ratio p-GSK-3 β / GSK-3 β , devenant proche du ratio des cellules hypoxiques (4% O₂ ; non traitées) (**Figure 47C**).

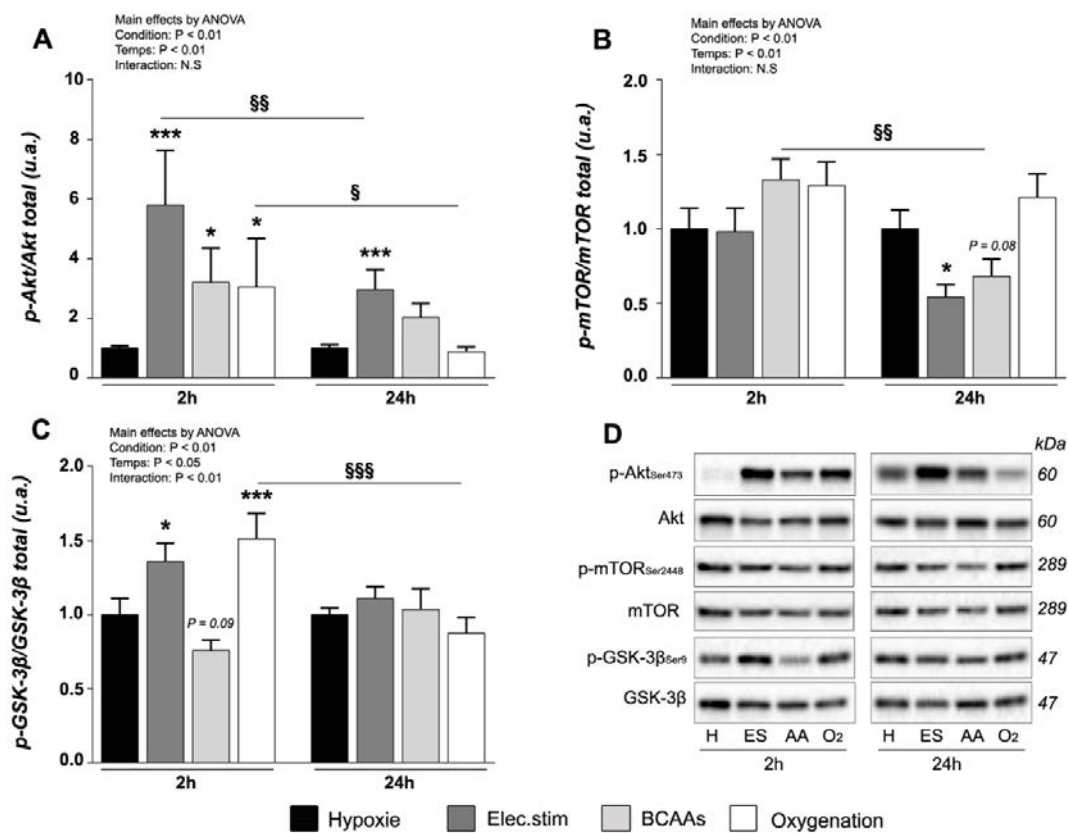


Figure 47 : Impact des différentes contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie sur la voie de synthèse des protéines Akt-mTOR. Le niveau d'activation de la voie de signalisation Akt-mTOR a été déterminé par Western blot sur des myotubes C2C12 sous hypoxie (4% O₂) (H) traités par stimulation électrique (ES), par supplémentation en acides aminés (BCAAs) à une concentration de 5 mM (AA) ou par réoxygénation (2h, 21% O₂), l'analyse étant effectuée 2h et 24h post-traitement. A : Ratio p^{Ser473}Akt / Akt total. B : Ratio p^{Ser2441}mTOR / mTOR total. C : Ratio p^{Ser9}GSK-3 β / GSK-3 β total. D : Signaux représentatifs des protéines d'intérêt 2h ou 24h après traitement. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂ ; non traitée) sont présentées par : * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 2h) sont présentées par : § $P < 0.05$; §§ $P < 0.01$; §§§ $P < 0.001$ ($n = 10$ par condition).

La protéine mTOR, en aval d’Akt, ne montre aucun changement significatif de son activation après 2h de traitement. Seules les cellules musculaires traitées par stimulation électrique ou par supplémentation BCAAs conduisent, après 24h de traitement, à une diminution de l’activation de mTOR, en comparaison à la condition contrôle ($0,54 \pm 0,22$ u.a., $P < 0,05$ et $0,68 \pm 0,11$ u.a., $P = 0,08$, respectivement) (**Figure 47B**). Concernant les cibles en aval de mTOR, seul le traitement par réoxygénation (21% O₂ pendant 2h) a entraîné une augmentation significative de l’activation des protéines 4E-BP1 ($1,27 \pm 0,16$ u.a., $P < 0,01$) et P70S6K ($5,31 \pm 7,42$ u.a., $P < 0,001$), à 2h post-traitement et par rapport à la condition hypoxie (**Figure 48 A et B**). Cependant, ce niveau d’activation provoqué par la réoxygénation a diminué après 24h pour les protéines 4E-BP1 (24h vs 2h, $P < 0,01$) et P70S6K (24h vs 2h, $P < 0,001$) pour revenir à un état d’activation similaire aux cellules en hypoxie (**Figure 48 A et B**).

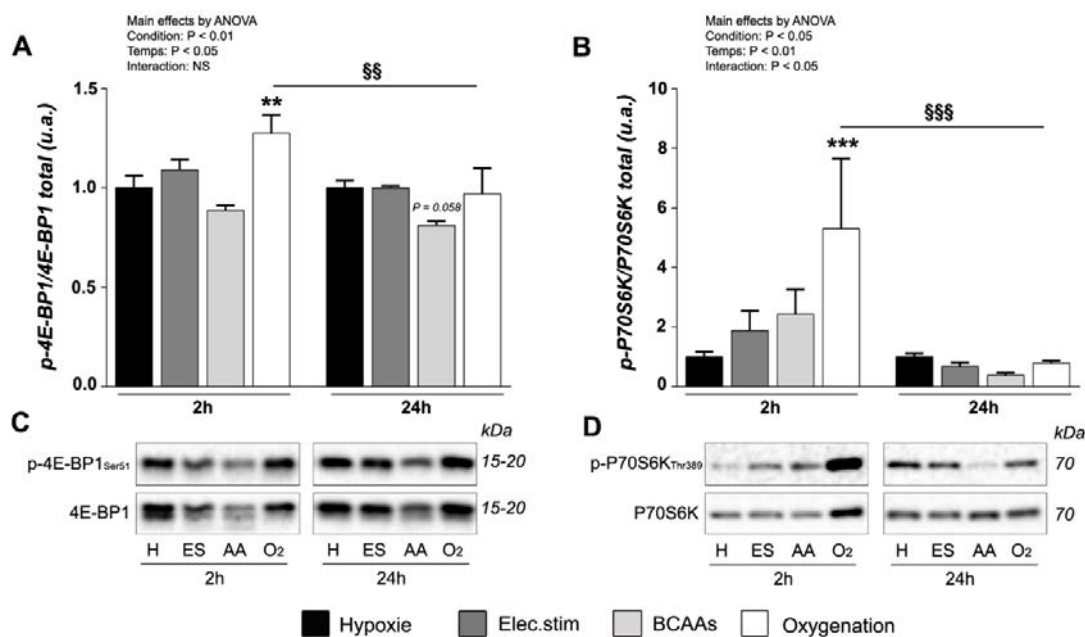


Figure 48 : La réoxygénation de cellules C2C12 sous hypoxie entraîne l’hyper-phosphorylation des protéines responsables de la néosynthèse protéique. Le niveau d’activation de 4E-BP1 et de P70S6K a été déterminé par Western blot dans des myotubes C2C12 sous hypoxie (4% O₂) (H) traités par stimulation électrique (ES), ou supplémentation en acides aminés (BCAAs) à une concentration de 5 mM (AA) ou par réoxygénation (2h, 21% O₂), l’analyse étant effectuée 2h et 24h post-traitement. A : Ratio p^{Ser51}4E-BP1 / 4E-BP1 (n = 6). B : Ratio p^{Thr389}P70S6K / P70S6K total (n = 10). C et D : Signaux représentatifs des protéines d’intérêt à 2h ou 24h après traitement. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂; non traitée) sont présentées par : ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 2h) sont présentées par : §§ $P < 0,01$, §§§ $P < 0,001$.

Bien que l’ensemble des traitements aient entraîné une suractivation de la protéine Akt (2h post-traitement), les effets de chacune des contre-mesures à l’atrophie testées dans notre étude diffèrent l’une de l’autre. La supplémentation en BCAAs ne semble avoir eu d’effet positif que sur Akt, alors que seule la stimulation électrique des cellules musculaires a permis de maintenir un niveau d’activation d’Akt élevé, 24h post-stimulation. De manière intéressante, le traitement par réoxygénation des cellules C2C12 a été la condition ayant engendré le plus fort impact sur l’ensemble des protéines constituant la voie PI3K / Akt / mTOR. Avec l’activation des protéines Akt et GSK-3 β , le retour en normoxie transitoire des cellules musculaires C2C12 sous hypoxie a été l’unique traitement ayant

entraîné l'activation des protéines 4E-BP1 et P70S6K. Nous savons que l'hypoxie impacte négativement les voies régulatrices de l'homéostasie protéique au sein de la cellule musculaire squelettique ; ces données prouvent qu'il est possible, par le biais de traitements tels que la stimulation électrique des myotubes et surtout la réoxygénation cellulaire, d'activer ou de réactiver l'une des voies de signalisation principale responsable de la protéosynthèse dans le muscle squelettique. Il serait intéressant de déterminer si ces contre-mesures agissent également sur les voies de signalisation responsables du catabolisme musculaire, particulièrement activées lors d'un stress hypoxique.

III.2. Effets de la stimulation électrique, de la supplémentation en BCAAs ou de la réoxygénation cellulaire sur les facteurs de transcription FoxOs et les systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome.

Les protéines faisant partie de la famille de classe O (FoxO) sont des facteurs de transcription jouant un rôle important dans l'homéostasie cellulaire. Exprimés dans le muscle squelettique, FoxO1 et FoxO3 sont impliqués dans la dégradation des protéines par la régulation de plusieurs protéines des voies de l'autophagie (LC3) et ubiquitine-protéasome (E3 ubiquitine-ligases). Les variations de la phosphorylation ou l'expression de ces protéines nous éclairent sur l'activité catabolique de la cellule, et par conséquent, peuvent nous renseigner sur l'impact des contre-mesures utilisées dans notre étude sur l'atrophie des cellules musculaires C2C12 induite par l'hypoxie.

Le traitement des myotubes C2C12 sous hypoxie par stimulation électrique a été l'unique condition ayant entraîné une augmentation de la phosphorylation de la protéine FoxO1 sur sa sérine 256, à 2h ($1,27 \pm 0,12$ u.a., $P < 0,05$) et 24h ($1,23 \pm 0,16$ u.a., $P = 0,09$) post-stimulation, en comparaison aux cellules hypoxiques (4% O₂ ; non traitées) (**Figure 49A**). Au contraire, la supplémentation en BCAAs a provoqué une réduction de la forme phosphorylée de FoxO1, après 24h d'incubation ($0,74 \pm 0,03$ u.a., $P = 0,06$). Les cellules C2C12 traitées par réoxygénation n'ont présenté qu'une faible augmentation de la phosphorylation de FoxO1, que ce soit à 2h ($1,19 \pm 0,13$ u.a.) ou 24h ($1,15 \pm 0,13$ u.a.) post-traitement (**Figure 49A**). Parallèlement à son homologue FoxO1, la phosphorylation de la protéine FoxO3a sur sa sérine 294, augmente faiblement à la suite du traitement par réoxygénation à 2h ($1,16 \pm 0,1$ u.a.) et 24h ($1,12 \pm 0,07$ u.a.) après traitement (**Figure 49B**). Á l'opposé des données recueillies sur FoxO1, le traitement par stimulation électrique n'a engendré aucune variation de la phosphorylation de FoxO3a. En revanche, lorsque le milieu de culture des cellules C2C12 sous hypoxie a été supplémentation en BCAAs pendant une durée de 24h, cela a entraîné une hypo-phosphorylation de la protéine FoxO3a ($0,62 \pm 0,11$ u.a., $P < 0,05$) (**Figure 49B**).

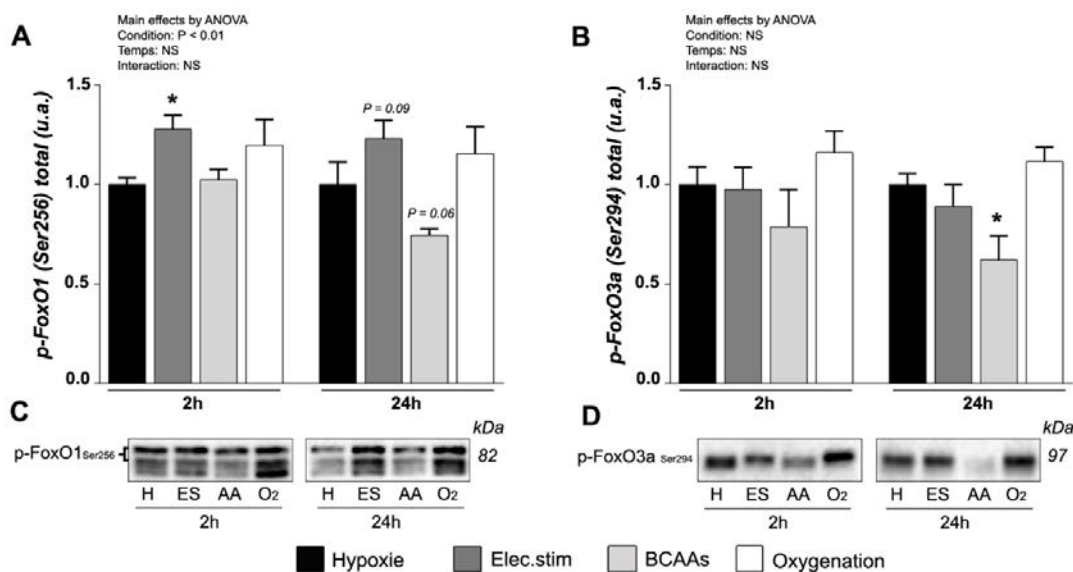


Figure 49 : Augmentation de la phosphorylation de FoxO des cellules C2C12 sous hypoxie à la suite d'un traitement par stimulation électrique. Le niveau de phosphorylation de FoxO1 et FoxO3a a été déterminé par Western blot dans des myotubes C2C12 sous hypoxie (4% O₂) (H) traités par stimulation électrique (ES), ou supplémentation en acides aminés (BCAAs) à une concentration de 5 mM (AA) ou par réoxygénation (2h, 21% O₂), l'analyse étant effectuée 2h et 24h post-traitement. A : Quantification de FoxO1 phosphorylé (Ser256) (n = 6). B : Quantification de FoxO3a phosphorylé (Ser294) (n = 10). C et D : Signaux représentatifs des protéines d'intérêt à 2h ou 24h après traitement. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂; non traitée) sont présentées par : * $P < 0,05$; les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique.

À la suite de l'application des différents traitements testés dans notre étude, l'analyse du ratio LC3 II / I, indiquant le degré de maturation de l'autophagosome, nous a révélé une augmentation de l'autophagie pour les cellules traitées par électrostimulation, 2h post-stimulation ($1,31 \pm 0,11$ u.a., $P < 0,05$), puis une réduction 24h après la fin de la stimulation électrique ($0,79 \pm 0,05$ u.a., 24h vs 2h, $P < 0,001$) (**Figure 50A**). Tout comme les cellules stimulées électriquement, la supplémentation en BCAAs des cellules C2C12 a entraîné une augmentation de l'expression de LC3 II ($1,32 \pm 0,14$ u.a., $P < 0,05$) 2h post-traitement, puis une diminution du ratio LC3 II / I suite à 24h de traitement par les BCAAs ($0,88 \pm 0,14$ u.a., 24h vs 2h, $P < 0,01$) (**Figure 50A**). Bien que nous ayons observé une diminution de l'activité de l'autophagie entre 2h et 24h post-stimulation électrique et post-incorporation des BCAAs, après 24h, les ratios LC3 II / I de chacune des contre-mesures testées était similaire au ratio des cellules en hypoxie (4% O₂; non-traitées) (**Figure 50A**). Nos données indiquent que ces deux conditions (stimulation électrique ou supplémentation en BCAAs) ont entraîné des effets parallèles sur les systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome. En effet, nous avons constaté une diminution des deux systèmes de dégradation entre les mesures réalisées 2h et 24h après traitement, pour les cellules supplémentées par BCAAs ($1,05 \pm 0,38$ u.a. vs $0,83 \pm 0,12$ u.a., à 2h et 24h respectivement, 24h vs 2h $P < 0,05$) ou stimulées électriquement ($1,05 \pm 0,22$ u.a. vs $0,87 \pm 0,13$ u.a., à 2h et 24h respectivement, 24h vs 2h $P = 0,08$) (**Figure 50B**). En opposition aux conditions stimulation électrique et supplémentation en BCAAs, le traitement par réoxygénation des cellules C2C12 sous hypoxie n'a entraîné aucun changement des deux systèmes de dégradation protéique mesurés, que ce soit par rapport aux cellules hypoxiques, ou à travers le temps pour cette même condition (24h vs 2h) (**Figure 50**).

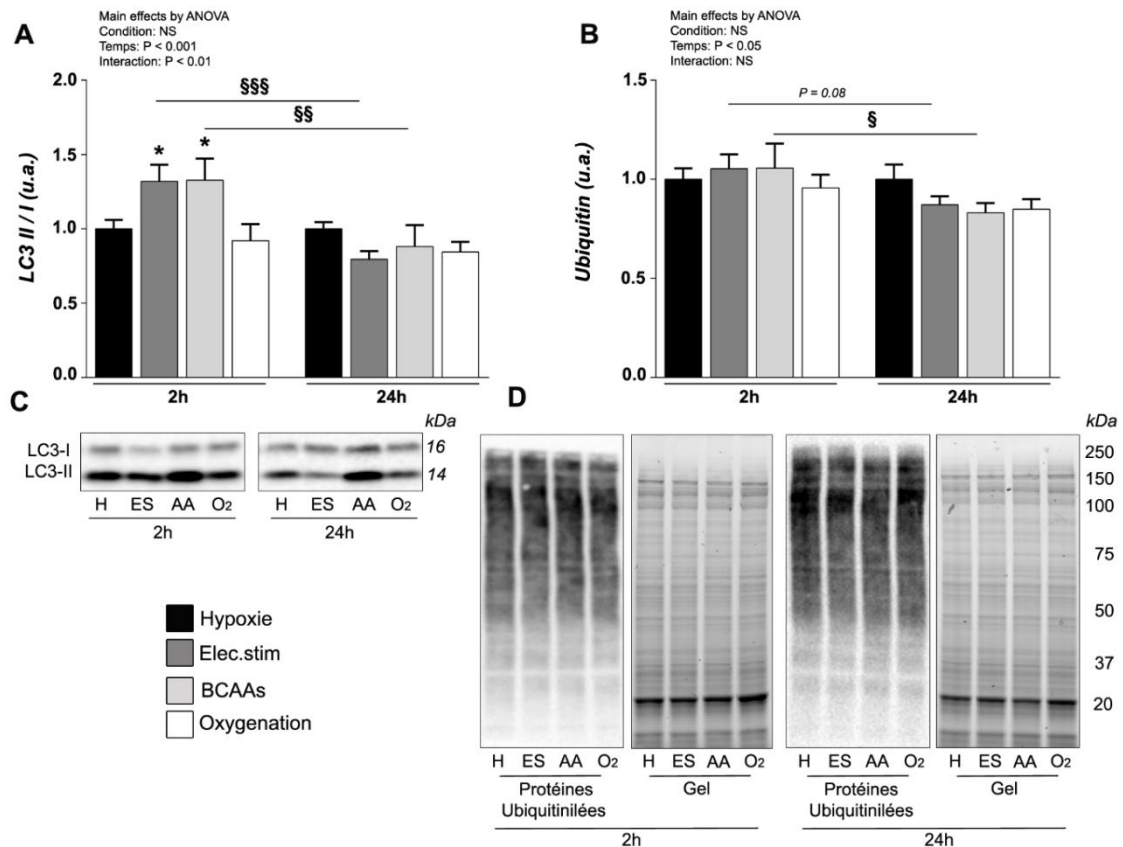


Figure 50 : Réduction des systèmes d'autophagie et d'ubiquitine-protéasome à travers le temps (2h et 24h) pour les cellules C2C12 traitées par stimulation électrique et supplémenté en BCAAs. Le niveau d'expression des systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome a été déterminé par Western blot dans des myotubes C2C12 sous hypoxie (4% O₂) (H) traités par stimulation électrique (ES), ou supplémentation en acides aminés (BCAAs) à une concentration de 5 mM (AA) ou par réoxygénation (2h, 21% O₂), l'analyse étant effectuée 2h et 24h post-traitement. A : Ratio des protéines LC3 II / LC3I. B : Quantification des protéines conjuguées à l'ubiquitine. C : Signaux représentatifs des protéines LC3 I et LC3II. D : Signaux représentatifs des gels et protéines ubiquitinées. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂; non traitée) sont présentées par : * P < 0,05. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 2h) sont présentées par : § P < 0,05, §§ P < 0,01, §§§ P < 0,001. Les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique (n = 10 par condition).

Nos données ont montré que seules les cellules C2C12 sous hypoxie ayant subi un traitement par stimulation électrique ont observé une hyper-phosphorylation de FoxO1, le rendant par conséquent inactif par sa séquestration dans le cytosol. De plus, les contractions répétées des myotubes, initiées par le programme de stimulation électrique, ont entraîné une augmentation de l'expression de LC3 II, peu de temps après la fin de la stimulation. Cependant, nous avons observé que les traitements par stimulation électrique ou par supplémentation en BCAAs ont entraîné tous deux une baisse d'activation des systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome à travers le temps (2h vs 24h). Contrairement aux protéines de la voie de synthèse Akt-mTOR, le traitement par réoxygénation n'a eu que peu d'effet sur les facteurs de transcription et voies de dégradation des protéines des cellules C2C12 sous hypoxie. Bien que l'on ait constaté une variabilité importante de réponse pour chacun des traitements, une analyse morphologique approfondie des myotubes permettrait de mettre en relation, voire confirmer, les données recueillies au niveau intracellulaire.

III.3. Effets de la stimulation électrique, de la supplémentation en BCAAs ou de la réoxygénation cellulaire sur la morphologie et la teneur en protéines des myotubes.

Avant d'exposer les effets de chacune des contre-mesures sur les différents paramètres qui composent notre analyse morphologique, nous allons tout d'abord analyser la condition hypoxie de notre étude, c'est-à-dire décrypter l'impact de l'hypoxie sur le degré de différenciation et de maturation des myotubes. L'analyse morphologique des myotubes C2C12 sous hypoxie a révélé une diminution de leur diamètre, d'autant plus importante que le temps d'incubation à 4% O₂ était de longue durée, avec une différence significative entre chaque jour de différenciation post-incubation : J5 ($18 \pm 0,28 \mu\text{m}$), J6 ($15,24 \pm 0,38 \mu\text{m}$, J6 vs J5, $P < 0,001$) et J7 ($10,94 \pm 0,36 \mu\text{m}$, J7 vs J6, $P < 0,001$) (**Figure 51B**). La densité des myotubes a également fortement été perturbée par l'hypoxie, comme le montre la diminution drastique du nombre de myotubes avec la durée d'exposition à l'hypoxie après 5 (J5 : $29,9 \pm 1,6$), 6 (J6 : $22,6 \pm 1,6$; J6 vs J5, $P < 0,01$) et 7 (J7 : $12,51 \pm 1,16$; J7 vs J6, $P < 0,01$) jours de différenciation (**Figure 51D**). Le degré de maturation des myotubes déterminé par l'index de fusion a montré également une diminution entre les jours J5 ($44,8 \pm 2,3 \%$) et J6 ($27,1 \pm 2 \%$, J6 vs J5, $P < 0,001$) de différenciation (**Figure 51C**). Ces données, additionnées aux résultats obtenus lors de notre première étude, confirment que l'induction d'une hypoxie physiologique normobarique de 4% O₂ altère dramatiquement la morphologie des myotubes C2C12, avec des signes d'atrophie musculaire similaires à ce que l'on peut observer dans un muscle *in vivo* soumis à une hypoxie aiguë ou chronique (de Theije et al., 2014 ; Sato et al., 1997).

En revanche, l'application de contre-mesures à l'atrophie telles que la stimulation électrique et la réoxygénation a permis tout d'abord de maintenir des valeurs de diamètre de myotubes très proches entre les jours J5 ($18,74 \pm 0,51 \mu\text{m}$ et $18,17 \pm 0,43 \mu\text{m}$, stimulation électrique et réoxygénation, respectivement) et J6 ($18,1 \pm 0,39 \mu\text{m}$ et $17,56 \pm 0,63 \mu\text{m}$, stimulation électrique et réoxygénation, respectivement) de différenciation. De plus, le diamètre des myotubes soumis à ces deux traitements est supérieur aux cellules hypoxiques (4% O₂), que ce soit à 24h ($P < 0,01$) ou 48h ($P < 0,001$) post-traitement (**Figure 51B**). En comparaison aux deux conditions précédemment citées, les cellules traitées par supplémentation en BCAAs présentent un diamètre plus élevé comparativement aux cellules hypoxiques, uniquement 48h post-administration ($12,34 \pm 0,75 \mu\text{m}$, $P < 0,05$) (**Figure 51B**). En terme de densité des myotubes, nous avons constaté que la conditions hypoxie (4% O₂; non traitées) et la condition supplémentation en BCAAs ont présenté une diminution similaire du nombre de myotubes au cours du temps, que ce soit à 24h (J6 vs J5, $P < 0,01$) ou à 48h (J7 vs J6, $P < 0,01$) post-traitement (**Figure 51D**). Seuls les traitements par stimulation électrique ou par réoxygénation ont permis aux cellules C2C12 sous hypoxie de limiter une perte de myotubes au cours du temps (J6 vs J5 et J7 vs J6, $P = \text{n.s.}$), avec un nombre de myotubes par image supérieur à la condition hypoxie seule, 48h post-stimulation pour le traitement par stimulation électrique ($P < 0,05$), ou à 24h et 48h post-induction pour le traitement par réoxygénation ($P < 0,01$) (**Figure 51D**).

Il est intéressant de noter que seules les cellules ayant été traitées par réoxygénation ont permis de maintenir un index de fusion myogénique sensiblement proche entre les temps 2h ($45,7 \pm 4,55\%$) et 24h ($44,76 \pm 4,62\%$) (**Figure 51C**), tandis que l'ensemble des autres conditions ont observé une réduction du pourcentage de fusion entre ces deux temps (2h et 24h post-traitements) ($P < 0,01$). La stimulation électrique et la réoxygénation sont les deux conditions permettant de maintenir un index de fusion significativement supérieur par rapport à la condition hypoxie (4% O₂; non traité) ($P < 0,01$), 24h post-application, tandis que la réoxygénation est l'unique traitement ayant conduit à un

pourcentage de fusion des myotubes plus élevé ($34,66 \pm 1,7\%$, $P < 0,05$) que celui des cellules en hypoxie seule ($26,54 \pm 3,1\%$), 48h post-induction (**Figure 51C**). Concernant le nombre de noyaux par myotube, les données coïncident avec celles mesurées pour l'index de fusion après 24h de traitement, avec un nombre de noyaux dans les myotubes plus importants pour les traitements par stimulation électrique ou par réoxygénation des cellules C2C12, 24h post-traitement (**Figure 51E**).

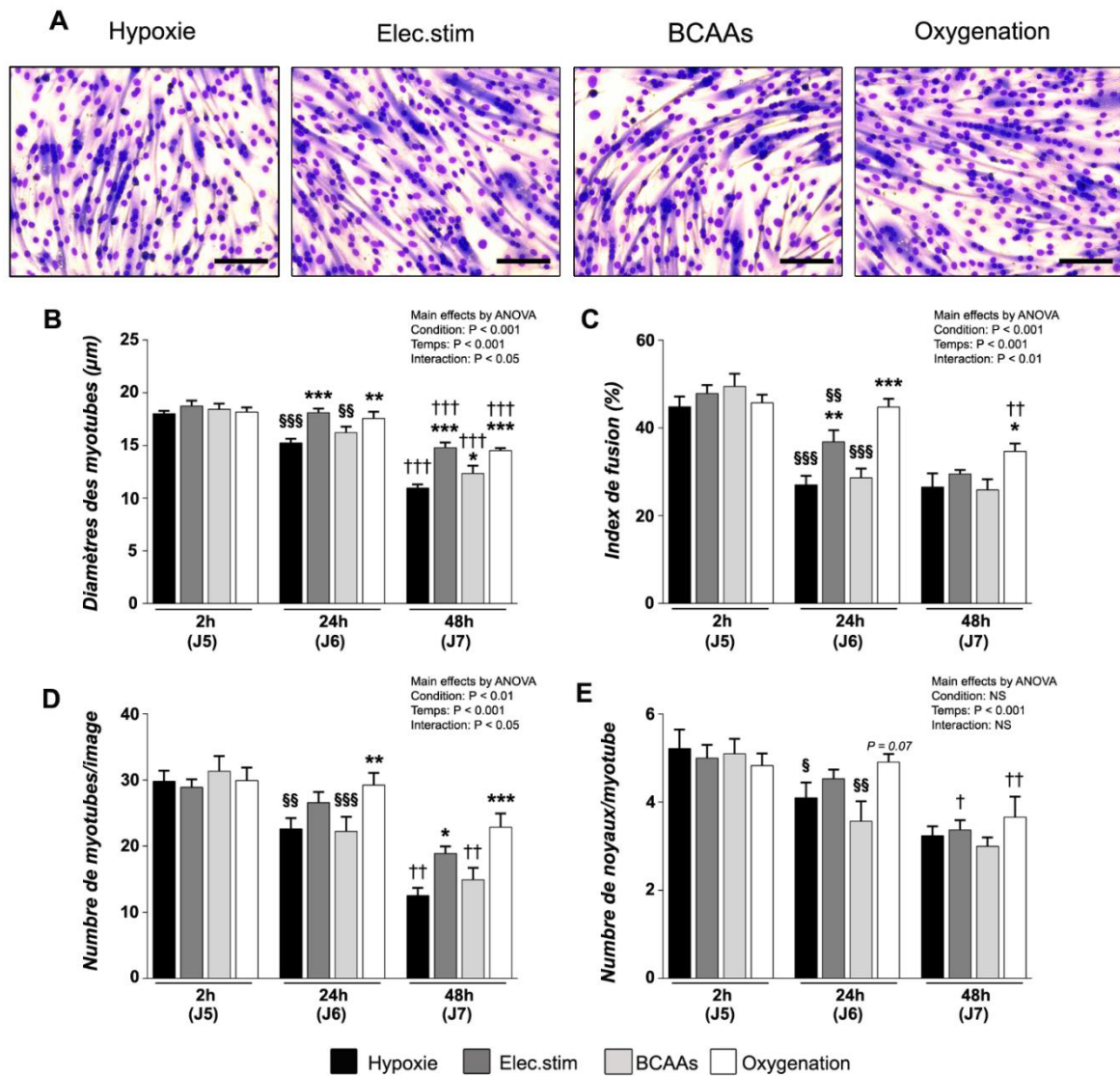


Figure 51 : Limitation de l'atrophie des myotubes C2C12 sous hypoxie à la suite des traitements par stimulation électrique et réoxygénation cellulaire. A : Images représentatives des myotubes C2C12 sous hypoxie ($4\% \text{ O}_2$) (H) ou traités par stimulation électrique (ES), supplémentés en acides aminés (BCAAs) à une concentration de 5 mM ou traités par réoxygénation ($21\% \text{ O}_2$) (O_2) 48h après traitement. Les images ont été acquises à un agrandissement $\times 20$. Barre d'échelle = $100 \mu\text{m}$. B : Mesure du diamètre des myotubes à 2h, 24h et 48h post-traitement, exprimé en μm . C : Analyse de l'index de fusion des myotubes en culture, exprimé en pourcentage. D : Analyse du nombre de myotubes par image. E : Analyse du nombre de noyaux par myotube. J : jour de différenciation des myotubes. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie ($4\% \text{ O}_2$; non traitée) sont présentées par : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 2h) sont présentées par : § $P < 0,05$, §§ $P < 0,01$, §§§ $P < 0,001$. 48h vs 24h : † $P < 0,05$, †† $P < 0,01$, ††† $P < 0,001$ ($n = 6$ par condition).

La mesure de la teneur en protéines totales de chaque condition de notre étude nous permet de soutenir et renforcer les données obtenues par l'analyse morphologique des myotubes. Parallèlement à la mesure du diamètre et de la densité des myotubes, nous avons observé une quantité de protéines sensiblement similaire tout au long des différents temps de mesures réalisés dans notre étude, pour chaque traitement respectif, stimulation électrique ($0,36 \pm 0,01$; $0,29 \pm 0,01$ et $0,28 \pm 0,06$ mg ; à 2h, 24h et 48h post-stimulation, respectivement) ou réoxygénation ($0,35 \pm 0,02$; $0,27 \pm 0,01$ et $0,27 \pm 0,09$ mg ; à 2h, 24h et 48h post-induction, respectivement) (**Figure 52**). Au contraire, la supplémentation en BCAAs n'a pu empêcher l'importante perte du contenu protéique, 2h ($0,36 \pm 0,01$ mg) et 24h ($0,14 \pm 0,01$ mg, 24h vs 2h, $P < 0,001$) post-administration (**Figure 52**). De plus, à l'instar de la supplémentation par BCAAs, les cellules C2C12 sous hypoxie traitées par stimulation électrique ou par une période de réoxygénation, ont montré des niveaux de protéines supérieurs à celui des cellules hypoxiques, à 24h ($P < 0,05$) et 48h ($P < 0,05$) post-application (**Figure 52**).

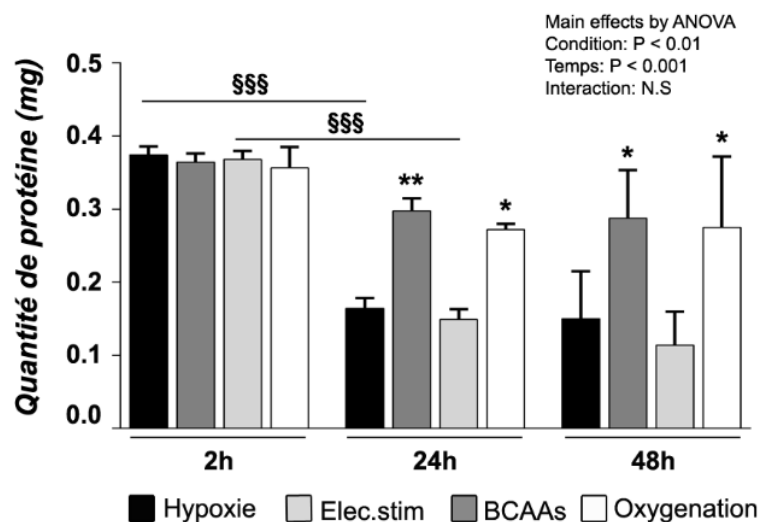


Figure 52 : La teneur totale en protéines est plus élevée pour les myotubes C2C12 sous hypoxie traités par stimulation électrique ou par réoxygénation jusqu'à 48h après traitement. La teneur totale en protéines a été déterminée dans les myotubes C2C12 sous hypoxie non traités (H) ou traités par stimulation électrique (ES), acides aminés (BCAAs) ou réoxygénation (O₂) 2h, 24h et 48h post-traitements. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂; non traitée) sont présentées par : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 2h) sont présentées par : §§§ $P < 0,001$ (n = 10 par condition).

Les données de l'analyse morphologique nous ont révélé que les traitements par stimulation électrique et par réoxygénation des cellules C2C12 sous hypoxie (4% O₂) ont entraîné une limitation des effets négatifs sur la morphologie des myotubes résultant de la réduction du niveau d'oxygène (4% O₂). Ces deux contre-mesures ont permis de conserver un état de maturation (diamètre et densité des myotubes) et de différenciation (index de fusion) à travers le temps, c'est-à-dire entre les différents moments de mesure de notre étude (24h et 48h post-traitement). Quels que soient les critères mesurés lors de notre analyse morphologique, le traitement des cellules C2C12 sous hypoxie par supplémentation en BCAAs n'a pu maintenir des valeurs de maturation et de différenciation des myotubes similaires aux conditions stimulation électrique et supplémentation en BCAAs. De plus, la mesure de la teneur en protéines cellulaires nous a révélé une importante diminution de la quantité de protéines des cellules musculaires sous hypoxie non-traitées ou supplémentées en BCAAs. De même

que les données morphologiques, la stimulation électrique et la réoxygénation cellulaires ont permis de maintenir une quantité de protéines très proche entre la première (2h) et la dernière (48h) mesures réalisées lors de notre étude.

IV. Conclusion de l'étude II

Cette étude sur l'analyse et la comparaison des contre-mesures à l'atrophie telles que la stimulation mécanique, la supplémentation nutritionnelle ou l'oxygénation cellulaire, nous a permis de démontrer qu'une période de réoxygénation des myotubes C2C12 sous hypoxie conduisait à l'activation ou la réactivation de l'une des voies principales de la protéosynthèse, la voie Akt-mTOR, par l'hyperphosphorylation des protéines clés telles que Akt, GSK-3 β , et tout particulièrement 4E-BP1 et P70S6K. La limitation de l'atrophie des myotubes révélée par les différents paramètres de l'analyse morphologique, comme le diamètre des myotubes et l'index de fusion myogénique, ont révélé qu'une période de réoxygénation a pour effet de conserver un taux de maturité et un degré de différenciation des myotubes bien au-dessus des cellules hypoxiques non traitées. De plus, la conservation de la teneur en protéines jusqu'à 48h après traitement, nous permet de confirmer les effets bénéfiques de l'oxygénothérapie sur des cellules musculaires squelettiques atrophiées à la suite d'un stress hypoxique. En revanche, nous n'avons observé aucun impact significatif d'un traitement par réoxygénation sur les différentes voies cataboliques considérées dans notre étude (autophagie et ubiquitine-protéasome). À l'inverse, la stimulation électrique a été l'unique traitement impactant à la fois les protéines régulatrices des voies de dégradation (FoxO1, LC3 et les protéines ubiquitinées) et la voie de synthèse des protéines Akt-mTOR (Akt et GSK-3 β). Tout comme le traitement par réoxygénation, la stimulation électrique des myotubes C2C12 sous hypoxie a permis de maintenir un niveau de maturité morphologique et une teneur en protéines des myotubes bien plus élevés que les myotubes non-traités. À l'opposé, la supplémentation par BCAAs a été le traitement ayant eu le moins d'effets significatifs parmi les trois contre-mesures testées dans cette étude, bien que les BCAAs aient permis une activation de la protéine Akt, une réduction des systèmes d'autophagie et d'ubiquitine-protéasome à travers le temps, entre 2h et 24h post-traitement. Ces changements au niveau intracellulaire n'ont eu que très peu de répercussion sur la morphologie et la teneur en protéines des myotubes supplémentés en BCAAs, avec des valeurs très proches de celles des cellules C2C12 sous hypoxie et non traitées.

Cette seconde étude a permis de mettre en évidence les caractéristiques anabolisantes d'un traitement tel que la réoxygénation de cellules musculaires squelettiques sous hypoxie. Outre l'impact exclusif et significatif de la réoxygénation sur la voie de synthèse des protéines Akt / mTOR (4E-BP1 et P70S6K), les données de l'analyse morphologique des myotubes semblables, voir supérieures au traitement par stimulation électrique, montre bien l'intérêt réel et le regard nouveau que la communauté scientifique et le corps médical devraient porter sur la supplémentation en oxygène dans l'élaboration de nouveaux traitements et programmes thérapeutiques dans la prise en charge de l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie musculaire, observée chez des patients atteints de pathologies respiratoires et souffrant d'hypoxémie sévères et chronique.

Etude III : Effets additionnels de la stimulation mécanique, de la supplémentation en acides aminés et d'une période d'oxygénation vis-à-vis de l'atrophie des myotubes induite par l'hypoxie.

I. Contexte et objectif

Les programmes de réhabilitation de personnes souffrant de BPCO, focalisés sur la perte de masse musculaire des patients, sont pour la grande majorité centrés sur l'emploi d'une unique stratégie thérapeutique, notamment : l'activité physique dans les programmes de réentraînement à l'effort ; la supplémentation nutritionnelle en glucides et protéines pour les sujets souffrant de dénutrition ou de fonte musculaire importante ; ou l'oxygénothérapie pour les sujets atteints d'hypoxémie sévère. L'utilisation de ces traitements de manière isolée n'entraîne que peu d'effet sur les paramètres physiologiques perturbés lors d'un stress hypoxique et symptômes ou complications métaboliques provoqués par les atteintes respiratoires. En plus d'engendrer des adaptations physiologiques fortement dépendantes de la nature de l'intervention, de nombreuses études ont observé une disparité marquée dans les améliorations et adaptations aux traitements en fonction du stade de sévérité de la pathologie mais aussi du niveau d'atrophie musculaire des patients. En particulier, certains sujets arrivés à un stade sévère de la pathologie associé à des symptômes de cachexie ne montrent aucune réponse face à ces traitements. Dans la littérature scientifique, il n'existe qu'un nombre très limité de recherches faisant mention d'une combinaison de plusieurs traitements ayant pour but de contrecarrer l'atrophie musculaire consécutive à des pathologies respiratoires. Des co-traitements résultant de la combinaison d'un programme de réentraînement en force additionné à une supplémentation riche en protéines (programme emprunté au domaine de la performance sportive) apportent certes des améliorations significatives du nombre et du volume des fibres musculaires, mais uniquement chez les sujets souffrant de BPCO de type non hypoxémique. Ainsi, il n'existe à ce jour aucune réelle stratégie thérapeutique apportant une réponse efficace pour limiter ou réverser l'atrophie musculaire observée chez les patients souffrant d'une hypoxémie musculaire.

Les résultats observés dans notre seconde étude montrent qu'une période de réoxygénation de cellules musculaires squelettiques atrophiées par l'hypoxie entraîne la réactivation de l'une des voies de signalisation majeure de l'hypertrophie musculaire (Akt / mTOR) ; cela nous laisse à penser que l'oxygénothérapie pourrait être une piste sérieuse et envisageable dans la lutte de l'atrophie musculaire de personnes souffrant d'hypoxémie chronique et sévère. Nous faisons l'hypothèse que la combinaison de plusieurs traitements contre l'atrophie musculaire, tels que la stimulation mécanique, la supplémentation nutritionnelle riche en protéines et notamment la réoxygénation musculaire, seraient à même de contrecarrer efficacement l'atrophie musculaire consécutive à un stress hypoxique sévère et prolongé. L'association de chacun des traitements permettrait de potentialiser les réponses anaboliques au détriment des voies cataboliques exacerbées lors de phase d'hypoxie, et responsables de l'atrophie musculaire. Par conséquent, l'objectif de cette troisième étude est d'analyser et comparer les effets moléculaires (par l'analyse de protéines clés de l'homéostasie protéique) et morphologiques (par l'analyse de l'index de fusion, du diamètre et de la densité des myotubes) de cellules musculaires squelettiques C2C12 mises en culture sous hypoxie, soumises à plusieurs combinaisons de traitements associant la stimulation électrique, la supplémentation en acide aminés et/ou une période de réoxygénation.

II. Protocole de l'étude

Au 4^{ème} jour de différenciation cellulaire, les myotubes initialement en culture dans un milieu dit de normoxie (21% O₂) ont été transférés à l'intérieur d'une chambre à hypoxie (4% O₂), et y ont été maintenus jusqu'à la fin du protocole d'étude (**Figure 53**). Après 24h d'hypoxie, c'est-à-dire au cinquième jour de différenciation, nous avons appliqué aux cellules C2C12 sous hypoxie différentes combinaisons de traitements : (i) non traitées (hypoxie 4% O₂) ; (ii) stimulation électrique (SE) ; (iii) stimulation électrique + supplémentation en BCAAs (SE + BCAAs) ; (iv) stimulation électrique + réoxygénation (SE + O₂) ; et enfin (v) stimulation électrique + BCAAs + réoxygénation (SE + BCAAs + O₂). La stimulation électrique des cellules musculaires C1C12 a été appliquée par l'intermédiaire d'un électro-stimulateur, avec un programme de stimulation identique à celui utilisé dans notre seconde étude, soit une intensité de stimulation de 30 V, une fréquence de 1 Hz, une durée de contraction de 3ms, sur une durée totale de 60 minutes. À noter qu'avant et après chaque stimulation électrique, le milieu de culture est changé. Pour les conditions (SE + BCAAs) et (SE + BCAAs + O₂), le milieu de culture a été enrichi par un mélange de BCAAs (leucine, isoleucine et valine) à une concentration de 5mM, immédiatement après la fin du programme de stimulation électrique. Pour les conditions (SE + O₂) et (SE + BCAAs + O₂), les cellules C2C12 préalablement exposées dans la chambre à hypoxie durant 24h à 4% O₂ sont rapidement transférées dans un environnement dit de normoxie au sein de l'incubateur principal, à un taux d'oxygène de 21% O₂, sur une durée de 120 min. À la fin de cette période de réoxygénation cellulaire, les cellules sont replacées dans la chambre à hypoxique (4% O₂) jusqu'à la fin du protocole (**Figure 53**).

Mesures et temps d'analyses

L'analyse moléculaire a été réalisée 2h et 24h après la fin de la période de la stimulation électrique (60 min) et de la réoxygénation (120 min). L'état de phosphorylation et/ou de l'expression des protéines de la voie de synthèse PI3K / Akt / mTOR (Akt ; mTOR ; 4E-BP1 ; P70S6K ; GSK-3 β) et des voies de dégradation des protéines (FoxO1 ; FoxO3a ; LC3 ; protéines ubiquitinées) ont été quantifiés par la technique du Western blot. Nous avons également, par le biais d'un marquage des myotubes au May-Grünwald-Giemsa, analysé l'état de maturation et de différenciation des myotubes à 2h (J5), 24h (J6) et 48h (J7) après application des différents traitements (**Figure 53**).

Analyses statistiques

L'ensemble des traitements ont été effectués au moins en triplicatas biologiques ou en quadruplicatas provenant de 2 ou 3 cultures indépendantes. Toutes les données sont présentées en moyenne \pm SEM. Un test de normalité (Shapiro-Wilk test) a été réalisé sur l'ensemble des données. Les effets des différentes conditions (i, ii, iii, iv et v) et les durées (24h vs 2h et 48h vs 24h) ont été testés par ANOVA à deux voies (conditions et temps). Si des effets principaux et/ou des interactions significatifs étaient observés avec l'ANOVA, des tests post-hoc multi-rangs de Fisher ont été appliqués pour examiner des différences pour chaque paire spécifique. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque $P < 0,05$. Les statistiques ont été calculées à l'aide du logiciel Statistica 8.0.

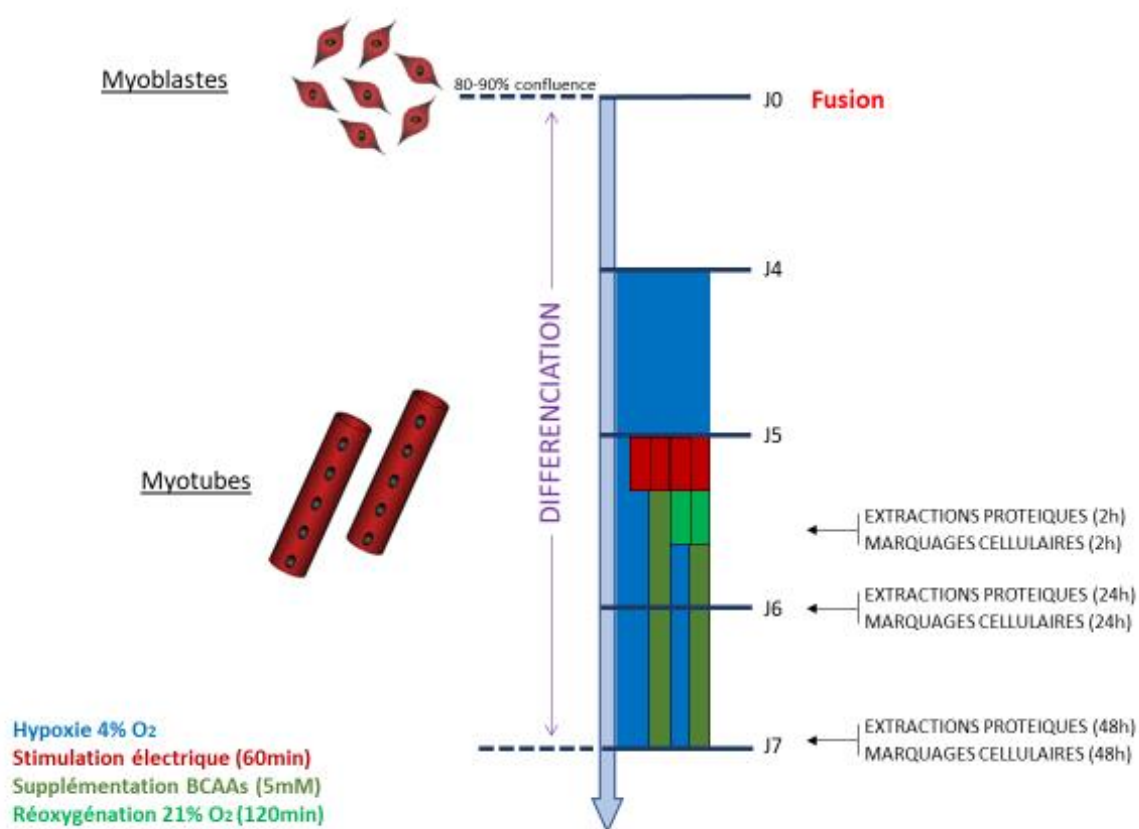


Figure 53 : Représentation schématique des différentes conditions et combinaisons de traitement appliquées aux cellules C2C12 sous hypoxie. J : jour de différenciation des myotubes, % : taux d'oxygène administré aux cellules musculaires C2C12 différenciées en myotubes.

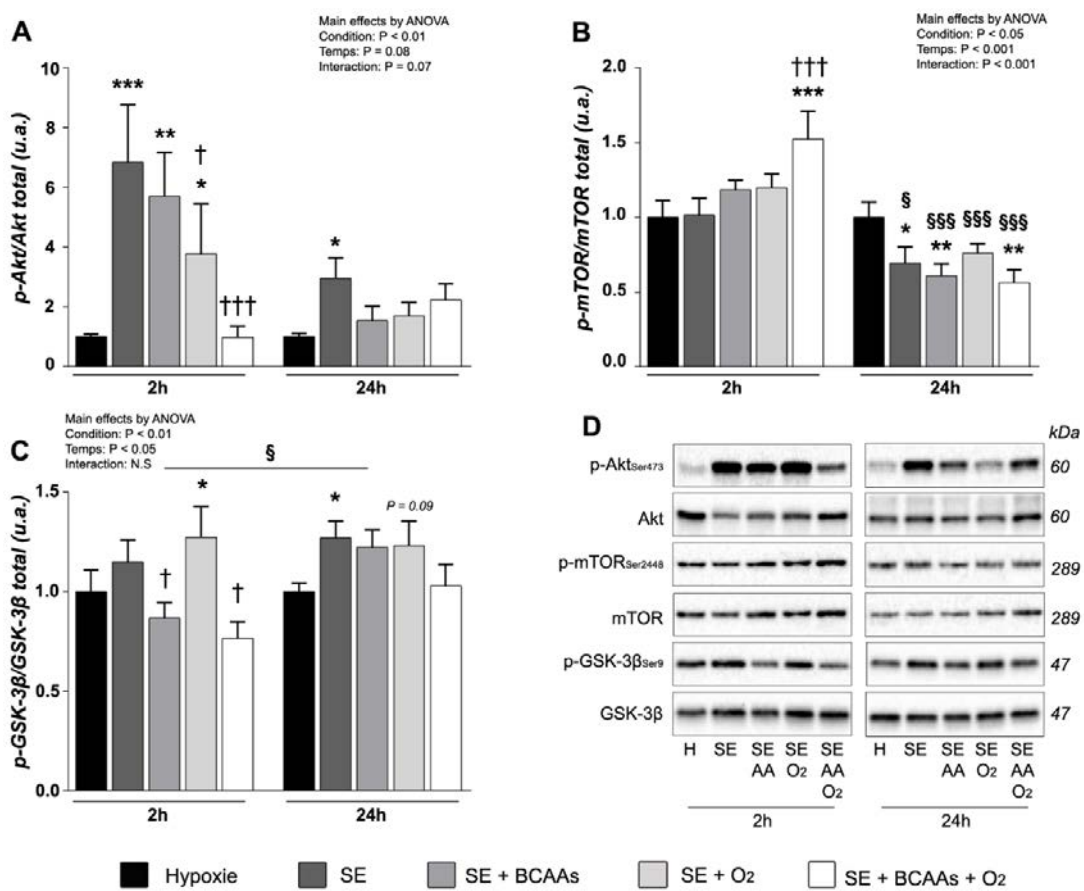
III. Résultats

III.1. Effets de l'association des contre-mesures à l'atrophie musculaire (stimulation électrique, supplémentation en BCAAs et réoxygénation) consécutive à l'hypoxie, sur la voie de signalisation Akt-mTOR.

La quantification de la protéine Akt, 2h post-traitement, a révélé que la majorité des conditions ont conduit à une hyper-phosphorylation d'Akt en comparaison aux cellules sous hypoxie et non traitées, notamment SE ($6,83 \pm 1,92$ u.a., $P < 0,001$), SE + BCAAs ($5,69 \pm 1,46$ u.a., $P < 0,01$) et SE + O₂ ($3,76 \pm 1,68$ u.a., $P < 0,05$). En revanche, la combinaison des trois contre-mesures (SE + BCAAs + O₂) n'a entraîné aucune variation du ratio p-Akt / Akt. Parmi les traitements ayant entraîné une activation d'Akt, seuls les effets résultant du traitement par stimulation électrique seule (SE) ont persisté 24h post-stimulation ($2,94 \pm 0,68$ u.a., $P < 0,05$) par rapport à la condition hypoxie (4% O₂ ; non traitée) (**Figure 54A**). Contrairement à ce qui a été observé pour la protéine Akt, la condition associant l'ensemble des contre-mesures (SE + BCAAs + O₂) a été l'unique traitement entraînant une augmentation de la phosphorylation de mTOR ($1,52 \pm 0,18$ u.a.), et ce en comparaison aux cellules sous hypoxie non traitées ($P < 0,001$) et cellules traitées par stimulation électrique seule ($P < 0,01$). Il a été observé, 24h après traitement, une importante diminution du ratio p-mTOR / mTOR de l'ensemble

des conditions testées, par rapport aux données analysées 2h post-traitement (24h vs 2h, $P < 0,05$). De plus, on peut noter une réduction du niveau de phosphorylation de mTOR pour les conditions ES (0,69 ± 0,1 u.a., $P < 0,05$), ES + BCAAs (0,6 ± 0,07 u.a., $P < 0,01$) et ES + BCAAs + O₂ (0,56 ± 0,08 u.a., $P < 0,01$) par rapport à la condition hypoxie (Figure 54B). Concernant l'état activation de la protéine GSK-3β, l'une des cibles en aval de Akt, seules les cellules C2C12 traitées par ES + O₂ (1,27 ± 0,15 u.a., $P < 0,05$) ont provoqué, 2h post-traitement, une hyper-phosphorylation de GSK-3β comparativement aux cellules C2C12 sous hypoxie et non traitées. Toujours 2h post-traitement, la comparaison des traitements combinés avec la condition stimulation électrique seule a révélé une diminution du ratio p-GSK-3β / GSK-3β pour les traitements associant la stimulation électrique à une supplémentation en BCAAs (SE + BCAAs ; SE + BCAAs + O₂) ($P < 0,05$). Au-delà de 24h de traitement, seul le traitement par stimulation électrique (SE) a entraîné une suractivation de GSK-3β (1,27 ± 0,08 u.a., $P < 0,05$) par rapport à la condition hypoxie (4% O₂ ; non-traitée) (Figure 54C).

Figure 54 : Impact des différentes combinaisons de contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à



l'hypoxie sur la voie de synthèse Akt-mTOR dans des cellules C2C12 sous hypoxie. Le niveau d'activation de la voie de signalisation Akt-mTOR a été déterminé par Western blot sur des myotubes C2C12 sous hypoxie (4% O₂) non traitées (H) ; traitées par stimulation électrique (SE) ; stimulation électrique + supplémentation en BCAAs (SE + AA) ; stimulation électrique + réoxygénation (SE + O₂) ; et enfin stimulation électrique + BCAAs + réoxygénation (SE + AA + O₂), l'analyse étant effectuée 2h et 24h post-traitement. A : Ratio Phospho^{Ser473} Akt / Akt total. B : Ratio Phospho^{Ser2441} mTOR / mTOR total. C : Ratio Phospho^{Ser9} GSK-3β / GSK-3β total. D : Signaux représentatifs des protéines d'intérêt 2h ou 24h après traitement. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂ ; non traitée) sont présentées par : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique. Les différences par rapport à la condition stimulation électrique (SE) sont présentées par : † $P < 0,05$; †† $P < 0,01$. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 2h) sont présentées par : § $P < 0,05$, §§§ $P < 0,001$ (n = 10 par condition).

Après 24h de traitement, l'analyse de la protéine 4E-BP1 a montré une hyper-phosphorylation des cellules C2C12 sous hypoxie traitées par l'ensemble des conditions combinant au moins deux contre-mesures : SE + BCAAs ($1,61 \pm 0,13$ u.a.), SE + O₂ ($1,92 \pm 0,07$ u.a.), SE + BCAAs + O₂ ($1,83 \pm 0,1$ u.a.). Cette augmentation du niveau de phosphorylation a été observé à la fois sur les cellules sous hypoxie (4% O₂) non traitées ($P < 0,001$) et sur les cellules traitées par stimulation électrique seule ($0,99 \pm 0,16$ u.a., $P < 0,001$), et également aux valeurs analysées 2h post-traitement (24h vs 2h, $P < 0,01$) (**Figure 55**). La protéine P70S6K, second effecteur de mTOR mesuré dans notre analyse moléculaire de la voie Akt-mTOR, n'a observé aucune variation significative de son niveau de phosphorylation pour l'ensemble des conditions testées, et ce quels que soient les temps de mesures utilisés dans notre protocole (2h et 24h). Nous pouvons toutefois noter que les cellules C2C12 ayant été traitées par la condition combinant stimulation électrique et réoxygénation ont observé une élévation du ratio p-P70S6K / P70S6K après 24h, en comparaison aux cellules traitées par la même condition 2h post-traitement (24h vs 2h, $P < 0,05$) (**Figure 55**).

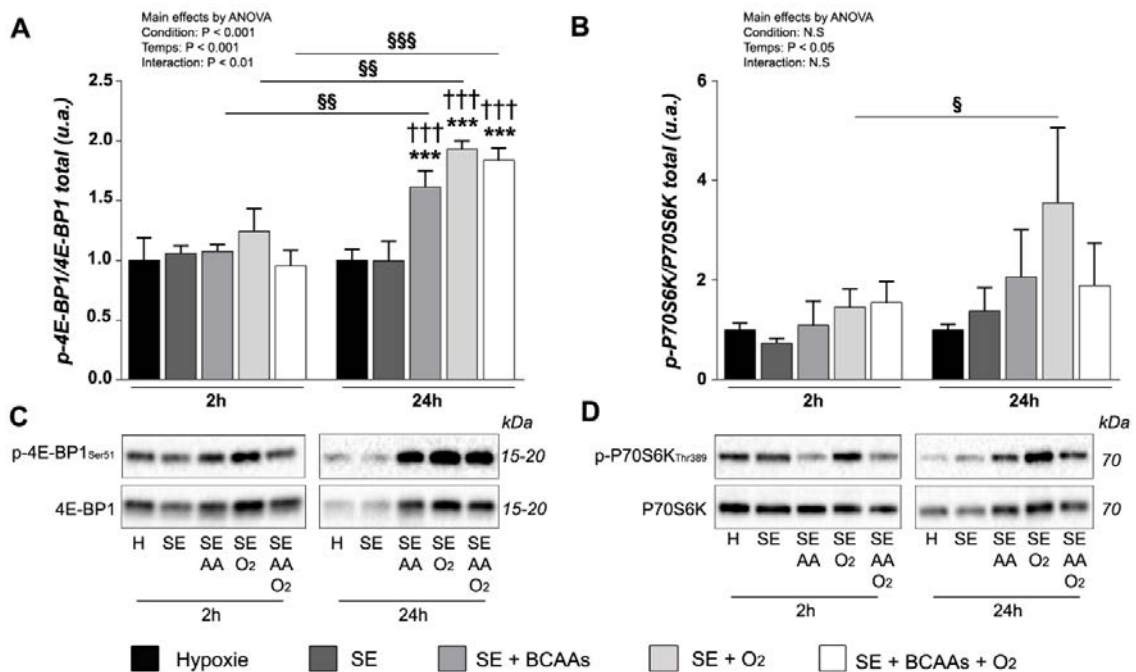


Figure 55 : Effets des différentes combinaisons de contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie sur les effecteurs de mTOR (4E-BP1 et P70S6K). Le niveau d'activation de 4E-BP1 et de P70S6K a été déterminé par Western blot sur des myotubes C2C12 sous hypoxie (4% O₂) non traitées (H) ; traitées par stimulation électrique (SE) ; stimulation électrique + supplémentation en BCAAs (SE + AA) ; stimulation électrique + réoxygénation (SE + O₂) ; et enfin stimulation électrique + BCAAs + réoxygénation (SE + AA + O₂). A : Ratio Phospho^{Ser51} 4E-BP1 / 4E-BP1 total (n = 6). B : Ratio Phospho^{Thr389} P70S6K / P70S6K total (n = 10). C et D : Signaux représentatifs des protéines d'intérêt à 2h ou 24h après traitement. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂; non traitée) sont présentées par : *** $P < 0,001$. Les différences par rapport à la condition stimulation électrique (SE) sont présentés par : ††† $P < 0,001$. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 2h) sont présentées par : § $P < 0,05$, §§ $P < 0,01$, §§§ $P < 0,001$.

Cette première phase d'analyse moléculaire nous indique que les traitements combinant plusieurs contre-mesures semblent avoir plus d'impact sur les protéines clés de la voie Akt / mTOR, fait observé lors de l'analyse de la protéine 4E-BP1 pour laquelle l'ensemble des traitements combinés ont entraîné une augmentation significative de la phosphorylation, en comparaison aux cellules C2C12 traitées par la stimulation électrique seule. De plus, l'association des trois contre-mesures en un seul traitements

(SE + BCAAs + O₂), a été l'unique condition à entraîner une suractivation de la protéine mTOR comparativement aux cellules musculaires sous hypoxie non traitées ou traitées par stimulation électrique seule, même si la condition stimulation électrique a entraîné la plus forte activation de Akt avec le maintien d'un niveau de phosphorylation d'Akt élevé 24h post-stimulation. L'association de plusieurs contre-mesures sur des cellules musculaires squelettiques sous hypoxie semble donc avoir un impact plus important sur les protéines se positionnant en aval de Akt dans la voie de protéosynthèse Akt / mTOR.

III.2. Effets de l'association des contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie sur les facteurs de transcription FoxOs et les systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome.

Les traitements des myotubes C2C12 sous hypoxie traités par stimulation électrique seule (SE) ($1,2 \pm 0,08$ u.a.) et par la combinaison d'une période de réoxygénation post-stimulation électrique (SE + O₂) ($1,16 \pm 0,02$ u.a.) ont été les seules conditions ayant entraîné une augmentation de la phosphorylation de FoxO1 sur sa sérine 256 2h post-traitement ($P < 0,05$), en comparaison à la condition hypoxie (4% O₂; non traitées) (**Figure 56A**). Après 24h de traitement, nos données ont montré une hypo-phosphorylation de FoxO1 dans les cellules C2C12 sous hypoxie traitées par l'ensemble des conditions associant au moins deux contre-mesures : SE + BCAAs ($0,85 \pm 0,06$ u.a., $P < 0,05$), SE + O₂ ($0,84 \pm 0,07$ u.a., $P < 0,05$), SE + BCAAs + O₂ ($0,69 \pm 0,04$ u.a., $P < 0,001$), par rapport aux cellules sous hypoxie non traitées. De plus, ces mêmes conditions ont observé une baisse significative du niveau de phosphorylation au cours du temps (24h vs 2h, $P < 0,01$) (**Figure 56A**). Contrairement à son homologue FoxO1, le facteur de transcription FoxO3a n'a subi aucune variation significative de son ratio p-FoxO3a / FoxO3a (**Figure 56B**).

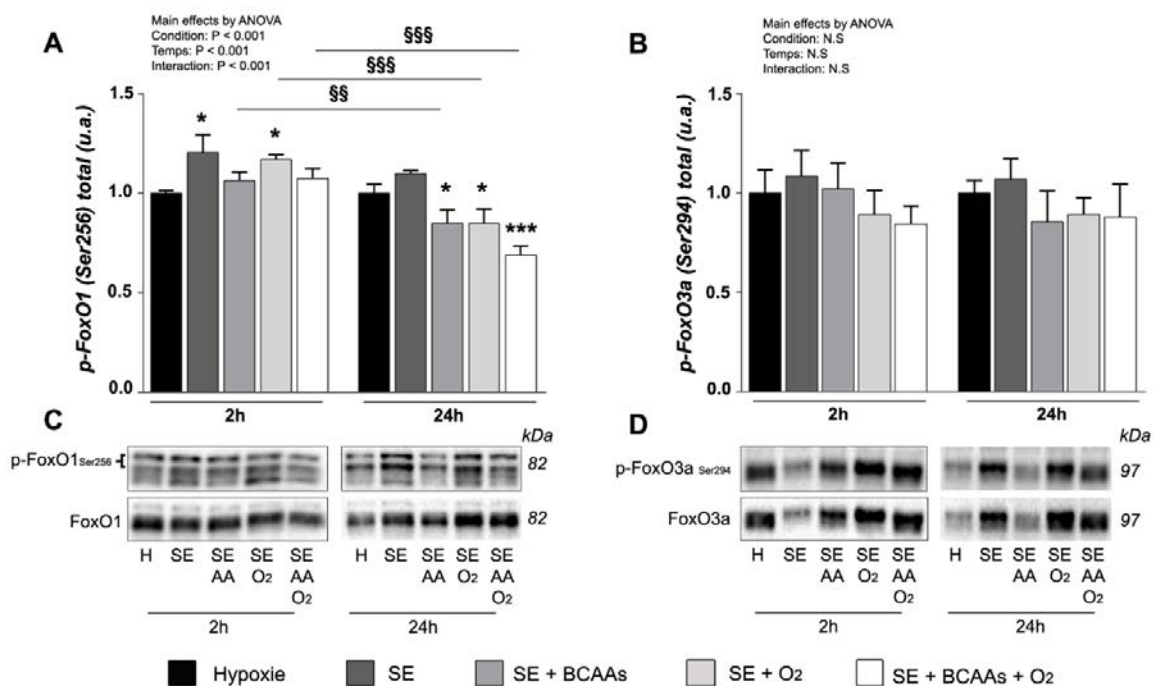


Figure 56 : Augmentation de la phosphorylation de FoxO des cellules C2C12 sous hypoxie à la suite d'un traitement par stimulation électrique seul. Le niveau de phosphorylation de FoxO1 et FoxO3a a été déterminé par Western blot dans des myotubes C2C12 sous hypoxie (4% O₂) (H) ; traitées (H) ; traitées par stimulation électrique (SE) ; stimulation électrique + supplémentation en BCAAs (SE + AA) ; stimulation électrique + réoxygénation (SE + O₂) ; et enfin stimulation électrique + BCAAs + réoxygénation (SE + AA + O₂). A : Ratio Phospho^{Ser256} FoxO1 / Foxo1, (n = 6). B : Ratio Phospho^{Ser294} FoxO3a / Foxo3, (n = 10). C et D : Signaux représentatifs des protéines d'intérêt à 2h ou 24h après traitement. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂; non traitée) sont présentées par : * P < 0,05 ; *** P < 0,001. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 2h) sont présentées par : §§ P < 0,01, §§§ P < 0.001.

À la suite de l'application des différents traitements testés dans notre étude, l'analyse du ratio LC3-II / LC3-I nous a révélé une augmentation de l'autophagie pour les cellules traitées par stimulation électrique seule (SE) (1,32 ± 0,15 u.a.) ou associée à une supplémentation en BCAAs (SE + BCAAs) (1,21 ± 0,15 u.a.) 2h post-stimulation (P < 0,05), suivie d'une réduction 24h post-traitement (24h vs 2h, P < 0,01) (**Figure 57A**). Par ailleurs, 24h après traitement, nous avons observé une sous-expression significative de la protéine LC3-II des cellules C2C12 sous hypoxie traitées par l'ensemble des conditions combinant au moins deux contre-mesures : SE + BCAAs (0,66 ± 0,06 u.a., P < 0,01), SE + O₂ (0,73 ± 0,05 u.a., P < 0,05), SE + BCAAs + O₂ (0,66 ± 0,07 u.a., P < 0,01), et ce par rapport à la condition hypoxie (4% O₂ ; non traitées) (**Figure 57A**). Concernant le système de dégradation ubiquitine-protéasome, nos données ont révélé, 2h post-traitement, une augmentation de l'ubiquitination des protéines pour les cellules C2C12 ayant été traitées par les conditions associant la stimulation électrique à une supplémentation en BCAAs, c'est-à-dire SE + BCAAs (1,22 ± 0,14 u.a., P < 0,05) et SE + BCAAs + O₂ (1,17 ± 0,13 u.a., P = 0,09). On note également que ces mêmes conditions ont observé une réduction de la quantité de protéines ubiquitinées au cours du temps (24h vs 2h ; P < 0,01) (**Figure 57B**).

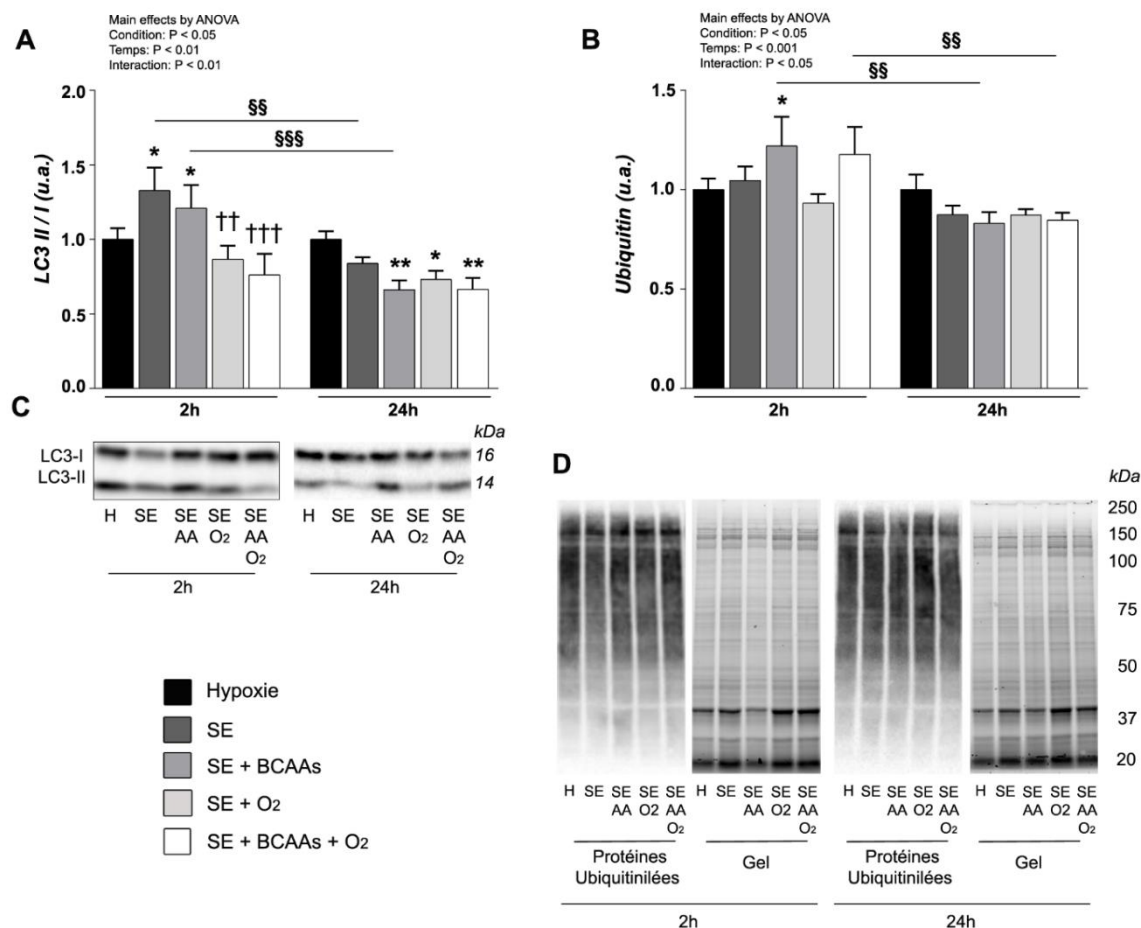


Figure 57 : Réduction des systèmes d'autophagie et d'ubiquitine-protéasome à travers le temps (2h et 24h) pour les cellules C2C12 traitées par stimulation électrique et supplémentées en BCAAs. Le niveau d'expression des systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome a été déterminé par Western blot dans des myotubes C2C12 sous hypoxie (4% O₂) (H) ; traitées par stimulation électrique (SE) ; stimulation électrique + supplémentation en BCAAs (SE + AA) ; stimulation électrique + réoxygénation (SE + O₂) ; et enfin stimulation électrique + BCAAs + réoxygénation (SE + AA + O₂). A : Ratio des protéines LC3 II / LC3I. B : Quantification des protéines conjuguées à l'ubiquitine. C : Signaux représentatifs des protéines LC3 I et LC3II. D : Signaux représentatifs des gels et protéines ubiquitinées. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂ ; non traitée) sont présentées par : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique. Les différences par rapport à la condition stimulation électrique (SE) sont présentées par : †† $P < 0,01$. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 2h) sont présentées par : §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$ (n = 10 par condition).

Les données recueillies sur les voies de dégradation des protéines, démontrent que seules les cellules C2C12 sous hypoxie ayant subi un traitement par stimulation électrique seule (SE) ou associée à une période de réoxygénation (SE + O₂) ont observé une hyper-phosphorylation de FoxO1, inhibant l'action transcriptionnelle de ce dernier. De plus, la stimulation électrique seule a été l'unique traitement permettant de maintenir au cours du temps (24h post-stimulation) un niveau de phosphorylation de FoxO1 équivalent aux cellules sous hypoxie non traitées, tandis que, l'ensemble des conditions associant plusieurs contre-mesures à l'atrophie ont observé une hypo-phosphorylation significative de FoxO1, 24h post-traitement. Contrairement à FoxO1, où les conditions associant plusieurs contre-mesures à l'atrophie ne semblent avoir que peu d'effet, ces traitements multiples ont permis de diminuer significativement le niveau d'activation de l'un des principaux systèmes de dégradation,

l'autophagie. Parallèlement aux protéines de la voie de synthèse Akt-mTOR, le traitement par stimulation électrique agit en amont des voies de signalisation de l'homéostasie protéique, avec la protéine Akt pour la voie de protéosynthèse et le facteur de transcription FoxO1 pour les voies de protéolyse, alors que les traitements combinant plusieurs contre-mesures agissent sur les protéines en aval de ces voies de signalisation, et ce sur une période relativement longue post-traitement (24h). Il serait intéressant de mettre en relation l'ensemble de ces données intracellulaires avec une analyse morphologique détaillée des myotubes, ce qui nous permettrait de confirmer cette variabilité de réponse entre les différentes modalités de traitements utilisés dans notre étude.

III.3. Effet de l'association des contre-mesures à l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie sur la morphologie de myotubes C2C12 hypoxiques.

L'analyse morphologique des myotubes nous a permis de mettre évidence que l'ensemble des contre-mesures utilisées dans notre protocole ont permis de maintenir des valeurs de diamètre de myotubes très proches entre les jours J5 et J6 de différenciation, alors que les myotubes sous hypoxie non traités ont observé une diminution significative de leur diamètre après 48h sous hypoxie (J6 vs J5, $P < 0,01$). De plus, les diamètres des myotubes soumis aux différentes contre-mesures à l'atrophie musculaire ont tous été supérieurs à la condition hypoxie, après 24h de traitement ($P < 0,05$) (**Figure 58B**). Nous avons observé, 48h post-traitement, que seules les cellules C2C12 traitées par l'ensemble des conditions combinant au moins deux contre-mesures, c'est-à-dire, SE + BCAAs ($12,52 \pm 1,19 \mu\text{m}$), SE + O₂ ($14,78 \pm 0,5 \mu\text{m}$), SE + BCAAs + O₂ ($14,52 \pm 0,23 \mu\text{m}$), ont observé un diamètre des myotubes plus élevé que celui des cellules musculaires sous hypoxie et non traitées ($10,94 \pm 0,36 \mu\text{m}$) ($P < 0,05$) (**Figure 58B**).

Concernant l'index de fusion myogénique, il est intéressant de noter qu'entre les temps de 2h et 24h post-traitement, seules les cellules ayant été traitées par réoxygénation, c'est-à-dire ES + O₂ ($45,7 \pm 0,96 \%$ et $44,76 \pm 1,8 \%$, à 2h et 24h, respectivement) et ES + BCAAs + O₂ ($47,69 \pm 1,8 \%$ et $46,48 \pm 2,33 \%$, à 2h et 24h, respectivement) ont permis de maintenir un pourcentage de fusion sensiblement proche entre ces deux temps de mesure (**Figure 58C**), bien que les myotubes C2C12 ayant été traités par stimulation électrique seule ($36,83 \pm 1,8 \%$, 24h post-traitement) ont pu maintenir un pourcentage de fusion supérieur aux myotubes contrôles non traités ($27,06 \pm 2,04 \%$) ($P < 0,01$). Les myotubes soumis à une période de réoxygénation (ES + O₂ et ES + BCAAs + O₂) ont entraîné un index de fusion plus élevé que la condition stimulation électrique seule ($P < 0,01$). D'autre part, seules les conditions de traitement comprenant une période de réoxygénation ont conduit à un pourcentage de fusion des myotubes plus élevé ($34,02 \pm 1,38 \%$ et $32 \pm 1,16 \%$; ES + O₂ et ES + BCAAs + O₂, $P < 0,05$ et $P = 0,06$; respectivement) que celui des myotubes sous hypoxie non traités ($26,54 \pm 3,09 \%$), 48h post-traitement (**Figure 58C**).

En terme de densité des myotubes, nous avons constaté que seule la condition hypoxie (4% O₂; non traitées) a présenté une diminution du nombre de myotubes au 6^{ème} jour de différenciation, soit 48h post-induction de l'hypoxie (J6 vs J5, $P < 0,01$). Seuls les traitements par réoxygénation ont conduit à un nombre de myotubes par image plus élevé que la condition hypoxie non traitée, et ce 24h post-traitement ($P < 0,01$) (**Figure 58D**), alors qu'au 7^{ème} jour de différenciation, l'ensemble des conditions a conduit à une réduction de la densité de myotubes comparativement aux données recueillies 24h auparavant (J7 vs J6, $P < 0,05$). De plus, 48h post traitement, l'ensemble des traitements

utilisés dans notre protocole ont maintenu un nombre de myotubes significativement plus élevé que les cellules sous hypoxie non traitées ($P < 0,01$) (**Figure 58D**). Concernant le nombre de noyaux par myotube, aucun des traitements employés dans notre étude n'a permis d'obtenir un nombre de noyaux plus important que les myotubes sous condition d'hypoxie (4% O₂ ; non traitées) (**Figure 58E**).

L'analyse morphologique des myotubes nous a révélé que l'ensemble des traitements combinant au moins deux contre-mesures à l'atrophie musculaire ont entraîné sur des cellules C2C12 sous hypoxie (4% O₂) une réduction de l'impact négatif de l'hypoxie sur la maturation des myotubes. Les traitements associant la stimulation électrique à une période de réoxygénation ont permis de conserver un index de fusion, un diamètre et une densité de myotubes supérieurs aux myotubes sous hypoxie non traités, et ce quels que soient les moments de mesures de notre étude (24h et 48h post-traitement). Cependant, nous pouvons noter que la condition stimulation électrique seule a pu également maintenir un état de maturation (diamètre des myotubes) et de différenciation (index de fusion) plus important que les myotubes sous hypoxies non traités, mais cela uniquement sur une période de temps n'excédant pas 24h post-traitement, alors que les conditions combinant plusieurs traitements ont réussi à conserver un meilleur diamètre et niveau de fusion des myotubes, et ce jusqu'à 48h après la fin de l'application des traitements.

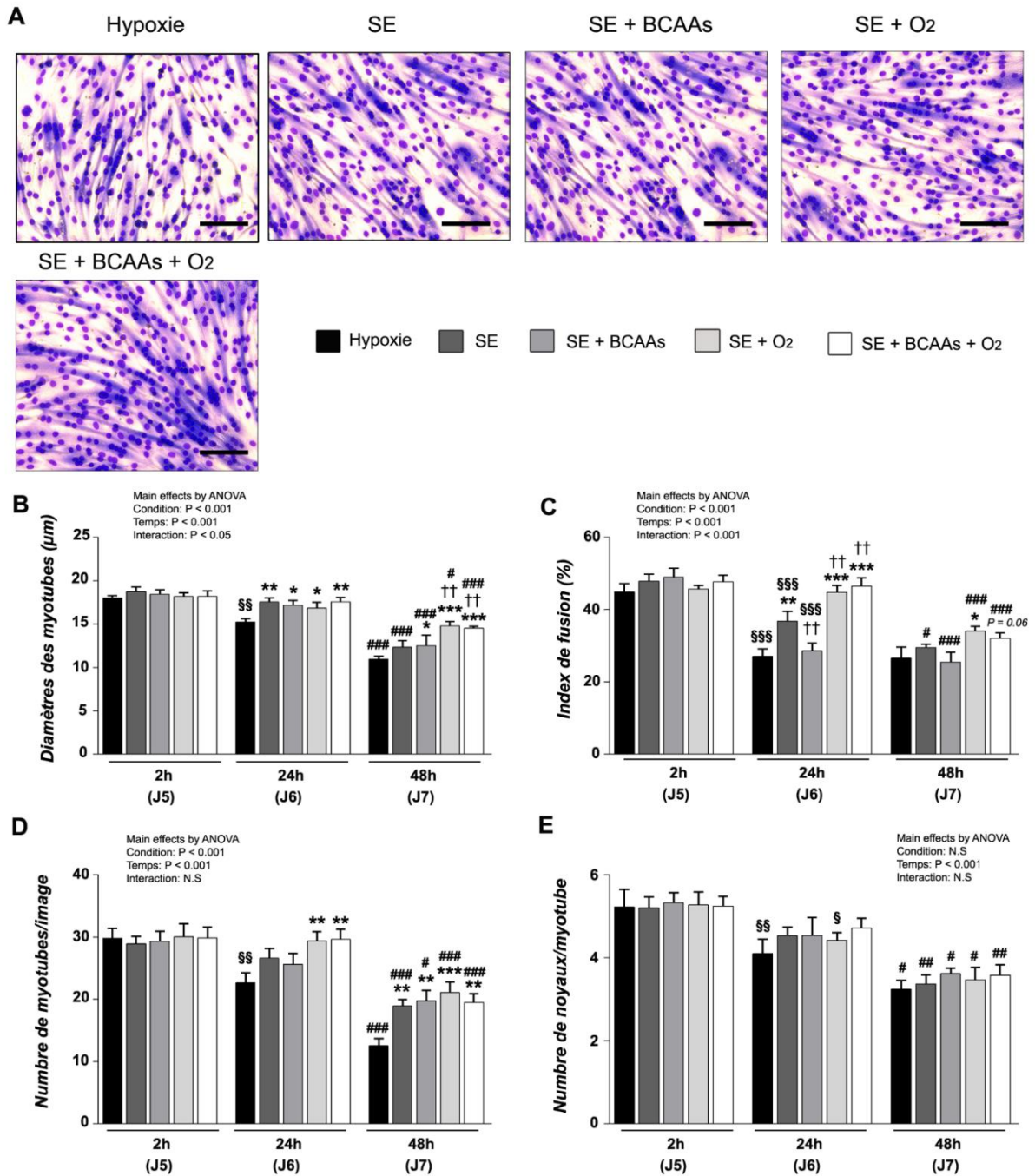


Figure 58 : Maturation des myotubes C2C12 sous hypoxie à la suite de différentes combinaisons de contre-mesures à l'atrophie musculaire. A : Images représentatives des myotubes C2C12 sous hypoxie (4% O₂) (H) ; traitées par stimulation électrique (SE) ; stimulation électrique + supplémentation en BCAAs (SE + AA) ; stimulation électrique + réoxygénation (SE + O₂) ; et enfin stimulation électrique + BCAAs + réoxygénation (SE + AA + O₂). Les images ont été acquises à un agrandissement x20. Barre d'échelle = 100 µm. B : Diamètre des myotubes à 2h, 24h et 48h post-traitement, exprimé en µm. C : Indice de fusion des myotubes en culture, exprimée en pourcentage. D : Nombre de myotubes par image. E : Nombre de noyaux par myotubes. J : jour de différenciation des myotubes. Les valeurs significativement différentes de la condition hypoxie (4% O₂; non traitée) sont présentées par : * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, les tendances sont indiquées par la valeur P spécifique. Les différences par rapport à la condition stimulation électrique (SE) sont présentés par : †† P < 0,01. Les valeurs significativement différentes pour les valeurs de temps (24h vs 2h) sont présentées par : § P < 0,05, §§ P < 0,01, §§§ P < 0,001. 48h vs 24h : # P < 0,05, ## P < 0,01, ### P < 0,001 (n = 6 par condition).

IV. Conclusion de l'étude III

Cette étude ayant pour objectif de comparer plusieurs modalités de co-traitements permettant de limiter l'atrophie musculaire de cellules C2C12 sous hypoxie (4% O₂) nous a permis de révéler une disparité d'impact au niveau intracellulaire de certaines protéines clés régulatrices de l'homéostasie protéique, entre les traitements utilisant uniquement la stimulation électrique et d'autres traitements combinant la stimulation électrique avec une supplémentation en BCAAs et/ou une période de réoxygénation. En effet, les données moléculaires indiquent une influence importante du traitement par stimulation électrique sur les protéines telles que Akt et FoxO1, localisées toutes deux en amont des voies de signalisation responsables de la protéosynthèse et de la protéolyse, respectivement. En revanche, la stimulation électrique suivie d'une supplémentation en BCAAs et/ou une réoxygénation des cellules musculaires sous hypoxie a impacté davantage, et ce de manière positive, des protéines en aval des voies de synthèse et de dégradation des protéines, avec la suractivation de la protéine mTOR et 4E-BP1 dans la voie Akt-mTOR, et une réduction de l'expression de la protéine LC3 II dans la voie de l'autophagie. De plus, il semblerait également que les traitements associant plusieurs contre-mesures à l'atrophie musculaire ont des effets retardés dans le temps, jusqu'à 24h après la fin des traitements, en comparaison au traitement par stimulation électrique seule (2h post-traitement). La mise en relation des données moléculaires avec l'analyse morphologique nous a permis de confirmer que l'ensemble des conditions associant plusieurs contre-mesures à l'atrophie musculaire ont entraîné un maintien important de plusieurs critères morphologiques (index de fusion, diamètre et densité des myotubes), révélateurs d'une limitation de l'atrophie des myotubes sous hypoxie, et ce même à un temps avancé (48h) post-application des différents traitements. Nous pouvons mettre en avant que seule l'intervention associant les trois contre-mesures à l'atrophie (stimulation électrique suivie d'une période de réoxygénation et d'une supplémentation en BCAAs) ait réussi, sur le plan moléculaire, à conduire à une suractivation de la protéine mTOR, et sur le plan morphologique, à maintenir un diamètre des myotubes supérieur aux myotubes sous hypoxie non traités, et également aux myotubes traités uniquement par stimulation électrique.

Discussion générale

Etude I : Impact de différentes méthodes d'induction de l'hypoxie cellulaire

Un approfondissement des connaissances des différentes formes d'altération de la fonction musculaire consécutive à un stress hypoxique est fondamental dans l'établissement et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des maladies respiratoires ayant des répercussions importantes sur le système musculaire. En ce sens, l'utilisation de modèles d'étude *in vitro* sous hypoxie est actuellement l'une des étapes essentielles pour une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires résultant d'une diminution du taux d'O₂ au niveau intracellulaire. Ainsi, il existe actuellement, au niveau de la cellule musculaire squelettique, plusieurs modalités d'induction de l'hypoxie *in vitro* (Chen et al., 2017 ; Choy et al., 2009 ; Hayot et al., 2011 ; Huang et al., 2014 ; Scaringi et al., 2013). Notre première étude a permis de déterminer les similitudes et les différences entre l'induction de l'hypoxie par l'intermédiaire d'une chambre à hypoxie, méthode dite « hypoxie physiologique normobarique », et l'utilisation de substances pharmacologiques telles que le chlorure de cobalt ou la desferrioxamine, appelées aussi « agents mimétiques de l'hypoxie ». Nos critères de comparaison entre ces deux modalités d'induction se sont focalisés principalement sur la maturation morphologique de cellules musculaires squelettiques et les voies de signalisation intracellulaires responsables de l'atrophie et de l'hypertrophie musculaires.

Une étude de Richardson et al, portant sur la cascade de la tension en O₂ à travers plusieurs compartiments du corps humain, nous indique que dans des conditions normales de normoxie, le muscle squelettique a une tension d'environ 30 à 40 mmHg, soit 5% d'O₂ (Richardson et al., 2006). Par conséquent, *in vivo*, toute concentration d'O₂ au niveau musculaire en-dessous de 5% est considérée comme une condition d'hypoxie. Ainsi, pour notre étude *in vitro*, nous avons fait le choix pour l'hypoxie physiologique normobarique d'entreposer les cellules musculaires C2C12 à 4% O₂. Bien que cette modalité d'induction de l'hypoxie par diminution de la teneur en oxygène de l'air ambiant reste à ce jour la référence dans la reproduction du phénomène d'hypoxie *in vivo* (Chaillou et al., 2016), des traitements pharmacologiques utilisant des agents mimétiques de l'hypoxie (CoCl₂ et DFO) sont couramment utilisés pour simuler dans la cellule un état d'hypoxie (Chen et al., 2017 ; Huang et al., 2014 ; Scaringi et al., 2013). Les agents mimétiques de l'hypoxie tels que le CoCl₂ et la DFO ont la faculté de court-circuiter le mécanisme d'hydroxylation du facteur de transcription HIF-1 α , senseur de l'hypoxie intracellulaire. L'ion cobalt (Co²⁺) et le fort pouvoir chélateur de la DFO entre en compétition avec le Fe²⁺, cofacteur indispensable au fonctionnement des prolyl hydroxylases, initiateurs de la dégradation de HIF-1 α . Ainsi, tout comme l'hypoxie physiologique, les agents mimétiques de l'hypoxie ont la caractéristique de stabiliser HIF-1 α , et ce malgré une exposition à un taux d'O₂ de 21%, considéré dans les protocoles de culture cellulaire comme la valeur de base de la normoxie (Chaillou et al., 2016 ; Ciafré et al., 2007). Au sein de la littérature, les concentrations utilisées pour les agents mimétiques de l'hypoxie varient de 5 à 500 μ M. Cependant, nous avons noté qu'une concentration de 200 μ M est communément utilisée dès lors que la durée d'un traitement des cellules est supérieure à 24h (Chen et al., 2017 ; Ciafré et al., 2007), et nos résultats montrent une augmentation de la quantité de HIF-1 α après 24h d'induction de l'hypoxie, et ce quelle que soit la modalité d'induction de l'hypoxie *in vitro*. Cette augmentation de la quantité de HIF-1 α peut résulter de deux processus : soit une stabilisation, soit une synthèse *de novo* de HIF-1 α . Une étude de Pisani et al., a montré sur des cellules C2C12 traitées au CoCl₂ (200 μ M) une augmentation de l'expression de la protéine HIF-1 α sur des temps relativement courts, 30min et 3h après traitement (Pisani et al., 2005), ces temps très courts n'étant que peu compatibles avec une néosynthèse de HIF-1 α . Au contraire, une autre étude, également

menée sur des cellules C2C12 exposées à une hypoxie de 5% d'O₂, a relevé une surexpression de HIF-1 α uniquement à partir de 72h d'exposition, et ce en comparaison à des mesures effectuées 24h et 48h après l'induction de l'hypoxie physiologique (Ji et al., 2018). L'augmentation de la quantité de HIF-1 α que nous avons mesuré dans notre étude a lieu dès 6h post-traitement va dans le sens d'une stabilisation de HIF-1 α par les agents mimétiques de l'hypoxie plutôt qu'une surexpression de HIF-1 α .

Il serait simple d'affirmer que les conséquences caractéristiques de l'hypoxie physiologique sur la cellule musculaire soient similaires aux effets de l'induction de l'hypoxie par agent pharmacologique. De plus, à notre connaissance, il n'existe dans la littérature aucune étude ayant déterminé avec précision les similitudes et les différences entre ces deux méthodes d'induction de l'hypoxie sur les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie des protéines, ni leur répercussion sur la morphologie des myotubes et leur teneur en protéines. Or, dans l'étude du système musculaire, et notamment dans la régulation de sa masse, l'homéostasie protéique prend une place importante dès lors que son équilibre peut être perturbé, ce qui peut avoir de lourdes conséquences sur le volume musculaire, que ce soit en termes d'hypertrophie ou d'atrophie musculaires (Langen et al., 2013). Les résultats de notre étude ont permis de mettre en évidence que les cellules musculaires squelettiques privées d'oxygène (4% O₂) ou traitées par le CoCl₂ sur une durée de 24h, ont observé une diminution d'activation de la protéine Akt, et dans un même temps une réduction de l'état de phosphorylation du facteur de transcription FoxO1, alors qu'aucune variation notable n'a été observée dans les cellules C2C12 traitées par la DFO concernant ces deux protéines importantes dans la régulation de l'homéostasie protéique musculaire. Ces données corroborent celles de Theije et collaborateurs, démontrant un ratio p-Akt / Akt moins important et une surexpression de FoxO1 dans le muscle squelettique de rat en réponse à une hypoxie chronique de 21 jours (Theije et al., 2013). L'ensemble de ces observations centrées sur les conséquences mécanistiques de l'hypoxie sur la cellule musculaire renforce les conclusions avancées par plusieurs auteurs portant sur les causes de l'atrophie musculaire chez les personnes atteintes de pathologie respiratoire (Glass et al., 2005 ; Vogiatzis et al., 2010 ; Doucet et al., 2007), et notamment le fait que l'hypoxie serait l'un des facteurs déterminants dans la perturbation de l'homéostasie protéique en faveur d'une atrophie musculaire prononcée. Par la suite, nous nous sommes intéressés aux conséquences de chacune des modalités d'induction de l'hypoxie sur l'activation et / ou l'expression des protéines en aval de Akt et FoxO1 dans les voies de synthèse et de dégradation des protéines, respectivement.

L'une des cibles d'Akt que nous avons sélectionnée dans notre analyse est la protéine GSK-3 β . Lorsque cette dernière est phosphorylée par Akt, son action d'inhibiteur de la synthèse des protéines, par inhibition du facteur de transcription eucaryote 2B (eIF2B), s'en trouve altérée (Léger et al., 2006). Il a été démontré chez le rat et sur des myotubes C2C12 une réduction du taux de phosphorylation de GSK-3 β à la suite d'une privation en O₂, entraînant ainsi une réduction de la synthèse protéique (Caron et al., 2009 ; Theije et al., 2013). Tout comme GSK-3 β , plusieurs études ont constaté qu'un stress hypoxique provoque sur des myotubes C2C12, sur des cultures primaires issues de muscles de patients atteints de BPCO, chez les rongeurs ou à partir de biopsies de patients BPCO, une hypophosphorylation de P70S6K, protéine en aval du complexe mTORC1 qui joue un rôle déterminant dans l'hypertrophie des cellules musculaires (Costes et al., 2015 ; Favier et al., 2010 ; Martin et al., 2017a). Nos données indiquent une diminution conjointe du ratio p-GSK-3 β / GSK-3 β et p-P70S6K / P70S6K pour les myotubes C2C12 soumis à une hypoxie physiologique ou à l'agent mimétique CoCl₂, alors

qu'au contraire, aucune de ces protéines n'a subi de variation significative à la suite d'un traitement par DFO (**Figure 59**).

Afin de compléter notre investigation sur les conséquences des différents modes d'induction de l'hypoxie sur les molécules clés régulant la croissance et le développement cellulaires, nous nous sommes intéressés, en plus des protéines des voies de protéosynthèse et de protéolyse, à l'un des facteurs de différenciation de la cellule musculaire, à savoir la myogénine. Parallèlement à la voie Akt / mTOR, notre analyse a révélé une sous-expression de la myogénine pour les cellules C2C12 traitées à 4% O₂ et au CoCl₂. Une étude de Di Carlo et collaborateurs explique cette perturbation de l'expression de la myogénine en hypoxie par une inhibition précoce du marqueur de différenciation MyoD, bloquant ainsi l'initiation de la différenciation terminale. De plus, les auteurs ont pu constater une réversibilité de l'inhibition de la différenciation en hypoxie ; en effet, un retour en normoxie des cellules musculaires C2C12 préalablement placées en hypoxie a entraîné des niveaux d'expression des facteurs myogéniques très proches de ceux observés auprès des cellules restées sous normoxie (Di Carlo et al., 2004). Au vu de cette analyse moléculaire, centrée principalement sur la voie de régulation de la protéosynthèse, le CoCl₂ est sans aucun doute l'agent mimétique de l'hypoxie ayant le plus de similitude avec l'induction de l'hypoxie par privation d'O₂, compte tenu de leurs impacts négatifs communs sur plusieurs protéines de la voie Akt / mTOR.

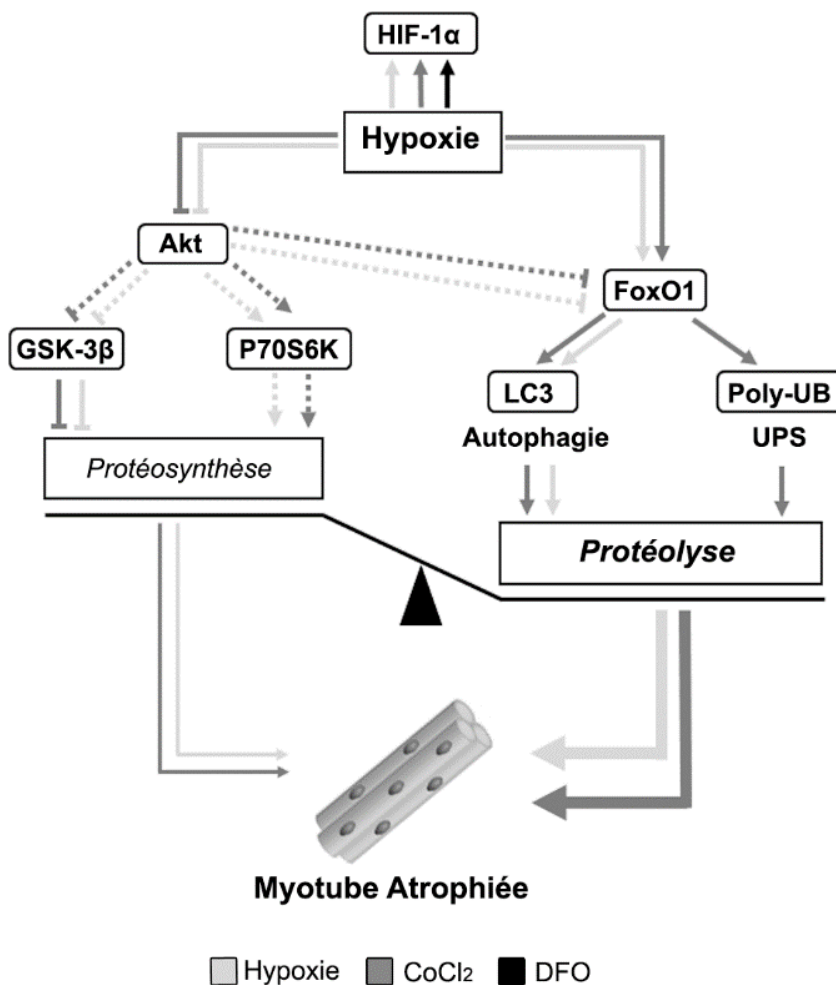


Figure 59 : Représentation schématique des impacts de l'hypoxie physiologique (4% O₂) et des agents mimétiques de l'hypoxie (CoCl₂ et DFO) sur la régulation de l'homéostasie protéique (c'est-à-dire l'équilibre entre la synthèse et la dégradation protéiques) et la morphologie des myotubes. Les cellules du muscle squelettique cultivées sous hypoxie physiologique (4% O₂) ou traitées avec l'agent chimique, le CoCl₂, présentent une diminution de la synthèse protéique et une augmentation de la dégradation protéique, entraînant une réduction du diamètre des myotubes. En revanche, le traitement par la DFO n'a aucun effet sur la morphologie des myotubes C2C12 ni sur les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie protéiques. Les traits continus traduisent une augmentation, et les traits discontinus une diminution.

Bien que l'une des causes majeures du déséquilibre de l'homéostasie protéique en hypoxie soit la perturbation des voies de synthèse des protéines, elle n'est pas la seule. Les voies de protéolyse jouent également un rôle important dans la régulation du métabolisme protéique. Ce catabolisme musculaire prononcé est un phénomène bien identifié chez certains patients atteints d'hypoxie sévère chronique et présentant une cachexie importante (Debigaré et al., 2003 ; Remels et al., 2012). Une étude réalisée à partir de biopsies du vaste latéral fémoral de patients BPCO montre une surexpression de la protéine LC3-II inversement corrélée à une réduction de la section transversale du muscle étudié (Guo et al., 2013). La présence importante de LC3-II dans la cellule musculaire traduit d'une hausse de l'autophagie (Sandri et al., 2013). Dans notre étude comparative, une convergence d'effet a été constaté entre l'hypoxie physiologique et l'induction de l'hypoxie par le CoCl_2 à la suite de 24h d'exposition. Toutes deux ont entraîné une activation du système de dégradation par autophagie, traduite par la hausse du ratio LC3-II / LC3-I. Le second processus de dégradation que nous avons considéré dans notre étude, tout aussi important que l'autophagie, est le système ubiquitine-protéasome. Martin et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression de l'ARNm de MuRF1 dans des myotubes C2C12 soumis à une réduction drastique du taux d'oxygène (1% O_2), alors que les cellules C2C12 soumises à une hypoxie de 5% n'ont observé aucun changement d'expression d'ARNm codant pour la E3-ubiquitine ligase (Martin et al., 2017a). Ainsi, cette étude de Martin nous laisse à penser que le taux d'hypoxie de 4% O_2 sélectionné dans notre protocole ne soit pas un niveau d'hypoxie suffisant pour stimuler l'ubiquitination des protéines (Martin et al., 2017a ; Theije et al., 2013), et effectivement, l'hypoxie induite par le CoCl_2 a été le seul traitement de notre étude ayant entraîné une augmentation du taux d'ubiquitination des protéines (Figure 59). Ces résultats sont en corrélation avec une étude ayant mis en évidence une augmentation de l'expression des ubiquitine E3 ligases, MAFbx et MuRF1, dans des cellules C2C12 traitées par le CoCl_2 (Rovetta et al., 2006).

L'hypophosphorylation de la protéine P70S6K et la surexpression de LC3-II ont clairement démontré que les cellules musculaires squelettiques étaient sensiblement impactées par une réduction du taux d'oxygène, conduisant à un déséquilibre évident des voies de régulation responsables de l'anabolisme et du catabolisme protéiques, et ce en faveur de l'atrophie musculaire (Langen et al., 2013). En effet, l'ensemble de nos données moléculaires nous a révélé que l'hypophosphorylation de FoxO1 et la surexpression de LC3-II, associées à une réduction de la voie Akt / mTOR / P70S6K, renforcent le postulat que l'hypoxie entraîne une perturbation de l'homéostasie des protéines pouvant altérer sérieusement la morphologie des myotubes. Concernant la comparaison des différentes modalités d'induction de l'hypoxie *in vitro*, nos résultats ont pu démontrer que seul le CoCl_2 , à la différence de son homologue la DFO, a impacté sensiblement les protéines responsables de la protéosynthèse mesurées sur les cellules musculaires, et ce de la même manière que les cellules soumises à une hypoxie physiologique. En parallèle à la voie de synthèse, notre analyse des deux systèmes de dégradation protéique (autophagie et système ubiquitine-protéasome) nous a révélé une disparité des effets entre une induction de l'hypoxie par réduction du taux d' O_2 et le CoCl_2 , qui avait jusqu'à présent montré d'importantes similitudes en terme d'impact sur des protéines clés régulatrices de l'homéostasie protéique (Akt, P70S6K, GSK-3 β et FoxO1) (Figure 59). En effet, nos données indiquent qu'une hypoxie physiologique à 4% O_2 augmente de façon importante (et sur un temps relativement court) l'expression de l'un des marqueurs de l'autophagie, la protéine LC3-II ; même si le traitement par le CoCl_2 a entraîné une surexpression de LC3-II par rapport aux cellules non-traitées, cette hausse reste bien en deçà de celle provoquée par l'hypoxie physiologique. Cette disparité d'effet

entre l'hypoxie physiologique et le CoCl_2 s'est renforcée avec l'analyse du système ubiquitine-protéasome. Les cellules musculaires traitées par le CoCl_2 pendant 24h ont observé une augmentation importante du taux d'ubiquitination des protéines en comparaison aux cellules C2C12 sous hypoxie physiologique (4% O_2). Ces différences d'effets entre une hypoxie à 4% O_2 et le CoCl_2 en terme de niveau et temps d'activation des deux systèmes de dégradation analysés peut s'expliquer notamment par le pourcentage d'oxygène (4%), la concentration de l'inducteur chimique (200 μM) ou le temps d'exposition sélectionné dans notre protocole (Chen et al., 2017 ; Rovetta et al., 2013 ; Theije et al., 2013). À l'opposé de son homologue mimétique de l'hypoxie, la DFO n'a provoqué aucune variation de phosphorylation ou d'expression des protéines d'intérêt analysées dans notre étude. Au contraire, la DFO a maintenu tout au long de notre investigation des voies de signalisation régulatrices de l'homéostasie protéique à des valeurs très proches de celles recueillies auprès des cellules musculaires non-traitées (normoxie à 21% O_2).

Après s'être concentrés sur des temps relativement courts d'incubation (6h et 24h), nous nous sommes intéressés aux conséquences à plus long terme (48h et 72h) des différentes modalités d'induction de l'hypoxie sur la morphologie et le contenu protéique des myotubes. Parallèlement aux données intracellulaires, nous avons mesuré une diminution du diamètre des myotubes étroitement associée à une perte importante du contenu protéique, et ce uniquement pour les myotubes traités par l'hypoxie physiologique ou par le CoCl_2 . Ces données, signes du développement d'une atrophie des myotubes consécutive au stress hypoxique, ont également été constatée *in vivo* auprès de rats après une période d'hypoxie prolongée à 8% O_2 (Theije et al., 2013) ou par la réduction du diamètre des myotubes issus de culture primaire de cellules musculaires de patients BPCO (Pomiès et al., 2015). L'ensemble de nos données moléculaires révèle une importante hypophosphorylation des protéines Akt, GSK3- β , P70S6K et FoxO1 à la suite d'une exposition hypoxique (physiologique ou chimique), pouvant expliquer les résultats de notre analyse morphologique et la concentration totale en protéines après une exposition de 48h et 72h aux différents traitements (Figure 59).

Pour conclure sur cette première partie de travail de thèse, qui avait pour objectif de mettre en évidence les similitudes ou disparités entre plusieurs modalités d'induction de l'hypoxie *in vitro*, l'ensemble de nos données, obtenues à la fois au niveau moléculaire et morphologique, démontre que l'hypoxie physiologique à 4% O_2 et l'agent mimétique de l'hypoxie, le chlorure de cobalt (CoCl_2), ont de nombreuses similitudes en terme d'impact sur les voies de signalisation responsables de l'homéostasie protéique et la morphologie des myotubes. Ces données renforcent le fait qu'en l'absence d'un dispositif permettant d'appauvrir physiquement le taux d' O_2 (chambre à hypoxie), le CoCl_2 est l'agent pharmacologique le plus adéquat dans la mise en place d'un protocole d'induction de l'hypoxie sur des cellules musculaires en culture. De plus, les différents indicateurs moléculaires et morphologiques de la mise en place progressive d'une atrophie musculaire consécutive à l'induction de l'hypoxie (4% O_2 et CoCl_2) semblent être en accord avec les processus cataboliques aboutissant à une atrophie musculaire observée *in vivo*, chez le rongeur en hypoxie ou chez des patients souffrant d'hypoxémie chronique (BPCO). Cette étude renforce l'intérêt des modèles d'induction artificielle de l'hypoxie, qui ont prouvé être une réelle alternative aux modèles animaux ou humain dans la compréhension des mécanismes des dysfonctionnements musculaires associés à l'hypoxie.

Etude II : La stimulation mécanique, la supplémentation en acides aminés ou la réoxygénation dans la limitation de l'atrophie de cellules musculaires sous hypoxie.

L'oxygénothérapie est un traitement extrêmement prescrit et répandu dans la prise en charge des patients souffrant d'hypoxie chronique les plus sévères. Même s'il existe un certain nombre d'études rapportant des améliorations significatives de la tolérance à l'effort et des scores aux différents tests de performances physiques utilisés lors d'évaluation en centre de réhabilitation (Emtner et al., 2003 ; Maltais et al., 2001), très peu d'études, à l'heure actuelle, se sont intéressées à la compréhension mécanistique d'une supplémentation en oxygène sur des cellules musculaires squelettiques sous hypoxie. De plus, il n'existe dans la littérature aucune donnée concernant les conséquences d'une réoxygénation de cellules musculaires sur les voies de signalisation régulatrices de l'homéostasie protéique. Le but de cette seconde étude a été de déterminer l'efficacité d'un traitement par supplémentation en O₂ à travers des indicateurs des processus d'atrophie et d'hypertrophie musculaires, et aussi de comparer les effets de ce traitement par réoxygénation avec d'autres interventions connues comme étant anabolisantes, telles que la stimulation mécanique (électrostimulation) ou la supplémentation nutritionnelle (acides aminés branchés).

Des études ont révélé des effets positifs sur la voie de protéosynthèse PI3K-Akt en réponse à une réoxygénation de cellules rénales embryonnaires humaines soumises à une réduction du taux d'oxygène, se manifestant notamment par une hyperphosphorylation de la protéine mTOR à la suite de cette supplémentation en O₂ (Arsham et al., 2003 ; Tan et al., 2013). Notre analyse moléculaire de la voie Akt / mTOR a révélé qu'une période de réoxygénation a entraîné une ré-activation de la protéine Akt et de plusieurs cibles en aval. Ainsi, après la période de réoxygénation, la protéine GSK-3 β a observé une hausse de sa forme phosphorylée, levant ainsi son inhibition sur le facteur eIF2 responsable de l'initiation de la traduction (Bolster et al., 2004) (**Figure 60**). De plus, la réoxygénation a conduit à une hyperphosphorylation des protéines 4E-BP1 et P70S6K, effecteurs du complexe mTORC1, avec pour actions respectives l'initiation de la traduction par la libération de eIF4E et l'activation de la protéine S6 ribosomale, provoquant toutes deux l'initiation de la synthèse protéique (Reyes de la Cruz et al., 2004). Il est important de noter que seules les cellules musculaires C2C12 initialement en hypoxie et ayant été traitées par réoxygénation ont observé une activation de précurseurs clés de la synthèse protéique (4E-BP1 et P70S6K), et ce en comparaison avec la stimulation électrique ou la supplémentation en BCAAs (**Figure 60**), ces dernières étant connues pour être des contre-mesures habituelles à l'atrophie musculaire des patients atteints d'hypoxémie chronique (Maltais et al., 2014).

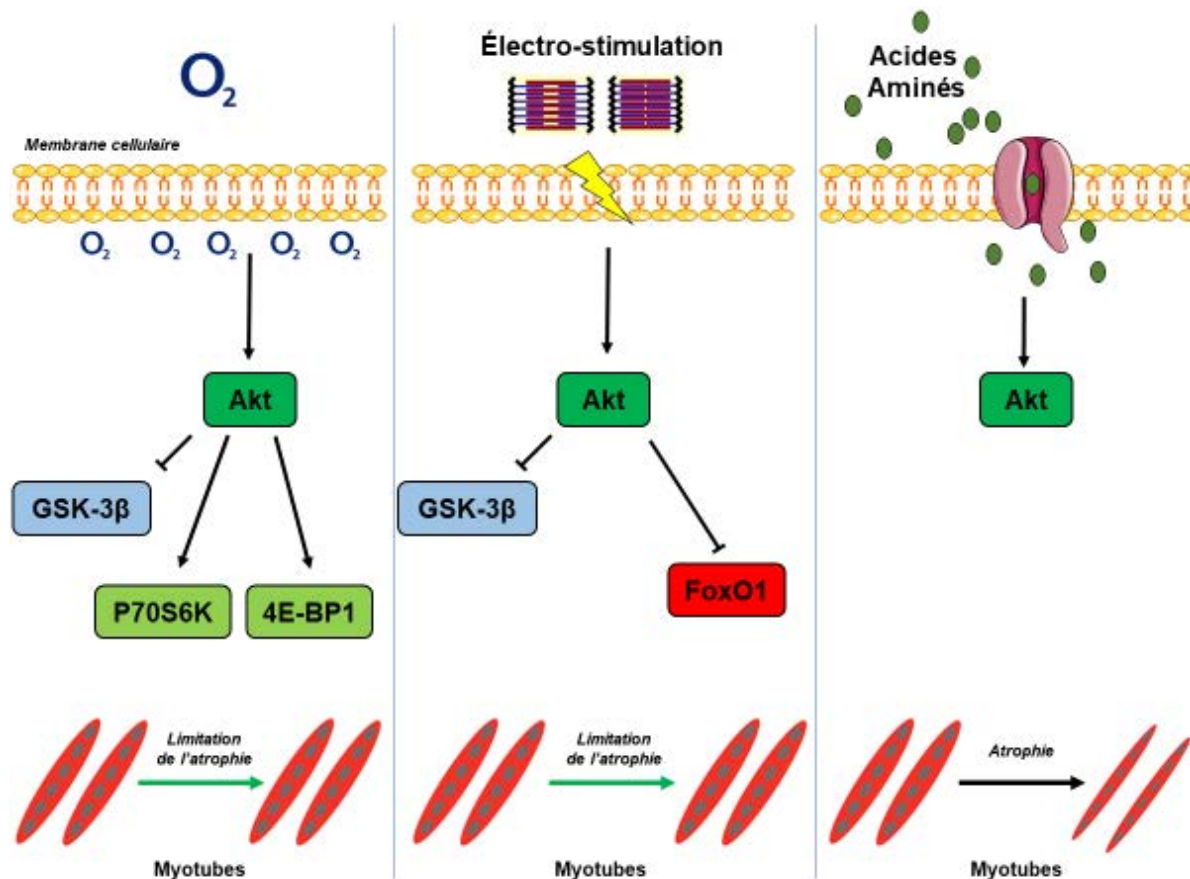


Figure 60 : Représentation schématique des effets moléculaires et morphologiques à la d'un traitement par stimulation électrique ou par supplémentation en BCAAs ou par des cellules musculaires squelettiques C2C12 sous hypoxies.

Contrairement au traitement par réoxygénation, la stimulation électrique a été l'unique intervention entraînant à la fois une hyperphosphorylation des protéines de la protéosynthèse Akt et GSK-3 β , et des voies de protéolyse par le facteur de transcription FoxO1 (**Figure 60**). Ce rééquilibrage de la balance entre les voies de signalisation de la synthèse et de la dégradation protéiques, en faveur de l'hypertrophie, est similaire à ce que l'on peut observer en normoxie dans des modèles de cellules musculaires en culture, ou *in vivo* (homme et rongeur) à la suite d'une série de contractions musculaires répétées, entraînant une suractivation de la voie PI3K / Akt / mTOR (Léger et al., 2006 ; Nedachi et al., 2008). Il est important de noter qu'en réponse à la stimulation électrique, seule la protéine Akt a gardé un état d'activation élevé, même 24h après la fin du programme d'électrostimulation. Au contraire, les effets de la stimulation électrique sur FoxO1 n'ont été observé que sur une courte durée après l'arrêt de la stimulation (2h). Ces observations renforcent le caractère aigu des effets de l'entraînement sur la protéolyse en hypoxie, et un impact plus important dans le temps sur la protéosynthèse (Brandt et al., 2016). Tout comme la stimulation mécanique, la supplémentation en acide(s) aminé(s) conduit à une stimulation des voies de la synthèse des protéines et tout particulièrement la voie Akt / mTOR, avec une augmentation de l'activation du complexe mTORC1, aussi bien dans des modèles *in vitro* de cellules musculaires en culture ou *in vivo* en normoxie (Jewell et al., 2013). L'ensemble de nos données moléculaires ont montré que contrairement aux traitements par oxygénation ou par stimulation électrique, l'incorporation de BCAAs au milieu de différenciation des cellules musculaires C2C12 sous hypoxie (4% O₂) n'a engendré que peu de variation

sur les protéines de la voie Akt / mTOR, et aucun changement positif sur les différents facteurs de la protéolyse considérés dans notre protocole (**Figure 60**). Malgré un certain nombre d'études sur la supplémentation en acides aminés dans le muscle squelettique, on ignore si l'absorption cellulaire et/ou l'action des acides aminés sont altérées dans la cellule musculaire en hypoxie (Engelen et al., 2007 ; Jewell et al., 2013 ; Waldron et al 2017).

Bien que le traitement par réoxygénation ait activé plusieurs protéines importantes de la voie Akt / mTOR, que ce soit en amont (Akt) ou en aval de mTOR (4E-BP1 et P70S6K), la supplémentation en O₂ n'a entraîné aucune variation significative des différentes protéines impliquées dans la protéolyse vue dans notre étude, renforçant ainsi un impact exclusivement anabolique de l'oxygénation pour limiter l'atrophie musculaire consécutive à un stress hypoxique (**Figure 60**). Ainsi, bien que l'activation de Akt provoque une phosphorylation des facteurs de transcription FoxOs, entraînant leur exclusion du noyau et par conséquent une inhibition de leur fonction de transcription de gènes cibles impliqués dans la protéolyse (Stitt et al., 2004), nos données indiquent que la stimulation électrique a été la seule intervention permettant de phosphoryler à la fois les protéines Akt et FoxO1 à 2h et 24h après la fin de la stimulation. Ces données sous-entendent que même dans des conditions de stress hypoxique, la cellule musculaire squelettique conserve cette sensibilité à un stress mécanique permettant d'inhiber FoxO1 par l'activation d'Akt (Léger et al., 2006).

Aucune des contre-mesures à l'atrophie musculaire en hypoxie (électrostimulation, supplémentation en BCAAs ou réoxygénation) utilisées dans notre étude n'a engendré de variation bénéfique sur l'autophagie, ni sur le système ubiquitine-protéasome, comparativement aux cellules C2C12 sous hypoxie uniquement (4% O₂ et non-traitées). Les seuls effets notables concernent les cellules musculaires ayant été traitées par stimulation électrique ou par supplémentation en BCAAs, entraînant dans un premiers temps une augmentation de l'expression de la protéine LC3-II 2h après traitements, puis un retour à un niveau d'expression similaire à celui des cellules hypoxiques non traitées après 24h. Cette baisse d'activation dans le temps a également été observée lors de l'analyse du système ubiquitine-protéasome, avec une diminution du niveau de protéines ubiquitinées entre 2h et 24h après la fin des traitements par stimulation électrique ou par supplémentation en BCAAs. La phosphorylation de FoxO1, recensée à 2h et 24h après la stimulation électrique, peut être un élément de réponse dans l'explication de la réduction des systèmes d'autophagie et ubiquitine-protéasome au cours du temps (Sandri et al., 2013). En effet, la cellule musculaire squelettique subit divers changements et adaptations lorsqu'elle est soumise à un stress hypoxique, avec notamment des modifications du métabolisme et la croissance cellulaires (Chaillou et al., 2016 ; Di carlo et al., 2004). La pénurie en oxygène a pour principale conséquence, au niveau du métabolisme de la cellule, la perturbation des processus d'oxydation des substrats, entraînant ainsi une suractivation des voies de dégradation en hypoxie afin de permettre un approvisionnement suffisant en énergie (Langen et al., 2013). La supplémentation en BCAAs des cellules C2C12 sous hypoxie pourrait ainsi compenser cette demande en substrats, ce qui expliquerait ainsi la réduction au cours du temps des deux systèmes de dégradation des protéines analysés dans notre étude.

Après avoir mis en évidence sur le plan moléculaire le caractère exclusivement anabolique du traitement par réoxygénation, notre analyse morphologique a révélé que les myotubes traités par oxygénation (c'est-à-dire un retour en normoxie, à 21% O₂) sur une durée de 2h ont maintenu un diamètre, un indice de fusion myogénique et une densité de myotubes plus élevés 48h post-traitement que les cellules musculaires hypoxiques non traitées. De nombreuses études ont démontré *in vitro* sur

des cellules musculaires qu'une réduction du niveau d'oxygène entraînait une inhibition des processus de prolifération et de maturation des myotubes, en maintenant les cellules sous hypoxie dans un état indifférencié par rapport aux cellules mises en culture dans des conditions standards de normoxie (Chaillou et al., 2016 ; Launay et al., 2010). Toutefois, une étude de Di Carlo et al a permis de mettre en évidence que l'altération de la différenciation induite par l'hypoxie peut être réversible. En effet, les cellules musculaires C2C12 initialement cultivées dans une chambre à hypoxie (1% O₂), puis transférées dans un environnement de normoxie (21% O₂) pendant 48h, ont été capables d'opérer une phase de différenciation similaire aux cellules constamment maintenues en normoxie. Ainsi les cellules musculaires gardent cette faculté de conserver la capacité de proliférer et de se différencier en réexprimant correctement les facteurs de la régulation myogénique (Di Carlo et al., 2004). Notre étude a permis de mettre en évidence pour la toute première fois qu'une courte période de réoxygénation (2h) de cellules musculaires squelettiques hypoxiques a permis de limiter l'atrophie des myotubes, et ce jusqu'à 48h après la fin du traitement. Les données recueillies, que ce soit au niveau moléculaire ou au niveau morphologique, ont permis de mettre en évidence les bénéfices que peut apporter le traitement par supplémentation en O₂ sur la différenciation et la maturation des myotubes initialement sous hypoxie (**Figure 60**).

Chez l'homme, des études ont démontré que l'entraînement physique (notamment en résistance) ou la stimulation électrique entraînent l'activation de plusieurs mécanismes responsables de l'hypertrophie musculaire (Krieger, 2010 ; Vivodtzev et al., 2012). Le programme d'électrostimulation des myotubes utilisé dans notre protocole a permis de maintenir, jusqu'à 48h après la fin de la stimulation, un diamètre et une densité de myotubes significativement supérieurs par rapport aux cellules C2C12 sous hypoxie et non traitées. Ces données morphologiques corroborent de précédentes études conduites *in vitro* sur des cellules musculaires en normoxie (21% d'O₂), montrant une augmentation du diamètre des myotubes et une amélioration de la formation de la structures sarcomériques striées des myotubes en réponse à une stimulation électrique (Fujita et al., 2007 ; Nedachi et al., 2008). Par conséquent, les adaptations anabolisantes de la cellule musculaire squelettique en réponse à une stimulation électrique observées dans un environnement de normoxie peuvent être réinvesties dans la limitation de l'atrophie des myotubes consécutive à un stress hypoxique.

En comparaison des effets de la stimulation électrique ou de la réoxygénation, la supplémentation en BCAAs n'a entraîné que peu d'effet sur la morphologie des myotubes. On remarque uniquement, 48h après incorporation, un niveau de diamètre supérieur au diamètre des myotubes sous hypoxie (4% O₂ et non-traitées). Ces résultats morphologiques peuvent s'expliquer par le faible impact des BCAAs sur les voies de synthèse et de dégradation des protéines, comme nous l'avons vu précédemment. Alors qu'en normoxie, la leucine ou d'autres acides aminés sont des activateurs directs du complexe mTORC1 (inhibant ainsi le système ubiquitine-protéasome et augmentant en parallèle les facteurs responsables de la prolifération et différenciation cellulaires (Duan et al., 2017)), il semblerait, d'après nos données, que la diminution du taux d'oxygène au niveau intracellulaire modifie et altère les effets anabolisants des acides aminés dans le muscle squelettique. Malheureusement, ces mécanismes perturbateurs en hypoxie restent encore inconnus à ce jour.

Cette seconde étude a démontré que les processus du développement de l'atrophie musculaire consécutive à une pénurie en oxygène au niveau intracellulaire peuvent-être limités, voire inversés, par l'intermédiaire d'un programme d'électrostimulation ou une courte période de

réoxygénation. L'analyse et la comparaison des différentes contre-mesures à l'atrophie des myotubes sous hypoxie a permis de mettre en évidence que le traitement par réoxygénation a un impact positif sur l'anabolisme des cellules C2C12, comparable à la stimulation électrique, et supérieur à celui de la supplémentation par acides aminés (**Figure 60**). Toutefois, parallèlement au programme par électrostimulation, le traitement par réoxygénation a été la seule condition à stimuler de façon importante plusieurs protéines de la voie Akt / mTOR, notamment les effecteurs de mTOR, les protéines 4E-BP1 et P70S6K. De plus, l'activation de ces principaux initiateurs de la protéosynthèse a été corroborée au niveau morphologique, avec le maintien dans le temps de plusieurs paramètres de la maturation cellulaire, tels que le diamètre, l'index de fusion et la densité des myotubes. Cette limitation de l'atrophie des myotubes sous hypoxie pourrait être due à une activation exclusive de la voie de synthèse Akt / mTOR, puisque les voies de dégradation considérées dans notre étude n'ont absolument pas été influencées par la période d'oxygénation. L'association de nos données moléculaires et morphologiques constituent la première preuve que l'une des principales voies de signalisation de la protéosynthèse dans le muscle squelettique, altérée consécutivement à un stress en hypoxie, reste sensible et peut-être réactivée par une courte période de supplémentation en oxygène. Ainsi, cette étude met en lumière le potentiel thérapeutique de l'oxygénothérapie chez les personnes souffrant d'une atrophie musculaire induite par une hypoxémie sévère et chronique.

Etude III : La stimulation mécanique, la supplémentation en acides aminés ou l'oxygénation dans la limitation de l'atrophie de cellules musculaires sous hypoxie.

Bien que l'exercice physique reste le traitement de référence dans la limitation de la perte de masse musculaire auprès de patients atteints de maladies respiratoires, des études menées sur la limitation de l'atrophie musculaire, basées sur des programmes de réentraînement à l'effort conventionnels tels que l'on peut observer en centre de réhabilitation, font état d'une importante disparité de réponse en fonction du type de complication et de sévérité propre à chaque patient. Ces patients sont pour la grande majorité atteints de BPCO, et souffrent d'hypoxémie ou de cachexie ([Brandt et al., 2016](#) ; [Costes et al., 2015](#) ; [Vogiatis et al., 2010](#)). Cette non-réponse du système musculaire au traitement par l'activité physique entraîne une perte de masse musculaire des sujets atteints si importante qu'elle en devient un fort prédicteur de mortalité, mettant ainsi au premier plan la prise en charge de cette atrophie musculaire comme un élément central de la stratégie thérapeutique ([Marquis et al., 2002](#) ; [Patel et al., 2014](#)). Une étude de [Costes et al.](#), démontre une importante disparité de réponse du système musculaire entre les sujets sains, et des patients BPCO hypoxémique et non hypoxémique, à la suite d'un réentraînement combinant exercice aérobie et résistance, mettant en avant une perturbation de la réponse du système musculaire à la suite d'un exercice physique, en lien avec la pénurie de l'oxygène dans la cellule musculaire ([Costes et al., 2015](#)).

Au vu des résultats et conclusions de notre seconde étude, chacune des contre-mesures testées a montré des effets bénéfiques dans la limitation de l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie (**Figure 61**). Même si les traitements par stimulation électrique ou par réoxygénation ont impacté différemment les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie protéique, tous deux ont conduit à une limitation de l'atrophie des myotubes 24h et 48h post-traitement. Dans cette troisième étude, notre objectif a été de tenter de potentialiser, de maximiser les effets bénéfiques de

l'association de plusieurs contre-mesures à l'atrophie musculaire. Notre hypothèse était que l'association d'un programme d'électrostimulation à une supplémentation en acides aminés et/ou à une période réoxygénation permettrait à des cellules musculaires C2C12 sous hypoxie (4% O₂) de bénéficier d'un maximum de stimulations anabolisantes pour leur permettre de lutter contre les effets délétères de l'hypoxie, et notamment de contrer l'atrophie musculaire.

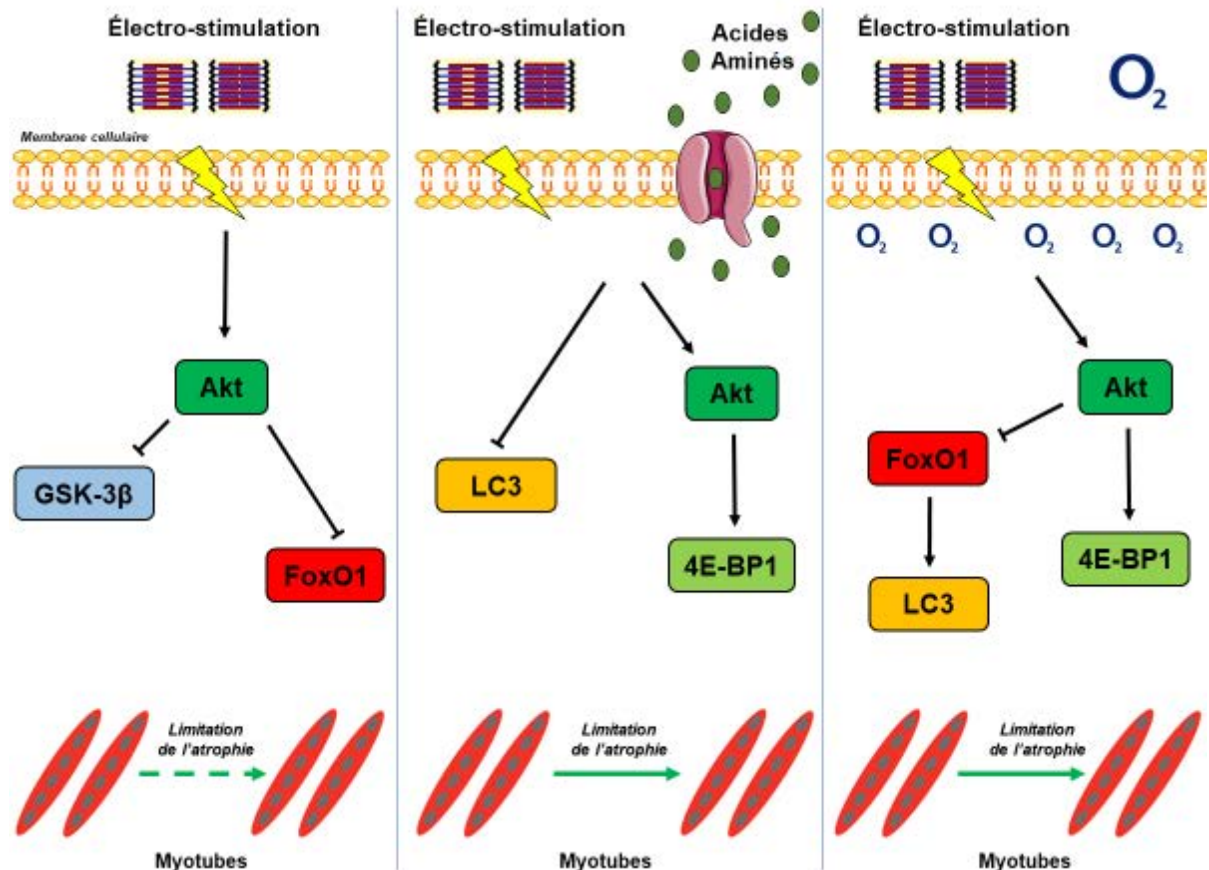


Figure 61 : Représentation schématique des effets moléculaires et morphologiques d'un traitement combinant stimulation électrique suivie d'une supplémentation en BCAAs et une période de réoxygénation sur des cellules musculaires squelettiques C2C12 sous hypoxies.

Les données recueillies concernant les effets de la stimulation électrique seule ont été similaires aux résultats obtenus lors de notre seconde étude, avec un impact positif sur les protéines Akt, GSK-3β, et facteur transcription FoxO1. L'ensemble des données recensées au niveau moléculaire et morphologique ont montré que les cellules C2C12 traitées uniquement par la stimulation électrique ont observé des réponses anabolisantes moins importantes que les cellules musculaires ayant été traitées par l'association d'au moins deux contre-mesures à l'atrophie, à savoir l'électrostimulation associée à une supplémentation en BCAAs et/ou à une réoxygénation (Figure 61). Au niveau moléculaire, la réponse anabolisante plus faible observée pour la stimulation électrique seule peut expliquer la différence d'impact observée au niveau morphologique comparativement aux conditions alliant plusieurs traitements, même si l'unique intervention de la stimulation électrique a réussi à maintenir un index de fusion et un diamètre des myotubes supérieurs à celui des cellules C2C12 sous hypoxie non traitées, mais uniquement sur un temps relativement court (24h post-stimulation). Des études réalisées en normoxie ont révélé que l'électrostimulation de cellules C2C12 a permis de

maintenir une expression élevée des MyHC-I et MyHC-II jusqu'à 48h après la fin de la stimulation, en comparaison aux cellules contrôles (Nedachi et al., 2008). Une autre étude menée sur des rats ayant suivi un protocole d'entraînement en endurance a montré, 3 jours après la dernière séance d'entraînement, une surexpression des protéines MyHC-I et MyHC-II (Burch et al., 2010). Les effets de courte durée, en deçà de 24h, de la stimulation électrique sur les cellules C2C12 sous hypoxie montre que la diminution du taux d'oxygène au niveau intracellulaire serait l'une des causes principales de l'altération des réponses anabolisantes dans le temps. L'impact catabolique engendré par l'hypoxie sur la cellule musculaire est tel que l'activation de courte durée de la voie de protéosynthèse (Akt / mTOR) ne suffit pas à contrebalancer les effets négatifs de la suractivation des voies de protéolyse (Brandt et al., 2016).

Parallèlement à la stimulation électrique seule, les cellules musculaires traitées par la combinaison d'au moins deux contre-mesures ont subi des changements d'expression ou d'état d'activation de protéines impliquées dans les voies de signalisation de la protéosynthèse et de la protéolyse. Cependant, nos données indiquent que ces variations se sont opérées en aval de ces voies, avec la suractivation de la protéine 4E-PB1 (effecteur de mTOR) et la sous-expression de la protéine LC3-II (**Figure 61**), facteur important de la voie de l'autophagie, initiée par le facteur de transcription FoxO1 (Sandri et al., 2013). Cet effet positif sur les protéines 4E-BP1 et LC3-II, de plus qu'un effet à relativement long terme au niveau cellulaire (24h), peut expliquer sur le plan morphologique une maturation et une différenciation des myotubes supérieures comparativement aux cellules non traitées ou traitées par la stimulation électrique seule, avec un diamètre et une densité de myotubes plus importants 48h post-traitements. Cette différence de réponse constatée entre stimulation électrique seule, et stimulation électrique combinée à une autre contre-mesure sur des cellules musculaires sous hypoxie, corrobore plusieurs études menées *in vitro* ou *in vivo* en normoxie. Différents travaux ont constaté une supériorité des effets anabolisants d'un stress mécanique, d'une électrostimulation de cellules musculaires en culture (Hornberger et al., 2006 ; Martin et al., 2017b) ou d'un entraînement physique chez l'homme (Atherton et al., 2017 ; Drummond et al., 2008) sur la voie de protéosynthèse lorsqu'une supplémentation en acides aminés ou à un régime riche en protéines y est associée, comparativement aux mêmes traitements pris de manière isolée (Brook et al., 2016). La combinaison d'un stress mécanique et d'une supplémentation en acides aminés entraîne sur le plan morphologique une hypertrophie accrue du muscle squelettique, symbolisée par une augmentation de la section transversale musculaire (Andersen et al., 2005 ; Hulmi et al., 2010). Cette configuration de traitement, c'est-à-dire une stimulation mécanique suivie d'une supplémentation en acides aminés, confère à la cellule musculaire un ensemble de conditions propices à son développement. L'activation des voies de protéosynthèse et l'inhibition des voies de protéolyse à la suite d'un stress mécanique et de l'apport des acides aminés nécessaires à la synthèse de nouvelles protéines, conduisent à une augmentation du processus hypertrophique du muscle squelettique (Reidy et al., 2017).

Après avoir mis en évidence la supériorité anabolisante des traitements combinant au moins deux contre-mesures à l'atrophie musculaire, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux réponses des cellules ayant été traitées par stimulation électrique suivi d'une période de réoxygénation avec ou sans supplémentation en BCAAs (**Figure 61**). L'alliance entre la stimulation électrique et la supplémentation en oxygène a entraîné le plus fort impact sur la maturation et la différenciation des myotubes, en comparaison au cellules C2C12 traitées par électrostimulation seule

ou combinée à une supplémentation en BCAAs. Les traitements associant la réoxygénation ont été les seuls à maintenir une densité des myotubes et un index de fusion myogénique supérieurs, respectivement à 24h et 48h post-traitements, par rapport aux autres conditions. De plus, les cellules ainsi traitées ont été les seules à observer un diamètre de leur myotube nettement plus élevé que celles traitées par stimulation électrique seule. Contrairement aux données que nous avons recueillies dans notre seconde étude, montrant que le traitement par réoxygénation de cellules C2C12 sous hypoxie impactait exclusivement la voie de synthèse Akt /mTOR, le fait d'avoir associé la stimulation électrique et une supplémentation en oxygène a permis de potentialiser les effets bénéfiques de chacun des deux traitements sur les voies de signalisation régulatrices de l'homéostasie protéique. La stimulation des deux versants de la balance de l'homéostasie protéique (anabolisme et catabolisme), sur des protéines clés (4E-BP1 et LC3-II) en aval de chacune des voies de signalisation, et ce sur des temps relativement longs à l'échelle cellulaire (24h post-traitements), montre l'intérêt et le potentiel de ce type d'intervention par rapport à l'utilisation de traitements isolés dans la lutte contre l'atrophie musculaire consécutive à stress en hypoxie (Brandt et al., 2016 ; Maltais et al., 2014). Au cours d'un stress mécanique prolongé, l'ensemble des voies anaboliques de la cellule musculaire est inhibé en faveur d'une suractivation des voies cataboliques, apportant ainsi l'énergie nécessaire au fonctionnement et à l'équilibre de la cellule musculaire lors de sa contraction (Bamman et al., 2017). Immédiatement à la fin d'un programme d'électrostimulation musculaire (Tsutaki et al., 2013) ou d'un entraînement physique (Atherton et al., 2015), on observe une importante réactivation des voies responsables de la protéosynthèse et une inhibition de la protéolyse. Les protéines nouvellement formées sont créées pour renouveler les cellules musculaires endommagées suite à la répétition des contractions musculaires et à renforcer l'appareil contractile en préparation à un futur stress mécanique (Atherton et al., 2015). L'impact morphologique et moléculaire plus important de la stimulation électrique suivi d'une réoxygénation découle bien entendu de la nature et des conséquences engendrées par chacun des traitements. Ce bénéfice est aussi à relier au fait d'avoir programmé la période de réoxygénation (2h à 21% O₂) immédiatement après la fin du programme d'électrostimulation des myotubes, permettant ainsi à la cellule musculaire d'exploiter au maximum les effets anabolisants du stress mécanique dans un état de normoxie, comparativement à un environnement constamment maintenu en hypoxie.

L'ensemble des données issues de notre analyse moléculaire et morphologique a révélé peu de différence entre les conditions stimulation électrique suivie d'une supplémentation en oxygène, et l'alliance des trois contre-mesures (électrostimulation, supplémentation en BCAAs et réoxygénation). À l'exception de la protéine mTOR, la combinaison des trois traitements a été l'unique intervention permettant d'entraîner une suractivation de l'un des facteurs centraux dans la voie de protéosynthèse, à savoir mTOR (**Figure 62**). Cette hyperphosphorylation de mTOR, significativement supérieure à la condition stimulation électrique seule, et le fait que la condition stimulation électrique associée à une supplémentation en BCAAs ou en oxygène n'ont engendré aucune variation du ratio p-mTOR / mTOR, démontre qu'une période de réoxygénation a possiblement permis aux BCAAs de retrouver leur action activatrice de la protéine mTOR de manière comparable à ce qui est observé en normoxie (Duan et al., 2017). Par conséquent, nous pouvons supposer que les mécanismes d'utilisation des acides aminés soient hautement dépendant du niveau d'oxygène intracellulaire dans la cellule musculaire squelettique.

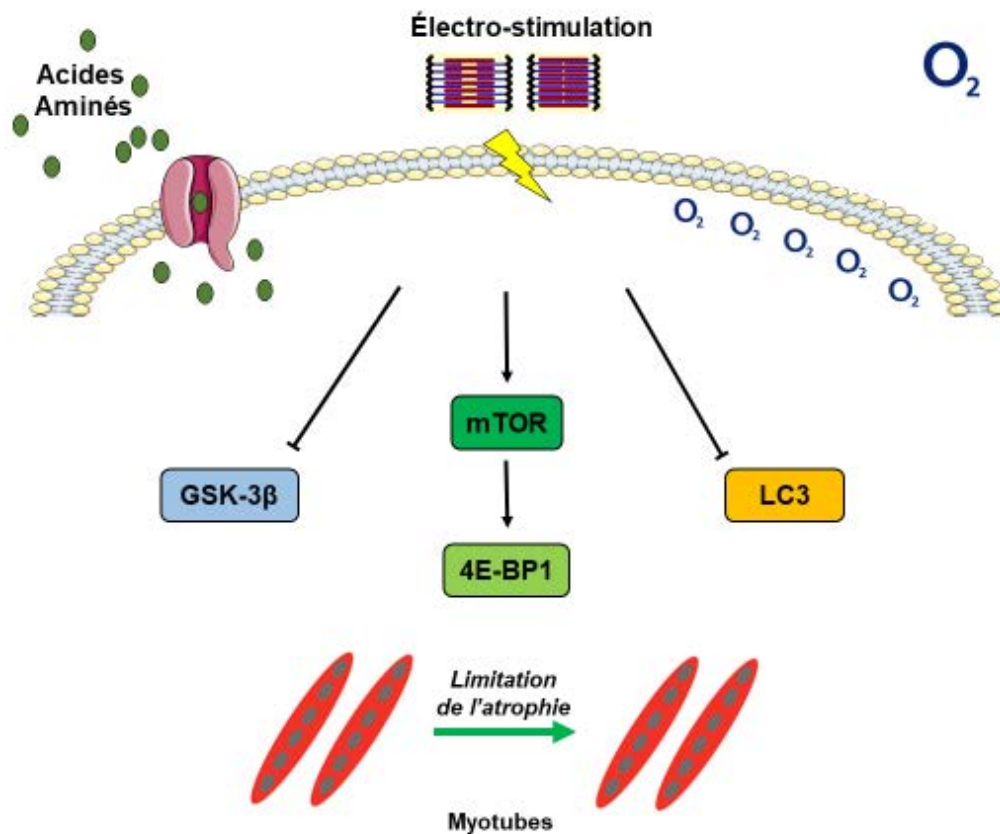


Figure 62 : Représentation schématique des effets moléculaires et morphologiques d'un traitement par stimulation électrique seul ou l'alliance de la stimulation électrique suivie d'une supplémentation en BCAAs ou une période de réoxygénation, sur des cellules musculaires squelettiques C2C12 sous hypoxies.

Pour conclure sur cette troisième étude, nous avons démontré que les conditions associant plusieurs contre-mesures à l'atrophie musculaire sur des cellules C2C12 sous hypoxie se sont avérées être des traitements ayant un impact significativement plus important sur la maturation et la différenciation des myotubes, en comparaison à l'application d'un unique traitement, telle que la stimulation électrique par exemple. Chacun des traitements faisant intervenir une période de réoxygénation post-électrostimulation ont permis un net maintien dans le temps (jusqu'à 48h) de plusieurs paramètres morphologiques (index de fusion, diamètre et densité des myotubes). De plus, cette même modalité de traitement a également entraîné conjointement une stimulation de la voie de protéosynthèse Akt / mTOR, et d'inhiber en parallèle l'un des systèmes de la dégradation des protéines (autophagie). Si l'on analyse l'ensemble des conditions testées durant ce travail de thèse, une seule contre-mesure à l'atrophie (stimulation électrique ou supplémentation en BCAAs ou réoxygénation ; Etude II), avec les différents traitements combinant plusieurs contre-mesures (Etude III), on peut s'apercevoir que la cellule musculaire adopte des processus de réponse propres à chacune des conditions testées. De plus, la réponse aux traitements combinant plusieurs contre-mesures à l'atrophie ne s'opère pas de manière arithmétique où chaque stimulus issu de chaque contre-mesure s'additionnerait aux autres. Au contraire, la réponse cellulaire serait de nature beaucoup plus complexe, résultant d'une interaction étroite en les spécificités propres à chacune des interventions, et non comme une accumulation de traitements isolés entre eux et dépourvus d'interactions.

Perspectives

Les perspectives de ce travail de thèse peuvent s'orienter dans différents champs, à savoir :

- 1. Approfondir l'impact des différentes combinaisons de contre-mesures sur les voies de signalisation régulatrices de l'homéostasie protéique en hypoxie.**
- 2. Déterminer l'influence des contre-mesures à l'atrophie musculaire sur l'activité mitochondriale et la production de stress oxydant consécutives à l'hypoxie sur les voies de signalisation en lien avec l'homéostasie protéique.**
- 3. Approfondir les effets des différentes combinaisons de contre-mesures sur un modèle rongeur en hypoxie.**

1. Approfondir l'impact des différentes combinaisons de contre-mesures sur les voies de signalisation régulatrices de l'homéostasie protéique en hypoxie

Nous avons montré dans ce travail de thèse que l'application d'une période de réoxygénation auprès de cellules musculaires C2C12 sous hypoxie entraînait une réactivation de la voie de synthèse des protéines Akt / mTOR, et ce de manière plus importante que les traitements par stimulation électrique ou par supplémentation en BCAAs. Bien que l'application d'un programme par stimulation électrique ait permis d'impacter positivement à la fois la voie Akt / mTOR, par la phosphorylation des protéines Akt et GSK-3 β , et l'un des facteurs de transcription FoxOs (FoxO1), notre analyse morphologique des myotubes a montré que les cellules musculaires ayant été traitées par réoxygénation observent une nette limitation de l'atrophie des myotubes dans le temps, jusqu'à 48h post-application. Afin de préciser et confirmer le rôle anabolisant de la supplémentation de l'oxygène sur les cellules musculaires squelettiques sous hypoxie, il faudrait évaluer avec plus de précision les régulateurs du complexe mTORC1, en lien direct avec l'hypertrophie musculaire (Jiang et al., 2013 ; Miyazaki & Takemasa, 2017). La mesure de la protéine Rheb, connue pour être l'un des principaux activateurs de mTOR, et de son inhibiteur le complexe TSC1 / TSC2, permettrait de mieux comprendre par quel mécanisme l'oxygène interagit avec l'une des voies principales de la protéosynthèse. L'analyse des protéines Rag apporterait également des données intéressantes permettant de localiser mTORC1 dans la cellule, afin d'en déterminer sa forme active (membrane lysosomale) ou inactive (cytoplasme). Afin de mettre en lien nos données intracellulaires et morphologiques, il serait également intéressant de déterminer l'impact des différentes contre-mesures sur les processus régulateurs de la myogenèse, par l'évaluation de l'expression des protéines Pax7, MyoD, myogénine, et Myf, régulatrices de la prolifération et différenciation cellulaires (Le Grand & Rudnicki, 2007).

Concernant l'évaluation des voies cataboliques, les données recueillies dans les études 2 et 3 ont montré une baisse d'activation du système d'autophagie, symbolisée par une sous-expression de la protéine LC3-II au cours du temps, entre 2h et 24h après l'application des traitements cumulés, c'est-à-dire, la stimulation électrique associée à une supplémentation en BCAA et / ou réoxygénation. L'analyse de système ubiquitine-protéasome pourrait être approfondie en quantifiant l'expression protéique par immunoblot ou la quantité d'ARNm par PCR (polymerase chain reaction) des E3 ubiquitine-ligases spécifiques dans l'atrophie du muscle squelettique, MAFbx et MuRF1 (Bodine et al., 2001). Afin de compléter notre analyse sur les effets des différentes combinaisons de traitement sur les voies régulatrices de la protéosynthèse, nous pourrions également évaluer la dégradation et le remodelage du cytosquelette des myotubes sous hypoxie par l'analyse des calpaïnes. Ces dernières pourraient apporter des renseignements supplémentaires sur l'impact des différents traitements

proposés dans nos études sur les processus de protéolyse, les calpains intervenant notamment dans la dégradation des protéines sarcomériques causée par l'hypoxie (Agrawal et al., 2018).

2. Déterminer l'influence des contre-mesures à l'atrophie musculaire sur l'activité mitochondriale et la production de stress oxydant consécutives à l'hypoxie sur les voies de signalisation en lien avec l'homéostasie protéique

Les résultats de ce travail de thèse mettent en avant qu'une supplémentation en oxygène serait l'une des clés dans le traitement de la limitation de l'atrophie musculaire consécutive à l'hypoxie. Bien que l'impact cellulaire de la diminution du taux d'oxygène ait été quantifié par l'expression du facteur de transcription HIF-1 α dans l'étude comparative des différents modes d'induction de l'hypoxie, nous n'avons effectué aucune mesure de senseurs en oxygène contenus dans la cellule musculaire pendant ou à la suite d'une supplémentation en oxygène, à savoir les mitochondries. Ainsi, nous pourrions déterminer l'impact de la réoxygénation sur les mitochondries des cellules musculaires squelettiques mises en culture, la mitochondrie étant l'un des éléments centraux dans la détection des variations de l'O₂. Ainsi, l'activité enzymatique des différents complexes composant la chaîne de transport de électrons de la mitochondrie pourra donc être évaluée, nous donnant des informations importantes sur l'efficacité de chaque complexe, et notamment celui responsable de la production d'ATP (complexe V). Il serait également intéressant de déterminer l'impact de chacun des traitements sur l'expression des protéines impliquées dans la biogenèse mitochondriale (AMPK, PGC-1 α et NRF) et la mitophagie (BNIP3) (Peterson et al., 2012). Lors d'un appauvrissement en O₂ au niveau intracellulaire, on constate une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) de la part de la mitochondrie (Huang & Manton, 2004). Ces ROS libérées agissent comme un rétro-contrôle négatif en influençant diverses voies de signalisation intracellulaires régulatrices de la biogenèse mitochondriale, ou d'autres voies de signalisation permettant notamment la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α (Sabharwal et al., 2014 ; Sullivan et al., 2013). La mesure de la production de ROS telles que le H₂O₂ ou la quantité de protéines carboxylées nous indiquerait si une courte période de réoxygénation, associé ou non à un programme d'entraînement de type aérobie, serait efficace dans la réduction de la production de ROS consécutive à l'hypoxie.

3. Approfondir les effets des différentes combinaisons de contre-mesures sur un modèle rongeur en hypoxie

L'ensemble des données que nous avons recueillies tout au long de ce travail de thèse n'est qu'un premier élément de réponse, une étape essentielle dans la compréhension mécanistique des effets de l'association d'un stress mécanique, d'une supplémentation nutritionnelle en acides aminés branchés et une période de réoxygénation dans la limitation de l'atrophie musculaire consécutive à hypoxie. Le réinvestissement de nos données dans un modèle murin en hypoxie permettrait d'apporter des réponses plus précises, tant sur le plan de l'impact de chaque traitement sur les différentes voies de signalisation responsables de l'homéostasie protéique que sur le phénotype musculaire. De plus, sur le plan de la conception méthodologique, une étude *in vivo* nous donnerait l'occasion de tester et d'affiner les différents traitements proposés dans nos études.

Ainsi, la qualité et la quantité nutritionnelles ingérées quotidiennement par les rongeurs pourraient être étroitement contrôlées, et donner lieu à plusieurs tests, en comparant l'impact de régimes

nutritionnels spécifiques et variés, avec par exemple des proportions variables de protéines, glucides et / ou lipides.

Nous pourrions également tester les effets de différents types de programme de réentraînement (endurance, intermittence, résistance) ou de combinaisons d'exercices. L'impact de ces traitements sur l'atrophie musculaire serait contrôlé à la fois au niveau moléculaire (par la quantification de protéines clés des voies de protéosynthèse et de protéolyse par immunoblot ou PCR), les analyses pouvant être réalisées sur différents types de muscles (lents, tels que le soleus, ou rapides, tels que l'EDL). Nous pourrions également compléter cette étude par l'analyse des marqueurs de la biogenèse et de l'activité mitochondriales. Enfin, l'expérimentation sur un modèle de rongeur permettrait également de réaliser un ensemble de tests fonctionnels permettant d'évaluer la performance physique des animaux et leur force, par exemple avec un test de préhension (grip test), mais également de mesurer la force et la fatigue musculaires sur muscle isolé.

La plus-value de cette étude serait donc d'apporter des données quant aux adaptations morphologiques consécutives aux différents traitements, avec des compléments de mesures tels que la composition corporelle (masse maigre et masse grasse), ainsi que le volume et le phénotypage des fibres musculaires par section transversale et marquage. De plus, sur un tel modèle d'étude, les effets des différents traitements pourraient être quantifiés et comparés dans le temps grâce à des cinétiques, permettant de mesurer l'évolution de chacune des mesures citées précédemment. Une étude *in vivo* sur le rongeur donnerait de plus accès à des mesures systémiques, telles que la quantification de certains acteurs de la réponse inflammatoire ; il serait en effet pertinent de quantifier, à la suite de nos différents traitements, certaines interleukines pro-inflammatoires spécifiques de la réponse à un stress hypoxique (IL-4, -5, -6 et -13) (Savale et al., 2009).

A plus long terme : perspective clinique de l'association de plusieurs contre-mesures dans la lutte contre l'atrophie musculaire des BPCO cachectiques

Les sujets BPCO les plus gravement atteints par un degré sévère d'atrophie et non répondeurs à des protocoles de réentraînements sont pour la majorité atteints d'hypoxie chronique (Maltais et al., 2014). L'oxygénothérapie entraîne de nombreuses améliorations en termes de tolérance à l'effort, une diminution de la dyspnée et une augmentation du périmètre de marche (Emtner et al., 2003 ; Nonoyama et al., 2007). Cependant, aucune étude ne s'est concentrée sur les effets positifs de la supplémentation en oxygène sur la régulation du système musculaire squelettique à travers l'analyse des voies de signalisation régulant l'homéostasie protéique. Les résultats de ce travail de thèse confirment que la molécule d'oxygène est un facteur important dans la régulation de l'homéostasie protéique des cellules musculaires. Sa rarification entraîne une perturbation des voies de signalisation intracellulaires entraînant un catabolisme accru de la cellule musculaire, tandis qu'une supplémentation, même de courte durée, pourrait être l'une des solutions permettant la réactivation de l'anabolisme protéique afin de limiter l'atrophie musculaire.

Ainsi, l'association d'un programme de réentraînement suivi d'une période de réoxygénation lors de la phase de récupération et d'une alimentation riche en protéines pourrait être l'une des stratégies envisageables pour la prise en charge spécifique des patients non-répondeurs aux programmes de réhabilitation traditionnels.

Il serait ainsi possible à plus long terme de mettre en place une étude clinique qui porterait sur l'évaluation d'un protocole associant les différentes contre-mesures à l'atrophie musculaire, énumérées ci-dessus. L'efficacité de chacun des protocoles de réentraînement serait analysée à

travers les mesures de la composition corporelle (masse maigre) et de la force musculaire (dynamomètre à bras et contraction maximale du quadriceps). Les tests fonctionnels, tels que la mesure de l'équilibre, la vitesse de marche et la performance de lever de chaise seraient également des marqueurs intéressants à mesurer. Cependant, plusieurs paramètres seront impérativement à prendre en compte lors de la conception et la mise en place d'un tel protocole, et en tout premier lieu, la prescription du « bon dosage d'oxygène », un surdosage en O₂ pouvant entraîner au niveau de l'organisme une surproduction de stress oxydant, responsable de lésions cellulaires et tissulaires (Deby-Dupont et al., 2002). Ensuite, le choix du type de réentraînement et le contrôle de l'intensité en fonction de chaque patient seront également des données importantes à prendre en compte dans la réussite d'un tel traitement.

Références bibliographiques

A

- Aagaard, P., Suetta, C., Caserotti, P., Magnusson, S. P., & Kjær, M. (2010).** Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scandinavian journal of medicine & science in sports, 20*(1), 49-64.
- Adams, G. R., & McCue, S. A. (1998).** Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *Journal of Applied Physiology, 84*(5), 1716-1722.
- Adams, J. (2003).** The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer treatment reviews, 29*, 3-9.
- Adams, J., Difazio, L., Rolandelli, R. H., Lujan, J., Hasko, G. Y., Csoka, B., ... & Németh, Z. (2009).** HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiologica Hungarica, 96*(1), 19-28.
- Agrawal, A., Rathor, R., Kumar, R., Suryakumar, G., & Ganju, L. (2018).** Role of altered proteostasis network in chronic hypobaric hypoxia induced skeletal muscle atrophy. *PLoS one, 13*(9), e0204283.
- Agustí, A. G., Sauleda, J., Miralles, C., Gomez, C., Togoies, B., Sala, E., ... & Busquets, X. (2002).** Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine, 166*(4), 485-489.
- Ahluwalia, A., & S Tarnawski, A. (2012).** Critical role of hypoxia sensor-HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Current medicinal chemistry, 19*(1), 90-97.
- Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., & Kholodenko, B. N. (2012).** Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance.
- Allen, D. L., & Unterman, T. G. (2007).** Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology, 292*(1), C188-C199.
- Amirouche, A., Durieux, A. C., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Mouret, C., ... & Freyssenet, D. (2008).** Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology, 150*(1), 286-294.
- Amthor, H., Otto, A., Macharia, R., McKinnell, I., & Patel, K. (2006).** Myostatin imposes reversible quiescence on embryonic muscle precursors. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 235*(3), 672-680.
- Andersen, L. L., Tufekovic, G., Zebis, M. K., Cramer, R. M., Verlaan, G., Kjær, M., ... & Aagaard, P. (2005).** The effect of resistance training combined with timed ingestion of protein on muscle fiber size and muscle strength. *Metabolism, 54*(2), 151-156.
- Andrés, V., & Walsh, K. (1996).** Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *The Journal of cell biology, 132*(4), 657-666.
- Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., ... & Hoch, M. (2010).** Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Current Biology, 20*(2), 143-148.
- Arsham, A. M., Howell, J. J., & Simon, M. C. (2003).** A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *Journal of Biological Chemistry, 278*(32), 29655-29660.
- Atherton, P. J., Smith, K., Etheridge, T., Rankin, D., & Rennie, M. J. (2010).** Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. *Amino acids, 38*(5), 1533-1539.
- Atherton, P. J., Phillips, B. E., & Wilkinson, D. J. (2015).** Exercise and regulation of protein metabolism. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 135, pp. 75-98). Academic Press.
- Atherton, P. J., Kumar, V., Selby, A. L., Rankin, D., Hildebrandt, W., Phillips, B. E., ... & Smith, K. (2017).** Enriching a protein drink with leucine augments muscle protein synthesis after resistance exercise in young and older men. *Clinical nutrition, 36*(3), 888-895.
- Attaix, D., Ventadour, S., Codran, A., Béchet, D., Taillandier, D., & Combaret, L. (2005).** The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays in biochemistry, 41*, 173-186.

Avila-George, K., Ramos-Olivares, K., Vasquez-Munoz, K., Villanueva-Morales, V., Reyes-Farias, M., Quintero, P., ... & Garcia-Diaz, D. F. (2017). Chemically induced hypoxia promotes differential outcomes over preadipocyte–or adipocyte–macrophage communication. *Archives of physiology and biochemistry*, *123*(3), 175-181.

B

Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L., & Vogt, P. K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews Cancer*, *5*(12), 921.

Bamman, M. M., Roberts, B. M., & Adams, G. R. (2017). Molecular regulation of exercise-induced muscle fiber hypertrophy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, a029751.

Band, M., Joel, A., Hernandez, A., & Avivi, A. (2009). Hypoxia-induced BNIP3 expression and mitophagy: in vivo comparison of the rat and the hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax ehrenbergi*. *The FASEB Journal*, *23*(7), 2327-2335.

Bakker, W. J., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2007). FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2. *Molecular cell*, *28*(6), 941-953.

Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2014). Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in cell biology*, *24*(7), 400-406.

Barton, E. R. (2006). Viral expression of insulin-like growth factor-I isoforms promotes different responses in skeletal muscle. *Journal of applied physiology*, *100*(6), 1778-1784.

Baumann, A. P., Ibebunjo, C., Grasser, W. A., & Paralkar, V. M. (2003). Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, *3*(1), 8-16.

Bechet, D., Tassa, A., Taillandier, D., Combaret, L., & Attaix, D. (2005). Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *37*(10), 2098-2114.

Bedessem, B., Marie-Paule, M., Hamel, M., Giroud, F., & Stéphanou, A. (2015). Effects of the Hypoxia-Mimetic Agents DFO and CoCl₂ on HeLa-Fucci Cells. *J Cell Biol Cell Metab*, *2*(1).

Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouysségur, J., & Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and cellular biology*, *29*(10), 2570-2581.

Bernier, N. J., Gorissen, M., & Flik, G. (2012). Differential effects of chronic hypoxia and feed restriction on the expression of leptin and its receptor, food intake regulation and the endocrine stress response in common carp. *Journal of Experimental Biology*, *215*(13), 2273-2282.

Bentzinger, C. F., Romanino, K., Cloëtta, D., Lin, S., Mascarenhas, J. B., Oliveri, F., ... & Zorzato, F. (2008). Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell metabolism*, *8*(5), 411-424.

Blaauw, B., Canato, M., Agatea, L., Toniolo, L., Mammucari, C., Masiero, E., ... & Reggiani, C. (2009). Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *The FASEB journal*, *23*(11), 3896-3905.

Block, B. A., Imagawa, T., Campbell, K. P., & Franzini-Armstrong, C. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *The Journal of cell biology*, *107*(6), 2587-2600.

Bolster, D. R., Crozier, S. J., Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2002). AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(27), 23977-23980.

Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K. M., Nunez, L., Clarke, B. A., ... & Pan, Z. Q. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, *294*(5547), 1704-1708.

Bodine, S. C. (2006). mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, *38*(11), 1950-1957.

Bodine, S. C., & Baehr, L. M. (2014). Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *307*(6), E469-E484.

Bostock, E. L., Morse, C. I., Winwood, K., McEwan, I., & Onambélé-Pearson, G. L. (2013). Hypo-activity induced skeletal muscle atrophy and potential nutritional interventions: a review. *World Journal of Translational Medicine*, *2*(3), 36-48.

- Bowen**, T. S., Schuler, G., & Adams, V. (2015). Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 6(3), 197-207.
- Brand**, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., ... & Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), 755-767.
- Brønstad**, E., Rognmo, Ø., Tjonna, A. E., Dedichen, H. H., Kirkeby-Garstad, I., Håberg, A. K., ... & Steinshamn, S. (2012). High intensity knee extensor training restores skeletal muscle function in COPD patients. *European Respiratory Journal*, erj01934-2011.
- Brocca**, L., Cannavino, J., Coletto, L., Biolo, G., Sandri, M., Bottinelli, R., & Pellegrino, M. A. (2012). The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *The Journal of physiology*, 590(20), 5211-5230.
- Brook**, M. S., Wilkinson, D. J., Phillips, B. E., Perez-Schindler, J., Philp, A., Smith, K., & Atherton, P. J. (2016). Skeletal muscle homeostasis and plasticity in youth and ageing: impact of nutrition and exercise. *Acta physiologica*, 216(1), 15-41.
- Brugarolas**, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., ... & Kaelin, W. G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & development*, 18(23), 2893-2904.
- Bujak**, A. L., Crane, J. D., Lally, J. S., Ford, R. J., Kang, S. J., Rebalka, I. A., ... & Steinberg, G. R. (2015). AMPK activation of muscle autophagy prevents fasting-induced hypoglycemia and myopathy during aging. *Cell metabolism*, 21(6), 883-890.
- Bunn**, H. F., & Poyton, R. O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological reviews*, 76(3), 839-885.
- Burd**, N. A., Holwerda, A. M., Selby, K. C., West, D. W., Staples, A. W., Cain, N. E., ... & Phillips, S. M. (2010). Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men. *The Journal of physiology*, 588(16), 3119-3130.

C

- Çalikoglu**, M., Şahin, G., Unlu, A., Ozturk, C., Tamer, L., Ercan, B., ... & Atik, U. (2004). Leptin and TNF-alpha levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease and their relationship to nutritional parameters. *Respiration*, 71(1), 45-50.
- Calnan**, D. R., & Brunet, A. (2008). The foxo code. *Oncogene*, 27(16), 2276.
- Campos**, G. E., Luecke, T. J., Wendeln, H. K., Toma, K., Hagerman, F. C., Murray, T. F., ... & Staron, R. S. (2002). Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *European journal of applied physiology*, 88(1-2), 50-60.
- Caron**, M. A., Thériault, M. E., Paré, M. È., Maltais, F., & Debigaré, R. (2009). Hypoxia alters contractile protein homeostasis in L6 myotubes. *FEBS letters*, 583(9), 1528-1534.
- Carpagnano**, G. E., Kharitonov, S. A., Foschino-Barbaro, M. P., Resta, O., Gramiccioni, E., & Barnes, P. J. (2004). Supplementary oxygen in healthy subjects and those with COPD increases oxidative stress and airway inflammation. *Thorax*, 59(12), 1016-1019.
- Carvalho**, A. J., McKee, N. H., & Green, H. J. (1996). Metabolic and contractile responses of fast-and slow-twitch rat skeletal muscles to ischemia. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 74(12), 1333-1341.
- Casaburi**, R., Kukafka, D., Cooper, C. B., Witek Jr, T. J., & Kesten, S. (2005). Improvement in exercise tolerance with the combination of tiotropium and pulmonary rehabilitation in patients with COPD. *Chest*, 127(3), 809-817.
- Chaillou**, T., Koulmann, N., Meunier, A., Malgoyre, A., Serrurier, B., Beaudry, M., & Bigard, X. (2013). Effect of hypoxia exposure on the phenotypic adaptation in remodelling skeletal muscle submitted to functional overload. *Acta Physiologica*, 209(4), 272-282.
- Chandel**, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., & Schumacker, P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11715-11720.

- Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., & Schumacker, P. T. (2000).** Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia a mechanism of O₂ sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25130-25138.
- Charton, K., Sarparanta, J., Vihola, A., Milic, A., Jonson, P. H., Suel, L., ... & Udd, B. (2015).** CAPN3-mediated processing of C-terminal titin replaced by pathological cleavage in titinopathy. *Human molecular genetics*, 24(13), 3718-3731.
- Chaudhary, P., Suryakumar, G., Prasad, R., Singh, S. N., Ali, S., & Ilavazhagan, G. (2012).** Chronic hypobaric hypoxia mediated skeletal muscle atrophy : role of ubiquitin–proteasome pathway and calpains. *Molecular and cellular biochemistry*, 364(1-2), 101-113.
- Chen, C. C., Jeon, S. M., Bhaskar, P. T., Nogueira, V., Sundararajan, D., Tonic, I., ... & Hay, N. (2010).** FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor. *Developmental cell*, 18(4), 592-604.
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003).** Production of reactive oxygen species by mitochondria central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36027-36031.
- Chen, C. Y., Tsai, Y. L., Kao, C. L., Lee, S. D., Wu, M. C., Mallikarjuna, K., ... & Kuo, C. H. (2010).** Effect of mild intermittent hypoxia on glucose tolerance, muscle morphology and AMPK-PGC-1 α signaling. *Chin J Physiol*, 53(1), 62-71.
- Chen, H. T., Chung, Y. C., Chen, Y. J., Ho, S. Y., & Wu, H. J. (2017a).** Effects of Different Types of Exercise on Body Composition, Muscle Strength, and IGF-1 in the Elderly with Sarcopenic Obesity. *Journal of the American Geriatrics Society*, 65(4), 827-832.
- Chen, L., Xu, B., Liu, L., Luo, Y., Zhou, H., Chen, W., ... & Huang, S. (2011a).** Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 624-632.
- Chen, R., Jiang, T., She, Y., Xu, J., Li, C., Zhou, S., ... & Liu, S. (2017b).** Effects of cobalt chloride, a hypoxia-mimetic agent, on autophagy and atrophy in skeletal C2C12 myotubes. *BioMed research international*, 2017.
- Chen, Y., Sood, S., McIntire, K., Roth, R., & Rabkin, R. (2011b).** Leucine-stimulated mTOR signaling is partly attenuated in skeletal muscle of chronically uremic rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(5), E873-E881.
- Cheng, S. W., Fryer, L. G., Carling, D., & Shepherd, P. R. (2004).** Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 15719-15722.
- Choo, A. Y., Yoon, S. O., Kim, S. G., Roux, P. P., & Blenis, J. (2008).** Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(45), 17414-17419.
- Choy, M. K., Movassagh, M., Bennett, M. R., & Foo, R. S. Y. (2010).** PKB/Akt activation inhibits p53-mediated HIF1A degradation that is independent of MDM2. *Journal of cellular physiology*, 222(3), 635-639.
- Churchward-Venne, T. A., Burd, N. A., Mitchell, C. J., West, D. W., Philp, A., Marcotte, G. R., ... & Phillips, S. M. (2012).** Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: effects on myofibrillar protein synthesis at rest and following resistance exercise in men. *The Journal of physiology*, 590(11), 2751-2765.
- Ciciliot, S., Rossi, A. C., Dyar, K. A., Blaauw, B., & Schiaffino, S. (2013).** Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(10), 2191-2199.
- Clanton, T. L. (2007).** Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 102(6), 2379-2388.
- Clarke, B. A., Drujan, D., Willis, M. S., Murphy, L. O., Corpina, R. A., Burova, E., ... & Glass, D. J. (2007).** The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell metabolism*, 6(5), 376-385.
- Clarkson, A. N., Sutherland, B. A., & Appleton, I. (2005).** The biology and pathology of hypoxia-ischemia: an update. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 53(3), 213-225.
- Cohen, P., & Frame, S. (2001).** The renaissance of GSK3. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(10), 769.
- Combaret, L., Dardevet, D., Rieu, I., Pouch, M. N., Béchet, D., Taillandier, D., ... & Attaix, D. (2005).** A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 569(2), 489-499.

Constantin, D., Menon, M. K., Houchen-Wolloff, L., Morgan, M. D., Singh, S. J., Greenhaff, P., & Steiner, M. C. (2013). Skeletal muscle molecular responses to resistance training and dietary supplementation in COPD. *Thorax*, thoraxjnl-2012.

Costes, F., Gosker, H., Feasson, L., Desgeorges, M., Kelders, M., Castells, J., ... & Freyssenet, D. (2015). Impaired exercise training-induced muscle fiber hypertrophy and Akt/mTOR pathway activation in hypoxemic patients with COPD. *Journal of applied physiology*, 118(8), 1040-1049.

Craig, R., & Woodhead, J. L. (2006). Structure and function of myosin filaments. *Current opinion in structural biology*, 16(2), 204-212.

Csibi, A., Tintignac, L. A., Leibovitch, M. P., & Leibovitch, S. A. (2008). eIF3-f function in skeletal muscles: to stand at the crossroads of atrophy and hypertrophy. *Cell cycle*, 7(12), 1698-1701.

Czech, M. P. (2000). PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell*, 100(6), 603-606.

D

Dal Negro, R. W., Aquilani, R., Bertacco, S., Boschi, F., Micheletto, C., & Tognella, S. (2016). Comprehensive effects of supplemented essential amino acids in patients with severe COPD and sarcopenia. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 73(1).

Dasarathy, S., Dodig, M., Muc, S. M., Kalhan, S. C., & McCullough, A. J. (2004). Skeletal muscle atrophy is associated with an increased expression of myostatin and impaired satellite cell function in the portacaval anastomosis rat. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(6), G1124-G1130.

Davydov, A. S. (1973). The theory of contraction of proteins under their excitation. *Journal of Theoretical Biology*, 38(3), 559-569.

D'Hulst, G., Jamart, C., Van Thienen, R., Hespel, P., Francaux, M., & Deldicque, L. (2013). Effect of acute environmental hypoxia on protein metabolism in human skeletal muscle. *Acta physiologica*, 208(3), 251-264.

Dean, N. C., Brown, J. K., Himelman, R. B., Doherty, J. J., Gold, W. M., & Stulberg, M. S. (1992). Oxygen may improve dyspnea and endurance in patients with chronic obstructive pulmonary disease and only mild hypoxemia. *American Review of Respiratory Disease*, 146, 941-941.

Deldicque, L., & Francaux, M. (2013). Acute vs. chronic hypoxia: What are the consequences for skeletal muscle mass. *Cellular and Molecular Exercise Physiology*, 2(1), e5.

DeYoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., & Ellisen, L. W. (2008). Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes & development*, 22(2), 239-251.

Debigaré, R., Marquis, K., Côté, C. H., Tremblay, R. R., Michaud, A., LeBlanc, P., & Maltais, F. (2003). Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest*, 124(1), 83-89.

Debigaré, R., Maltais, F., Côté, C. H., Michaud, A., Caron, M. A., Mofarrahi, M., ... & Hussain, S. N. (2008). Profiling of mRNA expression in quadriceps of patients with COPD and muscle wasting. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 5(2), 75-84.

Deby-Dupont, G., Deby, C., & Lamy, M. (2002). Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. *Réanimation*, 11(1), 28-39.

Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 705.

Dennis, M. D., Jefferson, L. S., & Kimball, S. R. (2012). Role of p70S6K1-mediated phosphorylation of eIF4B and PDCD4 proteins in the regulation of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42890-42899.

Deval, C., MORDIER, S., OBLED, C., BECHET, D., COMBARET, L., ATTAIX, D., & FERRARA, M. (2001). Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. *Biochemical Journal*, 360(1), 143-150.

de Boer, M. D., Maganaris, C. N., Seynnes, O. R., Rennie, M. J., & Narici, M. V. (2007). Time course of muscular, neural and tendinous adaptations to 23 day unilateral lower-limb suspension in young men. *The Journal of physiology*, 583(3), 1079-1091.

De Brandt, J., Spruit, M. A., Derave, W., Hansen, D., Vanfleteren, L. E., & Burtin, C. (2016). Changes in structural and metabolic muscle characteristics following exercise-based interventions in patients with COPD: a systematic review. *Expert review of respiratory medicine*, 10(5), 521-545

de Oca, M. M., Torres, S. H., Gonzalez, Y., Romero, E., Hernández, N., Mata, A., & Tálamo, C. (2006). Peripheral muscle composition and health status in patients with COPD. *Respiratory medicine*, 100(10), 1800-1806.

- de Theije**, C. C., Langen, R. C., Lamers, W. H., Schols, A. M., & Köhler, S. E. (2013). Distinct responses of protein turnover regulatory pathways in hypoxia-and semistarvation-induced muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 305(1), L82-L91.
- de Theije**, C. C., Langen, R. C., Lamers, W. H., Gosker, H. R., Schols, A. M., & Koehler, S. E. (2014). Differential sensitivity of oxidative and glycolytic muscles to hypoxia-induced muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 118(2), 200-211.
- Dibble**, C. C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J. M., ... & Manning, B. D. (2012). TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Molecular cell*, 47(4), 535-546.
- Dibble**, C. C., & Cantley, L. C. (2015). Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends in cell biology*, 25(9), 545-555.
- Di Carlo**, A., De Mori, R., Martelli, F., Pompilio, G., Capogrossi, M. C., & Germani, A. (2004). Hypoxia inhibits myogenic differentiation through accelerated MyoD degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16332-16338.
- Di Prampero**, P. E., & Narici, M. V. (2003). Muscles in microgravity: from fibres to human motion. *Journal of biomechanics*, 36(3), 403-412.
- Donaldson**, A. V., Maddocks, M., Martolini, D., Polkey, M. I., & Man, W. D. (2012). Muscle function in COPD: a complex interplay. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 7, 523.
- Doucet**, M., Russell, A. P., Léger, B., Debigaré, R., Joannisse, D. R., Caron, M. A., ... & Maltais, F. (2007). Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 176(3), 261-269.
- Doucet**, M., Dubé, A., Joannisse, D. R., Debigaré, R., Michaud, A., Paré, M. È., ... & Maltais, F. (2010). Atrophy and hypertrophy signalling of the quadriceps and diaphragm in COPD. *Thorax*, 65(11), 963-970.
- Drager**, J., Harvey, E. J., & Barralet, J. (2015). Hypoxia signalling manipulation for bone regeneration. *Expert reviews in molecular medicine*, 17.
- Dreyer**, H. C., Fujita, S., Cadenas, J. G., Chinkes, D. L., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2006). Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 576(2), 613-624.
- Drummond**, M. J., Dreyer, H. C., Pennings, B., Fry, C. S., Dhanani, S., Dillon, E. L., ... & Rasmussen, B. B. (2008). Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *Journal of applied physiology*, 104(5), 1452-1461.
- Duan**, C., Ren, H., & Gao, S. (2010). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *General and comparative endocrinology*, 167(3), 344-351.
- Duan**, Y., Zeng, L., Li, F., Wang, W., Li, Y., Guo, Q., ... & Yin, Y. (2017). Effect of branched-chain amino acid ratio on the proliferation, differentiation, and expression levels of key regulators involved in protein metabolism of myocytes. *Nutrition*, 36, 8-16.
- Durante**, P. E., Mustard, K. J., Park, S. H., Winder, W. W., & Hardie, D. G. (2002). Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein kinase isoforms in rat muscles. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(1), E178-E186.
- Durieux**, A. C., Amirouche, A., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Padeloup, M., ... & Freyssenet, D. (2007). Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology*, 148(7), 3140-3147.
- Dzamko**, N., Schertzer, J. D., Ryall, J. G., Steel, R., Macaulay, S. L., Wee, S., ... & Jørgensen, S. B. (2008). AMPK-independent pathways regulate skeletal muscle fatty acid oxidation. *The Journal of physiology*, 586(23), 5819-5831.
- Dziegala**, M., Kasztura, M., Kobak, K., Bania, J., Banasiak, W., Ponikowski, P., & Jankowska, E. A. (2016). Influence of the availability of iron during hypoxia on the genes associated with apoptotic activity and local iron metabolism in rat H9C2 cardiomyocytes and L6G8C5 skeletal myocytes. *Molecular medicine reports*, 14(4), 3969-3977.

E

- Eckert**, D. J., Jordan, A. S., Merchia, P., & Malhotra, A. (2007). Central sleep apnea: pathophysiology and treatment. *Chest*, 131(2), 595-607.

- Elkasrawy**, M. N., & Hamrick, M. W. (2010). Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and skeletal form. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 10(1), 56.
- Elkina**, Y., von Haehling, S., Anker, S. D., & Springer, J. (2011). The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 2(3), 143-151.
- Eliasson**, J., Elfegoun, T., Nilsson, J., Kohnke, R., Ekblom, B. T., & Blomstrand, E. (2006). Maximal lengthening contractions increase p70S6 kinase phosphorylation in human skeletal muscle in the absence of nutritional supply. *American journal of physiology-Endocrinology and metabolism*.
- Elmore**, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Engelman**, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, 7(8), 606.
- Engelen**, M. P., Rutten, E. P., De Castro, C. L., Wouters, E. F., Schols, A. M., & Deutz, N. E. (2007). Supplementation of soy protein with branched-chain amino acids alters protein metabolism in healthy elderly and even more in patients with chronic obstructive pulmonary disease-. *The American journal of clinical nutrition*, 85(2), 431-439.
- Engert**, J. C., Berglund, E. B., & Rosenthal, N. (1996). Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *The Journal of cell biology*, 135(2), 431-440.
- Emerling**, B. M., Weinberg, F., Snyder, C., Burgess, Z., Mutlu, G. M., Violette, B., ... & Chandel, N. S. (2009). Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(10), 1386-1391.
- Emtner**, M., Porszasz, J., Burns, M., Somfay, A., & Casaburi, R. (2003). Benefits of supplemental oxygen in exercise training in nonhypoxemic chronic obstructive pulmonary disease patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168(9), 1034-1042.
- Epstein**, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., ... & Tian, Y. M. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), 43-54.
- Ersahin**, T., Tuncbag, N., & Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular Biosystems*, 11(7), 1946-1954.

F

- Fabian**, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. Annual review of biochemistry, 79, 351-379.
- Favier**, F. B., Costes, F., Defour, A., Bonnefoy, R., Lefai, E., Baugé, S., ... & Freyssenet, D. (2010). Downregulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(6), R1659-R1666.
- Ferrando**, A. A., Sheffield-Moore, M., Paddon-Jones, D., Wolfe, R. R., & Urban, R. J. (2003). Differential anabolic effects of testosterone and amino acid feeding in older men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(1), 358-362.
- Ferrara**, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, 9(6), 669.
- Ferretti**, G., Berg, H. E., Minetti, A. E., Moia, C., Rampichini, S., & Narici, M. V. (2001). Maximal instantaneous muscular power after prolonged bed rest in humans. *Journal of applied physiology*, 90(2), 431-435.
- Fingar**, D. C., Richardson, C. J., Tee, A. R., Cheatham, L., Tsou, C., & Blenis, J. (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology*, 24(1), 200-216.
- Fischer**, D. R., Sun, X., Williams, A. B., Gang, G., Pritts, T. A., James, J. H., ... & Hasselgren, P. O. (2001). Dantrolene reduces serum TNFalpha and corticosterone levels and muscle calcium, calpain gene expression, and protein breakdown in septic rats. *Shock (Augusta, Ga.)*, 15(3), 200-207.
- Flicker**, P. F., Phillips Jr, G. N., & Cohen, C. (1982). Troponin and its interactions with tropomyosin: an electron microscope study. *Journal of molecular biology*, 162(2), 495-501.
- Flück**, M., & Hoppeler, H. (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. In *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* (pp. 159-216). Springer, Berlin, Heidelberg.

Foletta, V. C., White, L. J., Larsen, A. E., Léger, B., & Russell, A. P. (2011). The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 461(3), 325-335.

Franssen, F. M., Wouters, E. F., & Schols, A. M. (2002). The contribution of starvation, deconditioning and ageing to the observed alterations in peripheral skeletal muscle in chronic organ diseases. *Clinical Nutrition*, 21(1), 1-14.

Fritzen, A. M., Frøsig, C., Jeppesen, J., Jensen, T. E., Lundsgaard, A. M., Serup, A. K., ... & Kiens, B. (2016). Role of AMPK in regulation of LC3 lipidation as a marker of autophagy in skeletal muscle. *Cellular signalling*, 28(6), 663-674.

Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96(3), 183-195.

Fujita, S., Abe, T., Drummond, M. J., Cadenas, J. G., Dreyer, H. C., Sato, Y., ... & Rasmussen, B. B. (2007). Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. *Journal of applied physiology*.

G

Gallagher, P., Trappe, S., Harber, M., Creer, A., Mazzetti, S., Trappe, T., ... & Tesch, P. (2005). Effects of 84-days of bedrest and resistance training on single muscle fibre myosin heavy chain distribution in human vastus lateralis and soleus muscles. *Acta physiologica Scandinavica*, 185(1), 61-69.

Gallinetti, J., Harputlugil, E., & Mitchell, J. R. (2013). Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR. *Biochemical Journal*, 449(1), 1-10.

Gamboa, J. L., & Andrade, F. H. (2009). Mitochondrial content and distribution changes specific to mouse diaphragm after chronic normobaric hypoxia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(3), R575-R583

Garami, A., Zwartkruis, F. J., Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Stocker, H., ... & Thomas, G. (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Molecular cell*, 11(6), 1457-1466.

Gayan-Ramirez, G. (2018). Relevance of nutritional support and early rehabilitation in hospitalized patients with COPD. *Journal of thoracic disease*, 10(Suppl 12), S1400.

Gayraud-Morel, B., Chrétien, F., Flamant, P., Gomès, D., Zammit, P. S., & Tajbakhsh, S. (2007). A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Developmental biology*, 312(1), 13-28.

Gea, J., Sancho-Muñoz, A., & Chalela, R. (2018). Nutritional status and muscle dysfunction in chronic respiratory diseases: stable phase versus acute exacerbations. *Journal of thoracic disease*, 10(Suppl 12), S1332.

Gelfi, C., Vasso, M., & Cerretelli, P. (2011). Diversity of human skeletal muscle in health and disease: contribution of proteomics. *Journal of proteomics*, 74(6), 774-795.

Gilson, H., Schakman, O., Combaret, L., Lause, P., Grobet, L., Attaix, D., ... & Thissen, J. P. (2007). Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology*, 148(1), 452-460.

Girón, R., Matesanz, C., Garcia-Rio, F., De Santiago, E., Mancha, A., Rodríguez-Salvanés, F., & Ancochea, J. (2009). Nutritional state during COPD exacerbation: clinical and prognostic implications. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 54(1), 52-58.

Glass, D. J. (2003). Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nature cell biology*, 5(2), 87.

Glass, D. J. (2010). PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. In *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease* (pp. 267-278). Springer, Berlin, Heidelberg.

Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3-12.

Gomes, A. V., Potter, J. D., & Szczesna-Cordary, D. (2002). The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB life*, 54(6), 323-333.

Gonzalez, E., & McGraw, T. E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle*, 8(16), 2502-2508.

Gosker, H. R., Van Mameren, H., Van Dijk, P. J., Engelen, M. P. K. J., Van Der Vusse, G. J., Wouters, E. F. M., & Schols, A. M. W. J. (2002). Skeletal muscle fibre-type shifting and metabolic profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 19(4), 617-625.

- Gould**, D. W., Lahart, I., Carmichael, A. R., Koutedakis, Y., & Metsios, G. S. (2013). Cancer cachexia prevention via physical exercise: molecular mechanisms. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 4(2), 111-124.
- Gran**, P., & Cameron-Smith, D. (2011). The actions of exogenous leucine on mTOR signalling and amino acid transporters in human myotubes. *BMC physiology*, 11(1), 10.
- Greer**, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P., & Brunet, A. (2007). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30107-30119.
- Greijer**, A. E., & Van der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology*, 57(10), 1009-1014.
- Griffiths**, E. J., & Rutter, G. A. (2009). Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(11), 1324-1333.
- Grimes**, C. A., & Jope, R. S. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Progress in neurobiology*, 65(4), 391-426.
- Grimm**, C., Wenzel, A., Groszer, M., Mayser, H., Seeliger, M., Samardzija, M., ... & Remé, C. E. (2002). HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nature medicine*, 8(7), 718.
- Grosfeld**, A., André, J., Hauguel-de Mouzon, S., Berra, E., Pouysségur, J., & Guerre-Millo, M. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 42953-42957.
- Guenette**, J. A., Chin, R. C., Cheng, S., Dominelli, P. B., Raghavan, N., Webb, K. A., ... & O'Donnell, D. E. (2014). Mechanisms of exercise intolerance in global initiative for chronic obstructive lung disease grade 1 COPD. *European Respiratory Journal*, erj00347-2014.
- Gundersen**, K. (2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biological Reviews*, 86(3), 564-600.
- Guo**, K., Searfoss, G., Krolkowski, D., Pagnoni, M., Franks, C., Clark, K., ... & Ivashchenko, Y. (2001). Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell death and differentiation*, 8(4), 367.
- Guo**, M., Song, L. P., Jiang, Y., Liu, W., Yu, Y., & Chen, G. Q. (2006). Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1 α independent mechanisms. *Apoptosis*, 11(1), 67-77.
- Gürtler**, A., Kunz, N., Gomolka, M., Hornhardt, S., Friedl, A. A., McDonald, K., ... & Posch, A. (2013). Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Analytical biochemistry*, 433(2), 105-111.
- Guzy**, R. D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K. D., ... & Schumacker, P. T. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell metabolism*, 1(6), 401-408.

H

- Haddad**, F., & Adams, G. R. (2002). Acute cellular and molecular responses to resistance exercise. *Journal of applied physiology*.
- Hahn-Windgassen**, A., Nogueira, V., Chen, C. C., Skeen, J. E., Sonenberg, N., & Hay, N. (2005). Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32081-32089.
- Haidl**, P., Clement, C., Wiese, C., Dellweg, D., & Köhler, D. (2004). Long-term oxygen therapy stops the natural decline of endurance in COPD patients with reversible hypercapnia. *Respiration*, 71(4), 342-347.
- Hall**, Z. W., & Sanes, J. R. (1993). Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, 72, 99-121.
- Hallin**, R., Koivisto-Hursti, U. K., Lindberg, E., & Janson, C. (2006). Nutritional status, dietary energy intake and the risk of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respiratory medicine*, 100(3), 561-567.
- Hamanaka**, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in biochemical sciences*, 35(9), 505-513.

- Hameed**, M., Orrell, R. W., Cobbold, M., Goldspink, G., & Harridge, S. D. R. (2003). Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *The Journal of physiology*, 547(1), 247-254.
- Hara**, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M. T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q. P., ... & Avruch, J. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26457-26463.
- Hara**, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C., & Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14484-14494.
- Hardie**, D. G., Hawley, S. A., & Scott, J. W. (2006). AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept. *The Journal of physiology*, 574(1), 7-15.
- Hardie**, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(4), 251.
- Harrington**, L. S., Findlay, G. M., & Lamb, R. F. (2005). Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends in biochemical sciences*, 30(1), 35-42.
- Hartman**, J. W., Tang, J. E., Wilkinson, S. B., Tarnopolsky, M. A., Lawrence, R. L., Fullerton, A. V., & Phillips, S. M. (2007). Consumption of fat-free fluid milk after resistance exercise promotes greater lean mass accretion than does consumption of soy or carbohydrate in young, novice, male weightlifters. *The American journal of clinical nutrition*, 86(2), 373-381.
- Harvey**, C. B., & Williams, G. R. (2002). Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid*, 12(6), 441-446.
- Hawley**, J. A. (2002). Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 29(3), 218-222.
- Hayot**, M., Rodriguez, J., Vernus, B., Carnac, G., Jean, E., Allen, D., ... & Bonniou, A. (2011). Myostatin up-regulation is associated with the skeletal muscle response to hypoxic stimuli. *Molecular and cellular endocrinology*, 332(1-2), 38-47.
- He**, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, 43.
- Heinemeier**, K. M., Olesen, J. L., Schjerling, P., Haddad, F., Langberg, H., Baldwin, K. M., & Kjaer, M. (2007). Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. *Journal of applied physiology*, 102(2), 573-581.
- Heras-Sandoval**, D., Pérez-Rojas, J. M., Hernández-Damián, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cellular signalling*, 26(12), 2694-2701.
- Hidalgo**, M., Marchant, D., Quidu, P., Youcef-Ali, K., Richalet, J. P., Beaudry, M., ... & Launay, T. (2014). Oxygen modulates the glutathione peroxidase activity during the L6 myoblast early differentiation process. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(1), 67-77.
- Hirst**, J. (2013). Mitochondrial complex I. *Annual review of biochemistry*, 82, 551-575.
- Hollnagel**, A., Grund, C., Franke, W. W., & Arnold, H. H. (2002). The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Molecular and cellular biology*, 22(13), 4760-4770.
- Holm**, L., Olesen, J. L., Matsumoto, K., Doi, T., Mizuno, M., Alsted, T. J., ... & Kjær, M. (2008). Protein-containing nutrient supplementation following strength training enhances the effect on muscle mass, strength, and bone formation in postmenopausal women. *Journal of Applied Physiology*, 105(1), 274-281.
- Hong**, J. H., Oh, S. O., Lee, M., Kim, Y. R., Kim, D. U., Hur, G. M., ... & Park, S. K. (2001). Enhancement of lysophosphatidic acid-induced ERK phosphorylation by phospholipase D1 via the formation of phosphatidic acid. *Biochemical and biophysical research communications*, 281(5), 1337-1342.
- Hood**, D. A. (2009). Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34(3), 465-472.
- Hoppeler**, H., Kleinert, E., Schlegel, C., Claassen, H., Howald, H., Kayar, S. R., & Cerretelli, P. (1990). II. Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia. *International journal of sports medicine*, 11(S 1), S3-S9.
- Hoppeler**, H., & Vogt, M. (2001). Muscle tissue adaptations to hypoxia. *Journal of experimental biology*, 204(18), 3133-3139.
- Hoppeler**, H., Vogt, M., Weibel, E. R., & Flück, M. (2003). Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Experimental physiology*, 88(1), 109-119.
- Hornberger**, T. A., Stuppard, R., Conley, K. E., Fedele, M. J., Fiorotto, M. L., & ESSER, K. A. (2004). Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B-and growth factor-independent mechanism. *Biochemical Journal*, 380(3), 795-804.

Hornberger, T. A., Sukhija, K. B., & Chien, S. (2006). Regulation of mTOR by mechanically induced signaling events in skeletal muscle. *Cell cycle*, 5(13), 1391-1396.

Hornberger, T. A., & Chien, S. (2006). Mechanical stimuli and nutrients regulate rapamycin-sensitive signaling through distinct mechanisms in skeletal muscle. *Journal of cellular biochemistry*, 97(6), 1207-1216.

Howald, H., Hoppeler, H., Claassen, H., Mathieu, O., & Straub, R. (1985). Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflügers Archiv*, 403(4), 369-376.

Howlett, R. A., & Hogan, M. C. (2007). Effect of hypoxia on fatigue development in rat muscle composed of different fibre types. *Experimental physiology*, 92(5), 887-894.

Hu, Y. L., DeLay, M., Jahangiri, A., Molinaro, A. M., Rose, S. D., Carbonell, W. S., & Aghi, M. K. (2012). Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer research*.

Huang, H., & Manton, K. G. (2004). The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci*, 9, 1100-1117.

Huang, J., & Manning, B. D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes.

Huang, J., & Xiaoping, Z. H. U. (2016). The molecular mechanisms of calpains action on skeletal muscle atrophy. *Physiological research*, 65(4).

Huang, K., & Fingar, D. C. (2014). Growing knowledge of the mTOR signaling network. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 36, pp. 79-90). Academic Press.

Hulmi, J. J., Lockwood, C. M., & Stout, J. R. (2010). Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutrition & metabolism*, 7(1), 51.

I

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology*, 4(9), 648.

Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K. L. (2003a). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5), 577-590.

Inoki, K., Li, Y., Xu, T., & Guan, K. L. (2003b). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development*, 17(15), 1829-1834.

Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., ... & Wang, C. Y. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126(5), 955-968.

Irrcher, I., Adhietty, P. J., Joseph, A. M., Ljubicic, V., & Hood, D. A. (2003). Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise. *Sports Medicine*, 33(11), 783-793.

Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., ... & Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes & development*, 12(2), 149-162.

J

Jakobsson, P., Jorfeldt, L., & Brundin, A. (1990). Skeletal muscle metabolites and fibre types in patients with advanced chronic obstructive pulmonary disease (COPD), with and without chronic respiratory failure. *European Respiratory Journal*, 3(2), 192-196.

Janssen, D. J., Spruit, M. A., Uszko-Lencer, N. H., Schols, J. M., & Wouters, E. F. (2011). Symptoms, comorbidities, and health care in advanced chronic obstructive pulmonary disease or chronic heart failure. *Journal of palliative medicine*, 14(6), 735-743.

Jastrzebski, K., Hannan, K. M., Tchoubrieva, E. B., Hannan, R. D., & Pearson, R. B. (2007). Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth factors*, 25(4), 209-226.

Jayasinghe, I. D., & Launikonis, B. S. (2013). Three-dimensional reconstruction and analysis of the tubular system of vertebrate skeletal muscle. *J Cell Sci*, jcs-131565.

- Jensen**, K. S., Binderup, T., Jensen, K. T., Therkelsen, I., Borup, R., Nilsson, E., ... & Landberg, G. (2011). FoxO3A promotes metabolic adaptation to hypoxia by antagonizing Myc function. *The EMBO journal*, 30(22), 4554-4570.
- Jewell**, J. L., Russell, R. C., & Guan, K. L. (2013). Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(3), 133.
- Ji**, W., Wang, L., He, S., Yan, L., Li, T., Wang, J., ... & Zhang, Y. (2018). Effects of acute hypoxia exposure with different durations on activation of Nrf2-ARE pathway in mouse skeletal muscle. *PLoS one*, 13(12), e0208474.
- Jiang**, L., Xu, L., Mao, J., Li, J., Fang, L., Zhou, Y., ... & Dai, C. (2013). Rheb/mTORC1 signaling promotes kidney fibroblast activation and fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(7), 1114-1126.
- Jobin**, J., Maltais, F., Doyon, J. F., LeBlanc, P., Simard, P. M., Simard, A. A., & Simard, C. (1998). Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention*, 18(6), 432-437.
- Jolly**, E. C., Di Boscio, V., Aguirre, L., Luna, C. M., Berenzstein, S., & Gené, R. J. (2001). Effects of supplemental oxygen during activity in patients with advanced COPD without severe resting hypoxemia. *Chest*, 120(2), 437-443.
- Jung**, J. E., Lee, H. G., Cho, I. H., Chung, D. H., Yoon, S. H., Yang, Y. M., ... & Chung, M. H. (2005). STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *The FASEB Journal*, 19(10), 1296-1298.
- Jung**, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D. H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584(7), 1287-1295.

K

- Kadi**, F. (2008). Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. *British journal of pharmacology*, 154(3), 522-528.
- Kamei**, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., ... & Nishino, I. (2004). Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 41114-41123.
- Kang**, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation*, 18(4), 571.
- Karl**, J. P., Cole, R. E., Berryman, C. E., Finlayson, G., Radcliffe, P. N., Kominsky, M. T., ... & Pasiakos, S. M. (2018). Appetite Suppression and Altered Food Preferences Coincide with Changes in Appetite-Mediating Hormones During Energy Deficit at High Altitude, But Are Not Affected by Protein Intake. *High altitude medicine & biology*.
- Karovic**, O., Tonazzini, I., Rebola, N., Edström, E., Lövdahl, C., Fredholm, B. B., & Daré, E. (2007). Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes: similarities with hypoxia and role of HIF-1 α . *Biochemical pharmacology*, 73(5), 694-708.
- Kedar**, V., McDonough, H., Arya, R., Li, H. H., Rockman, H. A., & Patterson, C. (2004). Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(52), 18135-18140.
- Kemp**, B. E., Mitchell, K. I., Stapleton, D., Michell, B. J., Chen, Z. P., & Witters, L. A. (1999). Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends in biochemical sciences*, 24(1), 22-25.
- Kemp**, J. G., Blazev, R., Stephenson, D. G., & Stephenson, G. M. (2009). Morphological and biochemical alterations of skeletal muscles from the genetically obese (ob/ob) mouse. *International journal of obesity*, 33(8), 831.
- Kent**, B. D., Mitchell, P. D., & McNicholas, W. T. (2011). Hypoxemia in patients with COPD: cause, effects, and disease progression. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 6, 199.
- Kim**, A. H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T. F., & Chao, M. V. (2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology*, 21(3), 893-901.
- Kim**, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., ... & Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110(2), 163-175.

- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., & Guan, K. L. (2008).** Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology, 10*(8), 935.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., & Guan, K. L. (2008a).** Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology, 10*(8), 935.
- Kim, E. S., Lee, H., Kim, S. J., Park, J., Lee, Y. J., Park, J. S., ... & Cho, Y. J. (2018).** Effectiveness of high-flow nasal cannula oxygen therapy for acute respiratory failure with hypercapnia. *Journal of thoracic disease, 10*(2), 882.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011).** AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology, 13*(2), 132.
- Kim, J. S., Cross, J. M., & Bamman, M. M. (2005).** Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 288*(6), E1110-E1119.
- Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006).** HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism, 3*(3), 177-185.
- Kim, L. C., Cook, R. S., & Chen, J. (2017).** mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene, 36*(16), 2191.
- Kim, V., Benditt, J. O., Wise, R. A., & Sharafkhaneh, A. (2008b).** Oxygen therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society, 5*(4), 513-518.
- Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2006).** Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *The Journal of nutrition, 136*(1), 227S-231S.
- Kimura, N., Tokunaga, C., Dalal, S., Richardson, C., Yoshino, K. I., Hara, K., ... & Yonezawa, K. (2003).** A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes to cells, 8*(1), 65-79.
- Kirschbaum, B. J., Kucher, H. B., Termin, A., Kelly, A. M., & Pette, D. (1990).** Antagonistic effects of chronic low frequency stimulation and thyroid hormone on myosin expression in rat fast-twitch muscle. *Journal of Biological Chemistry, 265*(23), 13974-13980.
- Knapp, J. R., Davie, J. K., Myer, A., Meadows, E., Olson, E. N., & Klein, W. H. (2006).** Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. *Development, 133*(4), 601-610.
- Koehler, F., Doehner, W., Hoernig, S., Witt, C., Anker, S. D., & John, M. (2007).** Anorexia in chronic obstructive pulmonary disease—association to cachexia and hormonal derangement. *International journal of cardiology, 119*(1), 83-89.
- Koning, M., Werker, P. M., van Luyn, M. J., & Harmsen, M. C. (2011).** Hypoxia promotes proliferation of human myogenic satellite cells: a potential benefactor in tissue engineering of skeletal muscle. *Tissue Engineering Part A, 17*(13-14), 1747-1758.
- Koopman, R., Wagenmakers, A. J., Manders, R. J., Zorenc, A. H., Senden, J. M., Gorselink, M., ... & van Loon, L. J. (2005).** Combined ingestion of protein and free leucine with carbohydrate increases postexercise muscle protein synthesis in vivo in male subjects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 288*(4), E645-E653.
- Kosek, D. J., Kim, J. S., Petrella, J. K., Cross, J. M., & Bamman, M. M. (2006).** Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults. *Journal of applied physiology, 101*(2), 531-544.
- Kortianou, E. A., Nasis, I. G., Spetsioti, S. T., Daskalakis, A. M., & Vogiatzis, I. (2010).** Effectiveness of interval exercise training in patients with COPD. *Cardiopulmonary physical therapy journal, 21*(3), 12.
- Koyama, T., Rodrigues, M. A., Athanasiadis, A., Shingleton, A. W., & Mirth, C. K. (2014).** Nutritional control of body size through FoxO-Ultraspiracle mediated ecdysone biosynthesis. *Elife, 3*.
- Kramerova, I., Kudryashova, E., Tidball, J. G., & Spencer, M. J. (2004).** Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Human molecular genetics, 13*(13), 1373-1388.
- Krommidas, G., Kostikas, K., Papatheodorou, G., Koutsokera, A., Gourgoulianis, K. I., Roussos, C., ... & Loukides, S. (2010).** Plasma leptin and adiponectin in COPD exacerbations: associations with inflammatory biomarkers. *Respiratory medicine, 104*(1), 40-46.
- Krustrup, P., Söderlund, K., Mohr, M., & Bangsbo, J. (2004).** Slow-twitch fiber glycogen depletion elevates moderate-exercise fast-twitch fiber activity and O₂ uptake. *Medicine & Science in Sports & Exercise, 36*(6), 973-982.

Kryger, A. I., & Andersen, J. L. (2007). Resistance training in the oldest old: consequences for muscle strength, fiber types, fiber size, and MHC isoforms. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 17(4), 422-430.

Kubo, T., Gerelt, B., Han, G. D., Sugiyama, T., Nishiumi, T., & Suzuki, A. (2002). Changes in immunoelectron microscopic localization of cathepsin D in muscle induced by conditioning or high-pressure treatment. *Meat science*, 61(4), 415-418.

Kuma, A., Matsui, M., & Mizushima, N. (2007). LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy*, 3(4), 323-328.

Kushmerick, M. J., Meyer, R. A., & Brown, T. R. (1992). Regulation of oxygen consumption in fast-and slow-twitch muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 263(3), C598-C606.

L

Lacasse, Y., Tan, A. Y. M., Maltais, F., & Krishnan, J. A. (2018). Home Oxygen in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 197(10), 1254-1264.

Lagirand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M. P., Batonnet-Pichon, S., Tintignac, L. A., ... & Leibovitch, S. A. (2008). The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogen1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *The EMBO journal*, 27(8), 1266-1276.

Lai, K. M. V., Gonzalez, M., Poueymirou, W. T., Kline, W. O., Na, E., Zlotchenko, E., ... & Glass, D. J. (2004). Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Molecular and cellular biology*, 24(21), 9295-9304.

Lam, Y. A., Xu, W., DeMartino, G. N., & Cohen, R. E. (1997). Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*, 385(6618), 737.

Lambernd, S., Taube, A., Schober, A., Platzbecker, B., Görgens, S. W., Schlich, R., ... & Eckel, J. (2012). Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways. *Diabetologia*, 55(4), 1128-1139.

Langen, R. C. J., Gosker, H. R., Remels, A. H. V., & Schols, A. M. W. J. (2013). Triggers and mechanisms of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(10), 2245-2256.

Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., & Kambadur, R. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49831-49840.

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science*, 122(20), 3589-3594.

Latres, E., Amini, A. R., Amini, A. A., Griffiths, J., Martin, F. J., Wei, Y., ... & Glass, D. J. (2005). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2737-2744.

Laughlin, M. H., & Roseguini, B. (2008). Mechanisms for exercise training-induced increases in skeletal muscle blood flow capacity: differences with interval sprint training versus aerobic endurance training. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 59(Suppl 7), 71.

Launay, T., Hagström, L., Lottin-Divoux, S., Marchant, D., Quidu, P., Favret, F., ... & Beaudry, M. (2010). Blunting effect of hypoxia on the proliferation and differentiation of human primary and rat L6 myoblasts is not counteracted by Epo. *Cell proliferation*, 43(1), 1-8.

Laurentino, G. C., Ugrinowitsch, C., Roschel, H., Aoki, M. S., Soares, A. G., Neves Jr, M., ... & Tricoli, V. (2012). Strength training with blood flow restriction diminishes myostatin gene expression. *Med Sci Sports Exerc*, 44(3), 406-12.

Lecker, S. H., Solomon, V., Mitch, W. E., & Goldberg, A. L. (1999). Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *The Journal of nutrition*, 129(1), 227S-237S.

Lee, S., Park, J. B., Kim, J. H., Kim, Y., Kim, J. H., Shin, K. J., ... & Ryu, S. H. (2001). Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28252-28260.

Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., & Kim, K. W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Experimental & molecular medicine*, 36(1), 1.

- Lee, W. J., Kim, M., Park, H. S., Kim, H. S., Jeon, M. J., Oh, K. S., ... & Yoon, M.** (2006). AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR α and PGC-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 340(1), 291-295.
- Lee, D. F., Kuo, H. P., Chen, C. T., Hsu, J. M., Chou, C. K., Wei, Y., ... & He, X.** (2007). IKK β suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*, 130(3), 440-455.
- Lee, F. Y., Zhen, Y. Y., Yuen, C. M., Fan, R., Chen, Y. T., Sheu, J. J., ... & Yip, H. K.** (2017). The mTOR-FAK mechanotransduction signaling axis for focal adhesion maturation and cell proliferation. *American journal of translational research*, 9(4), 1603.
- Léger, B., Cartoni, R., Praz, M., Lamon, S., Dériaz, O., Crettenand, A., ... & Russell, A. P.** (2006). Akt signalling through GSK-3 β , mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *The Journal of physiology*, 576(3), 923-933.
- Le Grand, F., & Rudnicki, M. A.** (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current opinion in cell biology*, 19(6), 628-633.
- Lei, J., Wang, K. K., Liu, X. L., Wang, G. L., Liu, Y., Liu, M. D., & Xiao, X. Z.** (2011). Effects of Cobalt Chloride on the Expression of a Novel Gene Mipu 1 in H9c2 Cardiomyoblast. *Progress in Modern Biomedicine*, 11(1), 30-32.
- Lezon, C., Bozzini, C., Romero, A. A., Pinto, P., Champin, G., Alippi, R. M., ... & Bozzini, C. E.** (2016). Effect of chronic undernutrition on body mass and mechanical bone quality under normoxic and altitude hypoxic conditions. *British Journal of Nutrition*, 115(9), 1687-1695.
- Li, Z. B., Kollias, H. D., & Wagner, K. R.** (2008). Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *Journal of Biological Chemistry*.
- Lim, C. H., Luu, T. S., Jeong, T. S., & Kim, C. K.** (2017). Satellite cell activation and mTOR signaling pathway response to resistance and combined exercise in elite weight lifters. *European journal of applied physiology*, 117(11), 2355-2363.
- Lin, G. D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K. K., Carson, M., Jin, L., ... & Narayana, S. V.** (1997). Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nature structural biology*, 4(7), 539-547.
- Liu, L., Cash, T. P., Jones, R. G., Keith, B., Thompson, C. B., & Simon, M. C.** (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Molecular cell*, 21(4), 521-531.
- Liu, P., Gan, W., Chin, Y. R., Ogura, K., Guo, J., Zhang, J., ... & Su, B.** (2015). PtdIns (3, 4, 5) P3-dependent activation of the mTORC2 kinase complex. *Cancer discovery*, 5(11), 1194-1209.
- Lo, M. S., Lin, L. L., Yao, W. J., & Ma, M. C.** (2011). Training and detraining effects of the resistance vs. endurance program on body composition, body size, and physical performance in young men. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 25(8), 2246-2254.
- Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., & Avruch, J.** (2005). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current Biology*, 15(8), 702-713.
- López-García, J., Lehocný, M., Humpolíček, P., & Sába, P.** (2014). HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *Journal of functional biomaterials*, 5(2), 43-57.
- Lunde, I. G., Anton, S. L., Bruusgaard, J. C., Rana, Z. A., Ellefsen, S., & Gundersen, K.** (2011). Hypoxia inducible factor 1 α links fast-patterned muscle activity and fast muscle phenotype in rats. *The Journal of physiology*, 589(6), 1443-1454.
- Luo, Z., Zang, M., & Guo, W.** (2010). AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future oncology*, 6(3), 457-470.

M

- Ma, L., Dong, W., Wang, R., Li, Y., Xu, B., Zhang, J., ... & Wang, Y.** (2015). Effect of caloric restriction on the SIRT1/mTOR signaling pathways in senile mice. *Brain research bulletin*, 116, 67-72.
- Ma, Z., Qi, J., Meng, S., Wen, B., & Zhang, J.** (2013). Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *European journal of applied physiology*, 113(10), 2473-2486.
- MacDougall, J. D., Green, H. J., Sutton, J. R., Coates, G., Cymerman, A., Young, P., & Houston, C. S.** (1991). Operation Everest II: structural adaptations in skeletal muscle in response to extreme simulated altitude. *Acta physiologica Scandinavica*, 142(3), 421-427.

- Mador**, M. J., & Bozkanat, E. (2001). Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory research*, 2(4), 216.
- Mador**, M. J., Bozkanat, E., Aggarwal, A., Shaffer, M., & Kufel, T. J. (2004). Endurance and strength training in patients with COPD. *Chest*, 125(6), 2036-2045.
- Magnuson**, B., Ekim, B., & Fingar, D. C. (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochemical Journal*, 441(1), 1-21.
- Majmundar**, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*, 40(2), 294-309.
- Majmundar**, A. J., Skuli, N., Mesquita, R. C., Kim, M. N., Yodh, A. G., Nguyen-McCarty, M., & Simon, M. C. (2011). O₂ regulates skeletal muscle progenitor differentiation through PI3K/AKT signaling. *Molecular and cellular biology*, MCB-05857.
- Mammucari**, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., ... & Goldberg, A. L. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism*, 6(6), 458-471.
- Mammucari**, C., Schiaffino, S., & Sandri, M. (2008). Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy*, 4(4), 524-526.
- Man**, W. D. C., Soliman, M. G., Gearing, J., Radford, S. G., Rafferty, G. F., Gray, B. J., ... & Moxham, J. (2003). Symptoms and quadriceps fatigability after walking and cycling in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168(5), 562-567.
- Man**, W. D. C., Kemp, P., Moxham, J., & Polkey, M. I. (2009). Skeletal muscle dysfunction in COPD: clinical and laboratory observations. *Clinical science*, 117(7), 251-264.
- Manabe**, Y., Miyatake, S., Takagi, M., Nakamura, M., Okeda, A., Nakano, T., ... & Fujii, N. L. (2012). Characterization of an acute muscle contraction model using cultured C2C12 myotubes. *PLoS one*, 7(12), e52592.
- Mao**, X., Zeng, X., Wang, J., & Qiao, S. (2011). Leucine promotes leptin receptor expression in mouse C2C12 myotubes through the mTOR pathway. *Molecular biology reports*, 38(5), 3201-3206.
- Marquis**, K., Debigaré, R., Lacasse, Y., LeBlanc, P., Jobin, J., Carrier, G., & Maltais, F. (2002). Mid thigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166(6), 809-813.
- Markman**, B., Dienstmann, R., & Tabernero, J. (2010). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway—beyond rapalogs. *Oncotarget*, 1(7), 530.
- Martin**, N. R., Aguilar-Agon, K., Robinson, G. P., Player, D. J., Turner, M. C., Myers, S. D., & Lewis, M. P. (2017a). Hypoxia impairs muscle function and reduces myotube size in tissue engineered skeletal muscle. *Journal of cellular biochemistry*, 118(9), 2599-2605.
- Martin**, N. R., Turner, M. C., Farrington, R., Player, D. J., & Lewis, M. P. (2017b). Leucine elicits myotube hypertrophy and enhances maximal contractile force in tissue engineered skeletal muscle in vitro. *Journal of cellular physiology*, 232(10), 2788-2797.
- Martinet**, W., De Meyer, G. R., Herman, A. G., & Kockx, M. M. (2005). Amino acid deprivation induces both apoptosis and autophagy in murine C2C12 muscle cells. *Biotechnology letters*, 27(16), 1157-1163.
- Mascher**, H., Andersson, H., Nilsson, P. A., Ekblom, B., & Blomstrand, E. (2007). Changes in signalling pathways regulating protein synthesis in human muscle in the recovery period after endurance exercise. *Acta Physiologica*, 191(1), 67-75.
- Matsumoto**, A., Fujita, N., Arakawa, T., Fujino, H., & Miki, A. (2014). Influence of electrical stimulation on calpain and ubiquitin-proteasome systems in the denervated and unloaded rat tibialis anterior muscles. *Acta histochemica*, 116(5), 936-942.
- Mazères**, G., Leloup, L., Daury, L., Cottin, P., & Brustis, J. J. (2006). Myoblast attachment and spreading are regulated by different patterns by ubiquitous calpains. *Cell motility and the cytoskeleton*, 63(4), 193-207.
- McAllister**, R. M., Jasperse, J. L., & Laughlin, M. H. (2005). Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilation in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 98(2), 753-761.
- McCall**, G. E., Byrnes, W. C., Dickinson, A., Pattany, P. M., & Fleck, S. J. (1996). Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. *Journal of applied physiology*, 81(5), 2004-2012.
- McCroskery**, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M., & Kambadur, R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of cell biology*, 162(6), 1135-1147.
- McCubrey**, J. A., LaHair, M. M., & Franklin, R. A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10), 1775-1789.
- McFarlane, C., Plummer, E., Thomas, M., Hennebry, A., Ashby, M., Ling, N., ... & Kambadur, R. (2006). Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF- κ B-independent, FoxO1-dependent mechanism. *Journal of cellular physiology*, 209(2), 501-514.

- McFarlane**, C., Hennebry, A., Thomas, M., Plummer, E., Ling, N., Sharma, M., & Kambadur, R. (2008). Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Experimental cell research*, 314(2), 317-329.
- McGhee**, N. K., Jefferson, L. S., & Kimball, S. R. (2009). Elevated corticosterone associated with food deprivation upregulates expression in rat skeletal muscle of the mTORC1 repressor, REDD1. *The Journal of nutrition*, 139(5), 828-834.
- McKay**, B. R., O'reilly, C. E., Phillips, S. M., Tarnopolsky, M. A., & Parise, G. (2008). Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle-lengthening contractions in humans. *The Journal of physiology*, 586(22), 5549-5560.
- Megeney**, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E., & Rudnicki, M. A. (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes & development*, 10(10), 1173-1183.
- Menon**, S., Dibble, C. C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A. J., Takahashi, H., ... & Manning, B. D. (2014). Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell*, 156(4), 771-785.
- Menon**, D., Salloum, D., Bernfeld, E., Gorodetsky, E., Akselrod, A., Frias, M. A., ... & Foster, D. A. (2017). Lipid sensing by mTOR complexes via de novo synthesis of phosphatidic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 292(15), 6303-6311.
- Mescher**, A. L. (2013). *Junqueira's basic histology: text and atlas*. Mcgraw-hill.
- Milan**, G., Romanello, V., Pescatore, F., Armani, A., Paik, J. H., Frasson, L., ... & Blaauw, B. (2015). Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nature communications*, 6, 6670.
- Miyatake**, S., Bilan, P. J., Pillon, N. J., & Klip, A. (2015). Contracting C2C12 myotubes release CCL2 in an NF- κ B-dependent manner to induce monocyte chemoattraction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 310(2), E160-E170.
- Mizuno**, M., Savard, G. K., Areskog, N. H., Lundby, C., & Saltin, B. (2008). Skeletal muscle adaptations to prolonged exposure to extreme altitude: a role of physical activity? *High altitude medicine & biology*, 9(4), 311-317.
- Mizushima**, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069.
- Moerke**, N. J., Aktas, H., Chen, H., Cantel, S., Reibarkh, M. Y., Fahmy, A., ... & Halperin, J. A. (2007). Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell*, 128(2), 257-267.
- Morimoto**, R. I., & Cuervo, A. M. (2014). Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 69(Suppl_1), S33-S38.
- Morissette**, M. R., Cook, S. A., Buranasombati, C., Rosenberg, M. A., & Rosenzweig, A. (2009). Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 297(5), 1124-1132.
- Mosmann**, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mungai**, P. T., Waypa, G. B., Jairaman, A., Prakriya, M., Dokic, D., Ball, M. K., & Schumacker, P. T. (2011). Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Molecular and cellular biology*, 31(17), 3531-3545.
- Müller**, O., Sattler, T., Flötenmeyer, M., Schwarz, H., Plattner, H., & Mayer, A. (2000). Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *The Journal of cell biology*, 151(3), 519-528.
- Murphy**, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1-13.
- Musarò**, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., ... & Rosenthal, N. (2001). Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature genetics*, 27(2), 195.
- Miyazaki**, M., & Takemasa, T. (2017). TSC2/Rheb signaling mediates ERK-dependent regulation of mTORC1 activity in C2C12 myoblasts. *FEBS Open Bio*, 7(3), 424-433.

Nagata, D., Mogi, M., & Walsh, K. (2003). AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31000-31006.

Nakashima, K., & Yakabe, Y. (2007). AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(7), 1650-1656.

Nassis, G. P., Papantakou, K., Skenderi, K., Triandafillopoulou, M., Kavouras, S. A., Yannakoulia, M., ... & Sidossis, L. S. (2005). Aerobic exercise training improves insulin sensitivity without changes in body weight, body fat, adiponectin, and inflammatory markers in overweight and obese girls. *Metabolism*, 54(11), 1472-1479.

Nataneek, S. A., Gosker, H. R., Slot, I. G., Marsh, G. S., Hopkinson, N. S., Man, W. D. C., ... & Polkey, M. I. (2013). Heterogeneity of quadriceps muscle phenotype in chronic obstructive pulmonary disease (COPD); implications for stratified medicine? *Muscle & nerve*, 48(4), 488-497.

Neel, B. A., Lin, Y., & Pessin, J. E. (2013). Skeletal muscle autophagy: a new metabolic regulator. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(12), 635-643.

Neishabouri, S. H., Hutson, S. M., & Davoodi, J. (2015). Chronic activation of mTOR complex 1 by branched chain amino acids and organ hypertrophy. *Amino acids*, 47(6), 1167-1182.

Netzer, N. C., Chytra, R., & Küpper, T. (2008). Low intense physical exercise in normobaric hypoxia leads to more weight loss in obese people than low intense physical exercise in normobaric sham hypoxia. *Sleep and Breathing*, 12(2), 129-134.

Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K. I., ... & Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15461-15464.

Nonoyama, M., Brooks, D., Lacasse, Y., Guyatt, G. H., & Goldstein, R. (2007). Oxygen therapy during exercise training in chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).

Nordén, J., Grönberg, A., Bosaeus, I., Forslund, H. B., Hulthén, L., Rothenberg, E., ... & Slinde, F. (2015). Nutrition impact symptoms and body composition in patients with COPD. *European journal of clinical nutrition*, 69(2), 256.

Norton, L. E., Layman, D. K., Bunpo, P., Anthony, T. G., Brana, D. V., & Garlick, P. J. (2009). The leucine content of a complete meal directs peak activation but not duration of skeletal muscle protein synthesis and mammalian target of rapamycin signaling in rats. *The Journal of nutrition*, 139(6), 1103-1109.

Nystrom, G. J., & Lang, C. H. (2008). Sepsis and AMPK activation by AICAR differentially regulate FoxO-1, -3 and -4 mRNA in striated muscle. *International journal of clinical and experimental medicine*, 1(1), 50.

O

Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Tarry, M. J., Carter, A. P., & Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, 292(5518), 897-902.

Ohanna, M., Sobering, A. K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., ... & Pende, M. (2005). Atrophy of S6K1^{-/-} skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nature cell biology*, 7(3), 286.

O'Donnell, D. E., & Laveneziana, P. (2007). Dyspnea and activity limitation in COPD: mechanical factors. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 4(3), 225-236.

O'Neill, H. M., Maarbjerg, S. J., Crane, J. D., Jeppesen, J., Jørgensen, S. B., Schertzer, J. D., ... & Kemp, B. E. (2011). AMP-activated protein kinase (AMPK) $\beta 1\beta 2$ muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 16092-16097.

Osthoff, A. K. R., Taeymans, J., Kool, J., Marcar, V., & van Gestel, A. J. (2013). Association between peripheral muscle strength and daily physical activity in patients with COPD: a systematic literature review and meta-analysis. *Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention*, 33(6), 351-359.

Otto, A., & Patel, K. (2010). Signalling and the control of skeletal muscle size. *Experimental cell research*, 316(18), 3059-3066.

P

- Papandreou, I., Lim, A. L., Laderoute, K., & Denko, N. C. (2008).** Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell death and differentiation*, *15*(10), 1572.
- Patel, M. S., Natanek, S. A., Stratakos, G., Pascual, S., Martínez-Llorens, J., Disano, L., ... & Maltais, F. (2014).** Vastus lateralis fiber shift is an independent predictor of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *190*(3), 350-352.
- Paul, A. C., & Rosenthal, N. (2002).** Different modes of hypertrophy in skeletal muscle fibers. *The Journal of cell biology*, *156*(4), 751-760.
- Pena, C., Hurt, E., & Panse, V. G. (2017).** Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *nature structural & molecular biology*, *24*(9), 689.
- Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., ... & Thomas, G. (2004).** S6K1^{-/-}/S6K2^{-/-} mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and cellular biology*, *24*(8), 3112-3124.
- Peterson, C. M., Johannsen, D. L., & Ravussin, E. (2012).** Skeletal muscle mitochondria and aging: a review. *Journal of aging research*, *2012*.
- Pette, D., & Staron, R. S. (2000).** Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and technique*, *50*(6), 500-509.
- Phillips, M., Cataneo, R. N., Greenberg, J., Grodman, R., Gunawardena, R., & Naidu, A. (2003).** Effect of oxygen on breath markers of oxidative stress. *European Respiratory Journal*, *21*(1), 48-51.
- Pisani, D. F., & Dechesne, C. A. (2005).** Skeletal muscle HIF-1 α expression is dependent on muscle fiber type. *The Journal of general physiology*, *126*(2), 173-178.
- Polge, C., Heng, A. E., Jarzaguat, M., Ventadour, S., Claustre, A., Combaret, L., ... & Attaix, D. (2011).** Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *The FASEB Journal*, *25*(11), 3790-3802.
- Pomies, P., Rodriguez, J., Blaquièrre, M., Sedraoui, S., Gouzi, F., Carnac, G., ... & Hayot, M. (2015).** Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *Journal of cellular and molecular medicine*, *19*(1), 175-186.
- Pouysségur, J., Dayan, F., & Mazure, N. M. (2006).** Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, *441*(7092), 437.
- Pownall, M. E., Gustafsson, M. K., & Emerson Jr, C. P. (2002).** Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annual review of cell and developmental biology*, *18*(1), 747-783.
- Princiotta, M. F., Finzi, D., Qian, S. B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgerit, F., ... & Yewdell, J. W. (2003).** Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, *18*(3), 343-354.
- Puig-Vilanova, E., Martínez-Llorens, J., Ausin, P., Roca, J., Gea, J., & Barreiro, E. (2015).** Quadriceps muscle weakness and atrophy are associated with a differential epigenetic profile in advanced COPD. *Clinical Science*, *128*(12), 905-921.
- Pullen, N., & Thomas, G. (1997).** The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS letters*, *410*(1), 78-82.
- Purintrapiban, J., Wang, M. C., & Forsberg, N. E. (2003).** Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology*, *136*(3), 393-401.

R

- Raguso, C. A., Guinot, S. L., Janssens, J. P., Kayser, B., & Pichard, C. (2004).** Chronic hypoxia: common traits between chronic obstructive pulmonary disease and altitude. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *7*(4), 411-417.
- Raguso, C. A., & Luthy, C. (2011).** Nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease: role of hypoxia. *Nutrition*, *27*(2), 138-143.

- Ray**, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24(5), 981-990.
- Reed**, S. A., Senf, S. M., Cornwell, E. W., Kandarian, S. C., & Judge, A. R. (2011). Inhibition of I κ B kinase alpha (IKK α) or IKKbeta (IKK β) plus forkhead box O (Foxo) abolishes skeletal muscle atrophy. *Biochemical and biophysical research communications*, 405(3), 491-496.
- Reidy**, P. T., Fry, C. S., Dickinson, J. M., Drummond, M. J., & Rasmussen, B. B. (2017). Postexercise essential amino acid supplementation amplifies skeletal muscle satellite cell proliferation in older men 24 hours postexercise. *Physiological reports*, 5(11), e13269.
- Ren**, H., Accili, D., & Duan, C. (2010). Hypoxia converts the myogenic action of insulin-like growth factors into mitogenic action by differentially regulating multiple signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), 5857-5862.
- Rhen**, T., & Cidlowski, J. A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1711-1723.
- Richardson**, R. S., Duteil, S., Wary, C., Wray, D. W., Hoff, J., & Carlier, P. G. (2006). Human skeletal muscle intracellular oxygenation: the impact of ambient oxygen availability. *The Journal of physiology*, 571(2), 415-424.
- Richter**, E. A., & Ruderman, N. B. (2009). AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochemical Journal*, 418(2), 261-275.
- Ríos**, R., Carneiro, I., Arce, V. M., & Devesa, J. (2002). Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(5), C993-C999.
- Risau**, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671.
- Riso**, E. M., Ahtikoski, A., Alev, K., Kaasik, P., Pehme, A., & Seene, T. (2008). Relationship between extracellular matrix, contractile apparatus, muscle mass and strength in case of glucocorticoid myopathy. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 108(1-2), 117-120.
- Risson**, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., Corneloup, C., ... & Freyssenet, D. (2009). Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *The Journal of cell biology*, 187(6), 859-874.
- Röckl**, K. S., Hirshman, M. F., Brandauer, J., Fujii, N., Witters, L. A., & Goodyear, L. J. (2007). Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes*, 56(8), 2062-2069.
- Rodriguez**, J., Vernus, B., Toubiana, M., Jublanc, E., Tintignac, L., Leibovitch, S., & Bonniieu, A. (2011). Myostatin inactivation increases myotube size through regulation of translational initiation machinery. *Journal of cellular biochemistry*, 112(12), 3531-3542.
- Rodriguez**, J., Vernus, B., Chelh, I., Cassar-Malek, I., Gabillard, J. C., Sassi, A. H., ... & Bonniieu, A. (2014). Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cellular and molecular life sciences*, 71(22), 4361-4371.
- Rommel**, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., ... & Glass, D. J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology*, 3(11), 1009.
- Rossiter**, H. B., Howlett, R. A., Holcombe, H. H., Entin, P. L., Wagner, H. E., & Wagner, P. D. (2005). Age is no barrier to muscle structural, biochemical and angiogenic adaptations to training up to 24 months in female rats. *The Journal of physiology*, 565(3), 993-1005.
- Roth**, S. M., Martel, G. F., Ferrell, R. E., Metter, E. J., Hurley, B. F., & Rogers, M. A. (2003). Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Experimental biology and medicine*, 228(6), 706-709.
- Rovetta**, F., Stacchiotti, A., Faggi, F., Catalani, S., Apostoli, P., Fanzani, A., & Aleo, M. F. (2013). Cobalt triggers necrotic cell death and atrophy in skeletal C2C12 myotubes. *Toxicology and applied pharmacology*, 271(2), 196-205.
- Rudnicki**, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., & Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, 75(7), 1351-1359.

S

- Sabharwal**, S. S., & Schumacker, P. T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?. *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 709.

- Sabourin**, L. A., Girgis-Gabardo, A., Seale, P., Asakura, A., & Rudnicki, M. A. (1999). Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *The Journal of cell biology*, 144(4), 631-643.
- Sahra**, I. B., Regazzetti, C., Robert, G., Laurent, K., Le Marchand-Brustel, Y., Auberger, P., ... & Bost, F. (2011). Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer research*.
- Sahu**, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., ... & Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental cell*, 20(1), 131-139.
- Sancak**, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., ... & Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular cell*, 25(6), 903-915.
- Sancak**, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882), 1496-1501.
- Sancak**, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., & Sabatini, D. M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, 141(2), 290-303.
- Sanchez**, A. M., Csibi, A., Raibon, A., Cornille, K., Gay, S., Bernardi, H., & Candau, R. (2012). AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *Journal of cellular biochemistry*, 113(2), 695-710
- Sanchez**, A. M., Candau, R. B., & Bernardi, H. (2014). FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cellular and molecular life sciences*, 71(9), 1657-1671.
- Sandri**, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., ... & Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117(3), 399-412.
- Sandri**, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology*, 23(3), 160-170.
- Sandri**, M. (2010). Autophagy in skeletal muscle. *FEBS letters*, 584(7), 1411-1416.
- Sandri**, M. (2013). Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(10), 2121-2129.
- Sandri**, M., Barberi, L., Bijlsma, A. Y., Blaauw, B., Dyar, K. A., Milan, G., ... & Pion, D. (2013). Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle. The role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology*, 14(3), 303-323.
- Sarbassov**, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., ... & Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology*, 14(14), 1296-1302.
- Sartori**, R., Gregorevic, P., & Sandri, M. (2014). TGFβ and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(9), 464-471.
- Sasai**, N., Agata, N., Inoue-Miyazu, M., Kawakami, K., Kobayashi, K., Sokabe, M., & Hayakawa, K. (2010). Involvement of PI3K/Akt/TOR pathway in stretch-induced hypertrophy of myotubes. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 41(1), 100-106.
- Sato**, T., Umetsu, A., & Tamanoi, F. (2008). Characterization of the Rheb-mTOR signaling pathway in mammalian cells: constitutive active mutants of Rheb and mTOR. *Methods in enzymology*, 438, 307-320.
- Sato**, Y., Asoh, T., Honda, Y., Fujimatsu, Y., Higuchi, I., & Oizumi, K. (1997). Morphologic and histochemical evaluation of muscle in patients with chronic pulmonary emphysema manifesting generalized emaciation. *European neurology*, 37(2), 116-121.
- Savale**, L., Tu, L., Rideau, D., Izziki, M., Maitre, B., Adnot, S., & Eddahibi, S. (2009). Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respiratory research*, 10(1), 6.
- Scaringi**, R., Piccoli, M., Papini, N., Cirillo, F., Conforti, E., Bergante, S., ... & Menicanti, L. (2013). NEU3 sialidase is activated under hypoxia and protects skeletal muscle cells from apoptosis through the activation of the epidermal growth factor receptor signaling pathway and the hypoxia-inducible factor (HIF)-1α. *Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 3153-3162.
- Schachat**, F. H., Diamond, M. S., & Brandt, P. W. (1987). Effect of different troponin T-tropomyosin combinations on thin filament activation. *Journal of molecular biology*, 198(3), 551-554.
- Schakman**, O., Gilson, H., Kalista, S., & Thissen, J. P. (2009). Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. *Hormone Research in Paediatrics*, 72(Suppl. 1), 36-41.
- Schena**, F., Guerrini, F., Tregnaghi, P., & Kayser, B. (1992). Branched-chain amino acid supplementation during trekking at high altitude. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 65(5), 394-398.

- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011).** Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*, 91(4), 1447-1531.
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013).** Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS journal*, 280(17), 4294-4314.
- Schoenfeld, B. J. (2010).** The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 24(10), 2857-2872.
- Schneider, A., Younis, R. H., & Gutkind, J. S. (2008).** Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*, 10(11), 1295-1302.
- Schuelke, M., Wagner, K. R., Stolz, L. E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., ... & Lee, S. J. (2004).** Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *New England Journal of Medicine*, 350(26), 2682-2688.
- Schulman, B. A., & Harper, J. W. (2009).** Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(5), 319.
- Schwaller, B., Dick, J., Dhoot, G., Carroll, S., Vrbova, G., Nicotera, P., ... & Celio, M. R. (1999).** Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 276(2), C395-C403.
- Scott, D., Blizzard, L., Fell, J., Giles, G., & Jones, G. (2010).** Associations between dietary nutrient intake and muscle mass and strength in community-dwelling older adults: the Tasmanian Older Adult Cohort study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 58(11), 2129-2134.
- Semenza, G. L. (1998).** Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Current opinion in genetics & development*, 8(5), 588-594.
- Semenza, G. L. (2001).** HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current opinion in cell biology*, 13(2), 167-171.
- Semenza, G. L. (2002).** HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 8(4), S62-S67.
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012).** Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2), 158-167.
- Sengupta, S., Peterson, T. R., & Sabatini, D. M. (2010).** Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular cell*, 40(2), 310-322.
- Settembre, C., & Ballabio, A. (2014).** Lysosome: regulator of lipid degradation pathways. *Trends in cell biology*, 24(12), 743-750.
- Seynnes, O. R., de Boer, M., & Narici, M. V. (2007).** Early skeletal muscle hypertrophy and architectural changes in response to high-intensity resistance training. *Journal of applied physiology*, 102(1), 368-373.
- Shortreed, K. E., Krause, M. P., Huang, J. H., Dhanani, D., Moradi, J., Ceddia, R. B., & 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(10), e7293.
- Simler, N., Grosfeld, A., Peinnequin, A., Guerre-Millo, M., & Bigard, A. X. (2006).** Leptin receptor-deficient obese Zucker rats reduce their food intake in response to hypobaric hypoxia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290(3), E591-E597.
- Simoneau, J. A., & Bouchard, C. L. A. U. D. E. (1989).** Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 257(4), E567-E572.
- Singh, S. N., Vats, P., Shyam, R., Suri, S., Kumria, M. M. L., Ranganathan, S., ... & Selvamurthy, W. (2001).** Role of neuropeptide Y and galanin in high altitude induced anorexia in rats. *Nutritional neuroscience*, 4(4), 323-331.
- Sjodin, B., & Jansson, E. (1993).** Muscle fibre type changes with sprint training: effect of training pattern. *Acta Physiol Scand*, 149, 245-246.
- Smith, E. M., Finn, S. G., Tee, A. R., Browne, G. J., & Proud, C. G. (2005).** The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *Journal of Biological Chemistry*.
- Snijders, T., Verdijk, L. B., & van Loon, L. J. (2009).** The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing research reviews*, 8(4), 328-338.
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C. M., & Ellisen, L. W. (2005).** Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Molecular and cellular biology*, 25(14), 5834-5845.
- Song, G., Ouyang, G., & Bao, S. (2005).** The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine*, 9(1), 59-71.

- Southgate**, R. J., Neill, B., Prelovsek, O., El-Osta, A., Kamei, Y., Miura, S., ... & Febbraio, M. A. (2007). FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21176-21186.
- Stark**, M., Lukaszuk, J., Prawitz, A., & Salacinski, A. (2012). Protein timing and its effects on muscular hypertrophy and strength in individuals engaged in weight-training. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9(1), 54.
- Stitt**, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyeva, Y., Kline, W. O., ... & Glass, D. J. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular cell*, 14(3), 395-403.
- Stoller**, J. K., Panos, R. J., Krachman, S., Doherty, D. E., & Make, B. (2010). Oxygen therapy for patients with COPD: current evidence and the long-term oxygen treatment trial. *Chest*, 138(1), 179-187.
- Stump**, C. S., Short, K. R., Bigelow, M. L., Schimke, J. M., & Nair, K. S. (2003). Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7996-8001.
- Sullivan**, L. B., Martinez-Garcia, E., Nguyen, H., Mullen, A. R., Dufour, E., Sudarshan, S., ... & Chandel, N. S. (2013). The proto-oncometabolite fumarate binds glutathione to amplify ROS-dependent signaling. *Molecular cell*, 51(2), 236-248.
- Sun**, Q., Fan, W., & Zhong, Q. (2009). Regulation of Beclin 1 in autophagy. *Autophagy*, 5(5), 713-716.

T

- Tamaki**, T., Akatsuka, A., Tokunaga, M., Ishige, K., Uchiyama, S., & Shiraiishi, T. (1997). Morphological and biochemical evidence of muscle hyperplasia following weight-lifting exercise in rats. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 273(1), C246-C256.
- Tan**, C. Y., & Hagen, T. (2013). Post-translational regulation of mTOR complex 1 in hypoxia and reoxygenation. *Cellular signalling*, 25(5), 1235-1244.
- Tanida**, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. In *Autophagosome and Phagosome* (pp. 77-88). Humana Press.
- Tanner**, C. J., Barakat, H. A., Dohm, G. L., Pories, W. J., MacDonald, K. G., Cunningham, R. G., ... & Houmard, J. A. (2002). Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*.
- Tarum**, J., Folkesson, M., Atherton, P. J., & Kadi, F. (2017). Electrical pulse stimulation: an in vitro exercise model for the induction of human skeletal muscle cell hypertrophy. A proof-of-concept study. *Experimental physiology*, 102(11), 1405-1413.
- Taylor**, W. E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard Jr, D. H., ... & Gonzalez-Cadavid, N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 280(2), E221-E228.
- Terzis**, G., Spengos, K., Mascher, H., Georgiadis, G., Manta, P., & Blomstrand, E. (2010). The degree of p70S6k and S6 phosphorylation in human skeletal muscle in response to resistance exercise depends on the training volume. *European journal of applied physiology*, 110(4), 835-843.
- Testelmans**, D., Crul, T., Maes, K., Agten, A. N. O. U. K., Crombach, M. A. R. K., Decramer, M., & Gayan-Ramirez, G. (2009). Atrophy and hypertrophy signaling in the diaphragm of patients with COPD. *European Respiratory Journal*.
- Tintignac**, L. A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M. P., & Leibovitch, S. A. (2005). Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2847-2856.
- Toigo**, M., & Boutellier, U. (2006). New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. *European journal of applied physiology*, 97(6), 643-663.
- Tortora**, G. J., & Derrickson, B. (2017). *Principles of anatomy & physiology*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Trappe**, S., Trappe, T., Gallagher, P., Harber, M., Alkner, B., & Tesch, P. (2004). Human single muscle fibre function with 84 day bed-rest and resistance exercise. *The Journal of physiology*, 557(2), 501-513.
- Trendelenburg**, A. U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S., & Glass, D. J. (2009). Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296(6), C1258-C1270.

Tripet, B., Van Eyk, J. E., & Hodges, R. S. (1997). Mapping of a second actin-tropomyosin and a second troponin C binding site within the C terminus of troponin I, and their importance in the Ca²⁺-dependent regulation of muscle contraction. *Journal of molecular biology*, 271(5), 728-750.

Troosters, T., Sciruba, F., Battaglia, S., Langer, D., Valluri, S. R., Martino, L., ... & Decramer, M. (2010). Physical inactivity in patients with COPD, a controlled multi-center pilot-study. *Respiratory medicine*, 104(7), 1005-1011.

Tschöp, M., & Morrison, K. M. (2001). Weight loss at high altitude. In *Hypoxia* (pp. 237-247). Springer, Boston, MA.

Tsutaki, A., Ogasawara, R., Kobayashi, K., Lee, K., Kouzaki, K., & Nakazato, K. (2013). Effect of intermittent low-frequency electrical stimulation on the rat gastrocnemius muscle. *BioMed research international*, 2013.

Tzivion, G., Dobson, M., & Ramakrishnan, G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(11), 1938-1945.

V

van der Velden, J. L., Schols, A. M., Willems, J., Kelders, M. C., & Langen, R. C. (2008). Glycogen synthase kinase 3 β suppresses myogenic differentiation through negative regulation of NFATc3. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 358-366.

Verdijk, L. B., Gleeson, B. G., Jonkers, R. A., Meijer, K., Savelberg, H. H., Dendale, P., & van Loon, L. J. (2009). Skeletal muscle hypertrophy following resistance training is accompanied by a fiber type-specific increase in satellite cell content in elderly men. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 64(3), 332-339.

Vermeeren, M. A. P., Creutzberg, E. C., Schols, A. M. W. J., Postma, D. S., Pieters, W. R., Roldaan, A. C., ... & COSMIC Study Group. (2006). Prevalence of nutritional depletion in a large out-patient population of patients with COPD. *Respiratory medicine*, 100(8), 1349-1355.

Vilaró, J., Ramirez-Sarmiento, A., Martínez-Llorens, J. M., Mendoza, T., Alvarez, M., Sánchez-Cayado, N., ... & Roca, J. (2010). Global muscle dysfunction as a risk factor of readmission to hospital due to COPD exacerbations. *Respiratory medicine*, 104(12), 1896-1902.

Vogt, M., Puntchart, A., Geiser, J., Zuleger, C., Billeter, R., & Hoppeler, H. (2001). Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *Journal of applied physiology*, 91(1), 173-182.

Vogiatzis, I., Simoes, D. C., Stratakos, G., Kourepini, E., Terzis, G., Manta, P., ... & Zakyntinos, S. (2010). Effect of pulmonary rehabilitation on muscle remodelling in cachectic patients with COPD. *European Respiratory Journal*.

Vogiatzis, I., Terzis, G., Stratakos, G., Cherouveim, E., Athanasopoulos, D., Spetsioti, S., ... & Zakyntinos, S. (2011). Effect of pulmonary rehabilitation on peripheral muscle fiber remodeling in patients with COPD in GOLD stages II to IV. *Chest*, 140(3), 744-752.

Vyas, D. R., Spangenburg, E. E., Abraha, T. W., Childs, T. E., & Booth, F. W. (2002). GSK-3 β negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 283(2), C545-C551.

W

Wadell, K., Henriksson-Larsén, K., & Lundgren, R. (2001). Physical training with and without oxygen in patients with chronic obstructive pulmonary disease and exercise-induced hypoxaemia. *Journal of rehabilitation medicine*, 33(5), 200-205.

Wadley, G. D., Lee-Young, R. S., Canny, B. J., Wasuntarawat, C., Chen, Z. P., Hargreaves, M., ... & McConell, G. K. (2006). Effect of exercise intensity and hypoxia on skeletal muscle AMPK signaling and substrate metabolism in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290(4), E694-E702.

Waldron, M., Whelan, K., Jeffries, O., Burt, D., Howe, L., & Patterson, S. D. (2017). The effects of acute branched-chain amino acid supplementation on recovery from a single bout of hypertrophy exercise in resistance-trained athletes. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 42(6), 630-636.

Warrick, H. M., & Spudich, J. A. (1987). Myosin structure and function in cell motility. *Annual review of cell biology*, 3(1), 379-421.

Webster, K. A. (2003). Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 206(17), 2911-2922.

Welle, S., Burgess, K., & Mehta, S. (2009). Stimulation of skeletal muscle myofibrillar protein synthesis, p70 S6 kinase phosphorylation, and ribosomal protein S6 phosphorylation by inhibition of myostatin in mature mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(3), E567-E572.

Welsh, G. I., Stokes, C. M., Wang, X., Sakaue, H., Ogawa, W., Kasuga, M., & Proud, C. G. (1997). Activation of translation initiation factor eIF2B by insulin requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Febs Letters*, 410(2-3), 418-422.

Wenger, R. H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB journal*, 16(10), 1151-1162.

Wheaton, W. W., & Chandel, N. S. (2010). Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(3), C385-C393.

Whittemore, L. A., Song, K., Li, X., Aghajanian, J., Davies, M., Girgenrath, S., ... & Maylor, R. (2003). Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochemical and biophysical research communications*, 300(4), 965-971.

Wilkinson, S. B., Tarnopolsky, M. A., Grant, E. J., Correia, C. E., & Phillips, S. M. (2006). Hypertrophy with unilateral resistance exercise occurs without increases in endogenous anabolic hormone concentration. *European journal of applied physiology*, 98(6), 546-555.

Williamson, D. L., Bolster, D. R., Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2006). Time course changes in signaling pathways and protein synthesis in C2C12 myotubes following AMPK activation by AICAR. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 291(1), E80-E89.

Wilson, J. M., Loenneke, J. P., Jo, E., Wilson, G. J., Zourdos, M. C., & Kim, J. S. (2012). The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 26(6), 1724-1729.

Wood, I. S., Wang, B., Lorente-Cebrián, S., & Trayhurn, P. (2007). Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 361(2), 468-473.

Wright, W. E., Sassoon, D. A., & Lin, V. K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*, 56(4), 607-617.

Wrobel, J. P., Thompson, B. R., & Williams, T. J. (2012). Mechanisms of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: a pathophysiologic review. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 31(6), 557-564.

Wullschlegel, S., Loewith, R., Oppliger, W., & Hall, M. N. (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30697-30704.

X

Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology*, 9(10), 1102.

Xu, J., Li, R., Workeneh, B., Dong, Y., Wang, X., & Hu, Z. (2012). Transcription factor FoxO1, the dominant mediator of muscle wasting in chronic kidney disease, is inhibited by microRNA-486. *Kidney international*, 82(4), 401-411.

Y

Yaffe, D., & Saxel, O. R. A. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639), 725.

Yoon, G., Kim, H. J., Yoon, Y. S., Cho, H., Lim, I. K., & Lee, J. H. (2002). Iron chelation-induced senescence-like growth arrest in hepatocyte cell lines: association of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1)-mediated p27Kip1 expression. *Biochemical Journal*, 366(Pt 2), 613.

Yoon, M. S. (2017). mTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle mass. *Frontiers in physiology*, 8, 788.

You, J. S., Anderson, G. B., Dooley, M. S., & Hornberger, T. A. (2015). The role of mTOR signaling in the regulation of protein synthesis and muscle mass during immobilization in mice. *Disease models & mechanisms*, 8(9), 1059-1069

Yun, Z., Lin, Q., & Giaccia, A. J. (2005). Adaptive myogenesis under hypoxia. *Molecular and cellular biology*, 25(8), 3040-3055.

Yuan, T. L., Wulf, G., Burga, L., & Cantley, L. C. (2011). Cell-to-cell variability in PI3K protein level regulates PI3K-AKT pathway activity in cell populations. *Current biology*, 21(3), 173-183.

Z

Zammit, P. S., Relaix, F., Nagata, Y., Ruiz, A. P., Collins, C. A., Partridge, T. A., & Beauchamp, J. R. (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of cell science*, 119(9), 1824-1832

Zanchi, N. E., & Lancha, A. H. (2008). Mechanical stimuli of skeletal muscle: implications on mTOR/p70s6k and protein synthesis. *European journal of applied physiology*, 102(3), 253-263.

Zanchi, N. E., de Siqueira Filho, M. A., Lira, F. S., Rosa, J. C., Yamashita, A. S., de Oliveira Carvalho, C. R., ... & Lancha-Jr, A. H. (2009). Chronic resistance training decreases MuRF-1 and Atrogin-1 gene expression but does not modify Akt, GSK-3 β and p70S6K levels in rats. *European journal of applied physiology*, 106(3), 415-423.

Zanou, N., & Gailly, P. (2013). Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(21), 4117-4130.

Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., ... & Goldberg, A. L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism*, 6(6), 472-483.

Zhang, L., Wang, X. H., Wang, H., Du, J., & Mitch, W. E. (2010). Satellite cell dysfunction and impaired IGF-1 signaling cause CKD-induced muscle atrophy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(3), 419-427.

Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J., & Rishi, A. K. (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(11), 1978-1986.

Zong, H., Ren, J. M., Young, L. H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M. J., & Shulman, G. I. (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(25), 15983-15987.