50376 2004 201

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE U.F.R. DE BIOLOGIE

THÈSE Présentée pa

Présentée par

Cyrille BOZZO



Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE Label Européen Discipline : « Sciences de la Vie et de la Santé »

VARIATIONS DE PHOSPHORYLATION DE LA CHAÎNE LÉGÈRE DE MYOSINE EN RELATION AVEC LA PLASTICITÉ DU MUSCLE SQUELETTIQUE

VARIATIONS IN MYOSIN LIGHT CHAIN PHOSPHORYLATION IN RELATION TO SKELETAL MUSCLE PLASTICITY

JURY

M. Xavier Bigard Docteur, C.R.S.S.A., Grenoble

M. Carlo Reggiani Professeur, Université de Padoue

M. Ger Stienen Professeur, Université d'Amsterdam

Mme Guillemette Gauquelin-Koch Docteur, CNES Paris

Mme Yvonne Mounier Professeur, Université de Lille I

Melle Laurence Stevens Professeur, Université de Lille I Rapporteur Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Directeur

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire de Lille I et au Laboratoire de Biophysique Musculaire de Padoue.

REMERCIEMENTS

Remercier à sa juste valeur n'est jamais facile. Et ces quelques phrases ne seront que des mots qui ne traduiront qu'en partie les sentiments qu'ils se veulent définir. Pourtant, il est nécessaire de dépasser les notions de pudeur et de hiérarchie afin de rendre à qui de droit, ce qu'elle ou il m'a apporté. Les relations humaines sont régies par diverses règles comme le sens moral et le respect d'autrui, et ces valeurs qui m'ont été inculquées et que ma faible expérience a bonifié, me dictent ces quelques paroles :

Je remercie Madame le Professeur Yvonne Mounier de m'avoir accueilli dans le Laboratoire lorsqu'elle en était responsable, et de m'avoir intégré à son équipe de recherche. Au même titre, je remercie Monsieur le Professeur Maurice Falempin d'avoir poursuivi cette formation. Je n'oublierai pas facilement vos discours qui m'ont permis de développer un sens critique plus mûr et mieux adapté au milieu professionnel.

Comprendre ce que l'on fait et développer des idées de recherches intellectuellement valables n'est pas chose aisée lors d'un doctorat, principalement au début. Pour cela, l'encadrement de Mademoiselle le Professeur Laurence Stevens aura été très pédagogique et chaleureux. Laurence, tes qualités humaines se ressentent grandement au niveau du travail. Merci, profondément, et finalement, je préfère nettement le tutoiement au vouvoiement.

Je remercie Monsieur le Professeur Carlo Reggiani, qui m'a permis de bénéficier de toute son expérience et de son soutien lors mon intégration dans ce charmant pays qu'est l'Italie. Carissimo Carlo, sei stato per me di grande aiuto, soprattutto durante i periodi sgradevoli che ho conosciuto, ma anche quando tutto funzionava al meglio. Per tutto questo, e per l'impegno che aggiungi ancora adesso ti esprimo la mia più profunda stima.

Je remercie tous les membres de mon jury, Madame le Docteur Guillemette Gauquelin-Koch, Monsieur le Professeur Ger Stienen, Monsieur le Docteur Xavier Bigard ainsi que Monsieur le Professeur Carlo Reggiani, Madame le Professeur Yvonne Mounier et Mademoiselle le Professeur Laurence Stevens pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon mémoire de thèse, pour le temps qu'il s ont consacré à sa lecture, et pour s'être déplacés pour participer à ma soutenance.

Je remercie aussi Messieurs les Professeurs Torje Lomo pour nous avoir fourni le matériel nécessaire au déroulement d'une partie de ce travail, et Giuseppe Fontana pour sa collaboration et la mise à disposition de son équipement et des compétences de son équipe.

A ce même titre, j'associe Barbara Spolaore de l'équipe du Pr. Fontana, et Caroline Cieniewski-Bernard pour leur aide importante lors de mes travaux.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'entreprise Novarthis, pour nous avoir fourni la cyclosporine A à moindre frais.

Qu'aurais-je fait sans vous mesdames et mesdemoiselles? C'est de vous bien sûr dont il est question, Françoise, Laetitia, Luana, Valérie. Mes techniciennes préférées, toujours disponibles et sur lesquelles je me suis « parfois » déchargé pour les tâches ingrates. Bonne humeur, petits nœuds très bien ficelés, conseils pratiques, idées judicieuses, et bien d'autres choses encore. Je vous adore !!

En ce qui concerne les conseils, je crois que j'ai ennuyé tous les maîtres de conférences du Laboratoire, et je m'en excuse... Comment avez-vous fait pour supporter ces questions ? Florence, Marie-Hélène, Bruno, Laurent, votre patience et votre disponibilité m'ont toujours surpris.

Des étudiants des Laboratoires français et italiens dont j'ai fait parti, je retiendrai tous ces moments de franche rigolade que nous avons pu avoir. Signorine Elena, Elisabetta, Marta, Michela, e particolarmente tu, Samantha, tra spettegolare e scherzare, mi sono perso, ma mi avete fatto sentire il gallo tra le galline !!!! Meravigliosa sensazione... Vecio' Nicola, gheto capio che sei benvenuto da me quando lo vorrai? Belle, ma petite belge, et Bert, mon grand hollandais, je bent een parel en bedankt voor je vriendschap, voor deze mooie vriendschap.

Vous, mes compagnons d'armes français, Adeline, Erwan, Hélène, Marion, Mounir, Nicolas, je ne pense pas qu'on remettra ça trois ans de plus, mais ça aura été très ludique avec vous ! Julie, bon courage !

Un grand Merci aussi à Michèle, notre secrétaire, pour ta bonne humeur, ton efficacité et ta gentillesse. Tu es partie, mais je crois que François sera à ta hauteur pour toutes ces qualités.

Enfin, et même si ces derniers remerciements sont de nature plus intimes, je ne peux oublier ma famille et mes amis dont certains ont déjà été cités...

BOZZO CYRIL

Born on the 23th of August 1977 in DOUAI - FRANCE Unmarried – childless Ph.D. student

Professional address : LABORATORY OF NEUROMUSCULAR PLASTICITY

Bat SN4, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex. Tel: 33 (0)3 20 33 70 86 - Fax : 33 (0)3 20 43 40 89 E-mail : Structcont.Cell@univ-lille1.fr

ACADEMIC DEGREES:

- sept 2001 : Preparation for the PhD. : Doctorat des Sciences de la Vie et de la Santé. LABORATORY OF NEUROMUSCULAR PLASTICITY, Director: Pr. Laurence Stevens. Université des Sciences et Technologies de Lille – FRANCE.
 - 2001 : **Diplôme d'Etudes Approfondies** des Sciences de la Vie et de la Santé : grade bien. Research training for one year in the LABORATORY OF NEUROMUSCULAR PLASTICITY. Université des Sciences et Technologies de Lille – FRANCE.
 - 2000 : **MAITRISE** de Biologie Cellulaire et Physiologie, subject Physiology : grade assez bien. Université des Sciences et Technologies de Lille – FRANCE.
 - 1999 : **LICENCE** de biologie mention biologie des organismes : grade assez bien. Université des Sciences et Technologies de Lille – FRANCE.
 - 1998 : **DEUG** Sciences mention Sciences de la Vie : grade assez bien. Université des Sciences et Technologies de Lille – FRANCE.
 - 1995 : Scientific BACCALAUREAT, subject Sciences de la Vie et de la Terre : grade bien.

PROFESSIONAL BACKGROUND :

- 2004-2005 : A.T.E.R. : Teaching and Researching assistant.
- 2002-2004 : EU grant HPRN-CT-2000-0091 (January 2002 August 2004). Collaboration with DEPARTMENT OF ANATOMY AND PHYSIOLOGY, University of Padova, Padova, Italy, Dr Reggiani Carlo.
 Periods of stay : January 2002 to July 2002 (inc.), October 2002 and December 2002, April 2003 to June 2003 (inc.), October 2003 to December 2003 (inc.), April 2004 to June 2004 (inc.). Total : 19 months

TECHNICAL CAPACITIES

- Monodimensional and 2D electrophoreses
- Immunoblotting
- Mechanicals on skinned muscle fibers
- Semi quantitative RT-PCR
- Notions in mass spectrometry and data base searching
- Notions in electrophysiology, Patch Clamp methods (stage of 2 weeks, Dr Roman Skryma)
- Animal experimentation, no personal authorization

OTHER QUALIFICATIONS :

Italian and English languages : read, written, spoken. Notions in German language. French private address : 25 rue Emile DESMET 59000 LILLE - FRANCE <u>E-mail</u> : cyelboz@hotmail.com

PUBLICATIONS:

- <u>Bozzo C.</u>, Spolaore B., Toniolo L., Stevens L., Bastide B., Cieniewski-Bernard C., Fontana G., Mounier Y., Reggiani C. Myosin light chain phosphorylation in denrvated slow and fast rat skeletal muscles. Submitted to American Journal of Physiology. (October 2004)
- Bozzo C, Stevens L. Bouet V., Montel V., Picquet F., Falempin M., Lacour M., Mounier Y. Hypergravity from conception to adult stage : effects on contractile properties and skeletal muscle phenotype. J. Exp. Biol. 2004 Jul;207(Pt 16):2793-802.
- Stevens L, Bastide B, Bozzo C, Mounier Y.
 - Hybrid fibres under slow-to-fast transformations: expression is of myosin heavy and light chains in rat soleus muscle.

Pflugers Arch. 2004 Aug;448(5):507-14.

- Bozzo C, Stevens L, Toniolo L, Mounier Y, Reggiani C. Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat Soleus. Am J Physiol Cell Physiol. 2003 Sep;285(3):C575-83
- Stevens L, <u>Bozzo C</u>, Nemirovskaya T, Montel V, Falempin M, Mounier Y. Contractile properties of rat single muscle fibers and myosin and troponin isoform expression after hypergravity. J Appl Physiol. 2003 Jun;94(6):2398-405.

COMMUNICATIONS:

Bozzo C., Toniolo L., Stevens L., Mounier Y. and Reggiani C.

- Study of MLC2 phosphorylation in rat skeletal muscle.
 - EU Training Network, Muscle Group Meeting, Alpach (Autriche), April 2004
- Bastide B., Cienewski C., Stevens L., <u>Bozzo C</u>, Lemoine J., Michalski J.C. and Mounier Y. Characterization of some post-traductional modifications in rat skeletal muscle. Société Française de Myologie, 1ères journées Annuelles, Caen (France), 9-10 october 2003.
- Mounier Y, <u>Bozzo C</u>, Picquet F, Montel V, Bastide B and Falempin M (Université des Sciences et Technologies de Lille), Nemirovskaya T (Université Lomonosov., Moscou), Bouet V, Lacour M (Université de Provence, Marseille)

Role of the gravity factor on mechanical properties and expression of contractile proteins in rat soleus muscles. 24th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Santa Monica (USA), May 2003

- <u>Bozzo C.</u>, Toniolo L., Stevens L., Mounier Y. and Reggiani C.
 Expression of contractile proteins in rat muscles under different conditions. Myosin light chain 2 phosphorylation
 EU Training Network, Muscle Group Meeting, University of kent (UK), April 2003
- Bozzo C., Toniolo L., Stevens L., Mounier Y. and Reggiani C.

Regulation of contractile proteins in rats muscles under different conditions

EU Training Network, Muscle Group Meeting, Abano Thermes (Italy), April 2002

POSTERS :

- <u>Bozzo C.</u>, Cieniewski-Bernard C., Stevens L., Bastide B., Mounier Y.
 Influences du facteur nerveux dans les phénomènes de régulation post-traductionnelle des protéines contractiles du muscle squelettique.
 8^{ième} Journée Scientifique du Réseau LARC-Neurosciences, Paris (France) October 2004.
- Bozzo C., Spolaore B., Toniolo L., Stevens L., Mounier Y. and Reggiani C. Denervation, slow⇔fast phenotype transformation and MLC phosphorylation. 33rd European Muscle Conference, Isola d'Elba (Italy), september 2004.
- Bozzo C., Stevens L., Toniolo L., Mounier Y. and Reggiani C. Slow-to-fast transformation of muscle phenotype: myosin expression and regulation. 32nd European Muscle Conference, Montpellier (France), september 2003.
- Bozzo C., Stevens L., Toniolo L., Reggiani C. and Mounier Y.

Expression and regulation of myosin isoforms after a slow-to-fast muscle phenotype transformation. Journée André Verbert, Lille (France), september 2003.

Bozzo C., Stevens L., Reggiani C. and Mounier Y.

Myosin isoform plasticity during slow-to-fast transformation of muscle phenotype. Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Lille (France), october 2002.

Stevens L., Nemirovskaya T., Bozzo C., Montel V. and Mounier Y.

Increased muscle loading induced selective plasticity of different contractile proteins in adult rats. 31th European Muscle Conference, Lunteren (Netherland), Septembre 2002

Stevens L., Bozzo C., Bastide B., Bouet V., Lacour M. and Mounier Y.

Adaptation of biochemical and functional characteristics of rat extensor muscles to an elevation of gravity factor.

30th European Muscle Conference, Pavia (Italy), septembre 2001.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS EN VUE DE L'OBTENTION DU LABEL EUROPÉEN

ABSTRACT FOR EUROPEAN LABEL

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Cyrille BOZZO

PhD

« UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE »

European Label

VARIATIONS IN MYOSIN LIGHT CHAIN PHOSPHORYLATION IN RELATION TO SKELETAL MUSCLE PLASTICITY

JURY

Mr Xavier Bigard Reviewer Doctor, C.R.S.S.A., Grenoble Mr Carlo Reggiani Reviewer Professor, Padua University Mr Ger Stienen Reviewer Professor, Amsterdam University Ms Guillemette Gauquelin-Koch Examiner Doctor, CNES Paris **Ms Yvonne Mounier** Examiner Professor, Lille I University **Miss Laurence Stevens** Director Professor, Lille I University

This work was performed in the Laboratory of Neuromuscular Plasticity of Lille I and in the Laboratory of Muscle Biophysics of Padua.

he present work aims at assessing the role of a post-translational modification, phosphorylation, of a regulatory protein of skeletal muscle contraction, the Myosin Light Chain 2 (MLC2) in the case of long term muscular phenotype transformations. These transformations were induced by changes in environmental conditions, particularly due to changes in neuromuscular activity. To this end, a multidisciplinary study was conducted in order to combine several approaches necessary to investigate the present research area : a functional, a biochemical and a proteomic approach.

Our work was carried out as well in the "Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire" (Université de Lille, France, PhD Director Pr. L. Stevens) as in the "Laboratory of Muscle Biophysics" (University of Padova, Department of Anatomy of Physiology, Italy, Head Pr. C. Reggiani). This work was supported by a grant from European Union devoted to young scientist inside a Research and Training Network.

INTRODUCTION

MLC2 is a ~17kD contractile protein of the muscle thick filament. It is localized in the neck domain of the Myosin Heavy Chain (MHC). MLC2 is represented by two different isoforms : a slow one, named MLC2s and a fast one, MLC2f. MLC2 plays an important role in skeletal muscle contraction, first, by its Ca^{2+} / Mg^{2+} sensitive site located in its amino terminal part and, more particularly, by its phosphorylation site (Szczesna, 2003).

After tetanic stimulation, MLC2 is known to potentiate skeletal muscle contraction, especially in fast muscles (Manning et Stull, 1982). The mechanisms that occur during contraction potentiation are well known : MLC2 is able to facilitate cross-bridge cycling and, thus, to increase actin-myosin interaction (Sweeney et Stull, 1990). This process is a rapid and reversible mechanism that is considered as a cellular adaptation to its environment to counteract the fatigue effects in fast muscles.

Phosphorylation of the MLC2 isoforms is a controversial mechanism in skeletal muscles. In smooth muscles, MLC2 is phosphorylated in two positions, ser 19 and ser 1-2 or thr 9, whereas in skeletal muscles, only one aminoacid has been showed to be phosphorylated, in ser 14 position for the slow MLC2 isoform and in ser 15 for the fast one. Whether a second site of phosphorylation exists in skeletal MLC2 is hypothetical. Phosphorylation is realized by a Ca^{2+} -calmodulin dependant enzyme, the MLC kinase (MLCK). The removal is made by

Myosin Phosphatase (MP), composed by a catalytic subunit (PP1, Protein Phosphatase 1) and a regulatory subnunit (MYPT2, Myosin Phosphatase Target 2), specific to the skeletal muscle. In smooth muscles, other kinases can phosphorylate MLC2, like Rho kinase or Protein Kinase C. The possibility of such mechanisms in skeletal muscles is not yet established.

Muscle plasticity is known to be an important characteristic of skeletal muscle to adapt to the environmental changes. It is clear that neuromuscular activity acts on muscle phenotype determination. Generally, a decrease in neuromuscular activity changes slow muscle phenotype to faster one, and an increase in neuromuscular activity modifies fast muscle phenotype into a slower one. These transformations are deeply marked on contractile protein expression, such as MHC, MLC, troponins.....They also induce changes in muscle functional properties. Consequently, skeletal muscle is able to counteract changes caused by exogen stimuli by transforming in an optimal mode.

Evidences about post-translational regulations adding to contractile protein transitions that alter muscle phenotype are described, as MLC2 phosphorylation or glycosylation in skeletal muscles. A relation between neuromuscular activity and MLC2 phosphorylation seems to exist. Thus, electrical stimulations that produce tetanos increase transitorily MLC2 phosphorylation, the effects being more pronounced in fast than in slow muscles. These transformations in MLC2 phosphorylation are supposed to be linked to variations in calcium sensitivity of muscle fibers (Sweeney et Stull, 1990).

While short term adaptations, i.e. potentiation of muscle contraction, are well described in skeletal muscles, our knowledge about events occurring in long term adaptation are very poor at the MLC2 phosphorylation level. With the aim to understand these phenomena, we analyzed on slow (soleus) and fast (EDL or extensor digitorum longus, plantaris) rat skeletal muscles, the variations of MLC2 phosphorylation in the case of various models of slow—fast and fast—slow muscle phenotype transitions, linked to changes in neuromuscular activity. All the aspects of muscle plasticity required different technical approaches : we used skinned fiber measurements, mono- and bi- dimensional electrophoreses, western blots and mass spectrometry analysis. RT-PCR experiments were also necessary to study kinase and phosphatase expressions at the transcriptional level.

We divided our work into three parts :

Part 1. Firstly, we analyzed the changes in MLC2 phosphorylation in the case of high reductions of neuromuscular activity that led to slow—fast phenotype transitions, in relation to the Ca²⁺ affinity determined by skinned fiber experiments (Tension/pCa relationships). The

role of the nervous message in regulating MLC2 phosphorylation was also investigated in this part.

Part 2. Secondly, we completed the investigations of Part 1 by analyzing MLC2 phopshorylation in the case of opposite phenotypical transformations, i.e. fast \rightarrow slow transitions, caused by increases in neuromuscular activity.

Part 3. Finally, we studied the mechanisms that permitted to regulate the MLC2 phosphorylation / dephosphorylation via the two enzymes MLCK / MP.

RESULTS

<u>Part 1</u>. We first determined the relation between neuromuscular activity, muscle phenotype, changes in Ca^{2+} sensitivity and variations in MLC2 phosphorylation. We used four models. First, we compared the variations occurring during 15 days of hypodynamiahypokinesia (HH, also named HU for Hindlimb Unloading) to 15 days of clenbuterol treatment (CB). HH is known to produce slow—fast transformations, decrease in Ca^{2+} sensitivity and muscular atrophy, whereas CB produces in a same manner slow—fast transitions, but increase in Ca^{2+} sensitivity and muscular hypertrophy.

Hypodynamia-hypokinesia and clenbuterol treatment both led to slow \rightarrow fast transitions, well marked on MHC and MLC isoform expression patterns (increase in MHCIIa, appearance of MHCIId/x and MHCIIb relative expressions, and increase in MLC2f expression). We described muscular atrophy and decrease in Ca²⁺ sensitivity after HH, whereas CB soleus was hypertrophied, its Ca²⁺ sensitivity being increased. These two latter effects were reversed by combined treatment (HH+CB) The analysis of the MLC2s and MLC2f variants by 2D-electrophoresis demonstrated an increase in MLC2 phosphorylation after HH and CB. In CONT soleus, MLC2s variants were divided in two spots : 2s and the more acidic 2s1, and MLC2f was expressed only as 2f variant. However, the increase in MLC2 phosphorylation in HH and CB corresponded to the appearance of two acidic spots 2s2 and 2f1. The use of a specific phosphotylated. The 2s1 spot was not completely removed by PP1 treatment.

We suggested that the increased MLC2 phosphorylation observed in HH and CB conditions was better correlated to slow—fast phenotype transitions than to variations in Ca^{2+}

sensitivities. We explained the partial removing of 2s1 by the possible existence, in the same isoelectric point, of two various isoforms or two different MLC2s variants.

These results were described in the published paper entitled "Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus" by Bozzo *et al.* (2003).

Additional experiments (not yet published) were performed, concerning MLC2 phosphorylation in EDL after HH conditions. Even if it was atrophied (-25% from control mass), no change was detected nor in EDL phenotype transformation, nor in MLC2 phosphorylation after HH.

To complete this study, we analyzed the variations in MLC2 phosphorylation in the case of a total disappearance of the neuromuscular activity, obtained by a period of 15-days denervation (DE) in soleus and EDL muscles. Moreover, increasing evidences point to a role of the calcineurin-NFAT (CaN-NFAT) pathway, in mediating the effects of the low frequency pattern of neural discharge on transcription of genes typical of slow muscle phenotype (such as slow myosin subunits). Thus, we have undertaken in parallel the study of the role of this way of regulation on MLC2 phosphorylation by inhibiting specifically the action of CaN by cyclosporin A (CsA).

Denervation led to slow—fast transformations in soleus by increasing the relative amount of MHCIId/x isoform. CsA also led to slow—fast transformations, but increased the relative amount of MHCIIb. Moreover, muscle phenotype was affected for MLC expression in DE, but not in CsA. In EDL muscle, DE and CsA led to a slight fast—slow transition. MLC expression in EDL was still not affected by CsA.

Denervation increased MLC2 phosphorylation by expressing 2s2 and 2f1 variants in soleus. Control EDL expressed a typical fast MLC2 profile composed of 2s1, 2s2 and 2f, 2f1, while a slight decrease in phosphorylation (decrease in 2s2 expression) was observed in EDL DE.

From this study, we hypothesized that an increase in MLC2 phosphorylation can be correlated to a slow \rightarrow fast phenotype transformation, and a decrease in MLC2 phosphorylation can be correlated to a fast \rightarrow slow transformation. Moreover, it seems that muscle phenotype expression and MLC2 phosphorylation are not exclusively regulated by a CaN-NFAT dependent pathway.

These results were described in the paper entitled "Myosin light chain phosphorylation in denervated slow and fast rat skeletal muscles " by Bozzo *et al.* (2004), submitted to American Journal of Physiology.

Part 2. In order to confirm our hypotheses about the correlation between variations of MLC2 phosphorylation and muscle phenotype transitions, we studied the changes in MLC2 phosphorylation in the case of an increased neuromuscular activity. First, we analyzed the MLC2 phosphorylation in hypergravity conditions (induced by centrifugation) in soleus and plantaris. Second, we determined the MLC2 phosphorylation level in the EDL submitted to Chronic Low Frequency Stimulation (CLFS - 20Hz, 3 weeks).

Hypergravity at 2G produced a slow—slower phenotype transformation in soleus muscles from rats conceived, born and reared until adult stage (100 days) in HG. Marked phenotype variations appeared in soleus since only slow MHCI was expressed after HG, but no change in MLC2 phosphorylation was observed. No change in plantaris phenotype or MLC2 phosphorylation was observed.

In adult rats exposed to HG (2g, 19 days), a slight slow \rightarrow fast phenotype transition occurred, only observed at the troponin level.

We concluded that i) gravity factor could interact with rat development, ii) hypergravity on CBR rats did not provoke any MLC2 phosphorylation change because of the very low basal level of MLC2 phosphorylation in control soleus, and iii) the effects occurring in adult rat muscles were not sufficient to induce variations in MLC2 phosphorylation.

These results were described in the published papers entitled "Hypergravity from conception to adult stage: effects on contractile properties and skeletal muscle phenotype " by Bozzo *et al.* (2003) and "Contractile properties of rat single muscle fibers and myosin and troponin isoform expression after hypergravity" by Stevens *et al.* (2003).

After **Chronic Low Frequency Stimulation**, very pronounced modifications in EDL phenotype occurred since it was changed into a slower muscle. EDL after CLFS expressed only MHCIIa and MHCI. The level of MLC2 phosphorylation was strongly modified. Indeed, MLC2 variants were reduced to 2s and 2f expressions whereas control EDL expressed 2s1, 2s2 and 2f, 2f1.

We confirmed here that a decrease in MLC2 phosphorylation was correlated to fast→slow transitions. The relevance of the appearance of the 2s variant suggests that 2s and 2s1 are two different states of MLC2 post-translational regulation.

Part 3. To better understand the phenomena occurring during changes in the level of MLC2 phosphorylation, we investigated MLCK and MP as principal actors of the MLC2 phosphorylation / dephoshorylation process.

RT-PCR analyses of MLCK, PP1 and MYPT2 transcripts in soleus muscles after HH showed an increase by 55% in MLCK mRNA expression and a decrease in MYPT2 mRNA amount by 50%. PP1 mRNA expression was not affected by HH. Analysis of protein amounts was also performed after HH. In soleus, MLCK expression increased in the same proportion as its mRNA. PP1 amount did not change after HH. Unfortunatly, we could not analyze the MYPT2 expression because of a lack of commercial anti-MYPT2 antibody.

After denervation, the MLCK protein expression increased by a 2.5 factor and no change occurred in PP1 expression. In cyclosporin A-treated soleus, no change nor in MLCK nor in PP1 was observed. In denervated EDL, MLCK expression was reduced by 33% and PP1 expression did not change. No variation in MLCK and PP1 amount was observed after CsA treatment.

In EDL CLFS, the expression of MLCK decreased and became similar to the one observed in control soleus. PP1 expression did not change.

We suggested that the increase in MLC2 phosphorylation could be correlated to an increase in MLCK expression (confirmed by mRNA and protein expressions) and a decrease in the MP expression. Regulation by MP would be specifically dependent on the expression of regulatory subunit MYPT2 (confirmed by mRNA expression) since no change was observed in PP1 relative content.

Some of these results were described in the same paper as previously described, entitled "Myosin light chain phosphorylation in denervated slow and fast rat skeletal muscles " by Bozzo *et al.* (2004).

GENERAL CONCLUSIONS

In this study, we analyzed the variations of MLC2 phosphorylation after changes in slow and fast muscle phenotypes induced in most cases by alteration of neuromuscular activity. We found that variations of MLC2 phosphorylation were linked to the transition in muscle phenotype, via a regulation pathway not exclusively CaN-NFAT dependant. The regulation (increase/decrease) of MLC2 phosphorylation was achieved by the MLCK and MP proteins, thanks to an increase (decrease) in MLCK and a decrease (increase) in MP expressions. The whole results raise some points of discussion and perspectives:

• When we compared the CsA model to the others, it is interesting to point out that CsA was the only model that did not produce any transition in MLC isoform expression pattern. Also, CsA did not induce any change in MLC2 phosphorylation. It seems that MLC2 phosphorylation is linked to MLC expression. If MLCK expression varies in parallel to the MLC2 phosphorylation levels, *it would be very interesting to analyze the MLCK and MLC2 promotors to detect a possible link in the activation of MLCK and MLC2 genes.*

• MLCK seems to be expressed differently according to the muscle type. The control soleus or slower EDL (EDL CLFS) would express low levels of MLCK while high levels would be more charasteristic of control EDL and faster soleus (HH). We could suggest that the expression of MLCK is based on a maximum/minimum scheme, the maximal expression occurring when the fast program was activated, and the minimal when the slow program was activated. *A study of the kinetic changes in MLC2 phosphorylation levels and MLCK activities during various time periods of CLFS in EDL and/or of HH in soleus could answer our question.*

• The pathway that permitted the nervous message to change the muscle phenotype and MLC2 phosphorylation level seemed to be not only CaN-NFAT dependant. The observation of an increased phosphorylation after clenbuterol treatment suggested that, as in smooth muscle, *the MLC2 phosphorylation could be regulated by other enzymes as Rho kinase or PKC*, via an inhibition of the MYPT2, even if the 48% homology at the carboxy terminal end (legation site of RhoK) between MYPT1 (smooth muscle) and MYPT2 (skeletal muscle) makes it hypothetical.

• The relation between MLC2 phosphorylation and fatigue is a well known phenomenon in short term regulation. Our work showed that this regulation by phosphorylation for potentiation of muscular contraction was linked to the fast phenotype expression. The increase

of MLC2 phosphorylation in slow to faster soleus, relative to a reduced capability of soleus to resist to fatigue strength, suggested that *the faster soleus could create a high basal level of phosphorylation and MLCK expression to answer altered functional demands in a fast manner*.

REFERENCES

Manning D.R. and Stull J.T. Myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation in mammalian skeletal muscle. *Am J Physiol.* C234-41. <u>1982</u>.

Sweeney H.L. and Stull J.T. Alteration of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: implications for regulation of actin-myosin interaction. *Proc Natl Acad Sci US A.* 414-8. <u>1990</u>.

Szczesna D. Regulatory light chains of striated muscle myosin. Structure, function and malfunction. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 187-97. 2003.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. LE MUSCLE SQUELETTIQUE	20
A. COMPOSITION MACROSCOPIQUE	20
1. La macrostructure du muscle squelettique	20
2. La fibre musculaire	21
3. Les myofibrilles	21
4. Le réticulum sarcoplasmique et le système tubulaire	22
B. COMPOSITION MICROSCOPIQUE DE LA FIBRE MUSCULAIRE : LES MYOFILAMENTS	23
1. Le filament épais	24
2. Le filament fin	29
3. Un troisième système de filaments sarcomèriques	32
C. LA CONTRACTION MUSCULAIRE	34
1. Le couplage excitation-contraction	34
2. Les mécanismes filamentaires de la contraction	36
3. Le système de contrôle troponines-tropomyosine (Tn-Tm)	38
D. LES TYPES DE MUSCI E	41
D, LES TIFES DE MUSCLE	41
E. LE DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE	43
II, LA PLASTICITE MUSCULAIRE	46
A FACTEURS DE PLASTICITE MUSCULAIRE INDUISANT DES TRANSFORMATIONS	
PHENOTYPIOUES LENT↔RAPIDE	46
1. L'innervation	46
2. La charge musculaire	51
5. Les agents pharmacologiques	58
6. Les hormones et les facteurs de croissance	59
7. Le vieillissement	63
8. L'entraînement et l'hypoxie	63

B. MECANISMES GENIQUES, PRE ET POST-TRADUCTIONNELS DE REGULATION DE LA PLASTICITE MUSCULAIRE	67
1. Les mécanismes géniques	68
2. La calcineurine (CaN).	
4 La régulation post-traductionnelle	
III. LA MLC2 A. Structure et fonction	7 5 75
 La structure La fonction 	75 77
B. LA PHOSPHORYLATION	78
1. Les enzymes MLCK et MP (PP1, MYPT)	79
2 Les effets de la phosphorylation de la MLC2	82

POSITION DU PROBLEME

MATERIELS ET METHODES

I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET TRAITEMENTS EXPERIMENTAUX

5XTENIMENTROX	······································
A. Les animaux	
B. LES MODELES EXPERIMENTAUX	
1. L'hypodynamie – hypokinésie (HH)	
2. L'hypergravité	
3. Le clenbutérol	
4. La dénervation de la patte postérieure	
5. La cyclosporine A	
6. L'électrostimulation de l'EDL	
C. LES MUSCLES ETUDIES	

A. ANALYSE FONCTIONNELLE DES FIBRES MUSCULAIRES	101
1. Protocole de pelage	101
2. Isolement des fibres	
3. Enregistrement des tensions isométriques	103
4. Solutions	
B. ANALYSE STRUCTURALE SUR MUSCLE ENTIER	106
1. Extraction et dosage des protéines pour les MHC	107
2. Etude des MHC	109
3. Électrophorèse bi-dimensionnelle ou 2D	
C. RT-PCR et spectrometrie de masse	117
1. La RT-PCR appliquée à la semi-quantification des taux d'ARNm des d	ifférentes
isoformes de MHC	
2. Spectrométrie de masse	122

RESULTATS

I. ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 DANS LE CAS D'UNE REDUCTION DE L'ACTIVITE NEUROMUSCULAIRE

A. PHOSPHORYLATION ET TRANSFORMATIONS PHENOTYPIQUES	126
1. Introduction	126 n
lent-rapide du soleus (Bozzo et al., 2003)	127
3. Phosphorylation de la MLC2 dans l'EDL après HH	138
4. Conclusion	141
B. RELATION MESSAGE NERVEUX, TRANSFORMATION DU PHENOTYPE MUSCULAIRE ET VARIATION DE PHOSPHORYLATION DE LA MLC2	143
1. Introduction	143
2. Phosphorylation de la MLC2 dans le soleus et l'EDL dénervés (Bozzo et al., 2	.004
soumis à AJP)	144
3. Conclusions	173

A. VARIATIONS DE PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 APRES HYPERGRAVITE 174

1. Introduction 2. Conclusions	174 195
B. VARIATIONS DE PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 DANS L'EDL APRES ELECTROSTIMULATION	195
 CLFS et transitions phénotypiques de l'EDL CLFS et phosphorylation de la MLC2 dans l'EDL 	

III. REGULATION DE LA PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 PAR ANALYSE DE L'EXPRESSION DES ENZYMES MLCK ET MP 199

A. INTRODUCTION	199
B. Expression des ARNM et des proteines correspondantes de MLCK, P MYPT2 dans le soleus apres HH	P1 et 200
1. Expression des ARNm de MLCK, PP1 et MYPT2 après HH 2. Expression protéique de la MLCK et de la PP1	200 201
C. EXPRESSION DE MLCK ET MP DANS LES MUSCLES DENERVES ET ELECTROSTI	MULES 203
1. Expression protéique de la MLCK et de la PP1 dans le soleus dénervé et t CsA	traité à la 203
2. Expression protéique de la MLCK et de la PP1 dans l'EDL dénervé et tra CsA	ité à la
3. Expression protéique de la MLCK et la PP1 dans l'EDL électrostimulé 4. Conclusions	

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

INTENSITE DES TRANSFORMATIONS PHENOTYPIQUES ET	
VEAUX DE PHOSPHORYLATION DE LA MLC2	209
REGULATION DE LA PHOSPHORYLATION PAR LA MLCK E	T
<u>AMP</u>	210
I. DU MESSAGE NERVEUX A LA REGULATION DE LA	
HOSPHORYLATION DE LA MLC2	211
. UNE OU DEUX ISOFORMES, UNE OU DEUX MODIFICATION	VS
DST-TRADUCTIONNELLES ?	212

V. RAPPORT DE LA PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 A LA RESISTANCE A LA FATIGUE MUSCULAIRE	214
PERSPECTIVES	216

REFERENCES



enquête personnelle, réalisée au sein d'une population non ne sélectionnée, m'a permis de déterminer de façon générale, ce que le terme de « muscle » évoque chez une gente non éclairée, tout milieu social confondu. A une simple question, « que vous inspire, résumé en quelques phrases, le mot « muscle » ? », des réponses des plus éparses m'ont été proposées. Ainsi, la candeur d'un enfant de 4 ans (Nicolas) qui m'exposait avec fierté que le muscle était « ce que [son] papa a et que [sa] maman n'a pas ! », la douceur d'une jeune fille s'extasiant devant les corps d'éphèbes des jeunes hommes de magazines (« c'est ce qu'il y a chez les beaux mecs !! » -Justine, 17ans), le caractère plus mature d'une réponse incluant la notion de mouvement et de complexité de l'organe (« le muscle est l'organe qui nous sert à bouger » - Jean-Marie, 47 ans), toutes ces réponses parmi tant d'autres me semblaient après une première analyse, comme dessiner un spectre large des imaginations de notre société occidentale. Puis, une « étude » plus attentive de ces réponses, a mis en évidence certaines récurrences : la force, le mouvement mais aussi la beauté, et qui plus est, toutes ces notions se limitaient à l'Homme. Le muscle, dans notre société, serait donc limité à la catégorie du muscle squelettique strié humain, et n'aurait pour simple rôle que de permettre à des individus en bonne santé de se mouvoir, mais aussi de séduire. Quelle stupeur, une pensée aussi réductrice à propos de mon organe de prédilection !?! Toutes les potentialités de cette formidable machinerie étaient donc occultées, aussi simples à imaginer soient-elles. Le cœur n'est-il pas un muscle ? Les animaux sont-ils incapables de mouvement? Avons-nous les mêmes capacités musculaires que nos cousins hominidés, que nos ancêtres ? Tous les muscles de notre corps sont-ils les mêmes ? Bref, l'Evolution aurait-elle permis uniquement un développement des structures cérébrales ? Les structures myofibrillaires, les capacités biochimiques et fonctionnelles seraient-elles les mêmes dans le cytosquelette d'une bactérie préhistorique, chez une amibe, que chez le plus corticalisé des animaux ? Peut-être mon esprit scientifique me refusait-il l'accès à une naïveté

et une simplicité de raisonnement qui ont été influencées et modifiées par mes connaissances de biologiste, mais le résultat de cette enquête me frustra après 3 années d'études approfondies de la plasticité du muscle squelettique. La plasticité, un terme qui semble bien éloigné des mots « chair » ou « viande » que j'avais pu entendre... Cette plasticité musculaire, présente de façon aussi large que précise, permit au cours des temps de développer des systèmes extrêmement dynamiques, en remodelage constant, à base de myosine et d'actine permettant de transformer l'énergie biochimique en énergie mécanique, allant des premiers cytosquelettes, pour prendre en complexité et aboutir à des systèmes cardiaques, des systèmes vasculaires et viscéraux à muscles lisses, à nos fameux muscles striés squelettiques de la séduction,..., mais aussi, permettant à chaque être vivant de s'adapter à son environnement et ses activités. La marche, la respiration, la circulation sanguine, le retour veineux, la déglutition, la digestion, la vue, l'ouïe, autant de systèmes qui mettent en jeu des protéines contractiles.

L'objectif de cette thèse pourrait être considéré tout aussi réducteur que ces précédentes réponses, puisqu'il ne concernera qu'une forme de régulation des protéines contractiles à l'appui de la notion de plasticité musculaire. Mais dans le domaine du très petit, le muscle, dans la complexité de ses mécanismes de transformations moléculaires, offre un immense jeu de pistes à explorer.

Toute cette complexité, aussi importante soit-elle, ne s'articule qu'autour d'un seul et même mécanisme moléculaire, c'est-à-dire l'interaction des deux grandes protéines musculaires que sont l'actine et la myosine, afin de produire la contraction musculaire. Toute influence en amont ou en aval de cette réaction vient modifier à court, moyen ou long terme le profil de la contraction musculaire.

La contraction musculaire est un mécanisme qui ne se limite pas à l'enveloppe du muscle. Elle est régie par des mécanismes, certes intramusculaires, mais aussi

extramusculaires. Si nous nous limitons au muscle strié squelettique, responsable du maintien de la posture et des mouvements, la contraction volontaire est dirigée par les centres nerveux supérieurs qui répondent à des stimuli internes ou externes. Involontaire, c'est le réflexe. L'étroite relation nerf-muscle est une notion importante, tout muscle recevant une innervation appropriée et spécifique de son statut. Ce statut musculaire, appelé scientifiquement phénotype, dépend de la nature des fibres qui composent le muscle. Il existe de facon simpliste, deux grands types de phénotypes musculaires. Les muscles lents composés en majorité de fibres dites lentes, et les muscles rapides, ayant une majorité de fibres rapides. La composition moléculaire de chaque fibre reflète, de par sa composition en isoformes de protéines musculaires, cette dualité lent / rapide. Toute modification de l'environnement, toute adaptation, se traduira par une modification de la nature des divers éléments de cette chaîne, allant de la modification des « patterns » de décharge nerveuse, à la transformation myofibrillaire. Toutes ces modifications ne s'établissent cependant pas sous un mode aléatoire. De fines régulations sont à la disposition de l'organisme afin de permettre la meilleure conformation possible du système neuromusculaire à la demande et engendrer ainsi la contraction la plus appropriée et la plus efficace face aux exigences de l'environnement. Il s'agit alors de « feedback » nerveux, par l'intermédiaire d'organes intramusculaires sensibles à la force contractile (organe tendineux de Golgi) ou à l'étirement (fuseau neuromusculaire), et de même, de contrôles intermoléculaires allant de l'activation génique à la régulation de l'activité des protéines codées.

Dans ces régulations moléculaires, il est une protéine, la MLC2, ou Myosin Light Chain 2, qui, à l'heure actuelle, est connue pour réguler le comportement contractile de la fibre musculaire. Les études qui ont porté sur l'importance du rôle de la MLC2 ont en effet démontré qu'elle intervenait via sa phosphorylation, dans la sensibilité au calcium des fibres musculaires et entraînait une potentialisation de la contraction des muscles rapides que d'aucuns ont interprété comme un mécanisme de la cellule musculaire de type rapide pour résister à la fatigue engendrée par une contraction intensive. Cependant, ces études ne se sont portées majoritairement que sur des comportements à court terme de la phosphorylation de la MLC2. L'importance des changements phénotypiques observés dans les muscles lors de modifications à long terme, qui permettent une adaptation stable du muscle à son environnement, contraste avec les changements observés lors des études de la phosphorylation de la MLC2 à court terme, qui est un processus rapide d'adaptation de la fibre musculaire.

Suscitant notre intérêt, nous nous sommes focalisés pour ce travail de thèse, sur les variations d'états de la phosphorylation de la MLC2 lors de transformations phénotypiques profondes, correspondant à l'adaptation du muscle à son environnement.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. LE MUSCLE SQUELETTIQUE

A. COMPOSITION MACROSCOPIQUE

1. La macrostructure du muscle squelettique

Le muscle squelettique est composé de protéines qui, par leur organisation, permettent la formation de structures contractiles. Ces protéines s'organisent en myofilaments qui forment un réseau de myofibrilles dont l'association crée les fibres musculaires (figure 1). Ces fibres musculaires forment à leur tour les faisceaux musculaires qui composent le muscle. Fibres, faisceaux et muscles sont entourés de gaines et enrobés de tissu conjonctif. Chaque muscle squelettique s'insère sur l'os par l'intermédiaire de tendons qui permettent la transmission de la force développée, un tendon pouvant supporter des charges de plus de 500kg/cm².



Figure 1. Représentation de la structure du muscle squelettique : du muscle entier aux filaments contractiles.

2. La fibre musculaire

Les fibres musculaires sont des éléments cellulaires polynucléés de grande dimension (pouvant mesurer jusqu'à plusieurs centimètres et d'un diamètre compris entre 20 et 150 µm). Le volume d'une fibre est occupé essentiellement par les myofibrilles, éléments formant l'appareillage contractile (figure 1). A l'intérieur de la fibre musculaire se développe en outre un réseau complexe intracellulaire particulièrement élaboré, le réticulum sarcoplasmique. Ce réseau sarcoplasmique est en relation avec la membrane plasmique appelée sarcolemme, au niveau de ses invaginations profondes en tubules transverses. Cette membrane délimite le pourtour de la cellule et emprisonne les différents éléments baignant dans le sarcoplasme (cytoplasme musculaire) au volume réduit à une fine couche située sous le sarcolemme et au niveau des interstices entre myofilaments. Le sarcolemme est riche en protéines, glycogène, résidus phosphatés hautement énergétiques (ATP et créatine phosphate), myoglobine (protéines ayant une affinité pour l'oxygène supérieure à l'hémoglobine), mitochondries, et en enzymes intervenant dans le métabolisme cellulaire.

3. Les myofibrilles

D'une centaine par fibre et d'un diamètre de 1 à 2 μ m, elles sont composées de deux types de myofilaments : le filament fin et le filament épais. Chaque myofibrille est enveloppée d'un réseau membranaire complexe dérivé du sarcolemme qui s'invagine à intervalles réguliers pour former le système tubulaire transverse (système T) (figure 2A). La dénomination "striée" employée pour définir le muscle squelettique provient de la disposition parallèle (entre eux et à l'axe de la fibre) et alternée de ses filaments (figure 2), qui définit deux zones distinctes : réfringente (bande I=isotrope) et biréfringente (bande A=anisotrope). En effet, ces zones mono et biréfringentes sont accolées les unes aux autres de façon à être

exactement alignées selon des plans orthogonaux à l'axe de la fibre. Chaque extrémité des filaments fins est reliée à une structure appelée "strie Z" située au milieu de la zone monoréfringente. La région d'une myofibrille comprise entre deux stries Z est nommée "sarcomère" (figure 2B).



Figure 2. Systèmes tubulaires transverse et longitudinal du réticulum sarcoplasmique. A. Au sein d'une fibre musculaire striée squelettique. D'après Marieb (1993). **B**. Représentation schématique.

4. Le réticulum sarcoplasmique et le système tubulaire

Comme il l'a déjà été partiellement évoqué, les myofibrilles sont enveloppées d'un système complexe de structures membranaires, constitué du réticulum sarcoplasmique (RS) et du système T. Le RS est une structure intracellulaire fermée et constitue une réserve de calcium. Le RS est formé d'une partie longitudinale et de citernes terminales. Il est accolé au système de tubules transverses, au niveau des citernes terminales. La juxtaposition des membranes d'un tubule transverse avec 2 citernes constitue une triade. C'est au niveau des citernes terminales du RS que se trouvent des canaux récepteurs de la ryanodine (RyR = Ryanodin Receptor), responsables du largage du calcium contenu dans le RS. Ces RyR sont

en relation étroite avec d'autres canaux, les DHPR (DiHydropyridin Receptor), récepteurs sensibles à la dépolarisation membranaire. Ces structures vont jouer un rôle fondamental dans le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire (voir paragraphe I.C.1.)

B. COMPOSITION MICROSCOPIQUE DE LA FIBRE MUSCULAIRE : LES MYOFILAMENTS

Les caractéristiques sarcomèriques sont dûes à la présence en leur sein d'une série agencée de myofilaments (environ 4500 par fibre musculaire). Les myofilaments sont composés de différentes protéines assurant l'organisation en filaments épais et filaments fins (figure 3A). La quantité de filaments fins est d'environ 3000 par myofibre alors que celle des filaments épais est de l'ordre de 1500. Au centre de chaque sarcomère se trouve donc un rapport de 2 filaments fins pour 1 filament épais. La bande A est constituée de filaments fins et épais, alors que la bande I ne contient que des filaments fins (figure 3B). Au centre de la bande A se trouve une zone optiquement moins dense, la bande H, composée uniquement de la partie des filaments épais ne comprenant pas les têtes S1 (décrites au paragraphe I.B.1.a). Cette bande H est très réduite dans un muscle au repos, disparaît lors de la contraction et est fortement élargie lors de l'étirement. Au centre de la bande H, une fine bande transversale est décrite, la ligne M (figure 3) qui est constituée de multiples protéines, parmi lesquelles, la protéine M et la myomésine.



Figure 3. A. Représentation simple de l'organisation des myofilaments à l'intérieur d'un sarcomère. *B.* Image en microscopie d'un sarcomère.

1. Le filament épais

Il est caractéristique de la zone biréfringente et occupe la partie centrale du sarcomère. Ses deux extrémités, libres, peuvent entrer en contact étroit avec le filament fin (figure 3). Dans sa portion centrale, correspondant à la ligne M, le myofilament s'épaissit, constituant la zone d'interconnexion entre les molécules de myosine qui forment le filament épais (figure 4A).



Figure 4. Représentation du filament épais de myosine. **A**. Structure du filament épais. **B**. Structure de la molécule de myosine, montrant les chaînes légères MLC associées aux chaînes lourdes MHC, ainsi que les différents fragments obtenus après digestions à la trypsine ou la papaïne. **C**. Tête S1 de myosine montrant les sites de fixation des chaînes légères (de deux types ELC et RLC), de l'ATP, et de l'actine.

a. La myosine

La protéine participant à la formation du filament épais est la myosine (figure 4B). C'est une molécule de 460kD organisée en un complexe de deux édifices :

- Un édifice de 2 chaînes de 100kD qui se présentent chacune sous la forme d'une « crosse de Hockey ». Ces deux chaînes lourdes de myosine ou MHC (Myosin Heavy Chain) sont associées en hélices α du côté C-term formant la « queue », et en « têtes » globulaires du côté N-term (figure 4B). Les premières études de la structure de la myosine utilisaient des coupures enzymatiques à la trypsine et la papaïne. Un clivage enzymatique par la trypsine (Lowey *et al.*, 1969) sépare la myosine en une queue fibrillaire (LMM, Light MeroMyosin) et une partie globulaire (HMM, Heavy MeroMyosin). Un clivage à la papaïne de cette partie globulaire donne deux fragments : une tête S1, globulaire, et une portion fibrillaire S2 (comprise entre S1 et la partie LMM) (figure 4B). Les têtes S1 sont composées de 3 domaines de 50, 25 et 20kD (figure 4C). Le domaine moteur est représenté par les domaine de 50 et 20kD : il peut intéragir avec le filament fin. De plus, un site de fixation pour l'ATP se situe dans la gorge délimitée par l'association de ces deux sous-unités. Le domaine de 20kD représente le domaine de transmission et fournit un ancrage aux chaînes légères de myosine.
- Le second édifice correspond à deux paires de chaînes légères de myosine ou MLC de 20 à 16kD, associées aux têtes de MHC, et formant la portion de connexion (ou coude) entre la tête et la queue de la MHC (figure 4C).

Chaque tête associée à ses deux chaînes légères forme un bras de levier qui permettra l'interaction avec le filament fin et ainsi le développement de la force par glissement des filaments les uns par rapport aux autres. En revanche, les queues de myosine établissent une ossature relativement rigide qui constitue la partie fixe du levier. Ce levier, articulé au niveau de l'insertion de la tête sur la queue, peut effectuer un mouvement de rotation angulaire respectivement à l'axe du myofilament (figure 4C).

Chaque filament épais est composé d'environ 200 molécules de myosines, associées dans le sens longitudinal du myofilament épais (figure 4A), alors que les têtes S1 émergent à intervalles réguliers, le long du filament épais. Elles établissent la liaison avec l'actine et donc les ponts actine-myosine, assurant la production de force. De la ligne M partent en sens opposés deux groupes de filaments de myosine disposés queues contre queues (figure 4A).

a1. Les chaînes lourdes de myosine ou MHC

Dans le muscle squelettique, différentes isoformes de MHC sont exprimées. Il existe aujourd'hui 9 isoformes de MHC connues (Pette et Staron, 1997). Chaque isoforme de MHC est codée par un gène distinct. Dans le muscle strié squelettique adulte, elles existent sous forme de 2 types caractéristiques : lent et rapide. Elles se répartissent de la plus lente à la plus rapide comme suit : MHCI, IIa, IId/x, IIb. Il existe également la MHC embryonnaire, la MHC néonatale, la MHCIα cardiaque (auriculaire), ainsi que la MHCIβ cardiaque (ventriculaire), qui est identique à la MHCI squelettique lente. Certaines isoformes sont exprimées de façon séquentielle durant le développement et ne sont pas présentes en quantité appréciable chez l'adulte. D'autres isoformes ont été décelées uniquement dans des muscles spécialisés (extraoculaire, orofacial, masséter) : MHC extraoculaire, MHCIIM ou « Masticatory MHC » dite « super-rapide » (trouvée chez de nombreux carnivores, mais ni chez l'homme ni chez le rat).

Leur profil de migration est différent d'une espèce à l'autre (Pette et Staron, 1990). Chez le rat, il se réalise comme suit :

Sens de migration dans un gel de polyacrylamide SDS-PAGE. (<8%) →MHCIIa

→MHC embryonnaire

→MHCIId/x

→MHC néonatale

 \rightarrow MHCIIb

 $\rightarrow MHCI\alpha \text{ cardiaque}$ $\rightarrow MHCI \qquad \rightarrow MHCI\beta \text{ cardiaque}$

a2. Les chaînes légères de myosine ou MLC

Les chaînes légères de myosine s'associent aux têtes des chaînes lourdes par des liaisons non covalentes, à raison de 2 chaînes légères par tête de MHC.

Les MLC sont différentiées en :

- « Essential Light Chains » (ELC) à rôle structural, dénommées aussi « Alkali Light Chains », puisqu'elles se dissocient des MHC en milieu alcalin,
- « Regulatory Light Chains » (RLC) ou « DNTB Light Chains » qui se dissocient des MHC en présence de 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate (DNTB). Elles ont un rôle régulateur de la contraction car elles sont phosphorylables.

À chaque tête de MHC sont associées une RLC et une ELC (figure 4C). Pour le muscle squelettique, il existe 3 isoformes de ELC :

- les MLC1s (ou ventriculaire) et f (s pour "slow" lente et f pour "fast" rapide)
- la MLC3f

et 2 isoformes de RLC :

• les MLC2s (ou cardiaque) et MLC2f.
Certaines références sont en faveur de l'existence de deux isoformes de MLC1s – MLC1sa et MLC1sb - (Pette et Staron, 1990). Il a aussi été découvert une forme embryonnaire de chaîne légère observée dans le muscle fœtal humain (Biral *et al.*, 1984).

b. Les protéines liées à la myosine

Les MBP ou Myosin Binding Protéins sont à prendre en compte dans la formation du filament épais. Il s'agit de la protéine H (MBP-H), la protéine M, la myomésine et la protéine C. La protéine H fut découverte chez le Lapin (Yamamoto, 1984). C'est une protéine de 58.5kD dont aucune isoforme n'a été rapportée dans la littérature. La protéine M et la myomésine sont des protéines de la ligne M de 165 et 162kD uniquement présentes chez le rat dans les fibres de type 2. La protéine C est une protéine de 130kD retrouvée dans la bande A et formée de 10 motifs globulaires. Au niveau de cette ligne M se trouve également la créatine kinase, enzyme qui permet la régénération de l'ATP.

2. Le filament fin

Le filament fin est caractéristique de la partie monoréfringente du sarcomère (figure 5). Il est ancré par une extrémité à la strie Z et cet ancrage est stabilisé par l' α -actinine. L'autre extrémité est libre et court vers la partie centrale du sarcomère, se terminant à la limite de la bande H. Les molécules le constituant sont l'actine, et les protéines régulatrices : la tropomyosine et les troponines (figure 5).



Figure 5. Illustration du filament fin dans l'organisation du sarcomère (partie supérieure) et dans sa composition moléculaire (partie inférieure).

a. L'actine

L'actine est l'un des principaux constituants du filament fin. C'est une molécule de 42kD composée de globules (actine G) s'associant en double filament (actine F) en milieu salin. Chaque filament est constitué de 300-400 molécules d'actine G. Les deux filaments forment une double hélice d'un pas de 700Å, et effectuent une rotation de 360° toutes les 13 molécules (figure 5). La configuration des globules d'actine fait en sorte que les sites de liaison de l'actine soient toujours en face des têtes de myosine. En effet, par fixation à la tête de myosine suite à la stimulation de l'activité de la myosine ATPase, l'actine participe à la contraction musculaire par création de ponts actine-myosine.

Cette molécule est hautement conservée car sa séquence en acides aminés varie très peu d'une espèce à l'autre. Deux isoformes d'actine ont été identifiées, une isoforme α -squelettique et une isoforme α -cardiaque, codées par deux gènes distincts (Schiaffino et Reggiani, 1996). La distribution tissulaire de ces deux isoformes varie selon les espèces animales mais aussi en fonction du stade de développement. Chez le rat, dans le muscle squelettique, les deux isoformes sont exprimées de façon contemporaine durant les phases de développement, puis l'isoforme cardiaque disparaît au stade adulte.

b. La tropomyosine (Tm)

Ce filament de deux hélices α (2x33kD) se présente sous la forme d'un hétérodimère $\alpha\beta$ le plus souvent, mais aussi sous la forme d'un homodimère $\alpha\alpha$ ou $\beta\beta$, α étant la sous-unité la plus rapide. Chaque dimère est logé dans le sillon du double filament d'actine et s'assemble bout à bout afin de créer un filament continu courant le long du filament d'actine (figure 5). Il permet la liaison du filament fin au complexe des troponines. Les monomères sont codés par 4 gènes Tm α , Tm β , Tmp3, Tmp4. Il existe, dans le muscle squeletique, 3 isoformes : α , plus exprimée dans les muscles rapides, β , exprimée majoritairement dans les muscles lents et Tmp3, exprimée dans le muscle de souris (Pieples et Wieczorek, 2000).

c. Les troponines (Tn)

Le complexe des troponines est présent tous les 7 globules d'actine (figure 5). Chaque complexe de troponine est lié au filament de tropomyosine. Un complexe est constitué d'une molécule de troponine C, une molécule de troponine I et une molécule de troponine T. Par l'intermédiaire de la TnI, il bloque, au repos, les sites de fixation actine-myosine.

La troponine C (TnC)

C'est une molécule de 18.5kD en forme d'haltère présentant 4 sites de fixation pour le calcium (I, II, III, IV). Les sites I et II N-term, sont spécifiques du calcium, les sites III et IV C-term fixent préférentiellement le magnésium mais peuvent fixer le calcium à haute

concentration. Il existe 2 isoformes de TnC : lente ou cardiaque (TnCs) et rapide (TnCf). Pour l'isoforme lente, le site I n'est pas fonctionnel.

<u>La troponine I (TnI)</u>

C'est une molécule de 23kD présentant 3 isoformes (TnIs, TnIf et TnIc). Par sa liaison à l'actine, elle masque le site de fixation de l'actine à la myosine ("I" comme inhibitrice). Elle est également associée à la TnC.

La troponine T (TnT)

Cette molécule est responsable de l'ancrage du complexe des troponines à la tropomyosine. Elle présente 8 isoformes : 3 lentes (TnT1s, TnT2s, TnT3s) décrites chez la souris et le rat (Jin *et al.*, 1998 ; Bastide *et al.*, 2002 ; Stevens *et al.*, 2003) et 5 rapides (TnT1f, TnT2f, TnT3f, TnT4f, TnT5f) décrites chez le lapin (Leeuw *et al.*, 1994).

3. Un troisième système de filaments sarcomèriques

Ce système est considéré comme régulateur de la longueur d'extension sarcomèrique et d'ancrage des diverses protéines des myofilaments. Il est constitué de la titine, la nébuline et l' α -actinine (figure 6).

a. La titine

C'est une protéine de 3000kD qui semble faire partie intégrante de la myofibrille. Chaque molécule de titine s'étend de la bande Z à la ligne M comme un long filament (Furst *et al.*, 1988) (figure 6). Elle comprend un segment (inextensible pour des étirements limités) fixé à la myosine dans la bande A et un segment libre, extensible au niveau de la bande I. Cette portion est considérée comme un « régulateur moléculaire » de la longueur du filament épais (Trinick, 1994), régulant l'intervalle des sites d'attachement de la protéine C.



Figure 6. Représentation du troisième filament sarcomèrique, montrant l'implication de ses principales protéines (titine, nébuline, α -actinine) dans les phénomènes de contraction.

b. La nébuline

C'est un simple filament de la strie Z courant le long du filament fin. Son poids moléculaire varie de 700 à 900 kD selon les espèces et semble être corrélé aux différentes longueurs observées du filament fin. La corrélation entre le poids moléculaire et la longueur du filament fin suggère que la nébuline peut fonctionner comme un régulateur moléculaire dans la détermination de la longueur du filament fin.

c. L'a-actinine

C'est la protéine majeure de la ligne Z, à laquelle s'attachent les filaments d'actine. Il en existe deux isoformes, une lente et une rapide. L'expression contemporaine des isoformes d' α -actinine squelettique et cardiaque est une caractéristique du muscle squelettique humain adulte, qui ne se rencontre pas chez les mammifères de petite taille.

C. LA CONTRACTION MUSCULAIRE

Le premier pas ayant permis la compréhension des phénomènes se réalisant au sein des sarcomères lors de la contraction musculaire, est venu de l'observation que les myofilaments fins et épais ne changeaient pas de longueur, même lors de la contraction. Ainsi naquit l'idée d'un raccourcissement des sarcomères par glissement des filaments fins entre les espaces vacants des filaments épais (Huxley, 1969 ; Huxley et Simmons, 1971). Il se forme en effet des ponts entre les filaments fins et épais, par lesquels les têtes de myosines se rapprochent des sites de liaison des molécules d'actine. Au niveau de ces ponts actinemyosine, s'établit non seulement un lien entre les deux parties moléculaires en contact, mais interviennent également des modifications de leur structure et de leur interaction, permettant de générer la force de contraction.

1. Le couplage excitation-contraction

La contraction des fibres musculaires squelettiques, phénomène mécanique, résulte d'une stimulation électrique ou potentiel d'action musculaire. Du caractère transitoire d'un unique potentiel d'action découle le caractère transitoire de la contraction, ramenant après un bref temps de latence, le muscle en sa position relâchée. La succession de potentiels d'action peut créer la sommation des contractions musculaires, induisant, selon la fréquence des potentiels, un tétanos imparfait ou parfait. Le couplage électromécanique fondé sur la stimulation par le potentiel d'action de l'appareillage contractile, ne se réalise pas de manière directe mais par l'intermédiaire d'un médiateur ionique (le calcium) (figure 7). L'excitation nerveuse transmise à la plaque motrice (jonction neuromusculaire), puis à la membrane sarcolemmique musculaire et aux tubules transverses, va entraîner, à partir du réticulum sarcoplasmique, la libération massive et rapide de calcium dans le cytoplasme (10⁻⁵M) jusque là, à une concentration de 10⁻⁷M. Ce processus est permis par l'existence d'un couplage excitation-contraction rendu possible par la relation entre le DHPR (DiHydroPyridin Receptor, récepteur situé dans la membrane du tubule transverse et sensible à la dépolarisation membranaire) et le RyR (Ryanodin Receptor, canal de largage du calcium du réticulum sarcoplasmique). Une partie des ions Ca²⁺ libérés pourra alors se fixer sur des sites spécifiques des myofilaments (notamment de la troponine, voir paragraphe I.C.4) et assurer le déclenchement du mécanisme contractile.



Figure 7. Représentation schématique du couplage excitation-contraction montrant les différentes étapes allant du potentiel d'action nerveux à la fixation du Ca^{2+} libéré par le réticulum sarcoplasmique.

2. Les mécanismes filamentaires de la contraction

Le processus de génération de force musculaire est fondé sur la théorie d'un coulissement des filaments fins et épais par interactions cycliques entre l'actine et la myosine (Huxley, 1957). L'énergie nécessaire au basculement de la tête S1 de la myosine d'une position « A » (90°, position relâchée) à une position « R » (45°, position dans une fibre en

contraction en absence d'ATP), est fournie par l'activité ATPasique de la myosine qui permet de libérer l'énergie contenue dans la liaison du phosphate inorganique en position gamma.

La figure 8 représente une schématisation des étapes du cycle attachementdétachement de la myosine sur l'actine :

- La liaison de l'ATP sur la tête de myosine induit une dissociation du complexe actinemyosine (AM↔A+M.ATP)
- L'ATP subit un clivage rapide et réversible (M.ATP↔M.ADP.Pi), qui permet à la tête de myosine de revenir à un angle de 90°
- 3. Le complexe M.ADP.Pi s'associe rapidement à l'actine (état « A » des têtes de myosine, liaison de faible affinité : A+M.ADP.Pi↔A-M.ADP.Pi)
- 4. Le complexe A-M.ADP.Pi subit une isomèrisation, et la liaison actine-myosine devient très forte (A-M.ADP.Pi↔AM.ADP.Pi). Le phosphate inorganique Pi est libéré (A-M.ADP.Pi↔AM.ADP) et le pont passe à la configuration « R » générant ainsi la force par coulissement des myofilaments.

Comme suggéré par certains auteurs (Rayment et Holden, 1994 ; Holmes, 1996), cette dernière étape regroupe l'isomèrisation « A » \rightarrow « R », le relargage du Pi et la génération de force.



Figure 8. Mécanisme de la contraction musculaire par formation de ponts actine-myosine (*A*) et mécanismes énergétiques (*B*).

3. Le système de contrôle troponines-tropomyosine (Tn-Tm)

L'établissement et la stabilisation d'un lien actine-myosine, ne sont pas, en soi, calcium-dépendants. Il a ainsi été démontré que la liaison des têtes S1 de myosine sur l'actine pouvait survenir en absence de Ca^{2+} à faible force ionique (Brenner *et al.*, 1984). De fait, pour expliquer la nécessité des ions calcium libres dans le sarcoplasme pour l'activation de la contraction, il doit être admis la présence au niveau des myofilaments, d'un système qui rend calcium-dépendante l'interaction actine-myosine au niveau des ponts. Ce système fut identifié comme étant le complexe régulateur Tn-Tm. Il impliquerait un blocage stérique par encombrement de l'unité d'actine par la Tm qui lui est associée, et ce, sous contrôle du complexe des Tn (Haselgrove et Huxley, 1973 ; Huxley, 1973 ; Parry et Squire, 1973). Les ions calcium libérés par le stimulus d'un potentiel d'action, se fixent sur la Troponine C. La TnC agit comme un « sensor » calcique, détectant les variations cytosoliques de Ca^{2+} . Le déplacement du Mg²⁺ des sites III et IV de la TnC est un phénomène trop lent pour rendre

compte du déclenchement de la contraction rapide (Robertson et al., 1981). Lors du largage de calcium par le réticulum sarcoplasmique, les sites I et II de la TnC fixent le Ca²⁺, étant ainsi les sites régulateurs de la contraction. Un changement conformationnel de la TnC s'opère alors (Herzberg et al., 1986) (figure 9A). Le domaine N-term de la TnC, chargé en Ca²⁺, présente alors une haute affinité pour la TnI (Wang et Cheung, 1985 ; Cheung et al., 1987). La liaison entre TnI et actine se rompt, et la TnI forme un complexe avec la TnC (figure 9B). Dans cette conformation, la TnI ne maintient plus le complexe Tn-Tm en sa position de blocage stérique. La Tm passe d'un état « off » inhibiteur, à un état « on » libérant les sites de fixation de l'actine. Cette transition d'état off→on n'empêche ainsi plus la liaison des têtes S1 de myosine aux sites de fixation de l'actine. Il est cependant à noter que dans un système reconstitué [Myosine-Actine-Tm-TnI-TnC], la TnC neutralise l'activité inhibitrice de la TnI en présence comme en absence de Ca^{2+} (Amphlett *et al.*, 1976). L'addition de la TnT fixée à la Tm dans le système [Myosine-Actine-Tm-TnI-TnC] induit un renforcement de l'inhibition de l'ATPase en absence de Ca^{2+} , et une augmentation de l'activité ATPasique en présence de Ca²⁺ (Greaser et Gergely, 1971 ; Malnic et Reinach, 1994). Pour que le système devienne sensible au calcium, la sous-unité de TnT est par conséquent nécessaire. Elle permet de transmettre le changement conformationnel au complexe des troponines (Tanokura et Ohtsuki, 1982 ; Leszyk et al., 1990) (figures 9A et B). L'étroite relation entre TnC et TnT et la dépendance de leur activité à la concentration calcique (Heeley et al., 1987), suggèrent une transmission du signal activateur calcique par ces deux protéines (Potter et al., 1995). Suite au dégagement des sites de fixation de l'actine à la myosine par le complexe Tn-Tm, les ponts actine-myosine se forment et la contraction musculaire a lieu (figure 9C).



Tropomyosine

Troponines

Figure 9. Schéma de l'interaction entre les différentes protéines du filament fin lors des variations de la concentration calcique. A. Modification de la conformation du filament fin. **B**. Rôle du complexe Tn-Tm dans le verrouillage des sites de fixation de l'actine à la myosine. **C**. Déplacement du filament de myosine après libération de Ca^{2+} et déverrouillage des sites du filament fin pour la fixation de la tête S1 de myosine.

D. Les types de muscle

Schématiquement, deux types de muscle sont décrits : les muscles lents et les muscles rapides. Les muscles lents comme le soleus sont le plus souvent des muscles antigravitaires, responsables du maintien de la posture et présentant une activité contractile chronique soutenue. Les muscles rapides comme le plantaris ou l'EDL (Extensor Digitorum Longus), sont plutôt impliqués dans l'exécution du mouvement, et sont donc sollicités de façon phasique. Afin de répondre à des demandes spécifiques liées aux contraintes de l'environnement, les muscles lents et rapides doivent posséder une composition en protéines, une activité enzymatique et des propriétés mécaniques spécifiques. Les muscles lents sont à cinétique de contraction lente, au métabolisme oxydatif et résistants à la fatigue. Les muscles rapides ont une cinétique de contraction rapide, un métabolisme soit glycolytique, pour les muscles fatigables, soit oxydatif, pour les muscles résistants à la fatigue. Chaque muscle présente une diversité de composition en fibres musculaires en relation avec son échelle d'activité. L'analyse histologique de l'activité ATPasique (associée à la stabilité acide ou alcaline) de la myosine et de l'activité enzymatique (oxydative versus glycolytique) a permis de montrer que les muscles lents sont composés essentiellement de fibres lentes (type 1, vitesse de contraction lente, activité enzymatique oxydative, activité ATPase stable à pH 4.3-4.6), et les muscles rapides essentiellement de fibres rapides [type 2A, à vitesse de contraction rapide, d'activité enzymatique oxydative, activité ATPase stable à pH 10.4; et type 2B, à vitesse de contraction rapide et d'activité enzymatique glycolytique, activité ATPase stable à pH 4.6-10.4] (Sreter et al., 1966).

Cependant, la grande diversité des fibres musculaires peut être appréhendée par le polymorphisme de l'ensemble de leurs protéines myofibrillaires.

Les études immunohistologiques, utilisant des anticorps anti-myosine, reliées à l'analyse de l'activité ATPase des fibres, ont démontré une corrélation positive entre la

classification métabolique des fibres (type 1, 2A ou 2B) et leur composition en isoformes lentes ou rapides (tableau1).

Les principales protéines myofibrillaires existant sous de nombreuses isoformes sont les myosines (MHC et MLC) et certaines protéines du filament fin (protéines régulatrices) (voir paragraphe I.B). Les fibres pures sont composées uniquement d'isoformes lentes ou d'isoformes rapides des protéines contractiles (MHCI, TnCs, ... pour les fibres lentes, MHCII, TnCf,... pour les fibres rapides). Il existe également des fibres hybrides ou de type C (1C ou 2C), composées des deux types d'isoformes, avec une dominance des isoformes reflétant leur état lent ou rapide. La composition en protéines musculaires et la vitesse de contraction des fibres sont également en étroite relation (tableau 1).

Typage ATPase]	[2A 2X			2B						
Vitesse de raccourcissement	+		++				+++			++++		
Rendement énergétique	+		++				+++			++++		
Résistance à la fatigue	++++		+++				++			+		
Enzymes glycolytiques	+		++				+++			++++		
Enzymes oxydatives	+++++		+++				++			+		
МНС	Ι		IIa				IId/x			IIb		
MLC	1s1s 2s2s	1s1f 2s2s	1s1f 2f2f	1f1f 2f2f	3f1f 2f2f	3f3f 2f2f	1f1f 2f2f	3f1f 2f2f	3f3f 2f2f	1f1f 2f2f	3f1f 2f2f	3f3f 2f2f
Exemple	Soleus		Soleus				Diaphragme			EDL		

Tableau 1. Correspondance entre les activités enzymatiques, l'expression en isoformes de myosines (MHC et MLC), l'activité ATPasique de certains muscles typiquement lents (soleus) et typiquement rapides (EDL et diaphragme). D'après Awede (2001).

Un profil d'expression en protéines musculaires peut donc être caractérisé pour chaque type de muscle (Tableau 2).

Muscles en d	éveloppement	Muscles adultes				
Embryonnaires	Néonatals	Rapides	Lents			
MHC emb	MHC néo	MHC IIB	MHC β slow			
MHC β slow	(MHC emb)	MHC IIX				
		MHC IIA				
MLC 1emb	MLC 1 fast	MLC 1 fast	MLC 1 slow, ventriculaire			
MLC 1 slow a MLC 1 fast	(MLC 3 fast)	MLC 3 fast	(MLC 1 slow a)			
MLC 2 fast	MLC 2 fast	MLC 2 fast	MLC 2 slow			
Actine α cardiaque	Actine α squelettique	Actine α squelettique	Actine α squelettique			
Actine α squelettique	(Actine α cardiaque)					
TnC fast	TnC fast	TnC fast	TnC slow/cardiaque			
TnC slow/cardiaque	· · · ·					
TnI slow	TnI fast	TnI fast	TnI slow			
TnT cardiaque	TnT fast, foetales	TnT fast adultes	TnT slow			
TnT slow						
ΤΜ β	ΤΜ β	TM α fast	TM α slow			
TM α fast	TM α fast	(TM β)	TM α fast			
TM α slow			ΤΜ β			

Tableau 2. Combinaisons possibles entre les isoformes des protéines contractiles en fonction des différents types de muscles. D'après Schiaffino et Reggiani (1996).

E. LE DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE

De nombreux muscles se développent à partir des somites qui se forment au début du du développement embryonnaire. Les cellules musculaires squelettiques dérivent des différents types de précurseurs myogéniques qui se trouvent dans ce mésoderme.

Le développement musculaire est caractérisé par une différentiation asynchrone de générations successives de fibres musculaires (figure 10). Dans le muscle squelettique de rat,

il peut être observé différents stades dans la diversification du type de fibre, en rapport avec le quatuor d'expression des isoformes de MHC (I, IIa, IId/x, IIb). Le développement musculaire y est caractérisé par une succession de substitutions des isoformes embryonnaire et néonatale des MHC avec les isoformes adultes de type 2. Durant les développements fœtal et néonatal, s'expriment deux générations de fibres (myotubes), primaire et secondaire.

La phase fœtale est caractérisée par la différentiation de fibres qui exprimeront la MHC lente (I β) et de fibres qui exprimeront les MHC néonatales, dérivant de la génération primaire de fibres. Elle est également caractérisée par la différentiation de fibres qui expriment aussi les MHC néonatales mais qui dérivent de la génération secondaire (Braun et Arnold, 1995).

Dans les premiers stades de développement des muscles postérieurs des membres, les MHC embryonnaires sont exprimées en grande proportion dans toutes les fibres, alors que les MHC néonatales et la MHCI β sont peu exprimées et de façon hétérogène ; successivement, après les 16-17ièmes jours de développement, la génération primaire se différencie en deux types distincts de fibres, l'un exprimant les MHC embryonnaires ainsi que la MHCI β , l'autre exprimant les MHC embryonnaires et néonatales (Condon *et al.*, 1990a). Dans certains muscles, par exemple le tibialis anterior, il existe une ségrégation régionale de ces deux populations de fibres, les fibres lentes étant concentrées dans la région centrale et profonde, alors que dans le soleus, toutes les fibres suivent la voie de différentiation qui conduit à la formation du phénotype lent.

La génération secondaire de fibres, qui, dans les muscles caudaux des membres postérieurs se développe aux alentours de 18 jours, présente un phénotype de type MHC néonatales; seules quelques fibres secondaires dans le soleus expriment aussi l'isoforme MHCIβ.



Figure 10. Représentation schématique des phases séquentielles de différentiation des divers types de fibres musculaires durant le développement. D'après Denardi et al. (1993).

II. LA PLASTICITE MUSCULAIRE

Reflétée par son polymorphisme structural, le muscle est une structure plastique : sa composition, donc ses propriétés se modifient au cours de la vie. La diversité observée à l'intérieur de chaque muscle, en fibres, mais aussi à l'intérieur de chaque fibre, en protéines myofibrillaires, évoque le haut degré de complexité dans le développement d'une spécialisation du muscle squelettique, pour l'adaptation à son environnement. Divers stimuli externes ou internes, en s'écartant de l'activité normative du muscle, sont responsables de cet état dynamique : innervation, âge (développement et vieillissement), hormones et facteurs mécaniques, agents pharmacologiques... Chaque modification de l'état de ces conditions environnementales, naturelles ou induites, entraîne une réponse adaptative du muscle par modification spécifique de ses diverses composantes. Il semble que le cadre de régulation génique et les réponses différentielles du muscle aux diverses conditions expérimentales ou naturelles puisse influencer le comportement musculaire. Dans ce chapitre seront présentés l'état des connaissances actuelles (Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino et Reggiani, 1994 ; Talmadge, 2000 ; Flück et Hoppeler, 2003).

A. FACTEURS DE PLASTICITE MUSCULAIRE INDUISANT DES TRANSFORMATIONS PHENOTYPIQUES LENT↔RAPIDE

1. L'innervation

Il est maintenant bien connu que les « pattern » de décharge nerveuse qui stimulent un muscle sont à l'origine de mécanismes d'élaboration et de transformation du phénotype

musculaire. L'acquisition du phénotype musculaire est donc en directe corrélation avec le message nerveux transmis au muscle (Pette et Staron, 1997). Cette dépendance vis-à-vis du facteur nerveux prend état dès la phase d'embryogénèse, et se poursuit toute la vie.

a. Durant le développement

Beaucoup d'observations expérimentales indiquent que les influences neurales jouent un rôle important au cours de la croissance et dans la différentiation des fibres musculaires durant le développement embryonnaire (voir paragraphe I.E). Toutefois, même en absence d'influence nerveuse, un certain nombre de myotubes lents et rapides peuvent se différencier. En effet, la paralysie chronique ou la dénervation dans les premiers jours de vie embryonnaire n'interrompt pas la séquence normale de maturation des myotubes primaires; par contre, les myotubes secondaires n'apparaissent pas (Harris *et al.*, 1989). Dans les embryons de rats, différents types de fibres se différencient même après traitement par des neurotoxines qui détruisent l'innervation avant l'invasion du muscle par les axones moteurs (Harris *et al.*, 1989; Condon *et al.*, 1990b). La transition « normale » MHCemb \rightarrow MHCneo \rightarrow MHCIIb s'établit même après l'élimination des motoneurones durant la vie foetale (Weydert *et al.*, 1987).

Lorsque l'innervation mature se met en place (innervation monosynaptique), les caractéristiques définitives du muscle adulte s'établissent (Picquet *et al.*, 1997).

L'effet de la dénervation sur le muscle varie selon son stade développemental. Cela indique l'existence de périodes critiques du développement au cours desquelles la sensibilité à l'influence neurale est majeure (Harris, Fitzsimons *et al.*, 1989 ; Condon *et al.*, 1990b ; Picquet *et al.*, 1998). La dénervation des muscles de rats nouveaux-nés n'interrompt pas l'apparition de l'isoforme MHCIIb, mais interfère avec l'induction de la MHCIIa et retarde la disparition de la MHCnéo (Butler-Browne *et al.*, 1982 ; Russell *et al.*, 1993). L'isoforme

MHCIβ persiste dans les fibres lentes des muscles rapides dénervés dès la naissance et diminue dans les fibres lentes du soleus.

Ces observations ont permis d'émettre l'hypothèse que durant le développement postnatal du muscle, il existe un « programme » prédéterminé de la différentiation musculaire qui, en absence d'innervation, conduit à un phénotype d'isoformes rapides, avec expression surtout de la MHCIIb, et que l'innervation est nécessaire pour induire et maintenir l'expression des gènes lents comme la MHCI (Butler-Browne *et al.*, 1988).

L'induction des gènes des myosines lentes (MHCI, MLC1s, MLC2s) pendant la régénération musculaire dépend elle-aussi de l'innervation. En effet, le soleus dénervé subit une transition d'expression d'isoformes rapides pour devenir un muscle plus lent. Réinnervé, il se réoriente vers son phénotype initial. De façon similaire, le muscle EDL dénervé se transforme en muscle plus lent, et, se réoriente vers son phénotype initial après réinnervation (Carraro *et al.*, 1983 ; D'albis *et al.*, 1988a ; D'albis *et al.*, 1988b).

Ces résultats ont cependant été obtenus à partir de protocoles différents. D'autres auteurs montrent que la dénervation du muscle postérieur de la patte de lapin âgé d'une semaine, semble réduire l'induction de la MHC rapide plutôt que de la MHC lente. Cette apparente hétérogénéité des résultats peut être expliquée par le fait que le nerf a une influence différente et indépendante sur les myotubes lents des première et seconde générations.

b. Chez l'adulte

La connaissance du rôle central de l'activité motoneuronale dans la détermination de la composition en fibres musculaires et de son importance dans l'établissement des caractéristiques structurales et fonctionnelles du muscle squelettique adulte, nous vient des études de différents types d'expériences comme l'électrostimulation, la dénervation, ou encore l'innervation croisée dite « cross-innervation », et les sections de moelle épinière. Ces

modèles jouent un rôle sur l'activité neuromusculaire (activité électrique et/ou charge musculaire) (Vrbova, 1963 ; Pette et Vrbova, 1992).

b1. Expériences de stimulation électrique

Il est maintenant admis depuis les expériences de cross-réinnervation de Buller *et al.* (1960) que le «pattern» d'activité électrique est spécifique du type de muscle étudié : lent ou tonique (10-15Hz) (Hennig et Lomo, 1985), et rapide ou phasique (~150Hz). En appliquant un «pattern» donné de stimulation à un muscle (électrostimulation), il est ainsi possible d'étudier les modifications phénotypiques découlant de cette nouvelle activité. Ce protocole permet de modifier l'activité électrique sans modifier la charge musculaire.

Pour cela, il a généralement été utilisé deux principaux types de protocoles expérimentaux :

Le premier protocole ou la stimulation continue à basse fréquence de muscles rapides (CLFS = Chronic Low Frequency Stimulation) transforme le phénotype de ces derniers en muscles de type lent (Salmons et Vrbova, 1969). Ce protocole à basse fréquence a été étudié chez différentes espèces (lapin, chien, chat, souris, rat). Certains phénomènes sont communs à toutes ces espèces. On observe généralement une diminution du diamètre des fibres, une augmentation de l'activité oxydative, et une transformation des isoformes rapides vers des isoformes lentes des protéines contractiles. Chez le rat, on observe un réarrangement des fibres rapides plutôt qu'une transformation des fibres rapides en fibres lentes. La diminution en l'expression du mRNA des fibres 2B est assez rapide ; après 7 jours, il devient presque indétectable (Kirschbaum *et al.*, 1989a, b, 1990). Le réarrangement protéique est complet après 2 semaines : les fibres 2B diminuent, alors que les fibres 2A et les fibres 2X augmentent modérément. La stimulation à basse fréquence n'induirait donc que le réarrangement des types de fibres dans les muscles rapides (Ausoni

et al., 1990). Cependant, une stimulation de plus longue durée (60 jours) entraîne après 15 jours (durée habituelle des stimulations), une augmentation de l'expression de MHCI (Pette et Staron, 1990). Ces modifications accompagnées de celle de l'expression des pompes Ca²⁺ ATPases et du canal RyR du réticulum (Ohlendieck *et al.*, 1999) engendrent alors un ralentissement des cinétiques de contraction et de relaxation du muscle transformé.

Le deuxième protocole, la stimulation à haute fréquence (150Hz) ne modifie pas les propriétés du muscle rapide mais induit la transformation du muscle lent en muscle rapide (Lomo *et al.*, 1974). Une différence est cependant notée entre un protocole de stimulation à haute fréquence court ou prolongé (Ausoni *et al.*, 1990). Une faible durée de stimulation à 150Hz préserve l'expression de la MHCIIb dans les fibres de type 2 de l'EDL, mais ne parvient pas à induire l'expression de cette même isoforme dans le soleus alors que la MHCIId/x devient prédominante. Une durée importante de stimulation à 150Hz diffère en supprimant quasiment la MHCIIb dans l'EDL, et en induisant une forte expression de la MHCIIa dans le soleus (Ausoni *et al.*, 1990).

b2. Dénervation et cross-innervation

La révolution dans les modèles d'étude de la plasticité du tissu musculaire est sans doute provenue des résultats de transformation lent—rapide du muscle soleus après section du tendon obtenu par Buller et Lewis (1965). Ce travail a ainsi permis la création de nouveaux modèles de rupture ou de diminution de l'activité neuromusculaire sans modifier la charge musculaire. Le modèle de dénervation d'un muscle découle directement de ces premières expériences. Après dénervation, les fibres musculaires adultes subissent des altérations structurales et fonctionnelles qui peuvent entraîner des dégénérescences et des nécroses. De

multiples modifications de l'expression des isoformes de nombreuses protéines myofibrillaires ont été observées. Pour les isoformes de myosines, dans les muscles soleus et tibialis anterior adultes dénervés, une apparition des isoformes embryonnaires et néonatales a été observée (Schiaffino *et al.*, 1988). L'apparition de ces deux isoformes est limitée aux fibres qui contiennent l'isoforme MHCIIa, et ce, concentrée sur de petits segments répartis le long de la fibre. Cette condition suggère une perte de coordination entre les divers noyaux cellulaires et, au sein de chaque noyau, une perte de contrôle dans l'expression des isoformes de MHC.

Dans le muscle soleus dénervé pendant 21 jours, il existe une augmentation de la proportion en fibres rapides (Midrio *et al.*, 1992). Ceci expliquerait la raison pour laquelle les effets de la dénervation sont suivis d'une augmentation de la vitesse maximale de raccourcissement du soleus (Gundersen, 1985). Après dénervation, dans l'EDL, il existe un remodelage des MHC et des modifications des propriétés contractiles (Dulhunty, 1985 ; Ausoni *et al.*, 1990).

2. La charge musculaire

Il existe différentes méthodes pour faire varier la charge musculaire : la réduire (« unloading ») en immobilisant un muscle ou en diminuant la force de gravité ; ou l'accroître (« overloading ») par hypertrophie compensatrice ou en augmentant la force gravitaire. Ces modifications de charge sont très souvent en étroite relation avec l'activité électrique.

a. L'immobilisation

Ce protocole se traduit par une diminution de l'activité électrique et de la charge musculaire. Deux positions du muscle se distinguent dans le modèle d'immobilisation : une position dite « raccourcie » qui diminue l'expression des ARNm codant pour la MHCIIa dans les muscles rapides (Nonaka *et al.*, 1997), alors qu'une position « étirée » augmente l'expression de la MHCIIa dans le soleus (Zador *et al.*, 1999). Les résultats les plus spectaculaires surviennent dans les muscles lents immobilisés dans une position intermédiaire ou raccourcie (Booth, 1982).

b. La microgravité

C'est une situation qui provoque une diminution de la charge ainsi que de l'activité musculaires. La microgravité provoque une situation d'hypodynamie-hypokinésie (HH). Outre la microgravité réelle dite « apesanteur », qui nécessite des excursions coûteuses et rares dans l'espace, obtenir une gravité avoisinant les 0G est souvent simulé. Il existe différents modèles simulant la microgravité réelle : de courte durée, il s'agit du vol parabolique (environ 20s à 0G lors d'une parabole), ou de plus longue durée, le modèle de suspension des pattes postérieures chez le rat (Morey *et al.*, 1979), et l'alitement prolongé ou « bed rest » chez l'homme (Booth, 1994).

En microgravité réelle ou simulée, la diminution de l'activité neuromusculaire et de la charge corporelle jouent un rôle important et complexe dans la régulation des propriétés fonctionnelles et structurales du muscle squelettique. Elle touche principalement les muscles extenseurs, lents et impliqués dans la posture. Leur activité motrice est traduite par l'électromyogramme (EMG). Cependant, les travaux obtenus sur l'animal sont peu nombreux et les résultats non homogènes. Sur des rats soumis à 30 jours de microgravité simulée, l'activité est réduite après quelques jours (jusqu'à 9% de l'EMG contrôle pour le soleus) pour revenir progressivement (à 7 jours) à des valeurs avoisinant l'EMG contrôle (80% de celui-ci pour le soleus) (Alford *et al.*, 1987). Cette variation de l'EMG s'accompagne d'une transformation des caractéristiques du «pattern» d'activité. Pour une durée de 28 jours d'HH,

le «pattern» tonique observé pour un muscle lent se transforme en un «pattern» de type plus phasique (Blewett et Elder, 1993), même si cette dernière étude n'a pas montré de retour progressif vers un pattern contrôle. Des résultats complémentaires ont été obtenus au sein du laboratoire après un vol parabolique (Leterme et Falempin, 1998) : l'EMG du soleus diminue instantanément dès la phase de 0G et maintient sa chute pendant les 20s de 0G. Il existe en même temps une augmentation de l'activité des muscles fléchisseurs.

La microgravité réelle [vols spatiaux de 6 jours (Baldwin *et al.*, 1994 ; Caiozzo *et al.*, 1994), de 14 jours (Stevens *et al.*, 1993)] ou simulée provoque une atrophie (détectée jusque 28 jours) se manifestant principalement sur les muscles lents, et les fibres lentes (Goldspink *et al.*, 1986 ; Desplanches *et al.*, 1987 ; Baldwin *et al.*, 1994 ; Caiozzo *et al.*, 1994 ; Kischel *et al.*, 2001a, b). La réduction de taille des fibres musculaires et le changement du phénotype sont le résultat d'une diminution de synthèse protéique et/ou d'une augmentation de leur dégradation (Goldspink *et al.*, 1986 ; Haddad *et al.*, 1993).

Après microgravité réelle (vols spatiaux de 5, 7 ou 14 jours), il existe une diminution de la force maximale très marquée sur les fibres lentes du soleus (Holy et Mounier, 1991 ; Stevens *et al.*, 1993). Cette perte de force n'est pas modifiée lorsqu'elle est rapportée à la section des fibres (Holy et Mounier, 1991), et serait associée directement à la perte en protéines myofibrillaires (Riley *et al.*, 2000). Une modification du phénotype des fibres musculaires est également observée. Les muscles lents antigravitaires subissent des transformations dans le sens lent—rapide. Dans le soleus, il y a augmentation du nombre de fibres rapides de type 2A, aux dépens des fibres de type 1 (Talmadge *et al.*, 1996 ; Staron *et al.*, 1998). L'expression des MHC lentes (MHCI) est diminuée, alors que les MHC rapides (IId/x, IIb) augmentent (Caiozzo *et al.*, 1994 ; Talmadge *et al.*, 1996). Ces changements

phénotypiques ont pour conséquence des changements dans les propriétés contractiles puisqu'il se produit une accélération des cinétiques de contraction (diminutions des temps de contraction et de demi-relaxation), et une augmentation de la Vmax des muscles antigravitaires (Caiozzo *et al.*, 1994). Enfin, dans les muscles rapides, la proportion de fibres qui expriment les MHCIId/x et IIb augmente (Haddad, 1993).

De façon générale, les modèles de microgravité simulée reproduisent correctement les effets de la microgravité réelle (Thomason et Booth, 1990). Depuis de nombreuses années, ils permettent, en outre, d'approfondir les connaissances sur les caractéristiques et la régulation des processus de dysfonctionnements neuromusculaires. Le modèle de suspension du rat (Morey et al., 1979), que nous avons utilisé à plusieurs reprises dans cette thèse, reproduit les conditions de 0G par hypodynamie (réduction de charge corporelle) et hypokinésie (réduction de l'activité motrice) (HH), et déplacement des liquides corporels vers la partie céphalique. Du point de vue fonctionnel et structural, les effets sur le tissu musculaire sont ceux observés après les vols spatiaux. On retrouve une diminution de la force développée par les muscles lents (Falempin et al., 1990 ; Diffee et al., 1991), mais pas par les muscles rapides (Fitts et al., 1986). Ces pertes de forces peuvent être attribuées à une diminution en protéines myofibrillaires (Thomason et al., 1987), ainsi qu'à une diminution de la sensibilité calcique (baisse du seuil et de l'affinité calcique) des fibres de muscles lents (Gardetto et al., 1989 ; Stevens et al., 1990, 1993). La baisse de sensibilité calcique peut être en partie reflétée par la transformation des protéines contractiles, qui expriment alors en plus forte quantité les isoformes de MHC et MLC rapides, ainsi que des protéines régulatrices (Stevens et Mounier, 1990 ; Stevens et al., 1990, 1993, 2002 ; Campione et al., 1993 ; Kischel et al., 2001a ; Bastide et al., 2002). Une augmentation des fibres de type 2 aux dépens des fibres de type 1 (Desplanches et al., 1987; Diffee et al., 1991) est décrite, avec une surexpression des MHCIIa et une apparition des MHCIId/x et IIb au détriment de la MHCI (Diffee et al., 1991 ;

Campione *et al.*, 1993 ; Stevens *et al.*, 1999a, b, 2002, 2004 ; Kischel *et al.*, 2001a ; Bastide *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces modifications peut avoir plusieurs origines. Une modification des messages afférents pourrait être impliquée dans les transformations musculaires observées en microgravité réelle ou simulée avec une modification de l'activité des propriocepteurs et une augmentation de l'activité des fuseaux neuromusculaires (De-Doncker *et al.*, 2000, 2002). Des résultats récents obtenus au laboratoire (Picquet et Falempin, 2003) ont montré qu'une déafférentation sélective du muscle soleus a des conséquences importantes sur le muscle : une atrophie significative et une perte de force musculaire mais pas de transition phénotypique lent \rightarrow rapide. En microgravité, une position plutôt raccourcie des muscles extenseurs et, étirée, des muscles fléchisseurs pourrait être aussi à l'origine des modifications observées (Riley *et al.*, 1990).

c. L'hypergravité

Une augmentation de la charge mécanique du muscle produit initialement des effets opposés à ceux produits par une diminution de charge; on observe généralement une hypertrophie, une accumulation d'isoformes lentes de MHC, et une transition du phénotype musculaire lent vers un phénotype rapide (Diffee *et al.*, 1993).

c1. L'hypergravité (HG) par centrifugation

L'hypergravité est généralement obtenue par centrifugation, s'assimilant à l'entraînement de pilotes de chasse soumis à plusieurs G. Les précédents résultats concernant les variations de masse musculaire et de masse corporelle au cours d'un épisode d'hypergravité diffèrent selon les auteurs. Sur des rats Sprague-Dawley adultes, Martin (1978) décrit une diminution de masse corporelle après 60 jours en hypergravité. Amtmann et Oyama

(1976), chez des rats Sprague-Dawley de 30 jours, observent qu'après 810 jours à 2.76g, les animaux présentent une diminution de leur masse corporelle, mais pas de diminution de la masse du muscle par comparaison aux animaux contrôles de même poids. Roy *et al.* (1996) observent même, chez des rats Wistar adultes et après 14 jours en hypergravité, une augmentation de masse relative du muscle, mais aucune variation des masses absolues du muscle et du corps. Kita *et al.* (1998) décrivent chez le coquelet placé en hypergravité pendant 3 semaines, une diminution de la masse corporelle mais une augmentation de la masse du soleus et de sa synthèse protéique. Martrette *et al.* (1998), chez les rats Long Evans soumis à l'hypergravité du 11^e jour de gestation au 7^e jour après la naissance, rapportent une perte de masse du muscle et une diminution de la synthèse en protéines musculaires. Enfin, selon Almurshed et Grunewald (1999), il n'existe pas de perte de masse et de quantité de protéines des muscles placés en condition de surcharge, et en condition de privation énergétique : le travail musculaire préviendrait les effets de la perte énergétique.

Il est donc clair que les effets de l'hypergravité peuvent être très différents, selon le stade de développement des animaux, la durée de l'épisode d'HG, les conditions expérimentales...

Les expériences de Roy *et al.* (1996) et de Martin *et al.* (1980), exercées sur le rat adulte, ont montré qu'après des périodes d'hypergravité de 14 et 60 jours de vie adulte, la transformation phénotypique des muscle lents posturaux (soleus), s'effectue vers un profil encore plus lent. Selon Leterme et Falempin (1998), la position corporelle des rats placés pendant la phase d'accélération d'un vol parabolique (période pendant laquelle la gravité augmente) correspond à un aplatissement de l'animal contre le sol, avec des angles de posture des membres modifiés de façon caractéristique. De plus, une augmentation caractéristique de l'amplitude et de la fréquence du «pattern» de décharge de l'EMG du soleus est observée lors des périodes d'hypergravité transitoire d'un vol parabolique. Cependant, peu de données

existent sur la composition musculaire en différentes protéines contractiles et les caractéristiques de contraction. Des travaux effectués au laboratoire (Picquet *et al.*, 2003) ont démontré une disparition totale de l'expression des isoformes rapides de MHC adultes chez des animaux concus, nés et ayant vécu en hypergravité jusqu'à 100 jours.

c2. Surcharge fonctionnelle

Une augmentation de la charge appliquée au muscle dans les modèles fonctionnels (hypertrophie compensatrice par ténotomie des muscles synergiques) augmente l'activité électrique du muscle et induit de manière générale une transformation phénotypique rapide→lent. Après 5 semaines de surcharge fonctionnelle par ténotomie du gastrocnemius (synergiste du plantaris et du soleus), les muscles soleus et plantaris sont hypertrophiés (~+40% par rapport aux contrôles) et s'orientent vers un phénotype plus lent. Le soleus n'exprime plus que de la MHCI, alors que le plantaris qui exprime généralement 4 isoformes de MHC (I, IIA, IId/x, IIb), n'exprime plus la MHCIIb, et les proportions des autres MHC sont augmentées (Sugiura et al., 1993). Les caractéristiques de la contraction sont modifiées : la force développée lors des secousses musculaires simples ou tétaniques est supérieure à celle enregistrée en conditions contrôles, mais ne varie pas si on la rapporte à la section du muscle (Roy et al., 1985; Johnson et Klueber, 1991). Dans l'EDL, une cinétique d'analyse des effets de la surcharge fonctionnelle a permis de montrer qu'il n'y a pas d'augmentation du nombre de fibres, et que le recrutement des fibres musculaires se faisait de façon temporelle. Le recrutement des fibres 2A se ferait dans les premières phases de compensation de la surcharge, alors que les fibres 2B seraient recrutées plus tardivement (Johnson et Klueber, 1991).

5. Les agents pharmacologiques

Un certain nombre de modèles ont été développés à partir de traitements avec des agents pharmocologiques, supposés avoir ou démontrés comme ayant une incidence sur le phénotype musculaire.

a. Tétrodotoxine

La tétrodotoxine ou TTX, inhibiteur strict du potentiel d'action par blocage des canaux sodiques, mais n'empêchant pas la diffusion des substances nerveuses trophiques, entraîne une sévère atrophie musculaire, une augmentation des vitesses de contraction des muscles lents (Dunn et Michel, 1999), ainsi que l'apparition des isoformes des MHCIId/x et embryonnaire, traduisant une nette transformation lent→rapide (Midrio *et al.*, 1998 ; Dunn et Michel, 1999).

b. Clenbutérol

Le clenbutérol est un agoniste des récepteurs $\beta 2$ adrénergiques, connu dès 1977 pour ses capacités bronchodilatatrices, puisqu'il était utilisé pour soigner des chevaux asthmatiques. Sur ces animaux, il a été observé que le clenbutérol favorisait leur croissance. Considéré par certains comme un anabolisant (Emery *et al.*, 1984) ou par d'autres comme un anti-catabolique (Benson *et al.*, 1991), un traitement au clenbutérol aboutit à une hypertrophie des fibres musculaires, lentes et rapides pour Dodd *et al.* (1996), ou lentes uniquement pour Criswell *et al.* (1996). Cette hypertrophie est accompagnée d'une transformation dans le sens lent \rightarrow rapide des muscles lents (chez le soleus de rat). On observe également une augmentation de l'expression de la MHCIIa, avec une apparition en faibles proportions des MHCIId/x et IIb dans le soleus. Il existe de même un rééquilibre de la balance MLC lentes/rapides, avec une surexpression des MLC de type rapide (1f, 3). Le gastrocnemius est affecté de la même façon, alors que la composition de L'EDL (composé essentiellement de MHCIId/x et IIb) ne varie pas (Stevens *et al.*, 2000).

Ces transformations phénotypiques dues au clenbutérol entraînent des modifications au niveau des caractéristiques d'activation calcique. Les fibres musculaires présentent une augmentation de la sensibilité calcique (Ricart-Firinga *et al.*, 2000). Cependant, il ne s'agit pas d'un effet direct du clenbutérol sur les protéines contractiles et il a été suggéré que les effets du clenbutérol mettent en jeu des cascades de phosphorylation intracellulaires. Ainsi, il est supposé qu'une phosphorylation directe des protéines myofibrillaires puisse améliorer les capacités contractiles. Cela a pu être démontré pour la TnI cardiaque (Winegrad *et al.*, 1983). Dans ce travail, une relation entre clenbutérol et augmentation du niveau de phosphorylation de la MLC2 a été suggérée, même si le mécanisme n'a pas encore été exploré (voir nos résultats).

6. Les hormones et les facteurs de croissance

a. Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont parmi les plus puissants régulateurs du phénotype musculaire et, en particulier, de la composition en isoformes du système myofibrillaire. Le mécanisme d'action à travers lequel les hormones thyroïdiennes peuvent influencer la composition en isoformes a été identifié en analysant l'interaction des protéines ligands qui se lient au DNA supposé réguler la transcription génétique.

Durant le développement, l'action des hormones thyroïdiennes est essentielle pour la différentiation musculaire, car elles sont capables d'activer le facteur de transcription MyoD, de stimuler l'accumulation de protéines, soit directement, soit au travers d'une augmentation

de la sécrétion de GH qui, à son tour, agit sur l'IGF-I (Insulin Growth Factor I). Elles sont en outre capables de promouvoir la différentiation des différents types de fibres. Lors de la phase de développement musculaire, les hormones thyroïdiennes semblent induire une accélération du processus normal de maturation du muscle. La transition postnatale de la MHC néonatale à la MHC rapide adulte est réduite en absence d'hormone thyroïdienne et peut être accélérée sous administration de cette même hormone (Butler-Browne *et al.*, 1984). Ce phénomène est indépendant de l'innervation, puisqu'il survient de la même façon dans des muscles dénervés dès la naissance (Russell *et al.*, 1988).

Tous les muscles squelettiques du même animal répondent à des variations de la concentration sanguine en hormones thyroïdiennes, mais leur réponse (activation des gènes codant les MHC par exemple) varie selon le type de muscle, de fait de leur composition différente en récepteurs à ces hormones (Izumo *et al.*, 1986 ; D'albis *et al.*, 1989, 1990). Par exemple, un cas d'hypothyroidisme se traduit au niveau musculaire par une augmentation de la proportion de MHC lentes dans les muscles rapides (Leijendekker et Van Hardeveld, 1987). Dans l'hyperthyroidisme, Fitts ainsi que Ianuzzo (Ianuzzo *et al.*, 1977 ; Fitts *et al.*, 1980) ont démontré une tendance à la transformation des types de fibres musculaires dans le sens lent—rapide. De plus, l'administration des hormones thyroidiennes induit une diminution de l'expression des MHC lentes au profit des MHC rapides dans le soleus (Caiozzo *et al.*, 1991).

Les hormones thyroïdiennes seraient essentielles à l'activation des gènes qui régissent la synthèse des isoformes rapides de la myosine à haute activité ATPasique. En outre, l'expression du gène codant pour l'isoforme de la MHCIIa serait stimulé par les hormones thyroidiennes dans les muscles rapides, alors que le gène codant pour la MHCIIb semble ne répondre à la stimulation thyroidienne que dans certains muscles (Izumo *et al.*, 1986).

b. Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes (le cortisol par exemple) sont des hormones catabolisantes. A dose supraphysiologique, ils sont capables d'induire une atrophie musculaire en modifiant la balance synthèse/dégradation protéique (Czerwinski *et al.*, 1989). Ceci a été clairement démontré au niveau des MHC (Seene et Alev, 1985 ; Seene *et al.*, 2003). Le processus d'atrophie s'applique aux fibres de manière sélective : les fibres lentes sont moins touchées que les fibres rapides, et au sein des fibres rapides, les fibres 2B sont plus affectées que les fibres 2A. La distribution en isoformes de ces dernières est modifiée après traitement aux glucocorticoïdes. Les fibres 2A et 2B sont moins exprimées dans le soleus, alors que dans les muscles rapides (EDL, diaphragme), la quantité de 2A augmente (Polla *et al.*, 1994).

c. L'insuline, l'IGF et la GH (Growth Hormone)

Ce sont des hormones anabolisantes. L'insuline semble avoir un effet dans la myogénèse. Il a été observé que dans le diabète expérimental, il se manifeste un déficit de l'activité contractile (Eibschutz *et al.*, 1984) en partie dû à une modification de la composition en myosine, avec réduction de la myosine rapide. De telles modifications ont été observées dans les cas de déficience nutritionnelle (avec réduction du taux sanguin d'insuline) dans lesquels a lieu également une transition rapide—lent (Kelsen *et al.*, 1985 ; Lanz *et al.*, 1992), accompagnée d'une atrophie sélective des fibres rapides, moins capables d'assimiler le glucose et les acides aminés que les fibres lentes (Brady *et al.*, 1981).

L'IGF-1 détermine l'augmentation de l'incorporation des acides aminés, de la synthèse protéique et de la captation du glucose. Il est en outre capable de stimuler la différentiation myogénique, effet probablement basé sur l'induction du facteur de transcription de la myogénine (Florini et Magri, 1989). L'IGF-I entraînerait également une

hypertrophie musculaire en mobilisant les cellules satellites, et en induisant un métabolisme glycolytique via une voie calcineurine-NFAT dépendante (Musaro *et al.*, 1999; Semsarian *et al.*, 1999).

Un autre facteur de croissance est le GH, pour lequel il a été démontré qu'un déficit provoque dans le muscle de rat adulte, une diminution de la proportion en fibres de type 1, accompagnée de l'expression de fibres dans un état transitionnel (2C/1B) (Ayling *et al.*, 1989). Une administration de GH après hypophysectomie permettrait le retour à des phénotypes « normaux » (Ayling *et al.*, 1989).

d. Les androgènes

Les androgènes (testostérone principalement) sont capables d'engendrer une augmentation de la synthèse protéique et de la masse musculaire même si cela a été décrit de façon peu claire, puisque couplé ou non à une augmentation de l'activité contractile (Alen *et al.*, 1984 ; Griggs *et al.*, 1989). Les androgènes sont en concentrations plus élevées chez les rats mâles que chez les femelles, ce qui détermine un développement « sexué » du tissu musculaire. Cependant, cette différence est réduite lorsque les fibres musculaires des femelles contiennent une concentration élévée en récepteurs aux androgènes. En effet, il ne semble pas exister de preuve qu'il y ait une différence dans la distribution des isoformes et des différents types de fibres dans les muscles des mâles par rapport à ceux des femelles. Par contre, l'administration d'androgènes à des rats castrés ou à des femelles cause des transitions phénotypiques lent—rapide, qui semblent plus marquées dans les muscles lents que dans les muscles rapides (Holmang, 1993).

7. Le vieillissement

Les caractéristiques musculaires subissent des modifications liées à l'âge. Au cours du vieillissement, il existe une diminution de la synthèse en protéines myofibrillaires. Celle-ci affecte tout particulièrement les chaînes lourdes de myosine (Balagopal *et al.*, 1997). Pour les muscles squelettiques rapides de rat, l'avancement dans l'âge induit une diminution progressive de la MHCIIb, avec une augmentation de la MHCIId/x, et une diminution de la quantité de MHCIIa (Larsson *et al.*, 1991, 1993). Pour le soleus de rat, il a été démontré une diminution des fibres de type 2 et une augmentation de l'expression de fibres de type 1 (Lexell *et al.*, 1988). Le soleus de rats âgés subit donc une transformation dans le sens lent vers plus lent, avec une augmentation du taux de MHCI et une diminution concomitante des MHCIIa (Larsson *et al.*, 1995 ; Balagopal *et al.*, 2001).

8. L'entraînement et l'hypoxie

Les modifications induites dans le muscle squelettique pendant l'entraînement, peuvent être considérées comme un processus d'adaptation qui consent à une meilleure réponse du muscle en terme de prestation contractile. Il est nécessaire de distinguer deux modalités et des intensités d'entraînement différentes: un entraînement en endurance, c'est-àdire de grande durée, et un entraînement en force avec exercices brefs mais intenses.

Lors d'un entraînement en endurance, il est décrit une réduction de la proportion de fibres de type 2B (Andersen et Henriksson, 1977), ce qui explique la diminution de la fatigue musculaire. Une augmentation de la proportion des MHC lentes aux dépens des rapides a ainsi été observée (Sullivan *et al.*, 1995 ; Pette, 1998 ; Allen *et al.*, 2001). Généralement, aucune hypertrophie musculaire n'est décrite après ce type d'entraînement.

Une hypertrophie des fibres est en revanche observée dans le cas d'entraînement de puissance, on observe aussi une amélioration des performances musculaires. Un exercice intense entraîne ainsi un accroissement de la force maximale et de la vitesse de raccourcissement (Trappe *et al.*, 2000). Les sections transversales des fibres 1 et 2 sont plus importantes (Klitgaard *et al.*, 1989), et il y a une augmentation de l'expression des fibres de type 2A, 2X, comme observé chez des sprinteurs (Andersen *et al.*, 1994 ; Andersen et Aagaard, 2000).

Enfin, des études ont porté sur l'entraînement en endurance associé à des conditions d'hypoxie (par effet de l'altitude ou du caisson hyperbar). Un consensus émerge des études réalisées sur l'exposition chronique à l'hypoxie concernant des modifications de morphologie musculaire, telles qu'une diminution de la section des fibres, une perte de masse musculaire et une augmentation de la densité des capillaires (Desplanches et al., 1996 ; Deveci et al., 2001). Il a été rapporté que l'hypoxie chronique module la composition des chaînes lourdes de myosine en augmentant les isoformes de type rapide. En effet, à l'exception des études de Sillau et Banchero (1977), et de Bigard et al. (1991) qui ne trouvent aucune différence dans la composition des fibres du soleus de rat suite à une exposition à l'hypoxie, l'ensemble des travaux aboutissent à des résultats similaires en mettant en évidence que des rats hypoxique présentent de hauts pourcentages de fibres glycolytico-oxydatives (Ishihara et al., 1995; Itoh et al., 1995). Une étude menée par Bigard et al. (2000a) confirme qu'une exposition de quatre semaines à l'hypoxie hypobarique chronique se traduit bien par une diminution des MHCI dans le soleus de jeunes rats. Ces auteurs indiquent qu'un entraînement en endurance, conduit en hypoxie, permet le retour à un profil des isoformes de MHC similaire à celui mesuré en normoxie, notamment pour le soleus, soit une transformation rapide \rightarrow lent.
Dans le tableau 3 sont récapitulés les effets des différents modèles utilisés dans notre étude, sur les transitions phénotypiques et les modifications de masses musculaires.

	TRANSFORMATIONS PHÉNOTYPIQUES		MASSE (relative au poids corporel)		CHARGE	ACTIVITÉ ÉLECTRIQUE	
	Muscle lent (type soleus)	Muscle rapide (type EDL)	Muscle lent	Muscle rapide	MUSCULAIRE	Muscle lent	Muscle rapide
ÉLECTROSTIMULATION	HFS : lent→rapide	CLFS : rapide→lent			=	(HFS)	++ (CLFS)
DÉNERVATION	lent→rapide	rapide→lent			=	0	0
MICROGRAVITÉ RÉELLE OU SIMULÉE	lent→rapide	0		-			0
HYPERGRAVITÉ (conception→adulte)	lent→plus lent	0	=	=	++	++	
HYPERGRAVITÉ (adulte)	lent→rapide peu marquée		++	=	++	-+-+	
SURCHARGE FONCTIONNELLE	lent→plus lent	rapide→lent	++	++	++	=	=
CLENBUTÉROL	lent→rapide	0		=		=	=

Tableau 3. Récapitulatif des modifications phénotypiques et de masse musculaire ayant lieu dans des modèles affectant l'activité neuromusculaire (charge et activité électrique) et après traitement au clenbutérol. HFS = High Frequency Stimulation; CLFS = Chronic Low Frequency Stimulation.

B. MECANISMES GENIQUES, PRE ET POST-TRADUCTIONNELS DE REGULATION DE LA PLASTICITE MUSCULAIRE

Les changements en taux protéiques et en isoformes de protéines lors d'adaptations à diverses contraintes environnementales affectant le muscle squelettique peuvent être potentiellement contrôlés au niveau des différentes étapes ayant lieu entre le décodage de l'ADN et l'assemblage des produits de traduction (figure 11).



Figure 11. Le contrôle de l'expression génique. Divers signaux extracellulaires engendrent des réponses pré/post transcriptionnelles et post-traductionnelles. L'influence de la balance synthèse/dégradation de l'ARN ainsi que des protéines détermine l'état d'une protéine à un moment donné. Sont indiqués en italique les niveaux de régulation pour lesquels un rôle dans la plasticité musculaire a été démontré. D'après Flück et Hoppeler (2003).

1. Les mécanismes géniques

Certaines protéines de la famille MyoD, ou de la famille MEF2 (Myosin Enhancer Factor 2) (relatifs à la calcineurine, cf paragraphe B.2. La calcineurine) collaborent lors de la myogénèse pour l'élaboration des lignées cellulaires et sont essentielles pour la transcription de gènes muscle-spécifiques (Molkentin *et al.*, 1995, 1998 ; Olson *et al.*, 1995 ; Black et Olson, 1998).

Les MRF (Myogenic Regulator factor) qui régulent les transformations musculaires constituent un groupe de 4 protéines : myogénine, MyoD, myf5 et MRF4. Par association avec d'autres protéines, elles lient des séquences de l'ADN (E-box) que l'on retrouve dans de nombreuses séquences géniques régulatrices de la MHCI ou la MHCIIb. Par exemple, MyoD et Myf-5 semblent principalement réguler la transition de la phase proliférative à la phase postmitotique des myoblastes, alors que la myogénine est impliquée dans la différentiation des myoblastes en myotubes. Le facteur MRF4 (Muscle Regulatory Factor 4) serait, quant à lui, impliqué lors des états tardifs de la myogénèse, mais contrairement aux autres facteurs de régulation, son expression est élevée chez l'adulte (Kraus et Pette, 1997).

Un rôle spécifique des facteurs de régulation myogénique dans la différentiation terminale des fibres lentes et rapides est suggéré. En effet, Hughes *et al.* (1993) ont observé une expression diférentielle de MyoD et de la myogénine dans les différents muscles lents et rapides de rats. Ainsi, les transcrits de la myogénine sont en concentrations plus élevées dans le soleus, composé essentiellement de fibres lentes, alors que MyoD est essentiellement présent dans les fibres rapides (Hughes *et al.*, 1993). De plus, MyoD est fortement exprimé dans les cellules satellites du soleus, alors que la myogénine est exprimée dans les deux types cellulaires lents et rapides (Dupont-Versteegden *et al.*, 1998). Ceci expliquerait que la fusion des cellules satellites permette l'expression de la MHCIIb dans les fibres lentes.

Ainsi, certaines hypothèses supposent que l'altération du phénotype musculaire correspondrait à un changement du rapport MyoD/myogénine suite à une stimulation électrique ou hormonale (Hughes *et al.*, 1993). Par exemple, lors d'expériences de crossinnervation du soleus avec un nerf de muscle rapide, Hughes *et al.* (1993) ont montré que, au cours de la transformation lent→rapide observée dans ce cas, il apparaissait une diminution du taux de transcrits en myogénine. La dénervation a également permis de démontrer un rôle majeur du facteur nerveux dans l'activation génique. D'importantes et rapides augmentations des transcrits des facteurs de régulations géniques, tout spécialement la myogénine mais aussi MyoD, ont été observées après dénervation (Walters *et al.*, 2000 ; Weis *et al.*, 2000). Ces changements sont cependant transitoires puisqu'ils sont réversibles après électrostimulation. En outre, ils n'apparaissent qu'au début d'une longue période de dénervation (Duclert *et al.*, 1991 ; Voytik *et al.*, 1993).

MRF4, quant à lui, jouerait un rôle important dans la régulation des gènes pendant la régénération musculaire, ainsi qu'après dénervation (Weis *et al.*, 2000). Lors de l'hypodynamie-hypokinésie, uniquement MyoD est démontrée en augmentation, ce qui a permis d'expliquer la transformation lent—rapide observée (Wheeler *et al.*, 1999). Cependant, si le rapport myogénine/MyoD est en accord avec l'augmentation des MHC rapides dans le soleus, il ne l'est en aucun cas dans l'EDL (Dupont-Versteegden *et al.*, 1998). Quoi qu'il en soit, MyoD et myogénine pourraient être impliquées dans la régulation de la taille des fibres et l'expression en MHC en réponse à une modification de la commande motrice (Buonanno *et al.*, 1998 ; Dupont-Versteegden *et al.*, 1998). Cependant, des résultats ne validant pas cette théorie ont été décrits chez les souris pour lesquelles une surexpression de myogénine n'induit pas de changement dans l'expression en isoformes de MHC. Ainsi, même si le modèle de Hughes *et al.* (1993) fondé sur une

régulation de la balance myogénine/MyoD est encore acceptable dans la compréhension des différents mécanismes de régulation de l'expression myogénique, un modèle impliquant l'intervention du motoneurone a été proposé Buonanno *et al.* (1998) : le motoneurone induirait des mécanismes régulateurs de la transcription qui activeraient l'expression des gènes codant pour les protéines contractiles. Ces modèles sont décrits par Flück et Hoppeler (2003) et repris en figure 12. Enfin, des interactions entre calcineurine et MRF ont été mises en évidence. Calcium et calcineurine régulent en effet le gène de la myogénine au niveau de la transcription. La calcineurine active MyoD et stimule MEF2, ce qui induit l'expression de myogénine (Friday *et al.*, 2003).



Figure 12. Schéma récapitulatif des deux principaux mécanismes connus de régulation de l'activation des gènes codant pour les myosines.

2. La calcineurine (CaN)

La stimulation nerveuse provoque des changements dans les concentrations intracellulaires de certaines molécules sensibles aux variations de potentiels électriques, incluant le calcium, l'AMPc, le NO, ainsi que des produits des gènes de réponse-immédiate (c-fos par exemple) (Michel *et al.*, 1994 ; Chin *et al.*, 1998). Mais, à notre connaissance, il semblerait qu'aucune voie de signalisation spécifique ni aucune molécule régulatrice reliant l'activité motoneuronale à l'expression de gènes de changements phénotypiques musculaires n'ait encore été mise en évidence en dehors de la voie calcineurine–dépendante.

Les mécanismes de la voie calcineurine ont été caractérisés essentiellement lors de l'activation de l'expression de gènes cytokines des lymphocytes T et B répondant aux stimuli qui engendrent une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Rao *et al.*, 1997). La liaison du calcium au complexe calmoduline-calcineurine (les isoformes de calcineurine étant substrat-spécifiques) stimule l'activité sérine-thréonine phosphatase de la calcineurine qui déphosphoryle alors le NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). Ainsi déphosphorylé, le NFAT migre du cytoplasme vers le noyau où il stimule la transcription de gènes cibles comme ceux de la famille de MEF2 (Crabtree et Olson, 2002). Il a été démontré que l'activité de la CaN, ainsi que la translocation du NFAT vers le noyau, étaient insensibles aux oscillations de grande amplitude de la concentration en calcium intracellulaire (activant d'autres phénomènes calcium-dépendants comme le NFkB ou c-Jun). Au contraire, la voie CaN–NFAT répond préférentiellement à des concentrations en calcium intracellulaire maintenues à niveau bas (Timmerman *et al.*, 1996).

L'abondance de la CaN et du NFAT (NFAT2 et 4) dans les muscles squelettiques (Hoey *et al.*, 1995), ainsi que la différence en concentration calcique intracellulaire entre les muscles lents (100-300nM) (Chin et Allen, 1996) et rapides (50nM associé à des pics de 1µM) (Westerblad et Allen, 1991) indiquent clairement une corrélation entre le «pattern»

d'activité neuronale spécifique d'un type de muscle, la concentration calcique résultant de cette activité électrique et la voie de signalisation calcineurine-NFAT (Chin *et al.*, 1998). Ainsi, la voie calcineurine serait stimulée dans un muscle de phénotype lent, alors qu'elle ne le serait pas dans un muscle rapide. Il a été démontré par la suite que la CaN est plus exprimée dans le soleus (lent) que dans le plantaris (rapide) (Bigard *et al.*, 2000b). Le schéma et la figure 13 (Chin *et al.*, 1998) résument cette différence d'activation des muscles lents et rapides. Tout récemment, Mccullagh *et al.* (2004) ont démontré que la CaN régulerait non seulement l'expression de la MHCI mais aussi inhiberait l'expression de la MHCIIb.



slow fiber

fast fiber

Figure 13. Schéma représentant l'activation de la voie calcineurine-NFAT (CaN-NFAT) dans un muscle de type lent et un muscle de type rapide, ainsi que les modes de transitions phénotypiques entre ces deux types de muscles. D'après Chin et al. (1998).

Cette interprétation schématique de Chin *et al.* (1998) permet d'expliquer les résultats obtenus lors des expériences de stimulation. En effet, une stimulation chronique à 10 Hz d'un muscle rapide entraîne une modification phénotypique de type rapide—lent. L'élévation soutenue du taux de calcium intracellulaire observée lors de cette transformation (Williams *et* *al.*, 1986 ; Sreter *et al.*, 1987) stimulerait la voie calcineurine-NFAT qui établierait alors, les bases moléculaires de l'activation des gènes spécifiques de type lent.

Outre le NFAT, d'autres facteurs de transcription (MEF2) pouvant être activés par la calmoduline, sont mis en jeu par la CaN (Wu *et al.*, 2000, 2001). Cette voie MEF2 est aussi impliquée dans les transitions de MHC (Allen et Leinwand, 2002).

3. La régulation par l'ARN : le pré-transcrit et le transcrit

Il existe différentes façons pour une cellule de réguler son expression protéique intrinsèque. La limitation du domaine nucléaire est ainsi une théorie indiquant qu'une cellule musculaire ne peut produire qu'une quantité limitée d'ARNm codant pour les protéines ribosomales, structurales ou métaboliques, dépendant de son volume nucléaire (Allen *et al.*, 1999). Cette théorie définissant un « état critique » du volume nucléaire, indique de fait, la nécessité pour une cellule musculaire de fusionner à une cellule satellite afin d'accroître son matériel de transcription pour augmenter son potentiel adaptatif à la demande musculaire (Schiaffino et Reggiani, 1994).

Les altérations pré ou post-transcriptionnelles ont une grande importance dans la régulation moléculaire du phénotype musculaire. Certaines modifications sont ainsi le résultat de la régulation de la balance synthèse/dégradation des ARN (Day et Tuite, 1998), comme dans les cas d'hypertrophie musculaire où il existe un accroissement de la synthèse protéique résultant d'une augmentation de l'activité ARN polymérase (Goldberg et Goodman, 1969). Une étude des réponses moléculaires fournies par le muscle pour modifier ses propriétés contractiles indique qu'en règle générale, le vecteur des changements adaptatifs des ARNm suit la même direction et le même sens que celui reflétant les adaptations de l'expression protéique (Booth et Baldwin, 1995). Lorsque ARN et produit protéique ne varient pas dans le

même sens, l'explication est donnée par un haut niveau de « turn-over » ou par un niveau basal élevé de la concentration en protéine. Un changement du taux d'ARNm est alors capable d'engendrer des adaptations de la concentration en protéine codée.

4. La régulation post-traductionnelle

Une fois le produit de transcription traduit, l'action ou l'activité de la protéine résultante peut être modulée par différents mécanismes. Outre la formation de complexes inhibiteurs ou activateurs affectant l'activité de la protéine (citons pour exemple le NFkB, ou encore le complexe régulateur Tn-Tm) des modifications affectant directement la structure d'une protéine donnée sont de plus en plus un centre d'intérêt des recherches actuelles. On distingue parmi celles-ci la phosphorylation, la glycosylation, la farnélisation, l'alkylation, la méthylation, l'acétylation... Ces régulations d'ordre post-traductionnel des protéines peuvent constituer une manière efficace et ubiquitaire de moduler les propriétés fonctionnelles d'une protéine ou d'une voie de régulation. Les modifications par des enzymes relatives au métabolisme et aux voies de signalisation ont été rapportées comme d'importantes réponses à diverses contraintes physiologiques du muscle squelettique (Booth et Baldwin, 1995 ; Cieniewski-Bernard *et al.*, 2004). Certaines de ces adaptations ne sont que transitoires et sont elles-mêmes régulées par la dégradation ou le recyclage des protéines affectées, voire encore par la nature réversible de la modification (Bergamini, 1992 ; Sorkin et Waters, 1993).

III. LA MLC2

Les chaînes légères de myosines jouent un rôle régulateur important lors de la contraction musculaire. En effet, leur état de phosphorylation se répercute sur l'interaction actine-myosine. Cependant, la fonction régulatrice des MLC2 au sein du muscle strié squelettique, via le processus de phosphorylation, n'est pas encore bien définie.

A. STRUCTURE ET FONCTION

1. La structure

La protéine MLC2 (ou RLC) a été largement étudiée à un niveau génique dans les années 70. La séquence de son gène a été décodée dans de nombreuses espèces. Sa structure chez les mammifères reste encore controversée. Chez le rat, cette séquence comporte 7 exons et 6 introns (Nudel *et al.*, 1984) (figure 14A).

Comme il l'a été décrit précédemment, la traduction de l'ARNm de la MLC2 donne naissance chez le rat à une protéine de ~17 kD connue à ce jour sous deux isoformes, une lente et une rapide (Schiaffino et Reggiani, 1996). Les RLC sont localisées au niveau de la jonction tête-queue des MHC et stabilisent l'hélice alpha située au niveau de la partie charnière de la molécule de MHC (Szczesna, 2003) (figure 14B). Les RLC sont liées de façon non-covalente aux chaînes lourdes de sorte que leur domaine N-term s'enroule autour du domaine C-term des MHC entre les résidus Asn 825 et Leu 842, et que leur domaine C-term interagisse avec les MHC entre les résidus Glu 808 et Val 826 (Rayment *et al.*, 1993a, 1993b).



Figure 14. A. Représentation schématique de l'ARN de la MLC2 montrant les parties codantes et non codantes. **B**. Illustration 3D de la position de la MLC2 au niveau de la structure du domaine régulateur de la tête S1 de MHC. **C**. Schématisation de la zone EF-hand sensible au calcium de la protéine MLC2.

La partie N-term de la MLC2 contient un site de liaison pour les cations bivalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}), localisé dans le premier motif hélice-boucle-hélice (figure 14C). Ce site a une conformation équivalente à celui des TnC. En absence de calcium, ce site est dans une conformation dite « conformation fermée » par repliement des hélices les unes sur les autres. Le calcium entraîne l'établissement d'une « conformation ouverte » par déplacement des hélices qui deviennent perpendiculaires. L'importance de ce site n'est à notre connaissance pas encore définie. Il est pour l'instant supposé que ce site de fixation Ca^{2+}/Mg^{2+} influerait sur la liaison des RLC aux MHC, entraînant alors des effets sur le cycle des ponts actine-myosine (Szczesna, 2003).

2. La fonction

La première fonction de la MLC2 qui a été décrite est un rôle dans la stabilité des sarcomères. La localisation de la MLC2 au niveau du « coude » de la MHC suppose une implication possible de celle-ci dans le système du cycle des ponts actine-myosine. Il a été en effet démontré que le domaine de liaison des MLC2 aux MHC subissait des changements conformationnels d'inclinaison et de torsion pouvant jouer un rôle important dans la génération de force (Ritz-Gold *et al.*, 1980 ; Rayment *et al.*, 1993a, 1993b ; Uyeda *et al.*, 1996 ; Szczesna, 2003). Dans le muscle squelettique, par des expériences d'extraction-remplacement des MLC sur fibres pelées, Szczesna *et al.* (1996) ont démontré que l'absence de MLC2 dans le complexe moléculaire musculaire induisait une diminution par 2 du niveau de redéveloppement de la tension musculaire obtenue pour des concentrations calciques sous-maximales. De même, suite à des expériences d'« in-vitro motility assay », et après extraction des MLC2, il a été observé que les filaments d'actine atteignaient les têtes de myosine avec une vitesse réduite (Lowey *et al.*, 1993). Cette vitesse retourne à une valeur « normale » après

réintroduction des MLC2. D'autres expériences d'extraction ont démontré que l'extraction de la MLC2 augmentait l'affinité de la myosine pour le MgADP, mais diminuait l'affinité pour le Pi.

La MLC2 entre également en jeu pour la modulation de la force générée par la fibre musculaire en fonction de la concentration calcique (Perrie et al., 1973). Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire d'une modification de la phosphorylation de la protéine. Ceci sera évoqué dans le paragraphe suivant. Cette phosphorylation est elle-même contrôlée par un déplacement de l'équilibre kinase/phosphatase (équilibre relatif à l'activité enzymatique mais l'état l'expression protéine), aussi à de la enzymes liées à de phosphorylation/déphosphorylation de la MLC2.

B. LA PHOSPHORYLATION

La modification post-traductionnelle la plus connue à ce jour dans le muscle squelettique est la phosphorylation. La phosphorylation de la MLC2 sur des sites spécifiques a été pour la première fois décrite par Perrie *et al.* (1973). Dans le muscle squelettique de rat, les sites de phosphorylation se situent au niveau de résidus sérine en position N-term. Jusqu'à présent, il n'a été démontré dans le muscle squelettique, l'existence que d'un site unique de phosphorylation sur la sérine 14 pour l'isoforme lente, et sur la sérine 15 pour l'isoforme rapide (Blumenthal et Stull, 1980). Dans le muscle lisse, outre un premier site de phosphorylation situé en sérine 19, un second site a été décrit, situé selon les auteurs en sérine 1-2, ou en thréonine 9 (Ikebe et Hartshorne, 1985). Le premier site serait phosphorylable par une Ca²⁺/calmoduline MLC kinase dépendante ainsi que par une Rho-kinase (Ikebe et Hartshorne, 1985) et activerait l'interaction actine-myosine. Le second site serait lui sous

l'action de la PKC (Protéine Kinase C) et sa phosphorylation aurait un effet inhibiteur (Ikebe *et al.*, 1985 ; Ikebe et Reardon, 1990a, b). L'existence d'un second site de phosphorylation pour la MLC2 squelettique est pour l'instant sujet à discussion (Morano *et al.*, 1989 ; Gonzalez *et al.*, 2002).

1. Les enzymes MLCK et MP (PP1, MYPT)

Les enzymes assurant la régulation de la phosphorylation de la MLC2 sont diverses dans le muscle lisse. Dans le muscle squelettique c'est le duo régulateur indissociable MLCK / MLCP qui est principalement évoqué.

a. La MLCK (Myosin Light Chain Kinase)

Les MCLK ont été purifiées à partir de différents tissus incluant les muscles squelettiques (Pires et Perry, 1977 ; Blumenthal et Stull, 1980 ; Adelstein et Klee, 1981) lisses (Adelstein et Klee, 1981 ; Miller *et al.*, 1983) et cardiaques (Walsh *et al.*, 1979 ; Wolf et Hofmann, 1980). Le décodage de l'ADNc de la MLCK chez le rat (Roush *et al.*, 1988) a permis de démontrer que l'ADN de la MLCK présente 2823 acides aminés, avec une séquence de lecture ouverte de 1830 acides aminés. Une analogie de 96% en C-term (région catalytique et site de liaison à la calmoduline) existe entre la MLCK de rat (Roush *et al.*, 1988) et celle de lapin, décodée par Pires et Perry (1977). Elle n'est transcrite que par un seul et unique ARN dans le muscle squelettique.

Malgré les similitudes existant entre les différentes MLCK retrouvées dans les tissus musculaires et non musculaires, leur poids moléculaire (PM) est variable. Les MLCK extraites du muscle lisse présentent ainsi un PM d'environ 130-150kD, alors que ceux des MLCK des muscles striés cardiaque et squelettique sont d'environ 75-95kD (Pires et Perry,

1977 ; Wolf et Hofmann, 1980 ; Adelstein et Klee, 1981). L'existence d'isozymes de MLCK tissu- et espèce-spécifiques a également été démontrée (Stull *et al.*, 1985).

La MLCK présente la particularité d'être substrat-spécifique. Elle phosphoryle uniquement et strictement les RLC (Stull *et al.*, 1985). La MLCK est une protéine $Ca^{2+}/calmoduline dépendante. Liée sous forme de complexe à la calmoduline dans son état de repos, la MLCK s'active suite à la liaison du calcium sur les 4 sites EF-hand de la calmoduline (Blumenthal et Stull, 1980 ; Stull$ *et al.*, 1985). Cependant, l'importance du rôle de la MLCK varie selon qu'il s'agisse d'un muscle squelettique ou d'un muscle lisse. En effet, la phosphorylation de la MLC2 semble nécessaire et indispensable à l'initiation de la contraction dans le muscle lisse (Kamm et Stull, 1985), alors qu'elle ne régule que certains aspects de la contraction du muscle squelettique (voir paragraphe B.2. Les effets de la phosphorylation de la MLC2).

Dans le muscle squelettique, l'étude de l'expression de l'ARN de la MLCK a démontré qu'il était exprimé de façon différente dans les muscles lents ou rapides. En général, l'activité enzymatique est corrélée à l'expression de la MLCK. Il a été observé qu'un muscle « rapide-glycolytique » comme le gastrocnemius blanc présente une activité de phosphorylation fortement supérieure à celle des muscles lents. Ainsi, le gastrocnemius rouge (muscle « rapide-glycolytique ») et le soleus (muscle « lent-oxydatif ») possèdent respectivement 60 et 13% de l'activité enzymatique observable dans le gastrocnemius blanc (Roush *et al.*, 1988).

Enfin, il a été décrit par Gao *et al.* (1992) que la MLCK s'autophosphoryle en Ser 161 lors de la contraction, ce qui aurait sur celle-ci un effet autoinhibiteur.

b. La MP (Myosin light chain Phosphatase)

La MP est une enzyme composée de deux sous-unités, catalytique et régulatrice. La sous-unité catalytique est identifiée comme la Protéine Phosphatase 1 (PP1) de 37 kD. Cette sous-unité fait partie de la grande famille des PP1, ser/thr phosphatases. Dans le muscle squelettique, la PP1 a été identifiée comme les isoformes PP1ß ou PP18 qui sont en fait une seule et même protéine (Dent et al., 1992 ; Cohen, 2002). La PP1 déphosphoryle une multitude de protéines. La spécificité de déphosphorylation est donnée par la seconde sousunité régulatrice : dans le muscle il s'agit de la sous-unité MYPT (MYosin Phosphatase Target). D'après des études menées dans le muscle lisse (Cohen, 2002), celle-ci interagit avec un site hydrophobe de la PP1, par l'intermédiare du motif RVxF. Trois isoformes de MYPT sont actuellement connues (Cohen, 2002). La sous-unité spécifique du muscle squelettique est la MYPT2 (Damer et al., 1998; Fujioka et al., 1998; Moorhead et al., 1998). C'est une protéine de 110kD qui présente une homologie de 61% avec la phosphatase connue dans le muscle lisse (Moorhead et al., 1998) (voir figure 15). En effet, MYPT a été étudiée essentiellement dans le muscle lisse (MYPT1). Dans son domaine N-term, elle lie la PP1 catalytique. Dans son domaine C-term, elle renferme des sites de liaison pour les phospholipides (Ito et al., 1997), la Rho Kinase (Kimura et al., 1996) et l'acide arachidonique (Gailly et al., 1996). À l'heure actuelle, ces propriétés ne sont pas décrites dans le muscle squelettique. L'homologie à seulement 48% dans leur domaine C-term entre MYPT1 et MYPT2 laisse penser que la possibilité d'une telle gamme d'interactions reste hypothétique.



Figure 15. Comparaison entre les sous-unités régulatrices de la Myosine Phosphatase (MP) du muscle squelettique (MYPT2) et du muscle lisse (MYPT1).

2. Les effets de la phosphorylation de la MLC2.

Il a été démontré « in vitro » que les niveaux de phosphorylation de la MLC2 augmentent après une stimulation tétanique chez le rat et le lapin (Moore *et al.*, 1985, 1995). Ainsi, il existe un effet potentiateur de la phosphorylation sur la contraction après stimulation tétanique. Une tentative d'explication de cette potentialisation a été donnée par Levine *et al.* (1996). Ces auteurs ont observé en cristallographie que lorsque la MLC2 est phosphorylée, il existe une réorganisation des myofilaments par rapport à leur état de repos en conditions nonphosphorylées. Les têtes de myosine seraient enfermées dans le filament fin en conditions MLC2-phosphorylées, ce qui augmenterait l'intensité de l'interaction actine-myosine lors du retour à de faibles concentrations calciques. Ceci confirmerait l'hypothèse de Yang *et al.* (1998) qui indique que l'amplitude de la potentialisation à basse concentration calcique est inversement proportionnelle à la distance entre le filament épais et le filament fin. Cette distance diminue pour des longueurs de sarcomères importantes et lorsque l'espace interfilamentaire est compressé osmotiquement.

D'autres effets de la phosphorylation ont été répertoriés (Cooke *et al.*, 1982 ; Crow et Kushmerick, 1982) : la phosphorylation de la MLC2 permettrait de réduire le temps de latence entre 2 cycles de ponts actine-myosine successifs.

D'après Sweeney et Stull (1990), sur la base de l'hypothèse proposée par Brenner (1988), qui découpe le cycle des ponts actine-myosine en deux états « pas de force générée »/« génération de force », l'action de la phosphorylation de la MLC2 aurait pour effet d'augmenter la cinétique de passage de l'état « pas de force générée » à l'état « génération de force » du cycle des ponts actine-myosine.

Les phénomènes de potentialisation de la contraction via la phosphorylation sont identiques qu'il s'agisse d'un muscle lent ou d'un muscle rapide. Cependant, dans le cas d'une stimulation tétanique, pour obtenir une augmentation de phosphorylation, la stimulation doit être plus intense pour un muscle lent que pour un muscle rapide (Manning et Stull, 1982; Moore et Stull, 1984). Ceci résulterait d'une quantité plus importante de MLCK dans les muscles rapides (Gao *et al.*, 1992).

D'après Szczesna *et al.* (2002), la phosphorylation de la MLC2 aurait deux effets lors de la contraction musculaire :

Un effet à court terme : en général, il est observé une augmentation de la sensibilité calcique (décalage vers la gauche de la relation Tension/pCa) des fibres musculaires. Celle-ci a été observée par de nombreuses équipes (Metzger et al., 1989 ; Sweeney et al., 1993 ; Szczesna et al., 2002). Une différence d'intensité de réponse à la phosphorylation est cependant notée entre ces auteurs. Szczesna et al. (2002) décrivent des résultats beaucoup plus marqués que ceux de Sweeney et al. (1993). Une telle différence pourrait être expliquée par un niveau de base de phosphorylation

différent dans les fibres étudiées par chaque équipe. L'augmentation de la phosphorylation n'a cependant pas permis de mettre en évidence des changements dans la cinétique de développement de la force. Elle permet en fait aux muscles de développer une force optimale pour des concentrations sous-maximales de calcium (Szczesna *et al.*, 2002).

Un autre effet possible de la phosphorylation serait détectable à long terme. Il serait fondé sur une relation entre la commande nerveuse et la régulation de la phosphorylation de la MLC2. En effet, des muscles de souris présentant des potentiels d'action indépendants d'une stimulation électrique ont un niveau de phosphorylation de la MLC2 supérieur à celui de muscles contrôles (Jockusch *et al.*, 1988 ; Tubman *et al.*, 1996). Par contre, des muscles dont le message nerveux est inhibé par la TTX ont un niveau de phosphorylation inférieur à celui de muscles contrôles (Tubman *et al.*, 1996). De plus, d'autres études nous démontrent qu'il existe des niveaux hétérogènes de phosphorylation de la MLC2 suite à des traitements modifiant le message nerveux (Germinario *et al.*, 2002 ; Gonzalez *et al.*, 2002). Enfin, il est intéressant de noter que différentes études, réalisées sur des espèces variées, ont démontré que le niveau de phosphorylation dans le muscle cardiaque était en corrélation directe avec son niveau de phosphorylation du cœur de Hamster par un facteur 2.5 durant sa periode d'hibernation (diminution des battements cardiaques) (Morano *et al.*, 1992).

Pour finir, il est à noter que d'autres modifications post-traductionnelles sont envisageables pour la MLC2, comme la glycosylation. Il a en effet été démontré que la fonction de certaines protéines musculaires était influencée par une balance dite « Ying-

Yang » entre phosphorylation et glycosylation (Comer et Hart, 1999), pouvant réguler certaines voies de transduction. Au laboratoire, nous avons démontré que la MLC2 est une protéine O-Nacetylglucosaminilée (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2004). La possibilité d'un « Ying-Yang » pour la MLC2 pourrait sans doute influencer les interprétations des résultats obtenus dans ce travail.

POSITION DU PROBLEMIE

es études de plus en plus nombreuses mettent en évidence l'intervention de modifications post-traductionnelles dans les processus de régulation de la contraction musculaire. Comme nous l'avons dit précédemment, des processus de phosphorylation ou de glycosylation déjà connus pour être impliqué dans les phénomènes de régulation de voies de transduction, ont été détectés au sein même des protéines contractiles.

Il est connu que la MLC2 a un rôle régulateur dans la contraction musculaire. La compréhension des mécanismes sous-tendant cette régulation par la MLC2 est l'objet de nombreuses recherches depuis les années 1970. Ainsi, selon Perrie *et al.* (1973), la phosphorylation de la MLC2 peut réguler ou modifier les caractéristiques de la contraction musculaire. La majorité des études a consisté en une observation, à court terme, des effets engendrés par la phosphorylation de la MLC2 tels que les modulations de la sensibilité calcique des fibres musculaires et l'interaction actine-myosine. En effet, à court terme, l'élévation de phosphorylation observée après une tension tétanique augmente la sensibilité calcique des fibres musculaires et intensifie la formation ou la destruction des ponts actine-myosine. Ces modifications se traduisent par une potentialisation de la contraction musculaire, essentiellement observée dans les muscles de type rapide (comme l'EDL) (Moore et Stull, 1984).

L'interprétation admise de nos jours pour expliquer ces résultats, est que cette potentialisation de la contraction aurait pour but de compenser la déficience des muscles de type rapide plus fatigables que les muscles de type lent (comme le soleus), dans leur capacité à résister à la fatigue, en retardant la chute du niveau de force engendrée lors de la contraction.

Cependant, à l'heure actuelle, nous n'avons aucune donnée nous informant du rôle de la phosphorylation de la MLC2 dans des études à long terme. Le muscle étant une structure

très plastique, l'adaptation du tissu musculaire à des stimuli de longue durée (environ 15 jours généralement pour obtenir des modifications stables, ce que nous considèrerons comme une étude à long terme par rapport à une stimulation tétanique ponctuelle), se traduit par de profondes modifications du phénotype musculaire, comme il l'a été observé en conditions d'hypodynamie-hypokinésie (HH). La composition en protéines contractiles est modifiée, ce qui crée des bouleversements des caractéristiques musculaires fonctionnelles.

Il est aisé de supposer que ces transformations facilitant l'adaptation du muscle à son environnement, transformations profondes et stables, peuvent diminuer la nécessité d'un recours aux transformations ponctuelles rencontrées à court terme, qui sont des adaptations rapides au stress cellulaire induit par l'environnement. L'hypothèse du rôle de la phosphorylation de la MLC2 dans la potentialisation de la contraction pour compenser les effets de la fatigue, devient moins évidente à long terme, un meilleur rendement musculaire pouvant être apporté par des changements dans la composition en isoformes de protéines musculaires. En effet, une adaptation à la fatigue d'un muscle rapide, pour lesquel les effets de la phosphorylation de la MLC2 sont de grande importance à court terme, se traduit principalement par un glissement de son phénotype vers un type plus lent et moins fatigable.

Dans le cadre de ce travail, nous sommes partis des observations suivantes :

- Après CLFS (Chronic Low Frequency Stimulation), à court terme, il se produit une augmentation de phosphorylation de la MLC2 (activité électrique neuromusculaire accrue),
- Le niveau de phosphorylation de la MLC2 est supérieur dans un muscle rapide par rapport à un muscle lent,
- L'augmentation de la phosphorylation de la MLC2 serait associée à une augmentation de la sensibilité calcique des fibres musculaires,

 A long terme, des états de phosphorylation non homogènes de la MLC2 ont été décrits pour un même type de muscle (Germinario *et al.*, 2002 ; Gonzalez *et al.*, 2002).

Notre but a donc été d'analyser le comportement de la phosphorylation de la MLC2, suite à des changements profonds du phénotype musculaire lent↔rapide. Pour cela, nous nous nous sommes fixés 3 objectifs :

- 1. Vérifier si les résultats observables à court terme étaient similaires à ce que nous trouverions à long terme après des transformations phénotypiques, à savoir, existe-t-il une relation entre les variations de sensibilité calcique et d'activité électrique et les variations de phosphorylation de la MLC2 (cf I. Analyse de la phosphorylation de la MLC2 dans le cas d'une réduction de l'activité neuromusculaire) ?
- Renforcer l'hypothèse ci-dessus en étudiant le lien entre la phosphorylation et les modifications phénotypiques liées aux changements de la commande nerveuse (cf II. Analyse de la phosphorylation de la MLC2 dans le cas d'une augmentation de l'activité neuromusculaire).
- Aborder l'approche des phénomènes moléculaires permettant de réguler les variations de phosphorylation de MLC2 observées (cf III. Régulation de la phosphorylation de la MLC2 par analyse de l'expression des enzymes MLCK et MP).

MATERIELS ET METHODES

I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET TRAITEMENTS EXPERIMENTAUX

A. LES ANIMAUX

Les animaux qui ont été utilisés dans ce travail sont des rats Rattus norvegicus, de souche Wistar ou Long-Evans âgés d'environ 3 mois et pesant en moyenne 300g. Ces animaux ont été choisis pour leur capacité de résistance et d'adaptation aux différents traitements qui leur furent appliqués. Afin d'éviter toute complication éventuelle par interférence des cycles hormonaux œstradiens sur la biochimie musculaire (Suzuki et Yamamuro, 1985), les études se sont limités aux rats mâles.

Toutes les expériences sur les animaux ont été effectuées conformément aux régles établies par le Ministère Français de l'Agriculture (Services de Santé et de Protection des Animaux – numéro d'autorisation 59-0096).

Les rats sont soumis aux mêmes conditions d'éclairage (cycle éclairage/obscurité : 12/12h), et de température ambiante (23°C). Ils ont accès à l'eau et à la nourriture ad libitum.

Avant toute manipulation, les rats ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital (30mg/kg) ou d'éthylcarbamate, et sacrifiés par exsanguination.

B. LES MODELES EXPERIMENTAUX

1. L'hypodynamie – hypokinésie (HH)

Les conditions de diminution de charge (hypokinésie) et de mouvements (hypodynamie) des pattes postérieures ont été induites par le modèle de Morey (1979) qui consiste à surélever le train postérieur des rats en le suspendant par la queue (figure 16). La queue des rats est entourée d'une bande adhésive hypoallergénique sur laquelle un crochet est fixé à une potence munie d'un système de rotation sur 360°. La hauteur de la potence est ajustée de manière à ce que l'inclinaison du corps du rat forme un angle de 30° avec l'horizontale. L'inclinaison du rat est vérifiée chaque jour. Dans cette position, les pattes postérieures n'étant plus en contact avec le sol, le rat peut se déplacer et avoir accès librement à l'eau et à la nourriture à l'aide de ses pattes antérieures.

La durée de l'expérimentation est de 15 jours, afin de permettre les transformations phénotypiques attendues (Stevens et Mounier, 1990 ; Stevens et al., 1990, 1999b).





Figure 16. A. Photographies illustrant le modèle de suspension des membres postérieurs du rat de Morey (1979). B. Représentation schématique du modèle d'hypodynamie-hypokinésie.

2. L'hypergravité

Afin de comparer des effets mécaniques qui, cette fois, engendrent une augmentation de la charge appliquée sur les pattes postérieures, l'hypergravité, comme modèle opposé de la microgravité (~0g) nous a semblé le plus approprié. L'hypergravité à 2G engendre une hyperkinésie ainsi qu'une hyperdynamie (Bouet et al., 2003). L'appareillage permettant de reproduire les conditions de l'hypergravité artificielle consiste en une centrifugeuse dont le moteur est localisé au cœur de l'axe central vertical de l'appareillage, entraînant la rotation à vitesse constante de deux bras horizontaux se croisant perpendiculairement (4m ou 1.65m) (figure 17A). Quatre nacelles à balancement libre sont fixées à chaque extrémité des bras horizontaux; elles sont équipées d'un système d'aération, de lumières reproduisant un cycle circadien de 12 heures de luminosité - 12 heures d'obscurité, et de cages d'habitation standard pour rats. Une nacelle est équipée d'un système vidéo composé d'une caméra à grand angle de prise de vue, connectée à un écran moniteur. Ce système est utile afin de repérer avec exactitude la date de mise bas des rattes. Durant la centrifugation, les nacelles sont inclinées à un angle constant de 60° par rapport à la verticale, en relation avec la vitesse de rotation choisie. Les rotations s'effectuent dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, à la vitesse de 3.81 rad/s. Prenant en compte la masse et l'inertie des nacelles, en incluant celles des cages et des rats, cette vitesse angulaire conduit au développement d'une force résultante de 2g. Cette force résultante est directement mesurée par un capteur de force situé au centre du plancher des différentes nacelles.

Pendant la centrifugation, les rats sont soumis à un vecteur de force gravito-inertielle dont la direction est toujours identique à celle exercée par la gravité terrestre (parallèle à l'axe dorso-ventral de l'animal) (figure 17B). Ainsi, les rats sont aussi soumis aux accélérations de Coriolis, lesquelles dépendent des mouvements de l'animal à l'intérieur de la cage, qui sont

incontrôlables et imprévisibles. L'amplitude des accélérations de Coriolis dépend de la vitesse de locomotion de l'animal et mène à la déviation de la trajectoire du mouvement du rat. L'avantage de cet appareillage d'hypergravité artificielle est la liberté de mouvement du rat, fondamentale pour une étude résultant d'un comportement spontané.

Les animaux étudiés ont été conçus (accouplement et gestation), sont nés, et ont vécu en conditions d'hypergravité jusqu'au 100^e jour de vie. Cette durée a été choisie car elle correspond à la durée moyenne à laquelle il est possible d'obtenir des animaux de 300g en conditions de normogravité. Un protocole identique a été utilisé pour les rats adultes.







3. Le clenbutérol

Les animaux ont reçu dans l'eau de boisson 30mg/L de clenbutérol pendant 15 jours. La masse ainsi que la quantité de boisson ingérée par l'animal ont été contrôlées chaque jour, afin d'adapter quotidiennement la concentration de clenbutérol.

4. La dénervation de la patte postérieure

Il s'agit d'une dénervation au niveau du tronc sciatique, au niveau du trochanter (figure 18). Une sciaticotomie de 5 millimètres à 1 centimètre environ est effectuée et les extrémités du nerf sont suturées au tissu sous-cutané afin d'empêcher toute régénération nerveuse. Cette incision a pour conséquence une interruption de l'innervation locomotrice et sensitive de la majorité de la patte postérieure, à l'exception de l'intérieur de la cuisse innervée par le tronc fémoral, cette dernière ne concernant et n'influant pas les muscles étudiés (soleus, EDL). Les animaux sont ensuite suturés et une solution acide picrique / collodion est appliquée sur la patte, pour éviter que l'animal ne la lèse, la considérant dès lors comme un corps étranger. La patte contro-latérale a été utilisée comme contrôle. Les rats subissent les effets de ce traitement durant 14 jours et sont sacrifiés le 15^{ième} jour.



Figure 18. Représentation de la patte postérieure montrant le niveau de la sciaticotomie (flèche rouge).

5. La cyclosporine A

Les animaux ont reçu quotidiennement deux injections intrapéritonéales (12heures/12heures) de cyclosporine A (CsA) à raison de 10mg/kg/jour diluée dans une solution Cremophor 10% / NaCl. La masse de l'animal a été contrôlée chaque jour afin d'adapter quotidiennement la dose à injecter. Les animaux contrôles du traitement à la cyclopsorine A (COCsA) ont été injectés avec une solution identique au groupe CsA, mais ne contenant pas la cyclosporine, et selon les mêmes critères de calcul de la dose injectable.

6. L'électrostimulation de l'EDL

Les EDL ont été électrostimulés de façon chronique à 20Hz pendant 3 semaines (Windisch *et al.*, 1998). Le nerf sciatique est coupé et suturé aux tissus sous-cutanés comme pour la dénervation. Une incision est pratiquée au niveau de l'EDL pour dégager le muscle. Deux fils d'acier isolés par du téflon et dénudés aux extrémité sur 20-25mm, sont placés au travers de l'EDL, en s'assurant que les fils isolés touchent les fibres et non pas le tendon du muscle. Chaque fil est fixé au tissu sur quelques millimètres. Ces fils ressortent par des ouvertures pratiquées dans la peau de l'animal, engainés dans des tubes de plastique isolant. Ils sont reliés à un électrostimulateur qui délivre un stimulus bipolaire de 0.2ms et de 10-15mA d'intensité. La pattern de stimulation est de 20Hz pendant 10s, toutes les 20s. Ce protocole s'effectue 24/24h pendant 3 semaines.

<u>C. Les muscles etudies.</u>

Dans notre étude, deux types de muscles de la patte postérieure ont été étudiés : un muscle lent, le soleus, et deux muscles rapides, l'EDL (extensor digitorum longus) et le plantaris (figure 19).

Le soleus est un muscle extenseur de la cheville ou fléchisseur plantaire. C'est un muscle lent, impliqué dans le maintien de la posture et résistant à la fatigue. Il est composé majoritairement de fibres lentes (type 1 : 87%) et de fibres rapides (type 2 : 13%) (Armstrong et Phelps, 1984). Il a été choisi pour l'étude du rôle de la phosphorylation de la MLC2 dans le cas de transformations phénotypiques lent—rapide du muscle squelettique (Stevens et

Mounier, 1990). Nous l'avons donc utilisé dans chacun de nos modèles : microgravité, clenbutérol, hypergravité, dénervation et cyclosporine A.

L'EDL, comme son nom l'indique est un muscle extenseur des doigts. Il n'est pas impliqué dans la posture mais dans le mouvement. Il a été choisi pour sa composition en fibres majoritairement rapides (type 1 : 2%; type 2A : 42%; type 2B : 56%), qui font de lui un représentant idéal pour notre étude sur les transitions rapide—lent. Il a donc été étudié après utilisation des modèles suivant : microgravité, clenbutérol, dénervation et cyclosporine A.

Le plantaris est lui aussi un muscle typiquement rapide (type 1 : 9% ; type 2A : 50% ; type 2B : 41%). Il est également impliqué dans le mouvement. Il a été utilisé pour les expériences d'hypergravité.



Figure 19. Illustration des muscles soleus, plantaris et EDL dans la patte postérieure de rat. *A*. Face interne, *B*. Face externe. D'après Greene, « The anatomy of rat » (1968).
II. TECHNIQUES D'ETUDES UTILISEES

A. ANALYSE FONCTIONNELLE DES FIBRES MUSCULAIRES

1. Protocole de pelage

Le pelage consiste à perméabiliser le sarcolemme des fibres musculaires (Stienen, 2000). Il permet un accès direct aux protéines contractiles. L'activation de la contraction peut alors se faire en absence de toute commande nerveuse, par application externe de solutions contenant du calcium. L'avantage du pelage chimique est de pouvoir traiter l'ensemble des fibres d'une biopsie, qui, de part la rupture de la cohésion membranaire, s'extraient plus facilement. La technique de pelage utilisée est celle de Mounier et al. (1989) modifiée d'après Wood et al. (1975). Dès le prélèvement, les biopsies sont placées à 4°C dans une solution relaxante R. La solution R contient de l'EGTA (Ethylène Glycol bis aminoéthyl éther N, N' tétra-acide acétique). Cette molécule, agent chélateur du Ca²⁺, va permettre la déstructuration de la membrane et du système tubulaire transverse. Les protéines contractiles sous-jacentes (Eastwood et al., 1979) ainsi que leur sensibilité calcique ne sont pas altérées par ce traitement. Après 4h, les biopsies sont rincées, puis replacées dans la solution R pour une durée totale de 24h. Les biopsies sont ensuite placées dans une solution de conservation C contenant 50% de glycérol, 50% de solution R et de la leupeptine (10µg/mL). La leupeptine empêche une perte de force pouvant survenir par dégradation des protéines, en inhibant les protéases endogènes activées par le calcium (CaNP). Les biopsies peuvent ainsi être conservées à -20°C pendant 2 mois.

2. Isolement des fibres

Sous loupe binoculaire (x 80) et à l'aide de pinces fines, une fibre de 6 à 8 mm de long est isolée de la biopsie. Un fil de soie est noué à chacune de ses extrémités afin de pouvoir fixer la fibre entre une pince fine et un capteur de force, dans une cuve expérimentale contenant de la solution R. Un système d'aspiration sous vide permet l'évacuation des solutions de la cuve expérimentale. Elles sont renouvelées manuellement à la pipette. Le diamètre de la fibre est déterminé à l'aide d'un micromètre intégré à l'oculaire de la loupe binoculaire. La longueur de sarcomère est déterminée à l'aide d'un faisceau laser Hélium/Néon traversant la fibre perpendiculairement à son axe (figure 20). Les bandes de diffraction sont visualisées sur un écran calibré placé derrière la fibre, et permettent la lecture directe de la longueur de sarcomère de repos ($LS_0 = 2.2 \mu m$). La fibre est ensuite étirée à 120% de sa longueur de sarcomère de repos ($LS_E = 2.6 \mu m$), ce qui assure le développement d'une force isométrique optimale. Pour éliminer un éventuel effet du réticulum sarcoplasmique sur les paramètres d'activation calcique, la fibre est soumise à un traitement au Brij 58 (2% dans la solution R), détergent cétonique non ionique, qui élimine irréversiblement la capacité du réticulum sarcoplasmique à emmagasiner et à relarguer du Ca²⁺, sans altérer le système contractile (Orentlicher et al., 1977).



Figure 20. Dispositif expérimental d'étude des fibres pelées et isolées pour l'enregistrement de la relation Tension/pCa.

3. Enregistrement des tensions isométriques

Chaque tension développée par une fibre musculaire et détectée par le capteur de force, est convertie en un signal électrique. Ce signal est transmis à un amplificateur (10V/g). Les tensions sont visualisées sur un enregistreur graphique (Gould Windograf, modèle 40-8474-02).

La contraction musculaire est déclenchée par l'application de solutions de concentrations croissantes en calcium. Après un rinçage avec une solution spécifique W, sont appliquées successivement deux solutions de concentration calcique saturante (pCa = -log $[Ca^{2+}] = 4.2$) déclenchant une contraction d'amplitude maximale P₀, séparées d'une relaxation (solution R), et de deux rinçages (solutions W). La deuxième contraction P₀ servira de référence de tension maximale pour une fibre donnée. Puis les relations Tension/pSr et Tension/pCa (figure 21) sont établies.

a. La relation Tension/pSr

L'utilisation de l'ion strontium sert à déterminer fonctionnellement le type de fibre étudiée. En effet, les fibres rapides et lentes ont une sensibilité différente face à l'ion strontium (Takagi et Endo, 1977). Les fibres rapides présentent un Δ Sr (Δ Sr = pCa₅₀-pSr₅₀) supérieur à 1.5, les fibres lentes, un Δ Sr inférieur à 1.

On applique, trois solutions contenant du strontium $pSr = -log [Sr^{2+}]$ à concentration croissante, de la façon suivante :

La fibre est rincée par la solution W.

Les solutions à concentration croissante de strontium sont appliquées (obtention de tensions d'amplitude P), suivies d'une solution saturante de strontium pSr 3.4.

La fibre est ensuite relâchée (solution R), et le cycle calcique peut alors débuter.

b. La relation Tension/pCa

Différentes solutions calciques de concentrations judicieusement choisies (engendrant une tension d'amplitude P), sont appliquées comme pour la relation Tension/pSr selon une série de trois solutions à pCa décroissantes suivies d'une solution pCa 4.2, de deux relaxations (R) et de deux lavages (W).

Le rapport P/P₀ est alors établi pour des concentrations allant de pCa 6.8 à pCa 4.2, avec un pas de 0.2 unité pCa. Ce protocole permet de normaliser les tensions sous-maximales d'amplitude P à la tension maximale d'amplitude P₀ développée par la fibre (voir figure 21). Nous nous affranchissons ainsi de la variabilité de P₀ d'une fibre à l'autre, ainsi que de la perte de force éventuelle qui survient au cours des activations successives (notons que lorsque P₀ chute de plus de 20% au cours de l'expérience, la fibre n'est pas retenue pour les analyses).



Figure 21. *Représentation de la courbe Tension/pCa et de ses caractéristiques.*

Les caractéristiques d'activation calcique des fibres musculaires sont classiquement étudiées via la tension développée par une fibre pelée (membranes perméabilisées) en fonction de la concentration calcique (relation Tension/pCa avec $pCa = -\log [Ca^{2+}]$. Les relations Tension/pCa ont une allure sigmoïde; trois paramètres traduisant les caractéristiques d'activation calcique peuvent être mesurés:

- le seuil d'activation, concentration en Ca^{2+} minimale nécessaire pour induire une tension, est indicateur de la sensibilité calcique du système contractile ;

- la valeur de la pCa₅₀, concentration nécessaire pour induire 50% de la tension maximale P_0 , est un indicateur de l'affinité calcique ;

- la pente de la sigmoïde (ou n_H , coefficient de Hill), donnée par l'équation de Hill, traduit le degré de coopérativité entre les sites régulateurs de la TnC et les protéines régulatrices du filament fin.

4. Solutions

Toutes les solutions ont une force ionique fixée à 200mM et un pH ajusté à 7.00 ± 0.02 à l'aide de potasse (1N et 0.1N) et d'acide proprionique (1N et 0.1N). Elles contiennent toutes de l'ATP en une concentration suffisante (2.5mM) pour fournir l'énergie nécessaire à la fibre pendant une expérimentation. Les concentrations des différentes solutions

sont déterminées à l'aide d'un programme informatique avec les constantes d'association données par Orentlicher *et al.* (1977) pour les solutions pCa, et, par Moisescu et Thieleczek (1979) pour les solutions pSr.

Les solutions de relaxation (R ou de pelage), de lavage (W) et de conservation (C) sont composées comme suit :

	Solution R	Solution W	Solution C
Propionate de potassium (mM)	170	185	170
Acétate de magnésium (mM)	2.5	2.5	2.5
K ₂ EGTA (mM)	5	-	5
MOPS (acide 3 -morpholino- propane	20	10	20
sulfonique (mM)	20		20
ATP (mM)	2.5	2.5	2.5
Glycérol (en %, v/v)	-	-	50

Les solutions pCa contiennent les mêmes solutés que la solution de rinçage W. La concentration en calcium est donnée en ajoutant du CaEGTA et du K_2 EGTA mélangés de façon à obtenir une gamme de pCa comprise entre 6.8 et 4.2. Les solutions de pSr sont obtenues de même par ajout de SrEGTA et de K_2 EGTA.

Tous les produits utilisés proviennent de la firme SIGMA Chemical (St Louis, MO, USA).

B. ANALYSE STRUCTURALE SUR MUSCLE ENTIER

Les isoformes des protéines contractiles des muscles entiers sont séparées par électrophorèses monodimensionnelles dénaturantes sur gels de polyacrylamide, selon deux méthodes : \Rightarrow Une méthode de séparation des MLC sur gel de polyacrylamide à 15%

⇒ Une méthode de séparation des isoformes MHC sur gel de 7.5%, selon le procédé de Wada et al. (1995),

OU

par électrophorèse bi-dimensionnelle pour séparer les différents variants des isoformes de MLC lentes ou rapides modifiées de façon post-traductionnelle.

1. Extraction et dosage des protéines pour les MHC

a. Extraction des protéines musculaires

Les muscles fraîchement prélevés sont manipulés sous azote liquide. Placés dans une coupelle en métal, ils sont réduits à l'état de poudre. La poudre de muscle est ensuite placée dans une solution contenant du Tris HCl 125mM ajusté à pH6.8, de 2% de SDS, de 5% de β mercapto éthanol (Merck, Darmstadt, GER), ainsi que de 10% de glycérol et 0.02% de bleu de bromophénol. La quantité de protéines extraite est dosée par un kit (Dc Protéin Assy, Bio-Rad) fonctionnant selon la méthode de dosage de Lowry.

b. Coloration du gel

Les protéines du gel sont colorées de façon réversible par le Sypro Orange (Molecular Probes, Eugene, USA). Cette molécule présente l'avantage de ne pas se fixer irréversiblement sur les différentes protéines, ce qui permet ensuite un transfert sur membrane de nitrocellulose. La coloration s'effectue dans un bain contenant 40µL de Sypro Orange dilué dans 150mL de tampon de transfert pendant 1h à 1h30 (suivant l'intensité de la coloration). Elle s'effectue à l'abri de la lumière. Après rinçage, le gel est observé sur une table UV, à une longueur d'onde de 315nm. Il est ensuite photographié à l'aide d'un filtre spécifique (Molecular Probes, Eugene, USA) sur un film noir et blanc 100 ASA (Ilford Delta 100).

c. Transfert sur membrane

Le transfert s'effectue en semi-sec sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0.2µm (Adventec MFS Inc, Pleasanton, USA), à ampèrage constant de 0.8 mA/cm pendant 6h. Chaque membrane est ensuite conservée dans un mélange PBS (Phosphate Buffered Saline) / Sodium Azide.

d. Marquage aux anticorps

Ce marquage est nécessaire car la localisation de la position des isoformes de MLC2 en 2D est difficile du fait de la multiplication des spots révélés par cette technique, mais aussi du caractère inconnu des isoformes transformées post-traductionnellement. Il nécessite tout d'abord la saturation des sites non-spécifiques de la membrane. Elle est réalisée, pendant 2h, dans une solution de PBS contenant de l'albumine bovine à 5% et de l'antifoam à 0.01% (SIGMA). La membrane est ensuite incubée pendant 4h à 37°C avec un anticorps primaire (anti-MLC polyclonal FL-172sc15370 Santa Cruz, ou monoclonal F109.3E1 Alexis). Un anticorps secondaire biotinylé est par la suite appliqué pendant 1h.

Enfin, la membrane est incubée 1h avec un substrat ExtrAvidine[®]peroxidase conjuguée. La peroxydase va se lier à l'extravidine (10/1), elle-même liée à la biotine, ce qui amplifiera le signal de détection. Entre chaque application des différents produits, la membrane est rincée 3x15min au PBS afin d'éliminer tout bruit de fond résiduel.

La détection du signal est assurée par un kit ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Amersham, Little Chalfont, Angleterre). Les bandes ainsi révélées vont impressionner un film ECL (Hyperfilm ECL, Amersham) dans une cassette autoradiographique. Le film est ensuite

développé et fixé (Processing Chemicals, KodaK, GBX Developper/Fixer/Replenisher, SIGMA).

Nous avons utilisé la même technique pour détecter les différentes isoformes de troponines. Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps monoclonal JLT-12 (Sigma Aldrich) pour la détection des TnTf, l'anticorps polyclonal précédemment utilisé par Härtner *et al.* (1989) pour la détection des TnTs, et trois autres anticorps polyclonaux utilisés par Härtner et Pette (1990) pour détecter les TnC et TnI. Tous ces anticorps exceptés le JLT-12, nous ont été gracieusement fournis par le Pr. Dirk Pette.

2. Etude des MHC

a. Séparation

La séparation des différentes isoformes des chaînes lourdes de myosine est assurée par migration sur un gel de 4.5% et un gel de séparation de 7.5%. Le tampon de migration (à 12°C), se compose de 25mM de Tris, 190mM de glycine et 0.1% de SDS (p/v). La migration est réalisée pendant 24h à voltage constant (180V), à 13mA pour une plaque d'épaisseur de 0.75mm. Une quantité de 5µg est déposée dans chaque puits.

b. Coloration

A la fin de la migration, le gel est coloré par une solution d'argent. Les protéines sont fixées dans un mélange méthanol (50%) / acide acétique 10% / glycérol 5%, pendant 1h minimum. Après lavage, la révélation est réalisée dans un mélange de quatre solutions :

• Nitrate d'argent 2%, nitrate d'ammonium 2%

- Acide tungstosilicique 10%
- Formaldéhyde 2.8%
- Na₂CO₃ 2.5%

La coloration est bloquée par de l'acide acétique (5%) puis une analyse densitométrique du gel est réalisée (Quantiscan Microvial Systems, Biosoft, U.K.). Elle permet de déterminer les proportions relatives des différentes isoformes de MHC exprimées au sein des échantillons.

Pour l'analyse des gels 2D, en raison de la forme discoïdale des spots, nous avons utilisé une une analyse par le logiciel Adobe Photoshop image. Les gels 2D ont été numérisés par un scanner Epson 1650 à une résolution de 1200dpi. Le logiciel Photoshop permet de sélectionner avec exactitude l'aire du signal argentique d'une protéine. Les spots ont été analysés, en déterminant la relation aire x brillance (AB) après applatissement des couleurs et inversion noir/blanc de l'image selon une relation linéaire et constante. Dans la gamme de quantité de protéines choisie, la relation quantité de MLC2 (μ g) =f (AB ratio MLC2/actine) est linéaire (voir figure 22).



Figure 22. Corrélation entre le rapport Aire x Brillance (AB) du rapport MLC2 lentes purifiées sur le signal de l'actine, et la quantité de MLC2 lentes purifiées chargées dans un gel de polyacrylamide 15%. Les différentes quantités de MLC2s ont été chargées dans le gel ont été introduites avec une quantité constante d'actine afin de permettre la comparaison.

c. Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyennes affectées de leur erreur standard à la moyenne (X \pm SEM) ou de la déviation standard (X \pm Dev. St.). Les différences statistiques sont estimées après une analyse de variance (ANOVA), par un test *t* de Student ou de Bonferroni, p<0.05 étant choisi comme seuil significatif.

3. Électrophorèse bi-dimensionnelle ou 2D

L'électrophorèse 2D a été utilisée afin de séparer les différentes isoformes de MLC présentant des modifications post-traductionnelles. Cette technique permet de séparer les différentes protéines selon deux migrations électrophorétiques consécutives et perpendiculaires, fondées pour la première sur leur point isoélectrique (Pi), et pour la seconde, sur leur poids moléculaire. Les deux séparations étant indépendantes, elles confèrent à cette technique un pouvoir de résolution élevé.



poids moléculaire (2^{nde} dimension)

Figure 23. Schématisation du principe de l'électrophorèse bidimensionnelle.

a. La première dimension : l'isoélectrofocalisation (IEF)

Il s'agit de la première migration électrophorétique de la 2D. Elle utilise le point isoélectrique (pH spécifique pour lequel la charge de la protéine est nulle) des protéines afin de les faire migrer dans un gradient de pH préalablement établi dans un gel d'acrylamide à réticulation large. Le gradient de pH est établi dans un gel d'acrylamide à 4% d'une épaisseur de 0.5mm et de dimension 11cm x 3mm, provenant des laboratoires Amersham (Immobiline Drystrip, Amersham Biosciences). La faible réticulation du strip permettra une absorption et une migration facilitées des protéines. Le gradient de pH est créé à l'aide de molécules chargées et stables fixées dans le gel, appelées immobilines. Le pHi des MLC correspondant à leur point isoélectrique étant de pH5.0 environ et l'ajout d'un groupement phosphate à une protéine déplaçant le Pi d'environ 0.3 unités de pH vers le pôle acide, nous avons choisi d'utiliser un gradient de pH4-7.

Les protéines ont été extraites à partir de poudre de muscle obtenue à partir du protocole décrit au paragraphe II.B.1.a. La technique d'extraction utilisée correspond à une rupture membranaire à l'EGTA et une double précipitation en milieu hyperosmotique, ces deux étapes se déroulant en présence de divers inhibiteurs de protéases et phosphatases, afin d'éliminer toute activité enzymatique pouvant modifier le niveau de phosphorylation des MLC post-mortem. Par précaution, une autre technique consistant à un broyage du muscle entier frais dans un mélange acétone / 10% acide trichloroacétique éliminant toute activité enzymatique (même à -80°C) a été utilisée. Aucune différence dans les résultats obtenus suite à l'utilisation de ces deux protocoles n'a été determinée (données non montrées).

Dans notre protocole, 10mg de poudre musculaire ont été placés dans 1.2mL d'un mélange d'EGTA 6.3mM (pH7), de PMSF 1% et de pepstatine 0.1%. Après action du mélange et centrifugation à 13000rpm, le culot est récupéré puis placé dans une solution de

KCl 50mM, PMSF 1%, pepstatine 0.1%, et centrifugé à 13000rpm. Les protéines récupérées sont placées dans 1mL d'eau milliQ et dosées avec le kit Biorad (Dc Protein Assay, Bio-Rad).

Soixante-dix µg de protéines sont précipitées dans de l'acétone. Cette quantité testée préalablement, correspond à la quantité adéquate à l'étude de la phosphorylation de la MLC2. Les protéines sont ensuite récupérées dans 240µL d'un tampon de réhydratation composé d'un agent chaotrope non chargé (pour ne pas modifier le Pi des protéines), l'urée 8M, qui dénature les protéines en éliminant les liaisons covalentes et ioniques, de CHAPS 2% (détergent), de dithiotréitol 1% (qui rompt les ponts disulfures), et d'ampholines. Ces dernières sont des molécules similaires aux immobilines citées précedement, correspondant au gradient de pH choisi, et améliorant la solubilité des protéines à l'intérieur du gradient de pH.

Le mélange protéines / tampon de réhydratation est déposé dans un sarcophage en céramique (Amersham). Le strip contenant le gel d'acrylamide avec son gradient de pH défini, est placé sur ce mélange qui le réhydratera très lentement, lui faisant absorber les protéines solubilisées. Le strip baigné est alors recouvert d'un film d'huile minérale pour éviter toute évaporation du tampon. Le tampon sera également soumis à des contraintes électriques aggressives qui pourraient brûler l'acrylamide ou les protéines, ou même l'évaporer, induisant alors une cristallisation de l'urée.



Figure 24. Etapes d'application d'un strip pour l'isoélectrofocalisation dans un sarcophage en céramique.

Le sarcophage est ensuite placé dans un appareil (Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System, Amersham Biosciences) permettant de générer les courants choisis pour le protocole par l'intermédiaire d'une feuille d'or très conductrice et quasi-inoxydable évitant toute perturbation dans la transmission des courants électriques. Cet appareil permet aussi de réguler la température qui est réglée à 20°C, température à laquelle l'urée ne cristallise pas.



Figure 25. Appareil IPGphor permettant de réaliser l'isoélectrofocalisation.

Tous les courants électriques sont délivrés à ampérage constant de 50mA. La réhydratation du strip s'effectue de manière active, c'est-à-dire sous courant électrique de 50V pendant 15h. Ce courant attire les protéines dans le gel, facilitant leur absorption. Par la suite, différents courants croissants vont permettre de faire migrer les protéines, en commençant par les protéines de petite taille généralement faiblement chargées, pour déplacer peu à peu, les protéines de taille plus importante. Nous avons utilisé les pas de courant suivants :

- 500V, 1h
- gradient de voltage jusque 1000V, 1h
- 2000V, 1h
- 3000V, 1h

• 8000V jusqu'à atteindre 100000Vhrs, le temps de migration s'adaptant afin d'obtenir cette valeur.

<u>b. Procédure intermédiaire entre la 1^{ère} et la 2^{nde} dimension (la rééquilibration)</u>

Après iosélectrofocalisation, les strips sont récupérés. La deuxième dimension se déroule dans un gel de polyacrylamide à 15% identique à celui utilisé pour l'analyse monodimensionnelle des MLC. Afin de permettre cette migration, il a été nécessaire d'équilibrer les protéines, ce qui signifie les charger négativement uniformément. Les protéines sont donc baignées dans deux tampons d'équilibration composés d'urée 6M, glycérol 30%, SDS 2% (qui charge négativement les protéines), TrisHCl 0.375M et DTT 2% (tampon 1) ou iodoacétamide 2.5% (tampon 2), agent alcalin empêchant la reformation des ponts disulfures. Une fois les protéines chargées, le strip est placé sur le gel de la 2^{nde} dimension.

Le gel de 2^{nde} dimension est un gel de polyacrylamide à 15% de 1mm d'épaisseur (correspondant à l'épaisseur du strip baigné de la solution d'équilibration), utilisé également pour la séparation monodimensionnelle des MLC. Le strip est maintenu par un gel de concentration à 4% (concentration en acrylamide du strip à 4%). Le tampon de migration est le même que celui utilisé pour l'électrophorèse monodimensionnelle des MHC (voir paragraphe II.B.2.). La migration se déroule à ampérage constant (16mA/gel de 1mm d'épaisseur) pendant 6h.

C. RT-PCR ET SPECTROMETRIE DE MASSE

<u>1. La RT-PCR appliquée à la semi-quantification des taux d'ARNm</u> <u>des différentes isoformes de MHC</u>

a. Préparation des ARN totaux (Chomczynski et Sacchi, 1987)

La préparation des ARN totaux est une étape critique et délicate car les ARN sont vulnérables vis-à-vis de la ribonucléase qui est ubiquitaire, très active. Tout travail sur les ARN doit être effectué le plus stérilement possible.

La poudre musculaire est homogénéisée dans une solution « Tri Reagent » (1mL de Tri Reagent pour 50-100mg de tissu) (Sigma) contenant un détergent (SDS), un agent dissociant (thiocyanate de guanidine), une solution tampon (acétate de sodium dont le pH est ajusté par l'acide acétique) et un agent réducteur (2-mercaptoéthanol ou DTT). La solution tampon inhibe les ARNases endogènes, et dénature les acides nucléiques. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (10min à 12000g).

b. Extraction des ARN totaux

• Séparation :

Le principe est basé sur l'utilisation de la solubilité différentielle des molécules entre deux phases non miscibles (phase aqueuse et phase organique). L'extraction se fait par le phénol, déprotéinisant puissant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles, puis dans le bromochloropropane (0.1mL par mL de Tri Reagent) qui permet l'élimination des traces de phénol.

• Précipitation :

La précipitation a pour but de récupérer les ARN sous forme solide, ce qui permet après séchage de les resolubiliser à la concentration souhaitée et d'éliminer les sels. Ici, les ARN sont précipités à partir de la phase aqueuse par ajout d'isopropanol (0.5mL par mL de Tri Reagent). Il y a formation d'un culot blanchâtre.

• Lavages :

Le précipité est être lavé 3 fois avec de l'éthanol à 70% pour se débarrasser des traces d'isopropanol.

• Solubilisation :

Le culot est séché puis remis en suspension dans 30µL d'eau DEPC.

La concentration des ARN totaux est déterminée par la mesure de la densité optique à 260 nm sur spectrophotomètre. Une valeur de DO à 260 nm correspond à 40 μ g d'ARN/ml. Leur pureté est contrôlée par une mesure de DO à 280 nm, le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ devant se situer entre 1.8 et 2.0.

c. Synthèse de l'ADN complémentaire

L'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé à partir de 1 μ g d'ARN total dans un volume final de 20 μ L. Ces 20 μ L sont composés de :

- un mix de 7.8µl contenant :
 - Tampon RT [5X] (retro transcription : transcription inverse) : 4µL
 - dNTP (2.5 mM) (désoxyribonucléotides triphosphates) : 0.8µL
 - oligo $dT_{15} (2.5 \text{ mM}) : 1 \mu L$
 - inhibiteur de RNase (40 U.I.) : 1µL

- transcriptase inverse (20 U.I.) (AMV : Avian Myeloblastosis Virus) : 1µL
- x µL d'ARN total
- y μ L d'eau DEPC pour compléter à 20 μ L.

Les volumes d'ARN total (x) et d'eau DEPC (y) dépendent de la concentration de l'ARN total. Avant de mélanger l'ARN et le mix, l'échantillon est placé 3min à 65°C. L'ensemble est alors placé 1h à 42°C, puis 5 min à 65°C. Les échantillons sont ensuite dilués et aliquotés pour arriver à une concentration finale d'ADNc de 25 ng/µl. Ils sont ensuite conservés à -20°C.

d. Amplification de l'ADNc par PCR

Le principe consiste à répliquer de façon successive un brin d'ADN à partir d'une amorce à l'aide d'ADN polymérases. Il faut pour cela choisir des amorces oligonucléotidiques synthétiques capables de s'hybrider à l'ADNc pour réaliser la réplication. Le nombre de copies de la séquence est doublé à chaque réplication.

Une solution de 23µl est préparée pour chaque échantillon. Sa composition est la suivante :

- Tampon d'expansion de PCR : 2.5μ L
- dNTP (0,25 mM) : 1.25µL
- MgCl₂ (2 ou 2.5 mM) : 0.5 ou 1μ L selon la taille de l'ADNc
- Amorces MCLK, PP1, MYPT2 ou glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (0.2μM) : 0.2μL (sens) et 0.2μL (antisens)

• Taq polymérase (enzyme d'amplification) (0.63 U.I.) : 0.18µL

• Eau DEPC : 17.67µl

Les échantillons sont alors chauffés 3min à 65° C puis refroidis. Puis, 2µL d'échantillons sont déposés par tube, soit un total de 25µL par tube.

Les séquences des oligonucléotides pour la MLCK, la PP1, la MYPT2 ainsi que pour la GAPDH (témoin interne) ont été choisies selon les amorces utilisées. Le marquage de ces amorces (Thermo Hybaid) est réalisé sur l'amorce antisens en position 5' par la digoxigenine pour permettre la détection des produits amplifiés par chemiluminescence. Les amorces sens et antisens, la longueur du produit obtenu par PCR avec l'ADNc du rat et leurs références sont exposées dans le tableau 4 suivant :

Gène	Primer	Séquence	Produit (pb)
GAPDH	Sens	5'-ACC CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG C-3'	482	(Trujillo et al., 2001)
	Antisens	5'-AGG CCA TGC CAG GCT TCC CG-3'		
MLCK	Sens Antisens	5'-GAA AGA CTG TCA/T TCC/T ATG GC-3' 5'-TTG CAG GTG TAC/T TTG GCA TC-3'	227	(Trujillo et al., 2001)
PP1	Sens	5'-AAC CAT GAG TGT GCT AGC ATC A-3'	472	(Trujillo et al., 2001)
	Antisens	5'-CAC CAG CAT TGT CAA ACT CGC C-3'		
MYPT	Sens	5'-GAC TCC TTG CTG GGT CGT TC-3'	358	(Trujillo et al., 2001)
	Antisens	5'-AGG CCC CAT TTT CAT CCT TT-3'		

Tableau 4. Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR des ARN de MLCK, PP1, MYPT2 et de la GAPDH.

Pour l'amplification, nous avons choisi les conditions suivantes pour chaque cycle : dénaturation à 94 °C pendant 1min, hybridation à 59°C pendant 50s avec les amorces spécifiques, et synthèse à 72 °C pendant 1 min. Le nombre de cycles appliqué pour amplifier chaque fragment d'ADNc est choisi dans la partie linéaire de la gamme d'amplification pour permettre une détection des produits sans saturation. Le nombre de cycles pour chaque ADNc dans le tableau 5. Pour permettre une analyse semi-quantitative de l'expression génique, les réactions d'amplification sont réalisées en utilisant des standards d'ADNc. Pour obtenir ces standards, les produits de PCR sont purifiés en utilisant une procédure d'extraction (QIAGEN) de l'ADN du gel après une séparation par électrophorèse sur gel de

polyacrylamide à 6%. La concentration des ADN purifiés est mesurée au spectrophotomètre, et les quantités connues de chaque séquence sont amplifiées en parallèle des échantillons. Le nombre de copies simple brin des fragments d'ADNc des standards externes est exposé dans le tableau 5. On peut ainsi évaluer les quantités absolues des ARNm correspondants aux MLCK, PP1, MYTP2 et GAPDH (nombre de mol/µg d'ARN total).

	MLCK	PP1	MYPT2	GAPDH	
Nombre de cycles	25	25	27	25	<u>.</u>
Standards externes	4	$-10^7, 10^8$	⁸ , 10 ⁹		

Tableau 5. Récapitulatif du nombre de cycles et des standards externes utilisés pour MLCK, PP1, MYPT2 et la GAPDH.

e. Analyse des produits de PCR

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 6%, suivi d'un transfert alcalin des fragments sur une membrane de nylon et une incubation avec des anticorps anti-digoxigenine (Boehringer Mannheim). La détection des antigènes est réalisée par une méthode de détection non radioactive par chemiluminescence (kit ECL, Amersham). La luminescence se définit par l'émission de lumière résultant de la dissipation d'énergie par une substance à l'état excité. En chemiluminescence, l'excitation est produite par une réaction chimique. Elle consiste à réaliser l'oxydation du luminol par la peroxydase de Raifort (« Horse Radish Peroxydase » ou HRP) et par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les signaux lumineux sont alors révélés sur un film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham) puis analysés par densitomètrie.

2. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires. Le principe de la spectrométrie de masse est le suivant :

Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé.

Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés.

Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur.

L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

a. Préparation des protéines à partir des gels 2D

L'analyse des signaux obtenus après électrophorèse bidimensionnelle par spectrométrie de masse a été nécessaire pour confirmer de manière précise l'identité des signaux, mais également pour confirmer qu'un même signal ne contenait pas une ou des protéines surnuméraires autres que la MLC, et qui n'auraient pas pu être décelées par immunoblotting. Toutes les manipulations se sont réalisées de façon stérile afin d'éviter toute contamination par des protéines résiduelles comme la kératine.

Les spots sélectionnés sont tout d'abord excisés et décolorés dans une solution de ferrocyanure de potassium à 30mM et de thiosulfate de sodium à 100mM.

Les protéines sont ensuite réduites par le DDT et alcalisées par l'iodoacétamide. Elles sont ensuite digérées par la trypsine porcine (Promega, Madison, WI, USA) pendant toute une nuit à 37°C (Wilm *et al.*, 1996). Après centrifugation, le surnageant est transferé dans un autre microtube. Les peptides tryptiques résiduels sont extraits par incubation des spots du gel avec une solution de 25mM NH₄HCO₃ à 37°C pendant 15min. Cette étape est suivie par un rinçage des morceaux de gel à l'acétonitrile, puis ceux-ci sont incubés avec une solution d'acide formique à 5% à 37°C pendant 15min, et finalement rincés à l'acétonitrile. Les extraits sont mélangés au surnageant précedement prélevé, et le tout est séché au SpeedVac centrifuge (Savant). Les protéines digérées sont ensuite resuspendues dans une solution de 20µl de TFA 1% puis purifiées sur une microcolonne Zip Tip C₁₈ (Millipore). Les peptides sont finalement en spectrométrie de masse.

b. Spectrométrie de masse (MS) : la technique

Les spectres de masse ont été obtenus par spectrométrie en tandem MS/MS, grâce à un spectromètre de masse Q-TOF Micro (Micromass, Manchester, UK) équipé d'une interface d'électrospray « nanoflux Z-spray nanoflux ». Les capillaires Nano-ESI ont été préparés au laboratoire à partir de tubes en borosilicate de 1mm OD et 0.78mm ID (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) en utilisant une étireuse de micropipette Flaming/Brown P-80 PC (Sutter Instruments, Hercules, CA, USA), puis ils ont été entourés d'un manteau d'or par un enrobeur Edwards S150B (Edwards High Vacuum, West Sussex, UK). Les capillaires ont été taillés sous stéréomicroscope afin de leur donner un diamètre interne de $1-5\mu$ m.

et analysés utilisant les paramètres expérimentaux suivants ("positive ion mode"):

• capillary voltage, 1.5kV

- sample cone, 30.0V
- extractor cone, 1.0V.

Au moment de la collision des particules, le gaz argon est à une pression d'admission de 10 psi et l'énergie de collision à 4.0V. La source électrospray est chauffée à 40°C et le gaz de "desolvatation" (azote) est délivré selon un flux de 50L/h.

Lors du MS/MS, la collision des molécules de gaz est utilisée comme un indicateur de pression d'admission à 30 psi et l'énergie de collision était de 30 V. La calibration externe est établie par une solution d'acide phosphorique 0.1% dans 50% d'acetonitrile aqueux.

Le contrôle de la machine et l'acquisition des données ainsi que leur traitement est réalisée avec le logiciel MassLynx (Micromass). Seule de l'eau MilliQ est utilisée. Tous les produits d'HPLC (méthanol, acétonitrile, acide trifluoroacetique, dithiothreitol (DTT) et iodoacétamide) proviennent des laboratoires Fluka (Buchs, Swisserland), hormis l'acide formique (Sigma, St. Louis, MO, USA).

c. Recherche dans des banques de données

Les masses des peptides obtenus après digestion à la trypsine et les spectres MS/MS utilisés pour l'identification des protéines ont été recherchés grâce aux moteurs de recherche MASCOT (<u>http://www.matrixscience.com</u>) et SWISS-PROT, en incluant les possibles clivages trypsiques oubliés. L'analyse de l'emprunte de masse peptidique et du spectre MS/MS supposent que les peptides sont monoisotopiques, carbamidométhylés au niveau des cystéines et oxydés au niveau des méthionines.

RESULTATS

I. ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 DANS LE CAS D'UNE REDUCTION DE L'ACTIVITE NEUROMUSCULAIRE

A. PHOSPHORYLATION ET TRANSFORMATIONS PHENOTYPIQUES

<u>1. Introduction</u>

La phosphorylation de la MLC2 est connue pour entraîner à court terme, des modifications dans la contraction musculaire en modulant les rapports actine-myosine ainsi que la sensibilité au calcium des fibres musculaires.

Nous avons étudié sur un muscle lent, le soleus, l'évolution des états de phosphorylation à long terme de la MLC2 dans 2 conditions de transitions phénotypiques lent→rapide, de mêmes durées (15 jours), mais différentes par leurs effets sur la sensibilité (seuil et affinité calciques) au calcium, déterminée à partir de la relation Tension/pCa (voir Matériels et méthodes) :

- des conditions d'HH qui entraînent une atrophie des fibres musculaires, ainsi qu'une diminution de leur sensibilité calcique (Stevens *et al.*, 1990). Ces phénomènes se produisent dans le cadre d'une transformation phénotypique dans le sens lent→rapide.
- des conditions de traitement au clenbutérol, un stéroïde anabolisant, agoniste des récepteurs β2 adrénergiques, et connu pour produire une hypertrophie des fibres musculaires et une augmentation de leur sensibilité calcique (Ricart-Firinga *et al.*, 2000). Ces transformations, opposées à celles observées en HH, sont associées au même type de transformation phénotypique lent→rapide.

Les résultats de cette étude ont donné lieu à la publication suivante, présentée dans ce chapitre : « Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus » Cette publication fait l'objet du point 2. Nous y avons ajouté quelques résultats venant étayer nos conclusions (point 3).

2. Augmentation de la phosphorylation de la MLC2 associée à une

transformation lent-rapide du soleus (Bozzo et al., 2003)

Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus

Cyril Bozzo,^{1,2} Laurence Stevens,² Luana Toniolo,¹ Yvonne Mounier,² and Carlo Reggiani¹

¹Department of Anatomy and Physiology, University of Padova, 35131 Padua, Italy; and ²Laboratory of Neuromuscular Plasticity, Institut Fédératif de Recherche 118, University of Sciences and Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Submitted 25 September 2002; accepted in final form 10 May 2003

Bozzo, Cyril, Laurence Stevens, Luana Toniolo, Yvonne Mounier, and Carlo Reggiani. Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus. Am J Physiol Cell Physiol 285: C575-C583, 2003. First published May 14, 2003; 10.1152/ ajpcell.00441.2002.-In striated muscles myosin light chain (MLC)2 phosphorylation regulates calcium sensitivity and mediates sarcomere organization. Little is known about the changes in MLC2 phosphorylation in relation to skeletal muscle plasticity. We studied changes in MLC2 phosphorylation in rats receiving three treatment conditions causing slow-to-fast transitions: 1) atrophy induced by 14 days of hindlimb suspension (HS), 2) hypertrophy induced by 14 days of clenbuterol administration (CB), and 3) 14 days of combined treatment (CB-HS). Three variants of the slow (MLC2s) and two variants of the fast MLC2 (MLC2f) isoform were separated with two-dimensional electrophoresis and identified with monoclonal and polyclonal antibodies specific for MLC2; their relative proportions were densitometrically quantified. In control soleus muscle MLC2s predominated over MLC2f (91.4 \pm 3.9% vs. 8.5 \pm 3.9%) and was separated into two spots, the less acidic spot being $73.5 \pm 4.3\%$ of the total. All treatments caused a decrease of the less acidic unphosphorylated spot of MLC2s (CB: 64.1 ± 5.6%, HS: $62.4 \pm 6.8\%$, CB-HS: $56.4 \pm 4.4\%$), the appearance of a third more acidic variant of MLC2s (representing 3.9-5.9% of total MLC2s), an increase of MLC2f (\hat{CB} : 30.9 ± 3.1%, HS: 23.9 ± 3.3%, CB-HS: 25.3 \pm 3.9%), and the phosphorylation of a large fraction of MLC2f (CB: $30.4 \pm 6.7\%$, HS: $28.7 \pm 6.5\%$, CB-HS: 21.8 \pm 2.1%). Treatment with alkaline phosphatase or with protein phosphatase 1 (PP1) removed the most acidic spots of both MLC2f and MLC2s. We conclude that in rat skeletal muscles an increase of MLC2 phosphorylation is associated with the slow-to-fast transition regardless of whether hypertrophy or atrophy develops.

muscle atrophy; muscle hypertrophy; clenbuterol; hindlimb suspension

MYOSIN LIGHT CHAIN (MLC)2 is a component of the myosin molecule that contains sites suitable for phosphorylation and is able to modulate myosin-actin interaction in relation to its phosphorylation (32); for this reason MLC2 is also called regulatory light chain (RLC). Whereas in smooth muscle MLC2 phosphoryla-

tion is a necessary step to start the contractile response, in sarcomeric muscles the phosphorylation of MLC2 can only modulate the interaction between the contractile proteins (24). On MLC2 phosphorylation, the force developed at submaximal calcium concentration is increased, i.e., myofibrils become more sensitive to calcium activation (33, 42, 47, 49). An increase of the rate constant of the cross-bridge transition from nonforce-generating to force-generating states (48) is a likely explanation of the effect of MLC2 phosphorylation on force development. Through the modulation of calcium sensitivity, MLC2 phosphorylation regulates twitch amplitude and is causally related with posttetanic twitch potentiation (25). Recently, evidence for a structural role of MLC2 phosphorylation has been given: MLC2 phosphorylation induces stress fiber assembly in nonmuscle cells (19, 38) and mediates sarcomere organization during hypertrophic growth in cardiac muscle (3).

MLC2 exists in several isoforms, of which two, coded by distinct genes, are expressed in mammalian skeletal muscles and described as slow MLC2 and fast MLC2 in relation to their predominant expression in slow or in fast muscle fibers (40). The slow MLC2 isoform is also expressed in ventricular myocardium, whereas a distinct isoform is expressed in atrial myocardium (40). In both slow and fast MLC2 phosphorylation occurs at the amino-terminal end, on serine residues 14 in slow MLC2 and 15 in fast MLC2 in rat muscles, and is catalyzed by the Ca²⁺/calmodulin-dependent MLC kinase (4). In smooth muscle MLC2, the primary phosphorylation site is located at serine 19, and evidence for a second site of phosphorylation at serine 1-2 or at threonine 9 has been given (16). Phosphorylation at serine 19 is catalyzed by Ca²⁺/calmodulin-dependent MLC kinase (16) and by Rho kinase (1) with an activating effect on actin-myosin interaction, whereas phosphorylation at serine 1-2 or threenine 9 is catalyzed by PKC with an inhibitory effect on myosin function (17). Whether a second site of phosphorylation is also present in sarcomeric MLC2 is still controversial (14, 29).

0363-6143/03 \$5.00 Copyright © 2003 the American Physiological Society

C575

Address for reprint requests and other correspondence: C. Reggiani, Dept. of Anatomy and Physiology, Univ. of Padova, Via Marzolo 3, 35131 Padua, Italy (E-mail: carlo.reggiani@unipd.it).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked *"advertisement"* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Changes in MLC2 phosphorylation pattern associated with variations of the functional state have been repeatedly demonstrated in cardiac and smooth muscles. In rat ventricular myocardium, MLC2 phosphorylation changes in connection with hypertrophy development (22,28), is positively correlated with blood pressure (12), and shows seasonal variations (26) in hibernating mammals. In human ventricle, a recent analysis of cardiac muscle strain pattern in vivo has shown that gradients of phosphorylation correlate with gradients of strain on cardiac myocytes (9). In tracheal and bronchial smooth muscle, phosphorylation level increases in the respiratory airways of dogs sensitized to ragweed pollen (18), whereas in arterial smooth muscles, phosphorylation levels increase in relation to high-mechanical stress conditions (2). All these changes can be interpreted in light of a double role of MLC2 phosphorylation, as considered above: a functional role of modulating calcium sensitivity and a structural role of contributing to assembly of cytoskeleton and myofibril filaments.

Less information on long-term changes in MLC2 phosphorylation is available for skeletal muscles. It is well known that phosphorylation of MLC2 increases during repeated electrical stimulation, but long-term effects of electrical stimulation (chronic low-frequency stimulation; CLFS) seem to include a reduction in the degree of phosphorylation (14, 20, 21). This would agree with the observation that CLFS induces a fast-to-slow transition of fiber types and that slow muscles have a lower level of phosphorylation than fast muscles (25).

The lack of information on the variation in MLC2 phosphorylation during muscle adaptations involving changes in fiber size and fiber type, and the relevance of MLC2 phosphorylation to the regulation of contractile performance, prompted us to study MLC2 phosphorylation in two well-known models of muscle plasticity, the atrophy induced by muscle disuse during hindlimb suspension and the hypertrophy induced by clenbuterol administration. Hindlimb suspension applied for 14 days causes atrophy, decrease in calcium sensitivity, and slowto-fast transition of the contractile protein isoforms in the slow-twitch antigravitational soleus muscle (44, 45). The β_2 -adrenergic agonist clenbuterol has a marked anabolic action that produces muscle hypertrophy associated with an increase in the number of fast fibers (34). Changes in the myosin composition of soleus are consistent with slow-to-fast transitions (8), and Ca²⁺ sensitivity is increased. If the two treatments are associated, clenbuterol reduces the soleus atrophy induced by hindlimb suspension and increases the Ca^{2+} sensitivity in slow and fast fibers, this effect being more marked in atrophied than in normal muscles. In other words, clenbuterol has an anabolic action on muscle fibers and appears to counteract to some extent the effects of unloading conditions (37).

The three experimental treatments (clenbuterol, hindlimb suspension, and combined treatment) represent an optimal condition to assess 1) whether a slow-to-fast transition implies an increased phosphorylation of MLC2, as one might expect from the comparison between fast and slow muscles (25) and from the observation that CLFS causes a lower phosphorylation

level associated with the appearance of a slow phenotype (see above), and 2) whether atrophy and hypertrophy are associated with different patterns of phosphorylation, as one might expect from studies on cardiac muscles (see above) and from the opposite effects on calcium sensitivity (decreased by hindlimb suspension and increased by clenbuterol treatment, see above). The results obtained showed that slow-to-fast transition is associated with increased levels of phosphorylation regardless of the development of atrophy or hypertrophy.

MATERIALS AND METHODS

Animals and muscles. Adult male Wistar rats (initial body wt ~300 g) were randomly divided into four groups: control, clenbuterol administration (CB), hindlimb suspension (HS), and clenbuterol combined with hindlimb suspension (HS-CB). Hindlimb suspension was applied for 14 days as previously described (44, 45) according to the protocol proposed by Morey (30). Clenbuterol (Sigma, St. Louis, MO), freshly prepared each day, was administered via drinking water (30 mg/l) for 14 days (37). At the end of treatment, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ethylcarbamate and killed by exsanguination, and soleus muscles were dissected, blotted, and weighed. In control rats, extensor digitorum longus (EDL) muscle was also dissected. The body and soleus muscle weights of the four groups at the end of the experimental period are shown in Table 1. After dissection, the muscles were frozen in liquid nitrogen, pulverized in a small steel mortar, and stored at -80°C until being analyzed. The experiments received authorization from both the French Ministry of Agriculture (Veterinary Service of Health and Animal Protection) and the French Ministry of Education (authorization no. 59-00996).

Protein extraction and sample preparation. Myofibrillar proteins were extracted from 7–10 mg of dry muscle powder as described previously (50), washing first with a solution containing 6.3 mM EDTA (pH 7), 0.1% pepstatin, and 1% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and then with a second solution containing 50 mM KCl, 0.1% pepstatin, and 1% PMSF. The myofibrillar proteins were resuspended in 500 µl of milliQ water, and their concentration was determined with a protein assay kit (Dc Protein Assay, Bio-Rad) to prepare samples with a final quantity of 50 µg. The proteins were then precipitated for 2 h with acetone (8 vol (acetone)/vol (sample)), followed by centrifugation for 1 h at 13,000 rpm. The pellet was dissolved in Laemmli solution for SDS-PAGE or in rehydration buffer for two-dimensional gel electrophoresis.

Protein desphosphorylation. The samples (proteins suspended in water, see Protein extraction and sample prepara-

Table 1. Musci	le weight,	body weight	, and muscle
weight-to-body	weight ra	tio of soleus	muscles

Freatment	Muscle Weight,	Body Weight,	Muscle Weight/Body
	mg $(n = 6)$	g(n = 6)	Weight, mg/g $(n = 6)$
Cont CB HS HS-CB	$\begin{array}{c} 139.34 \pm 4.44 \\ 164.86 \pm 4.77 * \\ 82.16 \pm 0.96 * \\ 101.81 \pm 10.45 * \dagger \end{array}$	$\begin{array}{c} 322.8 \pm 14.8 \\ 380.4 \pm 22.2 * \\ 311.5 \pm 10.9 \\ 336.0 \pm 21.7 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.469 \pm 0.02 \\ 0.437 \pm 0.015 \\ 0.264 \pm 0.008^* \\ 0.320 \pm 0.015^* \dagger \end{array}$

Values are means \pm SE. Cont, control group; CB, clenbuterol-treated group; HS, hindlimb suspension-exposed group; HS-CB, combined-treatment group. Significant differences (P < 0.05). *vs. Cont, †vs. HS.

AJP-Cell Physiol • VOL 285 • SEPTEMBER 2003 • www.ajpcell.org

C576

tion) were incubated for 4 h at 37°C either with calf intestinal alkaline phosphatase (10 U/50 μ g protein; Sigma P6772) or with serine/threonine phosphatase (PP1) extracted from rabbit skeletal muscle (1 U/50 μ g protein; Upstate Cell Signaling Solutions). At the end of the incubation proteins were precipitated with acetone, centrifuged, and resuspended in rehydration buffer (see *Protein extraction and sample preparation*).

One-dimensional electrophoresis (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis). The isoform composition of myosin heavy chain (MHC) and MLC was determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Separation of MHC isoforms was achieved by the method previously described (46) with a 4.5% stacking gel and a 7.5% separating gel. Electrophoresis was run for 18 h at low temperature with 180 V (constant voltage; current ~13 mA/gel). Separation of MLC isoforms was achieved as described in Two-dimensional gel electrophoresis for the second dimension of two-dimensional gel electrophoresis. Gels were silver stained (31) and digitized with an Epson 1650 scanner with 200 dpi resolution. Identification of MHC and MLC isoforms was based on the migration rate. The areas under the peaks corresponding to the MHC or MLC isoforms were measured, and the area of each peak was expressed as a fraction of the total area of the peaks corresponding to MHC, to alkali MLC, or to regulatory MLC.

Two-dimensional gel electrophoresis. Proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis with a procedure similar to those previously used for MLC2 separation in sarcomeric muscles by Morano et al. (27) and Gonzalez et al. (14). For the first dimension, isoelectric focusing (IEF), proteins were solubilized in a buffer containing 8 M urea, 2% CHAPS, 0.01 M dithiothreitol (DTT), and 2% carrier ampholites (Amersham Biosciences) and then separated with the Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (Amersham Biosciences) on 3.5% acrylamide strips with immobilized pH gradients (4–7) (Amersham Biosciences). Strips were rehydrated at 50 V for 12 h, and proteins were focused under the following voltage conditions: 500 V for 1 h, 500–1,000 V for 1 h, 5,000 V until reaching 100,000 V·h. Temperature was kept constant at 20° C.

After reduction with a buffer containing 6 M urea, 30% glycerol, 0.375 M Tris·HCl (pH 8.8), and 2% DTT and alkylation with the same buffer with the addition of 2.5% iodoacetamide, the strips were embedded in 4% polyacrylamide stacking gels and the proteins were separated in 12% polyacrylamide gels (SDS-PAGE) for 8 h at 150 V and low temperature (4°C). After electrophoresis gels were silver stained according to Oakley et al. (31).

Image analysis and quantification. Two-dimensional gels were digitized with an Epson 1650 scanner at a resolution of 1,200 dpi. The spots were analyzed densitometrically, determining brightness-area product (BAP) with a constant threshold after black/white inversion with Adobe Photoshop software. In each gel, the BAP values of the spots identified as slow and fast MLC2 were summed to give a total for slow MLC2 and a total for fast MLC2: the value of each spot identified as slow MLC2 was expressed as a percentage of total slow MLC2, and the same was done for the spots identified as fast MLC2. From percentage values obtained in different gels means \pm SE were calculated. The quantification procedure was validated by running mixtures of a constant amount of purified actin and increasing amounts of purified slow MLC2 (kindly donated by Dr. Monica Canepari and Dr. Daniela Romano, University of Pavia, Pavia, Italy) on separate gels and determining the ratio between the BAP values of MLC2 and actin. Examples of the linear relation



Fig. 1. Identification of the spots corresponding to myosin light chain (MLC)2 and validation of the densitometric quantification procedure. A: immunostaining after blotting of a 2-dimensional gel in which soleus and extensor digitorum longus (EDL) samples from control rats were run together. The antibody FL-172sc15370 (Santa Cruz) was used with a dilution of 1:200. Only 4 spots were recognized by the antibody: 3 easily detectable spots (from *left* to *right*: s, f, f1; see also Figs. 3 and 4) and a fourth spot, s1, hardly detectable just above the spot f. B: correlation between the ratios of the brightness-area products (BAP) of slow MLC2 spots over actin spots and the amounts of purified slow MLC2 loaded. In each experiment 3 increasing amounts of purified slow MLC2 were run with a constant amount of actin. The amount of actin was higher in experiment 1 (top) and lower in experiment 2 (bottom).

between the ratio of MLC2 and actin BAP values and the actual amounts of MLC2 loaded are shown in Fig. 1B.

Protein transfer and immunoblotting. Two-dimensional gels were transferred to nitrocellulose membrane to identify MLC2 spots by immunostaining. Transfer was obtained by a semidry transfer procedure by applying a current of 0.8 mA/cm² for 6 h. Nitrocellulose sheets were reacted first with a primary antibody directed against MLC2 and then with a peroxidase-conjugated secondary antibody. The spots were visualized by an enhanced chemiluminescence (ECL) method in which luminol was excited by peroxidase in the presence of H_2O_2 . Two antibodies specific for MLC2 were used: the polyclonal antibody FL-172sc15370 (Santa Cruz) and the monoclonal antibody F109.3E1 (Alexis). A typical example of the results is shown in Fig. 1A: the spots corresponding to slow and fast MLC2 are clearly identified.

Statistical analysis. Data are expressed as means \pm SE and were compared by one-way ANOVA followed by Bonferroni test. The level of significance was set at P < 0.05.

RESULTS

Effects of experimental treatments: slow-to-fast transformation, atrophy, and hypertrophy. Samples of myofibrillar proteins from each experimental group were analyzed by one-dimensional PAGE followed by densitometric quantification of MHC and MLC isoforms. MHC isoforms were analyzed because they are reliable indicators of fiber type transformation (40). The results are shown in Fig. 2 and Table 2. As expected (43), both clenbuterol and hindlimb suspension induced a slowto-fast transition that also occurred with the combined

treatment. The proportions of the fast MLC2 isoform increased and the proportion of slow MLC2 isoform decreased compared with controls in all three experimental groups, as shown in Table 2 and Fig. 2. It is important to emphasize, however, that the changes in MLC2 isoform distribution were accompanied by opposite changes in muscle size: hindlimb suspension induced soleus atrophy, whereas clenbuterol administration induced hypertrophy (see Table 1). The combined treatment reduced the muscle atrophy induced by inactivity. When normalized to actin, no difference in the total amount of MLC2 isoforms was detectable between the control group and each experimental group (data not shown). This suggests that no selective loss or accumulation of this myosin subunit occurred in atrophic or hypertrophic muscles.

MLC2 isoform identification. The positions of slow and fast isoforms of MLC2 on two-dimensional gels were determined according to their molecular weight, using appropriate markers of molecular weight in the second dimension, and to their isoelectric point in the first dimension (IEF) and were confirmed by immunoblotting (see Fig. 1A). The spots of MLC2 on the twodimensional gel detectable in soleus and EDL of control rats are shown in Fig. 3 and indicated as s and s1 and f and f1. In the soleus of control rats, slow MLC2 was the predominant regulatory light chain and appeared separated into two spots: s and s1 (see Fig. 3, *left*); a third almost undetectable more acidic spot was occa-

Fig. 2. Typical example of separation of MLC isoforms on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of control (Cont) rat soleus; soleus of a rat treated with clenbuterol (CB), soleus of a rat exposed to hindlimb suspension (HS), and soleus of a rat exposed to both treatments (HS-CB). EDL, sample of EDL muscle of a control rat taken as a reference for fast MLC isoforms.



AJP-Cell Physiol • VOL 285 • SEPTEMBER 2003 • www.ajpcell.org

C578

	Cont $(n = 5)$	CB (n = 5)	HS (n = 5)	HS-CB $(n = 5)$
MHC I	95.05 ± 2.80	$72.55 \pm 1.28^*$	$73.05 \pm 2.25^*$	$65.09 \pm 0.10^{*\dagger}$
MHC IIa	4.95 ± 1.99	$22.00 \pm 2.81*$	$9.34 \pm 1.75^*$	$15.6 \pm 0.6^{*}$ †
MHC IIx		$2.91 \pm 0.42*$	$8.33 \pm 1.01^*$	$11.75 \pm 0.74^{*\dagger}$
MHC Hb		$2.54 \pm 1.26*$	$9.28 \pm 1.43^{*}$	$7.55 \pm 0.25^*$
Alkali MLC				
MLC 1s	92.60 ± 4.14	$80.18 \pm 4.06^*$	$76.05 \pm 4.13^{*}$	$73.54 \pm 5.86^{*}$
MLC $1f + 3f$	7.40 ± 0.65	$19.42 \pm 3.92*$	$23.95 \pm 2.56^*$	$26.46 \pm 2.78^*$
Regulatory MLC				
MLC 2s	91.44 ± 3.95	$69.12 \pm 3.05^*$	$76.06 \pm 2.5^{*}$	$74.71 \pm 3.89^*$
MLC 2f	8.56 ± 3.95	$30.88 \pm 3.05*$	$23.94\pm2.5^*$	$25.29 \pm 3.89 *$

Table 2. Distribution of slow and fast MHC and MLC isoforms of rat soleus muscles determined by one-dimensional gel electrophoresis

Values are means \pm SE. The amount of each myosin heavy chain (MHC) isoform is expressed as % of total MHC. Each alkali [myosin light chain (MLC) 1 and/or 3] or regulatory (MLC2) isoform is expressed as % of total of alkali or regulatory MLC. s, Slow; f, Fast. Significant differences (P < 0.05). *vs. Cont, †vs. HS.

sionally present. Only a minor amount of fast MLC2 was present in the soleus and it appeared as a single spot, located close to the s1 spot of slow MLC2 in a position corresponding to the spot indicated as f in the EDL. In the EDL, the fast isoform of MLC2 was predominant and appeared composed of two spots (f and f1) of similar size with lower molecular weights and more acidic isoelectric points than the spots of the slow isoform (see Fig. 3, *right*).

Effect of clenbuterol administration on MLC2 isoform distribution. As reported in Table 2 and shown in Fig. 4 (*left*), clenbuterol administration stimulated the expression of fast MLC2 in the soleus. In control soleus muscles the slow MLC2 isoform showed the following distribution: s represented 74%, s1 represented 26%, and the third more acidic spot, s2, was almost undetectable (see Table 3 and Fig. 4). Fast MLC2 was scarcely expressed and was represented by the less acidic form f. In CB soleus muscles, the most acidic form (s2) was consistently present and reached a relative proportion of ~6%. The proportion of s1 was not significantly modified. Furthermore, clenbuterol treatment induced not only the expression of fast MLC2 but also the concomitant appearance of the acidic form f1, which represented 30% of the total vs. 70% of the less



Fig. 3. MLC isoforms in control soleus and EDL as they appear in 2-dimensional gel electrophoresis. The pH gradient goes from more basic on the *left* to more acidic on the *right*. The variants of slow MLC2 are indicated as s and s1, and the variants of fast MLC2 are indicated as f and f1.

acidic form f (see Table 3 and Fig. 4). The incubation with alkaline phosphatase removed the most acidic forms of both slow and fast MLC2 isoforms (see Fig. 4, right), making the pattern of CB soleus in two-dimensional electrophoresis similar to that of the control soleus, except for the greater presence of the fast MLC2 isoform.

Effect of hindlimb suspension on MLC2 isoform distribution. The inactivity caused by hindlimb suspension induced the appearance of s2 as observed in CB muscles (see Table 3 and Fig. 4). The proportions of s and s1, however, were not significantly reduced in HS



Fig. 4. Effects of the treatments (CB, HS, HS-CB) and alkaline phosphatase on the MLC2 distribution in soleus muscle. *Left*: MLC2 variants in control and treated (CB, HS, HS-CB) soleus. *Right*: MLC2 variants in each group after incubation with alkaline phosphatase. The variants of slow MLC2 are indicated as s, s1, and s2, and the variants of fast MLC2 are indicated as f and f1. Note that all groups (Cont, CB, HS, HS-CB) exhibit similar patterns after incubation with phosphatase, except for the relative proportion of fast and slow MLC2 isoforms.

	Slow MLC2			Fast	Fast MLC2	
	s	s1	s2	f	f1	
Cont CB HS HS-CB	$73.56 \pm 4.3564.12 \pm 5.6762.38 \pm 6.8956.41 \pm 4.43^*$	$\begin{array}{c} 26.44 \pm 4.35 \\ 29.99 \pm 4.99 \\ 34.38 \pm 5.87 \\ 39.60 \pm 2.81^* \end{array}$	$\begin{array}{c} 0 \pm 0 \\ 5.89 \pm 0.92^{*} \\ 3.24 \pm 2.98^{*} \\ 3.99 \pm 0.99^{*} \end{array}$	$\begin{array}{c} 100\pm 0\\ 69.57\pm 6.67*\\ 71.34\pm 6.54*\\ 78.23\pm 2.12* \end{array}$	$\begin{array}{c} 0\pm 0\\ 30.43\pm 6.67*\\ 28.66\pm 6.54*\\ 21.77\pm 2.12* \end{array}$	

Table 3. Relative distribution of the variants of the slow and fast isoforms of MLC2 present in rat soleus muscles

Values (in % of total isoform) are means \pm SE of 5–10 samples. *Significantly different (P < 0.05) from cont.

soleus compared with control soleus. Hindlimb suspension also induced the slow-to-fast transition, with a moderate increase of the proportion of the fast MLC2 isoform (24%, see Table 2), which appeared separated into two spots (see Table 3 and Fig. 4). In agreement with the results obtained for CB soleus, alkaline phosphatase incubation of HS soleus removed the more acidic spots, leaving a pattern similar to that observed in control soleus: both s2 and f1 disappeared.

Effect of clenbuterol administration combined with hindlimb suspension on MLC2 isoform distribution. The combined treatment of clenbuterol and hindlimb suspension caused muscle atrophy slightly but significantly lower than that induced by hindlimb suspension alone (Table 1) and a shift toward fast isoforms comparable to that induced by clenbuterol alone (Table 2). Two-dimensional electrophoresis (see Fig. 4 and Table 3) revealed that the shift toward acidic forms of the slow MLC2 isoform was more pronounced than with hindlimb suspension or clenbuterol alone: s decreased significantly, and both s1 and s2 increased. Two spots corresponding to the fast MLC2 isoform, f and f1, were present (see Fig. 4 and Table 3). As in the two treatments described above, the phosphatase action removed the more acidic spots, thus determining a distribution reminiscent of that of control soleus (see Fig. 4).

Effects of PP1 dephosphorylation. Samples of soleus muscles from rats exposed to the experimental treatments were incubated with PP1. The results obtained in HS soleus are shown in Fig. 5: after PP1 incubation two acidic spots, s2 and f1, were completely removed, whereas the proportion of the intermediate acidic form s1 was reduced (to ~10% of total slow MLC2) but not eliminated. Similar results were obtained with CB and CB-HS soleus samples (data not shown). The specificity of the phosphatase action was tested by incubating the samples with heat-inactivated PP1: no change in spot distribution occurred after incubation with heat-inactivated PP1 (see Fig. 5).

DISCUSSION

The results obtained in this study show, for the first time, that an increase of MLC2 phosphorylation is associated with the hypertrophy caused by clenbuterol administration and the atrophy caused by hindlimb suspension. The two treatments have in common the transformation of the muscle phenotype with a marked slow-to-fast transition. The analysis of MLC2 phosphorylation was performed with two-dimensional electrophoresis, which revealed enhanced expression of the fast MLC2 isoform and the appearance of phosphorylated variants of both fast and slow MLC2 in the soleus of CB, HS, and HS-CB rats compared with control animals. Previous studies had shown that, whereas the immediate effect of repetitive electrical stimulation is the increase of the MLC2 phosphorylation that explains the posttetanic twitch potentiation (23, 25), long-term CLFS reduces the level of phosphorylation (14, 20,21). To the best of our knowledge, no other condition of muscle plasticity has been analyzed in terms of MLC2 phosphorylation until now.

Most of the classic studies on MLC2 phosphorylation in skeletal muscles have been based on isoelectrofocusing (IEF) on polyacrylamide gels after nondenaturing pyrophosphate electrophoresis of myosin (41). Twodimensional electrophoresis has been applied first to smooth muscle (11), then to cardiac muscle (27), and only more recently to skeletal muscle (10, 14). The use of two-dimensional electrophoresis has definitely improved the resolution of the protein separation, particularly with the use of narrow and immobilized pH



Fig. 5. MLC2 variant separation by 2-dimensional gel electrophoresis and effects of PP1 on a sample of soleus muscle of HS rat. A: separation without PP1 incubation. B: separation after PP1 incubation. C: separation after incubation with heat-inactivated PP1.

gradients (39). The two isoforms of MLC2 were unambiguously identified on the basis of their molecular weight and their reactivity with specific antibodies; they appeared divided into different spots, among which the more acidic forms could be considered as phosphorylated forms. In rat skeletal muscles fast MLC2 appeared to be composed of two spots and slow MLC2 of three spots (14). Interestingly, if we assume that the more acidic spots represent the phosphorylated forms, the picture emerging from two-dimensional electrophoresis is slightly different from that obtained with more classic methods (41). Separation on two-dimensional gels indicates that in the rat \sim 30% of the slow MLC2 isoform in soleus and 30-40% of the fast MLC2 isoform in EDL are in phosphorylated forms (see also Refs. 10 and 14). By contrast, no significant amount of phosphorylated MLC2 in the rat soleus and only 0.1 mol/mol in rat white gastrocnemius were found by Moore and Stull (25). Similar ratios (0.10 and 0.19 mol/mol, respectively) have been reported for rat gastrocnemius (21, 23).

The interpretation of the three spots observed in rat slow MLC2 is still controversial. A convincing demonstration that all three spots correspond to MLC2 has been given by Gonzalez et al. (14), using specific antibodies in Western blots. The three spots (indicated as s, s1, and s2 in this study) might correspond to two variants of slow MLC2, each of them under unphosphorylated and phosphorylated states, with the assumption that the intermediate spot (s1) contains one unphosphorylated and one phosphorylated form (14). Evidence in favor of the existence of two distinct variants of slow MLC2 was first given for the ventricular myocardium (27, 35). Two variants of slow MLC2 have been also observed in human vastus lateralis muscle (15). It is worthwhile to recall that only one gene coding for the slow isoform of MLC2 is expressed in ventricular myocardium and in slow skeletal muscle fibers (40). The presence of two variants must therefore be attributed to posttranscriptional or posttranslational modifications. In the latter alternative the hypothesis of double phosphorylation can be considered, especially if we refer to the demonstration of several phosphorylation sites in smooth muscle MLC2 (16). In this case, the increase of phosphorylation observed in this study might be explained by phosphorylation of the fast MLC2 and a second phosphorylation of the phosphorylated slow MLC2. Against the hypothesis of the double phosphorylation of slow MLC2 is the observation that only the most acidic spot (s2) of the slow MLC2 is completely removed by phosphatase action, whereas the intermediate acidic spot (s1) is greatly reduced but does not disappear. The spot of fast MLC2 considered as phosphorylated (f1) is completely removed (see also Ref. 14). Both alkaline phosphatase and PP1 were tested and were found insufficient to completely dephosphorylate slow MLC2. The specificity of PP1 is determined by the regulatory subunit (7), and the commercially available muscle PP1 used in this study contains a mixture of regulatory subunits, as stated by the manufacturer. Thus the partial effect of phosphatase might be due to a limitation to the access of the enzyme, for instance, by a structural constraint: only a very specific phosphatase, for example, PP1-M containing the myosin-specific regulatory subunit (MYPT2; Ref. 7) might produce a pattern with only one spot for the slow MLC2 and one spot for the fast MLC2.

The increase in MLC2 phosphorylation was associated with the slow-to-fast transition induced by all three treatments considered in this study; this is in agreement with the fact that MLC2 phosphorylation is higher in fast than in slow muscles, the difference being in turn dependent on different levels of calmodulin-dependent kinase activity (25). An inhibition of kinase gene expression (20) has been reported in relation to the decrease of the phosphorylation level observed after CLFS (14, 20, 21). One might speculate that, if the fast-to-slow transition induced by CLFS implies the inhibition of the calmodulin-dependent MLC kinase, the slow-to-fast transition determined by clenbuterol or by hindlimb suspension could include the activation of the same gene, as a part of a general "fast muscle fiber" program. This is, however, a simplified view: there are possibly also different isoforms of MLC kinase and regulatory mechanisms based on phosphorylation and autophosphorylation. The autophosphorylation reaction depends on calcium/calmodulin activation (13) with a rate of phosphorylation different from that of MLC2 phosphorylation but does not seem to modulate the catalytic function of the kinase. It is yet not known whether Rho kinase (1) can phosphorylate MLC2 in skeletal muscle. A recent study, however, showed variations of Rho kinase in relation to muscle atrophy (6). Finally, an increase of MLC2 phosphorylation might be caused by a decreased activity of specific phosphatase: the possible regulation of the MLC phosphatase (or PP1-M) in relation with β -adrenergic stimulation was recently discussed by Decostre et al. (10).

There is convincing evidence that phosphorylation of MLC2 increases the calcium sensitivity of the myofibrils and therefore force development at submaximal activation (33, 47, 49). As mentioned in the introduction, previous work by our group (44, 45) showed that calcium sensitivity decreased in atrophy induced by hindlimb suspension, whereas it increased after clenbuterol administration and after the combined treatment (37). Surprisingly, in both cases the phosphorylation level was found to be increased. This suggests that the decrease in calcium affinity in muscle fibers atrophied by hindlimb suspension in the presence of a high degree of MLC2 phosphorylation is due to other factors.

In conclusion, this study represents one of the first demonstrations that the long-term adaptation mechanisms of the contractile performance of skeletal muscles, although mainly based on regulation of myosin isoform expression and therefore operated at the transcriptional level, can be based partly on posttranslational modifications, phosphorylation in this case or glycosylation in other cases (36), as discussed in a recently published review (5). This finding is of special

interest considering that phosphorylation represents the way of regulation used by a large number of intracellular signaling pathways.

DISCLOSURES

This work was partially supported by European Union Grant HPRN-CT-2000-0091 to C. Bozzo, the Italian Ministry of University through Research Project of National Interest (PRIN) Grant 2000, and Centre National d'Etudes Spatiales (CNES) Grant 3194, Conseil Régional du Nord Pas-de-Calais.

REFERENCES

- 1. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, and Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). J Biol Chem 271: 20246-20249, 1996.
- 2. Annibale DJ, Rosenfeld CR, Stull JT, and Kamm KE. Protein content and myosin light chain phosphorylation in uterine artery during pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol* 259: C484-C489, 1990.
- 3. Aoki H, Sadoshima J, and Izumo S. Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy in vitro. *Nat Med* 6: 183–188, 2000.
- Blumenthal DK and Stull JT. Activation of skeletal muscle myosin light chain kinase by Ca²⁺ and calmodulin. *Biochemistry* 19: 5608-5614, 1980.
- Bottinelli R. Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibres: do myosin isoforms tell the whole story? *Pflügers Arch* 443: 6-17, 2001.
- 6. Chockalingam PS, Cholera R, Oak SA, Zheng Y, Jarret HW, and Thomason DB. Dystrophin-glycoprotein complex and Ras and Rho GTPase signaling are altered in muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C500-C511, 2002.
- Cohen PTW. Protein phosphatase 1—targeted in many directions. J Cell Sci 115: 241-256, 2002.
- 8. Criswell DS, Powers SK, and Herb RA. Clenbuterol-induced fiber type transition in the soleus of adult rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 74: 391-396, 1996.
- Davis JS, Hassanzadeh S, Winitsky S, Lin H, Satorius C, Vemuri R, Aletras AH, Wen H, and Epstein ND. The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation. *Cell* 107: 631-641, 2001.
- Decostre V, Gillis JM, and Gailly P. Effect of adrenaline on the post-tetanic potentiation in mouse skeletal muscle. J Muscle Res Cell Motil 21: 247-254, 2000.
- Di Salvo J, Gruenstein E, and Silver PJ. Ca²⁺ dependent phosphorylation of Ca²⁺ sensitive aortic actomyosin. Proc Soc Exp Biol Med 162: 337-341, 1979.
- 12. Fitzsimmons DP, Bodell KM, and Baldwin KN. Phosphorylation of rodent cardiac myosin light chain 2: effects of exercise. J Appl Physiol 67: 2447-2453, 1989.
- Gao ZH, Moomaw CR, Hsu J, Slaughter CA, and Stull JT. Autophosphorylation of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Biochemistry* 31: 6126-6133, 1992.
- 14. Gonzalez B, Negredo P, Hernando R, and Manso R. Protein variants of skeletal muscle regulatory myosin light chain isoforms: prevalence in mammals, generation and transitions during muscle remodelling. *Pflügers Arch* 443: 377-386, 2002.
- 15. Houston ME, Lingley MD, Stuart DS, and Grange RW. Myosin light chain phosphorylation in intact human muscle. *FEBS Lett* 219: 469-471, 1987.
- Ikebe M and Hartshorne DJ. Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. J Biol Chem 260: 10027-10031, 1985.
- Ikebe M and Reardon S. Phosphorylation of bovine platelet myosin by protein kinase C. Biochemistry 29: 2713-2720, 1990.
- Jiang H, Rao K, Liu X, Halayko AJ, Liu G, and Stephens NL. Early changes in airway smooth muscle hyperresponsiveness. Can J Physiol Pharmacol 72: 1440-1447, 1994.
- Katoh K, Kano Y, Amano M, Kaibuchi K, and Fujiwara K. Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in

cultured human fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol 280: C1669-C1679, 2001.

- 20. Klug GA, Biedermann M, Houston ME, Stuart D, Mumby M, and Stull JT. Chronic low frequency stimulation reduces myosin phosphorylation in rabbit fast twitch muscle. Can J Physiol Pharmacol 70: 859-865, 1992.
- 21. Klug GA, Botterman BR, and Stull JT. The effect of low frequency stimulation on myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *J Biol Chem* 257: 4688-4690, 1982.
- Liu X, Shao Q, and Dhalla NS. Myosin light chain phosphorylation in cardiac hypertrophy and failure due to myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol 27: 2613-2621, 1995.
- MacIntosh BR, Grange RW, Cory CR, and Houston ME. Myosin light chain phosphorylation during staircase in fatigued skeletal muscle. *Pflügers Arch* 425: 9–15, 1993.
- Manning DR and Stull JT. Myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation in mammalian skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol 242: C234-C241, 1982.
- Moore RL and Stull JT. Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscles in situ. *Am J Physiol Cell Physiol* 247: C462–C471, 1984.
- Morano I, Adler K, Agostini B, and Hasselbach W. Expression of myosin heavy and light chains and phosphorylation of the phosphorylatable myosin light chain in the heart ventricle of the European hamster during hibernation and in summer. J Muscle Res Cell Motil 13: 64-70, 1992.
- 27. Morano I, Arndt H, Gartner C, and Ruegg JC. Skinned fibres of human atrium and ventricle: myosin isoenzyme and contractility. *Circ Res* 62: 632-639, 1988.
- Morano I, Lengsfeld M, Ganten U, Ganten D, and Ruegg JC. Chronic hypertension changes myosin isoenzyme pattern and decreased myosin phosphorylation in the rat heart. J Mol Cell Cardiol 20: 875-886, 1988.
- Morano I, Wankerl M, Bohm M, Erdmann E, and Ruegg JC. Myosin-P-light chain isoenzymes in the human heart: evidence for a diphosphorylation of the atrial P-LC form. *Basic Res Cardiol* 84: 298-305, 1989.
- 30. Morey ER. Spaceflight and bone turnover: correlation with a new rat model of weightlessness. *Bioscience* 29: 168-172, 1979.
- Oakley BR, Kirsch DR, and Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem 105: 361-363, 1980.
- Perrie WT, Smillie LB, and Perry SB. A phosphorylated light-chain component of myosin from skeletal muscle. *Biochem* J 135: 151-164, 1973.
- 33. **Persechini A, Stull JT, and Cooke R.** The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 260: 7951–7954, 1985.
- 34. Polla B, Cappelli V, Morello F, Pellegrino MA, Boschi F, Pastoris O, and Reggiani C. Effects of β₂-agonist clenbuterol on respiratory and limb muscles of weanling rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 280: R862–R869, 2001.
- Price KM, Littler WA, and Cummins P. Human atrial and ventricular light chain subunits in the adult and during development. *Biochem J* 191: 571-580, 1980.
- 36. Ramamurthy B, Hook P, Jones AD, and Larsson L. Changes in myosin structure and function in response to glycation. FASEB J 15: 2415-2422, 2001.
- 37. Ricart-Firinga C, Stevens L, Canu MH, Nemirovskaya TL, and Mounier Y. Effects of β₂-agonist clenbuterol on biochemical and contractile properties of unloaded soleus fibers of rat. Am J Physiol Cell Physiol 278: C582-C588, 2000.
- Ridley AJ and Hall A. The small GTP binding protein rho regulates the assembly of focal adhesion and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399, 1992.
- Righetti PG and Gianazza E. Immobilized pH gradients (IPG). Electrophoresis 13: 185-186, 1992.
- Schiaffino S and Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76: 371-423, 1996.
- Silver PJ and Stull JT. Quantitation of myosin light chain phosphorylation in small tissue samples. J Biol Chem 257: 6137-6144, 1982.

AJP-Cell Physiol • VOL 285 • SEPTEMBER 2003 • www.ajpcell.org

C582

- 42. Stephenson GM and Stephenson DG. Endogenous MLC2 phosphorylation and Ca²⁺-activated force in mechanically skinned skeletal muscle fibres of the rat. *Pflügers Arch* 424: 30–38, 1993.
- 43. Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, Bastide B, Mounier Y, and Pette D. Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. Am J Physiol Cell Physiol 279: C1558-C1563, 2000.
- 44. Stevens L and Mounier Y. Evidences for slow to fast changes in the contractile proteins of rat soleus muscle after hindlimb suspension: studies on skinned fibers. *Physiologist* 33: S90–S91, 1990.
- 45. Stevens L, Mounier Y, Holy X, and Falempin M. Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension. J Appl Physiol 68: 334–340, 1990.
- 46. Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, and Pette D. Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. Am J Physiol Cell Physiol 277: C1044-C1049, 1999.
- Sweeney HL, Bowman BF, and Stull JT. Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. Am J Physiol Cell Physiol 264: C1085-C1095, 1993.
- 48. Sweeney HL and Stull JT. Alteration of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: implications for regulation of actin-myosin interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 414–418, 1990.
- Szczesna D, Zhao J, Jones M, Zhi G, Stull J, and Potter JD. Phosphorylation of the regulatory light chains of myosin affects Ca²⁺ sensitivity of skeletal muscle contraction. J Appl Physiol 92: 1661-1670, 2002.
- 50. Toursel T, Bastide B, Stevens L, Rieger F, and Mounier Y. Alterations in contractile properties and expression of myofibrillar proteins in wobbler mouse muscles. *Exp Neurol* 162: 311– 320, 2000.


3. Phosphorylation de la MLC2 dans l'EDL après HH

Les résultats qui suivent complètent ceux obtenus dans le muscle lent et détaillés dans la publication précédente. La même méthodologie que celle utilisée pour le soleus a été suivie pour l'EDL, muscle rapide. Pour celui-ci, nous nous sommes limités à l'étude en HH. En effet, l'EDL ne subit pas de transformations fonctionnelles et phénotypiques ni en conditions de HH (Stevens *et al.*, 2000), ni après traitement au clenbutérol (Ricart-Firinga *et al.*, 2000). L'objectif était de contrôler les effets de l'absence de transitions phénotypiques sur la phosphorylation de la MLC2.

<u> </u>	• • •	1 1 •	1 117777	11.1 TTTT
o Corocta	mationizas mon	mhologiaiia		n conditiond UU
a. Calacie	Instructs mor	DHOIDPIGUG		

	Masse du rat (BM, g)	Masse du muscle (MM, mg)	MM / BM (mg/g)
EDL CONT (n=6)	322 ±14	161 ±4	0,50 ±0,02
EDL HH (n=6)	311 ±10	126±5*	0,41 ±0,04*

Tableau 6. Masse du rat (BM = Body Mass), et masse de l' EDL, absolue (MM=Muscle Mass) et relative (MM / BM) en conditions contrôles et après HH.

La masse des EDL HH est inférieure à celle des EDL contrôles, ce qui se traduit par une atrophie de 22% après HH. b. Analyse du phénotype musculaire (MHC et MLC) de l'EDL après HH



Figure 26. Analyses électrophorétiques des isoformes de MHC et de MLC dans l'EDL après HH. Ces analyses ont été effectuées en SDS-PAGE 7.5% pour les MHC (partie supérieure) et 15% pour les MLC (partie inférieure).

	MHCI	MHCIIa	MHCIId/x	MHCIIb	MLC1s	MLC1f+3	MLC2s	MLC2f
EDL CONT	7,32	14,33	35,00	43,35	9,78	90,22	13,88	86,12
(n=4)	±0,65	±1,05	±0,98	±1,00	±1,28	±1,28	±5,62	±5,62
EDL	7,59	15,43	34,15	42,83	8,68	91,32	14,88	85,12
(n=4)	±0,56	±0,78	±1,99	±0,48	±2,18	±2,18	±3,03	±3,03

Tableau 7. Répartition des isoformes de MHC et MLC dans les muscles EDL en conditions contrôles et après HH.

La figure 26 et le tableau 7 confirment que, suite à 15 jours d'HH, l'EDL ne subit aucune transformation phénotypique, ni au niveau des MHC ni au niveau des MLC, qui conservent une répartition identique à celle observée dans les EDL contrôles.

c. Phosphorylation de la MLC2 dans l'EDL après HH



Figure 27. Expression des isoformes de MLC2 (lentes « s » et rapides « f ») séparées par électrophorèse bidimensionnelle (voir Matériels et méthodes). Les variants de la MLC2 lente sont nommés 2s1 et 2s2, et les variants de la MLC2 rapide sont nommés 2f1 et 2f2.

	MLC 2s1	MLC 2s2	MLC 2f	MLC 2f1
EDL CONT (n=4)	68,29 ±1,16	31,71 ±1,16	76,12 ±2,18	23,88 ±2,18
EDL HS (n=4)	66,41 ±1,38	33,59 ±1,38	74,48 ±1,52	25,52 ±1,52

Tableau 8. Répartition des états de phosphorylation des isoformes de MLC2 dans l'EDL CONT après HH.

L'analyse en électrophorèse 2D ne montre aucune variation des états de phosphorylation de la MLC2 entre les EDL contrôles et les EDL soumis à l'HH. Il est cependant à noter que le profil de répartition des variants de l'isoforme lente de MLC2 dans l'EDL (contrôle ou HH) n'exprime pas le variant 2s identifié dans le soleus. De même, dans l'EDL, le variant 2s2 est exprimé alors qu'on ne le retrouve pas dans le soleus contrôle. Cette observation renforce une de nos hypothèses énoncées dans la publication précédente qui propose que 2s et 2s1 sont deux isoformes différentes de la MLC2 lente. Cette théorie sera discutée dans une des publications présentées dans cet ouvrage (cf. « Myosin light chain phosphorylation in denervated slow and fast rat skeletal muscles »).

4. Conclusion

Nous avons démontré dans ce chapitre que l'augmentation de phosphorylation de la MLC2 dans le soleus est corrélée à la transformation phénotypique lent→rapide. Les variations de masse ainsi que de sensibilité au calcium des fibres musculaires ne semblent pas corrélées aux variations de phosphorylation observées dans les muscles lents (atrophie et diminution de la sensibilité calcique, mais augmentation du niveau de phosphorylation de la MLC2). Il en est de même pour les muscles rapides (atrophie, sensibilité calcique identique aux conditions contrôles et pas de changement du niveau de phosphorylation de la MLC2). Un point important est à souligner : la baisse de sensibilité calcique ne peut donc pas être

reliée, dans des conditions d'études à long terme, à une variation de phosphorylation de la MLC2, comme cela a été décrit dans la bibliographie après tension tétanique (Manning et Stull, 1982 ; Sweeney *et al.*, 1993).

L'absence de transformation phénotypique, ainsi que l'absence de variation du niveau de phosphorylation de la MLC2 dans l'EDL après HH tendent à nous faire penser qu'un des facteurs pouvant engendrer un changement de phosphorylation de la MLC2 par l'intermédiaire d'un changement phénotypique du muscle, pourrait être la commande nerveuse imposée au muscle. En effet, en HH, il est connu que le « pattern » d'activité nerveuse d'un muscle postural lent comme le soleus est fortement modifié pour se transformer en un « pattern » se rapprochant de celui d'un muscle rapide. Le « pattern » d'un muscle rapide, plus impliqué dans le mouvement comme l'EDL, n'est, lui, pas modifié en HH.

B. RELATION MESSAGE NERVEUX, TRANSFORMATION DU PHENOTYPE MUSCULAIRE ET VARIATION DE PHOSPHORYLATION DE LA MLC2

1. Introduction

Afin d'étudier l'influence de la commande nerveuse sur le degré de phosphorylation de la MLC2, nous avons utilisé le modèle de dénervation de la patte postérieure. Ce modèle a permis :

- de supprimer la commande nerveuse du muscle, et donc d'obtenir des effets plus marqués que l'HH au niveau du soleus. Au niveau de l'EDL, dont le message nerveux n'est pas modifié après HH, la dénervation permet d'observer les effets d'une absence de commande nerveuse sur le niveau de phosphorylation de la MLC2 ;
- de transformer le soleus en un muscle plus rapide, conservant ainsi une transition phénotypique comparable à celle rencontrée en HH. Pour l'EDL, la dénervation étant connue pour transformer le muscle en un muscle plus lent, nous obtiendrons une première approche des variations de phosphorylation de la MLC2 dans le cas d'une transition phénotypique inverse rapide→lent.

De plus, afin de comprendre les mécanismes moléculaires existant entre changement du phénotype musculaire et variation de phosphorylation de la MLC2, nous avons inhibé spécifiquement l'action de la calcineurine par injection de cyclosporine A. En effet, il est connu maintenant que l'identité du message nerveux (type lent ou type rapide) rend active (muscle lent) ou inactive (muscle rapide) la calcineurine, qui, par l'intermédiaire du NFAT, régule l'activation des gènes typiques du phénotype lent, et l'inhibition de certains gènes rapides. L'injection de la cyclosporine A nous permet donc :

- d'obtenir une transformation lent→rapide de muscles lents, mais aussi rapide→lent de muscles rapides,
- d'analyser les variations de phosphorylation de la MLC2 dans le cas de l'inhibition d'une voie de régulation du phénotype musculaire par le message nerveux.

Cette possibilité sera analysée dans l'étude suivante : « Myosin light chain phosphorylation in denervated slow and fast rat skeletal muscles » soumise à l'American Journal of Physiology.

2. Phosphorylation de la MLC2 dans le soleus et l'EDL dénervés (Bozzo *et al.*, 2004 soumis à l'American Journal of Physiology)

NB : les résultats concernant l'expression des enzymes MLCK et MP présentés et discutés dans l'article ci-après, seront repris ultérieurement dans le chapitre III, pour une meilleure interprétation des phénomènes contrôlant leur régulation.

TITLE

Myosin light chain phosphorylation in denervated slow and fast rat skeletal muscles

AUTHORS

^{1,2}Cyril Bozzo, ³Barbara Spolaore, ¹Luana Toniolo, ²Laurence Stevens, ²Bruno Bastide, ²Caroline Cieniewski-Bernard, ³Giuseppe Fontana, ²Yvonne Mounier, ¹Carlo Reggiani

AFFILIATIONS

¹Dept. Anatomy and Physiology, University of Padova, Padova, Italy. ²Lab. Neuromuscular Plasticity, IFR118, USTL,Villeneuve d'Ascq, France. ³CRIBI Biotechnology Centre, University of Padova, Italy

RUNNING TITLE

Myosin phosphorylation and denervation

KEY WORDS

Myosin, phosphorylation, denervation, mass spectrometry, cyclosporin

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Carlo Reggiani Dept. of Anatomy and Physiology - University of Padova Via Marzolo 3 35131 Padova – Italy Phone +39 049 8275513, Fax +39 049 827 5301 e-mail: carlo.reggiani@unipd.it

ABSTRACT

Neural stimulation controls contractile properties of skeletal muscle fibres through transcriptional regulation of a number of proteins including myosin isoforms. It is little known whether post-translational modifications are also implicated.

To study the relevance of neural control on myosin post-translational modifications, we analysed the effects of denervation (DE) on myosin phosphorylation in rat slow and fast muscles. The degree of MLC1 and MLC2 phosphorylation was determined in soleus and EDL using 2D gel electrophoresis, densitometry and mass spectrometry. Based on the evidence that neural stimulation acts through an intracellular signalling pathway involving calcineurin, the effects of ciclosporin A (CsA, 10mg/kg/d), an inhibitor of calcineurin, were also studied.

In control rats differences between soleus and EDL were found not only in the relative abundance of the fast and slow isoforms of MLC1 and MLC2 but also in the distribution of the variants with distinct isoelectric point identified on 2D gels.

Two weeks after DE, MLC2 phosphorylation was significantly increased in soleus, whereas it was reduced in EDL. Relative proportions of slow and fast MLC2 isoform were also modified. Two weeks of treatment with CsA did not change significantly MLC2 fast and slow isoform distribution or MLC2 phosphorylation. No difference in MLC1 phosphorylation was detectable after DE or CsA. Changes in the expression of MLC kinase without variation of expression of phosphatase subunit PP1 were detected and provided an explanation of the phosphorylation changes.

The results show that innervation controls MLC2 phosphorylation through activity-dependent and calcineurin-independent regulation of MLC kinase expression.

INTRODUCTION

Myosin isoforms are major determinants of the contractile properties of skeletal muscle fibers (31) and neural discharge pattern has an important role in determining which myosin isoforms are expressed as demonstrated by cross innervation (5) and denervation (24, 30) experiments. In particular denervation of a slow muscle causes a quick decrease of slow myosin mRNA associated with an increase of mRNA of fast MHCIIx/d and MHCIIb, whereas the opposite, i.e. a decrease of mRNA of fast MHC isoforms occurs in denervated fast muscles (14). After a longer time the distribution of MHC isoform proteins also changes accordingly (16, 23, 24).

Whereas the regulation of the contractile properties of muscle fibers via transcriptional control of myosin isoform expression is well known (31), it is less known whether myofilament functions can be the target of long term regulation based on post-translational protein modifications. The recent observation that changes in cross bridge kinetics due to myosin non-enzymatic glycosylation occur in slow fibers during aging (19, 20) demonstrates that post-translational modifications can be relevant to determine contractile properties over long time periods.

Phosphorylation of the light chain subunits is the most studied post-translational modification of myosin. Phosphorylation of regulatory MLC is catalysed by a calmodulin-dependent kinase (MLC kinase) which is activated by the increase of cytosolic calcium related with excitation-contraction coupling (3). Thus, a repetitive or tetanic stimulation causes an increased phosphorylation of regulatory MLC. Phosphorylation is then removed by a phosphatase composed of PP1 associated to MYPT2, a targeting subunit specific for skeletal muscle MLC (8, 9, 27). Myosin phosphorylation enhances force development at submaximal calcium concentration, i.e. induces a shift of the force-pCa curve towards lower calcium concentrations (28, 34) and, through this mechanism, offers a plausible explanation for the phenomenon of the post-tetanic potentiation (26).

There is evidence in favor of the existence of a long term regulation of the MLC2 phosphorylation beside the short term regulation dependent on calcium released during contraction. Long term regulation means changes in phosphorylation level occurring over periods of days or weeks and might be considered a special case of skeletal muscle differentiation and plasticity. In substantial agreement with the first observations that

phosphorylation level is higher in fast than in slow muscles (26), recent studies have shown that phosphorylation decreases with CLFS (chronic low frequency stimulation) which induces a fast-to-slow transformation (12, 17, 18). An increase of myosin phosphorylation during adaptive responses, such as hind limb suspension (HS), which imply a slow-to-fast transformation has been demonstrated in a recent study of our group (4).

The finding that MLC2 phosphorylation increases with HS and decreases with CLFS suggests that the level of activity might control the degree of phosphorylation. It is important to underline that contractile activity can cause opposite variations of the degree of myosin phosphorylation on short and on long time intervals. Actually, in short term regulation repetitive or tetanic stimulation (duration: seconds or fractions of seconds) leads to an increased phosphorylation, whereas in long term regulation CLFS (duration: days or weeks) causes a reduced phosphorylation. Taking into account the indications of a role of the activity in long term regulation of myosin phosphorylation, we thought to investigate whether denervation is followed by changes in myosin phosphorylation level and to use denervation as a model to explore the mechanisms of long term regulation. As recalled above, several studies have shown that denervation enhances expression of fast myosin isoforms in the slow soleus muscle and expression of slow myosin in the fast muscles (13). At our best knowledge only one paper (10) has analysed the MLC2 phosphorylation in denervated muscles and shown that, in EDL, MLC2 phosphorylation is reduced 7 days after denervation. A decrease in phosphorylation in a denervated fast muscle where a down-regulation of genes coding for fast myosin occurs (14) points to the connection between fast isoforms and high phos phorylation level discussed above. Following this reasoning, an increased phosphorylation in the slow soleus muscle after denervation might be anticipated.

The first aim of this study was, therefore, to assess whether denervation modifies the level of MLC2 phosphorylation in soleus and EDL taken as representative slow and fast muscles, i.e. two muscles where specific patterns of neural stimulation determine and maintain opposite structural and functional characteristics. 2D gel electrophoresis and mass spectrometry were employed to analyze the changes in phosphorylation. A second aim of this study was to understand the molecular mechanisms which determine the changes in phosphorylation level. To this end we tested the hypothesis that changes in phosphorylation following denervation were due to variations in the amount of MLC kinase and phosphatase in the muscle. MLC kinase and the phosphatase subunit PP1 were determined by Western blot. Available evidence

points to a role of the calcineurin-NFAT pathway in mediating the effect of the low frequency pattern of neural discharge on transcription of genes typical of slow muscle phenotype such as slow myosin subunits (6); (22, 32). In the frame of this model we explored, whether the inhibition of calcineurin with Cyclosporin A could mimic the effects of denervation on myosin phosphorylation as it does with myosin isoform expression (2). Finally, taking into account the recent evidence of MLC1 phosphorylation in cardiac muscle (1), we extended our investigation based on 2D gel electrophoresis and mass spectrometry to MLC1 isoforms.

The results obtained confirmed the hypothesis of a close connection between fast myosin expression and high phosphorylation level of MLC2. MLC kinase was found to vary in direct relation with the degree of phosphorylation providing a possible explanation of the regulatory mechanism. Cyclosporin A treatment was sufficient to modify myosin isoform expression but did not change MLC2 phosphorylation suggesting that the regulation of MLC kinase expression is calcineurin independent. In addition, although 2D gels gave evidence in favor of MLC1 phosphorylation in skeletal muscles, no variations in the degree of MLC1 phosphorylation were found in slow and fast muscles after denervation or Cyclosporin A administration.

MATERIALS AND METHODS

Animals and treatments

Experiments were performed on adult male Wistar rats of ~250g weight. Animals were divided in 4 groups: i) control untreated animals (CONT), ii) animals with surgical section of sciatic nerve (DE). Rats of this group were anesthetized with Zoletil 10 mg/Kg (Zolazepam and Tiletamine 1:1) and Xilazine 2% 0.06 ml/Kg, and about 1 cm of the sciatic nerve on the right hindlimb at the level of trochanter was removed. The left hindlimb was taken as control of the denervation (CODE). iii) A third group of animals received 10mg/day/kg Ciclosporin A diluted in a 10% cremophor A solution (CsA) by an intraperitoneal injection, iv) a fourth group received a corresponding treatment with the vehicle alone, i.e. with 10% cremophor A solution (COCsA). The volume of the cremophor solution injected was calculated according to the animal weight as for the CsA group. After two weeks from denervation or after 14 days of CsA or vehicle administration, the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ethylcarbamate, killed by exsanguination, and Soleus and EDL muscles were dissected, blotted, and weighed. After dissection, the muscles were quickly frozen in liquid N_2 , pulverized in a small steel mortar and stored at -80°C until analyzed. The experiments and the treatment of the animals were approved by the French Agricultural and Forest Ministry and the French National Education Ministry (authorization 5900996).

Protein extraction for mono- and bi-dimensional electrophoresis

Muscle powder was used to extract myofibrillar proteins for MHC and MLC analysis by electrophoresis. Myofibrillar proteins were extracted from 7 to 10 mg of dry muscle powder as described previously (37), washed first with a solution containing 6.3 mM EDTA (pH 7), pepstatine 0.1%, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 1%, and then with a second solution containing KCl 50 mM, pepstatine 0.1%, PMSF 1%. The myofibrillar proteins were resuspended in 1 ml of sterile milliQ water and their concentration was determined by a protein assay kit (Dc Protein Assay, Bio-Rad) to prepare samples with a final amount of 10 μ g for 1D electrophoresis, 70 μ g for 2D electrophoresis, and 150 μ g for mass spectrometry. This last protein quantity was chosen to optimize the mass spectrometry analysis by intensifying the less abundant spots, and avoiding contamination between spots migrating in very near positions. Then, the proteins were precipitated for 2 hours with acetone (8 v/v), followed by

centrifugation for 1 hour at 13,000 rpm. The pellet was dissolved in Laemmli solution for SDS-PAGE or in re-hydration buffer for 2D gel electrophoresis.

Mono-dimensional electrophoresis for MHC and MLC analysis.

MHC isoform composition was determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAE) on a 4.5% stacking gel and a 8% separating gel. Electrophoresis was run for 20 h at low temperature (180 volts constant, 13 mA/gel). For the analysis of MLC isoform composition, 12% separating gels with 4% stacking gels were used. The electrophoresis was run for 8 hours at low temperature (150 volts, 13 mA/gel). After the run, gel slabs were silver stained. The relative proportions of MHC or MLC isoforms in each sample were determined by densitometry (GS-700 Imaging Densitometer, Biorad, Ivry s/Seine, France). At least two independent measurements were performed on each sample. The mean value was used as an individual measurement.

Two-dimensional electrophoresis for MLC analysis

Proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis with a procedure similar to that previously described (4). For the first dimension or isoelectric focusing (IEF), proteins were solubilized in a 8M urea, 2% Chaps, 0.01M dithiotreitol (DTT) and 2% carrier ampholites (Amersham Biosciences) buffer, and then separated using the Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (Amersham Biosciences) on 3.5% acrylamide strips with immobilized pH gradients (4 to 7) (Amersham). Strips were re-hydrated at 50V for 12 hours and proteins were focused under the following voltage conditions: 500V for 1 hour, 500V to 1000V for 1 hour, 8000V until reaching 100,000 V.h. Temperature was kept constant at 20°C. After reduction with a 6 M urea, 30% glycerol, Tris HCl 0.375 M pH 8.8, and 2% DTT buffer and alkylation with the same buffer with additional 2.5% iodoacetamide, the strips were embedded in 4% polyacrylamide stacking gel and the proteins were separated in 12% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) for 8 hours at 150 V at low temperature (4°C). Following electrophoresis, gels were silver stained. The positions of slow and fast isoforms of MLC on 2D gels were identified according to their isoelectric point in the first dimension and to appropriate markers of molecular weight in the second dimension, confirmed by immunostaining (4) and by mass spectrometry (see below).

Protein transfer and immunoblotting

Muscle proteins were separated on 12% gels by SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membrane to analyse MLCK, PP1 and actin expression by immunostaining. Transfer was obtained by semi-dry transfer procedure by applying a current of 0.8 mA/cm² for six hours. Nitrocellulose sheets were reacted first with the primary antibodies directed against actin, MLCK and phosphatase subunit PP1. Antibodies used were : monoclonal anti-actin clone AC-40 (A 3853, Sigma Aldrich, USA), polyclonal anti-MLCK sc9456 and polyclonal anti-PP1 sc6106 (Santa Cruz Biotechnology). Then, a peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse antibody (P 260, Dako, Denmark) for anti-actin, and a rabbit anti-goat antibody (A 5420, Sigma Aldrich, USA) for MLCK and PP1 antibodies were employed as secondary antibodies. The bands were visualized by an enhanced chemiluminescence method (ECL) in which luminol was excited by peroxidase in the presence of H_2O_2 . Preliminary tests were carried out for each antibody to check any cross-reactivity and to verify exactly the position of each protein on the gel, particularly actin and PP1 that had a very similar molecular weight.

Image analysis and quantification

Two-dimensional gels were digitized with a scanner EPSON 1650 at a resolution of 1200 dpi. The spots were analyzed densitometrically and each spot was characterized by a value of Brightness-Area Product (BAP) with a constant threshold after black/white inversion using Adobe Photoshop Software. In each gel, the BAP values of the spots identified as slow and, respectively, fast isoforms of MLC1 and MLC2 were summed to give a total for each isoform: slow MLC1, fast MLC1, slow MLC2 and fast MLC2. The value of each spot was expressed as percent of the total value for that particular isoform. From percentage values obtained in different gels Means \pm Standard Deviation were calculated. The quantification procedure had been validated in a previous paper (4) by running on separate gels known mixtures of a constant amount of purified actin and increasing amounts of purified slow MLC2 and determining the ratio between the BAP values of MLC2 and actin (see Figure 1B in Bozzo et al (4)).

Mass spectrometry for identification of the 2D spots.

Tryptic in-Gel Digestion: Selected spots were excised from 2D-gels and proteins were in-gel digested as previously described (39). Briefly, gel pieces were destained and proteins were reduced with DTT, alkylated with iodoacetamide and digested with porcine trypsin (modified sequencing grade, Promega, Madison, WI, USA) overnight at 37°C. The supernatant was then transferred to another tube and residual tryptic peptides were extracted upon incubation of gel spots first with 25 mM NH₄HCO₃ at 37°C for 15 min followed by shrinking of gel pieces with acetonitrile, and then upon incubation with 5% formic acid at 37°C for 15 min and shrinking with acetonitrile. The extracts were combined with the primary supernatant and dried in a SpeedVac centrifuge (Savant). Protein digests were then resuspended in 20 μ l of 1% TFA and purified with Zip Tip C₁₈ microcolumns (Millipore) according to instructions provided by the manufacturer. Peptides were eluted in 50% methanol, 0.1% formic acid and analyzed directly by mass spectrometry.

Mass Spectrometry: Mass spectra were acquired on a tandem mass spectrometer Q-TOF Micro (Micromass, Manchester, UK) equipped with a Z-spray nanoflow electrospray interface. Nano-ESI capillaries were prepared in house from borosilicate glass tubes of 1 mm OD and 0.78 mm ID (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) using a Flaming/Brown P-80 PC micropipette puller (Sutter Instruments, Hercules, CA, USA), and gold coated using an Edwards S150B sputter coater (Edwards High Vacuum, West Sussex, UK). The capillary tips were cut under a stereomicroscope to give inner diameters of 1-5 μ m. Typically, 2 μ l of solution eluted from Zip Tip C_{18} microcolumn were directly loaded on the capillary tips and analyzed using the following experimental parameters (positive ion mode): capillary voltage, 1.5 kV; sample cone, 30.0 V; extractor cone, 1.0 V. In the collision cell argon was at an indicated inlet pressure of 10 psi and the collision energy setting was 4.0 V. The electrospray source was heated at 40°C and the desolvatation gas (nitrogen) was set at a flow of 50L/h. When MS/MS experiments were performed, typically the collision gas was used at an indicated inlet pressure of 30 psi and the collision energy setting was 30 V. External calibration was performed using a solution of 0.1% fosforic acid in 50% aqueous acetonitrile. Instrument control and data acquisition and processing were achieved with MassLynx software (Micromass). Deionized water from MilliQ water system (Millipore, Bedford, MA, USA) was always used. HPLC grade methanol and acetonitrile, trifluoroacetic acid (TFA), dithiothreitol (DTT) and iodoacetamide were purchased from Fluka (Buchs, Swisserland). Formic acid was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Database Searching: Masses of individual tryptic peptides and MS/MS spectra used for protein identification were searched using MASCOT search engine (<u>http://www.matrixscience.com</u>) against the SWISS-PROT database with trypsin plus potentially one missed cleavage. Peptide mass fingerprint and MS/MS spectra analysis used the assumption that peptides were monoisotopic, carbamidomethylated at cysteine residues and as variable modification oxidized at methionine residues.

Statistical Analysis

All the data were reported as Mean \pm Standard Deviation. The statistical significance of the difference between means was determined using ANOVA test and Bonferroni test. Differences at or above 95% confidence level were considered significant (p<0.05).

RESULTS

Body and muscle masses

At the end of the experimental period, body mass was similar in control untreated rats (CONT), rats which underwent denervation (DE) and rats receiving every day Cyclosporine A vehicle (COCsA), whereas it was significantly lower in rats which received 10mg/days/kg of Cyclosporin A (CsA) via i.p. injection (see Table 1). As initial body mass did not differ among the four groups of animals, the difference observed at the end of the treatments shows that denervation or vehicle administration n did not influence body mass growth over 14 days, whereas CsA administration for the same period caused a significant reduction in body mass growth (about 10%).

Both denervation and CsA administration modified muscle masses. After denervation, the mass of soleus and EDL were decreased by 33% and 43% respectively compared to CONT (see Table 1). The decrease of DE soleus mass was even more pronounced if compared with the corresponding controlateral not denervated (CODE) soleus (-46%). After CsA treatment; EDL but not soleus, showed a significant decrease in mass (-32%) as shown in Table 1. The higher atrophy induced by CsA in fast compared to slow muscles had been reported in previous studies (25).

Myosin Heavy Chain isoforms distribution

The isoform distributions of Myosin Heavy Chain (MHC) and Myosin Light Chain (MLC) in soleus and EDL of control and treated rats were determined by SDS-PAGE and densitometry and are shown in Figure 1 and Table 2. Four bands corresponding to MHCI or slow and to MHCIIa, MHCIId/x and MHCIIb were separated on 8% gels. As can be seen, no difference in MHC isoform distribution was present for both soleus and EDL muscles between control untreated rats (CONT), controlateral leg of denervated rats (CODE) and rats receiving the CsA vehicle by i.p. injection (COCsA). In all control samples soleus showed a predominant MHCI band and a minor MHCIIa band, whereas EDL showed a pattern composed of four bands with MHCIId/x and MHCIIb predominance in accordance with previous observations (35).

In soleus, 14 days after denervation a significant change in MHC isoform distribution was detectable (see Table 2). The slow MHC isoform of MHCI was less abundant (-9%) in DE than in CONT and CODE and this was accompanied by the expression of the fast MHCIId/x isoform (+5%). CsA treatment for 14 days produced similar reduction of MHCI, associated with a surprising increase of MHCIIb expression (+5%). In EDL, denervation was followed by an increase of MHCIIa (+6%) expression which was complementary to a decrease in MHCIId/x (-3%) and MHCIIb (-3%), these latter being below statistical significance. The changes produced by CsA were only partly similar as a significant increase of MHCIIa expression (+7%) was accompanied by a significant decrease of MHCIIb expression (-14%), whereas MHCIId/x proportion was significantly increased (+6%).

Myosin Light Chain expression

Five bands corresponding to MLC isoforms were identified on 12% gels and densitometrically quantified: three alkali MLC (MLC1slow and MLC1fast and MLC3) and two regulatory MLC (MLC2slow and MLC2fast). As expected (35), fast isoforms were predominant in EDL whereas slow isoforms were predominant in the soleus. As described above for MHC isoforms, no difference in MLC distribution was present between CONT, CODE and COCsA . In soleus, denervation caused a change in the distribution of both alkali and regulatory MLC isoforms, characterized by a decreased abundance of slow isoforms and an increase of fast isoforms. No other statistically significant changes were detected in soleus muscle and in EDL. Interestingly, CsA administration did not modify the distribution of MLC isoforms in soleus and in EDL.

Separation of Myosin Light Chain by two-dimensional gel electrophoresis

Myosin light chains were analysed in two dimensional electrophoresis with the aim to detected variants of the five isoforms MLC1slow, MLC1fast, MLC2slow, MLC2fast and MLC3. On two dimensional gels (see Figure 2), MLC1slow was divided by IEF in two spots, named 1s and 1s1, 1s1 being more acidic, and MLC1fast was similarly divided in 1f and 1f1. MLC2slow was separated in three spots, indicated as 2s, 2s1 and 2s2, in order from basic to acid isoelectric point. MLC2fast was divided in 2f and 2f1, 2f1 being a more acidic variant. MLC3 appeared as a single spot (not shown in Figure 2). The spots corresponding to MLC isoforms and their variants were identified and classified as previously described (4) on the

basis of their molecular weight (second dimension), isoelectric point (first dimension) and immunoblotting. Furthermore, the identity of all spots was confirmed with good scores by mass spectrometry (see table 3), except for the spots indicated as 1f1 and 2s2 which were below the sensitivity level of the mass spectrometry analysis.

The relative proportions of the spots corresponding to MLC isoforms and their variants were densitometrically quantified as described in the Methods and the results are shown in Table 4. In control soleus (CONT, CODE, COCsA) the predominant isoform MLC2slow (see Table 2) was composed of two spots, the less acidic (2s) being more abundant (c.a. 75%) than the more acidic (2s1, c.a. 25%). MLC2fast was also present and appeared composed of only one spot (2f). Denervation caused not only a shift from MLC2slow to MLC2fast as described above (see Table 2), but also an increase of the more acidic forms for both slow and fast MLC2. A third more acidic spot (2s2) appeared in MLC2slow and a second acidic spot (2f1) appeared in MLC2fast (see Figure 2 where 2s2 and 2f1 are circled). CsA treatment did not modify the relative proportions of the MLC2 variants in soleus. In control EDL, MLC2fast was predominant (see Table 2) and appeared divided in two variants, the more acidic one representing about 1/4 of the total. MLC2slow was also present and composed of two spots, the latter being 1/3 of the total. Importantly, careful analysis of the relative positions of the spots in 2D gels of control EDL compared with control soleus showed that the two variants of MLC2slow present in EDL corresponded to 2s1 and 2s2, whereas the less acidic variant 2s was not detectable. Denervation modified the relative proportion of the variants of MLC2slow, as the more acidic spot significantly decreased. As in soleus, CsA treatment did not modify the relative distribution of the MLC2 variants in EDL.

The proportions of the spots corresponding to MLC1slow and MLC1fast were determined in soleus and EDL of all control and treated groups (see Figure 2 and Table 4). Interestingly, the predominant isoform appeared divided in two spots both in soleus where MLC1slow was more abundant and in EDL where MLC1fast was more abundant. The ratio between the more acidic spot and the less acidic one was about 1/4 in both cases and did not change after denervation or CsA treatment. The less abundant isoform appeared as a single spot both in soleus and in EDL.

MLCK and PP1 expression

The expression of the skeletal myosin light chain kinase (MLCK) and phosphatase subunit PP1 was determined by SDS-PAGE, Western blot and densitometry, using actin band as a reference signal. The results are shown in Figure 3. In soleus, denervation significantly increased MLCK expression by approximately 2.5 fold, but did not influence PP1 expression which remained similar to the values obtained in CONT and in CODE. CsA administration did not affect either MLCK or PP1 expression. In control EDL (CONT, CODE, and COCsA), the level of MLCK expression was 1.5 fold higher than in control soleus, but lower than the MLCK level reached in denervated soleus. Denervation reduced MLCK expression in EDL by 1.5, so that MLCK level in DE EDL corresponded to the MLCK level observed in control soleus. CsA did not change the expression of MLCK. The level of PP1 expression was similar in soleus and EDL and no variation in PP1 expression was observed after denervation and CsA treatment.

DISCUSSION

In this study we examined the effects of denervation on myosin light chain phosphorylation in slow and fast muscles. In both cases we found that, in addition to the known effects on myosin isoform distribution, denervation was able to modify the degree of MLC2 phosphorylation. The changes were, however, opposite as in the slow muscles the degree of phosphorylation increased after denervation and in the fast muscles the degree of phosphorylation decreased. No variations in MLC1 phosphorylation were detected.

Two dimensional gel electrophoresis with isoelectric focusing based on strips with immobilized pH gradients was used to separate the phosphorylated and unphosphorylated forms. A detailed analysis based on mass spectrometry (MS) was performed to reinforce the identification of the individual spots based on isoelectric point (first dimension), molecular weight (second dimension) and immunostaining described in our previous paper (4). The spots corresponding to actin and all variants of MLC isoforms were identified with the exception of two spots, an acidic variant of MLC1 fast and the most acidic variant of MLC2slow, which were below the detection limit of the system. No attempt was done to determine which residues undergo to phosphorylation as the focus of the study was on the long term changes in the ratio between more acidic and less acidic variants. Both the slow and the fast isoform of alkali myosin light chain (MLC1slow and MLC1fast) were present in two discrete variants, with different isoelectric point and equal molecular weight. MS confirmed the identification of both variants of MLC1slow and of only one variant (the less acidic) of MLC1 fast. Interestingly, both in soleus and in EDL, only the more abundant MLC1 isoform appeared divided in two spots and, therefore, the three spot pattern detectable in soleus was the mirror image of the three spot pattern present in EDL. Three variants of MLC2 slow were separated on 2D gels. The identification had been achieved in our previous study by immunoblotting (4) and was confirmed in this study by MS except for the most acidic peptide (2s2). The comparison between soleus and EDL in control conditions revealed a new and unexpected difference as the two less acidic spots (2s and 2s1) were detected in soleus whereas the two more acidic spots (2s1 and 2s2) were present in EDL. In denervated soleus 2s2 appeared, whereas in denervated EDL the size of 2s2 decreased. The origin of the three spot remains controversial (4,12) whether they represent unphosphorylated (2s), monophosphorylated (2s1) and di-phosphorylated (2s2) variants as observed in smooth muscle (15) or the combination of two distinct post-translational modifications. In favor of the second explanation is the complete removal of 2s2 and the incomplete removal of 2s1 by phosphatase (4) and the recent observation of a de-amidation site (38) in MLC2slow which gives origin to a more acidic form. Finally, two distinct variants of the fast MLC2 isoform were separated by isoelectrofocusing and their identification confirmed by MS.

The changes of the phosphorylation level after denervation are examples of long term posttranslational modification, clearly different from the increase of phosphorylation which occurs after repetitive stimulation and is responsible for post-tetanic potentiation (26). It is known since many years that the phosphorylation level is higher in fast than in slow muscles (26). A decrease in phosphorylation level have been previously described in muscles which are subjected to chronic low frequency stimulation (12, 17, 18), a conditions which is known to induce a fast-to-slow transformation. Our previous work (4) has shown that slow-to-fast transformation either induced by disuse (HS) or by clenbuterol administration is associated with an increase phosphorylation level. Denervation is known to affect myosin isoforms, the transcriptional changes being detectable at mRNA level few days after denervation and at protein level within some weeks (14, 23, 24). The changes in myosin subunit expression observed in this study were in complete agreement with previous observations, as in denervated soleus slow myosin was less expressed (both MHCI and slow MLC) whereas fast myosin expression (MHC IIx and fast MLC) increased. In denervated EDL, only an increase in expression of MHC IIa, indication of a moderate transition towards a slow phenotype, was observed. In accordance with previous observations on long term changes in myosin phosphorylation, the slow-to-fast transition in soleus was associated with an increased level of phosphorylation and the fast-to-slow (or fast-to-less fast) transition in EDL with a decrease in phosphorylation level. It is worth to underline that the association between isoform changes and phosphorylation changes does not mean that MLC2fast is more phosphorylated than MLC2slow. It means, to give an example, that in denervated soleus both MLC2slow and MLC2fast increase their phosphorylation degree, from 26 to 33% and from 0 to 20%, respectively.

The results obtained provide the first evidence that the long term changes in phosphorylation level are caused by changes in MLCK without significant variations of the phosphatase or at least of the phosphatase subunit PP1. Western blot analysis showed very clearly that upon denervation MLCK increases in soleus and decreases in EDL. Preliminary results obtained in our laboratory with quantitative PCR confirm that both denervation and hindlimb suspension

cause an increase of mRNA of MLCK (data not shown). In agreement with these observations, a moderate increase in MLCK gene transcription is reported in the supplementary data of a microarray study of the transcriptional changes occurring in soleus during hindlimb suspension (36).

To shed some light on the intracellular signaling pathway controlling MLC2 phosphorylation and MLCK expression, we explored whether phosphorylation degree and MLCK concentration were affected by two weeks of CsA administration, a condition which should reproduce the transcriptional changes caused by denervation. According to a widely accepted model, the transcriptional effects of neural discharge pattern are mediated by an intracellular signaling pathway which links cytosolic calcium increase to calmodulin (CAM), calcineurin (CaN) and NFAT (2, 6). Dephosphorylated by CaN, NFAT translocates into the nucleus and contributes to activate the transcription of the genes specific of the slow phenotype (6, 7, 29, 32). CsA is expected to inhibit the phosphatase action of CaN and therefore to block the signaling pathway connecting neural stimulation and transcription. The results obtained in this study confirmed that CsA administration induces a slow-to-fast transition in adult fully differentiated muscles as previously observed by Bigard et al. (2), however no significant changes in MLC2 phosphorylation and MLCK expression were detected. As the observed changes in MHC isoform expression clearly show that the CsA administration was effective at transcriptional level, the lack of effect on MLC2 phosphorylation supports the view that MLCK expression was mediated by a pathway different from CAM-CaN-NFAT. This conclusion needs to be considered with caution as CsA treatment and denervation might be not completely overlapping: i) whereas CaN should only interfere with the signaling pathway mediating neural discharge inside muscle fibres, denervation achieved by severing sciatic nerve not only interrupts neural discharge on muscles, but also causes unloading as activity of both agonist and antagonist muscles is removed, ii) fast muscles, as EDL, respond to CsA better than slow muscles with regard both to atrophy and to myosin isoform transition, as described already by Bigard et al (2), and this agrees with the higher concentration of CaN in fast than in slow muscles (33), iii) recent studies on the promoter region of MHCI (11) cast some doubts whether transcriptional CsA effects are only mediated by interruption of the CaN-NFAT pathway.

In this study not only MLC2 phosphorylation but also MLC1 phosphorylation was taken into consideration. In cardiac muscle (1) two variants of MLC1 slow exist and the more acidic is

phosphorylated either in serine 200 or in threonine 69. Our observations are, to our knowledge, the first demonstration that, at least for MLC1 slow (see above) two variants with different isoelectric point exist also in skeletal muscle. The ratio between the two variants is similar in cardiac and in skeletal muscle as for both fast and slow MLC1 the more acidic form represents 1/4 of the total. In cardiac muscle ischemic preconditioning has been shown to modify the ratio from 1:4 to 1:3 (1). Our results show that in skeletal muscles neither denervation nor hindlimb suspension (our unpublished data) were able to modify the ratio between the variants of MLC1.

In conclusion, this study provides a strong demonstration that changes in fiber type are associated with changes in myosin phosphorylation level, with an increase being associated to slow-to-fast transition and a decrease being associated with fast-to-slow transition. The mechanism and the time course of these changes need to be further clarified, although the parallel variations of phosphorylation and MLCK concentration point to the transcriptional regulation of MLCK as a possible mechanism and the lack of effect of CsA administration suggest that this regulation is calcineurin-independent. The physiological relevance of the association between fast fiber phenotype and higher phosphorylation levels can be understood taking into account that repetitive stimulation induces at the same time decrease of force development through the fatigue mechanism and increase of force development through phosphorylation. Thus, the presence of a more effective phosphorylation mechanism in fast fibers which are more prone to fatigue might represent a useful mechanism to counteract the quick reduction of force which, in fast fibers, follows contractile activity.

Acknowldgements: This work was partially supported by EU grant HPRN-CT-2000-0091 to CB, Italian Ministry of University through PRIN (Research Project of National Interest) grant 2002, CNES (Centre National d'Etudes Spatiales, grant 3194), Conseil Regional du Nord Pasde-Calais.

REFERENCES

1. Arrell DK, Neverova I, Fraser H, Marban E, and Van Eyk JE. Proteomic analysis of pharmacologically preconditioned cardiomyocytes reveals novel phosphorylation of myosin light chain 1. *Circ Res* 89: 480-487, 2001.

2. Bigard X, Sanchez H, Zoll J, Mateo P, Rousseau V, Veksler V, and Ventura-Clapier R. Calcineurin Co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *J Biol Chem* 275: 19653-19660, 2000.

3. **Blumenthal DK and Stull JT.** Activation of skeletal muscle myosin light chain kinase by calcium(2+) and calmodulin. *Biochemistry* 19: 5608-5614, 1980.

4. Bozzo C, Stevens L, Toniolo L, Mounier Y, and Reggiani C. Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C575-583, 2003.

5. Buller AJ, Eccles JC, and Eccles RM. Interactions between motoneurones and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J Physiol* 150: 417-439, 1960.

6. Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, and Williams RS. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 12: 2499-2509, 1998.

7. **Crabtree GR and Olson EN.** NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl: S67-79, 2002.

8. **Damer CK, Partridge J, Pearson WR, and Haystead TA.** Rapid identification of protein phosphatase 1-binding proteins by mixed peptide sequencing and data base searching. Characterization of a novel holoenzymic form of protein phosphatase 1. *J Biol Chem* 273: 24396-24405, 1998.

9. Fujioka M, Takahashi N, Odai H, Araki S, Ichikawa K, Feng J, Nakamura M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T, and Ito M. A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* 49: 59-68, 1998.

10. Germinario E, Esposito A, Megighian A, Midrio M, Biral D, Betto R, and Danieli-Betto D. Early changes of type 2B fibers after denervation of rat EDL skeletal muscle. *J Appl Physiol* 92: 2045-2052, 2002.

11. **Giger JM, Haddad F, Qin AX, and Baldwin KM.**Effect of cyclosporin A treatment on the in vivo regulation of type I MHC gene expression. *J Appl Physiol* 97: 475-483, 2004.

12. Gonzalez B, Negredo P, Hernando R, and Manso R. Protein variants of skeletal muscle regulatory myosin light chain isoforms: prevalence in mammals, generation and transitions during muscle remodelling. *Pflugers Arch* 443: 377-386, 2002.

13. Haddad F, Herrick RE, Adams GR, and Baldwin KM. Myosin heavy chain expression in rodent skeletal muscle: effects of exposure to zero gravity. *J Appl Physiol* 75: 2471-2477, 1993.

14. **Huey KA and Bodine SC.** Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. *Eur J Biochem* 256: 45-50, 1998.

15. **Ikebe M and Hartshorne DJ.** Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 260: 10027-10031, 1985.

16. Jakubiec-Puka A, Ciechomska I, Morga J, and Matusiak A. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comp Biochem Physol B Biochem Mol Biol* 122: 355-362, 1999.

17. Klug GA, Biedermann M, Houston ME, Stuart D, Mumby M, and Stull JT. Chronic low frequency stimulation reduces myosin phosphorylation in rabbit fast twitch muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 70: 859-865, 1992.

18. Klug GA, Botterman BR, and Stull JT. The effect of low frequency stimulation on myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *J Biol Chem* 257: 4688-4690, 1982.

19. Larsson L and Ramamurthy B. Aging-related changes in skeletal muscle. Mechanisms and interventions. *Drugs Aging* 17: 303-316, 2000.

20. Larsson L, Yu F, Hook P, Ramamurthy B, Marx JO, and Pircher P. Effects of aging on regulation of muscle contraction at the motor unit, muscle cell, and molecular levels. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 11 Suppl: S28-43, 2001.

21. **Megighian A, Germinario E, Rossini K, Midrio M, and Danieli-Betto D.** Nerve control of type 2A MHC isoform expression in regenerating slow skeletal muscle. *Muscle Nerve* 24: 47-53, 2001.

22. Meissner JD, Gros G, Scheibe RJ, Scholz M, and Kubis HP. Calcineurin regulates slow myosin, but not fast myosin or metabolic enzymes, during fast-to-slow transformation in rabbit skeletal muscle cell culture. *J Physiol* 533: 215-226, 2001.

23. Michel RN, Parry DJ, and Dunn SE. Regulation of myosin heavy chain expression in adult rat hindlimb muscles during short-term paralysis: comparison of denervation and tetrodotoxin-induced neural inactivation. *FEBS Lett* 391: 39-44, 1996.

24. Midrio M, Danieli-Betto D, Megighian A, Velussi C, Catani C, and Carraro U. Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscle of the rat, in the presence of an antifibrillatory drug. *Pflugers Arch* 420: 446-450, 1992.

25. Mitchell PO, Mills ST, and Pavlath GK. Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C984-992, 2002.

26. **Moore RL and Stull JT.** Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscles in situ. *Am J Physiol* 247: C462-471, 1984.

27. **Moorhead G, Johnson D, Morrice N, and Cohen P.** The major myosin phosphatase in skeletal muscle is a complex between the beta-isoform of protein phosphatase 1 and the MYPT2 gene product. *FEBS Lett* 438: 141-144, 1998.

28. **Persechini A, Stull JT, and Cooke R.** The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 260: 7951-7954, 1985.

29. Rao A, Luo C, and Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707-747, 1997.

30. Schiaffino S, Gorza L, Pitton G, Saggin L, Ausoni S, Sartore S, and Lomo T. Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and paralyzed rat skeletal muscle. *Dev Biol* 127: 1-11, 1988.

31. Schiaffino S and Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76: 371-423, 1996.

32. Schiaffino S and Serrano A. Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol Sci* 23: 569-575, 2002.

33. **Spangenburg EE, Williams JH, Roy RR, and Talmadge RJ.** Skeletal muscle calcineurin: influence of phenotype adaptation and atrophy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1256-1260, 2001.

34. **Stephenson GM and Stephenson DG.** Endogenous MLC2 phosporylation and Ca(2+)-activated force in mechanically skinned skeletal muscle fibres of the rat. *Pflugers Arch* 424: 30-38, 1993.

35. Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, Bastide B, Mounier Y, and Pette D. Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1558-1563, 2000.

36. Stevenson EJ, Giresi PG, Koncarevic A, and Kandarian SC. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *J Physiol* 551: 33-48, 2003.

37. **Toursel T, Bastide B, Stevens L, Rieger F, and Mounier Y.** Alterations in contractile properties and expression of myofibrillar proteins in wobbler mouse muscles. *Exp Neurol* 162: 311-320, 2000.

38. White MY, Cordwell SJ, McCarron HC, Tchen AS, Hambly BD, and Jeremy RW. Modifications of myosin-regulatory light chain correlate with function of stunned myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 35: 833-840, 2003.

39. Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, and Mann M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379: 466-469, 1996.

Table 1: Body Mass, Muscle Mass and Muscle Mass / Body Mass ratio (MM/BM) of Soleus and EDL muscles in each experimental group (control rats, CONT; controlateral leg, CODE, and denervated leg, DE, of denervated rats; rats receiving daily injections of cremophor, COCsA; rats treated with CsA, CsA). Mean and standard deviation. * : significantly different (P<0.05) from CONT; #: significantly different (P<0.05) from the respective control group, \$: CsA significantly different (P<0.05) from DE.

	Body Mass (g)	Muscle Mass (mg) Soleus	MM/BM Soleus	Muscle Mass (mg) EDL	MM/BM EDL
CONT	307 ±4 (n=5)	123 ±15 (n=10)	0.40 ±0.04 (n=10)	144 ±23 (n=10)	0.47 ±0.07 (n=10)
CODE	303 ±13	151 ±21 (n=4)	0.50 ±0.05 (n=4)*	146 ±11 (n=4)	0.48 ±0.02 (n=4)
DE	(n=4)	82 ±5 (n=4)	0.27 ±0.01 (n=4)*#	82 ±10 (n=4)	0.27 ±0.02 (n=4)*#
COCsA	309 ±2 (n=4)	127 ±14 (n=8)	0.41 ±0.05 (n=8)	146 ±26 (n=8)	0.47 ±0.09 (n=8)
CsA	277 ±22 (n=4)*#	119 ±24 (n=8)	0.43 ±0.08 (n=8)	98 ±5 (n=8)	0.36 ±0.02 (n=8)*#

Table 2. Distribution of slow and fast MHC and MLC isoforms of control (CONT), control of the denervation (CODE), denervated (DE), control of ciclosporin A (COCsA), ciclosporin A (CsA) rat Soleus and EDL muscles, determined by one-dimensional gel electrophoresis. Each MHC isoform is expressed as percent of total amount of MHC. Each alkali (MLC1 and/or 3) or regulatory (MLC2) isoform is expressed as percent of the total amount of alkali or regulatory MLC. Mean and standard deviation. * : significantly different (P<0.05) from CONT; #: significantly different (P<0.05) from the respective control group, \$: CsA significantly different (P<0.05) from DE.

		SOLEU	IS (n=5)				EDL (n=5)					
		CONT	CODE	DE	COCsA	CsA	CONT	CODE	DE	COCsA	CsA	
		84.67	84.54	75.55	85.11	73.65	4.84	2.22	3.17	1.71	2.69	
	MHCI	±3.01	±3.83	±3.29*#	±6.18	±1.42	±4.70	±3.01	±2.79	±3.41	±2.78	
						8						
		15.33	15.46	19.90	14.89	20.24	1.20	2.00	7.78	3.01	9.71	
	MHCIIa	±3.01	±3.83	±3.00	±6.18	±4.81	±2.39	±0.39	±1.01	±1.39	±2.02*#	
MHC	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·											
	MUCILA	0 ±0	0 ±0	4.56	0 ±0	0 ± 0 S	38.25	38.94	35.66	39.29	45.75	
	Minchu/x		<u> </u>	±0.80*#			±5.42	±4.34	±3.01	±2.11	±2.31	
	мнспь	0 ±0	0 ±0	0 ±0	0 ±0	4.68	55.71	56.84	53.38	55.99	41.85	
						±1.01	±5.30	±5.78	±3.11	±3.04	<u>±</u> 2.87*#	
						#\$					S -	
		89.25	91.20	74.48	90.85	89.06	8.79	5.57	5.40	6.81	7.16	
	MLC1 slow	±2.86	±7.97	±2.53 #	±5.80	±5.11	±6.97	±6.47	±6.33	±5.25	±6.18	
Alkali				\$							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
light chain	MIC1 fost	10.75	8.80	25.52	9.15	10.94	91.21	94.4	94.6	93.19	92.84	
	\pm MLC1 last	±2.86	±7.97	±2.53*#	±5.80	±5.11	±6.97	±6.47	±6.33	±5.25	±6.18	
	TIMLCJ			S								
	MI C2 slow	87.65	88.57	72.39	86.35	83.49	11.30	8.30	8.3	9.16	8.08	
Regulatory	WILLUZ SIUW	±2.96	±6.64	±2.76*#	±5.40	±9.95	±4.97	±6.50	±8.02	±7.73	±4.14	
Regulatory light chain	MI C2 fast	12.35	11.43	27.61	13.65	16.51	88.70	91.70	91.7	90.84	91.92	
•	MLC2 fast	±2.96	±6.64	±2.76*#	±5.40	±9.95	±4.97	±6.50	±8.02	±7.73	±4.14	

Spot (see Figure 2)	Protein name	Swiss-Prot accession code	Matched peptides by PMF ^{a)}	Peptides sequenced by MS/MS ^{a)}	Sequence coverage	Theor. pI;Mr ^{b)}
Actin	Actin, skeletal muscle	P02568	15	2	46%	5.3 / 42.4
MLC1s	MLC1s b, ventricular isoform	P16409	9	2	50%	5.0 / 22.1
MLC1f	MLC1f,skeletal muscle isoform	P02600	5	2	30%	5.0 / 20.6
MLC1s1	MLC1s1 b, ventricular isoform	P16409	9	1	50%	5.0 / 22.1
MLC2s	MLC2 (MLC2v), myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	P08733	9	2	43%	4.9 / 18.7
MLC2f	MLC2, myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	P04466	5	3	32%	4.8 / 18.9
MLC2s1	MLC2 (MLC2v), myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	P08733	5		26%	4.9 / 18.7
MLC2f1	Myosin regulatory light chain 2 MLC2	P04466	10 (12) ^{c)}		54.0	4.8 / 18.9

Table 3. Identification of rat muscle proteins by mass spectrometry and database searching.

Proteins were identified by ESI MS/MS and/or by ESI MALDI-TOF.

a) Peptide mass fingerprint (PMF); ESI-quadrupole-TOF analysis (MS/MS)
b) Calculated for the corresponding SWISS-PROT entry.
c) Identified on basis of mass determination with a score of 1.105x10⁻⁶ on Swiss Prot data base

TABLE 4: Relative distribution of the variants of the slow and fast isoforms of MLC1 and MLC2 in Soleus and EDL muscles, separated with 2D gel electrophoresis: control untreated rats (CONT), controlateral leg of denervated rats (CODE), denervated rats (DE), rats serving as controls for CsA treatment (COCsA), CsA treated rats (CsA). The variants of slow MLC1 are indicated as "s" and "s1", whereas the variants of fast MLC1 are indicated as "f" ad "f1". The variants of slow MLC2 are indicated as "s", "s1" and "s2", whereas the variants of fast MLC2 are indicated as "f" and "f1". Each variant of slow MLC1 is expressed as percent of total slow MLC1 and each variant of fast MLC1 as percent of total fast MLC1. The same expression is used for the variants of slow MLC2 and fast MLC2. Mean and standard deviation. * : significantly different (P<0.05) from CONT; #: significantly different (P<0.05) from the respective control group, **£**: COCsA significantly different (P<0.05) from the respective control group, **£**: COCsA significantly different (P<0.05) from CONT; #: significantly different (P<0.05).

		SOLEU	S				EDL						
		CONT	CODE	DE	COCsA	CsA	CONT	CODE	DE	COCsA	CsA		
		(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)		
	5	79,63±	78,68±	79,89±	81,13±	80,04±	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0		
	3	1,41	3,32	1,95	4,56	2,48							
	a 1	20,37±	21,32±	20,11±	18,87±	19,96±	0 ± 0	0±0	0 ± 0	0 ± 0	0±0		
MICI	51	1,41	3,32	1,95	4,56	2,48							
MLCI	£	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	81,43±	79,77±	80,16±	78,56±	79,76±		
	I						0,76	3,34	4,91	3,75	4,11		
	£1	0 ± 0	0 ± 0	0±0	0±0	0 ± 0	18,57±	$20,23\pm$	19,84±	21,44±	20,24±		
	11						0,76	3,34	4,91	3,75	4,11		
	0	74,09	74,01	66,09	76,23	77,27	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ±0	0 ±0		
	8	±7,39	±3,16	±6,41	±8,19	±4,40							
	a 1	25,91	25,99	27,76	23,77	22,73	66,84±	69,91±	77,73±	67,83±	71,75±		
	81	±7,39	±3,16	±4,34	±8,19	±4,40	1,58	3,89	3,66*#	3,11	3,49		
		0 ±0	0 ± 0	6,15	0 ± 0	0 ± 0 \$	33,16±	30,09±	22,27±	32,17±	28,25±		
MIC2	s2			±2,93*			1,58	3,89	3,66*#	3,11	3,49		
MILC2				#									
		100 ±0	100 ± 0	79,85	100 ± 0	100 ± 0	74,25±	76,17±	74,72±	74,35±	74,00±		
	f			$\pm 8,06$			0,77	4,95	3,62	7,77	7,26		
				*#\$									
	f1	0 ± 0	0 ±0	20,15±	0 ± 0	0 ±0\$	25,65±	23,83±	25,28±	25,65±	26,00±		
	11			8,06 *#			0,77	4,95	3,62	7,77	7,26		

Figure 1 : MHC and MLC expression in soleus (left side of the figure) and EDL (right side of the figure) in control untreated rats (CONT), in the controlateral leg (CODE) and in the denervated leg (DE) of rats with surgical section of sciatic nerve, in rats receiving daily i.p. injection of 10% cremophor A solution (COCsA) and receiving 10mg/day/kg ciclosporin A diluted in a 10% cremophor A solution (CSA) by an i.p. injection. Separation of MHC isoforms was obtained with SDS-PAGE with 8% gels, whereas separation of actin and MLC isoforms was obtained with SDS-PAGE on 12% gels, as described in the Methods.

Figure 2: Myosin light chain region in 2D-gels from soleus (left column) and EDL (right column) of control rats (CONT), controlateral leg (CODE) and denervated leg (DE) of denervated rats, rats receiving daily cremophor injections (CoCsA) and rats receiving daily injections of CsA (CsA). The pH gradient goes from basic on the left to acidic on the right. Note the different pattern of MLC1 spots and MLC2 spots in control soleus and EDL. The changes in pattern of MLC2 variants in DE muscles are detectable both in soleus (from 3 spot pattern to a 5 spot pattern) and in EDL (decrease of the acidic variants). 2s2 and 2f1 spots in DE soleus are encircled.

Figure 3 : Myosin Light Chain Kinase (MLCK) and phosphatase regulatory subunit (PP1) in soleus and EDL muscles of control untreated rats (CONT), controlateral leg (CODE) and denervated leg (DE) of rats with surgical section of sciatic nerve, rats receiving daily i.p. injection of 10% cremophor A solution (COCsA) and rats receiving 10mg/day/kg ciclosporin A diluted in a 10% cremophor A solution (CSA) by an i.p. injection. A: representative immunoblotting, **B** : means and standard deviations of the ratios of MLCK and PP1signals to actin signal. N=5. * : significantly different from CONT. **Figure 1 :** MHC and MLC expression in soleus (left side of the figure) and EDL (right side of the figure) in control untreated rats (CONT), in the controlateral leg (CODE) and in the denervated leg (DE) of rats with surgical section of sciatic nerve, in rats receiving daily i.p. injection of 10% cremophor A solution (COCsA) and receiving 10mg/day/kg ciclosporin A diluted in a 10% cremophor A solution (CSA) by an i.p. injection. Separation of MHC isoforms was obtained with SDS-PAGE with 8% gels, whereas separation of actin and MLC isoforms was obtained with SDS-PAGE on 12% gels, as described in the Methods.



Figure 3: Myosin Light Chain Kinase (MLCK) and phosphatase regulatory subunit (PP1) in soleus and EDL muscles of control untreated rats (CONT), controlateral leg (CODE) and denervated leg (DE) of rats with surgical section of sciatic nerve, rats receiving daily i.p. injection of 10% cremophor A solution (COCsA) and rats receiving 10mg/day/kg ciclosporin A diluted in a 10% cremophor A solution (CSA) by an i.p. injection. A: representative immunoblotting, B : means and standard deviations of the ratios of MLCK and PP1signals to actin signal. N=5. * : significantly different from CONT.



3. Conclusions

L'ensemble des travaux de ce chapitre a permis de suggérer que l'augmentation de la phosphorylation de la MLC2 est directement reliée à une transition phénotypique. En effet, notre troisième modèle d'atteinte de l'activité neuromusculaire, la dénervation, montre bien, d'une part, que dans le soleus, la transition lent—rapide est accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation (cf. les modèles HH et clenbutérol), et d'autre part, qu'une transition inverse rapide—lent, dans le cas de l'EDL dénervé, est associée à une diminution de la phosphorylation.

L'importance de la commande nerveuse dans la détermination de l'état de phosphorylation de la MLC2 semble confirmée. En occasionnant une transformation phénotypique d'un muscle lent par modification du message nerveux, il est possible de faire varier l'état de phosphorylation (dénervation), alors qu'un modèle (injection de CsA) inhibant non pas directement la commande nerveuse mais une molécule médiateur du message nerveux (la CaN) ne modifie pas le niveau de phosphorylation de la MLC2.

Nous supposons donc que le message nerveux est de haute importance dans la régulation de la phosphorylation de la MLC2, mais par l'intermédiaire d'un changement phénotypique qui n'est pas exclusivement CaN/NFAT-dépendant.
II. ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 DANS LE CAS D'UNE AUGMENTATION DE

L'ACTIVITE NEUROMUSCULAIRE

Afin de confirmer l'hypothèse d'une corrélation entre la phosphorylation de la MLC2 et des transformations phénotypiques, énoncée au chapitre I, nous avons :

- utilisé un autre modèle sur le soleus permettant cette fois une transformation lent→plus lent, dans des conditions d'hypergravité (HG)
- choisi un autre modèle permettant des transitions rapide→lent plus marquées pour l'EDL, l'électrostimulation.

A. VARIATIONS DE PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 APRES HYPERGRAVITE

1. Introduction

Le modèle d'HG nous a permis d'obtenir une comparaison directe par rapport à l'HH, situation reproduisant la microgravité. Notre hypothèse de départ était que le soleus se transforme en muscle plus lent après HG. Cependant, ce muscle exprimant naturellement peu d'isoformes rapides des protéines musculaires, nous avons utilisé des rats conçus, nés et élevés pendant 100 jours en HG (rats CBR : Conceived Born and Reared), pour tenter d'amplifier les transformations du soleus. Les résultats sur le phénotype musculaire et les états de phosphorylation de la MLC2 sont détaillés dans la publication citée en

he Journal of Experimental Biology 207, 2793-2802 ublished by The Company of Biologists 2004 bi:10.1242/jeb.01076

Hypergravity from conception to adult stage: effects on contractile properties and skeletal muscle phenotype

Cyril Bozzo^{1,*}, Laurence Stevens¹, Valentine Bouet², Valérie Montel¹, Florence Picquet¹, Maurice Falempin¹, Michel Lacour² and Yvonne Mounier¹

¹Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, UPRES EA 1032, IFR 118, Bâtiment SN4, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France and ²Laboratoire de Neurobiologie des Restaurations Fonctionnelles, CNRS Unité Mixte de Recherche 6562, Université de Provence, 52, Faculté de St Jérôme, 13397 Marseille cedex 20, France

*Author for correspondence (e-mail: cyelboz@hotmail.com)

Accepted 7 May 2004

Summary

This study examined the effects of an elevation of the gravity factor (hypergravity -2g) on the molecular and unctional characteristics of rat soleus and plantaris nuscles. Long Evans rats were conceived, born and eared (CBR) continuously in hypergravity conditions until the age of 100 days. Whole muscle morphological earameters, Ca²⁺ activation characteristics from single kinned fibers, troponin (Tn) subunit and myosin heavy MHC) and light (MLC) chains isoform compositions were xamined in CBR and control muscles from age-paired errestrial rats. Decreases in body and muscle mass in oleus and plantaris muscles were observed and associated, in the soleus, with a decrease in fiber diameter. The specific force of CBR soleus fibers was increased, and orrelated with the elevation of Ca²⁺ affinity. This was

Introduction

It is now clear that nervous discharge patterns govern the equisition of muscle definitive phenotype and that modified ravitational forces affect muscle development (Vrbova and Wareham, 1972; Butler-Brown and Whalen, 1984; Lomo, 989; Picquet et al., 1998). To date, changes in gravitational nvironment have been studied extensively in real or simulated nicrogravity conditions (for a review, see Thomason and 300th, 1990). Under these conditions, slow extensor muscles resented an atrophy, a decrease in generated forces and a general slow-to-fast phenotype transformation (Gardetto et al., 989; Musacchia et al., 1990; Stevens et al., 1993; Fauteck and Kandarian, 1995). The changes were particularly marked on he myosin heavy chains (MHC) and light chains (MLC) Stevens et al., 1999a,b, 2000) as well as on the T, C and I ubunits of troponin (Kischel et al., 2001; Bastide et al., 2002; Stevens et al., 2002). Moreover, these modifications were associated with a decrease in Ca²⁺ affinity of the contractile ystem.

Less is known about the adaptation of the muscular system

accompanied by slow-to-slower TnC and TnI isoform transitions and a rearrangement in TnT fast isoform content. The MHC transformations of the soleus after hypergravity were associated with the up (down)regulation of the MHCI (MHCIIa) mRNA isoforms. The MLC2 phosphorylation state remained unchanged in the soleus muscle. The results suggested that the gravity factor could interact with rat muscle development and that hypergravity experiments could provide good tools for the study of myofibrillar protein plasticity and their associated pathways of regulation.

Key words: 2G-centrifugation, skinned fiber, rat, soleus, plantaris, contractile and regulatory protein, electrophoresis, RT-PCR.

under hypergravity (HG) conditions, particularly in terms of contractile protein isoform transitions, and/or Ca^{2+} activation properties. Most studies have examined rats born in normal gravity and placed as adults into an HG environment (Amtmann and Dyama, 1976; Roy et al., 1996; Chi et al., 1998; Stevens et al., 2003). For instance, adult rats exposed for 14 days (Roy et al., 1996) or 19 days in HG (Stevens et al., 2003) led to partial slow-to-fast transformation of the slow soleus phenotype without alteration of the developed forces. The phenotype transformation was characterized by an increase in fast isoform contents of TnC and TnI in relation to a higher cooperativity along the thin filament (steeper Tension/pCa relationship), whereas fast muscle was not (plantaris) or less (gastrocnemius) modified.

Few experiments have reported the effects of hypergravity on rats reared in HG. Martin (1980) has shown an elevation in slow oxidative fibers in soleus and plantaris muscles of 30-day old rats centrifuged at 2g for 2 weeks. In the rectus capitis muscle (responsible for head posture) of rats conceived, born

2794 C. Bozzo and others

and reared until the seventh postnatal day at 1.8 g centrifugation, Martrette et al. (1998) showed an increase in slow and perinatal MHC isoform expressions. In a recent study on rats reared in HG (Picquet et al., 2002), we showed that the slow soleus muscle studied *in situ* presented an increase in maximal and twitch tensions and was changed into a slower type, for both contractile parameters and MHC isoform content, while the fast plantaris was less affected.

Therefore the results obtained under lifelong conditions of hypergravity, when compared to both microgravity and hypergravity applied to adults, appeared opposite in terms of generated forces and MHC isoform transitions. This led us to characterize the effects of HG on Long Evans rats conceived, born and reared in hypergravity (2 g) conditions, in order to understand how a complete life in HG could affect the generated force in relation to the muscle protein transformations. Two muscles were studied: the soleus muscle (a predominantly slow ankle extensor) and its fast agonist, the plantaris.

For this purpose, the different objectives of this work were: (1) analysis, at the cellular level, of the Ca^{2+} activation characteristics in relation to the forces developed by single fibers, in order to complete the study of Picquet et al. (2002), who showed, at the whole muscle level, a reduction of the absolute twitch and maximal tetanic forces, as well as a decrease in fiber cross sectional area after HG. (2) To study more deeply phenotype acquisition in muscles continuously exposed to 2g. The analysis in Picquet et al. (2002) was limited to the MHC, so to obtain a more complete understanding of the isoform transitions occurring after HG, we studied the three subunits of the troponin molecule (TnC, TnT and TnI, contributing to the regulation of Ca²⁺ activation properties) and the set of MLC, especially the regulatory MLC2, known to modulate the Ca²⁺ sensitivity of the contractile proteins by its phosphorylation state (Sweeney and Stull, 1996). Slow-to-slower MHC changes in contractile properties have already been described in CBR soleus muscle in situ (Picquet et al., 2002), so a study of MLC2 phosphorylation could contribute to our knowledge of the regulation of this phenotypical modification. Indeed, we have recently reported an increase of MLC2 phosphorylation associated with slow-to-fast transitions induced by hindlimb unloading in rat soleus muscle (Bozzo et al., 2003). Thus, we hypothesize that the slow-to-slower characteristics acquired after HG were associated with a decrease in MLC2 phosphorylation. (3) To estimate by reverse transcriptionpolymerase chain reaction (RT-PCR) analyses, the gene regulation of the MHC slow-to-slower transition observed previously (Picquet et al., 2002).

Materials and methods Biological material

Experiments were performed on male Long Evans rats Rattus norvegicus Janvier aged 100 days divided into two groups: control rats (CONT, N=14) and rats subjected to

hypergravity – chronic centrifugation (N=15) as previously described (Gustave Dit Duflos et al., 2000). Briefly, the latter rats were derived from couples placed in centrifugation apparatus, but only females remained until weaning. Male rats descending from different littermates were studied and named CBR because they were Conceived, Born and Reared until 100 days old in hypergravity. The CONT rats were reared under the same conditions as the CBR rats, i.e. the same room, same dark:light cycle (12 h:12 h), and the same temperature. CONT and CBR animals were anaesthetised by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (30 mg kg⁻¹) and weighed. For each group, soleus and plantaris muscles were dissected and weighed. After biopsy, the animals were killed with a lethal dose of pentobarbital sodium. One half of each muscle was skinned as previously described (Mounier et al., 1989) to study the contractile properties. The skinned muscles were stored at -20°C in a 50/50 glycerol/skinning solution (see below), containing protease inhibitor leupeptin (10 µg ml⁻¹), known to prevent loss of contractile proteins and to preserve the fiber tension (Reiser et al., 1988). The other half was frozen in liquid N₂ and stored at -80°C for electrophoretic study of protein composition.

The experiments and the maintenance conditions of the animals were approved by both the Agricultural and Forest Ministry and National Education Ministry (authorization 5900996).

Hypergravity conditions

Hypergravity was obtained in the same centrifugation apparatus as the one previously used by Picquet et al. (2002) and described by Gustave Dit Duflos et al. (2000). The centrifuge consisted of a velocity-controlled DC motor located in the vertical axis of the apparatus and driving two horizontal cross-arms (length 165 cm) at constant rotation speed. Four free-swinging gondolas were jointed at the four extremities of the horizontal arms, 76.5 cm away from the axis of rotation; the gondolas were equipped with lights that reproduced a 12 h:12 h light:dark cycle, and standard home cages for rats. One gondola carried a video system used to observe animal birth and behavior. During centrifugation, the gondolas were tilted at a constant angle of 60° depending on the centripetal acceleration for 2g hypergravity environment. Counterclockwise rotations were achieved at constant velocities of 3.81 rad s^{-1} . Given the mass and the inertia of the gondolas, including the home cages and the rats, these angular velocities led to a 2g resultant force whose direction was always similar to that exerted in normal gravity (directed dorso-ventrally, orthogonal to the antero-posterior axis of the animal).

Solutions

All reagents were provided by Sigma (St Louis, USA). The composition of all the solutions was calculated as previously described (Mounier et al., 1989). Final ionic strength was 200 mmol l^{-1} . Activating solutions contained MOPS, 10 mmol l^{-1} , potassium propionate (KProp, 185 mmol l^{-1}),

magnesium acetate (MgAc, 2.5 mmol l^{-1}) and various concentrations of free Ca²⁺ from CaCO₃, buffered with EGTA and added in proportions to obtain different pCa values (6.8–4.2, where pCa=–log[Ca²⁺]). The pSr (pSr=–log[Sr²⁺]) solutions were similar to the pCa solutions but with free Sr²⁺ from SrCl₂. Relaxing solution (R) was identical to the skinning solution and composed of 10 mmol l⁻¹ MOPS, 170 mmol l⁻¹ KProp, 2.5 mmol l⁻¹ MgAc and 5 mmol l⁻¹ EGTA. pH was adjusted to 7.0 and ATP at 2.5 mmol l⁻¹ was added to each solution. Before applications of the Ca²⁺ or Sr²⁺ solutions, each fiber was bathed for 15 min in 2% Brij 58 (polyoxyethylene 20 cetyl ether) under constant stirring. The non-ionic Brij 58 detergent irreversibly eliminated the ability of the SR of skinned muscles to sequester and release Ca²⁺, without altering the actomyosin system.

Force measurement and recording

The experiments were carried out in a thermostatically controlled room $(19\pm1^{\circ}C)$. Fibers were mounted in an experimental chamber and connected to a strain-gauge (Ford 10, World Precision Instruments, Aston, UK). A micrometer allowed fiber diameter measurements. The resting sarcomere ength (*SL*) was determined by diffraction using a Helium/Neon laser (Spectra Physics, Carlsbad, USA). For soleus as well as for plantaris muscle fibers, the *SL* was set to 2.6 μ m (120% of resting *SL*) to allow optimal isometric tension development upon ionic activation.

Single fibers were first immersed in a pCa 4.2 solution to measure the initial force. Next, they were checked for their strontium reactivity by successive exposures to pSr solutions: submaximal steady state tensions obtained in pSr 5.8, 5.4, 5.0, 4.6, were normalized to maximal Sr²⁺ activated tension (pSr 3.4), in order to deduce the half maximal activation (Sr^{2+} -affinity or pSr₅₀) by strontium from the linear part of the Tension-pSr T-pSr relationship). Fibers were then activated with various oCa (from 6.8 to 4.2 for all fibers). The steady state submaximal ensions P were expressed as a percentage of the maximal tension P_0 (induced by the saturating pCa 4.2 solution), and reported as Tension-pCa (T-pCa) relationships. Fiber type was determined, using the difference between Ca^{2+} and Sr^{2+} activation characteristics for fast and slow fibers, the fast muscle fibers being less sensitive to Sr²⁺ than slow fibers (Kerrick et al., 1980). Fiber type was therefore determined by establishing the Δ value or difference between the respective Ca²⁺ and Sr²⁺affinity criteria, pCa₅₀ and pSr₅₀ (Ca²⁺ and Sr²⁺ concentration needed to elicit 50% of P_0). Typically, the Δ value of slow fiber is <0.30 pCa units, and \geq 1.00 pCa units in fast fibers. Two other important parameters were deduced from the T-pCa relationships: the threshold for activation by Ca²⁺, reflecting the sensitivity of the contractile system, and the steepness of the T-pCa curve, corresponding to the cooperativity between the different regulatory proteins within the thin filament. Fast type fibers could also be distinguished from slow type ones by a higher Ca²⁺ threshold (lower pCa value) and a steeper T-pCa curve, pCa₅₀ not usually being significantly different (Stevens et al., 1993). The steepness of the T-pCa curve was determined by the Hill coefficient n_H, calculated according to the following

Soleus and plantaris conceived and born at 2 g 2795

equation: $P/P_0 = ([Ca^{2+}]/K)^{nH} \{ 1 + ([Ca^{2+}]/K)^{nH} \}$, where P/P_0 is the normalized tension and K is the apparent dissociation constant ($pK = -\log K = pCa_{50}$).

Mono-dimensional electrophoresis for troponin and MHC analyses

Muscles stored at -80° C were pulverized under liquid N₂. Half the powder was dissolved in a buffer consisting of Tris-HCl 125 mmol l⁻¹, pH 6.8, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol and 10% glycerol with 0.02% Bromophenol Blue. As previously described (Kischel et al., 2001), the different isoforms of the three troponin subunits were separated on a one-dimensional 10%-20% gradient gel and identified by immunoblotting (see next section).

As already described (Toursel et al., 2000), the MHC composition was determined by sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 4.5% stacking gel and on a 7.5% separating gel. Electrophoresis was for 20 h at 12°C (180 V constant, 13 mA/gel). After the gel run, the MHC gel slabs were silver stained. The relative proportions of MHC isoforms in each sample was determined by integrating densitometry software (GS-700 Imaging Densitometer, Biorad, Ivry s/Seine, France). At least two independent measurements were performed on each sample. They were always quite similar and the mean value is reported.

Immunoblotting

Electrotransfer was performed on a 0.2 µm nitrocellulose sheet (Advantec MFS, Pleasanton, CA, USA). The membranes were blocked with a phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.4) containing 5% non-fat dry milk and 0.2% sodium azide. All the membranes were incubated overnight with each primary antibody. As previously described (Stevens et al., 2002), a monoclonal antibody (5C5 from Sigma, specific to α sarcomeric actin) allowed actin signal recognition, serving as internal control. For TnT, the fast isoforms were identified with the JLT-12 monoclonal antibody from Sigma; the slow TnT isoforms were detected using a polyclonal antibody previously characterized and provided by Pette and collaborators (Härtner et al., 1989). For TnC, both slow and fast isoforms (50-50% recognition) were identified by another polyclonal antibody provided by Pette and collaborators (Härtner and Pette, 1990). For TnI, slow and fast isoforms were identified by two separate polyclonal antibodies also provided by Härtner and Pette (1990). Previous studies from our team (Stevens et al., 2003), however, have shown that each TnI antibody (slow or fast) recognized each TnI isoform (slow or fast), respectively, and with the same affinity. The primary antigen-antibody complexes were detected by extravidin peroxidase and biotinylated conjugate antibodies against mouse or guinea pig IgGs (Sigma). The signals were visualized by an enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham, Bucks, UK). Signal intensities were evaluated by integrating densitometry. At least two independent measurements were performed on each sample (averaged value reported).

.

2796 C. Bozzo and others

The bound antibodies could be removed by an incubation at 50°C for 40 min with occasional stirring in a stripping buffer (100 mmol l^{-1} 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mmol l^{-1} Tris-HCl, pH 6.7). The membrane was washed twice in PBS at room temperature and the success of the stripping was tested by incubating the membrane with the secondary antibodies corresponding to the previously tested antibodies and ECL detection. Immunodetection of the other proteins was then performed as described above. To ensure that there was no muscle protein loss during incubation of the nitrocellulose membrane in the stripping buffer, the membrane was reincubated at the end of the experiments with the first used antibody and the intensities of the signals compared. No significant difference between the signals was measured.

Two-dimensional electrophoresis for MLC analysis

The other half of the muscle powder was used to extract myofibrillar protein for MLC analysis by 2-D gel electrophoresis. Myofibrillar proteins were extracted from 7-10 mg of dry muscle powder as described previously (Toursel et al., 2000), washed first with a solution containing 6.3 mmol l⁻¹ EDTA (pH 7), pepstatin 0.1%, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 1%, and then with a second solution containing KCl 50 mmol l⁻¹, pepstatin 0.1%, PMSF 1%. The myofibrillar proteins were resuspended in 500 µl of milliQ-filtered water and their concentration determined by a protein assay kit (Dc Protein Assay, Bio-Rad) to prepare samples having a final quantity of $50 \,\mu g$. Then, the proteins were precipitated for 2 h with acetone (8 v/v), followed by centrifugation for 1 h at 13 000 g. The pellet was dissolved in Laemmli solution (Laemmli, 1970) for SDS-PAGE or in rehydration buffer for 2-D gel electrophoresis.

Proteins were separated by two-dimensional (2-D) gel electrophoresis using a procedure similar to those previously described by Morano et al. (1988), Gonzalez et al. (2002) and Bozzo et al. (2003). For the first dimension or isoelectric focusing (IEF), proteins were solubilized in 8 mol 1^{-1} urea, 2% Chaps, 0.01 mol 1^{-1} dithitreitol (DTT) and a 2% carrier ampholites (Amersham) buffer, and then separated using the Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (Amersham) on 3.5% acrylamide strips with immobilized pH gradients (47) (Amersham). Strips were rehydrated at 50 V for 12 h and proteins focused under the following voltage conditions: 500 V for 1 h, 500–1000 V for 1 h, 8000–100 000 V h^{-1} . Temperature was kept constant at 20°C. After reduction with 6 mol l⁻¹ urea, 30% glycerol, Tris-HCl 0.375 mol l⁻¹, pH 8.8, 2% DTT and alkylation using the same buffer with additional 2.5% iodoacetamide, the strips were embedded in 4% polyacrylamide stacking gel and the proteins separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel for 8 h at 150 V at low temperature (4°C). Following electrophoresis, gels were silver stained. The positions of slow and fast isoforms of MLC on 2-D gels were determined according to their isoelectric point in the first IEF dimension, and to markers of appropriate molecular mass in the second dimension (Bozzo et al., 2003). All two-dimensional gels were digitized with an Epson 1650 scanner at a resolution of 200 dpi. The spots were analyzed densitometrically determining BAP (Brightness Area Product) with a constant threshold after black/white inversion using Adobe Photoshop Software (Bozzo et al., 2003).

Statistical analysis

All the data are reported as means \pm S.E.M. The statistical significance of the difference between means was determined using the Student's *t*-test. Differences at or above 95% confidence level were considered significant (*P*<0.05).

Results

Body and muscle mass

The results are reported in Table 1. At the end of the 100 days in hypergravity conditions, the mean body mass (BM) of CBR rats was about 40% lower than that of CONT. Soleus and plantaris CBR muscles exhibited muscle wet mass (MWM) reductions of 42 and 46%, respectively, when compared to CONT. However, the MWM/BM ratio was not different between CONT and CBR in both soleus and plantaris muscles. Moreover, hypergravity induced, in soleus, a decrease of about 10% in diameter measured on isolated skinned fibers, while no change was found for plantaris fibers. Maximal tension (P_0) developed by isolated fibers and expressed per cross sectionat

	Body mass (BM) (g) ^a	Muscle	Muscle wet mass (MWM) (g) ^a	MWM/BM (mg/g) ^a	Fiber diameter (µm)	P_0 (kN m ⁻²)
CONT	370±15 (14)	SOL PL	198.71±19.97 (7) 430.86±18.31 (7)	0.54±0.03 (7) 1.15±0.05 (7)	84.72±2.78 (9) 76.67±3.21 (6)	65.80±7.34 (9) 151.89±25.93 (6)
CBR	219±22* (15)	SOL PL	114.76±13.98* (15) 231.75±47.50* (8)	0.53±0.07 (15) 1.04±0.14 (8)	77.27±1.95* (22) 72.35±2.23 (17)	99.92±10.71* (22) 119.48±13.77 (17)

Table	1.	Morp	holo	gical	and	force	parameters	after.	hypery	gravit	y
									~ ~ ~ ~		

Values are means \pm S.E.M. (N).

CONT, control rats; CBR, rats conceived, born and reared in hypergravity (2 g); P_0 , relative maximal tension, expressed per cross sectional area of skinned fibers from SOL (soleus muscle) and PL (plantaris muscle).

^aData transposed from Picquet et al. (2002).

*Significantly different from CONT.



Soleus and plantaris conceived and born at 2 g 2797

Bi			
SOL	pCa _{thr}	pCa ₅₀	n _H
CONT N=8)	6.65±0.12	5.61±0.09*	1.94±0.32*
CBR N=21)	6.42±0.07	5.75±0.02*	3.01±0.19*

Bii			
PL	pCa _{thr}	pCa ₅₀	nH
CONT (<i>N</i> =6)	6.02±0.05	5.60±0.06	4.20±0.34
CBR (N=13)	6.10±0.03	5.68±0.05	4.46±0.55

Fig. 1. Tension–pCa relationships of SOL (soleus) and PL (plantaris) fibers in control (CONT) rats and rats conceived, born and reared in hypergravity (CBR). (A) CONT and CBR T–pCa curves of slow SOL fibers (Ai) and fast PL fibers (Aii). (Bi,ii) Parametric values derived from Γ –pCa curves of the fibers analyzed in A. pCa_{thr}, threshold for Ca²⁺ activation; pCa₅₀, pCa at which tension is half maximum; $n_{\rm H}$, Hill coefficient. Values are means ± S.E.M. Curves were fitted according to the Hill equation. *Significantly different from CONT (P<0.05).

area (kN m⁻²) was significantly increased (by a factor 1.5) for CBR soleus and not modified for CBR plantaris muscles.

Ca²⁺ activation properties of isolated skinned fibers

The T-pCa curves and their derived parameters are illustrated for soleus and plantaris in Fig. 1. We chose to test only slow fibers in both CONT and CBR soleus muscles (Fig. 1Ai,Bi). Slow fibers of CBR rat soleus exhibited a mean T-pCa curve shifted to lower calcium concentrations when compared to CONT. The Ca²⁺ affinity parameter (pCa₅₀) was increased by 0.14 pCa units and the steepness ($n_{\rm H}$ value) of the curve was elevated by 55% in CBR fibers. The calcium sensitivity (pCa threshold) was not affected. Ca²⁺ activation properties of fast plantaris fibers were not altered after hypergravity conditions (Fig. 1Aii,Bii, bottom). All characteristics of CBR fibers from plantaris presented values identical to those of CONT ones.

Protein expression of troponin isoforms

The expression patterns of the different isoforms of the three subunits of troponin are illustrated in Fig. 2A and their relative expression reported in Fig. 2B. All the troponin subunit identifications were performed using specific antibodies against slow and fast Tn isoforms (see Materials and methods). As described in Fig. 2A,B (top), TnT protein is composed, in control soleus from Long Evans rats, of four fast isoforms:

 Table 2. Distribution of total slow and fast myosin light chain (MLC) isoforms and relative repartition of MLC2 isoforms in

 CONT and CBR soleus muscles

			9	6 Distribution		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		· · · ·	· · · · · ·	
		MLC1		MLC2		MLC3	MCL2 i	MCL2 isoforms (% repartition)		
		Slow	Fast	Slow	Fast	Fast	MLC2s	MLC2s1	MLC2f	
	CONT	84±6	16±6	92±4	8±4	100±0	79±2	21±2	100±0	
	CBR	96±3*	4±3*	95±3	5±3	100±0	80±1	20±1	100±0	
	0211	. , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,				10020	00_1	2021		

CONT, control rats; CBR, rats conceived, born and reared in hypergravity (2 g). Slow or fast MLC1, MLC2 and MLC3 isoforms expressed as % of the total (slow+fast) MLC1, MLC2 or MLC3 isoforms. Each MLC2 isoform (s, s1 and f) expressed as % of the total MLC2 isoforms. *Significantly different from CONT.

2798 C. Bozzo and others

InT1f, 2f, 3f and 4f and three slow isoforms: TnT1s, 2s and 3s. In CBR rats, the relative distribution of fast isoforms was modified with an upregulation of TnT3f (20% increase) and a downregulation of TnT1f (50% decrease) when compared to CONT soleus. However, no change was observed for TnTs isoforms. In CBR soleus muscles (Fig. 2A,B), the relative percentages of slow (fast) TnI isoforms were increased (decreased) by ~20%. The same effects (amount and direction) were observed for TnC isoforms.

No variation in Tn (T, I and C) isoform expression in the plantaris was seen in hypergravity conditions.

Protein expression of MLC isoforms and MLC2 phosphorylation

Since no difference was found for the three Tn subunits in plantaris, the effects of hypergravity on MLC expression and MLC2 phosphorylation were tested only in soleus muscles. The CONT soleus expressed predominantly the slow isoforms of MLC, slow MLC1 (84%) and slow MLC2 (92%), when compared to their respective fast counterparts, fast MLC1 (16%) and fast MLC2 (8%) (Table 2). The MLC3 was detected in the 2-D gels but at very low levels. In CBR soleus, the transitions could be seen only for MLC1 isoform distribution



SOL CONT SOL CBR PL CONT PL CBR

Fig. 2. Expression of troponin (Tn) protein isoforms. (A) ECL profiles of soleus (SOL) and plantaris (PL) in control (CONT) rats and rats conceived, born and reared in hypergravity (CBR), obtained by immunoblotting after SDS-PAGE in a 10%-20% gel. (B) Relative amounts of Tn (T, I, C) isoforms electrophoretically separated. For TnT subunit, each slow or fast isoform was expressed as a percentage within the total amount of slow (TnTs) or fast (TnTf) isoforms, respectively. For TnI and TnC subunits, each slow (or fast) isoform was expressed in % of the total amount of (slow + fast) isoforms. *Significantly different from CONT (P<0.05).

181



CONT

and were characterized by a 12% increase in slow MLC1 soform, with a concomitant decrease in fast MLC1, which remained slightly persistent (4%). No change was observed in MLC2 or MLC3 expression.

Analysis of MLC2 phosphorylation after hypergravity is also shown in Table 2 and in Fig. 3, which illustrates a 2-D gel and indicates the position of the different MLC2 spots (s, s1 and f). As described previously (Bozzo et al., 2003), the positions of slow and fast MLC2 isoforms were confirmed by immunoblotting (data not shown). In the CONT soleus, slow MLC2 was the predominant regulatory

.Fig. 3. Spots of MLC2 isoforms as they appeared in 2-D gel electrophoresis of soleus muscles from control rats (CONT) and rats conceived, born and reared in hypergravity (CBR). s, s1 and f, see text for explanation.

light chain and appeared, in fact, to be separated into two spots: MLC2s (as described above) and another spot with a more acidic isoelectric point, MLC2s1. MLC2s and MLC2s1 have previously been identified by alkaline phosphatase experiments (Bozzo et al., 2003) as unphosphorylated and phosphorylated spots, respectively. Hypergravity conditions did not modify the extent of phosphorylation of the MLC2s1 isoform in soleus muscles since there was no change in MLC2 spot unphosphorylated/ phosphorylated distribution in CBR soleus compared to control muscles (Fig. 3). For the fast MLC2 isoforms, both



Fig. 4. Expression patterns of MHC protein and mRNA isoforms (A) SDS-PAGE (7.5%) of MHC isoforms of soleus (SOL) and plantaris (PL) from CONT and CBR rats. (B) Relative amounts of MHC protein isoforms in SOL and PL muscles from CONT and CBR rats. Each isoform was expressed as a percentage of total MHC isoforms. (C) Relative amounts of MHC mRNA isoforms in SOL and PL muscles from CONT and CBR rats. The absolute MHC mRNA isoforms were obtained by RT-PCR and expressed as percentages of total mRNA isoforms. *Significantly different from CONT (P<0.05). Values are means ± S.E.M.; invisible error bars are compressed in the histogram thickness.

800 C. Bozzo and others

CONT and CBR soleus presented one single spot, the nphosphorylated MLC2f.

Protein and mRNA expressions of MHC isoforms

The changes in MHC isoform composition are described in ig. 4. These data were obtained from the same animals as ricquet et al. (2002). HG conditions had important and ignificant effects on the MHC isoform repartition in soleus nuscle. At the protein level (Fig. 4B), two MHC isoforms were xpressed in the CONT soleus: the predominant slow MHCI soform (64%) and the fast MHCIIa isoform (36%). As reviously reported (Picquet et al., 2002), the slow MHCI was ignificantly increased in CBR muscles since its expression eached 100% of total MHC content, while MHCIIa was no onger expressed. RT-PCR analysis of MHC mRNA isoform ontent of the SOL muscle demonstrated that the four MHC nRNA isoforms (MHCI, IIa, IId/x and IIb) were present in CONT and CBR soleus muscles (Fig. 4C). The slow MHCI soform was increased compared to CONT (~78% versus 58%) vhile fast MHCIIa and IId/x mRNA isoforms were decreased by 50% in CBR rats. MHCIIb mRNA isoform, present at very ow amounts in CONT SOL (~3%), was not affected.

At both protein and mRNA levels, the CONT plantaris nuscle expressed the four MHC isoforms previously lescribed, but with a predominance of the fast isoforms in the order MHCIId/x \geq MHCIIb \geq MHCIIa \geq MHCI. The protein and mRNA isoform distributions were not modified in CBR plantaris muscles.

Discussion

The aim of this work was to analyze contractile properties and hindlimb muscle phenotype transformations of rats conceived, born and reared in hypergravity induced by 2 gcentrifugation. The results showed a decrease in body mass and coleus weight associated with a decrease in fiber diameter. Increased specific maximal force correlated to increases in Ca^{2+} affinity and cooperativity within the thin "filament, were amply demonstrated. They were accompanied by slow-toslower phenotype transitions of the contractile and regulatory proteins. Except for muscle mass (~46% decrease), no change was observed in plantaris muscle in hypergravity.

Body and muscle mass, diameter and maximal tension of muscle fibers

As already described and discussed by Picquet et al. (2002), CBR rats exhibited body and muscle masses lower than those of control muscles. These authors concluded that the decrease in muscle mass was correlated with the decrease in body mass, which could, in turn, be related to a slowing down in the growth of the rats conceived and reared in hypergravity. They also observed a significant decline in the absolute CSA of the slow soleus fibers (-30%) and the fast plantaris (-17%) ones. These observations were confirmed by our measurements on skinned fiber diameters, the difference in the amplitude (-10% in soleus and -6% in plantaris fiber diameters) of the decreases being possibly explained by the different techniques of analysis and muscle fiber treatments (skinning) used.

Our results showed that the maximal tensions $(kN m^{-2})$ were increased by 34% in CBR soleus fibers. This also corresponded with the results of Picquet et al. (2002), obtained at the whole soleus muscle level. Here, the increase in specific maximal force could be linked either to an increased number of crossbridges or to an increase in force output per cross-bridge. The first hypothesis would suppose an elevated synthesis/ degradation ratio of proteins in CBR soleus fibers, a fact that was not supported by the observed decrease in fiber diameter. Some studies have suggested that hypergravity did not induce changes in protein synthesis (Almurshed and Grunewald, 2000), but had a general sparing effect on muscle proteins in rats that were not gaining body mass, thus permitting them to maintain muscle protein levels (Roy et al., 1996). Another explanation for the increase in the number of cross-bridges would be a modification in the myofilament lattice spacing, already proposed for microgravity conditions (Fitts et al., 2000). The second hypothesis, i.e. the elevated maximal tension P_0 (kN m⁻²) explained by an increase in force per cross-bridge, was in good agreement with the observed increase in Ca^{2+} affinity in CBR soleus fibers (see below).

For the plantaris muscle, the absence of alteration in specific force P_0 (kN m⁻²) in hypergravity, agreed with the lack of changes in calcium activation characteristics (especially in Ca²⁺ affinity parameter).

Contractile properties and troponin isoform transitions

This is the first time that changes in body and muscle growth of rats conceived, born and reared in hypergravity, have been shown to be accompanied by modifications in calcium activation characteristics of soleus but not plantaris muscle fibers. These changes consisted principally of a higher Ca²⁺ affinity and a higher cooperativity between proteins of the thin filament, indicating that CBR soleus fibers were able to produce more efficient contractions. These effects were specific to CBR animals (including animal gestation, birth and development), since only slight modifications (and in the opposite direction) have been reported for adult rats placed in hypergravity for a period of 19 days (Stevens et al., 2003). In our study, the electrophoretic analyses showed an increase in the relative proportions of slow isoforms of troponin subunits. It is well known that the isoform type of the three Tn subunits present in the muscle fibers can influence the shape of the T-pCa curve (Schiaffino and Reggiani, 1996). Here, the isoform composition of the three subunits (T, C and I) was affected. Thus, upregulation of TnC and TnI slow isoforms versus downregulation of the fast ones could explain very well the higher Ca²⁺ affinity observed in CBR soleus fibers. Indeed, slow fibers generally exhibit higher Ca²⁺ affinity than fast ones (Mounier et al., 1989; Schiaffino and Reggiani, 1996). Changes at the TnT level were less marked: the slow TnT content was not modified and a rearrangement within the fast TnT isoforms occurred, consisting of an increased relative level of TnT3f at the expense of TnT1f, one of the two isoforms (with TnT4f)

more representative of fast muscles. Thus, we suggested that the higher cooperativity observed in CBR soleus fibers might be linked to the rearrangement in TnT fast isoforms. Tropomyosin transformations can also be envisaged to explain the modifications in Ca^{2+} affinity (Schachat et al., 1987).

MLC and MLC2 isoform transitions

In our study, MLC slow-to-slower changes were seen only for the slow (fast) MLC1 isoform, which was significantly increased (decreased) in hypergravity. Thus, transitions at the total MLC level were less marked than for MHC (see below) and troponin isoforms. Such lesser effects of environmental conditions on MLC changes have already been described elsewhere (Ingalls et al., 1996; Stevens et al., 2000).

Another means of regulation, the phosphorylation of the MLC2 isoform, has previously been described as positively correlated with a slow-to-fast phenotype transformation in slow muscles (Bozzo et al., 2003). Here, the slow-to-slower phenotype transitions induced in CBR soleus were not accompanied by variations in MLC2 phosphorylation. One could have expected a decrease in phosphorylation. A possible explanation for these latter results could be the low level of MLC2 phosphorylation existing in the slow soleus muscle. Moreover, decreases (increases) in MLC2 phosphorylation have generally been associated with declined (elevated) Ca²⁺ affinities (Sweeney and Stull, 1986).

This was not the case in this study, since we did not demonstrate any change in phosphorylation paralleling the decrease in Ca^{2+} affinity in CBR soleus. As previously described by Bozzo et al. (2003), in unloaded soleus, MLC2 phosphorylation was increased alongside a decrease in Ca^{2+} affinity (Gardetto et al., 1989; Stevens et al., 1993). These observations led us to suggest that modifications in Ca^{2+} affinity induced by changes in the gravity factor could not be directly explained by variations in MLC2 phosphorylation.

MHC isoform transitions

The most important biochemical changes in CBR soleus reported here were characterized by slow-to-slower transitions, observed at the MHC level. Our results are in agreement with those previously described by Martin (1990) on Sprague-Dawley rats submitted to centrifugation at 30 days of age, but not with studies on rats placed in hypergravity for 2 weeks as adults (Roy et al., 1996; Stevens et al., 2003). This suggested that a nervous factor could be participating in the observed transformations. Indeed, Krasnov et al. (1992) have demonstrated in soleus from rats grown in hypergravity that the volumes of the bodies, nucleus and nucleolus in motoneurons from the spinal cord at the level of lumbar enlargement were increased. These authors thus suggested a higher functional motoneuron activity, associated with an elevated content of slow and intermediate muscle fibers.

In our conditions and as previously described (Picquet et al., 2002), the CBR soleus muscle only expressed the slow MHCI isoform. A total disappearance of all fast isoform expression, more precisely of MHCIIa, was observed. These changes were

Soleus and plantaris conceived and born at 2 g 2801

in agreement with those occurring at the mRNA level, i.e. a shift from MHCIIa mRNA (~30% in CONT/~15% in CBR) to MHCI mRNA (~60% in CONT/~80% in CBR). However, MHCIIa mRNA was still present in CBR muscles even though the protein was no longer expressed, suggesting altered translational and/or post-translational regulation during hypergravity.

In plantaris muscle, we also found no changes in maximal tension or contractile characteristics in MHC and troponin isoform compositions. The lack of changes in MHC isoforms described in this study does not conflict with the increased number of hybrid fibers observed by Picquet et al. (2002). Indeed, a rearrangement in the MHC isoform distribution among the different fibers would not necessary lead to a change in MHC content at the whole muscle level. Therefore, as was the case in real or simulated microgravity conditions, hypergravity at 2 g preferentially affected the propertype of slow hindlimb extensor muscles.

In conclusion, the present study performed on rats conceived, born and reared in hypergravity, reported effects on soleus muscle that are contrary to those observed in adult rats exposed to hypergravity. Indeed, in the latter (Stevens et al., 2003), only a few modifications were shown, consisting of a decrease in Ca²⁺ affinity, and a slight slow-to-fast transition of TnC and I isoforms; MHC and TnT isoforms were unaffected. In contrast, the present study on CBR rats highlights an increase in Ca2+ affinity and important changes in the expression of myofibrillar proteins: troponins present slow-toslower transitions and MHC isoform pattern are reduced to the single expression of the slow MHCI isoform. In this context, other periods of hypergravity initiation could be further examined with the aim of understanding which critical steps of rat gestation, birth and/or development influence the transformations induced by changes in gravity factor. Indeed, since the muscles in our study were removed at the adult stage, we could not determine whether or not the MHC plasticity under centrifugation went through remodelling steps including modified early-expressed myosin isoforms, like embryonic or neonatal MHC (Martrette et al., 1998).

We thank Miss Laetitia Cochon for technical assistance. The Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire was supported by the Ministry of Research (UPRES EA 1032 – IFR118) and received grants from the Centre National d'Etudes Spatiales (3194) and the Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais. The Laboratoire de Neurobiologie des Restaurations Fonctionnelles was supported by Centre National de la Recherche Scientifique/Université de Provence (UMR 6562) and by grants from the Centre National d'Etudes Spatiales.

References

Almurshed, K. and Grunewald, K. (2000). The effects of dietary energy restriction on overloaded skeletal muscle in rats. Br. J. Nutr. 84, 697-704.
 Amtmann, E. and Oyama, J. (1976). Effect of chronic centrifugation on the structural development of the musculoskeletal system of the rat. Anat. Embryol. 149, 47-70.

2802 C. Bozzo and others

- Bastide, B., Kischel, P., Puterflam, J., Stevens, L., Pette, D., Jin, J. P. and Mounier, Y. (2002). Expression and functional implications of troponin T isoforms in soleus muscle fibers of rat after unloading. *Pflug. Arch.* 444, 345-52.
- Bozzo, C., Stevens, L., Toniolo, L., Mounier, Y. and Reggiani, C. (2003). Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-tofast transition in rat soleus. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 285, C575-583.
- Sutler-Browne, G. S. and Whalen, R. G. (1984). Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev. Biol.* 102, 324-334.
- Caiozzo V. J., Haddad, F., Baker, M. J. and Baldwin, K. M. (1996). The influence of mechanical loading upon myosin heavy chain protein and mRNA isoform expression. J. Appl. Physiol. 80, 1503-1512.
- Chi, M. M., Manchester, J. K. and Lowry, O. H. (1998). Effect of centrifugation at 2G for 14 days on metabolic enzymes of the tibialis anterior and soleus muscles. Aviat. Space Environ. Med. 69, A9-11.
- Fauteck, S. P. and Kandarian, S. C. (1995). Sensitive detection of myosin heavy chain composition in skeletal muscle under different loading conditions. Am. J. Physiol. 268, C419-424.
- Fitts, R. H., Riley, D. R. and Widrick, J. J. (2000). Physiology of a microgravity environment. J. Appl. Physiol. 89, 8283-8289.
- Gardetto, P. R., Schluter, J. M. and Fitts, R. H. (1989). Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. J. Appl. Physiol. 66, 2739-2749.
- **Gonzalez, B., Negredo, P. Hernando, R. and Manso, R.** (2002). Protein variants of skeletal muscle regulatory myosin light chain isoforms: prevalence in mammals, generation and transitions during muscle remodelling. *Pflüg. Arch.* **443**, 377-86.
- **Gustave Dit Duflo, S., Gestreau C. and Lacour, M.** (2000). Fos expression in the rat brain after exposure to gravito-inertial force changes. *Brain Res.* **861**, 333-344.
- Härtner, K. T., Kirschbaum, B. J. and Pette, D. (1989). The multiplicity of troponin T isoforms. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur. J. Biochem.* 179, 31-8.
- Härtner, K. T. and Pette, D. (1990). Fast and slow isoforms of troponin I and troponin C. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur. J. Biochem.* 188, 261-7.
- ingalls, C. P., Barnes, W. S. and Smith, S. B. (1996). Interaction between clenbuterol and run training: effects on exercise performance and MLC isoform content. J. Appl. Physiol. 80, 795-801.
- Kerrick, W. G., Malencik, D. A. Hoar, P. E., Potter, J. D., Coby, R. L., Pocinwong, S. and Fischer, E. H. (1980). Ca²⁺ and Sr²⁺ activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflüg. Arch.* 386, 207-213.
- Kishel, P., Bastide, B. et al. (2001). Expression and functional behavior of troponin C in soleus muscle fibers of rat after hindlimb unloading. J. Appl. Physiol. 90, 1095-1101.
- Klug, G. A., Houston, M. E., Stull, J. T. and Pette, D. (1986). Decrease in myosin light chain kinase activity of rabbit fast muscle by chronic stimulation. *FEBS Lett.* 200, 352-354.
- Krasnov, I. B., Połyakov, I. V., Ilyina-Kakueva, E. I. and Drobyshev, V. I. (1992). Morphology and histochemistry of spinal cord and soleus muscle in rats grown under hypergravity. *Physiol.* 35, S216-217.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leeuw, T., Kapp, M. and Pette, D. (1994). Role of innervation for development and maintenance of troponin subunit isoform patterns in fastand slow-twitch muscles of rabbit. *Differentiation* 55, 193-201.
- Lomo, T. (1989). Long-term effects of altered activity on skeletal muscle. Biomed. Biochim. Acta 48, 5432-5444.
- Martin, W. D. (1980). Effects of chronic centrifugation on skeletal muscle fibers in young developing rats. *Aviat. Space Environ. Med.* **51**, 473-479.
- Martrette, J. M., Hartmann, N., Vonau, S. and Westphal, A. (1998).

Effects of pre- and perinatal exposure to hypergravity on muscular structure development in rat. J. Muscle Res. Cell Motil. 19, 689-694.

- Morano, I., Lengsfield, M. et al. (1988). Chronic hypertension changes myosin isoenzyme pattern and decreases myosin phosphorylation in the rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 20, 875-886.
- Mounier, Y., Holy, X. and Stevens, L. (1989). Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibers. *Pflüg. Arch.* 415, 136-141.
- Musacchia, X. J., Steffen, J. M., Fell, R. D. and Dombrowski, M. J. (1990). Skeletal muscle response to spaceflight, whole body suspension, and recovery in rats. J. Appl. Physiol. 69, 2248-2253.
- Picquet, F., Bouet, V., Canu, M. H., Stevens, L., Mounier, Y., Lacour, M. and Falempin, M. (2002). Contractile properties and myosin expression in rats born and reared in hypergravity. Am. J. Physiol. 282, R1687-R1695.
- Picquet, F., Stevens, L., Butler-Browne, G. S. and Mounier, Y. (1998). Differential effects of a six-day immobilization on newborn rat soleus muscles at two developmental stages. J. Mus. Res. Cell Motil. 19, 743-755.
- Reiser, P. J., Kasper, C. E., Greaser, M. L. and Moss, R. L. (1998). Functional significance of myosin transitions in single fibers of developing soleus muscle. Am. J. Physiol. 254, C605-613.
- Roy, R. R., Roy, M. E., Talmadge, R. J., Mendoza, R., Grindeland, R. E. and Vasques, M. (1996). Size and myosin heavy chain profiles of rat hindlimb extensor muscle fibers after 2 weeks at 2G. Aviat. Space Environ. Med. 67, 854-858.
- Schachat, F. H., Diamond, M. S. and Brandt, P. W. (1987). Effect of different troponin T-tropomyosin combination on thin filament activation. J. Mol. Biol. 198, 551-554.
- Schiaffino, S. and Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* 76, 371-423.
- Stevens, L., Bastide, B. Kischel, P., Pette, D. and Mounier, Y. (2002). Timedependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. Am. J. Physiol. 282, C1025-1030.
- Stevens, L., Bozzo, C., Nemirovskaya, T., Montel, V., Falempin, M. and Mounier, Y. (2003). Alterations in contractile properties and expression pattern of myofibrillar proteins in rat muscles after hypergravity. J. Appl. Physiol. 94, 2398-2405.
- Stevens, L., Firinga, C., Gohlsch, B., Bastide, B., Mounier, Y. and Pette, D. (2000). Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. Am. J. Physiol. 279, C1558-C1563.
- Stevens, L., Gohlsch, B., Mounier, Y. and Pette, D. (1999a). Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in single fibers of unloaded rat soleus muscle. *FEBS Lett.* 463, 15-18.
- Stevens, L., Mounier, Y. and Holy, X. (1993). Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. Am. J. Physiol. 264, R770-776.
- Stevens, L., Sultan, K. R., Peuker, H., Gohlsch, B., Mounier, Y. and Pette, D. (1999b). Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. Am. J. Physiol. 277, C1044-1049.
- Sweeney, H. L. and Stull, J. T. (1986). Phosphorylation of myosin in permeabilized mammalian cardiac and skeletal muscle cells. Am. J. Physiol. 250, C657-60.
- Thomason, D. B. and Booth, F. W. (1990). Atrophy of the soleus muscle by hindlimb suspension. J. Appl. Physiol. 68, 1-12.
- Toursel, T., Bastide, B., Stevens, L., Rieger, F. and Mounier, Y. (2000). Alterations in contractile properties and expression of myofibrillar proteins in wobbler mouse muscles. *Exp. Neurol.* **162**, 311-320.
- Vrbova, G. and Wareham, A. C. (1972). The effect of activity on some properties of the neuromuscular junction of mammalian skeletal muscle. J. *Physiol. (Lond)* 224, 81P-82P.

Service France

J Appl Physiol 94: 2398-2405, 2003. First published February 7, 2003; 10.1152/japplphysiol.00808.2002.

Contractile properties of rat single muscle fibers and myosin and troponin isoform expression after hypergravity

Laurence Stevens,¹ Cyril Bozzo,¹ Tatiana Nemirovskaya,² Valerie Montel,¹ Maurice Falempin,¹ and Yvonne Mounier¹

¹Laboratory of Neuromuscular Plasticity, Institut Fédératif de Recherche en Protéomique 118, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France; ²Faculty of Basic Medicine, Lomonossov Moscow State University, 119899 Moscow, Russia

Submitted 6 September 2002; accepted in final form 5 February 2003

Stevens, Laurence, Cyril Bozzo, Tatiana Nemi-rovskaya, Valerie Montel, Maurice Falempin, and Yvonne Mounier. Contractile properties of rat single muscle fibers and myosin and troponin isoform expression after hypergravity. J Appl Physiol 94: 2398-2405, 2003. First published February 7, 2003; 10.1152/japplphysiol.00808. 2002.-The effects of 19 days of hypergravity (HG) were investigated on the biochemical and physiological properties of the slow soleus muscle and its fast agonist, the plantaris. HG was induced by rotational centrifugation that led to a 2-G gravity level. The HG rats were characterized by a slower body growth than control, whereas the soleus muscle mass was increased by 15%. Using electrophoretic techniques, we showed that the distribution of myosin heavy chain and troponin T isoforms was not modified after HG in both soleus and plantaris. In contrast, the isoform expression pattern of two troponin subunits, troponin I and troponin C, was changed in a slow-to-fast manner only in the soleus. From tension-pCa relationships, changes in Ca²⁺ activation threshold by 0.18 pCa unit indicated a decrease in Ca² sensitivity and an increase in the slope of the curve, attesting to a higher cooperativity along the thin filament after HG. Comparison of our HG data with previous results in microgravity conditions indicated that muscle characteristics, except muscle mass, did not evolve linearly from 0 to 2 G.

centrifugation; isolated skinned fibers; myofibrillar proteins; calcium activation properties

MUSCLE PLASTICITY IN RESPONSE to microgravity during spaceflights or simulated non-weight-bearing conditions has been extensively studied over the last 20 years, especially in rats.

An atrophy of slow-twitch extensor muscles, such as the soleus, was reported, and marked losses of mass and contractile force in relation to changes in calciumactivated properties were described (13, 41, 42). This atrophy was accompanied by a slow-to-fast transformation of the soleus phenotype, characterized by changes in histochemical and biochemical properties. Decreases in the slow isoform expression of different contractile proteins, such as myosin heavy chain (MHC) I (4, 10, 43) and troponin (Tn; T, C, and I subunits) (2, 6, 39), were concomitant with a rise in the expression of the fast isoforms of these proteins and even with the appearance of MHC isoforms not expressed at the protein level in the normal soleus (MHC IId/x, MHC IIb). Few changes appeared in fast muscles, such as extensor digitorum longus, plantaris, or tibialis anterior (41).

Therefore, it is now evident that the gravity factor has to be integrated as a parameter that modulates muscular properties and that its changes induce adaptive processes. However, until now, the effects of hypergravity (HG) have been less studied, at least for muscle contractile properties. Some data reporting HG effects after chronic centrifugation on muscle morphology (48) and biochemical characteristics have demonstrated for the slow soleus either a transition toward a slower muscle in young developing rats (24, 25) or no change in slow MHC content in adults (33). However, the changes in the contractile mechanism specifically linked to HG remained unknown. So a question needs to be raised: what kinds of modifications in contractile properties appear in HG conditions, and are they accompanied by changes in phenotypic properties? Consequently, are the changes in muscle properties at 2 G opposite those induced by 0 G; otherwise, is there a continuum in muscle characteristics following the gravity level from 0 G to 1 G to 2 G?

The aim of this paper was to analyze the effect of a 2-G environment on two muscles: the slow soleus and its fast agonist, the plantaris. We investigated the contractile properties of these muscles by using single skinned fibers, which permitted us to determine the Ca^{2+} sensitivity of the myofilaments. In parallel, the MHC and the three Tn subunit expression patterns were examined. The myosin molecule was chosen as a fine marker of muscle plasticity due to its abundance in striated muscles and its highly extended range of isoforms capable of being modified, as clearly demonstrated in microgravity. TnT, TnC, and TnI, which contribute to the regulation of muscle contraction and which have been previously studied in unloading con-

Address for reprint requests and other correspondence: L. Stevens, Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France (E-mail: Laurence.Stevens@univ-lille1.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

ditions (2, 39), were also examined. The relation between TnC and TnT subunit expressions and Ca^{2+} activation characteristics has already been well established. Indeed, TnC, the Ca^{2+} -binding subunit, exists in skeletal muscle as fast (TnCf) and slow (TnCs) isoforms, with the modulation of the contractile response and the apparent Ca^{2+} affinity of the contractile system being directly dependent on the TnC isoform (21, 23, 28). The TnT subunit interacts with tropomyosin and plays an important role in Ca^{2+} activation and in the cooperativity process along the myofibrillar lattice (36). In the rat muscle, three different slow isoforms (TnTs) and four fast isoforms (TnTf) have already been described (2).

Our results indicated that HG conditions induced changes in the Ca^{2+} -activated properties of slow soleus fibers. The expression pattern of MHC and TnT isoforms was not altered in the soleus after HG, whereas slow-to-fast transitions occurred for the TnC and TnI molecules. The fast plantaris fibers were not modified, either for their contractile properties or for their MHC and Tn isoform expressions.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Muscle Preparation

The experiments were carried out on adult male Wistar rats (initial body weight ~ 200 g). The animals were randomly divided into a control (Cont, n = 9) group and a group submitted to a 2-G centrifugation (HG, n = 9). The experiments received authorizations from both the Ministry of Agriculture and the Ministry of Education (veterinary service of health and animal protection, authorization A59-682) in France and the Animal Care Committee in the Institute of Biomedical Problems in Moscow. After 19 days of HG, both groups of rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (30 mg/kg), and muscles were immediately dissected. The soleus and plantaris muscles were removed bilaterally and weighed. There was no statistical difference in muscle mass between the right and left sides. Then, for each animal, one muscle was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until SDS-PAGE analysis, and the other muscle was chemically skinned for the contractile experiments on single fibers. The skinning procedure was based on Ca^{2+} chelation by EGTA, which permeabilized the sarcolemmal and transverse tubular membranes. The EGTA skinning solution (see Solutions) was applied for 24 h at 4°C. The skinned biopsies were stored at -20°C in 50:50 glycerol-skinning solution (storage solution). Protease inhibitor leupeptin was added to the storage solution (10 µg/ml) to prevent protein degradation. All samples were brought in preserved temperature conditions (-80 and -20° C) to the laboratory in Lille for the experiments.

Centrifugation Apparatus

The centrifugation was conducted in Moscow at the Institute of Biomedical Problems. The apparatus consisted of a velocity-controlled direct-current motor located in the vertical axis of the apparatus and driving two horizontal crossarms (total length 4 m) at constant rotation speed. Four free-swinging gondolas were jointed at the four extremities of the horizontal arms. Each gondola contained five rats. During centrifugation, the gondolas were tilted at a constant 60° angle from vertical, depending on the chosen speed. Rotations were done at a constant velocity of 21 rad/min. Given the mass and the inertia of the gondolas, including the cages and rats, this angular velocity led to 2-G resultant force. The gondolas were equipped with a ventilation system and a light system that reproduced a 12:12-h light-dark cycle. For animal care (cleaning and feeding), the centrifugation was stopped daily for 15 min every morning at 11 AM. Food and water were available ad libitum. During the experiment, a video camera control indicated that the rats remained inactive and kept a tight grip on the floor of the gondola during the first 2–3 days of centrifugation. Then they began to move and to get food and water until the end of the experiment. However, they walked slowly, with short steps. These qualitative observations confirmed more specific reports on locomotion and caged activity levels (12, 46). For the whole duration of the study, Cont animals were kept in the centrifuge room in cages similar to the gondolas on the centrifuge apparatus, so that all of the animals were exposed to the same level of noise, lighting, and temperature ($20 \pm 1^{\circ}$ C).

Experimental Procedures

For each experiment, a 2- to 2.5-mm single-fiber segment was isolated from the skinned biopsy. A silk thread was tied at each extremity, allowing the mounting of the fiber in an experimental chamber with constant stirring, initially filled with relaxing (R) solution. The fiber was held at one end by small fixed forceps and at the other end by a clamp connected to a strain gauge (force transducer Fort 10, World Precision Instruments; sensitivity 10 V/g). The mounted fiber was viewed through a high-magnifying binocular $(\times 80)$ with a micrometer, allowing fiber diameter measurements. Fibers comparable to strips with a high degree of ellipticity were discarded ($\sim 5\%$). The resting sarcomere length was measured by means of a helium-neon laser (Spectra Physics) directed perpendicular to the long axis of the fiber. Then the fiber was stretched to $\sim 120\%$ of resting length to allow maximal isometric tension development on ionic activation. The resulting sarcomere length $(2.6 \pm 0.04 \ \mu m)$ was subsequently regularly controlled and readjusted if necessary. The output of the force transducer was amplified and recorded on a graph recorder (Gould, model Windograph no. 40-8474-02) and simultaneously analyzed by computer software.

Solutions

All reagents were provided by Sigma Chemical (St. Louis, MO). The composition of all solutions was calculated by the Fabiato computer program (9), with final ionic strength at 200 mM. The pH was adjusted to 7.0, and ATP (2.5 mM) was added in each solution. The skinning solution was made up of (in mM) 10 MOPS, 170 potassium propionate, 2.5 magnesium acetate, and 5 K2EGTA. The following solutions were used for the experimental procedure: a washing (W) solution composed of (in mM) 10 MOPS, 185 potassium propionate, and 2.5 magnesium acetate; a R solution identical to the skinning solution; and pCa- or pSr-activating solutions consisting of W solution plus various concentrations of free Ca²⁺ or Sr^{2+} from CaCO₃ or SrCl₂, respectively, buffered with EGTA and added in proportions to obtain the different pCa values (7.0-4.2) or pSr values (5.0 and 3.4). To eliminate a hypothetical influence of the sarcoplasmic reticulum (SR) on the tension developed by the myofilaments, each fiber was bathed for 20 min at the beginning of an experiment in a Brij solution made up of R solution with 2% Brij 58 (polyoxyethylene 20 cetyl ether). The nonionic Brij 58 detergent irreversibly eliminated the ability of the SR of skinned muscles to

sequester and release ${\rm Ca}^{2+},$ without altering the actomyosin system.

Tension-pCa Relationships

All experiments were performed in a thermostatically controlled room (19 \pm 1°C). At the beginning of each experiment, a maximal tension (P_0) was induced by applying a pCa 4.2 solution that contained enough calcium to saturate all TnC sites. An experimental sequence was defined as follows. The fiber was bathed in W solution, which eliminated EGTA traces from the previously applied R solution. Then the fiber was activated at a level of tension (P) in a given pCa solution, immediately followed by a maximal contraction Po. This procedure allowed the calculation of the relative tension (P/P_0) . Finally, the fiber was relaxed in R solution. Fibers were rejected if force declined during a sustained contraction, or decreased by >20% during the whole experiment, and if tension-pCa series were not completely achieved. Data from four or five fibers, at least, were kept from each muscle biopsy. The tensions developed in submaximally activating solutions were expressed as fractions of Po related to the Ca^{2+} concentration (in pCa), tension-pCa relationships. The tension-pCa experimental data were fitted to the Hill equation: $P/\dot{P}_0 = ([\dot{C}a^{2+}]/K)^{nH}/(1 + ([Ca^{2+}]/K)^{nH})$, where P/\dot{P}_0 is the normalized tension, $n_{\rm H}$ is the Hill coefficient, K is the apparent dissociation constant ($pK = -\log K = pCa_{50}$, where pCa_{50} is the pCa necessary to develop 50% of the P₀), and brackets denote concentration.

Different parameters can be deduced from the tension-pCa curves: the pCa threshold (pCa_{thr}), defined as the lowest Ca^{2+} concentration required to obtain the development of tension; the pCa₅₀ value; and $n_{\rm H}$, related to the steepness of the curve. Two $n_{\rm H}$ values were also calculated when the curve was asymmetric. We used the Hill plot linearization of the raw data, i.e., log [(P/P_0)/1 - (P/P_0)] (28). Thus the data were best fitted by two straight lines, corresponding to n_1 , slope for P/P_0 >50%, and n_2 , slope for P/P_0 <50%.

Functional Identification of Fiber Type

The criterion for functional fiber identification was based on the difference in Ca^{2+} and Sr^{2+} activation characteristics between slow and fast fibers. Indeed, it has been demonstrated that fast muscle fibers are less sensitive to Sr^{2+} than are slow fibers. To minimize the number of tensions developed by the fiber, only two Sr^{2+} solutions, pSr 3.4 and 5.0, were applied. The application of pSr 3.4 solution elicited the maximal Sr^{2+} tension. The pSr 5.0 solution produced tensions close to 95% P₀ in slow fibers and tensions ranging from 0 to 10% in fast fibers (23, 38, 44). Thus slow and fast fibers were clearly identified.

Electrophoresis

Frozen muscle tissue was pulverized under liquid N_2 in a small steel mortar and used for the analyses of MHC and Tn subunits. Muscle powder was dissolved in an extraction buffer, as previously described (2).

MHC isoforms. As already described (43), the MHC composition was determined by SDS-PAGE on a 4.5% stacking gel and on a 7.5% separating gel. Electrophoresis was run for 18 h at 12°C (180-V constant, 13 mA per gel). After the gel run, the gel slabs were silver stained. The relative proportion of each MHC isoform in each muscle type was determined by integrating densitometry (see below). At least two independent measurements were performed on each sample. They were quite similar, and the mean value was reported.

Th subunit (TnT, TnI, and TnC) isoforms. The isoforms of the three Tn subunits were separated on a one-dimensional 10-20% gradient gel (2). Fast and slow Tn subunits, as well as actin, were identified by immunoblotting.

Immunoblotting

Electrotransfer was carried out on a 0.2-µm nitrocellulose sheet (Advantec MFS, Pleasanton, CA). The membranes were blocked with a PBS solution (pH 7.4) containing 5% nonfat dry milk and 0.2% sodium azide. All of the membranes were incubated overnight with each primary antibody. A monoclonal antibody (5C5 from Sigma Chemical, specific to a-sarcomeric actin) allowed actin signal recognition. For TnT, the fast isoforms were identified with the JLT-12 monoclonal antibody from Sigma Chemical; the slow TnT isoforms were detected by using a polyclonal antibody previously characterized and provided by Härtner et al. (17). For TnC, both slow and fast isoforms (50/50% recognition) were identified by another polyclonal antibody provided by Härtner and Pette (18). For TnI, slow and fast isoforms were identified by two polyclonal antibodies also provided by Härtner and Pette.

The first identification was performed for actin. The bound antibodies were then removed by an incubation at 50°C for 40 min with occasional stirring in a stripping buffer (100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris·HCl, pH 6.7). The membrane was washed twice in PBS at room temperature, and the success of the stripping was tested by incubating the membrane with the secondary antibodies corresponding to the previously tested antibodies and enhanced chemiluminescence (ECL) detection. The immunodetection of the other proteins was then performed as described above.

The primary antigen-antibody complexes were detected by a peroxidase staining kit (Sigma Chemical), consisting of extravidin peroxidase and biotinylated goat conjugate antibodies against mouse or guinea pig IgG (Sigma Chemical). The signals were visualized by an ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Signal intensities were evaluated by an integrating densitometry software (GS-700 Imaging Densitometer, Biorad, Ivry Sur Seine, France). At least two independent measurements were performed on each sample (averaged value reported). To ensure that there was no muscle protein loss during incubation of the nitrocellulose membrane in the stripping buffer, the membrane was reincubated at the end of the experiments with the first antibody used, and the intensities of the signals were compared. No significant difference between the signals was measured.

The measurements of signal intensities of ECL films after immunoblots proved that the actin signal was unaltered during the 19-day HG period. Thus the actin signal intensities expressed in percentage of control corresponded to $103.3 \pm 2.2\%$ (n = 9) for HG soleus and $109 \pm 4.1\%$ (n = 9) for HG plantaris muscles. Therefore, the actin signal could serve as internal control. The method of analysis for each Tn subunit has been described at the beginning of each respective result section.

Statistical Analysis

The data are presented as means \pm SE. Student's *t*-test was used to estimate differences among means, with the acceptable level of significance being set at P < 0.05.

J Appl Physiol • VOL 94 • JUNE 2003 • www.jap.org

2400

Table 1. BM and MWM for soleus and plantaris and ratio of MWM to BM after 19 days of centrifugation at 2 G $\,$

	Cont	HG
BM, g		
Initial	$207 \pm 2(9)$	$208 \pm 2(9)$
Final	$290 \pm 7(9)$	$254 \pm 5^{*}(9)$
MWM, mg		
Soleus	$120.7 \pm 3.6(18)$	$138.8 \pm 3.1^{*}(18)$
Plantaris	$230 \pm 8.9(18)$	$215 \pm 9(18)$
MWM/BM, mg/g		
Soleus	$0.42 \pm 0.01(18)$	$0.55 \pm 0.01^{*}(18)$
Plantaris	$0.78 \pm 0.03(18)$	$0.85 \pm 0.04(18)$

Values are means \pm SE. Nos. of rats [for body mass (BM)] and muscles [for muscle wet mass (MWM) and ratio of MWM to BM] are shown in parentheses. Cont, control; HG, hypergravity. *Significantly different from Cont within a same muscle, P < 0.05.

RESULTS

Body Mass and Muscle Wet Mass

The initial body masses (BM) of Cont and HG rats were similar (Table 1). At the end of the 19-day experiment, rats of Cont and HG groups (n = 9) gained in weight an average of 83 and 46 g, respectively. The rats submitted to centrifugation yielded final BMs lower than those of Cont by 12%. The mean absolute wet mass of the soleus muscles was significantly increased by 15%. In contrast, after HG, the plantaris muscle mass remained unchanged. The ratio of muscle wet mass to BM was increased for soleus, whereas it was not significantly modified for plantaris. Fiber diameter measurements did not reveal any change in either muscles (see Table 3).

Myofibrillar Protein Expression in Whole Muscles

MHC protein isoforms in soleus and plantaris muscles. HG conditions during 19 days did not induce any change in the pattern of electrophoretically separated MHC isoforms in soleus and plantaris whole muscles (Fig. 1 and Table 2). MHC I and MHC IIa were expressed at similar levels in Cont and HG soleus. Similar proportions of MHC I, MHC IIa, MHC IId/x, and MHC IIb isoforms were found in Cont and HG plantaris.

Tn subunit isoforms. See Table 2 and Fig. 2.

TNT SUBUNIT. Polyclonal antibodies directed to TnTs allowed the identification of three bands corresponding





Table 2. Isoform expression patterns of MHC and troponin (TnT, TnI, and TnC) subunits in soleus and plantaris muscles from control rats and rats submitted to 2-G centrifugation

	So	leus	Plan	taris
	Cont	HG	Cont	HG
1	9	9	9	9
MHC I	83.1 ± 2.8	82.1 ± 1.7	3.03 ± 0.22	2.22 ± 1.05
MHC IIa	16.9 ± 2.7	17.9 ± 1.7	20.1 ± 1.2	17.4 ± 1.5
MHC IId/x			38.0 ± 0.5	41.2 ± 2.1
MHC IIb			38.9 ± 0.2	39.1 ± 4.3
ſnT1s	42.5 ± 2.0	41.7 ± 7.8	40.7 ± 4.8	40.2 ± 3.0
ſnT2s	41.0 ± 2.0	43.1 ± 2.4	39.5 ± 1.2	38.2 ± 3.5
[nT3s	16.5 ± 1.2	15.2 ± 4.5	19.8 ± 5.9	16.8 ± 6.3
ſnT1f	24.7 ± 0.6	27.2 ± 2.3	20.8 ± 1.4	20.9 ± 1.1
InT2f	41.7 ± 0.5	38.3 ± 0.6	23.5 ± 0.9	19.6 ± 1.7
InT3f	31.5 ± 0.4	30.9 ± 1.1	24.0 ± 1.1	22.8 ± 0.7
ſnT4f	2.1 ± 0.6	3.6 ± 0.8	31.7 ± 0.7	30.4 ± 2.3
ſnIs	75.5 ± 3.4	$62.3 \pm 4.2^{*}$	38.2 ± 6.9	36.3 ± 6.4
ſnIf	24.5 ± 4.0	$37.7\pm3.1^*$	61.8 ± 12.4	63.7 ± 6.1
InCs	78.8 ± 3.9	$59.1 \pm 3.0^{*}$	10.4 ± 2.8	10.5 ± 2.7
ſnCf	21.2 ± 3.9	$40.9\pm3.0^*$	89.6 ± 2.8	89.5 ± 2.7

Values are means \pm SE, in %; *n*, no. of muscles. MHC, myosin heavy chain; Tn, troponin; T, I, and C: Tn isoforms; s, slow isoform; f, fast isoform. *Significantly different from Cont within a same muscle, P < 0.05.

to TnT1s, TnT2s, and TnT3s and four bands representing the TnTf isoforms, TnT1f, TnT2f, TnT3f, and TnT4f. The proportions of the different isoforms within a TnT type (slow or fast) were related to the actin signal, as previously described (39). Because the two anti-TnT (slow or fast) antibodies were different, it was not possible to determine accurate relative proportions



Fig. 2. Expression profiles of troponin (Tn) subunit isoforms in soleus and plantaris muscles from C and HG rats. A: enhanced chemiluminescence (ECL) detection of actin signals. B: ECL detection of slow (TnTs) and fast TnT isoforms (TnTf). C: ECL detection of slow (TnIs) and fast TnI isoforms (TnIf). D: ECL detection of slow (TnCs) and fast TnC isoforms (TnCf).

of total slow and total fast isoforms in a given muscle. Nevertheless, within each population (slow or fast), we were able to estimate the relative proportion of each isoform. Thus the proportions of TnT1s, TnT2s, and TnT3s found in Cont soleus were not significantly modified by HG. The four TnTf isoforms were expressed in Cont soleus, with TnT2f and TnT3f being predominant, whereas TnT1f was slightly lower and TnT4f was present at a very low level. The same distribution was found in HG soleus muscles. For plantaris, the relative expression of slow and fast TnT isoforms remained unchanged after HG.

TNI SUBUNIT. TnI only exists as two well-separated isoforms. Changes were estimated after successive application of the slow and the fast antibodies, and relative concentrations of slow (TnIs) and fast (TnIf) isoforms were evaluated with reference to the same actin signal. TnIs was predominantly expressed in Cont soleus. Its expression was reduced after 19 days of HG, whereas TnIf increased. In plantaris, the respective expressions of TnIs and TnIf remained similar to those of Cont after HG.

TNC SUBUNIT. The expressions of TnCs and TnCf isoforms were compared on the same gel because the same polyclonal antibody was able to recognize both isoforms at 50/50%. Thus the proportion of each isoform could be measured as a percentage of total TnC. TnCs, the predominant isoform in Cont soleus muscles, represented \sim 79% of total TnC and was decreased by 25% after HG. The proportions of TnCf and TnCs in Cont plantaris were not modified by exposure to HG.

Maximal Forces and Tension-pCa Relationships

The P_0 was recorded in the saturating pCa 4.2 solution (Table 3). After HG, slow soleus fibers as well as fast plantaris fibers did not show any change in absolute and normalized P_0 compared with Cont. The tension-pCa relationships of the soleus and plantaris fibers are illustrated in Fig. 3. For the two muscles in Cont conditions, the curves showed classic distinct

Table 3. Contractile characteristics of slow-twitch fibers from soleus and fast-twitch fibers from plantaris in control and 2-G centrifuged rats

	So	leus	Plantaris		
	Cont	HG	Cont	HG	
n	41	52	42	40	
Diameter, µm	74.7 ± 2.2	71.5 ± 1.9	69.3 ± 1.8	67.6 ± 2.0	
$P_{0}, \times 10^{-4} N$	3.54 ± 0.32	3.63 ± 0.35	3.90 ± 0.34	3.54 ± 0.31	
P_0 , kN/m ²	88.7 ± 10.1	96.9 ± 10.2	110.3 ± 10.9	102.5 ± 8.5	
pCathr	6.63 ± 0.03	$6.45^{*} \pm 0.02$	6.31 ± 0.03	6.33 ± 0.04	
pCa ₅₀	5.85 ± 0.02	5.80 ± 0.02	5.76 ± 0.02	5.76 ± 0.03	
n _H	2.32 ± 0.11	$3.09^{*} \pm 0.13$	3.53 ± 0.16	3.49 ± 0.27	
n_1	2.19 ± 0.11	$2.88^{*} \pm 0.21$	2.90 ± 0.39	2.67 ± 0.39	
n_2	3.22 ± 0.11	$3.73^*\pm0.17$	4.60 ± 0.43	4.25 ± 0.49	

Values are means \pm SE; *n*, no. of fibers. P₀, maximal tension; pCa_{thr}, threshold for Ca²⁺ activation; pCa₅₀, pCa at which tension is half-maximal; *n*_H, slope of fitted line for tension-pCa curve; *n*₁ and *n*₂, Hill coefficients for relative tensions >50% and <50%, respectively. *Significantly different from Cont within a same muscle, *P* < 0.05.



Fig. 3. Tension-pCa relationships of single-skinned fibers in soleus (A) and plantaris (B) from C (\bullet) and HG (\odot) rats. Values are means \pm SE. Curves were fitted according to the Hill equation. P₀, maximal tension.

profiles (41). Thus pCa_{thr} was higher and $n_{\rm H}$ lower (Fig. 3 and Table 3) for the slow soleus than for the fast plantaris fibers. After HG, the mean tension-pCa relationship of the slow soleus fibers was shifted toward lower pCa values for the pCa_{thr}, and the slope of the curve was clearly increased. Both n_1 and n_2 parameters were increased. The pCa₅₀ value was not significantly modified. On the contrary, for the fast plantaris fibers, none of these three parameters was changed after HG.

DISCUSSION

This paper reports for the first time the effects of a 2-G centrifugation on the contractile properties of slow and fast rat muscle fibers in relation to their composition in MHC and Tn isoforms.

Body and Muscle Masses After HG

In our experiments, during the 19 days of HG, the animal growth was slowed down, and this led to a 12% lower final mean BM for rats submitted to centrifugation, compared with Cont. This decline is in agreement with that described by other studies in animals exposed to HG for 14 days (35, 48, 49). These authors explained that the BM decreased because the rats reduced their food intake during the first days of HG, although food and water were provided ad libitum. The same observation was made by our operator. Moreover,

a commonly described response to centrifugation consists in a loss in fat mass due to a preferential fat degradation (3, 48). Centrifugation also evokes a stress response during the first 5 days that results in a transient elevation in circulating catecholamines and corticosterone, which contributes to the increased lipolysis (28).

Centrifugation used to produce an artificially induced gravity should theoretically result in an increased load on muscles in response to an additional imposed force. Therefore, a hypertrophic response may be expected. Indeed, we observed a 15% increase in muscle mass and a significantly higher muscle wet mass-to-BM ratio for the soleus muscle. No change was obtained for the plantaris muscle. A slight increase (7) or stable absolute masses (35, 48) have already been reported for slow extensor muscles, whereas decreases in the range of 5-15% (3, 7, 48) occurred in fast extensor or flexor muscles. Thus HG conditions in our study target preferentially the slow muscle. A surprising result was the unchanged diameters in 2-G soleus muscle fibers, also observed by Roy et al. (35). Therefore, the increase in muscle mass might be more likely related to an increase in noncontractile muscle components such as connective tissue (30) or complexes of the extracellular matrix (14, 37). The possibility of edema in the muscle should be considered; however, it has been reported that many indexes of the state of hydration of animals (water balance and total body water) were unaffected after 2 wk of centrifugation at 2 G (26, 31).

Contractile Protein Expression and Ca^{2+} Activation Properties

After HG, our results demonstrated that soleus and plantaris muscles expressed, respectively, the same MHC patterns as Cont. This is in agreement with the results obtained by other groups in soleus muscle (35) and in fast muscles such as plantaris (25) and medial gastrocnemius (35). Thus data on soleus underline the fact that HG does not induce change in MHC isoform composition, unlike microgravity conditions, which result in slow-to-fast transitions from MHC I to MHC IIa, IId/x, and IIb. Nevertheless, a similarity between micro- and hypergravity situations might be found in the increased number of hybrid muscle fibers (32, 35, 40, 46).

This paper reports the first data relative to the expression pattern of Tn subunit isoforms at 2 G. In fast plantaris, no change in Tn subunit isoform composition was observed. In soleus, the proportions in TnT isoforms were similar to the Cont ones, for the slow as well as for the fast isoforms. On the contrary, the analysis of TnI and TnC expressions indicated transitions in the slow-to-fast direction, i.e., in the same direction as that observed in unloading conditions after hindlimb suspension (39). However, the level in TnIf was increased more after 14 days of unloading (\times 4) than after HG (\times 1.5), whereas the level in TnCf was

increased more after HG (\times 1.9) than after microgravity (\times 1.09).

The functional significance of these changes in Tn subunit isoform expression could be discussed in terms of Ca^{2+} -activated properties. A large elevation in the steepness of the tension-pCa curve indicated an increased cooperativity among the different proteins of the thin filament. This could be related to the increased expression of the TnCf isoform (28). Moreover, the straightening of the HG curve might contribute to masking the amplitude of the decrease in Ca^{2+} affinity, which is more evident at pCa_{thr} than at pCa₅₀. Nevertheless, the slightest direction of the rightward shift would be in agreement with the higher proportion of TnCf (15). Surprisingly, the increase in the steepness of the curve was not accompanied by changes in the InT molecule. This suggested that a protein such as tropomyosin strongly implied in the cooperative mechanisms within the thin filament (36) might have been transformed during HG. Further studies are needed to elucidate this point.

The changes in the tension-pCa relationship of the slow soleus fibers appeared comparable to those widely reported for different slow muscles from rat, monkey, and humans after simulated or real microgravity (11, 13, 22, 41, 50). No change was found in the tension-pCa relationship of fast plantaris fibers at 0 or 2 G. Thus microgravity (or HG) provoked a preferential adaptation to unloading (or increased load) for the Ca²⁺ activation properties of slow muscles.

Is There a Continuum for the Adaptation of Muscle Properties From 0 to 2 G?

Supporting this hypothesis already proposed by National Aeronautics and Space Administration-Ames' group (48), we have described changes in absolute and relative muscle masses, which were lower at 0 G and higher at 2 G compared, respectively, with 1-G data. Moreover, in both situations, the adaptation concerned more selectively the slow soleus extensor, whereas no change appeared in the fast plantaris.

The other changes reported in this paper did not follow a continuum from 0 to 2 G. Indeed, the tensionpCa relationships were shifted in a similar way at 0 or 2 G compared with 1 G, and TnC and TnI isoforms exhibited slow-to-fast transitions at 0 and 2 G. The most surprising result was the absence of change in MHC and TnT isoform compositions after 2 G, because these molecules are precisely the most extensively and rapidly transformed in microgravity (39, 43). Thus muscle mass should be regulated in a continual way, whereas the functional contractile properties and the phenotypical changes would escape this principle.

Muscle Properties After 2 G Compared With Other Mechanical Overload Situations

Our results after 2-G centrifugation can be compared with others obtained in overload situations, which also induce muscle hypertrophy. Compensatory hypertrophy related to chronic functional overload occurs after

ablation, tenotomy, or denervation of synergistic muscles. In these different conditions, studies have reported changes in the MHC composition corresponding, in the soleus, to an increase in MHC I expression and a decrease in MHC IIa (27, 29) and, in the plantaris, to increases in native slow myosin Sm (47) or MHC I (1, 5) associated with a repression of MHC IIb (5, 27). The transitions toward slower contractile characteristics were also attested by slower twitch contraction, decreases in maximal shortening velocity in whole soleus or plantaris muscles (1, 5, 33, 34), and decreases in SR Ca^{2+} uptake (1, 19, 45). Moreover, increases in P_0 were described in soleus and plantaris at whole muscle (5, 33) or single-fiber (20) levels. The tensionpCa relationship was shifted in the leftward direction, compared with Cont, for both muscles, with the effect being larger for the slow soleus fibers (20).

Taken together, all of these results on mechanical overload are opposite to those found in microgravity and participate lightly in the continuum principle mentioned above. Proposing an interpretation of the discrepancies between 2-G centrifugation and other overload situations is somewhat tempting. Our hypothesis is based on the fact that compensatory growth of mechanically overloaded muscles is largely due to passive chronic stretch (16). During our experiments at 2-G centrifugation, the animals kept a tight grip on the floor (see MATERIALS AND METHODS), with the soleus thus being passively stretched (ankle in a dorsiflexed position). It can, therefore, be supposed that this stretch may be less and/or may be elicited more temporarily than during other overloading situations, because it occurred preferentially during the first days at 2 G. Although this might appear speculative, there are no data available at present that provide a possible explanation for the differences between 2-G centrifugation and other overload conditions.

To conclude, 2-G centrifugation proposed as a potential countermeasure to prevent the effects of microgravity could be considered to limit the atrophic process, as previously described (8). However, what appears most disturbing from our present data is the same orientation of HG effects and microgravity effects during spaceflights that result in a reduction in the Ca^{2+} affinity of the contractile system. Finally, all of these data underline the importance of the gravity factor in muscle physiology.

We are thankful to D. Pette for providing the antibodies and Dr. I. B. Krasnov for giving access to experimental design and technical support in Moscow.

T. Nemirovskaya was a recipient of INTAS Grant 99-1190. The Laboratory of Neuromuscular Plasticity was supported by Centre National d'Etudes Spatiales Grant 8411 and a grant from the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais.

REFERENCES

- 1. Baldwin KM, Valdez V, Herrick RE, Macintosh AM, and Roy RR. Biochemical properties of overloaded fast-twitch skeletal muscle. J Appl Physiol 52: 467–472, 1982.
- 2. Bastide B, Kischel P, Puterflam J, Stevens L, Pette D, Jin JP, and Mounier Y. Expression and functional implication of

troponin T isoforms in soleus muscle fibers of rat after unloading. *Pflügers Arch* 444: 345–354, 2002.

- Burton RR and Smith AH. Adaptation to acceleration environments. In: Handbook of Physiology. Environmental Physiology. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 1996, sect. 4, vol. II, chapt. 40, p. 943-970.
- Caiozzo VJ, Haddad F, Baker MJ, and Baldwin KM. Influence of mechanical loading on myosin heavy chain protein and mRNA isoform expression. J Appl Physiol 80: 1503-1512, 1996.
- Caiozzo VJ, Haddad F, Baker MJ, Mc Cue A, and Baldwin KM. MHC polymorphism in rodent plantaris muscle: effects of mechanical overload and hypothyroidism. Am J Physiol Cell Physiol 278: C709-C717, 2000.
- Campione MS, Ausoni S, Guezennec CY, and Schiaffino SJ. Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. J Appl Physiol 74: 1156-1160, 1993.
- Chi MMY, Manchester JK, and Lowry OH. Effect of centrifugation at 2G for 14 days on metabolic enzymes of the tibialis anterior and soleus muscles. *Aviat Space Environ Med* 69: A9– A11, 1998.
- 8. D'Aunno DS, Robinson RR, Smith GS, Thomason DB, and Booth FW. Intermittent acceleration as a countermeasure to soleus muscle atrophy. J Appl Physiol 72: 428-433, 1992.
- 9. Fabiato A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Meth*ods Enzymol 157: 378-417, 1974.
- Fauteck SP and Kandarian SC. Sensitive detection of myosin heavy chain composition in skeletal muscle under different loading conditions. Am J Physiol Cell Physiol 268: C419-C424, 1995.
- Fitts RH, Bodine SC, Romatowski JG, and Widrick JJ. Velocity, force, power, and Ca²⁺ sensitivity of fast and slow monkey skeletal muscle fibers. J Appl Physiol 84: 1776-1787, 1998.
- Fox RA, Daunton NG, and Corcoran ML. Study of adaptation to altered gravity through systems analysis of motor control. *Adv Space Res* 22: 245-253, 1998.
- Gardetto PR, Schulter JM, and Fitts RH. Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. J Appl Physiol 66: 2739-2749, 1989.
- 14. Gordon SE, Flück M, and Booth FW. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Selected contribution: Skeletal muscle focal adhesion kinase, paxillin, and serum response factor are loading dependent. J Appl Physiol 90: 1174–1183, 2001.
- Gulati J, Scordilis S, and Babu A. Effect of troponin C on the cooperativity in Ca²⁺ activation of cardiac muscle. FEBS Lett 236: 441-444, 1998.
- Gutmann ES, Schiaffino S, and Hanzlikova V. Mechanism of compensatory hypertrophy in skeletal muscle of the rat. *Exp Neurol* 31: 451-464, 1971.
- Härtner KT, Kirschbaum BJ, and Pette D. The multiplicity of troponin T isoforms. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur J Biochem* 179: 31-38, 1989.
- Härtner KT and Pette D. Fast and slow isoforms of troponin I and troponin C. Eur J Biochem 188: 261–267, 1990.
- Kandarian SC, Peters DG, Taylor JA, and Williams JH. Skeletal muscle overload upregulates the sarcoplasmic reticulum slow calcium pump gene. Am J Physiol Cell Physiol 266: C1190-C1197, 1994.
- Kandarian SC and Williams JH. Contractile properties of skinned fibers from hypertrophied skeletal muscle. Med Sci Sports Exerc 25: 999-1004, 1993.
- Kischel P, Bastide B, Stevens L, and Mounier Y. Expression and functional behavior of troponin C in soleus muscle fibers of rat after hindlimb unloading. J Appl Physiol 90: 1095-1101, 2001.
- Kischel P, Stevens L, Montel V, Picquet F, and Mounier Y. Plasticity of monkey triceps muscle fibers in microgravity conditions. J Appl Physiol 90: 1825-1832, 2001.
- Kischel P, Stevens L, and Mounier Y. Differential effects of bepridil on functional properties of troponin C in slow and fast skeletal muscles. Br J Pharmacol 128: 767-773, 1999.

J Appl Physiol • VOL 94 • JUNE 2003 • www.jap.org

2404

- Martin WD. Effects of chronic centrifugation on skeletal muscle fibers in young developing rats. Aviat Space Environ Med 51: 473-479, 1980.
- 25. Martin WD and Romond EH. Effects of chronic rotation and hypergravity on muscle fibers of soleus and plantaris muscles of the rat. *Exp Neurol* 49: 758-771, 1975.
- Moran MM, Stein TP, and Wade CE. Hormonal modulation of food intake in response to low leptin levels induced by hypergravity. Exp Biol Med (Maywood) 226: 740-745, 2001.
- Morgan MJ and Loughna PT. Work overload induces changes in fast and slow skeletal muscle myosin heavy chain gene expression. *FEBS Lett* 255: 427-430, 1989.
 Moss RL, Lauer MR, Giulian GG, and Greaser ML. Altered
- Moss RL, Lauer MR, Giulian GG, and Greaser ML. Altered Ca²⁺ dependence of tension development in skinned skeletal muscle fibers following modification of troponin by partial substitution with cardiac troponin C. J Biol Chem 261: 6096-6099, 1986.
- Mozdziak PE, Greaser ML, and Schultz E. Moyogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. J Appl Physiol 84: 1359-1364, 1998.
- Nemirovskaya T, Krasnov I, Shenkman B, and Belozerova I. Morphological changes in rat skeletal muscles after 19 day exposure to +2G. J Gravit Physiol 8: 73-74, 2001.
- Ortiz RM and Wade CE. Water balance in rats exposed to chronic centrifugation. J Appl Physiol 89: 56-60, 2000.
- 32. Picquet F, Bouet V, Canu MH, Stevens L, Mounier Y, Lacour M, and Falempin M. Contractile properties and myosin expression in rats born and reared in hypergravity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 282: R1687-R1695, 2002.
- Roy RR, Baldwin KM, Martin TP, Chimarusti SP, and Edgerton VR. Biochemical and physiological changes in overloaded rat fast- and slow-twitch ankle extensors. J Appl Physiol 59: 639-646, 1985.
- 34. Roy RR, Meadows ID, Baldwin KM, and Edgerton VR. Functional significance of compensatory overloaded rat fast muscle. J Appl Physiol 52: 473-478, 1982.
- 35. Roy RR, Roy RE, Talmage RJ, Mendoza R, Grindeland RE, and Vasques M. Size and myosin heavy chain profiles of rat hindlimb extensor muscle fibers after 2 weeks at 2G. Aviat Space Environ Med 67: 854-858, 1996.
- Schachat FH, Diamond MS, and Brandt PW. Effect of different troponin T-tropomyosin combinations on thin filament activation. J Mol Biol 198: 551-554, 1987.
- Stauber WT, Miller GR, and Grimmett JG. Adaptation of rat gastrocnemius muscles to 2 weeks of centrifugation: myofibers and extracellular matrix. *Aviat Space Environ Med* 69: 45-48, 1998.

- Stephenson DG and Williams DA. Calcium-activated force responses in fast- and slow-twitch skinned muscle fibers of the rat at different temperatures. J Physiol 317: 281-302, 1981.
- Stevens L, Bastide B, Kischel P, Pette D, and Mounier Y. Time-dependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. Am J Physiol Cell Physiol 282: C1025-C1030, 2002.
- 40. Stevens L, Gohlsch B, Mounier Y, and Pette D. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in single fibers of unloaded rat soleus muscle. *FEBS Lett* 463: 15-18, 1999.
- Stevens L, Mounier Y, and Holy X. Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 264: R770-R776, 1993.
- Stevens L, Mounier Y, Holy X, and Falempin M. Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days hindlimb suspension. J Appl Physiol 68: 334-340, 1990.
- 43. Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, and Pette D. Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 277: C1044-C1049, 1999.
- Takagi A and Endo M. Guinea pig soleus and extensor digitorum longus: a study of single-skinned fibers. *Exp Neurol* 55: 95-101, 1977.
- 45. Talmadge RJ, Roy RR, Chalmers GR, and Edgerton VR. MHC and sarcoplasmic reticulum protein isoforms in functionally overloaded cat plantaris muscle fibers. J Appl Physiol 80: 1296-1303, 1996.
- 46. Tavakol M, Roy RR, Kim JA, Zhong H, Hodgson JA, Hoban-Higgins TM, Fuller CA, and Edgerton VR. Fiber size, type, and myosin heavy chain content in rhesus hindlimb muscles after 2 weeks at 2G. Aviat Space Environ Med 73: 551-557, 2002.
- 47. Tsika RW, Herrick RE, and Baldwin KM. Interaction of compensatory overload and hindlimb suspension on myosin isoform expression. J Appl Physiol 62: 2180-2186, 1987.
- 48. Vasques MS, Lang CBS, Grindeland RE, Roy R, Daunton N, Bigbee AJ, and Wade CE. Comparison of hyper- and microgravity on rat muscle, organ weights and selected plasma constituents. Aviat Space Environ Med 69: A2-A8, 1998.
- 49. Warren E, Horwitz BA, and Fuller CA. Gravity and body mass regulation. J Gravit Physiol 4: 89-92, 1997.
- 50. Widrick JJ, Knuth ST, Norenberg KM, Romatowski JG, Bain JLW, Riley DA, Karhanek M, Trappe SW, Trappe TA, Costill DL, and Fitts RH. Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibers. J Physiol 516: 915-930, 1999.

(a) :« Hypergravity from conception to adult stage: effects on contractile properties and skeletal muscle phénotype ».

De plus, une comparaison directe des effets de l'HG à ceux de l'HH (même âge, même durée d'expérimentation) a été étudiée sur des muscles de rats adultes (voir publication (b) : « Contractile properties of rat single muscle fibers and myosin and troponin isoform expression after hypergravity »).

<u>a. Les effets engendrés par l'hypergravité de la conception à l'âge adulte</u> <u>sur les propriétés contractiles et le phénotype musculaires (Bozzo *et al.*, 2004)</u>

<u>b. Les propriétés contractiles des fibres musculaires et l'expression des</u> <u>MHC et des Tn chez l'adulte en HG (Stevens *et al.*, 2003)</u>

2. Conclusions

Nous avons démontré dans la publication (a), que le soleus d'un rat conçu, né et élevé en HG n'exprime plus que des isoformes lentes (MHCI seule). De plus, malgré l'existence de ces profondes transformations phénotypiques, il n'est pas apparu de variation des états de phosphorylation de la MLC2 du soleus CBR ; ceci suggère que le niveau de base de phosphorylation de la MLC2, déjà faible dans le soleus contrôle, ne peut pas diminuer de façon détectable. Les publications (a) et (b) indiquent que l'HG (chez les CBR ou les adultes) n'induit pas de transformations phénotypiques et fonctionnelles du plantaris. Celui-ci subit quand même une perte de masse après HG.

B. VARIATIONS DE PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 DANS L'EDL APRES ELECTROSTIMULATION

Ce modèle nous permet d'obtenir une transformation de l'EDL selon une transition rapide→lent. Ces transformations dont une première approche avait été abordée lors de la dénervation, nous permettent donc d'analyser les variations de phosphorylation de la MLC2 dans un muscle rapide après de profonds changements phénotypiques. Comme indiqué dans la partie Matériels et méthodes, nous avons stimulé les EDL par CLFS (Chronic Low Frequency Stimulation) à 20Hz pendant 3 semaines.

1. CLFS et transitions phénotypiques de l'EDL

Les résultats illustrés à la figure 28 et dans le tableau 9 montrent que les transformations de l'EDL après CLFS sont importantes, puisqu'après analyse électrophorètique des MHC, il apparaît que l'EDL électrostimulé n'exprime plus que la MHCIIa comme isoforme rapide, alors que l'EDL contrôle exprimait MHCIIa, IId/x et IIb.



Figure 28. Représentation électrophorétique de l'expression des MHC d'un EDL contrôle et après CLFS. SDS-PAGE à 7.5%.

	MHCI	MHCIIa	MHCIId/x	MHCIIb
EDL CONT	7,32	14,33	35,00	43,35
(n=4)	±0,65	±1,05	±0,98	±1,00
EDL CLFS	5,41	94,59	· · ·	~ 4
(n=4)	±2,01*	±2,01*	0 ±0 ^	0 ±0 *

Tableau 9. Répartition des MHC dans l'EDL contrôle et après CLFS.

2. CLFS et phosphorylation de la MLC2 dans l'EDL

Les résultats de l'analyse de la phosphorylation de la MLC2 dans l'EDL CLFS sont reportés à la figure 29.





Figure 29. Phosphorylation de la MLC2 dans l'EDL après CLFS analysée par électrophorèse 2D. Comparaison avec l'EDL et le soleus contrôles.

Les résultats des effets de la CLFS sur l'EDL indiquent clairement une disparition des états de phosphorylation de la MLC2. En effet, dans le profil de l'EDL après CLFS, il n'existe plus que les deux spots 2s (100% des variants de MLC2s) et 2f (100% des variants de MLC2f) analysés précédement comme non phosphorylés (Bozzo *et al.*, 2003).

3. Conclusions

Nous avons ainsi démontré qu'une transformation phénotypique rapide \rightarrow lent de l'EDL diminue la phosphorylation de la MLC2. Le profil de la MLC2 après électrophorèse bidimensionnelle se rapproche de celui d'un muscle lent comme le soleus, ce qui indique qu'une transition vers un phénotype lent diminue la phosphorylation de la MLC2.

Nos observations de la MLC2s en électrophorèse 2D ont montré une différence entre le profil d'expression de ses variants entre l'EDL contrôle et le soleus contrôle. En effet, la figure 28 montre que le spot 2s n'est exprimé que dans le soleus contrôle, et que le spot 2s2 n'est exprimé que dans l'EDL contrôle. Nous posons donc deux hypothèses concernant la nature des variants de MLC2s :

• 2s serait non-phosphorylé, 2s1 monophosphorylé et 2s2 biphosphorylé, comme il l'a été observé sur le muscle lisse dans lequel la MLC2 comporte 2 sites de phosphorylation (Ikebe et Hartshorne, 1985). • 2s1 serait issu d'une modification post-traductionnelle autre que la phosphorylation. Cette dernière hypothèse est soutenue par une incomplète déphosphorylation de 2s1 après traitement par la PP1 (voir nos résultats sur la phosphorylation de la MLC2 après HH et CB), et aussi par la découverte d'un site de désamidation de la MLC2s qui engendre un variant de point isoélectrique plus acide (White *et al.*, 2003).

Dans le cas de la seconde hypothèse, l'expression du phénotype lent dans le soleus contrôle serait associée à une réduction, voire une absence de la deuxième modification post-traductionnelle située sur le site de désamidation ; cette modification post-traductionnelle serait au contraire plus importante dans l'EDL contrôle.

III. REGULATION DE LA PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 PAR ANALYSE DE L'EXPRESSION DES

ENZYMES MLCK ET MP

A. INTRODUCTION

Dans la mesure où nous avons démontré que la phosphorylation de la MLC2 était reliée de façon très étroite aux changements phénotypiques musculaires, avec une diminution de phosphorylation lors d'une transition rapide→lent, et une augmentation lors d'une transition lent→rapide, nous avons initié une approche des phénomènes de régulation de cette phosphorylation, en nous intéressant à l'expression de la kinase MLCK et de la phosphatase MP.

En effet, la régulation de la phosphorylation découle directement de la balance phosphorylation / déphosphorylation de cette protéine. Même si, dans le muscle lisse, il est possible de phosphoryler la MLC2 par d'autres enzymes que la MLCK (par exemple, la RhoKinase), la régulation de la balance phosphorylation / déphosphorylation est assurée dans le muscle squelettique, par la MLCK et la MP. Le degré de phosphorylation de la MLC2 peut être régulé par ces enzymes aux niveaux de :

- l'expression de leur ARNm,
- leur expression protéique,
- leur activité enzymatique.

Nous avons examiné dans cette étude les niveaux d'expression des transcrits et des protéines correspondant à ces deux enzymes, dans la plupart des modèles de variation d'activation neuromusculaire utilisés : HH, dénervation et électrostimulation.

B. EXPRESSION DES ARN_m et des proteines correspondantes DE MLCK, PP1 et MYPT2 dans le soleus apres HH

1. Expression des ARNm de MLCK, PP1 et MYPT2 après HH

L'étude de l'expression des ARNm de MLCK, PP1 et MYPT2 (figure 30) montre que lors de l'augmentation de l'expression du phénotype rapide et de la phosphorylation de la MLC2 dans le soleus, la transcription du gène codant pour la MLCK est plus élevée de 55% par rapport aux contrôles. La régulation de la MP s'effectuerait par une diminution de la transcription du gène codant pour sa sous-unité régulatrice spécifique du muscle squelettique, MYPT2, puisque celle-ci diminue après HH (de 50% par rapport aux contrôles). Le transcrit de la sous-unité catalytique PP1, non spécifique, ne varie pas dans le soleus après HH.



Figure 30. Expressions des ARNm de MLCK (A) et de MP (PP1 et MYPT2) (B) dans les soleus de muscles contrôles et après HH, déterminées par RT-PCR semi-quantitative. * : significativement différent du soleus contrôle.

2. Expression protéique de la MLCK et de la PP1

L'analyse de l'expression relative de la MLCK et de la PP1 après HH (figures 31 et 32) nous montre que l'expression de la MLCK est multipliée par 2 par rapport au soleus contrôle, alors que l'expression de la PP1 ne change pas. Ces transformations sont identiques à celles observées au niveau de leur ARNm. L'absence d'un anticorps commercial anti-MYPT2 ne nous a pas permis d'obtenir l'expression protéique de cette sous-unité de MP. Cependant, le parallèlisme entre l'expression des ARNm de MLCK et PP1 et leurs protéines correspondantes, nous permet de supposer que la protéine MYPT2 varie elle-aussi de façon similaire à son ARNm.



Figure 31. Immunoblotting de la MLCK, de la PP1 et de l'actine dans les muscles soleus contrôles et HH.



*Figure 32. Expression de la MLCK et de la PP1 dans les muscles soleus contrôles et HH. * : significativement différent du soleus CONT.*

<u>C. EXPRESSION DE MLCK ET MP DANS LES MUSCLES DENERVES</u> <u>ET ELECTROSTIMULES</u>

1. Expression protéique de la MLCK et de la PP1 dans le soleus dénervé et traité à la CsA

Ces résultats sont exposés dans l'article « Myosin light chain phosphorylation in denervated slow and fast rat skeletal muscles ». Nous les avons répertoriés également cidessous pour en faciliter la lecture (figure 33).





Nous pouvons observer une augmentation de l'expression de la MLCK dans le soleus dénervé (figures 33 A et B), pour lequel une augmentation de la phosphorylation de la MLC2 et une augmentation de l'expression du phénotype rapide ont été décrites. Dans le soleus CsA, aucune variation d'expression de MLCK et de MP n'a été montrée.

2. Expression protéique de la MLCK et de la PP1 dans l'EDL dénervé et traité à la CsA



Figue 34. A. Immunoblotting de la MLCK, de la PP1 et de l'actine dans les muscles EDL CONT, CODE, DE, COCsA et CsA. *B.* Expression de MLCK et PP1 dans les muscles EDL CONT, CODE, DE, COCsA, CsA. *: significativement différent de l'EDL CONT.

Dans l'EDL dénervé, pour lequel on observe une transformation rapide→lent ainsi qu'une diminution de phosphorylation de la MLC2, le niveau d'expression de la MLCK est diminué (figures 34A et B). Le niveau d'expression de la PP1 de l'EDL n'est pas affecté par la dénervation. De plus, ni l'expression de la MLCK, ni celle de la PP1 ne sont modifiées après inhibition de la voie CaN-NFAT par la CsA.

3. Expression protéique de la MLCK et la PP1 dans l'EDL

<u>électrostimulé</u>

Cette étude nous a permis de montrer que la CLFS provoque dans l'EDL une diminution de l'expression de la MLCK (-33%) mais ne modifie pas celle de la PP1. Pour une meilleure comparaison des niveaux d'expression sur l'immunoblotting, nous avons ajouté à la figure 35, les illustrations se rapportant aux soleus CONT et HH.



Figue 35. A. Immunoblotting de la MLCK, de la PP1 et de l'actine dans les muscles soleus CONT, soleus HH, EDL CLFS, EDL CONT. B. Expression de MLCK et PP1 dans les muscles soleus CONT, soleus HH, EDL CLFS, EDL CONT. *: significativement différent du soleus CONT. \$: significativement différent de l'EDL CONT.

4. Conclusions

Dans cette partie sur l'expression de la MLCK et de la MP, les résultats obtenus concordent avec ceux avancés à l'échelon des transformations phénotypiques. Lorsqu'il se produit une augmentation de la phosphorylation de la MLC2, les taux de MLCK et de son ARNm augmentent, l'expression de l'ARNm de MYPT2 diminue. Lorsque le degré de phosphorylation de la MLC2 diminue, l'expression de la MLCK diminue.

L'ensemble de ces résultats nous permet de suggérer que la variation du niveau de phosphorylation de la MLC2 découle directement de la balance dans l'expression du duo MLCK / MP :

- une augmentation de phosphorylation serait dûe à une augmentation de l'expression de MLCK et à une diminution de l'expression de MP,
- une diminution de phosphorylation serait dûe à une diminution de l'expression de MLCK et à une augmentation probable de la MP (non prouvée),
- les variations du niveau d'expression de la MP sont dépendants de l'expression de sa sous-unité régulatrice MYPT2, qui donne sa spécificité tissulaire à la MP, alors que sa sous-unité catalytique PP1, non spécifique, reste à un niveau basal quel que soit le changement phénotypique du muscle.

206



' objectif de cette thèse était d'étudier dans le muscle squelettique, les variations de la phosphorylation de la MLC2, protéine régulatrice de la contraction musculaire, lors de transformations phénotypiques à long terme de types lent⇔rapide.

Nos analyses se sont rapportées à l'étude de trois muscles typiquement lent (le soleus) et typiquement rapides (l'EDL et le plantaris). Ces muscles ont été analysés dans des cas de réduction ou d'augmentation de l'activité musculaire, reliées respectivement à une réduction ou une augmentation de la commande nerveuse. Nous nous sommes également intéressés aux mécanismes de régulation de la phosphorylation, en étudiant la voie calcineurine-NFAT, ainsi que l'expression des enzymes responsables de la phosphorylation (MLCK=Myosin Light Chain Kinase) ou de la déphosphorylation (MP = Myosin Phosphatase) de la MLC2.

Afin de conclure et pour synthétiser, nous avons démontré que, à long terme, le niveau de phosphorylation de la MLC2 pouvait être corrélé aux modifications phénotypiques musculaires, plutôt qu'à la variation des caractéristiques d'activation calcique (plus particulièrement la sensibilité au calcium des fibres musculaires), avec une diminution de la phosphorylation lorsque la transformation s'oriente vers l'expression du phénotype lent, et une augmentation lorsque la transformation s'oriente vers l'expression du phénotype rapide. Ces variations de phosphorylation seraient liées à une régulation dans l'expression de la MLCK et de la MP (par l'intermédiaire de sa sous-unité régulatrice MYPT2).

I. INTENSITE DES TRANSFORMATIONS PHENOTYPIQUES ET NIVEAUX DE PHOSPHORYLATION DE LA MLC2

Dans l'ensemble de notre étude, une augmentation de la phosphorylation de la MLC2 a été associée à une transition lent→rapide. Inversement, une diminution de la phosphorylation est observée après une transition rapide→lent. Cependant, il existe un cas pour lequel l'expression d'un phénotype rapide n'engendre pas une augmentation de la phosphorylation : l'inhibition de la voie calcineurine-NFAT par la CsA. Comment expliquer ce phénomène ?

En fait, même si le phénotype musculaire est communément déterminé par sa composition en MHC, les transformations ayant lieu lors de transitions phénotypiques sont des phénomènes complexes. Il est généralement admis que les transitions phénotypiques se réalisent au niveau des MHC selon le schéma de « transition de proximité » proposé par Pette et Staron (1990) : MHCI↔MHCIIa↔MHCIId/x↔MHCIIb. Cependant, une modification phénotypique traduite par un changement d'expression des MHC n'entraîne pas une modification de l'expression de tous les gènes actifs en conditions contrôles. Ainsi, un même signal n'influe pas de façon identique sur tous les gènes représentatifs d'un type musculaire (Reggiani et Te Kronnie, 2004).

Notre modèle de CsA ne semble pas obéir au schéma classiquement décrit, ne permettant pas l'expression de la MHCIId/x, mais en exprimant directement la MHCIIb. Or, ce modèle est également le seul qui n'induit pas de transformation au niveau des MLC. Ceci pourrait expliquer que la phosphorylation de la MLC2 n'est pas modifiée malgré une transition phénotypique marquée des MHC. Tout se passerait comme si, lorsque les MLC ne

sont pas affectées par les transformations, la MLC2 ne subit pas de variation de sa phosphorylation.

Pour ces raisons, nous avons tenté d'établir une relation entre l'intensité de la transformation, et particulièrement celle concernant les MLC, et le degré de phosphorylation de la MLC2. Pour le soleus, les intensités de phophorylation sont quasi identiques entre les différents traitements. Dans l'EDL, la quantité insuffisante de modèles présentant une modification de la phosphorylation n'a pas rendu cette étude possible.

Il serait pour cela très intéressant d'étudier la relation entre transformation des MLC et phosphorylation de la MLC2 en choisissant des modèles permettant des transitions plus fines et graduées des MLC.

II. REGULATION DE LA PHOSPHORYLATION PAR LA MLCK ET LA MP

Le niveau de phosphorylation après transformation est aussi à mettre en rapport avec celui de l'expression de la MLCK et de la MP. Même s'il s'agit ici d'une analyse relative du taux d'expression de ces enzymes, nous remarquons que, quel que soit le muscle (EDL ou soleus), ou la transformation (effective ou non), le niveau relatif de PP1 ne varie pas. Par contre, lorsqu'il y a expression du phénotype rapide dans le soleus, et, quel que soit le degré de transformation des MHC, le niveau d'expression de la MLCK devient similaire à celui d'un EDL contrôle. De même, un EDL-CFLS ou dénervé, exprimant un phénotype lent, a un taux de MLCK correspondant à celui d'un muscle soleus contrôle pour chaque niveau de transformation des MHC. Le niveau d'expression de la MLCK serait plutôt corrélé à l'expression d'un phénotype donné (lent ou rapide) qu'à l'intensité des transformations
phénotypiques. Ceci expliquerait alors pourquoi les niveaux de phosphorylation dans les soleus transformés varient très peu d'un modèle à l'autre.

Il serait intéressant d'observer les variations de la MLCK (et de MYPT2), en effectuant une cinétique de transformation lent→rapide (par exemple en faisant varier la durée de HH), ou de transformation rapide→lent (en faisant varier la durée d'électrostimulation). Cette analyse nous permettrait d'établir une comparaison des transformations de la MLC2, avec l'expression des deux enzymes. Cette expression est-elle du type « minimale/maximale » ou graduée ? Nous pourrions également comprendre comment s'effectue le passage d'une phosphorylation transitoire à court terme à des phénomènes d'adaptation à long terme.

Enfin, l'observation de l'expression accrue du transcrit du gène de la MLCK dans le soleus après HH, nous apporte une explication sur la régulation de la phosphorylation par la MLCK, qui serait d'origine post-traductionnelle (Stevenson *et al.*, 2003).

III. DU MESSAGE NERVEUX A LA REGULATION DE LA PHOSPHORYLATION DE LA MLC2

Il est maintenant bien établi que la commande nerveuse joue un rôle prépondérant dans les mécanismes régissant l'établissement du phénotype musculaire. Cependant, les processi par lesquels l'activité électrique du muscle peuvent entraîner la variation de phosphorylation de la MLC2 restent très hypothètiques.

Tous les modèles que nous avons utilisés engendrent des transformations phénotypiques fondées sur des modifications de l'activité du muscle : une réduction de la commande. motrice après HH et dénervation, une augmentation de cette activité électrique après hypergravité et électrostimulation. Nous pensions obtenir un élément de réponse en analysant la voie CaN-NFAT connue pour réguler l'expression des gènes lents suite à un message nerveux de type lent, mais la comparaison entre la dénervation et la cyclosporine A nous amène à penser que la régulation des transitions et de la MLCK n'est pas exclusivement CaN-dépendante.

Des voies de régulation autres que la CaN-NFAT, sont probablement impliquées dans la régulation des enzymes de phosphorylation/déphosphorylation de la MLC2.

L'augmentation de phosphorylation trouvée suite à l'utilisation du clenbutérol nous dirige vers de possibles régulations de l'activité de MLCK et de MP par d'autres enzymes. Un couplage régulation de l'activité enzymatique / augmentation de l'expression de ces enzymes semble être un moyen possible de régulation de la phosphorylation de la MLC2. Ceci a déjà été observé dans le muscle lisse, dans lequel la MLCK est régulable par d'autres enzymes comme les Rho-kinase ou les PKC (Protein Kinase C) (Somlyo et Somlyo, 2000). Dans le muscle lisse, ces deux enzymes aident à la phosphorylation de la MLC2. La Rho-kinase inhiberait MP en la phosphorylant. La PKC phosphorylerait un médiateur (le CPI-17) qui, une fois activé, inhiberait directement la MP active (non phosphorylée).

IV. UNE OU DEUX ISOFORMES, UNE OU DEUX MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES ?

L'identité des variants de la MLC2s qui ont été décrits est sujette à controverse comme nous allons le présenter ci-dessous. Deux hypothèses peuvent être retenues : la MLC2s serait composée d'une seule isoforme biphosphorylable en conditions de transitions phénotypiques (ici, le soleus est pris comme exemple) (Gonzalez *et al.*, 2002)



 la MLC2s subirait 2 modifications post-traductionnelles différentes lors de transitions phénotypiques, dont l'une sur un site de désamidation (Bozzo *et al.*, 2003 ; White *et al.*, 2003)



Les analyses spectromètriques ne nous ont pas permis de trancher parmi ces deux hypothèses. Cependant, certaines données sur la MLC2s, indiquant un site de désamidation dans sa séquence (White *et al.*, 2003), tendent à nous faire pencher en faveur de notre seconde hypothèse. Le site de désamidation est situé sur une asparagine 13 proche du site ser-14 de phosphorylation. L'asparagine retrouvée dans le variant 2s serait désamidée en aspartate dans le variant 2s1, rendant le point isoélectrique de celui-ci plus acide. De plus, nos expérimentations de déphosphorylation (HH et CB) ont montré que le spot 2s1 ne disparaissait pas entièrement après action de la PP1.

Cependant, la première hypothèse n'est pas à exclure, si l'on se réfère aux études sur le muscle lisse qui démontrent l'existence de deux sites de phosphorylations de la MLC2. Il serait possible de combiner ces deux hypothèses : il existerait deux sites de phosphorylation de la MLC2s ainsi qu'une autre transformation post-traductionnelle sur l'asparagine 13. Dès lors, on aurait pu s'attendre à l'existence d'un 4^{ième} variant de la MLC2s (2s3 ?). Il résulterait d'une biphosphorylation à la fois en ser 14 et sur un second site de phosphorylation non défini encore, du variant 2s1 désamidé (qui exprime un résidu aspartate en position 13 en conditions contrôles). Cependant, ni la coloration à l'argent après 2D, ni l'immunoblotting n'ont permis de mettre en évidence la détection de cet hypothètique variant 2s3.

V. RAPPORT DE LA PHOSPHORYLATION DE LA MLC2 A LA RESISTANCE A LA FATIGUE

MUSCULAIRE

A court terme, la phosphorylation de la MLC2 entraîne une potentialisation de la réponse musculaire du muscle rapide (Manning et Stull, 1982 ; Moore et Stull, 1984 ; Moore *et al.*, 1985 ; Levine *et al.*, 1996 ; Szczesna *et al.*, 1996, 2002, 2003). Cette potentialisation est un mécanisme de résistance à la fatigue caractéristique du muscle rapide (à matériel enzymatique glycolytique), par rapport à un muscle lent (à matériel enzymatique oxydatif). Une augmentation de phosphorylation était jusqu'à présent considérée comme un mécanisme transitoire de la fibre musculaire rapide pour répondre de façon immédiate à la demande musculaire.

Dans notre étude, les muscles sont transformés phénotypiquement par l'intermédiaire de l'expression de nouvelles isoformes des protéines contractiles. Ces transformations permettent au muscle de s'adapter plus facilement aux contraintes de l'environnement. Nos résultats montrent donc que le processus de résistance à la fatigue du muscle rapide n'est pas seulement transitoire, mais bien une adaptation du phénotype rapide à l'effort musculaire.

Le rapport entre l'augmentation de la phosphorylation de la MLC2 à long terme et l'augmentation de la phosphorylation à court terme dans un muscle rapide nous amène à penser que les niveaux de phosphorylation et de la MLCK tenderaient à établir un état de phosphorylation basal élevé, permettant à la fibre musculaire de réagir de manière plus rapide à l'effort musculaire. Les mécanismes à court et long terme seraient complémentaires. En effet, à court terme, la phosphorylation de la MLC2 est transitoire (Manning et Stull, 1982). Cela nécessite donc des mécanismes qui activent et désactivent en peu de temps le système de régulation de la phosphorylation. Par contre, à long terme, la stabilité de la phosphorylation implique des mécanismes de régulation permettant à la MLCK de ne pas être dégradée ou inactivée, et à la MP d'être inhibée.

Cette étude devrait être complétée par l'analyse de l'activité enzymatique de la MLCK et de la PP1 après stimulation tétanique, dans le cas de muscles déjà transformés (cas d'un soleus transformé en muscle plus rapide). Cela nous permettrait de définir si après transformation, il existe une activité transitoire de phosphorylation, venant s'ajouter à la phosphorylation pré-établie par les changements à long terme. De même, il serait intéressant d'analyser en profondeur les mécanismes de couplage phénotype / phosphorylation, avec comme priorité, une analyse des promoteurs de MLC et MLCK.

215

PERSPECTIVES

Dans le cadre d'une compréhension plus fine des mécanismes post-traductionnels s'établissant après des transformations phénotypiques, il nous semblerait judicieux de prolonger ce travail par deux grandes approches :

- une analyse des diverses régulations post-traductionnelles pouvant avoir lieu au niveau des autres protéines contractiles. Nous avons effectué une première approche de ces phénomènes, en étudiant les transformations subies par la MLC1 suite à un épisode de dénervation et de traitement à la CsA. Aucun changement n'a été démontré. Cependant, il est connu que d'autres protéines comme la Tm (Mak *et al.*, 1978 ; Heeley, 1994), et la TnI et la TnT (Härtner *et al.*, 1989 ; Noland et Kuo, 1993) peuvent subir des transformations post-traductionnelles.
- une analyse d'autres voies de régulation comme celles découvertes au niveau du muscle lisse : la régulation par la Rho-kinase ou par la PKC (Somlyo et Somlyo, 2000; Allen et Leinwand, 2002), mais aussi par les MAPKinases connues pour engendrer des processi de phosphorylation après stimulation nerveuse, ainsi que pour réguler le phénotype musculaire, lent ou rapide (Heeley, 1994; Allen et Leinwand, 2002).

REFERENCES

Adelstein R.S. and Klee C.B. Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. J Biol Chem. 256: 7501-9. <u>1981</u>.

Alen M., Hakkinen K. and Komi P.V. Changes in neuromuscular performance and muscle fiber characteristics of elite power athletes self-administering androgenic and anabolic steroids. *Acta Physiol Scand.* 122: 535-44. 1984.

Alford E.K., Roy R.R., Hodgson J.A. and Edgerton V.R. Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension. *Exp Neurol.* 96: 635-49. <u>1987</u>.

Allen D.L., Roy R.R. and Edgerton V.R. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve.* 22: 1350-60. <u>1999</u>.

Allen D.L., Harrison B.C., Maass A., Bell M.L., Byrnes W.C. and Leinwand L.A. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol.* 90: 1900-8. 2001.

Allen D.L. and Leinwand L.A. Intracellular calcium and myosin isoform transitions. Calcineurin and calciumcalmodulin kinase pathways regulate preferential activation of the IIa myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem.* 277: 45323-30. 2002.

Almurshed K. et Grunewald K. The effects of dietary energy restriction on overloaded skeletal muscle in rats. *British Journal of Nutrition.* 84: 697-704. 2000

Amphlett G.W., Vanaman T.C. and Perry S.V. Effect of the troponin C-like protein from bovine brain (brain modulator protein) on the Mg2+-stimulated ATPase of skeletal muscle actinomyosin. *FEBS Lett.* 72: 163-8. 1976.

Amtmann E. et Oyama J. Effect of chronic centrifugation on the structural development of the musculoskeletal system of the rat. *Anat. Embryol.* 149: 47-70, <u>1976</u>

Andersen J.L., Klitgaard H. and Saltin B. Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of sprinters: influence of training. *Acta Physiol Scand.* 151: 135-42. <u>1994</u>.

Andersen J.L. and Aagaard P. Myosin heavy chain IIX overshoot in human skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 23: 1095-104. 2000.

Andersen P. and Henriksson J. Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibres. *Acta Physiol Scand.* 99: 123-5. <u>1977</u>.

Armstrong R.B. and Phelps R.O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. Am J Anat. 171: 259-72. 1984.

Ausoni S., Gorza L., Schiaffino S., Gundersen K. and Lomo T. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci.* 10: 153-60. <u>1990</u>.

Awede B.L.S. Evaluation of the role of IGF-1, IGFBP-4 and IGFBP-5 in the control of muscle mass and phenotype. 2001.

Ayling C.M., Moreland B.H., Zanelli J.M. and Schulster D. Human growth hormone treatment of hypophysectomized rats increases the proportion of type-1 fibres in skeletal muscle. *J Endocrinol.* 123: 429-35. 1989.

Balagopal P., Rooyackers O.E., Adey D.B., Ades P.A. and Nair K.S. Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol.* 273: E790-800. <u>1997</u>.

Balagopal P., Schimke J.C., Ades P., Adey D. and Nair K.S. Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280: E203-8. 2001.

Baldwin K.M., Caiozzo V.J., Haddad F., Baker M.J. and Herrick R.E. The effects of space flight on the contractile apparatus of antigravity muscles: implications for aging and deconditioning. *J Gravit Physiol.* 1: P8-11. <u>1994</u>.

Bastide B., Kischel P., Puterflam J., Stevens L., Pette D., Jin J.P. and Mounier Y. Expression and functional implications of troponin T isoforms in soleus muscle fibers of rat after unloading. *Pflugers Arch.* 444: 345-52. 2002.

Benson D.W., Foley-Nelson T., Chance W.T., Zhang F.S., James J.H. and Fischer J.E. Decreased myofibrillar protein breakdown following treatment with clenbuterol. *J Surg Res.* 50: 1-5. <u>1991</u>.

Bergamini E. Protein degradation and modification. Introduction and overview. Ann N Y Acad Sci. 663: 43-7. 1992.

Bigard A.X., Brunet A., Guezennec C.Y. and Monod H. Skeletal muscle changes after endurance training at high altitude. *J Appl Physiol.* 71: 2114-21. <u>1991</u>.

Bigard A.X., Sanchez H., Birot O. and Serrurier B. Myosin heavy chain composition of skeletal muscles in young rats growing under hypobaric hypoxia conditions. *J Appl Physiol.* 88: 479-86. 2000a.

Bigard X., Sanchez H., Zoll J., Mateo P., Rousseau V., Veksler V. and Ventura-Clapier R. Calcineurin Coregulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *J Biol Chem.* 275: 19653-60. 2000b.

Biral D., Damiani E., Margreth A. and Scarpini E. Myosin subunit composition in human developing muscle. Biochem J. 224: 923-31. <u>1984</u>.

Black B.L. and Olson E.N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14: 167-96. <u>1998</u>.

Blewett C. and Elder G.C. Quantitative EMG analysis in soleus and plantaris during hindlimb suspension and recovery. *J Appl Physiol.* 74: 2057-66. <u>1993</u>.

Blumenthal D.K. and Stull J.T. Activation of skeletal muscle myosin light chain kinase by calcium(2+) and calmodulin. *Biochemistry*. 19: 5608-14. <u>1980</u>.

Booth F.W. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. J Appl Physiol. 52: 1113-8. 1982.

Booth F.W. Terrestrial applications of bone and muscle research in microgravity. Adv Space Res. 14: 373-6. 1994.

Booth F.W. and Baldwin K.M. Muscle plasticity: energy demanding and supply processes. *In: Rowell LB, Shepherd JT (eds). Handbook of physiology. Oxford University Press, New York,* <u>1995</u>.

Bouet V., Gahery Y. and Lacour M. Behavioural changes induced by early and long-term gravito-inertial force modification in the rat. *Behav Brain Res.* 139: 97-104. 2003.

Bozzo C., Stevens L., Toniolo L., Mounier Y. and Reggiani C. Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285: C575-83. <u>2003</u>.

Bozzo C., Stevens L., Bouet V., Montel V., Picquet F., Falempin M., Lacour M. and Mounier Y. Hypergravity from conception to adult stage: effects on contractile properties and skeletal muscle phenotype. *J Exp Biol.* 207: 2793-802. <u>2004</u>.

Brady L.J., Goodman M.N., Kalish F.N. and Ruderman N.B. Insulin binding and sensitivity in rat skeletal muscle: effect of starvation. *Am J Physiol.* 240: E184-90. <u>1981</u>.

Braun T. and Arnold H.H. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *Embo J.* 14: 1176-86. <u>1995</u>.

Brenner B., Yu L.C. and Podolsky R.J. X-ray diffraction evidence for cross-bridge formation in relaxed muscle fibers at various ionic strengths. *Biophys J* 46: 299-306. <u>1984</u>.

Brenner B. Effect of Ca2+ on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85: 3265-9. <u>1988</u>.

Buller A.J., Eccles J.C. and Eccles R.M. Interactions between motoneurones and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J Physiol.* 150: 417-39. <u>1960</u>.

Buller A.J. and Lewis D.M. Some Observations on the Effects of Tenotomy in the Rabbit. *J Physiol.* 178: 326-42. <u>1965</u>.

Buonanno A., Cheng J., Venepally P., Weis J. and Calvo S. Activity-dependent regulation of muscle genes: repressive and stimulatory effects of innervation. *Acta Physiol Scand.* 163: S17-26. <u>1998</u>.

Butler-Browne G.S., Bugaisky L.B., Cuenoud S., Schwartz K. and Whalen R.G. Denervation of newborn rat muscle does not block the appearance of adult fast myosin heavy chain. *Nature*. 299: 830-3. <u>1982</u>.

Butler-Browne G.S., Herlicoviez D. and Whalen R.G. Effects of hypothyroidism on myosin isozyme transitions in developing rat muscle. *FEBS Lett.* 166: 71-5. <u>1984</u>.

Butler-Browne G.S., Eriksson P.O., Laurent C. and Thornell L.E. Adult human masseter muscle fibers express myosin isozymes characteristic of development. *Muscle Nerve.* 11: 610-20. <u>1988</u>.

Caiozzo V.J., Herrick R.E. and Baldwin K.M. Influence of hyperthyroidism on maximal shortening velocity and myosin isoform distribution in skeletal muscles. *Am J Physiol.* 261: C285-95. <u>1991</u>.

Caiozzo V.J., Baker M.J., Herrick R.E., Tao M. and Baldwin K.M. Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J Appl Physiol.* 76: 1764-73. <u>1994</u>.

Campione M., Ausoni S., Guezennec C.Y. and Schiaffino S. Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J Appl Physiol.* 74: 1156-60. <u>1993</u>.

Carraro U., Dalla Libera L. and Catani C. Myosin light and heavy chains in muscle regenerating in absence of the nerve: transient appearance of the embryonic light chain. *Exp Neurol.* 79: 106-17. <u>1983</u>.

Cheung H.C., Wang C.K. and Malik N.A. Interactions of troponin subunits: free energy of binary and ternary complexes. *Biochemistry*. 26: 5904-7. <u>1987</u>.

Chin E.R. and Allen D.G. The role of elevations in intracellular [Ca2+] in the development of low frequency fatigue in mouse single muscle fibres. *J Physiol.* 491 (Pt 3): 813-24. <u>1996</u>.

Chin E.R., Olson E.N., Richardson J.A., Yang Q., Humphries C., Shelton J.M., Wu H., Zhu W., Bassel-Duby R. and Williams R.S. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* 12: 2499-509. <u>1998</u>.

Chomczynski P. and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-9, <u>1987</u>.

Cieniewski-Bernard C., Bastide B., Lefebvre T., Lemoine J., Mounier Y. and Michalski J.C. Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 3: 577-85. 2004.

Cohen P.T. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. J Cell Sci. 115: 241-56. 2002.

Comer F.I. and Hart G.W. O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 1473: 161-71. <u>1999</u>.

Condon K., Silberstein L., Blau H.M. and Thompson W.J. Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. *Dev Biol.* 138: 256-74. <u>1990a</u>.

Condon K., Silberstein L., Blau H.M. and Thompson W.J. Differentiation of fiber types in aneural musculature of the prenatal rat hindlimb. *Dev Biol.* 138: 275-95. <u>1990b</u>.

Cooke R., Franks K. and Stull J.T. Myosin phosphorylation regulates the ATPase activity of permeable skeletal muscle fibers. *FEBS Lett.* 144: 33-7. <u>1982</u>.

Crabtree G.R. and Olson E.N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*. 109 Suppl: S67-79. 2002.

Criswell D.S., Powers S.K. and Herb R.A. Clenbuterol-induced fiber type transition in the soleus of adult rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 74: 391-6. <u>1996</u>.

Crow M.T. and Kushmerick M.J. Myosin light chain phosphorylation is associated with a decrease in the energy cost for contraction in fast twitch mouse muscle. *J Biol Chem.* 257: 2121-4. <u>1982</u>.

Czerwinski S.M., Zak R., Kurowski T.T., Falduto M.T. and Hickson R.C. Myosin heavy chain turnover and glucocorticoid deterrence by exercise in muscle. *J Appl Physiol.* 67: 2311-5. <u>1989</u>.

D'albis A., Couteaux R., Janmot C., Roulet A. and Mira J.C. Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. *Eur J Biochem.* 174: 103-10. <u>1988a</u>.

D'albis A., Couteaux R., Mira J.C., Janmot C. and Roulet A. [Myosin isoforms synthesized during regeneration of fast contraction skeletal muscle regeneration, in the presence of motor nerve and after denervation. Study in adult rats and mice]. *Reprod Nutr Dev.* 28: 753-6. <u>1988b</u>.

D'albis A., Couteaux R., Janmot C. and Roulet A. Specific programs of myosin expression in the postnatal development of rat muscles. *Eur J Biochem.* 183: 583-90. <u>1989</u>.

D'albis A., Chanoine C., Janmot C., Mira J.C. and Couteaux R. Muscle-specific response to thyroid hormone of myosin isoform transitions during rat postnatal development. *Eur J Biochem.* 193: 155-61. <u>1990</u>.

Damer C.K., Partridge J., Pearson W.R. and Haystead T.A. Rapid identification of protein phosphatase 1binding proteins by mixed peptide sequencing and data base searching. Characterization of a novel holoenzymic form of protein phosphatase 1. *J Biol Chem.* 273: 24396-405. <u>1998</u>. Day D.A. and Tuite M.F. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. J Endocrinol. 157: 361-71. 1998.

De-Doncker L., Picquet F. and Falempin M. Effects of cutaneous receptor stimulation on muscular atrophy developed in hindlimb unloading condition. *J Appl Physiol.* 89: 2344-51. 2000.

De-Doncker L., Picquet F., Browne G.B. and Falempin M. Expression of myosin heavy chain isoforms along intrafusal fibers of rat soleus muscle spindles after 14 days of hindlimb unloading. *J Histochem Cytochem*. 50: 1543-54. 2002.

Denardi C., Ausoni S., Moretti P., Gorza L., Velleca M., Buckingham M. and Schiaffino S. Type 2Xmyosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J Cell Biol.* 123: 823-35. <u>1993</u>.

Dent P., Macdougall L.K., Mackintosh C., Campbell D.G. and Cohen P. A myofibrillar protein phosphatase from rabbit skeletal muscle contains the beta isoform of protein phosphatase-1 complexed to a regulatory subunit which greatly enhances the dephosphorylation of myosin. *Eur J Biochem.* 210: 1037-44. <u>1992</u>.

Desplanches D., Mayet M.H., Sempore B. and Flandrois R. Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J Appl Physiol.* 63: 558-63. <u>1987</u>.

Desplanches D., Hoppeler H., Tuscher L., Mayet M.H., Spielvogel H., Ferretti G., Kayser B., Leuenberger M., Grunenfelder A. and Favier R. Muscle tissue adaptations of high-altitude natives to training in chronic hypoxia or acute normoxia. *J Appl Physiol.* 81: 1946-51. <u>1996</u>.

Deveci D., Marshall J.M. and Egginton S. Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281: H241-52. 2001.

Diffee G.M., Caiozzo V.J., Herrick R.E. and Baldwin K.M. Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. *Am J Physiol.* 260: C528-34. <u>1991</u>.

Diffee G.M., Mccue S., Larosa A., Herrick R.E. and Baldwin K.M. Interaction of various mechanical activity models in regulation of myosin heavy chain isoform expression. *J Appl Physiol.* 74: 2517-22. <u>1993</u>.

Dodd S.L., Powers S.K., Vrabas I.S., Criswell D., Stetson S. and Hussain R. Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 28: 669-76. <u>1996</u>.

Duclert A., Piette J. and Changeux J.P. Influence of innervation of myogenic factors and acetylcholine receptor alpha-subunit mRNAs. *Neuroreport.* 2: 25-8. <u>1991</u>.

Dulhunty A.F. Excitation-contraction coupling and contractile properties in denervated rat EDL and soleus muscles. *J Muscle Res Cell Motil.* 6: 207-25. <u>1985</u>.

Dunn S.E. and Michel R.N. Differential sensitivity of myosin-heavy-chain-typed fibers to distinct aggregates of nerve-mediated activation. *Pflugers Arch.* 437: 432-40. <u>1999</u>.

Dupont-Versteegden E.E., Houle J.D., Gurley C.M. and Peterson C.A. Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am J Physiol.* 275: C1124-33. <u>1998</u>.

Eastwood A.B., Wood D.S., Bock K.L. and Sorenson M.M. Chemically skinned mammalian skeletal muscle. I. The structure of skinned rabbit psoas. *Tissue Cell*. 11: 553-66. <u>1979</u>.

222

Effimie R., Brenner H.R. and Buonanno A. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 1349-53. <u>1991</u>.

Eibschutz B., Lopaschuk G.D., Mcneill J.H. and Katz S. Ca2+-transport in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum of the chronically diabetic rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 45: 301-4. <u>1984</u>.

Emery P.W., Rothwell N.J., Stock M.J. and Winter P.D. Chronic effects of beta 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci Rep.* 4: 83-91. <u>1984</u>.

Falempin M., Leclercq T., Leterme D. and Mounier Y. Time-course of soleus muscle-change in and-recovery from disuse atrophy. *Physiologist.* 33: S88-9. <u>1990</u>.

Fitts R.H., Winder W.W., Brooke M.H., Kaiser K.K. and Holloszy J.O. Contractile, biochemical, and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle. *Am J Physiol.* 238: C14-20. <u>1980</u>.

Fitts R.H., Metzger J.M., Riley D.A. and Unsworth B.R. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J Appl Physiol.* 60: 1946-53. <u>1986</u>.

Florini J.R. and Magri K.A. Effects of growth factors on myogenic differentiation. Am J Physiol. 256: C701-11. <u>1989</u>.

Fluck M. and Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 146: 159-216. 2003.

Friday B.B., Mitchell P.O., Kegley K.M. and Pavlath G.K. Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation*. 71: 217-27. 2003.

Fujioka M., Takahashi N., Odai H., Araki S., Ichikawa K., Feng J., Nakamura M., Kaibuchi K., Hartshorne D.J., Nakano T. and Ito M. A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics.* 49: 59-68. <u>1998</u>.

Furst D.O., Osborn M., Nave R. and Weber K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol.* 106: 1563-72. <u>1988</u>.

Gailly P., Wu X., Haystead T.A., Somlyo A.P., Cohen P.T., Cohen P. and Somlyo A.V. Regions of the 110kDa regulatory subunit M110 required for regulation of myosin-light-chain-phosphatase activity in smooth muscle. *Eur J Biochem.* 239: 326-32. <u>1996</u>.

Gao Z.H., Moomaw C.R., Hsu J., Slaughter C.A. and Stull J.T. Autophosphorylation of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Biochemistry*. 31: 6126-33. <u>1992</u>.

Gardetto P.R., Schluter J.M. and Fitts R.H. Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. *J Appl Physiol.* 66: 2739-49. <u>1989</u>.

Germinario E., Esposito A., Megighian A., Midrio M., Biral D., Betto R. and Danieli-Betto D. Early changes of type 2B fibers after denervation of rat EDL skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 92: 2045-52. 2002.

Goldberg A.L. and Goodman H.M. Amino acid transport during work-induced growth of skeletal muscle. Am J Physiol. 216: 1111-5. <u>1969</u>.

Goldspink D.F., Morton A.J., Loughna P. and Goldspink G. The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflugers Arch.* 407: 333-40. <u>1986</u>.

Gonzalez B., Negredo P., Hernando R. and Manso R. Protein variants of skeletal muscle regulatory myosin light chain isoforms: prevalence in mammals, generation and transitions during muscle remodelling. *Pflugers Arch.* 443: 377-86. 2002.

Greaser M.L. and Gergely J. Reconstitution of troponin activity from three protein components. J Biol Chem. 246: 4226-33. 1971.

Griggs R.C., Kingston W., Jozefowicz R.F., Herr B.E., Forbes G. and Halliday D. Effect of testosterone on muscle mass and muscle protein synthesis. *J Appl Physiol.* 66: 498-503. <u>1989</u>.

Gundersen K. Early effects of denervation on isometric and isotonic contractile properties of rat skeletal muscles. *Acta Physiol Scand.* 124: 549-55. <u>1985</u>.

Gundersen K. Determination of muscle contractile properties: the importance of the nerve. *Acta Physiol Scand.* 162: 333-41. <u>1998</u>.

Haddad F., Herrick R.E., Adams G.R. and Baldwin K.M. Myosin heavy chain expression in rodent skeletal muscle: effects of exposure to zero gravity. *J Appl Physiol.* 75: 2471-7. <u>1993</u>.

Harris A.J., Fitzsimons R.B. and Mcewan J.C. Neural control of the sequence of expression of myosin heavy chain isoforms in foetal mammalian muscles. *Development*. 107: 751-69. <u>1989</u>.

Hartner K.T., Kirschbaum B.J. and Pette D. The multiplicity of troponin T isoforms. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur J Biochem.* 179: 31-8. <u>1989</u>.

Hartner K.T. and Pette D. Fast and slow isoforms of troponin I and troponin C. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur J Biochem.* 188: 261-7. <u>1990</u>.

Haselgrove J.C. and Huxley H.E. X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament model in actively contracting skeletal muscle. *J Mol Biol.* 77: 549-68. <u>1973</u>.

Heeley D.H., Golosinska K. and Smillie L.B. The effects of troponin T fragments T1 and T2 on the binding of nonpolymerizable tropomyosin to F-actin in the presence and absence of troponin I and troponin C. *J Biol Chem.* 262: 9971-8. <u>1987</u>.

Heeley D.H. Investigation of the effects of phosphorylation of rabbit striated muscle alpha alpha-tropomyosin and rabbit skeletal muscle troponin-T. *Eur J Biochem.* 221: 129-37. <u>1994</u>.

Hennig R. and Lomo T. Firing patterns of motor units in normal rats. Nature. 314: 164-6. 1985.

Herzberg O., Moult J. and James M.N. A model for the Ca2+-induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J Biol Chem.* 261: 2638-44. <u>1986</u>.

Hoey T., Sun Y.L., Williamson K. and Xu X. Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity*. 2: 461-72. <u>1995</u>.

Holmang A. Metabolic effect of steroïd hormones in skeletal muscle. BAM. 3: 133-141. 1993.

Holmes K.C. Muscle proteins--their actions and interactions. Curr Opin Struct Biol. 6: 781-9. 1996.

Holy X. and Mounier Y. Effects of short spaceflights on mechanical characteristics of rat muscles. *Muscle Nerve.* 14: 70-8. 1991.

Hughes S.M., Taylor J.M., Tapscott S.J., Gurley C.M., Carter W.J. and Peterson C.A. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*. 118: 1137-47. <u>1993</u>.

Hughes S.M., Chi M.M., Lowry O.H. and Gundersen K. Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J Cell Biol.* 145: 633-42. <u>1999</u>.

Huxley A.F. Muscle structure and theories of contraction. Prog Biophys Biophys Chem. 7: 255-318. 1957.

Huxley AF, Simmons RM. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature*. 233:533-8. 1971

Huxley A.F. A note suggesting that the cross-bridge attachment during muscle contraction may take place in two stages. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 183: 83-6. <u>1973</u>.

Ianuzzo D., Patel P., Chen V., O'brien P. and Williams C. Thyroidal trophic influence on skeletal muscle myosin. *Nature*. 270: 74-6. <u>1977</u>.

Ikebe M. and Hartshorne D.J. Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *J Biol Chem.* 260: 10027-31. <u>1985</u>.

Ikebe M., Inagaki M., Kanamaru K. and Hidaka H. Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by Ca2+-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 260: 4547-50. <u>1985</u>.

Ikebe M. and Reardon S. Phosphorylation of smooth myosin light chain kinase by smooth muscle Ca2+/calmodulin-dependent multifunctional protein kinase. *J Biol Chem.* 265: 8975-8. <u>1990a</u>.

Ikebe M. and Reardon S. Phosphorylation of bovine platelet myosin by protein kinase C. *Biochemistry*. 29: 2713-20. <u>1990b</u>.

Ishihara A., Itoh K., Oishi Y., Itoh M., Hirofuji C. and Hayashi H. Effects of hypobaric hypoxia on histochemical fibre-type composition and myosin heavy chain isoform component in the rat soleus muscle. *Pflugers Arch.* 429: 601-6. <u>1995</u>.

Ito M., Feng J., Tsujino S., Inagaki N., Inagaki M., Tanaka J., Ichikawa K., Hartshorne D.J. and Nakano T. Interaction of smooth muscle myosin phosphatase with phospholipids. *Biochemistry*. 36: 7607-14. <u>1997</u>.

Itoh K., Itoh M., Ishihara A., Hirofuji C. and Hayashi H. Influence of 12 weeks of hypobaric hypoxia on fibre type composition of the rat soleus muscle. *Acta Physiol Scand.* 154: 417-8. <u>1995</u>.

Izumo S., Nadal-Ginard B. and Mahdavi V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science*. 231: 597-600. <u>1986</u>.

Jin J.P., Chen A. and Huang Q.Q. Three alternatively spliced mouse slow skeletal muscle troponin T isoforms: conserved primary structure and regulated expression during postnatal development. *Gene.* 214: 121-9. <u>1998</u>.

Jockusch H., Reininghaus J., Stuhlfauth I. and Zippel M. Reduction of myosin-light-chain phosphorylation and of parvalbumin content in myotonic mouse muscle and its reversal by tocainide. *Eur J Biochem.* 171: 101-5. 1988.

Johnson T.L. and Klueber K.M. Skeletal muscle following tonic overload: functional and structural analysis. *Med Sci Sports Exerc.* 23: 49-55. <u>1991</u>.

Kamm K.E. and Stull J.T. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 25: 593-620. <u>1985</u>.

Kelsen S.G., Ference M. and Kapoor S. Effects of prolonged undernutrition on structure and function of the diaphragm. *J Appl Physiol.* 58: 1354-9. <u>1985</u>.

Kimura K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., Feng J., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A. and Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 273: 245-8. <u>1996</u>.

Kirschbaum B.J., Heilig A., Hartner K.T. and Pette D. Electrostimulation-induced fast-to-slow transitions of myosin light and heavy chains in rabbit fast-twitch muscle at the mRNA level. *FEBS Lett.* 243: 123-6. <u>1989a</u>.

Kirschbaum B.J., Simoneau J.A., Bar A., Barton P.J., Buckingham M.E. and Pette D. Chronic stimulationinduced changes of myosin light chains at the mRNA and protein levels in rat fast-twitch muscle. *Eur J Biochem.* 179: 23-9. <u>1989b</u>.

Kirschbaum B.J., Schneider S., Izumo S., Mahdavi V., Nadal-Ginard B. and Pette D. Rapid and reversible changes in myosin heavy chain expression in response to increased neuromuscular activity of rat fast-twitch muscle. *FEBS Lett.* 268: 75-8. <u>1990</u>.

Kischel P., Bastide B., Stevens L. and Mounier Y. Expression and functional behavior of troponin C in soleus muscle fibers of rat after hindlimb unloading. *J Appl Physiol.* 90: 1095-101. 2001a.

Kischel P., Stevens L., Montel V., Picquet F. and Mounier Y. Plasticity of monkey triceps muscle fibers in microgravity conditions. *J Appl Physiol.* 90: 1825-32. 2001b.

Kita F., Koike K., Metori K., et Takahashi S. Protein synthesis in fast and slow muscles of developing cockerels loading with 2G for 3 weeks. *Aviat. Space Environ. Med.* 69: 145-148, <u>1998</u>

Klitgaard H., Marc R., Brunet A., Vandewalle H. and Monod H. Contractile properties of old rat muscles: effect of increased use. *J Appl Physiol.* 67: 1401-8. <u>1989</u>.

Kraus B. and Pette D. Quantification of MyoD, myogenin, MRF4 and Id-1 by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in rat muscles--effects of hypothyroidism and chronic low-frequency stimulation. *Eur J Biochem.* 247: 98-106. 1997.

Lanz J.K., Jr., Donahoe M., Rogers R.M. and Ontell M. Effects of growth hormone on diaphragmatic recovery from malnutrition. *J Appl Physiol.* 73: 801-5. <u>1992</u>.

Larsson L., Ansved T., Edstrom L., Gorza L. and Schiaffino S. Effects of age on physiological, immunohistochemical and biochemical properties of fast-twitch single motor units in the rat. *J Physiol.* 443: 257-75. <u>1991</u>.

Larsson L., Biral D., Campione M. and Schiaffino S. An age-related type IIB to IIX myosin heavy chain switching in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 147: 227-34. <u>1993</u>.

Larsson L., Muller U., Li X. and Schiaffino S. Thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoform composition in young and old rats, with special reference to IIX myosin. *Acta Physiol Scand.* 153: 109-16. 1995.

Leeuw T., Kapp M. and Pette D. Role of innervation for development and maintenance of troponin subunit isoform patterns in fast- and slow-twitch muscles of the rabbit. *Differentiation*. 55: 193-201. 1994.

Leijendekker W.J. and Van Hardeveld C. Structural and functional aspects of the actomyosin complex from fast-twitch muscle of euthyroid and hypothyroid rats. *Pflugers Arch.* 410: 48-54. <u>1987</u>.

Leszyk J., Grabarek Z., Gergely J. *et al.*ins J.H. Characterization of zero-length cross-links between rabbit skeletal muscle troponin C and troponin I: evidence for direct interaction between the inhibitory region of troponin I and the NH2-terminal, regulatory domain of troponin C. *Biochemistry*. 29: 299-304. <u>1990</u>.

Leterme D. and Falempin M. EMG activity of three rat hindlimb muscles during microgravity and hypergravity phase of parabolic flight. *Aviat Space Environ Med.* 69: 1065-70. <u>1998</u>.

Levine R.J., Kensler R.W., Yang Z., Stull J.T. and Sweeney H.L. Myosin light chain phosphorylation affects the structure of rabbit skeletal muscle thick filaments. *Biophys J.* 71: 898-907. <u>1996</u>.

Lexell J., Taylor C.C. and Sjostrom M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci.* 84: 275-94. <u>1988</u>.

Lomo T., Westgaard R.H. and Dahl H.A. Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 187: 99-103. <u>1974</u>.

Lowey S., Slayter H.S., Weeds A.G. and Baker H. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol.* 42: 1-29. <u>1969</u>.

Mak A., Smillie L.B. and Barany M. Specific phosphorylation at serine-283 of alpha tropomyosin from frog skeletal and rabbit skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75: 3588-92. <u>1978</u>.

Malnic B. and Reinach F.C. Assembly of functional skeletal muscle troponin complex in Escherichia coli. *Eur J Biochem.* 222: 49-54. <u>1994</u>.

Manning D.R. and Stull J.T. Myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation in mammalian skeletal muscle. *Am J Physiol.* 242: C234-41. <u>1982</u>.

Marieb E.N. Anatomies et physiologie humaines. Deuxième édition. Edition deBoeck. 1114. 1993.

Martin W. D. Time course of change in soleus muscle fibers of rats subjected to chronic centrifugation. Aviat. Space Environ. Med. 49(6): 792-797, <u>1978</u>

Martin W. D. Effects of chronic centrifugation on skeletal muscle fibers in young developing rats. Aviat. Space Environ. Med. 51(5): 473-479, <u>1980</u>

Martrette J. M., Hartmann N., Vonau S., et Westphal A. Effects of pre- and perinatal exposure to hypergravity on muscular structure development in rat. Journal of Research and Cell Motility 19: 689-694, 1998

Mccullagh K.J., Calabria E., Pallafacchina G., Ciciliot S., Serrano A.L., Argentini C., Kalhovde J.M., Lomo T. and Schiaffino S. NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 10590-5. <u>2004</u>.

Metzger J.M., Greaser M.L. and Moss R.L. Variations in cross-bridge attachment rate and tension with phosphorylation of myosin in mammalian skinned skeletal muscle fibers. Implications for twitch potentiation in intact muscle. *J Gen Physiol.* 93: 855-83. <u>1989</u>.

Michel J.B., Ordway G.A., Richardson J.A. and Williams R.S. Biphasic induction of immediate early gene expression accompanies activity-dependent angiogenesis and myofiber remodeling of rabbit skeletal muscle. *J Clin Invest.* 94: 277-85. <u>1994</u>.

Midrio M., Danieli-Betto D., Megighian A., Velussi C., Catani C. and Carraro U. Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscle of the rat, in the presence of an antifibrillatory drug. *Pflugers Arch.* 420: 446-50. <u>1992</u>.

Midrio M., Danieli-Betto D., Esposito A., Megighian A., Carraro U., Catani C. and Rossini K. Lack of type 1 and type 2A myosin heavy chain isoforms in rat slow muscle regenerating during chronic nerve block. *Muscle Nerve.* 21: 226-32. <u>1998</u>.

Miller J.R., Silver P.J. and Stull J.T. The role of myosin light chain kinase phosphorylation in beta-adrenergic relaxation of tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 24: 235-42. <u>1983</u>.

Moisecu D. G. et Thieleczek R. Sarcomere length effects on the Sr^{2+} and Ca^{2+} -activation curves in skinned frog muscle fibers. *Biochimica et Biophysica Acta* 546 : 64-76, <u>1979</u>

Molkentin J.D., Black B.L., Martin J.F. and Olson E.N. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell.* 83: 1125-36. <u>1995</u>.

Molkentin J.D., Lu J.R., Antos C.L., Markham B., Richardson J., Robbins J., Grant S.R. and Olson E.N. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 93: 215-28. <u>1998</u>.

Moore K.J., Testa J.R., Francke U., Milatovich A., Copeland N.G. and Jenkins N.A. Cloning and regional assignment of the human myosin heavy chain 12 (MYH12) gene to chromosome band 15q21. *Cytogenet Cell Genet.* 69: 53-8. 1995.

Moore R.L. and Stull J.T. Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscles in situ. Am J Physiol. 247: C462-71. <u>1984</u>.

Moore R.L., Houston M.E., Iwamoto G.A. and Stull J.T. Phosphorylation of rabbit skeletal muscle myosin in situ. *J Cell Physiol.* 125: 301-5. <u>1985</u>.

Moorhead G., Johnson D., Morrice N. and Cohen P. The major myosin phosphatase in skeletal muscle is a complex between the beta-isoform of protein phosphatase 1 and the MYPT2 gene product. *FEBS Lett.* 438: 141-4. 1998.

Morano I., Wankerl M., Bohm M., Erdmann E. and Ruegg J.C. Myosin P-light chain isoenzymes in the human heart: evidence for diphosphorylation of the atrial P-LC form. *Basic Res Cardiol.* 84: 298-305. 1989.

Morano I., Adler K., Agostini B. and Hasselbach W. Expression of myosin heavy and light chains and phosphorylation of the phosphorylatable myosin light chain in the heart ventricle of the European hamster during hibernation and in summer. *J Muscle Res Cell Motil.* 13: 64-70. <u>1992</u>.

Morey E.R., Sabelman E.E., Turner R.T. and Baylink D.J. A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist*. 22: S23-4. <u>1979</u>.

Mounier Y., Holy X. and Stevens L. Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pflugers Arch.* 415: 136-41. <u>1989</u>.

Musaro A., Mccullagh K.J., Naya F.J., Olson E.N. and Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*. 400: 581-5. <u>1999</u>.

Noland T.A., Jr. and Kuo J.F. Protein kinase C phosphorylation of cardiac troponin I and troponin T inhibits Ca(2+)-stimulated MgATPase activity in reconstituted actomyosin and isolated myofibrils, and decreases actimmyosin interactions. *J Mol Cell Cardiol.* 25: 53-65. <u>1993</u>. Nonaka I., Miyazawa M., Sukegawa T., Yonemoto K. and Kato T. Muscle fiber atrophy and degeneration induced by experimental immobility and hindlimb suspension. *Int J Sports Med.* 18 Suppl 4: S292-4. <u>1997</u>.

Nudel U., Calvo J.M., Shani M. and Levy Z. The nucleotide sequence of a rat myosin light chain 2 gene. *Nucleic Acids Res.* 12: 7175-86. <u>1984</u>.

Ohlendieck K., Fromming G.R., Murray B.E., Maguire P.B., Leisner E., Traub I. and Pette D. Effects of chronic low-frequency stimulation on Ca2+-regulatory membrane proteins in rabbit fast muscle. *Pflugers Arch.* 438: 700-8. 1999.

Olson E.N., Perry M. and Schulz R.A. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol.* 172: 2-14. <u>1995</u>.

Orentlicher M., Brandt P. W., et Reuben . Regulation of tension in skinned muscle fibers : effect of high concentrations of Mg-ATP. Am. J. Physiol 233(5) : C127-C134, 1977

Parry D.A. and Squire J.M. Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the x-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles. *J Mol Biol.* 75: 33-55. <u>1973</u>.

Perrie W.T., Smillie L.B. and Perry S.B. A phosphorylated light-chain component of myosin from skeletal muscle. *Biochem J.* 135: 151-64. <u>1973</u>.

Pette D. and Staron R.S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 116: 1-76. <u>1990</u>.

Pette D. and Vrbova G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 120: 115-202. <u>1992</u>.

Pette D. and Staron R.S. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. Int Rev Cytol. 170: 143-223. 1997.

Pette D. Training effects on the contractile apparatus. Acta Physiol Scand. 162: 367-76. 1998.

Picquet F., Stevens L., Butler-Browne G.S. and Mounier Y. Contractile properties and myosin heavy chain composition of newborn rat soleus muscles at different stages of postnatal development. J Muscle Res Cell Motil. 18: 71-9. <u>1997</u>.

Picquet F., Stevens L., Butler-Browne G.S. and Mounier Y. Differential effects of a six-day immobilization on newborn rat soleus muscles at two developmental stages. *J Muscle Res Cell Motil.* 19: 743-55. <u>1998</u>.

Picquet F., De-Doncker L. and Falempin M. Expression of Myosin heavy chain isoforms in rat soleus muscle spindles after 19 days of hypergravity. *J Histochem Cytochem.* 51: 1479-89. 2003.

Picquet F. and Falempin M. Compared effects of hindlimb unloading versus terrestrial deafferentation on muscular properties of the rat soleus. *Exp Neurol.* 182: 186-94. 2003.

Pieples K. and Wieczorek D.F. Tropomyosin 3 increases striated muscle isoform diversity. *Biochemistry*. 39: 8291-7. 2000.

Pires E.M. and Perry S.V. Purification and properties of myosin light-chain kinase from fast skeletal muscle. Biochem J. 167: 137-46. <u>1977</u>. Polla B., Bottinelli R., Sandoli D., Sardi C. and Reggiani C. Cortisone-induced changes in myosin heavy chain distribution in respiratory and hindlimb muscles. *Acta Physiol Scand.* 151: 353-61. <u>1994</u>.

Potter J.D., Sheng Z., Pan B.S. and Zhao J. A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca2+ regulation of muscle contraction. *J Biol Chem.* 270: 2557-62. <u>1995</u>.

Rao A., Luo C. and Hogan P.G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annu Rev Immunol. 15: 707-47. 1997.

Rayment I., Holden H.M., Whittaker M., Yohn C.B., Lorenz M., Holmes K.C. and Milligan R.A. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*. 261: 58-65. <u>1993a</u>.

Rayment I., Rypniewski W.R., Schmidt-Base K., Smith R., Tomchick D.R., Benning M.M., Winkelmann D.A., Wesenberg G. and Holden H.M. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*. 261: 50-8. <u>1993b</u>.

Rayment I. and Holden H.M. The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem Sci.* 19: 129-34. <u>1994</u>.

Reggiani C. and Te Kronnie G. Muscle plasticity and high troughput gene expression studies. J Muscle Res Cell Motil. 25: 231-234. 2004.

Ricart-Firinga C., Stevens L., Canu M.H., Nemirovskaya T.L. and Mounier Y. Effects of beta(2)-agonist clenbuterol on biochemical and contractile properties of unloaded soleus fibers of rat. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278: C582-8. 2000.

Riley D.A., Slocum G.R., Bain J.L., Sedlak F.R., Sowa T.E. and Mellender J.W. Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J Appl Physiol.* 69: 58-66. 1990.

Riley D.A., Bain J.L., Thompson J.L., Fitts R.H., Widrick J.J., Trappe S.W., Trappe T.A. and Costill D.L. Decreased thin filament density and length in human atrophic soleus muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol.* 88: 567-72. 2000.

Ritz-Gold C.J., Cooke R., Blumenthal D.K. and Stull J.T. Light chain phosphorylation alters the conformation of skeletal muscle myosin. *Biochem Biophys Res Commun.* 93: 209-14. <u>1980</u>.

Robertson S.P., Johnson J.D. and Potter J.D. The time-course of Ca2+ exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca2+. *Biophys J.* 34: 559-69. 1981.

Roush C.L., Kennelly P.J., Glaccum M.B., Helfman D.M., Scott J.D. and Krebs E.G. Isolation of the cDNA encoding rat skeletal muscle myosin light chain kinase. Sequence and tissue distribution. *J Biol Chem.* 263: 10510-6. <u>1988</u>.

Roy R.R., Baldwin K.M., Martin T.P., Chimarusti S.P. and Edgerton V.R. Biochemical and physiological changes in overloaded rat fast- and slow-twitch ankle extensors. *J Appl Physiol.* 59: 639-46. 1985.

Roy R. R., Roy M. E., Talmadge R. J., Mendoza R., Grindeland R. E., et Vasques M.. Size and myosin heavy chain profiles of rat hindlimb extensor muscle fibers after 2 weeks at 2G. *Aviat. Space Environ. Med.* 67 : 854-8, <u>1996</u>

Russell S.D., Cambon N., Nadal-Ginard B. and Whalen R.G. Thyroid hormone induces a nerve-independent precocious expression of fast myosin heavy chain mRNA in rat hindlimb skeletal muscle. *J Biol Chem.* 263: 6370-4. <u>1988</u>.

Russell S.D., Cambon N.A. and Whalen R.G. Two types of neonatal-to-adult fast myosin heavy chain transitions in rat hindlimb muscle fibers. *Dev Biol.* 157: 359-70. <u>1993</u>.

Salmons S. and Vrbova G. The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J Physiol.* 201: 535-49. <u>1969</u>.

Schiaffino S., Gorza L., Pitton G., Saggin L., Ausoni S., Sartore S. and Lomo T. Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and paralyzed rat skeletal muscle. *Dev Biol.* 127: 1-11. <u>1988</u>.

Schiaffino S. and Reggiani C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 77: 493-501. 1994.

Schiaffino S. and Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev.* 76: 371-423. <u>1996</u>.

Seene T. and Alev K. Effect of glucocorticoids on the turnover rate of actin and myosin heavy and light chains on different types of skeletal muscle fibres. *J Steroid Biochem.* 22: 767-71. <u>1985</u>.

Seene T., Kaasik P., Pehme A., Alev K. and Riso E.M. The effect of glucocorticoids on the myosin heavy chain isoforms' turnover in skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 86: 201-6. 2003.

Semsarian C., Wu M.J., Ju Y.K., Marciniec T., Yeoh T., Allen D.G., Harvey R.P. and Graham R.M. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca2+-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*. 400: 576-81. 1999.

Sillau A.H. and Banchero N. Effects of hypoxia on capillary density and fiber composition in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 370: 227-32. <u>1977</u>.

Somlyo A.P. and Somlyo A.V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 522 Pt 2: 177-85. 2000.

Sorkin A. and Waters C.M. Endocytosis of growth factor receptors. *Bioessays.* 15: 375-82. 1993.

Sreter F.A., Seidel J.C. and Gergely J. Studies on myosin from red and white skeletal muscles of the rabbit. I. Adenosine triphosphatase activity. *J Biol Chem.* 241: 5772-6. <u>1966</u>.

Sreter F.A., Lopez J.R., Alamo L., Mabuchi K. and Gergely J. Changes in intracellular ionized Ca concentration associated with muscle fiber type transformation. *Am J Physiol.* 253: C296-300. <u>1987</u>.

Staron R.S., Kraemer W.J., Hikida R.S., Reed D.W., Murray J.D., Campos G.E. and Gordon S.E. Comparison of soleus muscles from rats exposed to microgravity for 10 versus 14 days. *Histochem Cell Biol.* 110: 73-80. <u>1998</u>.

Stevens L. and Mounier Y. Evidences for slow to fast changes in the contractile proteins of rat soleus muscle after hindlimb suspension: studies on skinned fibers. *Physiologist.* 33: S90-1. <u>1990</u>.

Stevens L., Mounier Y., Holy X. and Falempin M. Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension. *J Appl Physiol.* 68: 334-40. <u>1990</u>.

Stevens L., Mounier Y. and Holy X. Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am J Physiol.* 264: R770-6. <u>1993</u>. Stevens L., Gohlsch B., Mounier Y. and Pette D. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in single fibers of unloaded rat soleus muscle. *FEBS Lett.* 463: 15-8. <u>1999a</u>.

Stevens L., Sultan K.R., Peuker H., Gohlsch B., Mounier Y. and Pette D. Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am J Physiol.* 277: C1044-9. 1999b.

Stevens L., Firinga C., Gohlsch B., Bastide B., Mounier Y. and Pette D. Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279: C1558-63. 2000.

Stevens L., Bastide B., Kischel P., Pette D. and Mounier Y. Time-dependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282: C1025-30. 2002.

Stevens L., Bozzo C., Nemirovskaya T., Montel V., Falempin M. and Mounier Y. Contractile properties of rat single muscle fibers and myosin and troponin isoform expression after hypergravity. *J Appl Physiol.* 94: 2398-405. 2003.

Stevens L., Bastide B., Bozzo C. and Mounier Y. Hybrid fibres under slow-to-fast transformations: expression is of myosin heavy and light chains in rat soleus muscle. *Pflugers Arch.* 448: 507-14. 2004.

Stevenson E.J., Giresi P.G., Koncarevic A. and Kandarian S.C. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 551: 33-48. 2003.

Stienen GJ. Chronicle of skinned muscle fibres. J Physiol. 15;527 Pt 1:1. 2000

Stull J.T., Nunnally M.H., Moore R.L. and Blumenthal D.K. Myosin light chain kinases and myosin phosphorylation in skeletal muscle. *Adv Enzyme Regul.* 23: 123-40. <u>1985</u>.

Sugiura T., Miyata H., Kawai Y., Matoba H. and Murakami N. Changes in myosin heavy chain isoform expression of overloaded rat skeletal muscles. *Int J Biochem.* 25: 1609-13. <u>1993</u>.

Sullivan V.K., Powers S.K., Criswell D.S., Tumer N., Larochelle J.S. and Lowenthal D. Myosin heavy chain composition in young and old rat skeletal muscle: effects of endurance exercise. *J Appl Physiol.* 78: 2115-20. 1995.

Suzuki S. and Yamamuro T. Long-term effects of estrogen on rat skeletal muscle. *Exp Neurol.* 87: 291-9. 1985.

Sweeney H.L. and Stull J.T. Alteration of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: implications for regulation of actin-myosin interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 414-8. 1990.

Sweeney H.L., Bowman B.F. and Stull J.T. Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am J Physiol.* 264: C1085-95. <u>1993</u>.

Szczesna D., Zhao J. and Potter J.D. The regulatory light chains of myosin modulate cross-bridge cycling in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 271: 5246-50. <u>1996</u>.

Szczesna D., Zhao J., Jones M., Zhi G., Stull J. and Potter J.D. Phosphorylation of the regulatory light chains of myosin affects Ca2+ sensitivity of skeletal muscle contraction. *J Appl Physiol.* 92: 1661-70. 2002.

Szczesna D. Regulatory light chains of striated muscle myosin. Structure, function and malfunction. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 3: 187-97. 2003.

Takagi A. et Endo M. Ginea pig soleus and extensor digitorum longus : a study on single-skinned fibers. *Exp.* Neurol.55 : 95-101, <u>1977</u>

Talmadge R.J., Roy R.R. and Edgerton V.R. Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weightbearing rat soleus muscle fibers. *J Appl Physiol.* 81: 2540-6. <u>1996</u>.

Talmadge R.J. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve*. 23: 661-79. 2000.

Tanokura M. and Ohtsuki I. Location of troponin I-binding on troponin T sequence. FEBS Lett. 145: 147-9. 1982.

Thomason D.B., Herrick R.E., Surdyka D. and Baldwin K.M. Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *J Appl Physiol.* 63: 130-7. <u>1987</u>.

Thomason D.B. and Booth F.W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol.* 68: 1-12. <u>1990</u>.

Timmerman L.A., Clipstone N.A., Ho S.N., Northrop J.P. and Crabtree G.R. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca2+ signals and immunosuppression. *Nature*. 383: 837-40. <u>1996</u>.

Trappe S., Costill D. and Thomas R. Effect of swim taper on whole muscle and single muscle fiber contractile properties. *Med Sci Sports Exerc.* 32: 48-56. 2000.

Trinick J. Titin and nebulin: protein rulers in muscle? Trends Biochem Sci. 19: 405-9. 1994.

Trujillo M., Candenas L., Cintado C.G., Magraner J., Fernandez J., Martin J.D. and Pinto F.M. Hormonal regulation of the contractile response induced by okadaic acid in the rat uterus. *J Pharmacol Exp Ther.* 296: 841-8. 2001.

Tubman L.A., Rassier D.E. and Macintosh B.R. Absence of myosin light chain phosphorylation and twitch potentiation in atrophied skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol.* 74: 723-8. <u>1996</u>.

Uyeda T.Q., Abramson P.D. and Spudich J.A. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc Natl Acad Sci US A*. 93: 4459-64. <u>1996</u>.

Van der Velden J, Papp Z, Boontje NM, Zaremba R, de Jong JW, Janssen PM, Hasenfuss G, Stienen GJ. Myosin light chain composition in non-failing donor and end-stage failing human ventricular myocardium. Adv Exp Med Biol. 538 : 3-15. 2003

Voytik S.L., Przyborski M., Badylak S.F. and Konieczny S.F. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. *Dev Dyn.* 198: 214-24. 1993.

Vrbova G. Changes in the motor reflexes produced by tenotomy. J Physiol. 166: 241-50. 1963.

Wada M., Hamalainen N., et Pette D. Isomyosin patterns of single type IIB, IID and IIA fibers from rabbit skeletal muscle. J. Muscle. Res. Cell Motil. 16: 237-242, 1995

Walsh M.P., Vallet B., Autric F. and Demaille J.G. Purification and characterization of bovine cardiac calmodulin-dependent myosin light chain kinase. *J Biol Chem.* 254: 12136-44. 1979.

Walters E.H., Stickland N.C. and Loughna P.T. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil.* 21: 647-53. 2000.

Wang C.K. and Cheung H.C. Energetics of the binding of calcium and troponin I to troponin C from rabbit skeletal muscle. *Biophys J.* 48: 727-39. <u>1985</u>.

Weis J., Kaussen M., Calvo S. and Buonanno A. Denervation induces a rapid nuclear accumulation of MRF4 in mature myofibers. *Dev Dyn.* 218: 438-51. 2000.

Westerblad H. and Allen D.G. Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. *J Gen Physiol.* 98: 615-35. <u>1991</u>.

Weydert A., Barton P., Harris A.J., Pinset C. and Buckingham M. Developmental pattern of mouse skeletal myosin heavy chain gene transcripts in vivo and in vitro. *Cell.* 49: 121-9. <u>1987</u>.

Wheeler M.T., Snyder E.C., Patterson M.N. and Swoap S.J. An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is required for gene expression in fast muscle. *Am J Physiol.* 276: C1069-78. <u>1999</u>.

White M.Y., Cordwell S.J., Mccarron H.C., Tchen A.S., Hambly B.D. and Jeremy R.W. Modifications of myosin-regulatory light chain correlate with function of stunned myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 35: 833-40. 2003.

Williams R.S., Salmons S., Newsholme E.A., Kaufman R.E. and Mellor J. Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 261: 376-80. <u>1986</u>.

Wilm M., Shevchenko A., Houthaeve T., Breit S., Schweigerer L., Fotsis T. and Mann M. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature.* 379: 466-9. 1996.

Windisch A., Gundersen K., Szabolcs M.J., Gruber H. and Lomo T. Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. *J Physiol (Lond)*. 510: 623-32. <u>1998</u>.

Winegrad S., Mcclellan G., Horowits R., Tucker M., Lin L.E. and Weisberg A. Regulation of cardiac contractile proteins by phosphorylation. *Fed Proc.* 42: 39-44. <u>1983</u>.

Wolf H. and Hofmann F. Purification of myosin light chain kinase from bovine cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77: 5852-5. <u>1980</u>.

Wood D.S., Zollman J., Reuben J.R. and Brandt P.W. Human skeletal muscle : properties of the "chemicaly skinned" fiber. *Science*. 187: 1075-1076. <u>1975</u>.

Wu H., Naya F.J., Mckinsey T.A., Mercer B., Shelton J.M., Chin E.R., Simard A.R., Michel R.N., Bassel-Duby R., Olson E.N. and Williams R.S. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *Embo J.* 19: 1963-73. 2000.

Wu H., Rothermel B., Kanatous S., Rosenberg P., Naya F.J., Shelton J.M., Hutcheson K.A., Dimaio J.M., Olson E.N., Bassel-Duby R. and Williams R.S. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *Embo J.* 20: 6414-23. 2001.

Yamamoto K. Characterization of H-protein, a component of skeletal muscle myofibrils. *J Biol Chem.* 259: 7163-8. <u>1984</u>.

Yang Z., Stull J.T., Levine R.J. and Sweeney H.L. Changes in interfilament spacing mimic the effects of myosin regulatory light chain phosphorylation in rabbit psoas fibers. *J Struct Biol.* 122: 139-48. 1998.

Zador E., Dux L. and Wuytack F. Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRNA levels of the muscle regulatory factors distributed along the entire length of the fibers. *J Muscle Res Cell Motil.* 20: 395-402. 1999.

