

THESE

Présentée

DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR

Formation doctorale : Biochimie

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Par

Rami JAAFAR

**Régulation de la voie mTOR par la phospholipase D dans le muscle
squelettique : Implication dans le contrôle
de la différenciation myogénique et de la taille des myocytes.**

Soutenance le 3 février 2011

JURY :	DR. GERARD CABELLO	RAPPORTEUR
	DR. PATRICE CODOGNO	RAPPORTEUR
	DR. DAMIEN FREYSSENET	RAPPORTEUR
	DR. YANN-GAEL GANGLOFF	EXAMINATEUR
	DR. FABIO NARO	EXAMINATEUR
	DR. GEORGES NEMOZ	DIRECTEUR DE THESE
	DR. HUBERT VIDAL	PRESIDENT

Cette thèse a été préparée au laboratoire Régulations Métaboliques Nutrition et Diabète,
UMR INSERM 870/INRA 1235, INSA de Lyon et Faculté de Médecine Lyon-Sud.

**INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales - Quadriennal
2007-2010**

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	<u>CHIMIE DE LYON</u> http://sakura.cpe.fr/ED206 M. Jean Marc LANCELIN Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université Claude Bernard Lyon 1 Bât CPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 Fax : lancelin@hikari.cpe.fr
E.E.A.	<u>ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</u> http://www.insa-lyon.fr/eea M. Alain NICOLAS Insa : C. PLOSSU ede2a@insa-lyon.fr Secrétariat : M. LABOUNE AM. 64.43 – Fax : 64.54	M. Alain NICOLAS Ecole Centrale de Lyon Bâtiment H9 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 eea@ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN
E2M2	<u>EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION</u> http://biomserv.univ-lyon1.fr/E2M2 M. Jean-Pierre FLANDROIS Insa : H. CHARLES	M. Jean-Pierre FLANDROIS CNRS UMR 5558 Université Claude Bernard Lyon 1 Bât G. Mendel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.26 23 59 50 Fax 04 26 23 59 49 06 07 53 89 13 e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr
EDISS	<u>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE</u> Sec : Safia Boudjema M. Didier REVEL Insa : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Cardiologique de Lyon Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69500 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16 Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFOMATHS	<u>INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES</u> http://infomaths.univ-lyon1.fr M. Alain MILLE	M. Alain MILLE Université Claude Bernard Lyon 1 LIRIS - INFOMATHS Bâtiment Nautibus 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44 82 94 Fax 04 72 43 13 10 infomaths@bat710.univ-lyon1.fr - alain.mille@liris.cnrs.fr
Matériaux	<u>MATERIAUX DE LYON</u> M. Jean Marc PELLETIER Secrétariat : C. BERNAVON 83.85	M. Jean Marc PELLETIER INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-marc.Pelletier@insa-lyon.fr
MEGA	<u>MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE</u> M. Jean Louis GUYADER Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12	M. Jean Louis GUYADER INSA de Lyon Laboratoire de Vibrations et Acoustique Bâtiment Antoine de Saint Exupéry 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.18.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 mega@lva.insa-lyon.fr
ScSo	<u>ScSo*</u> M. OBADIA Lionel Insa : J.Y. TOUSSAINT	M. OBADIA Lionel Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.88 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

RESUME

La caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation myogénique et le contrôle du phénotype musculaire est primordiale pour envisager de traiter l'atrophie musculaire associée au vieillissement et à certaines maladies, comme le diabète, le cancer, le sida. La phospholipase D (PLD) est une enzyme qui hydrolyse la phosphatidylcholine des membranes cellulaires en réponse à des stimuli extracellulaires, libérant le messager acide phosphatidique. Une implication de la PLD a été démontrée dans de multiples fonctions, comme la réorganisation du cytosquelette, le trafic vésiculaire, la prolifération et la survie cellulaires. La capacité de la PLD à influencer sur la voie de signalisation de mTOR, acteur central dans le contrôle du tissu musculaire, nous a incités à étudier son rôle dans ce tissu.

Le rôle de la PLD dans le muscle squelettique est encore mal défini. Les travaux de ma thèse ont pour but d'étudier les mécanismes par lesquels la PLD intervient dans la différenciation myogénique, ainsi que son influence sur la régulation de la masse musculaire.

L'activation de la PLD par la vasopressine dans les myoblastes L6 induit leur différenciation en myotubes. Nous montrons que le mécanisme par lequel la PLD contrôle la différenciation des myoblastes met en jeu l'activation des deux complexes mTORC1 et mTORC2. mTORC2 active la différenciation myogénique, probablement via son effecteur PKC α , alors que le complexe mTORC1 réprime la différenciation via son effecteur S6 kinase, en induisant la phosphorylation de rictor, un composant du complexe mTORC2, et l'inhibition de mTORC2.

Nous avons par ailleurs montré que l'inhibition de l'activité PLD par le butanol-1 ou son extinction par interférence de l'ARN induit l'atrophie de myotubes L6 en culture, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation des effecteurs de la voie mTORC1, S6K1 et 4E-BP1. Inversement, la surexpression de la PLD à l'aide de vecteurs adénoviraux induit une hypertrophie des myotubes et une activation de la voie mTORC1 et de Akt, et atténue l'atrophie induite par la dexaméthasone. De plus, l'acide phosphatidique exogène, ainsi que la vasopressine, activateur de la PLD, sont aussi capables de contrer l'effet atrophique de la dexaméthasone. L'ensemble des résultats suggère un rôle hypertrophique et anti-atrophique de la PLD, qui s'exercerait par stimulation de la voie mTOR.

Ces résultats suggèrent un rôle clé de la PLD dans le muscle squelettique, s'exerçant potentiellement tant au niveau de la régénération du tissu qu'au niveau de la régulation de sa masse. De par ces propriétés, la PLD offre donc d'intéressantes potentialités d'action thérapeutique contre la perte de tissu musculaire, facteur aggravant majeur dans de multiples pathologies.

TABLES DES MATIERES

<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	7
<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u>	10
<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	13
<u>CHAPITRE 1 GENERALITES SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE</u>	15
1- Le muscle squeletique	16
2- Métabolisme et types des fibres musculaires	18
<u>CHAPITRE 2 LA MYOGENESE</u>	21
1- Généralités	22
2- Les facteurs de transcription myogéniques	23
2.1- Les MRFs	23
2.2- Protéines MADS-box et différenciation myogénique	27
3- Les facteurs humoraux inducteurs de la myogènese	30
3.1- L'arginine vasopressine	30
3.2- Les facteurs de croissance IGFs	33
4- Les facteurs répresseurs de la myogènese	36
4.1- Le facteur de croissance TGF- β	36
4.2- Le facteur de croissance FGF	37
5- Voies de signalisation impliquées dans la myogènese	37
5.1- La voie p38 MAPK	37
5.2- la petite protéine G Rho	41
5.3- La voie de signalisation mTOR	42
<u>CHAPITRE 3 LA PHOSPHOLIPASE D</u>	62
1- Généralités	63
2- La transphosphatidylation	63
3- Les deux isoformes de la PLD	64
4- Localisation subcellulaire	65
5- La structure de la PLD	66
6- La régulation de la PLD	69
6.1- Régulation par les protéines kinase C	69
6.2- Régulation par les petites protéines G Rho	70
6.3- Régulation par les petites protéines G de la famille ARF	70
7- Rôle de la phospholipase D et de l'acide phosphatidique	71
7.1- la PLD et le trafic vésiculaire, la sécrétion et l'endocytose	71
7.2- la PLD et le remaniement du cytosquelette	72

7.3- La PLD et la prolifération cellulaire	73
8- mTOR et la phospholipase D	74
8.1- Les mécanismes d'activation de la voie mTOR par la PLD	75
CHAPITRE 4 L'ATROPHIE ET L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRES	77
1- Les régulateurs positifs de la masse musculaire	78
1.1- La voie de signalisation Akt/mTOR	78
1.2- IGF-I	79
1.3- La stimulation mécanique	81
2- Les régulateurs négatifs de la masse musculaire	81
2.1- Les facteurs de transcription FOXO	82
2.2- Le système Ubiquitine/Protéasome	84
2.3- L'Autophagie	86
2.4- La myostatine	88
2.5- Les glucocorticoïdes	89
CHAPITRE 5 MATERIELS ET METHODES	92
1- Modèles cellulaires et traitements	93
1.1- Modèles cellulaires	93
1.2- Traitements des L6C5	93
1.3- Evaluation de la différenciation	93
2- Dosages enzymatiques	94
2.1- Dosage de l'activité de la PLD	94
2.2- Dosage de l'activité de la CK	95
3- Mesure de l'expression protéique	96
3.1 - Western Blotting	96
3.2- Immunofluorescence	99
4- Modulation de l'expression génique	100
4.1- Les ARNi	100
4.2- Les adénovirus	101
5- Mesure de l'expression génique	105
5.1- Transcription inverse et PCR en temps réel	105
6- Fixation du PA sur la S6 kinase	105
CHAPITRE 6 RESULTATS	107
1- PLD, mTOR, et différenciation myogénique	108
1.1- La voie mTORC1 est activée lors de la différenciation des L6	108
1.2- L'activation de la voie mTORC1 est PLD-dépendante	109
1.3- Régulation différentielle des deux isoformes de S6 kinase 1	112
1.4- La voie mTORC2 est activée lors de la différenciation des L6	114
1.5- L'activation de la voie mTORC2 est PLD-dépendante	116
1.6- La PLD et mTOR sont nécessaires à la différenciation myogénique	118
1.7- mTORC1 inhibe, mTORC2 active la différenciation des L6	120
1.8- mTORC1 inhibe la différenciation des L6 via S6 kinase	122

1.9- mTORC2 active la différenciation indépendamment de Akt	124
1.10- L'effet de la rapamycine sur les L6 n'implique pas la sécrétion de IGF2	127
1.11- mTORC2 active la différenciation des myoblastes via PKC α	128
1.12- Schéma récapitulant les résultats de la partie 1	131
2-PLD, mTOR, et atrophie musculaire	132
2.1- le butanol-1 induit une atrophie musculaire	132
2.2- La downrégulation de PLD1 induit une atrophie musculaire	134
2.3- La surexpression de PLD1 induit une hypertrophie musculaire	135
2.4- La PLD régule les voies mTORC1 et mTORC2	136
2.5- La PLD régule l'expression de MuRF1	138
2.6- La PLD protège contre l'atrophie musculaire induite par la dexaméthasone	140
2.7- LA PLD inhibe l'expression des atrogènes stimulée par la dexaméthasone	142
2.8- Schéma récapitulant les résultats de la 2 ^e partie	144
CHAPITRE 7 DISCUSSION	145
CHAPITRE 8 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	156
BIBLIOGRAPHIE	160
ANNEXES	188

LISTE DES ABREVIATIONS

4-EBP1	eIF4E binding protein 1
ADNc	ADN complémentaire
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARF	Facteur d'ADP-ribosylation
ARNm	ARN messenger
AVP	Arginine ⁸ -vasopressine
bHLH	Basic helix-loop-helix
BHT	Butyl-hydroxy-toluène
BuOH1	Butanol-1
BuOH2	Butanol-2
cdk	cyclin-dependant kinase
CDKI	cyclin-dependant kinase inhibitor
CK	créatine kinase
Ctrl	Contrôle
DAPI	4',6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOLE
Deptor	DEP-domain-containing mTOR interacting protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
FOXO	forkhead box O transcription factor
GSK3	glycogène synthase kinase 3
IGF-II	Insulin-like growth factor II
KO	Knock Out
MADS	MCM1-agamous-deficiens-SRF related domain
MAFbx	Muscle Atrophy F-box
MAP kinase	Mitogen Activated Protein Kinase
MCK	Muscle Creatin kinase
MEF2	Myocyte enhancer factor 2
MHC	Myosine Heavy chain
MKK5	MAPK KINASE 5
mLST8	mammalian lethal with Sec13 protein 8
MRF	Myogenic Regulatory Factors
MRF4	Myogenic regulatory factor 4

mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1/mTORC2	complexe TOR 1/2
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein
MuRF	Muscle Ring Finger
Myf5	Myogenic factor 5
MyoD	myoblast determination protein 1/myogenic differentiation 1
NF-κB	Nuclear factor Kappa B
NI	non infecté
PA	Acide phosphatidique
PBS	Phosphate buffered saline
Pbu	Phosphatidylbutanol
PDK	Phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1α
PH domain	Plextrin homology domain
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKA	Protéine Kinase AMPc-Dépendante
PKB/Akt	Protéine Kinase B
PKC	Protéine Kinase C
PLD	Phospholipase D
PPAR	Peroxisomes proliferator-activated receptors
PRAS40	Proline-rich Akt substrate, 40 kDa
propra	Propranolol
Protor-1	protein observed with rictor-1
rapa	Rapamycine
raptor	Regulatory-associated protein of mTOR
rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
Rb	Retinoblastoma protein
RE	Reticulum Endoplasmique
REDD1	Regulated in development and DNA damage responses
RT-qPCR	reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction
S6	Ribosomal protein S6
S6K	ribosomal protein S6 kinase
siRNA	small interfering RNA
SRF	Serum response factor

TBP	Tata Box binding protein
TFIIB	general transcription factor IIB
TGF β	Transforming growth factor beta
TNF- α	Tumor necrosis Factor-alpha
TSC1/2	tuberous sclerosis complex 1/2
UPS	Ubiquitin-proteasome system
Vps34	vacuolar protein sorting-associated protein 34, class III PI3K
Wnt	Wint
wort	wortmanin

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	Structure du muscle squelettique	13
Figure 2	Structure de l'unité contractile du muscle	14
Figure 3	Somitogenèse : différenciation du dermomyotome	19
Figure 4	Myogenèse chez les souris sauvages, déficientes en MyoD	20
Figure 5	La régulation de l'activité des MRFs	22
Figure 6	Mode d'action de l'arginine vasopressine	28
Figure 7	Rôle de p38 dans l'initiation de la différenciation myogénique	35
Figure 8	Rôle de p38 dans le maintien du phénotype différencié des muscles	36
Figure 9	La structure de la protéine mTOR	40
Figure 10	La structure des deux complexes de mTOR	42
Figure 11	Shéma récapitulatif de la régulation du complexe mTORC1	47
Figure 12	Structure des deux isoformes de S6 kinase 1	48
Figure 13	Rôle du complexe mTORC1 dans la synthèse et le métabolisme lipidique	53
Figure 14	Rôle du complexe mTORC1 dans la prolifération mitochondriale, le métabolisme oxydatif et l'autophagie	54
Figure 15	Action enzymatique de la PLD	60
Figure 16	la Structure des deux isoformes de la phospholipase D	61
Figure 17	Modèle théorique de catalyse par la PLD	63
Figure 18	Fixation de PA sur le complexe mTORC1	72
Figure 19	Régulation coordonnée de la synthèse et de la dégradation protéique par Akt.	80
Figure 20	Le système Ubiquitine-Ligase	81
Figure 21	mTOR et autophagie	84
Figure 22	Régulation inverse de l'activité transcriptionnelle de FOXO par IGF-I et myostatine	85
Figure 23	Régulation de la voie mTOR par les glucocorticoïdes	87
Figure 24	Effet de l'AVP sur la phosphorylation de S6 kinase 1	104
Figure 25	Effet de la downrégulation de raptor et rictor sur la phosphorylation de S6 kinase 1	105

Figure 26	Effet du butanol sur la phosphorylation de S6 kinase 1 stimulée par l'AVP	106
Figure 27	Effet du PA et du propranolol sur la phosphorylation de S6 kinase 1	106
Figure 28	Effet de la downrégulation et de la surexpression des deux isoformes de PLD sur la phosphorylation de S6 kinase 1	107
Figure 29	Effet de l'inhibition de mTORC1 et mTORC2 par la rapamycine sur la phosphorylation de S6 kinase stimulée par l'AVP	108
Figure 30	Effet de l'inhibition de mTORC1 et mTORC2 par la rapamycine sur la phosphorylation de S6 kinase stimulée par le propranolol	109
Figure 31	Fixation directe du PA sur S6 kinase	110
Figure 32	Effet de l'AVP sur la phosphorylation de Akt	111
Figure 33	Effet de la downrégulation de raptor et rictor sur la phosphorylation de Akt	112
Figure 34	Effet de rapamycine-24 h sur la phosphorylation de Akt induite par l'AVP ou le propranolol	112
Figure 35	Effet du PA et du propranolol sur la phosphorylation de Akt	113
Figure 36	Effet de la surexpression ou de la downrégulation de la PLD sur la phosphorylation de Akt	114
Figure 37	Effet de la rapamycine et de la wortmannine sur l'activité PLD	115
Figure 38	Effet de l'inhibition de la PLD, ou des complexes mTORC1 et mTORC2 sur la différenciation myogénique	116
Figure 39	Effet de la surexpression de PLD1 et de PLD2 sur l'expression et la translocation nucléaire de la myogénine	117
Figure 40	Effet de la rapamycine sur l'expression de la myogénine et sa translocation nucléaire	118
Figure 41	Effet de la downrégulation de raptor et de rictor sur l'expression et la translocation nucléaire de la myogénine	119
Figure 42	Effet de la surexpression de S6 kinase sur l'expression de la myogénine et de la troponine	120
Figure 43	Cinétique de phosphorylation de rictor au niveau de la Th-1135, et effet de la surexpression de S6 kinase sur la phosphorylation de rictor	121
Figure 44	Effet des inhibiteurs de la voie PI3K et de mTOR sur la différenciation myogénique	122
Figure 45	Effet de la surexpression de Akt sur l'accumulation nucléaire de la myogénine	123
Figure 46	Effet de la surexpression de formes mutées de PI3K sur l'accumulation nucléaire de la myogénine	124

Figure 47	Effet de la rapamycine sur la production de IGF-2	126
Figure 48	Implication de PKC α dans la différenciation myogénique	127
Figure 49	Schéma récapitulant les résultats de la partie PLD, mTOR et différenciation myogénique	129
Figure 50	Effet du butanol sur la surface des myotubes	130
Figure 51	Effet de butanol sur la quantité de myosine et l'activité de la créatine kinase	131
Figure 52	Effet de la downregulation des isoformes de PLD sur la surface des myotubes	132
Figure 53	Effet de la surexpression des isoformes de PLD sur la surface des myotubes.	134
Figure 54	Effet de PLD sur mTORC1 et mTORC2	135
Figure 55	Effet de la surexpression ou de la downregulation des isoformes de PLD sur la protéolyse	136
Figure 56	Réversion de l'effet de la dexaméthasone sur la surface des myotubes par le PA et l'AVP	137
Figure 57	Effet de la dexaméthasone, du PA, de l'AVP sur l'activité créatine kinase des myotubes	138
Figure 58	Réversion de l'effet de la dexaméthasone sur la surface des myotubes par la surexpression de la PLD	139
Figure 59	L'effet de la dexaméthasone, du PA, de l'AVP sur les ubiquitines ligases	140
Figure 60	Schéma récapitulant les résultats de la partie PLD, mTOR et atrophie musculaire	140

INTRODUCTION GENERALE

Les muscles striés squelettiques représentent environ 40 % de la masse corporelle d'un individu sain, remplissant des fonctions vitales : la locomotion, la respiration, la thermogénèse, la régulation du métabolisme des lipides et glucides. Le muscle est un organe doté d'une plasticité lui permettant de s'adapter aux changements physiologiques ou environnementaux, tels que la croissance, la stimulation mécanique, l'alimentation, l'âge, la maladie. Le muscle squelettique est un assemblage hétérogène de fibres musculaires possédant des capacités contractiles et métaboliques différentes, des fibres les plus rapides, au métabolisme glycolytique, aux fibres les plus lentes, au métabolisme oxydatif.

Le maintien d'une masse musculaire adéquate est critique pour la survie de l'individu. Deux phases sont importantes pour assurer ce maintien: la différenciation myogénique et le contrôle de la taille des fibres musculaires.

Lors de la différenciation myogénique, les myoblastes, cellules précurseurs, cessent de proliférer et fusionnent pour se différencier en myotubes polynucléés, exprimant les protéines spécifiques du tissu musculaire, notamment les constituants du système contractile. La myogénèse intervient au cours de la vie embryonnaire, mais aussi lors de la réparation des blessures du tissu musculaire déjà constitué, et dans la régénération du muscle dystrophique chez les patients atteints de myopathies. La myogénèse peut être perturbée dans diverses situations pathologiques, telles que l'exposition à certains toxiques environnementaux. La compréhension des mécanismes qui contrôlent ce processus présente donc un intérêt majeur en physiopathologie.

Parmi les mécanismes intervenant dans le processus de myogénèse, la voie de signalisation de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) a une importance particulière. mTOR est une sérine-thréonine kinase qui fait partie de la famille des phosphatidylinositol kinase-related kinases. La voie mTOR intègre des signaux intracellulaires et extracellulaires permettant la régulation du métabolisme, la croissance et la survie cellulaires. Elle joue un rôle central dans l'organisme par son implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques incluant la formation des tumeurs, l'angiogénèse, la résistance à l'insuline, l'adipogénèse, l'activation des lymphocytes T, etc.

Un des activateurs de la voie mTOR récemment décrit est la phospholipase D (PLD). La régulation de mTOR par la PLD découle de la fixation directe de l'acide phosphatidique produit par la PLD sur un site de la protéine. La PLD hydrolyse la liaison phosphodiester distale des phosphatidylcholines des membranes cellulaires, libérant de la choline et de l'acide phosphatidique, en réponse à des stimuli extracellulaires. Chez les mammifères, deux gènes distincts, PLD1 et PLD2,

ont été décrits. Ces deux isoformes de PLD nécessitent du phosphatidylinositol bisphosphate comme cofacteur pour leur activité mais sont régulées différemment. La PLD1, caractérisée par une activité basale faible, est activée synergiquement par les petites protéines G des familles Rho et ARF, et par les PKC conventionnelles. La PLD2, au contraire, a une activité basale élevée, et sa sensibilité à des protéines activatrices est peu documentée. Les fonctions cellulaires où une implication de la PLD a été démontrée sont multiples: le trafic vésiculaire, la réorganisation agoniste-dépendante du cytosquelette, l'explosion respiratoire chez les neutrophiles, la prolifération et la survie cellulaires, etc. Il a de plus été décrit dans plusieurs modèles cellulaires (L6 et C2C12) que la PLD joue un rôle important dans la différenciation myogénique. Cependant, le mécanisme par lequel la PLD intervient dans la myogénèse, et le rôle même de mTOR dans ce processus, restent sujets à controverse, étant donné la complexité des réseaux de régulation mis en jeu.

En ce qui concerne la régulation de la taille des myofibres, elle repose sur un équilibre entre synthèse et dégradation des protéines musculaires. L'augmentation de la synthèse protéique conduit à l'hypertrophie musculaire, observée lors de la croissance ou à l'âge adulte, lors d'une activité musculaire soutenue. Alors que l'atrophie musculaire, observée lors du vieillissement ou dans certaines situations pathologiques, résulte largement d'une dégradation protéique accrue.

L'adaptation du muscle aux signaux physiologiques et pathologiques résulte de l'intégration de signaux extracellulaires. Cette intégration des signaux extracellulaires met en jeu notamment la voie de signalisation PI3K/Akt/mTORC1 qui contrôle la synthèse protéique, et la voie FOXO/ubiquitine ligase et autophagie, connectée à la précédente, qui contrôle la dégradation protéique. La littérature suggère que la PLD est probablement aussi impliquée à ce niveau. En effet, la PLD est impliquée dans l'activation de la voie mTOR induite par la stimulation mécanique de muscles isolés, et pourrait intervenir dans la réponse hypertrophique. Un rôle direct de la PLD dans le contrôle de la taille des myocytes n'a cependant pas encore été démontré.

L'objectif de cette étude est d'élucider la régulation de la voie mTOR par la PLD dans les cellules musculaires, et de mettre en évidence l'implication de cette régulation dans la différenciation myogénique et dans le contrôle de la masse musculaire.

La première partie de ce mémoire est consacrée aux rappels bibliographiques. Le reste du mémoire concerne notre travail personnel et s'articule autour de trois parties distinctes. La première partie traite les méthodes d'étude utilisées. Les deuxième et troisième parties sont consacrées aux résultats expérimentaux et à la discussion des résultats obtenus. Ce mémoire se termine par une conclusion générale et par des perspectives.

CHAPITRE 1

GENERALITES SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE

1- Le muscle squelettique

Les muscles sont des tissus contractiles excitables permettant de mouvoir des parties du corps s'il s'agit de muscles squelettiques, ou de mouvoir des substances à l'intérieur du corps s'il s'agit de muscles lisses ou cardiaques. Le corps humain comprend plus de 640 muscles squelettiques dont la taille varie selon leur fonction. Ces muscles constituent en moyenne 43% du poids sec du corps.

L'unité de base de ce tissu est la fibre musculaire striée. Ces fibres sont de très longues cellules plurinucléées, contenant les protéines contractiles arrangées en structures particulières, qu'on appelle myofibrilles. Les fibres sont disposées parallèlement, elles mesurent de 10 à 100 μm de diamètre et peuvent atteindre 30 cm de longueur. Chaque fibre musculaire est formée de la fusion de plusieurs centaines de cellules précurseurs appelées myoblastes (*Figure 1*). Les noyaux des fibres musculaires sont accolés à la membrane plasmique (sarcolemme), pour ne pas nuire aux éléments contractiles.

Plusieurs couches de tissus conjonctifs séparent et protègent les composants des muscles squelettiques. L'endomysium recouvre chaque fibre musculaire, le périmysium organise de 10 à 100 fibres musculaires en faisceaux, et l'épimysium est la couche extérieure qui enveloppe tout le muscle. Ces membranes fournissent des fibres de collagène aux tissus conjonctifs qui attachent le muscle à d'autres structures (muscle, os, tendons).

Les propriétés contractiles des cellules musculaires découlent de la présence des myofibrilles constituées d'éléments du cytosquelette assemblés en unités contractiles appelées sarcomères. Ces éléments contractiles élémentaires sont constitués par des microfilaments de myosine, dits épais, couplés à des microfilaments d'actine, dits fins.

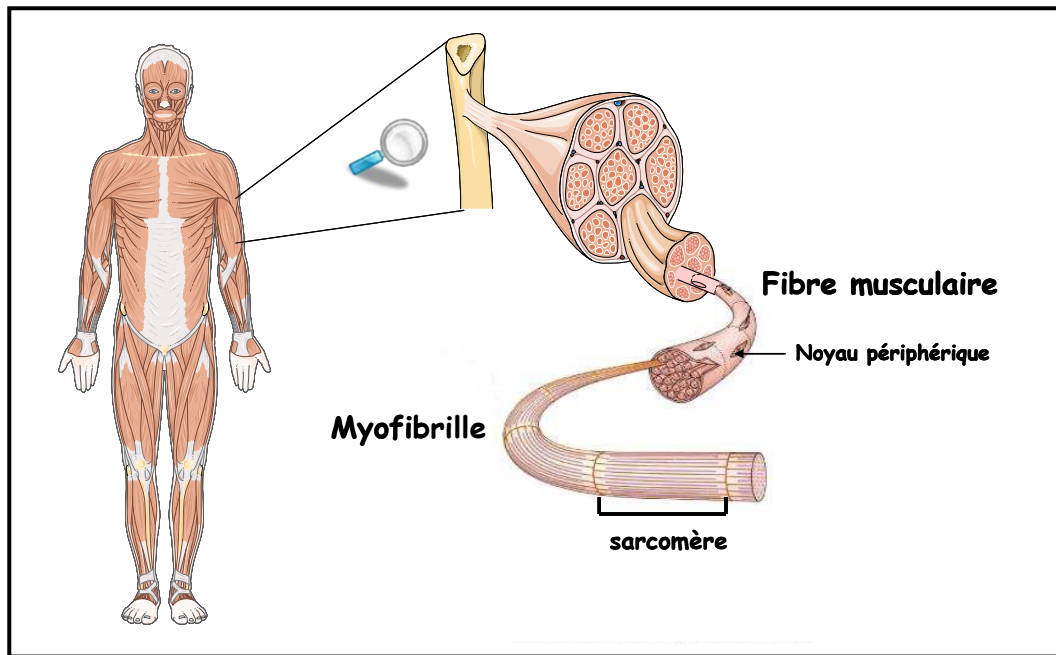


Figure 1: Structure du muscle squelettique.

Les microfilaments épais

Constitués principalement par la myosine, qui associe deux sous unités identiques dont les queues sont enroulées l'une sur l'autre, et dont les deux têtes globuleuses sont en saillie à l'une des extrémités. Ces têtes forment des ponts entre les filaments épais et fins. Chaque pont possède deux sites fondamentaux dans le processus contractile : le site de la liaison à l'actine, et le site de l'ATPase (Figure 2).

Les microfilaments fins

Ils sont constitués de trois types de protéines : l'actine, la troponine et la tropomyosine. Le monomère d'actine est la protéine de base. Il a une forme sphérique, et possède un site de liaison à la myosine. Il peut polymériser pour former des filaments (actine F). Les filaments d'actine sont composés de deux chaînes linéaires qui s'enroulent l'une autour de l'autre pour former une double hélice. La tropomyosine forme des filaments disposés au creux du sillon de la spirale d'actine. Dans cette position la tropomyosine masque les sites de liaison de l'actine à la myosine, et s'oppose à leur interaction. La troponine est composée de trois sous-unités : une qui se lie à la tropomyosine, une autre à l'actine et la troisième qui fixe le calcium, et régule l'interaction tropomyosine/myosine (Figure 2).

Quand il n'y a pas de calcium lié à la troponine, la tropomyosine est stabilisée en position bloquante, et masque les sites de liaison à la myosine. Quand du calcium se lie à la troponine, la forme de cette protéine est modifiée de telle façon que la tropomyosine s'écarte de sa position

bloquante, l'actine et la myosine peuvent alors interagir au niveau des ponts, ce qui entraîne la contraction musculaire.

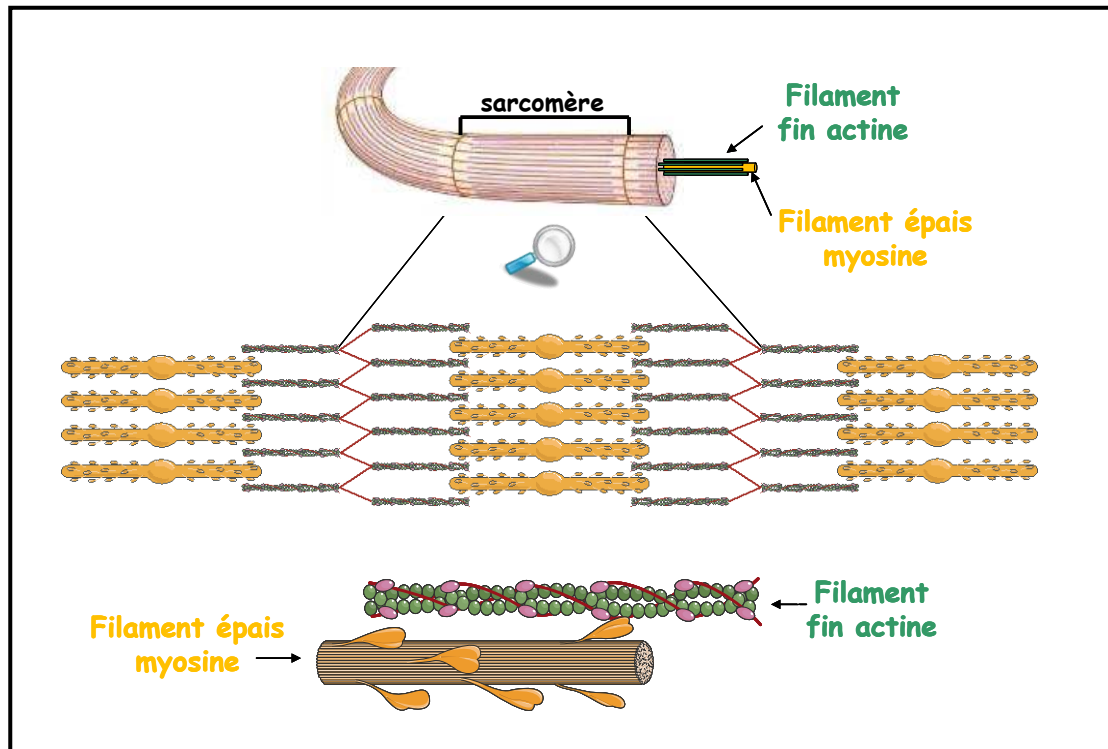


Figure 2 : Structure de l'unité contractile du muscle

2- Métabolisme et types des fibres musculaires

L'ATP est nécessaire lors de la contraction et la relaxation des muscles. L'approvisionnement en ATP, seule source d'énergie directement utilisable, doit être continu pour que l'activité contractile se prolonge. Les stocks d'ATP immédiatement disponibles sont peu importants dans le muscle, mais il y a trois sources d'ATP additionnelles qui peuvent être mises à contribution en cas de besoin:

La créatine phosphate

C'est le premier gisement d'énergie exploité au début de l'activité contractile. La créatine phosphate possède un groupe phosphate riche en énergie qui peut être donné à l'ADP pour former l'ATP. Comme une seule réaction enzymatique intervient dans ce transfert d'énergie, la production d'ATP à partir de la créatine-phosphate est rapide (fraction de seconde).

La phosphorylation oxydative (cycle de l'acide citrique et chaîne de transport d'électrons)

La phosphorylation oxydative a lieu dans les mitochondries, quand il y a suffisamment d'oxygène. Elle fournit beaucoup de molécules d'ATP pour chaque molécule de nutriment consommée, mais elle est relativement lente à cause des nombreuses étapes qu'elle comprend.

La glycolyse

La glycolyse aboutit à des produits destinés à entrer dans la voie de la phosphorylation oxydative mais elle n'est pas nécessairement suivie par celle-ci. Une molécule de glucose, après glycolyse, est scindée en deux molécules d'acide pyruvique avec production de deux molécules d'ATP. Au cours de la phosphorylation oxydative, l'acide pyruvique est dégradé avec fourniture d'énergie supplémentaire. La glycolyse produit de l'ATP en absence d'oxygène et elle est plus rapide que la phosphorylation oxydative.

En fonction de différences dans les modes de production et d'hydrolyse de l'ATP, les fibres musculaires sont classées en trois types :

Fibres de type I (ou lentes)

Fibres oxydatives à contraction lente et résistantes à la fatigue. Ces fibres contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires (fibres rouges). Ce sont des fibres qui métabolisent lentement l'ATP et sont petites en diamètre. L'isoforme de la myosine présente dans ce type de fibres est l'isoforme « β cardiaque » codée par le gène MYH7. Elles sont prépondérantes dans les muscles posturaux comme les muscles du cou. Chez le rat, le soleus est très majoritairement composé de fibres I.

Fibres de type IIA (ou rapides résistantes)

Fibres oxydatives à contraction rapide et résistantes à la fatigue. Ces fibres contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires mais, elles possèdent une coloration intermédiaire, et ont une forte capacité glycolytique (fibres intermédiaires). MHC2a, l'isoforme de myosine qu'on trouve dans ces fibres est codée par le gène MYH2. Elles sont fréquentes (50%) dans le plantaris du rat. Elles se retrouvent en grand nombre dans les muscles de la jambes des athlètes.

Fibres de type IIX / IIB (ou rapides fatigables)

Fibres glycolytiques, à faible capacité oxydative, à contraction rapide et sensibles à la fatigue. Ces fibres contiennent peu de myoglobine, de mitochondries et de capillaires (fibres blanches). Elles ont une haute teneur en glycogène et possèdent le plus grand diamètre. Les isoformes de la myosine qu'on trouve dans ces fibres sont MHC 2x, codée par le gène MYH1 (fibres IIX, présentes chez l'Homme et les rongeurs), et MHC2b codée par le gène MYH4 (fibres IIB, absentes chez l'Homme).

Elles sont majoritaires dans le tibialis anterior et le gastrocnemius du rat. On les retrouve en grand nombre dans les muscles du bras.

CHAPITRE 2

LA MYOGENESE

1- Généralités

La formation des somites au niveau du tube neural est une des étapes importantes dans la formation des muscles squelettiques. Ces somites commencent par se diviser en deux parties : le sclérotome ventral et le dermomyotome dorsal. Les cellules du sclérotome donnent naissance aux vertèbres et aux côtes, alors que le dermomyotome donne naissance à l'épiderme du dos et également aux muscles squelettiques du tronc. Des études effectuées chez la caille ont montré que les parties médiane et latérale des somites sont contrôlées par les facteurs sécrétés par les tissus environnants et donnent naissance à deux populations différentes de myoblastes, la première générée par la partie médiane du somite est à l'origine des muscles profonds du dos, ou muscles épaxiaux, alors que la partie latérale donne naissance aux muscles des parois du corps et des membres, ou muscles hypaxiaux (Sabourin and Rudnicki, 2000) (*Figure 3*).

De très nombreuses études ont montré l'importance de quatre facteurs de régulation de la myogénèse, les MRFs (Myogenic Regulatory Factors), qui contrôlent la spécification et la différenciation de la lignée musculaire. Des modèles *in vivo* et *in vitro* ont permis de montrer que ces MRFs jouent des rôles distincts au cours de la myogénèse. Ils agissent sur la détermination, la migration des cellules, la différenciation et la réparation du tissu musculaire (Perry and Rudnick, 2000).

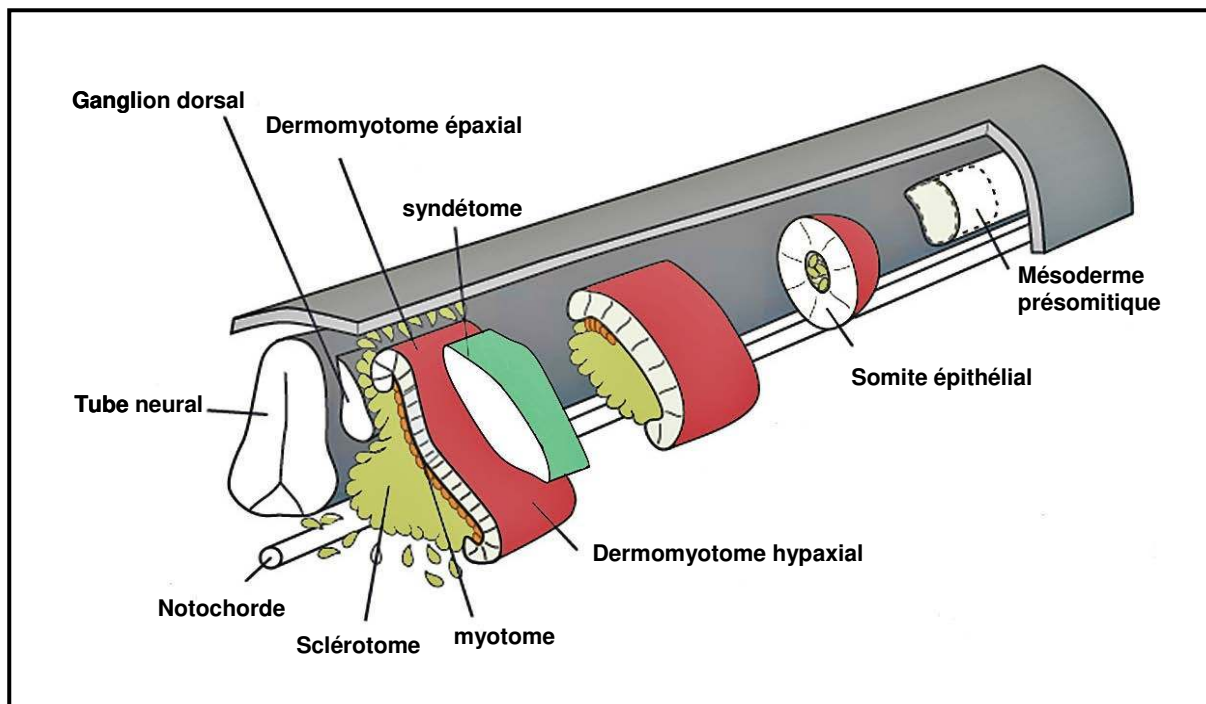


Figure 3 : Somitogenèse : différenciation du dermomyotome
D'après Hawke et Garry 2001

2- Les facteurs de transcription myogéniques

2.1- Les MRFs

Les MRFs font partie de la superfamille des facteurs de transcription bHLH (basic-Helix-loop-Helix) qui inclut également c-myc et achaete-scute (ref Olson 1994). La famille des MRFs comprend MyoD (ou Myf-3), Myf-5, myogénine (ou Myf-1), et MRF4 (ou Myf-6/herculine) (Sabourin and Rudnicki, 2000).

La caractéristique de ces MRFs est la présence dans leur structure d'une région conservée « basic DNA-binding domain » qui permet la liaison spécifique à certaines séquences d'ADN, et d'autre part d'un motif « Helix-Loop-Helix » nécessaire pour l'hétérodimérisation de ces protéines (Sabourin and Rudnicki, 2000). Les MRFs forment des hétérodimères avec des E-protéines, et se lient à l'ADN au niveau d'un motif qu'on appelle « E-box » (de séquence CANNTG). Ce motif se trouve dans le promoteur de plusieurs gènes spécifiques au muscle.

2.1.1- Rôle des MRFs au cours de la différenciation myogénique

La génération de souris déficientes en chacun des MRFs a permis de montrer qu'ils ont des fonctions distinctes et interviennent à des moments différents au cours de la myogénèse. Cependant, une certaine redondance de fonction existe aussi. Ainsi, les souris invalidées pour le gène MyoD présentent une augmentation de l'expression de Myf-5, avec un phénotype musculaire normal (Rudnicki et al., 1992), de même que les souris invalidées pour Myf-5, qui meurent cependant rapidement par défaut de formation des côtes (Braun et al., 1992). Par contre, les souris déficientes simultanément en ces deux MRFs meurent à la naissance avec une absence complète de muscles squelettiques et de myoblastes, ce qui prouve le rôle de MyoD et Myf-5 dans la détermination des muscles squelettiques (Rudnicki et al., 1993) (Figure 4).

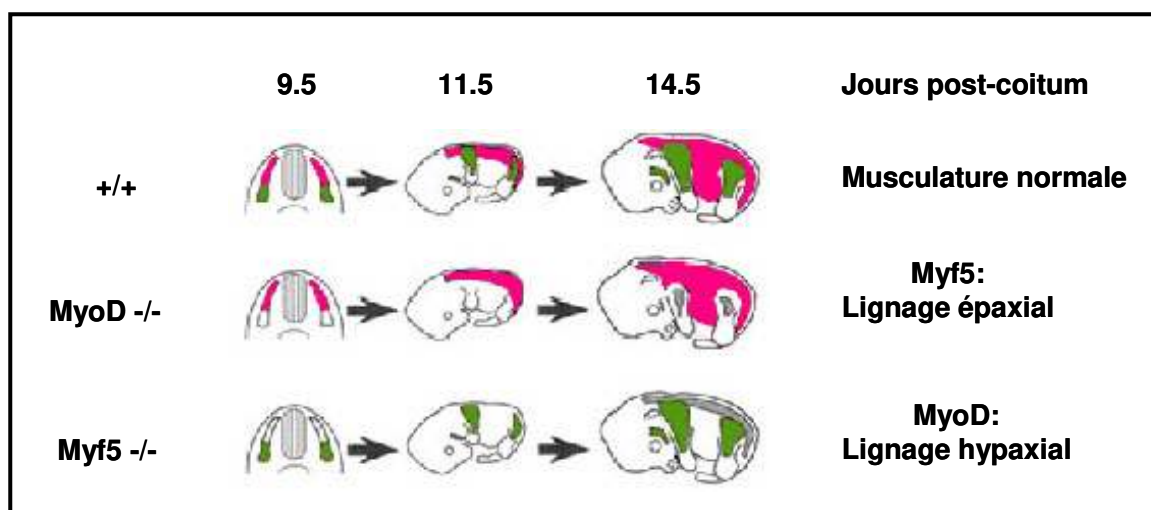


Figure 4 : Myogenèse chez les souris sauvages, déficientes en MyoD ou en Myf5

D'après Sabourin et Rudnicki, 2000

Les souris déficientes en myogénine meurent aussi à la naissance. Ces souris possèdent un nombre normal de myoblastes, mais pas de myofibres, ce qui implique la myogénine dans l'étape de la différenciation myogénique (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993). Les souris invalidées pour MRF4 possèdent un phénotype musculaire normal avec une augmentation de l'expression de la myogénine (Braun and Arnold, 1995; Zhang et al., 1995b).

Ces résultats permettent la distinction entre deux types de MRFs, les MRFs primaires (MyoD et Myf-5) qui sont impliqués dans la détermination myogénique, et les MRFs secondaires (myogénine et MRF4) qui sont impliqués dans la différenciation myogénique. Une autre conclusion est que

certaines MRFs sont interchangeables sans que cela affecte le développement musculaire normal (Sabourin and Rudnicki, 2000).

Les souris " KO MyoD" ont un développement normal des muscles épaxiaux (paraspinaux et intercostaux) alors que le développement de leurs muscles hypaxiaux est retardé de 2,5 jours par rapport aux souris sauvages. Les souris « KO Myf-5 » ont un développement musculaire normal au niveau des muscles des membres et des arcs branchiaux, mais un retard au niveau du développement des muscles épaxiaux. Ce qui confirme que MyoD et Myf5 ont des rôles distincts au cours de la myogénèse (Sabourin and Rudnicki, 2000).

2.1.2- La régulation de l'activité des MRFs

Les MRFs agissent sous forme d'hétérodimères avec les produits des gènes E2-2 qu'on appelle ITF2, et ceux du gène E2A qu'on appelle E12, E47 et ITF1. Ces hétérodimères activent la transcription de gènes spécifiques aux muscles, possédant dans leur promoteur un motif E-box (Sabourin and Rudnicki, 2000).

L'activité des MRFs est régulée négativement par les protéines Id, qui sont dépourvues de domaine de liaison à l'ADN (basic-DNA binding domain). Ces Id, codées par quatre gènes différents (Id1-4), agissent comme des dominants négatifs en s'hétérodimérisant avec les protéines E, empêchant ainsi leur association avec les MRFs et l'activation des gènes spécifiques des muscles (Benezra et al., 1990).

Par ailleurs, d'autres études ont montré que l'activité de MyoD est inhibée in vitro par la protéine « Twist murine » (mTwist) (Spicer et al., 1996) qui pourrait avoir le même rôle que les protéines Id : séquestrer les protéines E et empêcher leur fixation sur les MRFs. Une troisième protéine qui pourrait également jouer un rôle négatif dans la régulation des MRFs est Mist1, qui est aussi un facteur bHLH dépourvu de domaine de transactivation (Lemercier et al., 1998).

L'activité des MRFs est intimement liée au cycle cellulaire. D'une part, la protéine Rb (retinoblastoma protein), qui est nécessaire au maintien du phénotype différencié des myotubes, s'associe sous forme hypophosphorylée à MyoD pour la transactivation des promoteurs des gènes muscles-spécifiques contenant une E-box (Gu et al., 1993).

D'autre part, l'induction de la différenciation myogénique en culture induit une augmentation de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et p16 (Guo et al., 1995; Parker et al., 1995;

Schneider et al., 1994). Au cours de l'embryogénèse, la hausse de l'expression de p21 est corrélée à celle de la myogénine (Parker et al., 1995). Le lien inverse entre MRFs et cycle cellulaire a été également mis en évidence en montrant que la surexpression de la cycline D1, qui est un activateur de Cdk4, inhibe l'activité de MyoD. L'activité MyoD est diminuée par contact direct avec le domaine C-terminal de Cdk4 (Sabourin and Rudnicki, 2000).

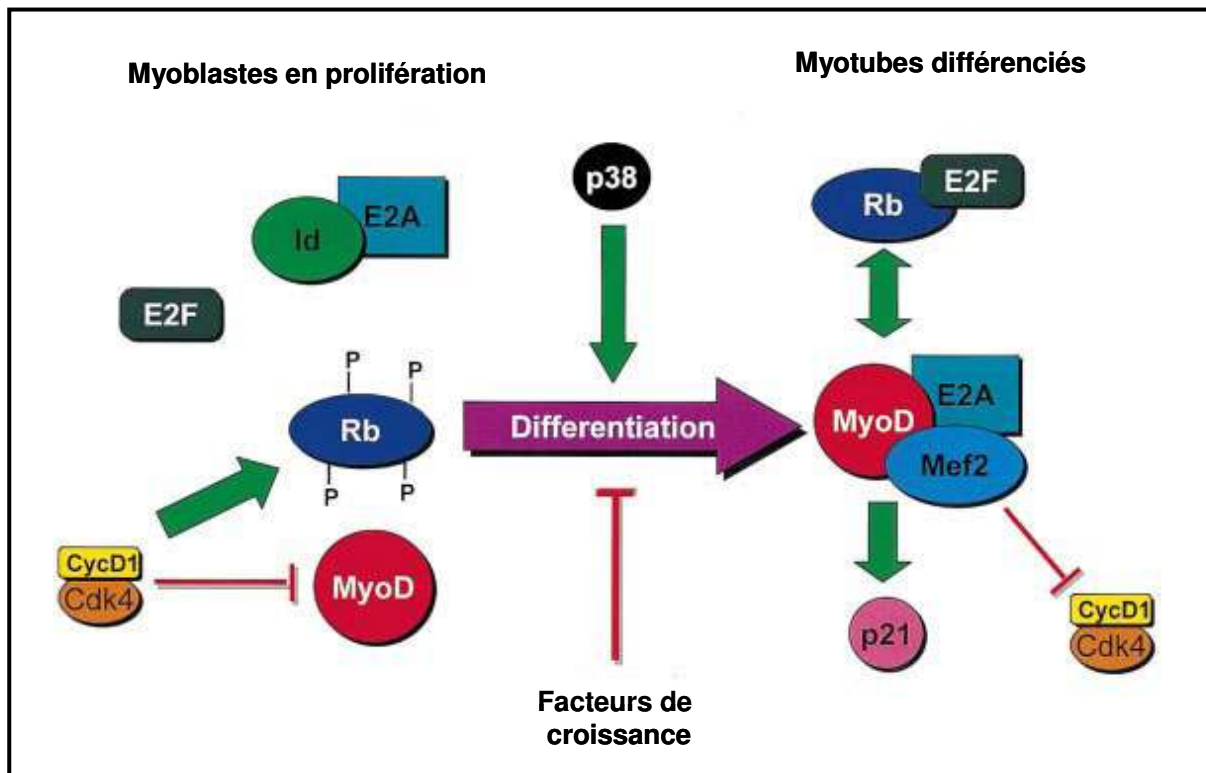


Figure 5 : La régulation de l'activité des MRFs

D'après Sabourine et Rudnicki 2000

L'activité des MRFs est aussi liée au cycle cellulaire par les effets négatifs de l'hétérodimère AP1 Fos/c-Jun. Le proto-oncogène c-Jun se lie directement à MyoD et inhibe son activité (Bengal et al., 1992; Li et al., 1992a). Au cours de la différenciation, l'expression de c-Fos est diminuée par MyoD, qui se fixe sur son promoteur au niveau d'une E-box (Trouche et al., 1993). D'autres oncogènes comme c-myc, N-ras et Ha-ras inhibent également la différenciation des myoblastes in vitro, ce qui suggère un effet régulateur négatif sur les MRFs (Sabourin and Rudnicki, 2000).

L'activité des MRFs est également régulée par phosphorylation. Par exemple, la myogénine peut être directement phosphorylée par la protéine kinase C (PKC) in vitro et in vivo. Le traitement avec FGF (fibroblast growth factor) ou la surexpression de la PKC induisent une phosphorylation de

la thréonine-87 au niveau du domaine de liaison à l'ADN, empêchant la fixation de l'hétérodimère MRF-E-protéine (Li et al., 1992b).

2.2- Protéines MADS-box et différenciation myogénique

Le motif MADS-box est une région conservée de 56 résidus d'acides aminés trouvée à l'intérieur de la séquence de liaison à l'ADN de certains facteurs de transcription. La famille de protéines MADS-box inclut les facteurs MCM1, AG, DEFA, et SRF (d'où son nom). La région N-terminale des protéines MADS-box est hydrophile avec une proportion élevée de résidus basiques, alors que la région C-terminale est plutôt hydrophobe (Shore and Sharrocks, 1995).

2.2.1- Les Myocyte Enhancer Factors 2 (MEF2)

Les protéines MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2), ont été identifiées par leur fixation spécifique au niveau d'une région riche en A et T du promoteur des gènes musculaires (Gossett et al., 1989). Ces protéines possèdent un domaine MADS-box et un domaine MEF2 propre. Quatre isoformes ont été identifiées chez les mammifères: MEF2A, B, C et D, codées par quatre gènes distincts (Breitbart et al., 1993).

L'expression des protéines MEF2 dans de nombreux types cellulaires, dont les neurones, les chondrocytes et les cellules musculaires lisses, cardiaques, et squelettiques se produit en même temps que l'activation de leur programme de différenciation (Olson et al., 1995; Potthoff et al., 2007).

MEF2 a d'abord été identifié comme un facteur se liant à l'ADN de manière spécifiquement musculaire, au niveau d'un motif: (CTA[A/T]₄TAG/A) sur le promoteur du gène de la créatine kinase. Tous les facteurs MEF2 identifiés depuis ont la capacité de se lier à ce site MEF2 consensus (Gossett et al., 1989). Par la suite, des sites MEF2 ont été identifiés au niveau des régions promotrices de la plupart des gènes spécifiquement musculaires (Olson et al., 1995; Wang et al., 1995; Wang et al., 1996). MEF2 se fixe sur le promoteur des gènes des protéines bHLH, notamment la myogénine et MyoD (Edmondson et al., 1992). Dans les cellules non musculaires, l'activité MEF2 peut être induite après surexpression de la myogénine et de MyoD, ce qui suggère une régulation réciproque de MEF2 et des protéines bHLH (Chambers et al., 1994). Cette boucle d'amplification pourrait être impliquée dans le maintien du taux d'expression de ces deux classes de facteurs de transcription au cours de la différenciation myogénique (Edmondson et al., 1992).

L'analyse des régions promotrices de nombreux gènes muscle-spécifique montre que les MRFs agissent en étroite coopération avec les protéines MEF2 dans les cellules musculaires

squelettiques. Un exemple de cette coopération est la régulation du promoteur du gène codant pour la desmine, protéine musculaire sarcomérique. L'expression de ce gène est contrôlée par une région régulatrice distale comprenant un site MEF2 et une E-Box adjacente. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que ces deux sites sont impliqués dans l'activité transcriptionnelle de ce promoteur (Li and Capetanaki, 1994), ainsi que dans l'expression de la desmine au cours du développement musculaire (Kuisk et al., 1996).

Un site MEF2 et une E-Box sont également présents sur le promoteur de MRF4, et MEF2 active synergiquement la transcription de MRF4 en présence de MyoD ou de myogénine (Black et al., 1995; Naidu et al., 1995). MEF2 et MyoD activent également de manière synergique les gènes codant la créatine kinase, les chaînes légères de la myosine 1 et 3, et la myogénine (Kaushal et al., 1994). De façon intéressante, la mutation d'un des deux motifs MEF2 ou E-box sur le promoteur du gène de la desmine ou de MRF4 n'abolit pas l'action synergique des MRFs et de MEF2 sur leur transcription. Les MRFs et MEF2 peuvent donc agir même si seul un site de liaison pour l'un des deux facteurs est présent sur le promoteur du gène cible. Ainsi, certains gènes ne possédant pas de E-Box au sein de leur promoteur peuvent être induit par les MRFs (Navankasattusas et al., 1992; Thompson et al., 1991). La transactivation du promoteur du gène de la myogénine par MyoD et par la myogénine elle-même, par exemple, nécessite un site MEF2 mais pas de E-Box (Buchberger et al., 1994; Edmondson et al., 1992; Parmacek et al., 1994). Le gène de la protéine sarcomérique troponine C, dont l'expression est activée par la myogénine et MyoD, ne contient qu'un site MEF2 (Parmacek et al., 1994). Dans ces derniers cas, la mutation du site MEF2 supprime totalement l'activation transcriptionnelle par les MRFs, suggérant que les MRFs sont capables d'agir indirectement sur le promoteur de ces gènes via un site MEF2. Une étude montre que la myogénine et MEF2, provenant d'extrait nucléaire de myotubes, se lient à l'ADN de façon coordonnée (Funk and Wright, 1992).

La démonstration de l'interaction entre MEF2 et les MRFs est apportée par une étude de Molkenin et al. (1995), montrant que MEF2, à l'inverse des MRFs, ne possède pas d'activité myogénique intrinsèque mais est capable d'induire la conversion myogénique de fibroblastes en culture en synergie avec les MRFs. Cette synergie est la résultante d'une interaction protéine-protéine directe entre les facteurs MEF2 et les hétérodimères MRF-protéines E. Des expériences d'immunoprécipitation montrent que MEF2C peut se lier à l'hétérodimère formé par la myogénine et la protéine E-12 (Molkenin et al., 1995). Par contre, MEF2C est incapable de reconnaître l'un de ces deux facteurs isolé. La formation du complexe MRF/protéines E permet donc la formation d'une surface de reconnaissance et d'interaction avec MEF2. Cette interaction se réalise entre l'extrémité amino-terminale de MEF2C regroupant les domaines MADS box et MEF2, et le domaine bHLH de la myogénine. Elle permet à chacun des facteurs d'activer la transcription via le site de liaison à l'ADN de l'autre.

La synergie entre MEF2 et MRFs dépend de la présence de deux résidus alanine et thréonine, présents dans le domaine de fixation à l'ADN des MRFs, et leur conférant leurs propriétés myogéniques. En effet, la protéine chimérique "MyoD-E12basic" contenant le domaine basique de la protéine E12, est incapable d'interagir avec MEF2C pour activer la transcription, sauf si les résidus pro-myogéniques alanine-thréonine sont introduits dans le domaine basique de E12 aux positions correspondantes à celles rencontrées dans le domaine basique des MRFs. (Molkentin et al., 1995).

D'autre part, comme déjà noté, les expressions des MRFs et de MEF2 sont intimement liées par une régulation réciproque. Il est probable que les facteurs MEF2 jouent un rôle d'amplification et de maintien de l'expression des MRFs au cours de la différenciation, plutôt qu'un rôle d'initiation de leur transcription.

2.2.2- Le facteur de Réponse au Sérum (SRF)

Le Facteur de Réponse au Sérum (SRF) est l'un des membres les plus étudiés de la famille MADS-box. D'une masse moléculaire de 67 KDa, ce facteur de transcription se fixe en homodimère sur une séquence de dix nucléotides CC(AT)₆GG appelée boîte CArG. Les fonctions de la protéine sont multiples puisqu'il existe une trentaine de sites CArGs fonctionnels dans des promoteurs de différents gènes (Chai and Tarnawski, 2002), dont le gène c-fos (Treisman, 1986), les gènes d' α -actines squelettique (Muscat et al., 1992) et cardiaque (Miwa and Kedes, 1987). Son inactivation génique n'apporte que peu d'indices quant à ses différentes fonctions: en effet, les embryons SRF^{-/-} se développent normalement jusqu'à E6,5 puis meurent *in utero* lors de la gastrulation, essentiellement par absence de formation du mésoderme (Arsenian et al., 1998). Aussi les études fonctionnelles menées sur la protéine ont-elles été en grande partie réalisées *in vitro* dans des lignées cellulaires. Elles ont permis de distinguer deux fonctions principales de la protéine SRF: l'induction de gènes impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire (Gauthier-Rouviere et al., 1996; Miano, 2003), et la régulation des processus de différenciation, notamment dans le tissu musculaire squelettique.

2.2.2.1 SRF et différenciation du muscle squelettique squelettique

Le SRF est exprimé de façon constitutive aux niveaux ARN-messager et protéine dans les cellules musculaires en culture, son niveau d'expression, de même que sa localisation nucléaire, ne variant pas selon le stade prolifératif ou différencié de la cellule (Vandromme et al., 1992). Cette même étude démontre que l'inactivation de la protéine SRF par microinjection d'anticorps inhibe la différenciation de la lignée musculaire C2 en empêchant la transition myoblaste-myotube. Cela se traduit par l'inhibition de l'expression de la Troponine T, marqueur tardif de la différenciation, mais

également de la myogénine, témoignant ainsi d'un rôle précoce de la protéine SRF dans le programme de différenciation myogénique (Gauthier-Rouviere et al., 1996). Il est par ailleurs important de noter que, alors que la Troponine T est effectivement une cible directe de la protéine SRF (Wang et al., 1994), aucune séquence CArG fonctionnelle n'a été identifiée dans les séquences régulatrices du gène de la myogénine. Son inhibition par extinction de la protéine SRF témoigne donc d'un rôle général de cette dernière dans le processus de différenciation, et non d'une régulation directe du gène. La protéine SRF sous forme de dimère n'a pas ou a peu d'activité (Treisman et al., 1992). Elle doit, pour être activée, être phosphorylée et/ou s'associer à des cofacteurs, et assurer ainsi une sorte d'ancrage pour la formation de complexes multiprotéiques sur les régions régulatrices de ses gènes cibles. Outre de nombreux gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette au cours de la différenciation, les gènes de la famille bHLH, et notamment MyoD, représentent des cibles potentielles importantes de la protéine SRF. L'implication du SRF dans la régulation du gène MyoD a été prouvée en 1996 par deux études de Gauthier-Rouvière et al., et Soulez et al., montrant que l'inactivation de la protéine SRF par microinjection d'anticorps bloquants dans des myoblastes prolifératifs, ou la construction de lignées C2 exprimant un oligonucléotide SRF anti-sens, se traduisent par une perte d'expression de la protéine MyoD (Gauthier-Rouviere et al., 1996; Soulez et al., 1996). Des travaux ultérieurs de Carnac et al. et Wei et al. confirment cette régulation de MyoD dépendante de SRF: l'inactivation de la petite protéine G RhoA, régulateur positif du facteur SRF, entraîne une perte d'expression de la protéine MyoD, sans toutefois altérer l'expression du facteur Myf5 (Carnac et al., 1998; Wei et al., 1998).

3- Les facteurs humoraux inducteurs de la myogénèse

3.1- L'arginine vasopressine

L'arginine-vasopressine (AVP) est un nonapeptide cyclique produit principalement par les neurones magnocellulaires des noyaux supra-optique et paraventriculaire, qui est ensuite transporté le long des axones vers l'hypophyse postérieure, où il est libéré dans la circulation sanguine (Kozniowska and Romaniuk, 2008).

Plusieurs études se sont intéressées à la biosynthèse de l'AVP, et ont montré à l'aide de techniques immunohistochimiques et d'hybridations *in situ* chez le rat que, outre l'hypothalamus, plusieurs structures comme l'hippocampe et le plexus choroïde sont capables de synthétiser de l'AVP (Buijs et al., 1978; de Vries and Miller, 1998).

Cette hormone est surtout connue comme un modulateur de l'osmolalité des fluides corporels, du volume sanguin, de la pression sanguine, du tonus vasculaire et de la prolifération cellulaire. Elle a des effets antidiurétiques et vasoconstricteurs. Les effets biologiques de l'AVP sont déterminés par le type de récepteurs sur lesquels l'hormone se fixe. Trois récepteurs ont été identifiés V1a-vasculaire, V2-rénal, V1b-pituitaire. Ce sont des récepteurs à plusieurs domaines transmembranaires couplés aux protéines G trimériques (*Figure 6*).

3.1.1- Les récepteurs de l'arginine-vasopressine

Le récepteur V2-rénal agit en activant l'adénylate cyclase et la protéine kinase A. Il est présent principalement au niveau de la portion médullaire des reins, et il contrôle d'une part la quantité d'eau libre, et d'autre part la réabsorption de l'urée (Thibonnier et al., 1996).

Le récepteur V1a active les phospholipases A2, C et D, ce qui stimule la synthèse de prostaglandines, d'inositol 1,4,5-trisphosphate et de diacylglycérol, la mobilisation du calcium intracellulaire, l'entrée de calcium extracellulaire, l'activation des protéines kinase C (Thibonnier, 1992), ainsi que la synthèse d'acide phosphatidique. Le récepteur V1a a été identifié au niveau des cellules musculaires lisses, des hépatocytes, des plaquettes sanguines, des lymphocytes, des monocytes, des pneumocytes de type II, du cortex surrénal, des organes sexuels et de l'épithélium rétinien (Thibonnier et al., 1996). Il joue un rôle important dans la contraction et la prolifération cellulaire, l'agrégation plaquettaire, la libération des facteurs de coagulation et la glycogénolyse (Thibonnier et al., 1996). Le récepteur V1a a aussi été mis en évidence dans les lignées myogéniques L6, L5, RD, C2C12, et dans les myoblastes primaires de poulet.

Le récepteur V1b (ou V3) est localisé au niveau de l'hypophyse postérieure, et l'activation de ce récepteur stimule la libération de l'ACTH (Thibonnier et al., 1996).

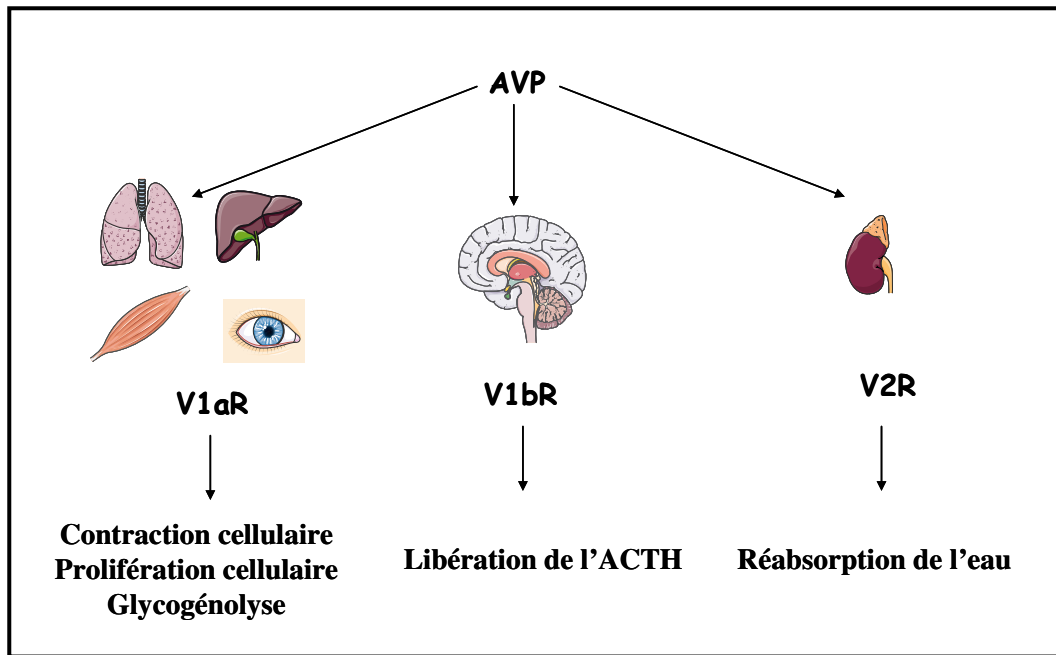


Figure 6 : Mode d'action de l'arginine vasopressine

3.1.2- Rôle de l'AVP dans la différenciation myogénique

En ce qui concerne l'induction de la différenciation myogénique, il a été démontré que l'AVP stimule la fusion des myoblastes et accentue le phénotype différencié des myotubes en augmentant leur taille. De plus, l'AVP agit en synergie avec les facteurs de croissance IGF pour stimuler la différenciation (Minotti et al., 1998).

Au niveau de la signalisation induite par l'AVP, Naro et al. (1997) ont montré que l'induction de la différenciation des myoblastes L6 par l'AVP met en jeu l'activation des phospholipases C et D, mais que seule l'activité phospholipase D est corrélée avec la réponse myogénique (Naro et al., 1997). L'action de l'AVP s'accompagne d'une augmentation de l'expression des régulateurs myogéniques MRFs (notamment Myf-5) et MEF2, nécessaires pour l'activation transcriptionnelle de la myogénine (Nervi et al., 1995; Scicchitano et al., 2002), suivie par l'apparition des marqueurs tardifs de la différenciation, tels que l'accumulation de myosine.

La probable implication in vivo de l'AVP dans la différenciation des muscles fœtaux est suggérée par la forte concentration d'AVP présente dans le muscle fœtal humain, qui baisse après la naissance (Smith et al., 1992). Une autre étude in vivo suggérant la pertinence physiologique de l'effet de l'AVP sur la différenciation a montré que le traitement de souris par l'AVP stimule la régénération musculaire et s'oppose aux effets négatifs de TNF α (Moresi et al., 2009).

In vitro, Komati et al. ont montré que l'AVP induit la différenciation des myoblastes L6 via l'activation de la phospholipase D et des petites protéines G Rho. Ils ont également montré que l'AVP induit la formation de fibres de stress qui pourraient être impliquées dans la différenciation myogénique (Komati et al., 2005). Des études de microscopie de fluorescence ont montré que la stimulation des myoblastes L6 par l'AVP induit une accumulation de PA et de PIP2 au niveau des fibres de stress (Komati et al., 2005).

3.2- Les facteurs de croissance IGFs

3.2.1- Généralités

Les IGFs (insulin like growth factors) IGF-I et IGF-II ressemblent structurellement à l'insuline. La forme mature de ces hormones est formée de 4 domaines. Les domaines A et B sont homologues à ceux de l'insuline ; contrairement à celui de l'insuline, le domaine C n'est pas clivé dans les IGFs matures. Le domaine D des IGFs est absent de la structure de l'insuline (Le Roith et al., 2001).

Les IGFs sont sécrétés principalement par le foie, mais sont aussi produits localement par la plupart des tissus, où ils agissent de manière autocrine ou paracrine. Les deux IGFs sont vitaux pour le développement embryonnaire, mais ils sont aussi sécrétés après la naissance et contribuent à la croissance des différents tissus de l'organisme notamment les muscles, les os, le cartilage, les reins, les poumons et le cerveau. Chez l'adulte les IGFs ont un rôle anabolique, et participent à la réparation des tissus (Dai et al., 2010). Il semble que IGF-I ait un rôle prépondérant après la naissance, le rôle précis d'IGF-II étant mal connu.

Les IGFs jouent un rôle important dans la croissance et le développement chez tous les vertébrés (Wood et al., 2005). Les souris invalidées pour IGF-I ou IGF-II sont plus petites que les souris sauvages (- 40% en poids) (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993). Les souris "doubles KO IGF-I-IGF-II" ne pèsent que 30% du poids des animaux sauvages, et meurent peu après la naissance (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993). La surexpression d'IGF-I dans les souris augmente le poids corporel de 30% (Mathews et al., 1988).

En plus de leur rôle dans la croissance et le développement, les IGFs sont importants dans la maturation du système nerveux central, du tissu musculaire et des organes reproductifs. Chez les humains, une délétion homozygote partielle du gène qui code pour IGF-I est associée avec un retard mental, un retard de croissance, et une surdité (Woods et al., 1996).

3.2.2- Les récepteurs des IGFs

➤ *Le récepteur IGF-IR*

IGF-I induit plusieurs réponses cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la migration en activant le récepteur IGF-IR (IGF-I receptor), constitué par deux sous-unités α et deux sous-unités β liées par des ponts disulfures. Les sous-unités α contiennent un site riche en cystéine qui permet la liaison d'IGF-I ; les sous-unités β sont caractérisées par leur activité tyrosine kinase qui transmet le signal aux effecteurs. IGF-IR possède une similarité de séquence et de structure très élevée avec le récepteur à l'insuline (De Meyts and Whittaker, 2002). La liaison d'IGF-I sur ce récepteur induit son autophosphorylation, et l'activation de multiples signaux intracellulaires via des molécules adaptateurs comme IRS-1 (Dupont and LeRoith, 2001; White, 2003). La similarité structurale entre IGF-I, IGF-II et l'insuline fait que ces hormones peuvent se fixer et activer les mêmes récepteurs. Notamment, IGF-II active IGF-IR (Duan et al., 2010).

➤ *Le récepteur IGF-IIR*

Ce récepteur agit également comme récepteur à mannose-6-phosphate (M6P). Il a une structure et une fonction différentes de celles du récepteur IGF-IR. C'est une protéine transmembranaire monomérique, avec un domaine extracellulaire riche en cystéine. Il a une affinité 100 fois plus élevée pour IGF-II que pour IGF-I. IGF-IIR lie IGF-II et l'amène vers les lysosomes où il sera dégradé (Kornfeld, 1992). Son rôle direct en signalisation semble limité.

➤ *Les protéines de liaison aux IGFs*

Les IGF-BPs (IGF-binding protein) constituent une famille de protéines sécrétées qui se lient spécifiquement et avec une forte affinité aux IGF - I et IGF - II. Ces protéines agissent comme des transporteurs des IGFs dans la circulation, et des régulateurs de leur disponibilité et de leur turnover (Jones and Clemmons, 1995).

3.2.3- Les IGFs et la myogénèse

Les IGFs jouent un rôle-clé dans la croissance des muscles, alors que leur rôle dans la différenciation myogénique est moins clair. Plusieurs études ont montré qu'il y a une augmentation du taux d'IGF-II au cours de la myogénèse (Florini et al., 1996; Florini et al., 1993; Florini et al., 1991b). Les souris déficientes en IGF-IR présentent une hypoplasie musculaire et meurent après la naissance par asphyxie (Liu et al., 1993). La surexpression d'IGF-I chez la souris induit une augmentation de la taille des fibres musculaires (Barton-Davis et al., 1998; Barton et al., 2002). Des études in vitro ont montré qu'un oligonucléotide antisens-anti IGF-II inhibe complètement la différenciation des

myoblastes C2 (Florini et al., 1991b), alors que la surexpression d'IGF-II ainsi que l'addition d'IGF-I ou IGF-II exogènes accélèrent la différenciation myogénique (Ren et al., 2010; Ren et al., 2008).

L'étude des voies de signalisation activées par les IGFs au cours de la différenciation myogénique a mis en évidence l'implication de la voie PI3K-Akt (Coolican et al., 1997; Wilson and Rotwein, 2007; Wilson et al., 2004). Wilson et Rotwein (2007) ont notamment montré que des fibroblastes embryonnaires surexprimant MyoD subissent une différenciation myogénique complète, qui est inhibée par la surexpression d'un mutant dominant-négatif d'Akt. Cette inhibition est due à un blocage de l'activité transcriptionnelle de MyoD, pas au blocage de son expression. Elle est reproduite par l'expression d'ARNi anti-Akt1, mais pas d'ARNi anti-Akt2, ce qui permet d'attribuer un rôle à la seule isoforme Akt1 dans la différenciation myogénique. L'équipe de Wilson a confirmé, en utilisant des fibroblastes embryonnaires surexprimant MyoD, que les cellules provenant de souris transgéniques déficientes pour Akt1 ne se différencient pas, n'expriment ni la myogénine ni la troponine, et ne fusionnent pas, contrairement aux cellules provenant de souris sauvages. Par contre les cellules provenant de souris déficientes en Akt 2 différencient normalement (Rotwein and Wilson, 2009).

Contrairement aux études de Wilson, d'autres études effectuées *in vitro* sur les myoblastes de la lignée C2 ont suggéré que c'est plutôt l'isoforme 2 d'Akt qui est impliquée dans la différenciation myogénique, son expression étant augmentée au cours de la différenciation, et l'injection d'anticorps anti-Akt2 dans les cellules bloquant la différenciation (Vandromme et al., 2001).

Akt contrôlerait l'activité myogénique de MyoD en permettant la formation du transcriptosome spécifique du muscle squelettique, comprenant MyoD et les acétyl transférases p300 et p300/CBP-associated factor, par phosphorylation directe de p300. La phosphorylation directe de p300 augmente son activité acétyltransférase envers MyoD et favorise le recrutement de pCAF qui à son tour permet l'acétylation de MyoD, p300 et des histones permettant la stabilisation du transcriptosome spécifique MyoD/p300/pCAF et l'initiation de la transcription. L'action de PI3K-Akt est une étape importante pour le remodelage de la chromatine induit par p38, qui permet le recrutement du complexe SWI/SNF au niveau des nucléosomes (Serra et al., 2007).

De plus, Akt2 est capable de se fixer sur la protéine Prohibitine2 (PHB2), un répresseur transcriptionnel de la myogénèse. La fixation d'Akt2 réduirait l'interaction PHB2/MyoD, et favoriserait l'action myogénique de MyoD (Heron-Milhavet et al., 2008)

Le rôle d'Akt dans la différenciation n'est cependant pas tout à fait clair. Une étude montre que chez les souris "double KO" pour les deux isoformes Akt1 et Akt2, les muscles se différencient

normalement, sans différence au niveau du nombre des fibres musculaires avec les souris sauvages. La seule différence observée est que les myofibres sont plus petites, ce qui implique Akt dans le contrôle de la taille des myotubes plutôt que dans leur différenciation (Peng et al., 2003). De plus, la surexpression d'un mutant dominant-négatif d'Akt dans des myoblastes primaires de souris n'a pas d'effet sur les taux et la cinétique d'expression des marqueurs de différenciation et la fusion des cellules (Bois and Grosveld, 2003)

Les IGFBPs, notamment IGFBP-5, pourraient jouer un rôle important au cours de la différenciation des myoblastes (Ren et al., 2008). In vitro, il a été montré que l'expression d'IGFBP-5 augmente au cours de la différenciation myogénique (Bayol et al., 2000). Son rôle est cependant controversé: d'une part sa surexpression inhibe la différenciation myogénique (Cobb et al., 2004) et les souris "IGFBP-5 KO" présentent une musculature normale (Ning et al., 2007), d'autre part, l'addition d'IGFBP-5 exogène avec de l'IGF-I stimule la différenciation myogénique (Ewton et al., 1998) et l'inhibition de l'expression d'IGFBP-5 par des ARNi inhibe la myogénèse et l'expression du gène IGF-II (Duan et al., 2010).

4- Les facteurs répresseurs de la myogénèse

4.1- Le facteur de croissance TGF- β

Le TGF- β a été initialement caractérisé comme un inducteur du phénotype transformé dans les cellules fibroblastiques. Par la suite on a observé qu'il peut influencer la prolifération et la différenciation de types cellulaires d'origine mésenchymateuses (Ignotz and Massague, 1985). Dans les lignées de cellules musculaires, ainsi que dans les cultures de myoblastes primaires (rat, caille), TGF- β inhibe d'une façon dose-dépendante la différenciation myogénique, et d'autre part il induit la prolifération cellulaire (Florini et al., 1991a).

D'après Florini et al. (1991), cet effet inhibiteur de TGF- β est transitoire puisque l'élimination de ce facteur du milieu de culture reverse ses effets négatifs (Florini et al., 1991a). Le mécanisme par lequel TGF- β inhibe la différenciation myogénique implique la phosphorylation des facteurs Smad2 et Smad3, qui, en combinaison avec certains facteurs de transcription, régulent l'expression génique (Glass, 2010). TGF- β inhibe ainsi l'expression de MyoD. De plus, Smad3 interagit physiquement avec MyoD et MEF2C, et inhibe leur activité de transactivation (Kollias and McDermott, 2008).

La myostatine, connue aussi sous le nom de GDF-8 (growth and differentiation factor 8) appartient à cette famille des TGF- β . C'est un régulateur négatif de la différenciation et de la masse musculaire (Lee, 2004). La myostatine bloque la différenciation des myoblastes en myotubes (Langley et al., 2002; Yang et al., 2007). Elle induit notamment une diminution de l'index de fusion, de l'expression des MRFs myogénine et MyoD, de l'activité de la créatine kinase, et du diamètre des myotubes (Glass, 2010). La myostatine est produite principalement dans le muscle squelettique, circule dans le sang, et agit sur le muscle en se fixant sur le récepteur de type II de l'activine, qui recrute et phosphoryle un récepteur de type I, ALK4 ou 5. Ce dernier recrute les facteurs Smad 2 et Smad 3 qui transloquent au niveau nucléaire après phosphorylation (Glass, 2010). Outre leurs effets géniques, et l'inhibition directe des MRFs, Smad2 et 3 inhibent Akt, ce qui entraîne une potentialisation de leur phosphorylation et de leurs effets anti-myogéniques (Trendelenburg et al., 2009).

4.2- Le facteur de croissance FGF

Le facteur de croissance FGF est connu pour être mitogène pour les cellules dérivées du mésoderme et du neuroectoderme, mais surtout c'est un puissant inhibiteur de la différenciation myogénique. Il inhibe l'expression des gènes qui codent pour les protéines bHLH. De plus, le FGF active la phosphorylation de la myogénine au niveau de la thréonine 114, ce qui entraîne la perte de sa capacité à se lier à l'ADN (Olson, 1993). Ce site de phosphorylation existe également au niveau des autres protéines bHLH, ce qui laisse supposer que la phosphorylation de ces autres protéines participe à l'inhibition de la différenciation myogénique (Olson, 1993).

5- Voies de signalisation impliquées dans la myogénèse

5.1- La voie p38 MAPK

La p38 MAP kinase est une sérine thréonine kinase impliquée dans les processus de croissance et de différenciation cellulaires, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Cette voie de signalisation est stimulée par des signaux extracellulaires comme les facteurs de croissance et certaines hormones (Keren et al., 2006).

L'activation de la voie de signalisation p38 met en jeu l'activation des MAPK kinases (MAP3K). Ces MAP3Ks phosphorylent et activent les deux MAPK kinases (MAP2Ks) MKK6 et MKK3 qui à leur tour activent p38 MAPK (Keren et al., 2006).

Chez les vertébrés quatre isoformes de p38 ont été identifiées : α , β , γ et δ . Ces isoformes sont caractérisées par la présence d'un motif de phosphorylation Thr-Gly-Tyr (TGY). Une fois activée, p38 phosphoryle ses substrats qui comprennent plusieurs kinases et facteurs de transcription, ce qui implique un rôle de p38 dans la régulation génique (Keren et al., 2006).

Plusieurs études ont montré qu'au cours de la différenciation les isoformes α et β de p38 sont phosphorylées et activées. L'implication de ces deux isoformes dans la différenciation myogénique a été démontrée. SB203580, un inhibiteur spécifique de p38 α et β , inhibe la différenciation myogénique et réduit l'expression des MRFs, de gènes de structure comme la myosine, ainsi que l'expression de gènes spécifiques du muscle et le régulateur du cycle cellulaire p21^{waf1} (Cuenda and Cohen, 1999; Wu et al., 2000; Zetser et al., 1999). Une autre preuve de l'implication de la voie p38 MAPK dans la différenciation myogénique vient du travail de Puri et al. qui ont montré que les cellules de rhabdomyosarcome RMS sont incapables de se différencier à cause de l'absence de l'activité p38 (Puri et al., 2000).

Le rôle des autres isoformes de p38 dans la différenciation myogénique n'est pas très clair. Cependant, Lechner et al. ont montré que la surexpression de p38 γ induit la différenciation myogénique des C2C12, alors que la surexpression de mutants négatifs de cette isoforme inhibe la différenciation (Lechner et al., 1996).

Le rôle des p38 MAPK pourrait être expliqué par leur capacité à activer les protéines de la famille MEF2, notamment MEF2A et MEF2C. Ces dernières pourraient être directement phosphorylées par p38 au niveau des leurs domaines de transactivation (Han et al., 1997; Zhao et al., 1999). Au cours de la différenciation, MEF2C est phosphorylé dans les myoblastes d'une façon p38-dépendante, et cette phosphorylation est nécessaire pour son activité transcriptionnelle (Wu et al., 2000; Zetser et al., 1999).

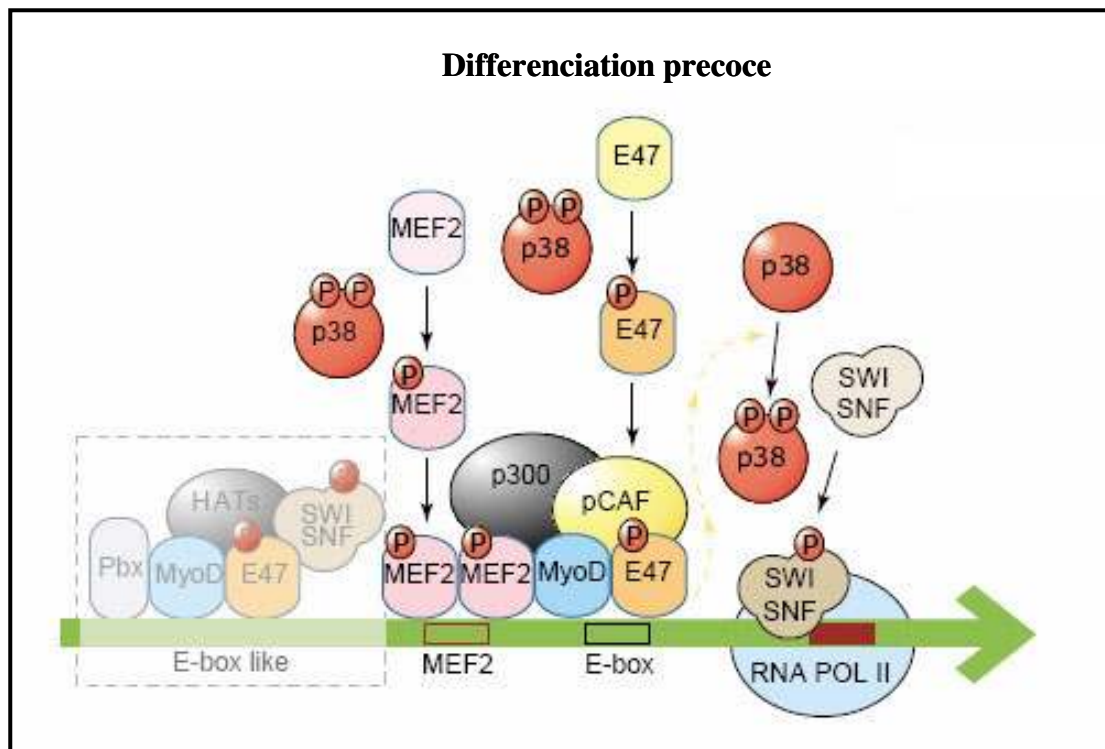


Figure 7 : Rôle de p38 dans l'initiation de la différenciation myogénique

D'après Keren *et al.* 2006

De plus, p38 est capable de réguler l'activité des MRFs. L'activité transcriptionnelle de MyoD pourrait être contrôlée indirectement par p38 (Lluis *et al.*, 2005; Molkenin *et al.*, 1995). p38 ne régule pas tous les MRFs positivement, MRF4, par exemple, est régulé négativement. MRF4 impliqué dans le stade terminal de la différenciation myogénique est exprimé dans les myotubes différenciés, et participe au maintien de la transcription des gènes muscles-spécifiques dans le tissu adulte. Il est phosphorylé par p38 au niveau des résidus sérines de son domaine de transactivation, ce qui réduit sa capacité à induire la transcription des gènes impliqués dans la différenciation myogénique (Suelves *et al.*, 2004). p38 inhibe MRF4 au cours de la différenciation, mais une fois que les myotubes sont formés, l'activité p38 décline et MRF4 est exprimé normalement pour maintenir le phénotype différencié des myotubes (Keren *et al.*, 2006).

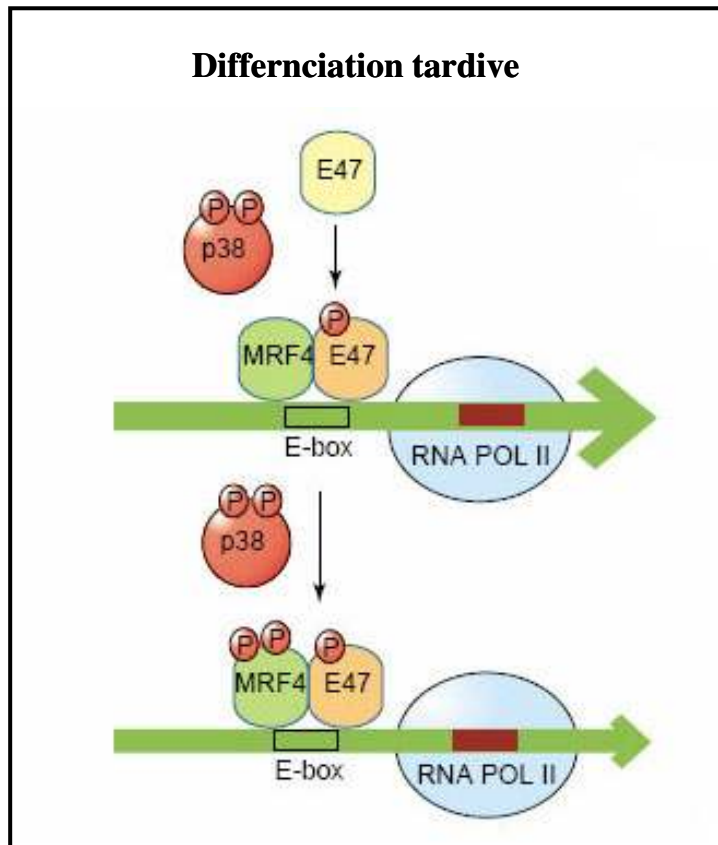


Figure 8 : Rôle de p38 dans le maintien du phénotype différencié des muscles

D'après Kerner *et al.* 2006

La voie de signalisation p38 MAPK pourrait interagir avec d'autres voies impliquées dans la différenciation myogénique, notamment la voie PI3K-Akt. A ce sujet, les résultats sont controversés : certains ont montré que l'activation des deux voies est complètement indépendante, en se basant sur le fait que l'inhibition d'une voie n'affecte pas l'activation de l'autre (Li *et al.*, 2000; Sarker and Lee, 2004; Tamir and Bengal, 2000) ; d'autres études ont par contre montré que les inhibiteurs de la voie mTOR et ceux de p38 MAPK inhibent simultanément ces deux voies de signalisation au cours de la différenciation myogénique. Cuenda et Cohen ont décrit une boucle de rétrocontrôle positif entre ces deux voies de signalisation, qui permettrait d'achever la différenciation myogénique (Cuenda and Cohen, 1999).

Une autre interaction de la voie de signalisation p38 est possible avec la voie ERK MAPK. L'inhibition de l'activité de ERK augmente l'activité de P38, et inversement, ce qui pourrait expliquer le rôle de p38 dans l'arrêt de la croissance cellulaire et l'induction de la différenciation myogénique (Khurana and Dey, 2002).

5.2- la petite protéine G Rho

Les GTPases monomériques sont une super-famille de 150 membres environ, dont les masses moléculaires varient de 20 à 30 KDa. Ces protéines possèdent un motif consensus de liaison au GTP. Elles sont classées, en fonction de leurs homologies de séquences, en 5 familles: Ras, Rho, Rab, ARF et Ran.

Les petites protéines G Rho contrôlent une multitude de processus biologiques, comme l'organisation du cytosquelette d'actine, la polarité cellulaire, le transport membranaire, et l'activité des facteurs de transcription (Bryan et al., 2005). La famille des petites protéines G Rho est constituée par 20 protéines divisées en 6 sous-familles, en fonction de leur séquence primaire, de la structure de leurs motifs, ainsi que leur activité biologique. Parmi ces sous-familles, on trouve "RhoA-related subfamily", "Rac1-related subfamily", et "Cdc42-related subfamily", qui sont connues pour être impliquées dans la différenciation myogénique (Bryan et al., 2005).

Les protéines G existent sous deux formes distinctes, l'une active liée au GTP, et l'autre inactive, liée au GDP. Dans le cytosol, les protéines Rho sont liées par leur extrémité C-terminale aux inhibiteurs de dissociation de GDP (GDIs) qui les maintiennent sous forme inactive. Lors de l'activation, les protéines Rho sont transloquées aux membranes où les facteurs d'échange GEFs (guanine nucleotide exchange factors) favorisent la dissociation du GDP et la liaison du GTP. Les protéines Rho peuvent alors activer leurs protéines effectrices. Il existe aussi des protéines activatrices de l'activité GTPase (GAPs) qui favorisent le retour des protéines Rho à leur état inactif (Bryan et al., 2005).

Les protéines de la famille Rho sont activées et transloquées du cytosol vers la membrane en réponse à de nombreux agonistes dont le LPA, l'endothéline-1, la trombine et l'insuline. Le mécanisme par lequel ces agonistes activent les protéines Rho n'est pas bien compris, mais plusieurs expériences laissent penser que des PKC, des tyrosines kinases, des PI-3 kinases et surtout les sous-unités α et $\beta\gamma$ de protéines G hétérotrimériques pourraient être impliquées (Exton, 1999).

Carnac et al. ont étudié le rôle de RhoA au cours de la différenciation des myoblastes C2.7, et ont montré que RhoA induit l'expression de MyoD. De plus, l'inhibition de RhoA par la lovastatine ou la toxine C3-transférase, ou la surexpression de mutants dominants-négatifs de RhoA, provoque une diminution du taux de protéine MyoD, ainsi qu'une diminution de l'activité d'un gène rapporteur sous contrôle de MyoD (Carnac et al., 1998). L'activation de l'expression de MyoD par RhoA nécessite une activation de SRF (Carnac et al., 1998).

Wei et al.(1998) ont remarqué que la co-transfection de Rho et de SRF stimule l'expression de l'actine musculaire (Wei et al., 1998). Cette même étude a montré que l'expression de mutants dominants négatifs de RhoA et SRF inhibe la fusion des myoblastes et diminue l'expression de la myogénine et de la myosine. Rho est également impliqué dans l'autorégulation du promoteur du gène murin SRF (Bryan et al., 2005).

Un mécanisme par lequel Rho pourrait activer la différenciation est suggéré par les travaux de Komati et al. (2005), qui montrent que RhoA est activé lors de la stimulation myogénique de myoblastes L6 par l'AVP, et qu'il induit un remodelage PLD-dépendant du cytosquelette (formation de fibres de stress) susceptible de participer au processus de myogénèse.

5.3- La voie de signalisation mTOR

Une voie nouvelle de régulation de la myogénèse fait l'objet d'études intensives, la voie de mTOR, qui est aussi largement impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la croissance cellulaires.

5.3.1- Généralités

mTOR (mammalian target of rapamycin), également connu sous le nom de FRAP (FKBP-rapamycin-associated protein), de RAFT1 (rapamycin and FKBP target), ou RAPT1 (rapamycin target) (Brown et al., 1994; Sabers et al., 1995), est une sérine-thréonine kinase qui fait partie de la famille des phosphatidylinositol kinase-related kinases (PIKK) incluant ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad3 related), DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) et hSMG1 (suppressor with morphological effect on genitalia) (Bakkenist and Kastan, 2004).

TOR est une protéine hautement conservée au cours de l'évolution. Les levures en possèdent deux gènes qui codent pour les deux protéines yTOR1 et yTOR2 (Helliwell et al., 1994). Les mammifères en ont un seul, qui code pour la protéine mTOR (Hay and Sonenberg, 2004).

TOR est la seule cible connue de la rapamycine, un macrolide bactérien lipophile, qui a été isolé en 1970 (Vezina et al., 1975). Ce macrolide a des effets antifongiques, immunosuppresseurs et anticancéreux (Brown et al., 1994). Il forme un complexe avec l'immunophiline FKBP12 (FK506-binding protein), et ce complexe est capable de se fixer sur mTOR au niveau d'un domaine spécifique, bloquant ainsi son activité (Lorberg and Hall, 2004).

La voie mTOR intègre des signaux intracellulaire et extracellulaire permettant la régulation du métabolisme cellulaire, la croissance et la survie cellulaire. Cette voie joue un rôle central dans l'organisme, de par son implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques incluant la formation des tumeurs, l'angiogénèse, la résistance à l'insuline, l'adipogénèse, l'activation des lymphocytes T, etc.

5.3.2- Structure de la protéine mTOR

mTOR est une protéine de 289 kDa. L'analyse de sa séquence peptidique a permis de mettre en évidence plusieurs domaines (*Figure 9*) :

Du côté N-terminal on trouve 20 domaines HEAT (Huntington, EF3, A subunit of PP2A, TOR1), répétés en tandem, impliqués dans des interactions protéine-protéine (Andrade and Bork, 1995). Ces domaines sont constitués de 2 hélices α de 40 acides aminés, avec une alternance spécifique de domaines hydrophiles et hydrophobes (Hay and Sonenberg, 2004).

La partie C-Terminale de la protéine mTOR contient le domaine catalytique responsable de son activité kinase. Adjacent à ce domaine catalytique, on trouve le domaine FRB (FKBP12-rapamycin binding domain) (Hay and Sonenberg, 2004).

La séquence peptidique de la kinase mTOR présente des domaines FAT (FRAP, ATM, TRAP), présents également dans les autres protéines de la famille PIKK (Bosotti et al., 2000), et du côté C-Terminal, des domaines FATC (focal adhesion targetting C-terminal domain), nécessaires à l'activité mTOR. Des études ont en effet montré que la délétion d'un seul acide aminé de ces domaines supprime l'activité catalytique de mTOR (Peterson et al., 2000). Entre le domaine catalytique et les domaines FATC on trouve le domaine de régulation négative NRD (Negative Regulatory Domain) (Sekulic et al., 2000).

Comme modèle d'activation de mTOR, il a été proposé que les domaines FAT et FATC interagissent pour exposer le domaine catalytique, et permettre la phosphorylation des substrats (Hay and Sonenberg, 2004).

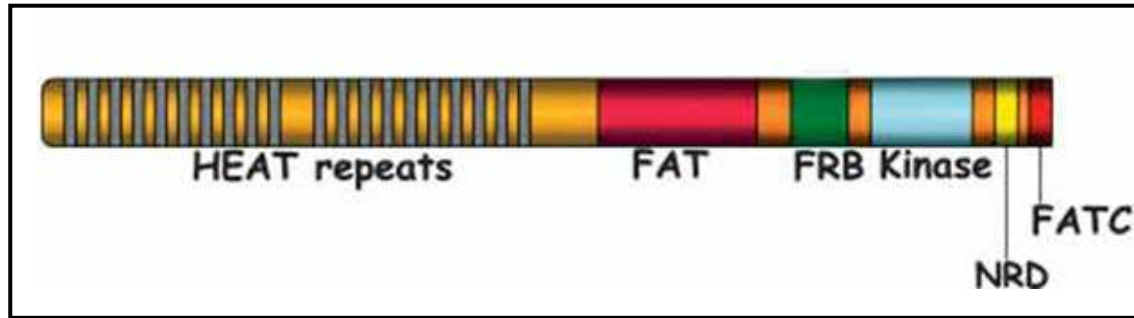


Figure 9 : La structure de la protéine mTOR

D'après Hay *et al.* 2004

5.3.3- Les 2 complexes de mTOR

Au niveau cellulaire la protéine mTOR se trouve associée à d'autres protéines pour former deux complexes distincts qui exercent des fonctions différentes : les complexes mTORC1 et mTORC2 (Wullschleger *et al.*, 2006) (Figure 9).

5.3.3.1- Le complexe mTORC1

Ce complexe de masse moléculaire 516 kDa est constitué par l'association de 5 protéines qui forment l'unité catalytique du complexe. Outre mTOR, il comprend :

- Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), de 150 kDa, qui d'après certaines études joue un rôle important dans l'assemblage du complexe (Hara *et al.*, 2002) et le recrutement des protéines substrats (Kim *et al.*, 2002).
- mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8) ou GBL, de 37 kDa, dont le rôle dans le complexe n'est pas clair, la délétion de cette protéine n'affectant pas l'activité de mTORC1 *in vivo* (Guertin *et al.*, 2006).
- PRAS40 (proline-rich AKT substrate, 40 kDa) et Deptor (DEP-domain-containing mTOR interacting protein) qui ont été identifiés comme régulateurs négatifs de mTORC1 (Peterson *et al.*, 2009; Sancak *et al.*, 2007).

Des études ont montré que PRAS40 inhibe le recrutement des substrats (Wang *et al.*, 2007). D'autres études ont confirmé le rôle négatif de PRAS40 et de Deptor dans l'activation de mTOR en

montrant que, d'une part le recrutement de ces deux protéines dans le complexe diminue l'activité catalytique de mTOR, et d'autre part que l'activation de mTOR induit la phosphorylation de ces deux protéines, ce qui inhibe leur association avec mTOR et permet l'activation du complexe 1 (Peterson et al., 2009; Wang et al., 2007).

5.3.3.2- Le complexe mTORC2

Six protéines constituent le noyau catalytique du complexe mTORC2: la protéine mTOR, Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein), Protor-1 (protein observed with rictor-1), mLST8 et Deptor.

Rictor interagit avec Protor-1, (Frias et al., 2006; Jacinto et al., 2004) mais le rôle physiologique de cette interaction est mal connu. Comme dans le complexe mTORC1, Deptor contrôle négativement l'activité de mTORC2 (Peterson et al., 2009). mLST8 est aussi importante pour l'activité de ce complexe, les mutants dominants négatifs de cette protéine diminuant la stabilité et l'activité du complexe (Guertin et al., 2006).

Jusqu'à une date récente la rapamycine était considérée comme inhibiteur du seul complexe mTORC1. Cependant, des études ont montré que l'utilisation d'une plus forte concentration et l'augmentation de la durée de traitement permettent à la rapamycine d'inhiber les deux complexes de mTOR, qui peuvent donc participer aux effets biologiques de ce composé (Rosner and Hengstschlager, 2008).

Relativement peu d'études ont porté sur la localisation cellulaire des deux complexes de mTOR. La plupart des protéines qui sont impliquées dans l'activation de la voie de signalisation de mTOR ont été identifiées dans le cytoplasme, mais également dans le noyau, y compris PI3K, PTEN, Akt, TSC1/TSC2 et S6 kinase. Les études menées notamment dans les lignées cellulaires comme HEK 293 ou CV-1 montrent une distribution nucléaire et cytoplasmique de mTOR, sans faire la distinction entre les deux complexes (Kim and Chen, 2000). Rosner et al. (2008) ont montré dans les fibroblastes primaires humains que mTORC1 est plus abondant dans le noyau que dans le cytoplasme, alors que mTORC2 est présent dans les deux compartiments (Rosner and Hengstschlager, 2008).

Des résultats récents ont montré que la petite protéine G Rheb, qui est nécessaire à l'activation de mTORC1 par les acides aminés, est localisée au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes. Sous l'action des acides aminés, le complexe Ragulator-Rag constitué par la protéine Rag-GTPase associée au complexe Ragulator (p18, MP1, p14) qui permet sa localisation au niveau des

lysosomes, joue le rôle d'appui pour la translocation de mTORC1 au niveau des lysosomes, et son activation par Rheb (Sancak et al., 2010).

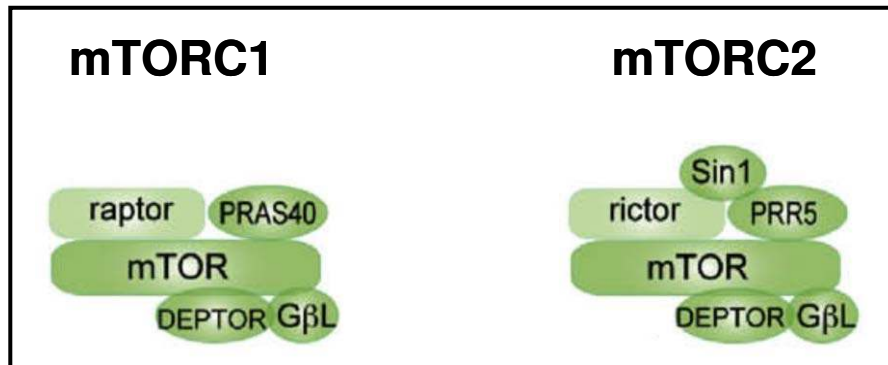


Figure 10 : La structure des deux complexes de mTOR

D'après Sandri *et al.* 2010

5.3.4- Régulations du complexe mTORC1 (Figure11)

5.3.4.1- Les facteurs de croissance

L'activation des voies de signalisation de l'insuline et de Ras-ERK induit la stimulation de la voie de signalisation de mTORC1, via la phosphorylation de TSC2, inhibiteur de cette voie. D'une part les facteurs de croissance comme le PDGF activent Akt qui est un activateur puissant de la voie mTOR (Potter et al., 2002), et d'autre part ils inhibent TSC2 (Inoki et al., 2002).

Il a été amplement montré que la stimulation *in vitro* des cellules par les facteurs de croissance augmente la phosphorylation de deux effecteurs de mTORC1, S6 kinase et 4E-BP1, d'une façon rapamycine-dépendante. Cette activation de la voie mTORC1 met en jeu de manière cruciale la lipide kinase PI3K. Une mutation au niveau du récepteur de PGDF rendant ce dernier incapable de se fixer sur la PI3K inhibe la phosphorylation mTORC1-dépendante de S6 kinase 1 (S6K1) induite par le PDGF (Chung et al., 1994). Une forme mutée de IRS-1 qui active PI3K constitutivement induit la phosphorylation mTORC1-dépendante de 4E-BP1 (Chung et al., 1994; Mendez et al., 1996). Plusieurs équipes ont aussi montré que la surexpression d'un mutant dominant-négatif de p85, la sous-unité régulatrice de PI3K, inhibe la phosphorylation de S6K1 induite par l'insuline (Sharma et al., 1998; Ueki et al., 2000). L'implication de PI3K dans l'activation de la voie mTOR a été également confirmée *in vitro* dans plusieurs modèles cellulaires, en utilisant des inhibiteurs de PI3K comme LY294002 ou la wortmannine (Brunn et al., 1996; Cheatham et al., 1994).

Ce rôle de PI3K dans l'activation de la voie mTORC1 induite par les facteurs de croissance pourrait expliquer les effets négatifs de PTEN (Phosphatase and Tensin homolog on chromosome 10) sur l'activation de la voie mTOR. PTEN est une phosphatidylinositol-3 phosphatase qui agit d'une façon opposée à celle de PI3K en déphosphorylant le PI-3,4-P2 et le PI-3,4,5-P3 produits par PI3K. La déficience en PTEN est associée avec avec une hyper-phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1 (Neshat et al., 2001; Podsypanina et al., 2001).

Au niveau physiopathologique, une augmentation d'activité de PI3K et/ou une diminution de d'activité de PTEN associées à une stimulation de mTORC1, ont été observées dans l'hypertrophie des muscles squelettiques (Bodine et al., 2001), dans des désordres hématologiques (Wendel et al., 2004), dans l'hypertrophie du muscle cardiaque (Shioi et al., 2003) et dans de nombreux cancers (Carracedo and Pandolfi, 2008).

➤ *Régulation de mTORC1 par Akt*

La protéine kinase Akt est un des effecteurs de PI3K. Akt se lie à son produit PIP3 grâce à son domaine PH (Pleckstrin Homology), ce qui induit sa translocation à la membrane, où elle est ensuite phosphorylée par PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase-1) sur le résidu Thr 308 du domaine catalytique, et par le complexe mTORC2 sur le résidu Ser 473 du domaine C-terminal (Alessi et al., 1997; Sarbassov et al., 2005). Ces deux phosphorylations produisent une activation synergique d'Akt.

Trois isoformes ont été identifiées, Akt1, Akt2, Akt3, qui ont des fonctions plus ou moins distinctes. Akt1 et Akt2 sont par exemple impliquées dans la survie cellulaire et l'homéostasie du glucose respectivement (Chen et al., 2001; Garofalo et al., 2003), alors que Akt3 a un rôle dans le développement du cerveau (Tschopp et al., 2005).

Akt joue un rôle important dans le développement, la régénération et l'hypertrophie du tissu musculaire induits en réponse à diverses voies de signalisation (Wilson and Rotwein, 2007). Chez la souris, les deux isoformes Akt1 et 2 semblent être importantes pour le développement des muscles, puisque leur absence provoque une atrophie musculaire sévère (Peng et al., 2003).

Dans les cellules HEK293 la surexpression d'une forme constitutivement active d'Akt induit la phosphorylation de 4E-BP1, substrat de mTORC1, en l'absence de facteur de croissance. Cette augmentation de la phosphorylation de 4E-BP1 est inhibée par la rapamycine et non pas par la wortmannine ce qui permet de positionner Akt comme activateur de mTORC1, en aval de PI3K (Gingras et al., 1998)

Chez des souris "double-KO" pour Akt1 et Akt2, la phosphorylation de 4EBP1 par mTOR est complètement inhibée, alors que l'effet est moins notable sur S6K1, autre substrat de mTOR. Ceci laisse supposer un rôle d'autres kinases, dont peut-être Akt3, dans la phosphorylation de S6K1 (Peng et al., 2003). D'autres études ont confirmé l'absence de corrélation entre la phosphorylation de S6K1 et l'activité Akt (Dufner et al., 1999; Radimerski et al., 2002), ce qui établit que S6K1 n'est pas strictement dépendante de l'activité d'Akt.

➤ *TSC1/TSC2*

Les protéines du complexe hétérodimérique TSC, TSC1 et TSC2, connues également sous les noms de Hamartine et Tubérine, sont codées par deux gènes distincts : tuberous sclerosis complex 1 et tuberous sclerosis complex 2. Ces deux protéines sont identifiées comme des régulateurs de mTOR (Cheadle et al., 2000).

La structure de TSC1 montre un domaine hélice super-enroulée au niveau C terminal, qui permet la liaison des protéines "ezrin-radixin-moesin actin binding proteins" impliquées dans la réorganisation du cytosquelette (Haddad et al., 2002). TSC2 contient un "leucine zipper" au niveau N-terminal, nécessaire pour l'association avec TSC1, et l'extrémité N-terminale est dotée d'une activité "GTPase activating protein" (GAP) (Wienecke et al., 1995).

Un lien étroit a été établi entre le complexe TSC1/TSC2 et la voie de signalisation mTOR. Dans plusieurs modèles cellulaires, la baisse de l'expression du complexe TSC1/TSC2 induit une augmentation de la phosphorylation de S6K1 (Goncharova et al., 2002; Inoki et al., 2002; Kwiatkowski et al., 2002). De plus, TSC2 est directement phosphorylée par Akt in vitro et in vivo, sur plusieurs sites (Inoki et al., 2002).

Des expériences de surexpression et de down-régulation du complexe TSC1/TSC2 in vitro montrent que ce complexe est un régulateur négatif de mTOR (Inoki et al., 2002). D'une part la surexpression des TSC1 et TSC2 dans les cellules HEK293 perturbe la phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1 induite par l'insuline (Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002), d'autre part dans des cellules mutées TSC1/TSC2-négatives, S6K1 et 4E-BP1 sont constitutivement activés et leur activité est sensible à l'effet de la rapamycine. De plus, la mutation de TSC2 au niveau du site de phosphorylation par Akt bloque complètement l'activation de mTOR induite par les facteurs de croissance (Inoki et al., 2002). On peut donc proposer le modèle de régulation suivant: la phosphorylation de TSC2 par Akt inactive le complexe TSC, et lève l'inhibition que ce dernier exerce sur mTORC1.

➤ *Rheb*

Des analyses en système acellulaire ont montré d'une part que l'activité GAP de TSC2 est sélective envers la petite protéine G Rheb, et d'autre part que Rheb est capable de se lier directement à TSC2 (Castro et al., 2003; Garami et al., 2003).

Garami et al. ont remarqué que l'insuline augmente les taux endogènes de Rheb-GTP d'une façon sensible à la wortmannine, et que les mutants TSC2-négatifs possèdent un taux élevé de Rheb-GTP (Garami et al., 2003). La surexpression de TSC2 augmente le taux de Rheb-GDP et diminue le taux de Rheb-GTP, (Castro et al., 2003), ce qui montre une régulation négative de Rheb par l'hétérodimère TSC1/TSC2.

La surexpression de Rheb dans des cellules mammaires induit une activation de la voie mTOR en l'absence de facteur de croissance, même en présence de l'inhibiteur de PI3K wortmannine (Castro et al., 2003; Garami et al., 2003; Inoki et al., 2002), alors que la surexpression d'un mutant dominant-négatif de Rheb bloque l'activation de mTOR induite par les facteurs de croissance et l'insuline. L'ensemble de ces résultats montre que Rheb, sous la forme Rheb-GTP, est un activateur de mTOR qui agit en aval de PI3K, Akt et du complexe TSC1/TSC2 (Tabancay et al., 2003)

5.3.4.2- Le métabolisme énergétique

mTOR est un acteur clé de la traduction des ARNm et de la biogénèse des ribosomes, processus qui consomment beaucoup d'énergie, ce qui implique la nécessité d'un contrôle de mTOR par le métabolisme énergétique.

La manipulation des taux d'ATP dans des cellules HEK293 et en système acellulaire montre en effet que l'activité de mTORC1 dépend étroitement du niveau de l'ATP, et suggère que mTORC1 peut être un senseur de l'état énergétique de la cellule (Dennis et al., 2001).

L'activité de la 5'-AMP activated kinase (AMPK) est modulée par un changement de ratio AMP/ATP, une diminution du taux d'ATP induisant une augmentation d'activité AMPK (Kemp et al., 1999). Il a été démontré qu'AMPK régule négativement l'activité mTOR, et notamment qu'une hausse d'AMPK induit une diminution de la phosphorylation de S6K1 (Kimura et al., 2003).

Plusieurs équipes ont étudié le rôle d'AMPK dans la régulation de la voie mTOR en traitant les cellules avec le 5-aminoimidazole-4-carboxymide (AICAR), activateur d'AMPK. AICAR perturbe la phosphorylation induite par l'insuline de S6K1, qui est dépendante de l'activité de mTOR, alors que la phosphorylation d'un mutant de S6K1 mTOR-indépendant (résistant à la rapamycine),

n'est pas perturbée (Inoki et al., 2003; Kimura et al., 2003). Ces résultats suggèrent une relation entre le taux d'ATP, AMPK, et l'activité mTORC1.

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer comment AMPK régule la voie mTOR. La première a été proposée par Inoki et al., qui ont montré que TSC2 possède plusieurs sites phosphorylables par AMPK in vitro et in vivo. Ils ont également montré que la mutation des résidus amino-acides cibles d'AMPK sur TSC2 rend la phosphorylation de S6K1 plus résistante à la suppression du glucose, ce qui prouve qu'AMPK active TSC2 (Inoki et al., 2003).

La deuxième hypothèse a été proposée par Cheng et al., qui ont montré que la protéine mTOR possède des sites qui pourraient être directement phosphorylés par AMPK, notamment la Thr 2446 du domaine NRD, ce qui aurait pour conséquence de réduire la phosphorylation de mTOR par Akt et d'affecter son activité (Cheng et al., 2004).

5.3.4.3- La disponibilité des nutriments

Plusieurs études ont montré que l'apport d'acides aminés à des cellules in vitro augmente la phosphorylation de S6K1 et de 4-EBP1 via une régulation de l'activité de mTOR (Kim, 2009). Cette activation de la voie mTOR par les acides aminés semble être contrôlée par la petite protéine G Rheb, car une surexpression de Rheb induit l'activation de la voie mTOR en l'absence des acides aminés (Long et al., 2005). Une autre observation en faveur du rôle de Rheb est que la stimulation par les acides aminés permet la fixation de Rheb sur mTOR (Long et al., 2005).

Cependant, selon Nobukuni et al. la régulation de la voie mTOR par les acides aminés est indépendante du complexe TSC1/TSC2 et de Rheb, puisque la privation en acides aminés de cellules déficientes en TSC1 et TSC2 n'affecte pas le taux de Rheb-GTP, bien qu'elle supprime la phosphorylation de S6K1. Ces auteurs ont suggéré l'implication de la "vacuolar protein-sorting-associated protein 34" (VPS34), une PI3 kinase de classe 3, dans l'activation de mTOR par les acides aminés (Nobukuni et al., 2005). Le mécanisme par lequel cette protéine agirait n'est pas encore élucidé.

D'autres hypothèses expliquant l'effet des acides aminés font intervenir les protéines Rag (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008), une famille de 4 petites GTPases qui après stimulation par les acides aminés interagiraient avec le complexe mTORC1, notamment avec Raptor, permettant ainsi la translocation du complexe au niveau périnucléaire où il pourrait être activé par Rheb (Sancak et al., 2008).

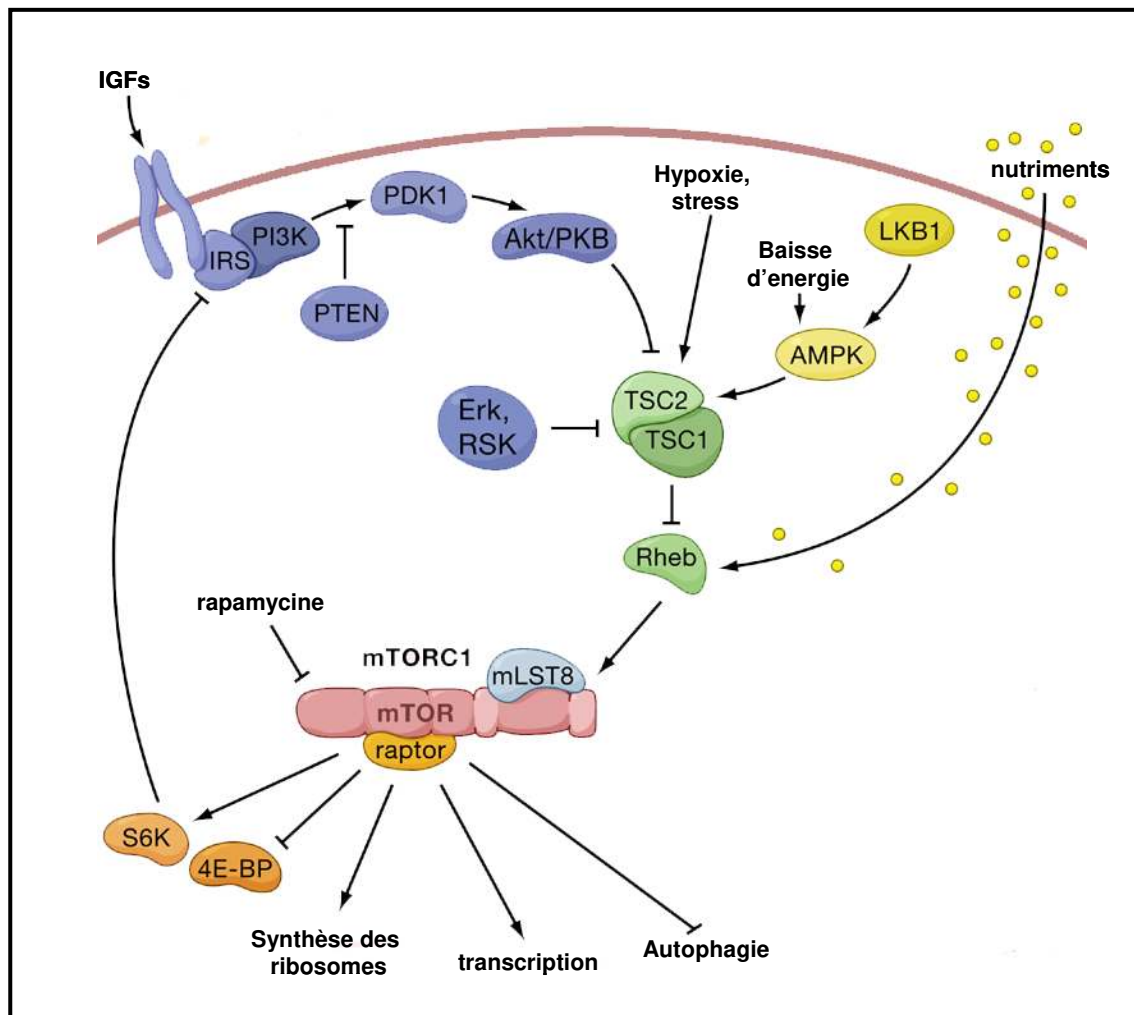


Figure 11 : Schéma récapitulatif de la régulation du complexe mTORC1

D'après Wullschleger *et al.* 2006

5.3.5- Les effecteurs de mTORC1

5.3.5.1- 4E-BP1

L'interaction entre les facteurs eIF4E et eIF4G, qui joue un rôle important dans l'initiation de la traduction des ARNm, est régulée par les membres de la famille eIF4E-binding proteins (4E-BPs). Chez les mammifères, cette famille contient 3 régulateurs de la traduction: 4E-BP1, 2 et 3, codés par trois gènes distincts, et connus pour réguler négativement la traduction (Poulin *et al.*, 1998).

Ces protéines se fixent sur eIF4E au niveau du site de fixation de eIF4G, empêchant ce dernier de s'y fixer, ce qui entraîne l'arrêt de l'étape d'initiation de la traduction (Hay and Sonenberg, 2004). Le complexe mTORC1 est connu pour réguler l'activité des 4E-BPs en les phosphorylant sur

plusieurs sites ; l'un d'entre eux est situé au niveau de la zone de contact avec eIF4E, à proximité d'une région riche en acides aminés acides. La phosphorylation augmente la charge négative et crée une répulsion électrostatique entre les deux protéines, permettant ainsi la libération de eIF4E, sa liaison avec eIF4G et l'initiation de la traduction (Gross et al., 2003)

L'étude de la séquence des 4E-BPs a permis d'identifier 7 sites de phosphorylation, dont 5 sont conservés entre les espèces. Quatre de ces sites sont importants pour la dissociation du complexe 4E-BPs/eIF4E : Thr 37, Thr 46, Ser 65, Thr 70. Deux de ces sites sont directement phosphorylés par mTORC1 (Hay and Sonenberg, 2004).

5.3.5.2- S6 kinase

La kinase de la protéine ribosomale S6 (S6 kinase), qui appartient à la grande famille des AGC-Ser/Thr kinases, a été identifiée par sa capacité à phosphoryler la protéine ribosomale S6 qui est localisée dans la sous-unité 40S, et est un composant-clé de la machinerie traductionnelle. S6 kinase est impliquée dans la régulation de la taille des cellules, la croissance et le métabolisme cellulaires (Panasyuk et al., 2006). Deux isoformes de S6 kinase ont été identifiées, codées par deux gènes distincts : S6K1 et S6K2 qui donnent naissance à deux variants chacune, l'un avec une localisation nucléaire et l'autre avec une localisation cytoplasmique. La différence entre les variants cytoplasmique et nucléaire est la présence, en N-terminal, d'une séquence de 13 à 23 résidus d'acides aminés qui constituent un signal de localisation nucléaire (Panasyuk et al., 2006) (*Figure 12*).

Les deux S6 kinases présentent une homologie élevée au niveau de leur domaine catalytique, et beaucoup de différences au niveau de leurs extrémités N et C terminales, qui ont été identifiées comme des régions permettant les interactions protéine-protéine. Les deux protéines sont phosphorylées et leurs sites de phosphorylations sont conservés (Panasyuk et al., 2006).

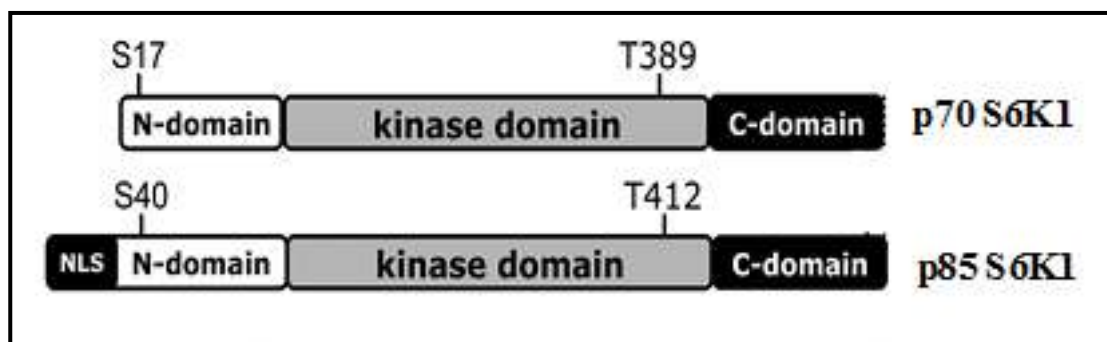


Figure 12 : Structure des deux isoformes de S6 kinase 1

D'après Panasyuk *et al.* 2006

S6 kinase est un effecteur direct de mTOR : elle est directement phosphorylée par le complexe mTORC1 sur plusieurs résidus Ser et Thr, ce qui entraîne son activation. La S6 kinase jouerait un rôle important dans la croissance cellulaire (Radimerski et al., 2002) en augmentant la traduction des ARNm, notamment les ARNm possédant une extrémité 5'-TOP (terminal oligopyrimidine tract), courte séquence polypyrimidine (4-14 nucléotides) adjacente à leur 5'-cap (coiffe méthylée). Ces ARNm codent pour les composants de la machinerie de la traduction, y compris les protéines ribosomales, les facteurs d'élongation, et les poly(A)-binding proteins (PABP) (Hay and Sonenberg, 2004). Il en résulterait une augmentation de la capacité traductionnelle.

La surexpression de mutants de S6 kinase résistants à la rapamycine rend la traduction des ARNm 5'-TOP également résistante à la rapamycine, ce qui suggère une relation étroite entre l'activité S6 kinase et la traduction des ARNm 5'-TOP (Jefferies et al., 1997). La S6 kinase semble donc jouer un rôle important dans le recrutement des ARNm 5'-TOP au niveau des ribosomes, et dans l'activation de la protéine ribosomale S6.

Cependant, le rôle de S6 kinase dans la traduction des ARNm 5'-TOP est controversé. Notamment, l'étude de cellules souches embryonnaires $S6K^{-/-}$ montre que la traduction des ARNm 5'-TOP est toujours activée par les acides aminés et les facteurs de croissance, malgré l'absence complète de phosphorylation de la protéine S6 ribosomale (Stolovich et al., 2002; Tang et al., 2001). Pende et al. ont montré également que dans les cellules déficientes en S6K1 ou 2, le recrutement des ARNm 5'-TOP au niveau des polysomes n'est pas affecté et reste sensible à la rapamycine, ce qui suggère l'implication d'autres voies de signalisation en aval de mTOR, indépendantes de S6 kinase (Pende et al., 2004).

Un effecteur de S6 kinase, autre que S6, qui pourrait expliquer ses effets sur la traduction et la croissance cellulaire est eIF4B, une "RNA-binding protein" qui stimule spécifiquement l'activité ATPase et hélicase du facteur d'initiation eIF4A (Rogers et al., 2002). eIF4B est activé en réponse à divers stimuli qui induisent la prolifération et la croissance cellulaire, comme l'insuline, les esters de phorbol et le sérum (Duncan and Hershey, 1985). Le résidu Ser 422 de eIF4B est le site de phosphorylation spécifique pour les S6 kinases 1 et 2, in vitro et in vivo (Raught et al., 2004). Chez des doubles mutants pour S6 kinases 1 et 2, la phosphorylation de Ser 422 de eIF4B est fortement inhibée (Hay and Sonenberg, 2004).

D'après plusieurs études, eIF4B semble plus impliqué dans la traduction des ARNm contenant une structure secondaire. D'une part, des « foot printing assays » ont montré un recrutement de eIF4B au niveau du ribosome au cours de la traduction des ARNm pourvus d'une

structure secondaire (Dmitriev et al., 2003); d'autre part, l'utilisation d'ARNi anti-eIF4B induit une inhibition de la traduction des ARNm dotés d'une structure complexe au niveau de leur 5'-UTR (Hay and Sonenberg, 2004).

5.3.5- Rôles physiologiques de la voie mTORC1

5.3.5.1- La transcription

La voie de signalisation mTORC1 joue un rôle important dans la transcription des gènes impliqués dans la biogénèse des ribosomes et la machinerie de la traduction, y compris la transcription des gènes des ARNr par l'ARN polymérase 1, la transcription des gènes des protéines ribosomales par l'ARN polymérase 2, ainsi que la transcription des gènes des ARNt et 5S par l'ARN polymérase 3. (Hannan et al., 2003; Mahajan, 1994; Powers and Walter, 1999; Zaragoza et al., 1998).

D'après Mayer ce rôle de mTOR dans la transcription peut en partie être attribué à sa capacité à réguler, par phosphorylation, l'activation des deux facteurs de transcription TIF-1A et UBF spécifiques de l'ARN polymérase I (Mayer et al., 2004). TIF-1A, facteur de transcription essentiel pour l'activité de l'ARN Pol-1, est capable de réverser les effets inhibiteurs de la rapamycine sur la transcription de l'ADNr. Hannan et al. n'ont pas pu démontrer une régulation directe de TIF-1A par mTOR, par contre ils ont montré que le facteur de transcription UBF, qui joue un rôle important dans la stimulation de la transcription de l'ADNr, est régulé par mTOR et que cette régulation est indépendante de l'activité de S6 kinase (Hannan et al., 2003). mTOR régule en effet UBF par une phosphorylation directe, au niveau de son extrémité C-terminale. Cette phosphorylation est nécessaire pour l'activation de UBF (Hay and Sonenberg, 2004). De plus, il a été montré que mTOR se fixe au niveau des promoteurs des gènes transcrits par Pol-1 et Pol-3, notamment ADNr, 5S-ARNr et les gènes ARNt, et que cette association est régulée par les signaux de croissance et inhibée par la rapamycine (Tsang et al., 2010).

5.3.5.2- Le contrôle de la taille et de la prolifération cellulaires

Il est connu que la voie de signalisation de mTOR stimule la synthèse protéique et, en conséquence, la croissance cellulaire, via divers effecteurs. Comme décrit ci-dessus, S6 kinase et 4EBP1 agissent au niveau des facteurs d'initiation et d'élongation.

La stimulation de mTORC1 induit aussi une augmentation de la biogénèse des ribosomes en agissant au niveau de la transcription des ARN et des protéines ribosomales. mTOR régule cette

transcription via TIF-IA, un facteur d'initiation essentiel, dont l'activité dépend de la phosphorylation du résidu sérine 44, sous le contrôle de la phosphatase PP2A. La stimulation de mTOR inactive PP2A, ce qui en retour active TIF-IA (Mayer et al., 2004).

mTORC1 active aussi la traduction des ARNm "5'-topés" qui constituent environ 15-20% des ARNm totaux de la cellule et codent pour les protéines ribosomales, les facteurs d'élongation, etc. Le rôle de S6K et de son substrat S6 dans cette régulation est remis en cause (Pende et al., 2004; Ruvinsky et al., 2005), certains auteurs suggérant qu'elle dépend plutôt de la phosphorylation par mTOR de 4E-BP1 (Holz et al., 2005).

Récemment, "S6K1 aly/REF-like target" (SKAR), une cible de S6K1, a été identifiée comme une protéine d'échafaudage impliquée dans le recrutement de S6K1 aux ARNm nouvellement synthétisés, et dans leur épissage. SKAR contribue ainsi à l'efficacité de la transcription (Ma and Blenis, 2009).

Ces diverses études montrent clairement le rôle régulateur de mTOR à différents niveaux de la machinerie de traduction des protéines. mTOR assure de cette manière la régulation de la taille des cellules. Chez la drosophile, l'inactivation de dTOR produit des larves de taille réduite, dont les cellules sont elles-même de petite taille. De même, chez les mammifères, la rapamycine réduit la taille des cellules, et la restauration de la voie mTOR rétablit une taille normale (Fingar et al., 2004). Cette régulation dépend, au moins en partie, de S6K1, car les souris invalidées pour S6K1 possèdent des myoblastes de taille réduite, qui prolifèrent et différencient normalement, mais produisent des myotubes plus petits in vitro. De même, in vivo, elles présentent des fibres musculaires de taille diminuée (Ohanna et al., 2005).

D'autre part, mTORC1 contrôle aussi le cycle cellulaire: le traitement par la rapamycine bloque la cellule dans la phase G1 du cycle cellulaire; la poursuite de la progression nécessite l'activité des deux effecteurs S6 kinase et 4E-BP1 (Fingar et al., 2004). Cet effet de mTOR sur la progression du cycle cellulaire est en partie dépendant de la traduction des ARNm des régulateurs positifs du cycle cellulaire comme la cycline D1 et c-myc. Il provient aussi de la diminution de la traduction des ANRm des régulateurs négatifs du cycle cellulaire comme p27 (Gera et al., 2004). Plusieurs études ont montré que c'est via son rôle dans la régulation du cycle cellulaire que mTOR est impliqué dans le cancer. Neshat et al. ont montré que le dérivé de la rapamycine CCI-779 inhibe l'hyperprolifération des cellules déficientes en PTEN. CCI-779 ralentit aussi le développement des tumeurs chez les souris PTEN^{+/-}. D'autres études ont montré que Akt confère aux cellules cancéreuses (B-cell lymphoma) une certaine résistance à l'apoptose induite par des cytotoxiques comme la doxorubicine. La rapamycine est capable d'inverser ces effets, ce qui implique mTOR dans

le développement des cancers, et justifie l'intérêt porté à la rapamycine et ses analogues comme agents anti-cancéreux.

5.3.5.3- Le contrôle négatif de l'autophagie

L'autophagie est la séquestration de composants intracellulaires à l'intérieur de phagosomes et leur dégradation par les lysosomes. Ce processus est important pour la dégradation des organites cellulaires et le turnover des protéines. L'autophagie permet à la cellule de s'adapter à la pénurie d'apport nutritionnel, la dégradation des organites et des complexes protéiques permettant de fournir les matériaux nécessaires au maintien des fonctions cellulaires essentielles comme la synthèse protéique et la production d'énergie, en situation de déséquilibre (Codogno and Meijer, 2005).

De nombreuses études ont montré l'implication de la voie mTOR dans la régulation de l'autophagie. D'une part l'inhibition du complexe mTORC1 par la rapamycine augmente l'autophagie, d'autre part la stimulation du complexe mTORC1 diminue ce processus. Le complexe mTORC1 phosphoryle et inhibe des protéines comme ULK1 (unc-51-like kinase 1), ATG13 (autophagy-related gene 13), FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa) qui participent au mécanisme de l'autophagie (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009) (*Figure 14*).

5.3.5.4- La synthèse des lipides

Un rôle important de la voie mTORC1 est son implication dans le métabolisme lipidique, de par la régulation de l'activité de SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1) (Porstmann et al., 2008) et de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) (Kim and Chen, 2004), deux facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du cholestérol (*Figure 13*).

L'inhibition de mTORC1 diminue l'activité de PPAR γ et SREBP1, mais le mécanisme par lequel mTOR contrôle l'activité de ces facteurs de transcription est mal connu (Kim and Chen, 2004). La rapamycine est par ailleurs connue pour empêcher la phosphorylation de la lipine-1 (Huffman et al., 2002), qui est une phosphatase de l'acide phosphatidique impliquée dans la synthèse des glycérophospholipides et dans l'activation de facteurs de transcription ou co-activateurs transcriptionnels impliqués dans le métabolisme lipidique, comme PPAR γ , PPAR α , PGC1- α (Laplante and Sabatini, 2009) (*Figure 13*).

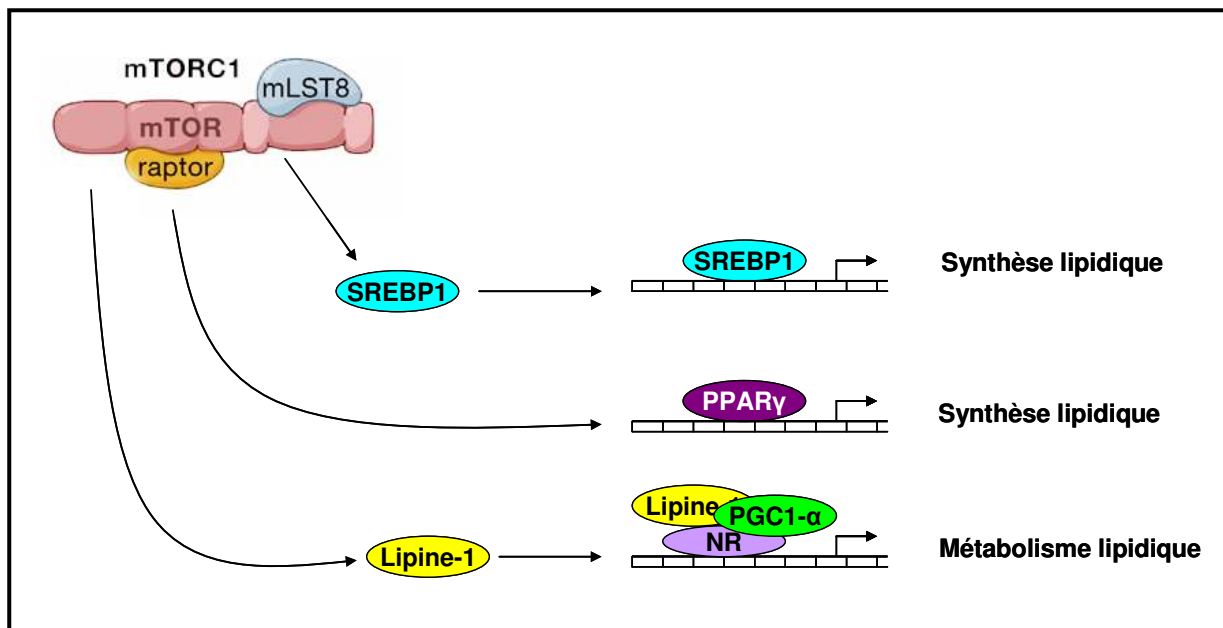


Figure 13 : Rôle du complexe mTORC1 dans la synthèse et le métabolisme lipidique

D'après Laplante et al. 2009

5.3.5.5- Le métabolisme et la biogénèse mitochondriaux

Une autre fonction attribuée à mTORC1 est la régulation du métabolisme et de la biogénèse des mitochondries. D'une part Schieke et al. ont remarqué les effets négatifs de la rapamycine sur le potentiel de membrane mitochondrial, la consommation d'oxygène, ainsi que sur le taux d'ATP cellulaire (Laplante and Sabatini, 2009). D'autre part Chen et al. et Cunningham et al. ont montré que la rapamycine peut altérer le nombre de copies d'ADN mitochondrial, ainsi que l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif (Chen et al., 2008; Cunningham et al., 2007)

La génération de souris transgéniques conditionnellement inactivées pour Raptor a permis de démontrer l'importance de la voie mTORC1 dans la biogénèse des mitochondries (Laplante and Sabatini, 2009). L'ablation de mTOR (Risson et al., 2009), ou Raptor (Bentzinger et al., 2008), mais pas de Rictor, spécifiquement dans le muscle, induit une myopathie sévère, incluant un métabolisme oxydatif et une régulation mitochondriale perturbés. Notamment, mTORC1 contrôle l'activité de PGC1- α , cofacteur nucléaire jouant un rôle clé dans la biogénèse des mitochondries et le métabolisme oxydatif (Cunningham et al., 2007) (*Figure 14*).

Par ailleurs, mTOR par lui-même, indépendamment de mTORC1 et mTORC2, contrôle la formation du complexe dystrophine/glycoprotéines, nécessaire au fonctionnement musculaire (Risson et al., 2009).

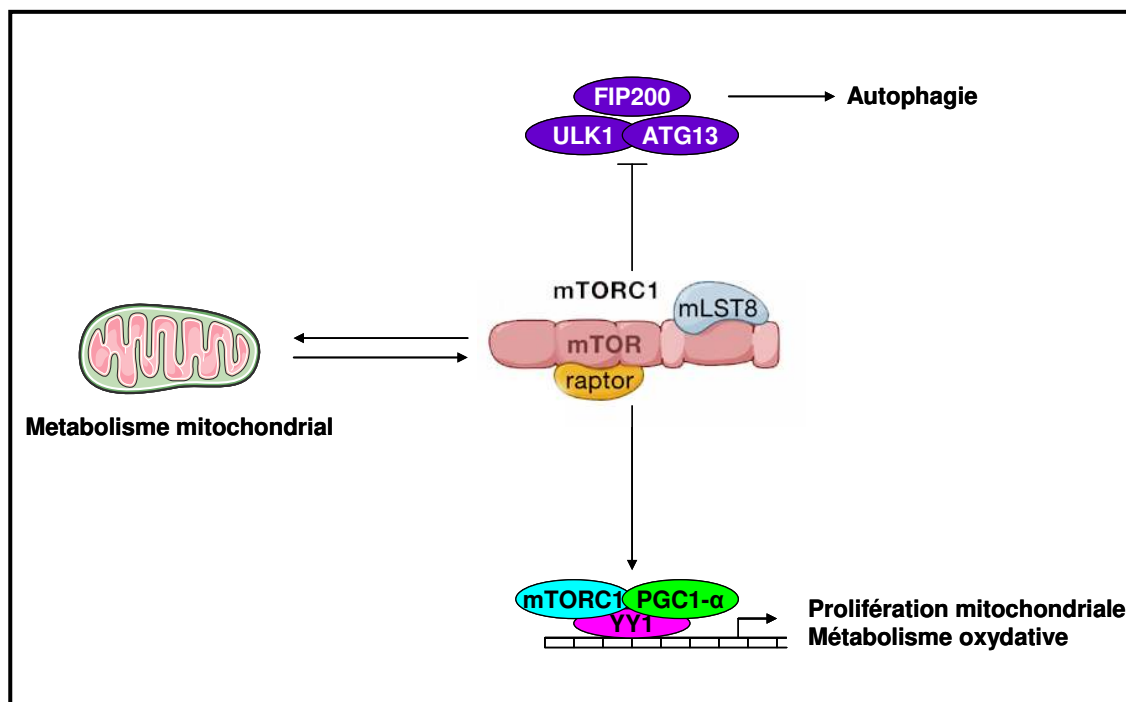


Figure 14 : Rôle du complexe mTORC1 dans la prolifération mitochondriale, le métabolisme oxydatif et l'autophagie D'après Laplante et al. 2009

5.3.6- Rôles de la voie mTORC2

Plusieurs signaux, y compris les facteurs de croissance et le sérum, ont été identifiés comme activateurs du complexe mTORC2, mais les voies par lesquelles ils agissent sont encore mal connues (Laplante and Sabatini, 2009). Huang et Manning ont récemment proposé l'intervention du complexe TSC1/TSC2, indépendamment de l'activité GAP de TSC2 et de Rheb. En effet, l'activité mTORC2 est sévèrement compromise dans les fibroblastes de souris déficientes en TSC1 ou TSC2. Réciproquement, l'activité mTORC2 kinase est stimulée par la surexpression de TSC2 dans les cellules sauvages. Ils ont de plus mis en évidence une interaction physique entre le complexe TSC et mTORC2, et une corrélation entre la capacité de TSC1/TSC2 à se fixer sur mTORC2, et l'effet de stimulation de mTORC2 par les facteurs de croissance (Huang and Manning, 2009).

Il a par ailleurs été démontré que mTORC1, via son effecteur S6 kinase, induit la phosphorylation du résidu T1135 de Rictor, composant du complexe mTORC2. Cette phosphorylation n'affecte ni l'activité in vitro, ni la localisation cellulaire, ni l'assemblage de mTORC2, mais une mutation de ce site de phosphorylation augmente l'activité du complexe mTORC2, ce qui met en évidence une régulation négative de mTORC2 par mTORC1 (Julien et al., 2009).

5.3.6.1- La survie cellulaire, le métabolisme et la prolifération

Ces trois fonctions sont hautement dépendantes de l'activité d'Akt, qui est un des effecteurs principaux du complexe mTORC2 (Manning and Cantley, 2007). mTORC2 est considéré comme la kinase "PDK2", responsable de la phosphorylation de Ser473, qui assure, en synergie avec la phosphorylation de Thr308 par PDK1, la pleine activation d'Akt. L'utilisation de "souris KO" pour les différents composants du complexe mTORC2 a permis de montrer que la désorganisation de ce complexe bloque la phosphorylation d'Akt au niveau de Ser 473 et inhibe l'activation de certains de ses substrats (Guertin et al., 2006). Ainsi, l'inactivation de mTORC2, et par conséquent d'Akt, supprime la phosphorylation et la séquestration cytosolique des facteurs de transcription "forkhead box protein O1" (FOXO1), et 3 (FOXO3). Ces facteurs sont alors transloqués au noyau où ils activent l'expression de gènes impliqués dans la résistance au stress, dans le métabolisme, dans l'arrêt du cycle cellulaire, et dans l'apoptose (Calnan and Brunet, 2008).

Outre Akt, d'autres effecteurs de mTORC2 ont été décrits. La "serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1" (SGK1), a des homologies avec Akt, mais à la différence d'Akt qui garde une activité partielle quand mTORC2 est complètement inhibé, l'activité de SGK1 est complètement dépendante de mTORC2 (Laplane and Sabatini, 2009). Parmi les effecteurs de mTORC2 on trouve également PKC α , qui est impliquée dans plusieurs processus biologiques comme l'apoptose, la croissance cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, la régulation de la forme cellulaire et la réorganisation du cytosquelette d'actine (Sarbasov et al., 2004).

L'impact physiologique de la régulation par mTORC2 de ces autres effecteurs est encore peu connu. Chez la levure *S. cerevisiae* il a été démontré que la protéine TORC2 est impliquée dans la synthèse des sphingolipides en activant Ypk2, une AGC kinase qui est l'équivalent de SGK1 chez les mammifères (Aronova et al., 2008).

5.3.6.2- L'organisation du cytosquelette d'actine

Plusieurs équipes ont montré que la downrégulation de mTORC2 a un impact sur la polymérisation de l'actine, et perturbe la morphologie cellulaire. Ces études ont suggéré que mTORC2 joue son rôle via l'activation de la protéine kinase C α (PKC α), des petites protéines G Rho et Rac1, de la paxilline (Laplane and Sabatini, 2009). Cependant, les effets de mTORC2 sur les filaments d'actine ont été décrits soit comme négatifs, soit comme positifs.

Notamment, Sarbassov et al. ont montré que des cellules HeLa invalidées pour rictor ont une forme plus aplatie et plus carrée. Des filaments épais d'actine sont présents dans le cytosol et l'actine corticale est diminuée par rapport aux témoins. La réorganisation du cytosquelette d'actine semble impliquer la down- régulation de PKC α (Sarbassov et al., 2004).

D'autre part, Jacinto et al. ont décrit la formation rapamycine-insensible de fibres de stress dans des fibroblastes 3T3 en réponse à l'addition de serum, de LPA, ou d'acides aminés. L'inactivation de mTORC2, mais pas de mTORC1, empêche la formation des fibres de stress. Celle-ci est rétablie par la surexpression d'une forme constitutivement active de RhoA, suggérant que mTORC2 contrôle la polymérisation de l'actine en régulant l'activité Rho-GTPase (Jacinto et al., 2004).

5.3.7- mTOR et différenciation myogénique

L'implication de la voie mTOR dans la différenciation myogénique est évidente, puisque la rapamycine l'inhibe complètement. Mais le mécanisme par lequel mTOR induit la différenciation est mal connu et controversé.

Selon l'équipe de J.Chen, dans le modèle C2C12 l'activité du promoteur P3 du gène qui code pour IGF2 est légèrement augmentée dans les myotubes, comparativement aux myoblastes. La rapamycine inhibe l'expression d'IGF2. Les acides aminés augmentent l'activité du promoteur P3, et cette augmentation est inhibée par la rapamycine. mTOR jouerait donc un rôle important dans la différenciation myogénique via l'activation du promoteur P3 et l'expression d'IGF2, qui agirait d'une façon autocrine pour activer la voie PI3K/Akt et induire ainsi la différenciation myogénique (Erbay et al., 2003). Une autre étude de la même équipe s'appuie sur l'expression d'une forme mutante de mTOR résistante à la rapamycine, qui permet de restaurer l'expression d'IGF2 et la différenciation en présence de rapamycine. Par contre, un mutant de S6K1 résistante à la rapamycine ne rétablit pas la différenciation myogénique, ce qui montre que S6K1 n'est pas impliquée. De plus, il semble que l'activité kinase de mTOR ne soit pas nécessaire à l'initiation de la différenciation (fusion des myoblastes), mais seulement à la maturation des myotubes. Les auteurs ont suggéré que mTOR contrôle de manière kinase-indépendante l'initiation de la différenciation, via l'expression d'IGF2, l'activité kinase de mTOR n'étant mise en jeu, via la sécrétion d'un facteur non identifié, que lors de la maturation des myotubes (Erbay and Chen, 2001).

Selon Yoon et Chen la réponse myogénique des C2C12 met en jeu la phospholipase D qui pourrait activer la voie mTOR, et ainsi la sécrétion d'IGF2, induisant la différenciation d'une façon autocrine via la voie PI3K/Akt (Yoon and Chen, 2008)

Un autre modèle impliquant mTOR dans la différenciation cellulaire a été proposé par Sarker et al.. Selon ce modèle, deux voies de signalisation parallèles induisent la différenciation : d'une part, p38 MAPK et l'activation en aval de MEK3/6 et MEF2, et d'autre part la voie mTOR, qui active S6 kinase et en aval p35/cdk5 (Sarker and Lee, 2004).

La myostatine est un facteur régulant négativement la croissance musculaire. Elle inhibe la différenciation myogénique en induisant la phosphorylation de Smad 2, qui inhibe alors la voie Akt. Dans des myoblastes primaires humains, l'inhibition de mTORC1 amplifie cette réponse et bloquerait ainsi la différenciation myogénique. Un rôle de mTORC1 serait donc de supprimer l'effet anti-myogénique de Smad 2 sur Akt (Trendelenburg et al., 2009).

Une autre étude implique la voie de signalisation de mTOR dans la différenciation des C2C12 induite par la créatine. La créatine agirait via Akt et l'activation, en aval, de mTORC1 et de ses effecteurs p70-S6 kinase et 4E-BP1, ainsi que par l'activation de la voie p38/ERK1/2 (Deldicque et al., 2007)

Pratiquement toutes les études du rôle de mTOR dans la myogénèse ont porté sur la voie mTORC1, et ont négligé les effecteurs du complexe mTORC2. Shu et al. ont cependant proposé l'implication du complexe mTORC2 dans la réponse myogénique des C2C12, l'inhibition du complexe mTORC1 par downrégulation de raptor n'ayant aucun effet sur la différenciation. Selon ces auteurs, mTORC2 induirait la différenciation myogénique via l'inhibition de la kinase Rho-dépendante ROCK1 (Shu and Houghton, 2009).

A l'opposé de ce qui a été décrit par l'équipe de Chen, Shu et al. ont montré que l'activité kinase de mTOR est nécessaire pour la différenciation myogénique. La surexpression de mutants kinase-déficients de mTOR inhibe en effet la différenciation myogénique. Cette activité kinase ne met pas en jeu l'effecteur S6 kinase, puisque la surexpression d'une forme constitutivement active de S6 kinase n'inverse pas les effets négatifs de la rapamycine sur la différenciation des C2C12 (Shu et al., 2002).

CHAPITRE 3

LA PHOSPHOLIPASE D

Un nouveau facteur régulateur de mTOR a été identifié il y a quelques années, l'acide phosphatidique (PA), second messenger phospholipidique produit par la phospholipase D (PLD), enzyme sensible à de nombreux stimuli extracellulaires.

1- Généralités

La phospholipase D fait partie d'une superfamille de phosphohydrolases qui comprend la cardiolipine synthase, la phosphatidylsérine synthase, les deux protéines d'enveloppe des proxivirus p37K et K4, la toxine murine de *Yersinia pestis*, et plusieurs endonucléases. Toutes ces enzymes sont caractérisées par la présence du motif HxK(x)₄D(x)₆GSxN (motif HKD).

La phospholipase D est largement distribuée dans les règnes animal et végétal ainsi que chez les bactéries, les levures et les champignons. Elle catalyse l'hydrolyse de la liaison phosphodiester distale des glycérophospholipides, pour libérer l'acide phosphatidique d'une part, et un alcool polaire d'autre part.

La PLD possède deux domaines catalytiques portant le motif HKD. La première histidine attaque le groupe phosphate des phospholipides, ce qui permet leur fixation sur le site catalytique de l'enzyme et la formation d'une structure intermédiaire qu'on appelle « phosphatidyl-enzyme ». La deuxième histidine agit comme un donneur de proton, ce qui permet la libération de la tête polaire du phospholipide. En présence d'un accepteur nucléophile (l'eau dans les conditions physiologiques, ou les alcools primaires) la deuxième histidine récupère son proton et génère un nucléophile (groupement hydroxyl) qui attaque la forme intermédiaire PLD-PA pour libérer l'acide phosphatidique (Stuckey and Dixon, 1999).

2- La transphosphatidylation

La PLD agit en deux étapes, la première aboutit à la formation d'un intermédiaire phosphatidyl-enzyme, la deuxième étant l'hydrolyse ou la transphosphatidylation (Stanacev and Stuhne-Sekalec, 1970). En présence d'alcools primaires à chaînes courtes qui sont de meilleurs accepteurs nucléophiles que l'eau, la PLD les utilise préférentiellement et produit les phosphatidylalcools, des lipides plus stables que le PA, ce qui permet, d'une part, de doser l'activité de la PLD, et d'autre part de bloquer la production d'acide phosphatidique. Il faut noter que seuls les alcools primaires à chaînes courtes comme le butanol-1 et l'éthanol peuvent être des substrats de la PLD. Les alcools secondaires ne sont pas utilisables par les PLD animales (*Figure 15*).

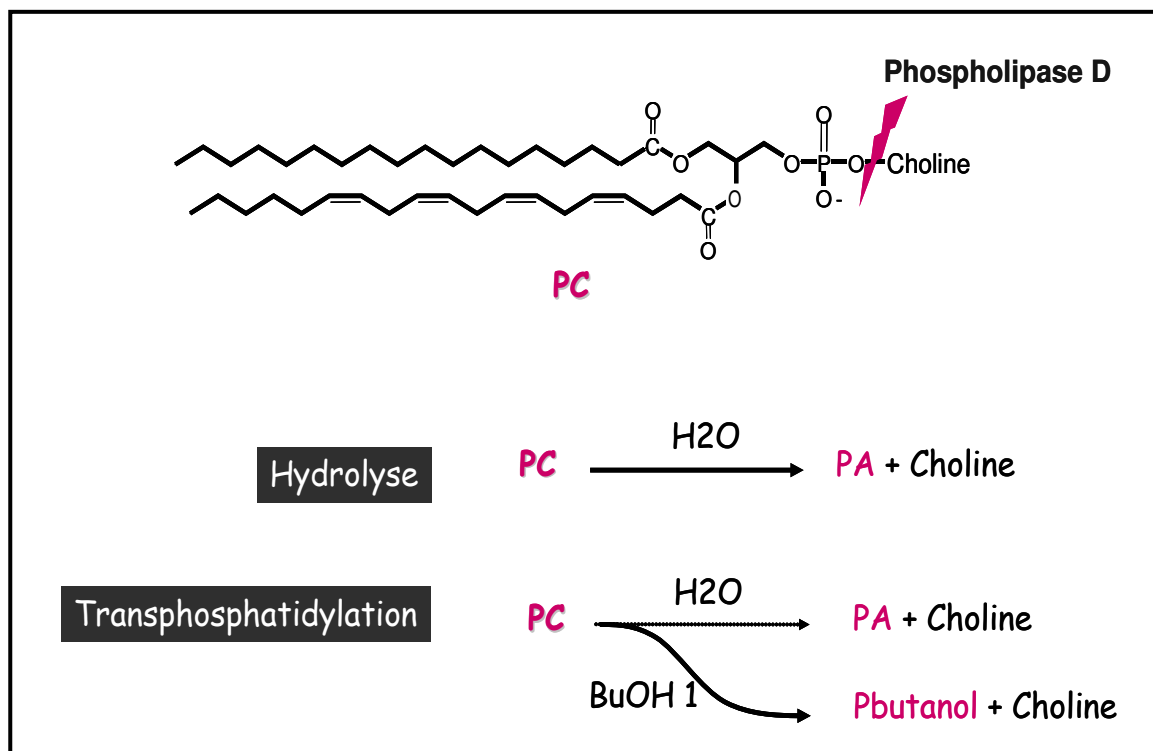


Figure 15 : Action enzymatique de la PLD

3- Les deux isoformes de la PLD

Il existe deux isoformes de PLD chez les mammifères, PLD1 (120kDa) (Hammond et al., 1995) et PLD2 (102kDa) (Colley et al., 1997), codées par deux gènes distincts. Deux variants de PLD1 (**a** et **b**) ont été décrits, le variant **b** résultant de la délétion de 38 acides aminés entre les séquences conservées I et II (Hammond et al., 1997). PLD2 possède 50% d'homologie avec PLD1 (Colley et al., 1997). Ces deux isoformes ont pour substrat préférentiel la phosphatidylcholine (*Figure 16*).

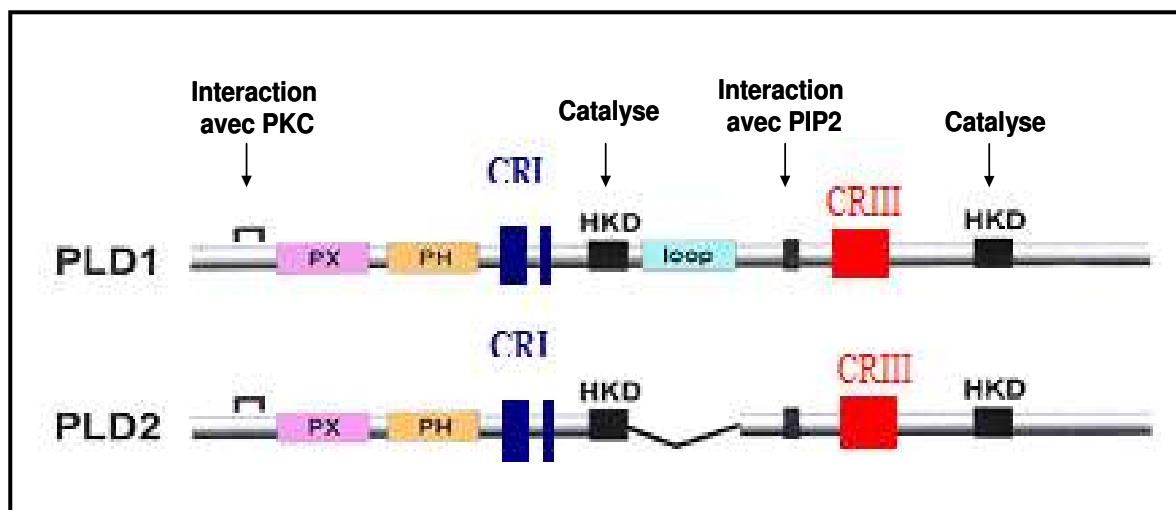


Figure 16 : la Structure des deux isoformes de la phospholipase D

4- Localisation subcellulaire

Une localisation périnucléaire de la PLD a été décrite par Colley et al. en 1997 dans les fibroblastes embryonnaires de rat (Colley et al., 1997). Cette localisation concerne un compartiment vésiculaire qui semble associé avec l'appareil de Golgi, le reticulum endoplasmique et les endosomes tardifs (Colley et al., 1997). Cependant, dans les cellules RBL-2H3, des protéines de fusion recombinantes GFP-PLD1b et HA-PLD1b ont été trouvées associées principalement avec les granules de sécrétion et les endosomes tardifs, alors qu'aucune association avec l'appareil de Golgi ou le RE n'a été remarquée. Les mêmes auteurs ont montré également que l'activation des récepteurs des IgE induit une translocation de la PLD vers la membrane plasmique (Brown et al., 1998). Des résultats similaires ont été obtenus par Toda et al. en 1999, avec les cellules NRK (Toda et al., 1999). Hughes et Parker (2001) ont montré que PLD1a et PLD1b ont une localisation au niveau des endosomes et ne colocalisent pas avec les marqueurs de l'appareil de Golgi, ni avec les cavéoles et les vésicules à clathrine (Hughes and Parker, 2001). Ces études permettent de dire que PLD1 a une localisation principalement vésiculaire, au niveau des vésicules de sécrétion, des endosomes tardifs, et également au niveau de sous-compartiments de l'appareil de Golgi et du reticulum endoplasmique.

PLD2 a été décrite au niveau de la membrane plasmique, notamment dans les cavéoles et les microdomaines (Colley et al., 1997), et au niveau du cytosol, où elle est colocalisée avec la β -actine (Lee et al., 2001). Aucune colocalisation de PLD2 n'a été observée avec les marqueurs de l'appareil de Golgi et du reticulum endoplasmique (Honda et al., 1999).

5- La structure de la PLD

Quatre domaines conservés (I-IV) ont été décrits comme responsables de l'activité catalytique de la PLD. Les domaines II et IV sont particulièrement conservés et contiennent le motif HKD (McDermott et al., 2004).

➤ *Les domaines HKD*

Diverses expériences de mutagenèse dirigée ont permis de montrer l'importance des domaines HKD dans l'activité catalytique de la PLD. Par exemple, le remplacement du résidu lysine dans le second motif HKD par un résidu arginine supprime l'activité catalytique de l'enzyme *in vitro* (McDermott et al., 2004). L'histidine du domaine HKD fonctionne comme un nucléophile dans l'activité catalytique de l'enzyme (Gottlin et al., 1998). De nombreuses études ont mis aussi en évidence l'importance de la lysine et de l'aspartate dans le rôle catalytique du domaine HKD (Iwasaki et al., 1999). Ils permettent en effet la liaison du substrat et la neutralisation de sa charge négative (Stuckey and Dixon, 1999). D'autre part, le motif IGSANIN adjacent à la partie C-terminale de la région HDK, qui est hautement conservé entre les espèces, joue un rôle important. Manifava et al. ont montré que la substitution du résidu sérine de ce motif provoque une perte de l'activité de l'enzyme et empêche sa palmitoylation et sa translocation (Manifava et al., 1999).

Deux modèles de fonctionnement du domaine HKD ont été suggérés. Le premier suppose que les deux motifs du domaine HKD fonctionnent indépendamment, alors que le deuxième considère chaque motif comme étant la moitié du site actif de l'enzyme. Ce dernier modèle semble plus proche de la réalité, puisque des mutations dans un des deux motifs suppriment complètement l'activité enzymatique (Ponting and Kerr, 1996; Sung et al., 1997). Il est aussi soutenu par les études de Stuckey et Dixon (1999) montrant que les endonucléases de *Salmonella typhimurium*, qui possèdent un seul motif HKD, se dimérisent grâce à des ponts hydrogènes pour former un seul site actif (Stuckey and Dixon, 1999) (*Figure 17*).

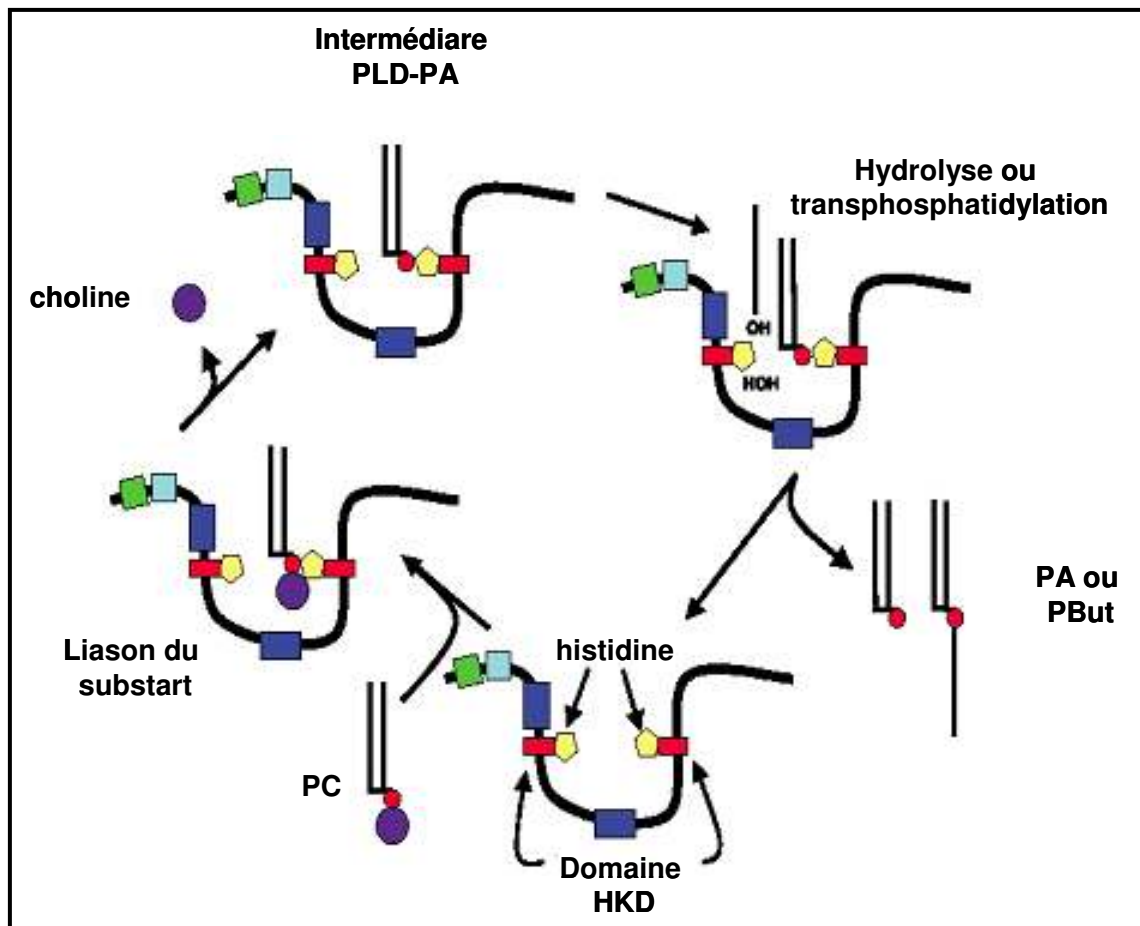


Figure 17 : Modèle théorique de catalyse par la PLD

D'après Mcdermott et al. 2004

➤ **Domaine III**

Une autre région conservée (domaine III) contient le motif IYIENQFFF qui est également nécessaire à l'activité catalytique de l'enzyme, la mutation de la tyrosine de ce motif en sérine diminue l'activité de 15%, alors que la mutation de cette tyrosine en cystéine ou en isoleucine diminue l'activité de 40 et de 45 % respectivement. Ce motif serait peut-être responsable de l'interaction avec le groupement choline de la phosphatidylcholine, et expliquerait l'affinité préférentielle des PLD de mammifères pour ce substrat. Le domaine III contient également la séquence $\Phi\chi\Phi\text{xxxx}\Phi$ (où Φ est un acide aminé aromatique), qui permet la fixation des cavéolines et favoriserait la liaison des PLD à la membrane plasmique et aux cavéoles (Frohman et al., 1999).

➤ **Plextrin homology domain (PH)**

Un domaine PH identifié chez certaines PLD, notamment les PLD de mammifères, au niveau de la région C-terminale chevauche le second domaine HKD (Qin et al., 1997). Cette région est importante pour l'activité catalytique de l'enzyme, une délétion ou une mutation de cette région

bloquant complètement l'activité catalytique *in vivo*. Bien que ce domaine PH ne soit pas responsable de l'activation de la PLD par le PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂), sa mutation provoque une translocation incorrecte de l'enzyme dans la cellule (Hodgkin et al., 2000; Sciorra et al., 2002).

➤ ***Phox homology domain (PX)***

Un domaine « Phox homology » ou PX, a été identifié au niveau de la région N terminale de la PLD (Liscovitch et al., 2000). Ce domaine semble être impliqué dans l'association de la PLD aux phosphoinositides, comme PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ (Xu et al., 2001). Certaines études ont suggéré que le domaine PX pourrait jouer un rôle dans l'association à certains facteurs qui permettent la translocation ou l'interaction de la PLD avec la membrane cellulaire, ou qu'il permet l'interaction de la PLD avec des kinases (Rudge et al., 1998). PtdIns(3)P et PtdIns(3,4)P₂ se lient à la PLD indépendamment du domaine PH, ce qui suggère un rôle important du domaine PX dans la liaison de l'enzyme à ces lipides (Honda et al., 1999).

➤ ***La région « boucle » de la PLD***

La PLD1 des mammifères possède une région de 116 acides aminés entre les domaines I et II. Cette région n'existe pas dans la séquence de PLD2, ni chez les organismes inférieurs, sauf les nématodes et les drosophiles (McDermott et al., 2004). L'addition de cette région dans la séquence de PLD2 diminue son activité (Hammond et al., 1997; Sung et al., 1999a). Par contre, la délétion de cette région de la séquence de PLD1 augmente son activité, ce qui suggère que c'est un élément de régulation négative de l'enzyme, responsable de son activité basale basse (Sung et al., 1999b).

➤ ***Le motif polybasique***

Le motif polybasique est un domaine formé d'acides aminés chargés positivement, séparés par des acides aminés aromatique et aliphatiques. Cette séquence est identique aux séquences trouvés dans les protéines du cytosquelette qui interagissent avec les phosphoinositides. Ce domaine est responsable de l'activation de la PLD par le PtdIns(4,5)P₂ (Sciorra et al., 2002).

➤ ***Les séquences carboxy et amino terminales.***

L'extrémité N-terminale de l'enzyme est très peu conservée. Elle tolère des modifications comme la fusion avec la GFP sans que l'activité, la localisation, ou même certaines régulations de l'enzyme en soient affectées (McDermott et al., 2004). La délétion de 325 acide aminés N-terminaux de PLD1 donne une enzyme qui a la même activité que la forme sauvage mais est peu sensible à l'activation par ARF ou Rac1 (Sung et al., 1999b). Chez PLD2, également, la suppression de la région N-terminale de PLD2 n'a pas d'effet sur l'activité catalytique mais diminue l'activation par ARF (Sung et al., 1999a). Il a été démontré que cette région joue un rôle important dans la stimulation de l'enzyme par les protéines kinases C (Zhang et al., 1999).

Contrairement à l'extrémité N-terminale, l'extrémité C-terminale est hautement conservée et ne tolère pas de modifications. La suppression de 99 acides aminés de la région C-terminale de PLD1 supprime son activité catalytique (Sung et al., 1999b). Même de petits changements dans la séquence C-terminale de l'enzyme peuvent affecter l'activité : par exemple, le remplacement de la thréonine terminale (T1074) par l'alanine diminue l'activité catalytique de l'enzyme (Liu et al., 2001). La suppression de 113 acides aminés de la région C-terminale des deux variants PLD1a et PLD1b diminue leur activité catalytique et change leur localisation (Hughes and Parker, 2001). Outre son rôle dans la localisation et l'activité de l'enzyme, l'extrémité C-terminale joue un rôle dans l'interaction de l'enzyme avec les petites protéines G de la famille Rho, et dans la stabilisation de la conformation fonctionnelle du site actif de l'enzyme (Liu et al., 2001).

6- La régulation de la PLD

6.1- Régulation par les protéines kinase C

Plusieurs études mettent en avant l'implication des protéines kinases C dans la régulation de l'activité PLD. Ceci a été démontré par des approches diverses : surexpression des PKC, downrégulation par les ARNi ou par traitement prolongé avec les esters de phorbol (Exton, 2002b). Seules PKC α et PKC β sont capable d'activer la PLD1 recombinante in vitro (Hammond et al., 1997; Min et al., 1998). La synergie entre PKC α et certains activateurs de PLD1, notamment les petites protéines G Rho et ADP-ribosylation factor (ARF) a été mise en évidence (Hammond et al., 1997).

La stimulation des PKC par les esters de phorbol ainsi que d'autres agonistes in vivo induit une forte activation des deux isoformes PLD1 et PLD2 (Hammond et al., 1997; Park et al., 1998; Sung et al., 1999b). Cette stimulation induit une phosphorylation des deux isoformes (Kim et al., 2000), mais cette phosphorylation ne semble pas être responsable de l'activation. En effet, la surexpression d'une forme mutante de PKC α dépourvue d'activité kinase supprime la phosphorylation des PLD mais pas leur activation, ce qui suggère que celle-ci dépend d'interactions protéine-protéine (Exton, 2002b). Des études ultérieures de mutagenèse dirigée et d'interactions protéine-protéine ont confirmé ce point en montrant la présence de sites d'interaction avec la PKC au niveau des extrémités C et N terminales de PLD1 (Min and Exton, 1998; Park et al., 1998; Sung et al., 1999b).

6.2- Régulation par les petites protéines G Rho

Plusieurs études ont montré une activation de PLD1, et non de PLD2, par les petites protéines G de la famille de Rho (RhoA, Rac1, Cdc42) (Bae et al., 1998; Colley et al., 1997; Hammond et al., 1997; Sung et al., 1999a). RhoA semble le plus impliqué, mais Rac1 et Cdc42Hs induisent aussi une activation significative de PLD1 (Bae et al., 1998). Le site d'interaction entre RhoA et PLD1 a été localisé dans la région C-terminale (Yamazaki et al., 1999).

In vivo, le rôle de RhoA dans l'activation de la PLD a été mis en évidence en présence d'agonistes qui se fixent sur des récepteurs couplés aux protéines hétéromériques G₁₃ (Plonk et al., 1998; Xie et al., 2002). D'une part l'utilisation de mutants de PLD délétés dans la région C-terminale a permis de démontrer une interaction directe entre RhoA et PLD1 (Xie et al., 2002). D'autre part, RhoA est capable de réguler l'activité de la PLD indirectement, via l'activation de la phosphatidylinositol-4P 5-kinase, l'enzyme responsable la synthèse de PIP₂, un des co-facteurs activateurs de la PLD (Chong et al., 1994; Oude Weernink et al., 2000). In vivo, l'activation de la PLD par RhoA a été confirmée en utilisant l'exoenzyme C3 de *Clostridium botulinum*, et la toxine B de *Clostridium difficile*, deux agents qui modifient covalentement et inactivent RhoA (Schmidt et al., 1996), ainsi que par des études de transfection de dominants négatifs ou de formes constitutivement actives de RhoA et de Rac1 (Exton, 2002a).

6.3- Régulation par les petites protéines G de la famille ARF

Toutes les isoformes d'ARF (ADP-ribosylation Factor) activent la PLD, notamment l'isoforme PLD1 (Exton, 2002b), l'isoforme 2 étant peu ou pas activée (Colley et al., 1997; Sung et al., 1999b).

Le site d'interaction de la PLD avec ARF a été localisé au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine (Jones et al., 1999; Zhang et al., 1995a). L'implication d'ARF dans la régulation de PLD1 a été bien étayée in vitro, mais relativement peu in vivo (Exton, 2002b).

Deux isoformes d'ARF notamment ont été décrites comme régulateurs importants de PLD1, ARF1 et ARF6, qui sous forme activée sont transloqués à la membrane où ils activent PLD (Caumont et al., 1998). ARF6 et ARF1 sont également connus pour activer la phosphatidylinositol-4P 5-kinase et la synthèse de PIP₂ susceptible de participer à l'activation de la PLD (Honda et al., 1999).

7- Rôle de la phospholipase D et de l'acide phosphatidique

De nombreux agonistes tels que les cytokines, les antigènes, les molécules d'adhésion cellulaire, les facteurs de croissance, sont capables d'activer la PLD (Rizzo and Romero, 2002). La mise en évidence de l'activation de la PLD après stimulation de récepteurs couplés aux protéines G ou aux tyrosines kinases a permis de l'impliquer dans la transduction de signaux intracellulaires et dans diverses fonctions cellulaires.

L'activation de la PLD conduit à la génération de l'acide phosphatidique, qui est un second messenger capable d'une part d'activer directement diverses cibles protéiques, et d'autre part, d'être métabolisé en d'autres messagers bio-actifs. Il est ainsi métabolisé en DAG (diacylglycérol) sous l'action de la phosphatidate-phosphohydrolase, enzyme très active *in vivo* (Jenkins and Frohman, 2005). L'acide phosphatidique peut aussi être transformé en un autre messenger lipidique, l'acide lysophosphatidique (LPA), par désacylation sous l'action d'une phospholipase A2 spécifique (Jenkins and Frohman, 2005). L'acide phosphatidique, directement ou indirectement, est donc impliqué dans de multiples fonctions biologiques.

7.1- la PLD et le trafic vésiculaire, la sécrétion et l'endocytose

Les travaux de Brown et al. (1993) et de Cockcroft et al. (1994) montrant que la PLD est activée par ARF laissaient supposer que la PLD pourrait, comme cette protéine G, être impliquée dans le trafic vésiculaire et la sécrétion. Effectivement, l'addition d'un alcool primaire empêche le transport de protéines du RE vers le Golgi, et l'ajout de liposomes contenant du PA rétablit partiellement ce transport (Jones et al., 1999).

Le rôle de l'acide phosphatidique dans la sécrétion pourrait être le recrutement de protéines nécessaires à la formation des vésicules sécrétoires à partir du trans-Golgi (Chen et al., 1997). Les deux isoformes de PLD régulent le transport de protéines entre le réseau trans-golgien et la membrane plasmique apicale dans les cellules épithéliales, et chacune des isoformes agit à une étape différente de ce trafic vésiculaire (Denmat-Ouisse et al., 2001).

La surexpression de PLD1, mais pas celle de PLD2, augmente l'exocytose dans les cellules neuroendocrines, alors que l'inactivation de PLD1 inhibe ce phénomène (Vitale et al., 2001; Vitale et al., 2002). La PLD a été impliquée dans la régulation de l'exocytose dans d'autres types cellulaires notamment les adipocytes, les cellules bêta du pancréas, et les mastocytes (Jenkins and Frohman, 2005). La PLD joue un rôle dans l'exocytose de manière ARF dépendante (Jones et al., 1999). Le PA

pourrait agir en activant la PI-4P 5-kinase et générant du PIP₂, qui permettrait le recrutement du facteur CAP impliqué dans l'exocytose de vésicules à cœur dense (Olsen et al., 2003).

La PLD serait aussi impliquée dans l'internalisation des récepteurs par endocytose. Par exemple, dans les cellules HEK293, le butanol-1 et les ARNi spécifiques de PLD2 bloquent l'endocytose du récepteur métabotrope au glutamate (Bhattacharya et al., 2004). De même la surexpression de PLD2 catalytiquement inactive, ou les ARNi dirigés contre PLD2, bloquent l'internalisation du récepteur de l'angiotensine II de type 1 (Du et al., 2004).

Par ailleurs l'addition de PA à des vésicules de membrane plasmique isolées de neutrophiles humains augmente le taux de fusion vésiculaire (Harsh and Blackwood, 2001). Le PA est en effet considéré comme un lipide fusogène, de par sa structure comportant une petite tête polaire chargée négativement à proximité de deux chaînes longues d'acides gras, ce qui lui confère une forme en cône. Le PA généré au niveau du feuillet interne de la membrane diminuerait la quantité d'énergie nécessaire pour la fusion des vésicules en introduisant une courbure négative de la membrane (Cazzolli et al., 2006). En confirmation de cette hypothèse, la lysophosphatidylcholine, qui induit une courbure positive de la membrane, lorsqu'elle est ajoutée sur le feuillet externe, rétablit l'exocytose préalablement bloquée par la suppression de l'activité PLD (Cazzolli et al., 2006).

7.2- la PLD et le remaniement du cytosquelette

Les PLD de mammifères jouent un rôle dans le remaniement du cytosquelette induit par différents agonistes. Plusieurs équipes ont pu établir un lien entre l'acide phosphatidique et la polymérisation de l'actine, dans différents types cellulaires, dont les fibroblastes IIC9 (Ha and Exton, 1993), les cellules endothéliales de l'aorte de porc (PAEC) (Cross et al., 1996), les neutrophiles (Siddiqui and English, 1997) et les monocytes (Zhou et al., 1995). Ha et Exton ont montré que le changement morphologique des fibroblastes IIC9, d'une forme semi-circulaire à une forme allongée, peut être induit par l' α -thrombine et s'accompagne de la formation de fibres de stress. L'ajout de PA exogène, ou d'une PLD bactérienne, produit les mêmes effets que l' α -thrombine, alors que d'autres phospholipides, ou le PMA, le DAG, et une PLC bactérienne ne permettent pas de reproduire ces effets (Ha et al., 1994).

Le PA produit par la PLD peut être métabolisé en LPA sous l'action d'une phospholipase A₂ spécifique (Thomson and Clark, 1995). Ce dernier phospholipide est un agoniste qui intervient dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Moolenaar, 1995). Ha et al. (1994) ont montré que le LPA entraîne une augmentation de la polymérisation de l'actine et une hausse très rapide des taux de PA endogène, dues à l'activation de la PLD. Le LPA stimulerait la PLD via une protéine G sensible à

la toxine pertussique (Ha et al., 1994). La stimulation des récepteurs au LPA active la PLD ainsi que la formation de fibres de tension dans les cellules PAEC (Cross et al., 1996). Le même effet est observé quand on ajoute du PA exogène aux cellules. En présence de butanol-1, la production de PA stimulée par le LPA est détournée au profit de la synthèse de phosphatidylbutanol par transphosphatidylation. Il en résulte une inhibition de la formation des fibres de stress. Dans les cellules U937, PLD1 est associée à une fraction insoluble à l'octylglucoside correspondant vraisemblablement au cytosquelette : cette PLD1 est activée par RhoA et ARF (Iyer and Kusner, 1999). L'exoenzyme C3 qui inactive les protéines Rho inhibe la formation des fibres de stress stimulées par le LPA ou le PA dans les fibroblastes (Ridley, 1999). L'AVP aussi peut induire une formation Rho-dépendante de fibres de stress, via la médiation des protéines $G\alpha_{12}$ (Gohla et al., 1999). Nous équipe a précédemment montré que la PLD intervient dans la réponse myogénique via une réorganisation du cytosquelette. Les inducteurs de différenciation AVP et TPA provoquent une formation de "Stress Fiber Like Structures" (SFLS) dans les myoblastes L6, concomitante avec l'activation de la PLD, et PLD-dépendante. Dans ce modèle, PLD1 est transloquée au niveau des fibres d'actine. A l'aide d'une sonde fluorescente intracellulaire liant spécifiquement le PA, nous avons montré que ce messenger participe activement au processus de mise en place des SFLS. En effet, il est sélectivement accumulé au niveau des SFLS naissantes (Komati et al., 2005). De nombreux auteurs ont montré que les deux isoformes PLD1 et PLD2 ont des fonctions différentes dans le contrôle du cytosquelette. Ainsi, dans les mastocytes, PLD2, et non PLD1, est impliquée dans la formation des «ruffles» au niveau de l'actine corticale après stimulation antigénique (O'Lunaigh et al., 2002). La surexpression de PLD2 provoque l'apparition de filopodes dans les cellules fibroblastiques (Colley et al., 1997). Au contraire, PLD1 et non PLD2 participe à la formation des fibres de stress dans les fibroblastes (Kam and Exton, 2001). Cette différence dans les rôles physiologiques des deux isoformes de PLD peut être attribuée à leurs localisations subcellulaires distinctes (Colley et al., 1997).

7.3- La PLD et la prolifération cellulaire

Le PA est un second messenger important dans le contrôle de la prolifération. La PLD est connue pour être activée par divers mitogènes et des facteurs de croissance dont les récepteurs possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque, comme celui de l'EGF (Zhang and Akhtar, 1998), ou sont couplés à une protéine G. L'effet de la PLD sur la prolifération semble s'exercer via le PA, mais aussi le LPA. L'addition de PA ou de LPA exogènes à des cellules de carcinome, des fibroblastes ou des cellules mésangiales, stimule la synthèse d'ADN (Knauss et al., 1990). Dans de nombreux modèles cellulaires, l'inhibition de la PLD par des alcools primaires provoque l'arrêt de la prolifération (Kotter et al., 2000). Il est important de noter que la PLD et ses produits métaboliques (PA, LPA, DAG) ne représentent qu'une des voies de signalisation permettant la prolifération cellulaire. L'activation de la PLD est très souvent parallèle à celle de la PLC et à la stimulation de

PKC et la mobilisation du calcium intracellulaire, eux-mêmes activateurs directs de la PLD (Boarder, 1994). La réponse mitogénique ne dépend pas toujours de l'activation de la PLD et inversement l'activation de la PLD n'est pas systématiquement associée à la prolifération cellulaire. Ainsi, l'activation de la PLD dans les lymphocytes est connue pour induire des signaux antiprolifératifs (Gilbert et al., 1998). Diaz et al. ont montré que l'activation de la PLD produite par l'enrichissement en acide docosahexaénoïque (DHA) des membranes de PBMCs (cellules sanguines mononucléées) inhibe fortement la réponse lymphoproliférative aux mitogènes. L'exclusion de PLD1 des microdomaines membranaires semble responsable de son activation après enrichissement des membranes en DHA (Diaz et al., 2002).

8- mTOR et la phospholipase D

Fang et al. ont montré une régulation directe de la voie mTOR par la PLD dans les cellules HEK293 : en effet, le PA exogène stimule la phosphorylation des deux effecteurs de mTORC1 S6 kinase et 4E-BP1 (Fang et al., 2001) Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Blenis (Tee et al., 2003), et cette phosphorylation est inhibée par la rapamycine (donc mTOR-dépendante). De plus, comme le PA exogène, des analogues stables de PA activent les effecteurs de mTORC1 (Xu et al., 2004). De plus, la surexpression de PLD2 ou PLD1 induit une augmentation de la phosphorylation de S6 kinase dans les cellules MCF7 et les fibroblastes de rat, respectivement (Chen et al., 2005; Hui et al., 2004).

Certaines études ont montré l'implication préférentielle de PLD1 dans la régulation de la voie mTOR, d'autres ont plutôt suggéré un rôle de l'isoforme 2. En faveur de PLD1, Kam et al. ont montré que l'activation de la voie mTOR par le LPA passe par la petite protéine G Rho (Kam and Exton, 2001) ; Fang et al. ont montré l'implication de PLD1 dans la réponse de la voie mTOR à la stimulation par la petite protéine G Cdc42 (Fang et al., 2001) ; Ohguchi et al. ont montré que la suppression de l'expression de PLD1 inhibe la phosphorylation de S6 kinase dans les cellules de mélanome B16 (Ohguchi et al., 2005). En ce qui concerne PLD2, il a été observé que cette isoforme peut se lier au complexe mTORC1 en se fixant sur Raptor, via le motif TOS (TOR signaling) de PLD2 (Ha et al., 2006)

En fait, il est difficile d'attribuer de manière non ambiguë l'activation de la voie mTOR à l'une ou l'autre isoforme, parce que leurs activités sont liées : l'activation de PLD1 induit une stimulation de PI-4P, 5-kinase, et l'accumulation de PIP2, co-facteur activateur de PLD2 (Sun and Chen, 2008).

8.1- Les mécanismes d'activation de la voie mTOR par la PLD

8.1.1- La voie PI3K-Akt

Le mécanisme par lequel la PLD active la voie mTOR est encore incomplètement connu. Certaines études ont mis en cause la voie PI3K-Akt, au vu de l'effet négatif de LY294002, inhibiteur de PI3K, sur la phosphorylation de S6 kinase induite par l'activation de la PLD (Hui et al., 2004). Cependant, d'autres ont remarqué que le PA exogène est capable d'induire la phosphorylation de S6 kinase même en présence de wortmannine, autre inhibiteur de PI3K (Tee et al., 2003). L'implication de la voie PI3K-Akt dans l'activation de la voie mTOR induite par la PLD n'est donc pas clairement établie.

Par ailleurs, Sun et al. ont montré que la petite protéine G Rheb, régulateur positif de mTORC1, est aussi un activateur direct de la PLD. Akt, via l'inactivation du complexe TSC1/2, régulateur négatif de Rheb, pourrait donc participer à l'activation de PLD (Sun et al., 2008)

8.1.2- Fixation de PA sur mTOR

La rapamycine se fixe sur la protéine cytosolique FKBP12, ensuite ce complexe se fixe sur le domaine FRB de mTOR pour inhiber son activité. Fang et al. expliquent l'inhibition de mTOR par la rapamycine par une compétition entre le complexe FKBP12/rapamycine et le PA, pour la fixation sur le domaine FRB (Chen and Fang, 2002; Fang et al., 2001). Ces auteurs ont montré qu'un peptide correspondant au domaine FRB de mTOR peut se lier sur des vésicules qui contiennent au moins 10% de PA, mais pas un autre phospholipide. Cette fixation du PA sur le domaine FRB est bloquée par FKBP12/rapamycine. Le domaine FRB portant la mutation conférant à mTOR une résistance à la rapamycine fixe l'acide phosphatidique même en présence de rapamycine. De plus, le résidu Arg 2109 joue un rôle important dans l'interaction entre le domaine FRB et le PA (Fang et al., 2001).

Veverka et al. ont déterminé par résonance magnétique nucléaire la structure tridimensionnelle en solution du domaine FRB de mTOR, et identifié le site de fixation spécifique de l'acide phosphatidique sur le domaine FRB. Le groupement phosphate du PA se fixe sur la chaîne latérale, chargée positivement, de l'arginine 2109. Un des deux chaînes acyles se fixe sur le même site que la rapamycine et établit des liaisons de van der Waals avec les chaînes latérales de leucine 2031, phénylalanine 2039, tryptophane 2101, et tyrosine 2105, l'autre se fixant sur une région adjacente formée par les chaînes latérales d'aspartate 2102, tyrosine 2105 et histidine 2106. Le chevauchement entre les domaines de liaison des deux ligands permet de penser que la rapamycine inhibe mTOR en empêchant la fixation de l'acide phosphatidique (Veverka et al., 2008).

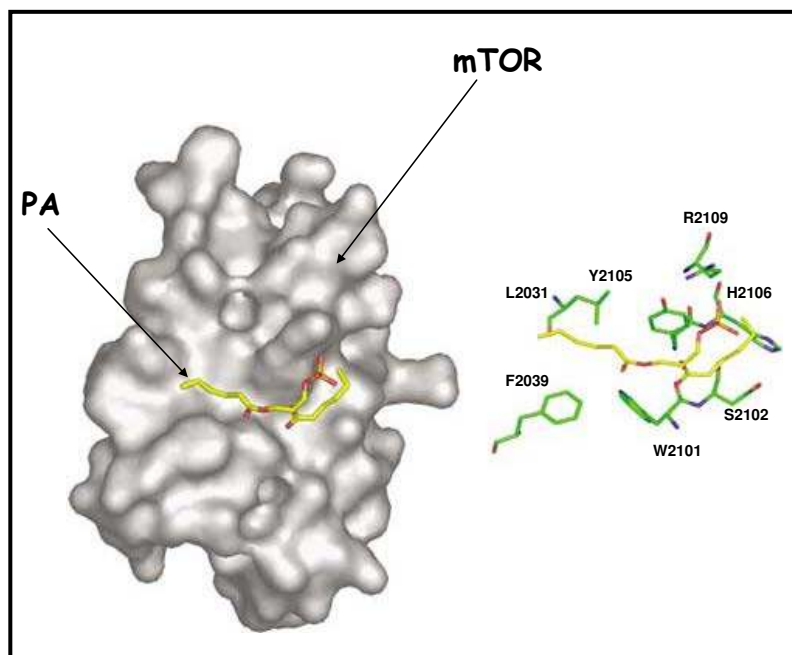


Figure 18 : Fixation de PA sur le complexe mTORC1

D'après Yip *et al.* 2010

D'autres résultats cohérents avec cette hypothèse ont été obtenus par l'équipe de Foster, qui a observé que l'élévation de l'activité PLD diminue l'effet de la rapamycine sur la prolifération de cellules cancéreuses : ainsi, dans les cellules MDA-MB-231, qui ont une activité PLD élevée, la DE50 de la rapamycine pour l'inhibition de la prolifération cellulaire est de 10 $\mu\text{mol/L}$, alors que dans les MCF7 qui ont une activité PLD basse, la DE50 de la rapamycine est de 20 nmol/L (Chen *et al.*, 2003).

Toschi *et al.* ont de plus montré que l'acide phosphatidique est nécessaire à la formation et la stabilisation des deux complexes mTORC1 et mTORC2, et que la rapamycine, en entrant en compétition avec le PA, empêche l'assemblage de ces deux complexes. Dans la même étude, ils ont montré que l'affinité du PA pour le complexe mTORC1 est plus faible que pour le complexe mTORC2, ce qui expliquerait l'inhibition préférentielle du complexe mTORC1 par la rapamycine (Toschi *et al.*, 2009).

Lehman *et al.* ont par ailleurs montré que l'acide phosphatidique est capable de se fixer sur, et activer, la S6 kinase d'une façon indépendante de l'activité mTOR. Le mécanisme d'activation n'est pas clair : il se pourrait que le PA se fixe spécifiquement sur la forme phosphorylée (activée) de S6 kinase, et ainsi la stabilise (Lehman *et al.*, 2007).

CHAPITRE 4

L'ATROPHIE ET L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRES

Le muscle squelettique possède des capacités intrinsèques pour adapter sa masse aux besoins fonctionnels et aux contraintes environnementales. Par exemple, il peut transformer des signaux mécaniques en signaux biochimiques qui induisent une augmentation de la synthèse protéique. Les changements de la masse musculaire résultent d'un équilibre délicat entre la synthèse et la dégradation protéique, dans lequel interviennent des facteurs humoraux, mécaniques, des voies de signalisation et de régulation transcriptionnelle complexes.

1- Les régulateurs positifs de la masse musculaire

1.1- La voie de signalisation Akt/mTOR

La voie de signalisation Akt/mTOR est un régulateur clé de l'atrophie et de l'hypertrophie musculaires, agissant notamment au niveau des facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction pour induire une augmentation de la synthèse protéique (Hornberger et al., 2004).

Les mutants dominants-négatifs d'Akt induisent une diminution de la taille des myotubes C2C12 *in vitro*, alors que la surexpression d'Akt sauvage induit une hypertrophie (Rommel et al., 2001). *In vivo*, une activité physique entraîne une augmentation de l'activité de PI3K et une augmentation de la phosphorylation des protéines Akt, mTOR, p70 S6 kinase, de la protéine ribosomale S6, de 4E-BP1 et GSK3- β (Favier et al., 2008). Les mêmes résultats sont obtenus avec d'autres procédures entraînant une hypertrophie musculaire, comme la stimulation électrique de haute fréquence (HFES) (Atherton et al., 2005), ou l'étirement passif (Hornberger et al., 2004). Le rôle d'Akt dans l'hypertrophie musculaire a été confirmé *in vivo* chez des souris transgéniques dans lesquelles on surexprime conditionnellement une forme constitutivement active d'Akt. Dans ces conditions, les myocytes ont une taille double de ceux des animaux sauvages, à cause de l'augmentation de la synthèse protéique (Lai et al., 2004).

L'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine bloque l'hypertrophie induite par surcharge, ce qui montre clairement un rôle important de la voie mTOR dans la régulation de la masse musculaire (Bodine et al., 2001). D'autre part, la suspension des pattes postérieures, ainsi que la dénervation des membres, procédures induisant l'atrophie des muscles immobilisés, diminuent la phosphorylation des différentes protéines de la voie mTOR (Bodine et al., 2001; Hornberger et al., 2001).

La perte musculaire est associée à une stabilité du complexe 4E-BP1/eIF4E (correspondant à une inhibition de la traduction), ainsi qu'à une augmentation du taux de TSC1 (associée à une

inhibition de mTORC1) (Bodine et al., 2001). Chez les rats âgés atteints d'atrophie musculaire, la phosphorylation d'Akt est diminuée au niveau du tibialis antérieur et du gastrocnemius médian, et la réponse à une HFES est réduite, ce qui suggère une perturbation de la voie mTOR (Haddad and Adams, 2006).

Le traitement des rats avec AICAR, un activateur de l'AMP kinase, réduit la synthèse des protéines musculaires en induisant une inhibition d'Akt et de la voie mTOR. AMPK est capable d'inhiber mTOR via l'activation du complexe TSC1/TSC2, ou directement par phosphorylation de mTOR au niveau de la Thr2446, ce qui empêche la phosphorylation de ce dernier par Akt sur la Thr2448 (Cheng et al., 2004).

mTOR joue également un rôle important dans le maintien de la fonction oxydative des mitochondries, en induisant la synthèse des gènes mitochondriaux et en favorisant la consommation d'oxygène d'une façon Akt-dépendante (Cunningham et al., 2007). Les auteurs ont montré qu'une inhibition de la voie mTOR induit une diminution du niveau d'expression des gènes régulateurs de la transcription mitochondriale comme PGC-1 α , "estrogen-related receptor α " et "nuclear respiratory factors", ainsi qu'une perturbation de la consommation de l'oxygène dans les muscles squelettiques (Cunningham et al., 2007).

Cependant, PI3K/Akt n'est pas la seule voie de régulation de mTOR impliquée dans le contrôle de la masse musculaire. La stimulation mécanique induit l'activation de la voie mTOR, mais d'une façon Akt-indépendante, puisque d'après l'équipe de Hornberger les muscles isolés de souris invalidées pour Akt répondent normalement à la stimulation mécanique par étirement passif, par une activation de la voie mTOR. (Hornberger et al., 2004). Celle-ci semble dépendre d'une activation de la PLD (Hornberger et al., 2006a). Les acides aminés sont aussi fortement impliqués dans le contrôle de la masse musculaire. Une supplémentation alimentaire en acides aminés essentiels et en glucides permet chez l'homme d'améliorer l'état du soleus, mais pas du vastus lateralis, affaiblis et atrophiés après une longue période d'immobilisation (Fitts et al., 2007). L'apport aux muscles de nutriments comme les acides aminés induit la phosphorylation de p70S6 kinase, sans activer Ak, ce qui montre que les nutriments activent la voie mTOR d'une façon Akt indépendante (Hornberger and Chien, 2006).

1.2- IGF-I

Il est considéré comme un anabolisant fort qui permet l'activation de la voie Akt/mTOR et inhibe TSC2, induisant ainsi une augmentation de la synthèse protéique conduisant à une hypertrophie musculaire (Favier et al., 2008).

Cependant, le rôle d'IGF-1 dans l'hypertrophie musculaire n'est pas tout à fait clair : d'une part l'augmentation de la concentration d'IGF-1 induite par injection ou manipulation génétique dans le muscle squelettique est suffisante pour induire une hypertrophie (Adams and McCue, 1998; Musaro et al., 2001), d'autre part, l'administration systémique d'IGF-1 et d'hormone de croissance (GH) n'induit pas forcément une hypertrophie musculaire. Par exemple, l'administration de GH/IGF-1 à des rats dont les pattes sont suspendues n'a aucun effet sur la masse musculaire en absence de charge mécanique (Allen et al., 1997). De plus, le traitement par GH/IGF-1 de personnes âgées soumises à un entraînement physique n'a pas d'effet sur leur masse musculaire, ce qui suggère que la baisse des taux de l'hormone de croissance et d'IGF-1 au cours du vieillissement n'est pas responsable de la perte de masse musculaire (Taaffe et al., 1996).

De même, dans les conditions atrophiques, le rôle d'IGF-1 n'est pas évident : une augmentation de l'ARNm d'IGF-1 dans le soleus a été montrée après deux jours de mise en décharge des pattes arrières, mais le taux revient aux valeurs contrôles après 8 jours (Awede et al., 1999). D'autres études ont montré que le taux de la protéine IGF-1 diminue au bout de 14 jours d'immobilisation des pattes, dans le plantaris mais pas dans le tibialis (Yimlamai et al., 2005). Chez l'Homme, la section du nerf spinal ou l'immobilisation des membres n'ont aucun effet sur les taux d'ARNm et de protéines d'IGF-1. Par contre des études ont montré que l'âge est associé à une diminution de MGF (mechano growth factor), un variant d'épissage de l'IGF-1 produit localement par le tissu musculaire en réponse à l'exercice ou à une lésion (Favier et al., 2008). La surexpression par adénovirus d'IGF-1Ea (peptide précurseur d'IGF-1) et MGF induit une hypertrophie musculaire chez les jeunes souris, cependant MGF n'a aucun effet sur la masse musculaire des animaux âgés (Barton, 2006).

La biodisponibilité d'IGF-1Ea est régulée par les IGF-binding proteins, notamment IGFBP-4 et IGFBP-5, et il a été démontré que les conditions hypertrophiques, comme les exercices de résistance ou l'électromyostimulation, sont accompagnées par une forte augmentation des taux d'ARNm d'IGFBP-4, alors que le taux d'IGFBP-5 est peu variable (Favier et al., 2008). De même, la testostérone augmente le taux d'ARNm d'IGFBP-4 dans le muscle squelettique de personnes âgées, ainsi que la synthèse protéique (Urban et al., 1995). Ceci suggère que les IGFBPs pourraient jouer un rôle important dans l'action des IGFs au niveau des muscles squelettiques.

1.3- La stimulation mécanique

Il est bien connu que la tension appliquée au muscle est un facteur important dans la régulation de sa masse : la surcharge induit une augmentation de la masse musculaire, alors que la mise au repos a l'effet inverse (Hornberger et al., 2006b).

Ces résultats sont observables *in vitro*. Vandeburgh et al. en 1987 ont montré que la stimulation mécanique induit une nette augmentation de la synthèse protéique, alors que la diminution de la protéolyse est minime, ce qui montre que la synthèse protéique a un rôle prépondérant dans l'hypertrophie mécano-induite (Vandeburgh, 1987). Comme les facteurs de croissance et les nutriments, la stimulation mécanique induit une augmentation de la phosphorylation de S6 kinase. Cette activation est sensible à la rapamycine, mais pas à la wortmannine, ce qui suggère que la stimulation mécanique contrôle la voie mTOR d'une façon PI3-K indépendante (Hornberger et al., 2006b). La stimulation de mTOR semble dépendante de la PLD, puisqu'elle est supprimée par le butanol-1 (Hornberger et al., 2006a). La stimulation mécanique induit une augmentation de la concentration du PA dans les muscles squelettiques, qui est supprimée par l'inhibition de la PLD (Hornberger et al., 2006a).

2- Les régulateurs négatifs de la masse musculaire

L'atrophie musculaire est associée à de nombreuses pathologies telles que le SIDA, le cancer, l'insuffisance rénale, etc. L'atrophie musculaire caractérise également la sarcopénie, un état physiologique de déclin de la masse et de la force musculaires survenant lors du vieillissement normal. La perte musculaire associée à ces diverses conditions représente un problème de santé majeur, de par la perte d'autonomie, la détérioration de la qualité de vie, et la mortalité qu'elle entraîne.

La fonte musculaire résulte principalement d'une dérégulation du métabolisme protéique, avec une baisse de la synthèse protéique et une accélération de la protéolyse, entraînant une réduction importante du contenu en protéines contractiles des fibres musculaires.

Les mécanismes précis sous-tendant la perte musculaire ne sont pas encore clairement établis. Dans de nombreux cas (cancer, vieillissement), les cytokines pro-inflammatoires telles que le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α), ou l'interferon gamma (IFN γ), semblent jouer un rôle important. Les glucocorticostéroïdes sont probablement aussi largement impliqués.

La comparaison de l'expression de gènes dans différents modèles d'atrophie musculaire a permis l'identification d'un groupe de gènes régulés négativement ou positivement dans les muscles atrophiés, quelle que soit la cause de l'atrophie (immobilisation, diabète, insuffisance rénale, etc.). Ces gènes en commun ont été considérés comme impliqués dans l'atrophie musculaire, et ont par la suite été désignés comme « atrogènes » (Sandri, 2008; Sandri et al., 2004). Ces gènes concernent les principaux systèmes impliqués dans la protéolyse associée à l'atrophie : le système ubiquitine /protéasome, et l'autophagie. Ces systèmes sont largement sous la dépendance d'une régulation par les facteurs de transcription FOXO.

2.1- Les facteurs de transcription FOXO

FOXO (sous-classe O des facteurs de transcription Forkhead box) est une famille de facteurs de transcription comprenant FOXO1, 3a, 4 et 6, qui sont des substrats d'Akt, et de SGK (serum and glucocorticoid-induced protein kinase). Les protéines FOXO interagissent avec la séquence GTAAA(C/T) sur l'ADN des gènes cibles (Greer and Brunet, 2005).

Chez les mammifères, les FOXOs jouent un rôle important dans des fonctions biologiques comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation d'ADN et l'apoptose. La perte de la fonction FOXO peut induire une prolifération cellulaire incontrôlée, une diminution de la réparation de l'ADN endommagé, ainsi qu'une tendance à la carcinogénèse (Greer and Brunet, 2005).

2.1.1- Rôles de FOXO

Les facteurs FOXO régulent l'expression de certains gènes comme p27^{kip1}, p130(RB2), cycline D1/2 et Bcl-6 qui sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Ils régulent également l'expression de gènes comme Bim, Fas ligand, TRAIL (tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand) et Bcl-X1 qui sont impliqués dans l'apoptose. Akt et SGK, en phosphorylant FOXO, provoquent sa séquestration dans le cytoplasme, empêchant ainsi sa translocation au noyau et son effet sur l'expression des gènes cibles. La phosphorylation de FOXO par Akt réduit en outre sa capacité à se fixer sur l'ADN et stimule sa dégradation (Lam et al., 2006).

Outre leur rôle dans le cycle cellulaire et l'apoptose, les FOXOs jouent un rôle important dans la protection contre la génotoxicité et le stress. Des études récentes ont montré l'implication d'un certain nombre de facteurs de transcription dans la réponse aux stress oxydant et calorique et dans la réparation de l'ADN (Greer and Brunet, 2005), notamment FOXO3a, qui induit l'expression

d'enzymes mitochondriale telles que la MnSOD (manganese superoxide dismutase) et les catalases, qui permettent la dégradation des radicaux oxygénés (Kops et al., 2002).

FOXO3a est un important senseur du stress cytotoxique induit par des agents chimiothérapeutiques comme le taxol et la doxorubicine (Sunters et al., 2003; Sunters et al., 2006). D'une part, l'activation de FOXO3a par un agent anticancereux induit l'arrêt du cycle cellulaire, d'autre part, elle entraîne l'apoptose. Cependant, une activation chronique de FOXO3a peut provoquer une résistance à la chimiothérapie en induisant l'expression de gènes de résistance comme le transporteur de drogues MDR1 (ABCB1) (Lam et al., 2006). De plus, FOXO3a stimule la survie des cellules cancéreuses en activant la voie PI3K/Akt selon un mécanisme mal connu (Lam et al., 2006).

2.1.2- Régulation de FOXO

L'activité transcriptionnelle de FOXO est contrôlée à plusieurs niveaux : l'expression génique, la localisation, la dégradation de la protéine, ainsi que par des modifications post-traductionnelles (Van Der Heide et al., 2004).

L'activité transcriptionnelle de FOXO peut être régulée négativement par certaines kinases comme Akt, SGK, CK1 (casein kinase 1), DYRRK1A (dual-specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1A) qui entraînent sa séquestration cytosolique (Greer and Brunet, 2005) (*Figure 19*).

Elle est aussi régulée par son état d'acétylation (Vogt et al., 2005). Les protéines FOXO sont acétylées dans les cellules, leur état d'acétylation étant modulé par les signaux de stress. Il a été démontré que le stress oxydatif facilite la fixation des désacétylases SIRTs (sirtuins) sur FOXO3a acétylé, et entraîne une activation préférentielle par FOXO3a des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la résistance au stress oxydant, et une diminution de l'expression des gènes pro-apoptotiques. SIRT1 active également FOXO1 et FOXO4 impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire via l'expression de p27^{kip1}, et dans la résistance au stress oxydant via les taux de MnSOD et de GADD45 (Lam et al., 2006).

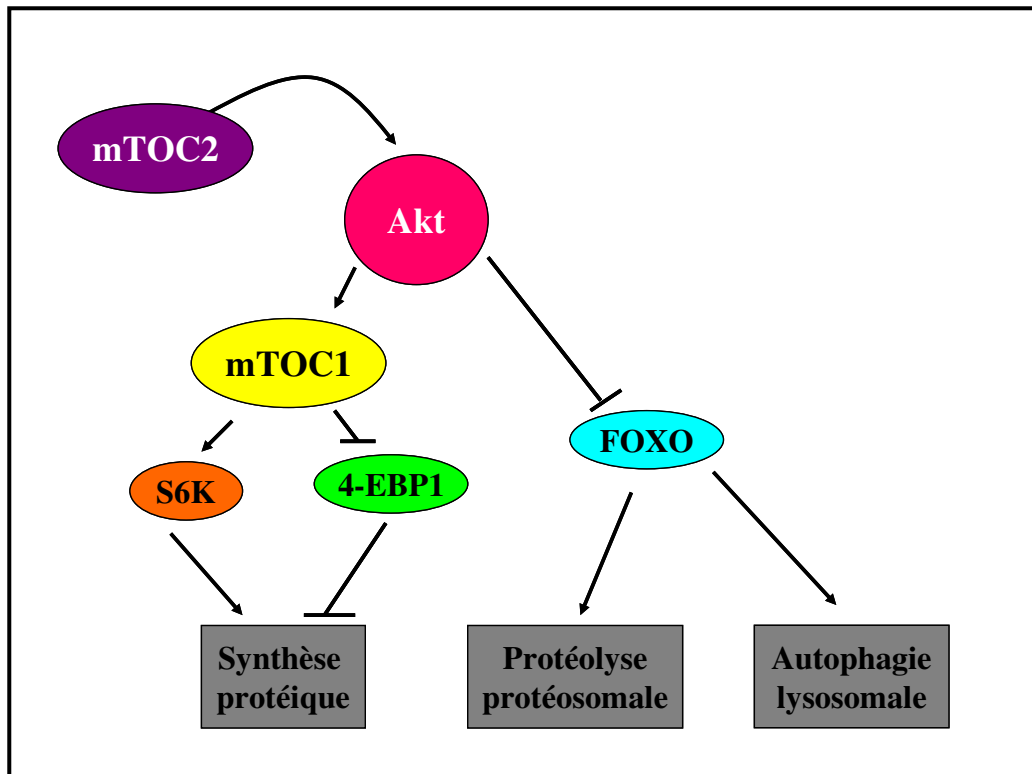


Figure 19 : Régulation coordonnée de la synthèse et de la dégradation protéique par Akt

L'activité de FOXO peut également être régulée par l'interaction avec des cofacteurs de transcription, comme la β -caténine, facteur de transcription impliqué dans le développement et le renouvellement des tissus, qui interagit avec FOXO et augmente son activité transcriptionnelle (Lam et al., 2006). D'autres facteurs de transcription comme Myc, NF- κ B, Smad et p53 sont impliqués dans la régulation de l'activité de FOXO (Greer and Brunet, 2005).

2.2- Le système Ubiquitine/Protéasome

Comme les autres tissus, le muscle est équipé de plusieurs systèmes de protéolyse, la protéolyse lysosomale ou autophagie, la protéolyse Ca^{++} -dépendante, le système ubiquitine-protéasome, les caspases et les métalloprotéinase de la matrice extracellulaire. Le système ubiquitine-protéasome notamment joue un rôle important dans la dégradation des protéines musculaires. Il est activé par les facteurs de transcription FOXO. Ce système implique deux étapes, la première est l'ubiquitinylation des protéines, la deuxième est la reconnaissance de ces protéines par le protéasome 26S et leur dégradation en peptides (Figure 20).

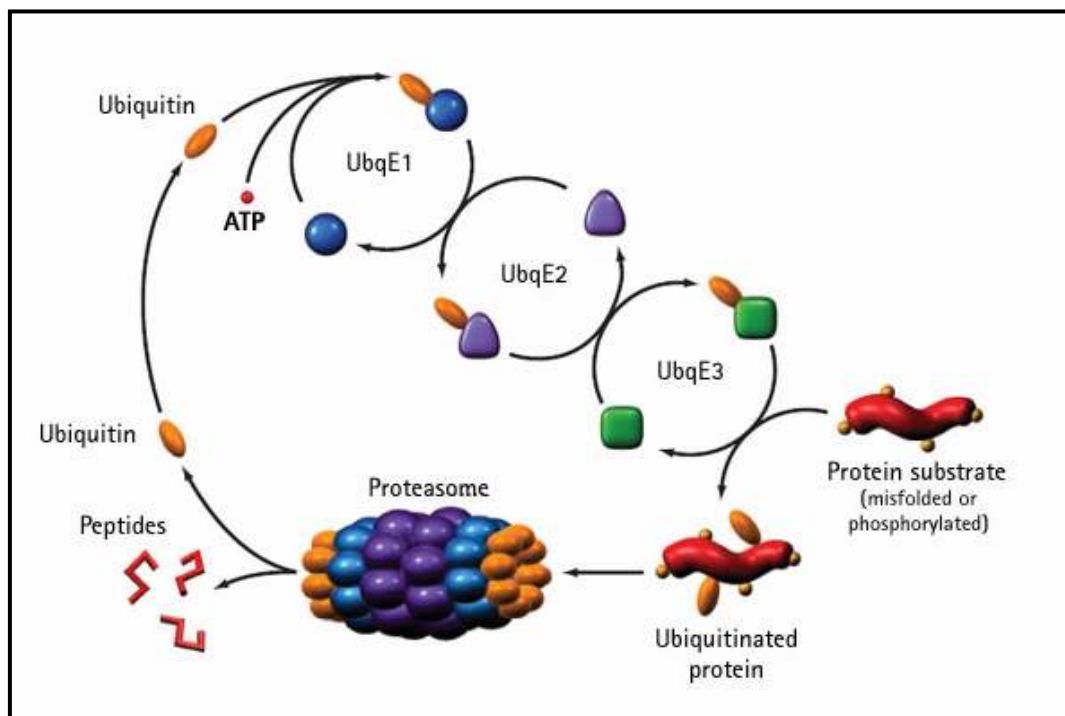


Figure 20 : Le système Ubiquitine-Ligases/protéasome

➤ **Les ubiquitine-ligases**

L'ubiquitinylation des protéines met en jeu l'"ubiquitin activating enzyme" (E1), les "ubiquitin-conjugating enzymes" (E2) et les ubiquitine-ligases (E3). E1 a une expression faible dans les muscles squelettiques, et son taux d'ARNm n'est pas régulé dans les cas de catabolisme accru ; par contre son activité enzymatique est extrêmement élevée. Quarante E2 ont été identifiés dans les cellules des mammifères, seulement un petit nombre d'entre elles étant surexprimées pendant la perte musculaire, comme 14-kDa E2 (HR6/UBC2), 20 kDa E2, et les isoformes UBC4/UBC5.

Une E2 interagit avec une ou plusieurs E3 pour reconnaître une protéine spécifique. Il y a de l'ordre de mille E3 dans les cellules des mammifères, dont la spécificité détermine la protéine cible. Un nombre limité de ces enzymes est surexprimé au cours de la perte musculaire, parmi lesquels on note E3 α /UBR1, "ubiquitinous N-end rule RING-finger" ligase, qui fonctionne avec 14-kDa E2. Ces deux protéines sont impliquées dans l'ubiquitinylation des protéines musculaires solubles. Une augmentation de leurs ARNm a été détectée dans plusieurs modèles de perte musculaire, mais le taux des protéines a été trouvé inchangé. Deux E3 spécifiques du muscle, connues sous les noms d'atrogine-1-MAFbx (muscle atrophy F-box protein), et de MuRF1 (muscle RING finger-1 protein) sont surexprimées au cours des maladies cataboliques. Ces deux E3 interagissent avec le complexe

calcineurine A- α -actinine-2 et la titine, dans les cardiomyocytes et les cellules musculaires respectivement. Les "souris KO" pour ces E3 sont résistantes à l'atrophie musculaire. La transcription d'atrogine et de MuRF1 est sous le contrôle de FOXO, alors que la transcription de MuRF1 est aussi contrôlée par l'activation de NF- κ B.

➤ *Le protéasome 26 S*

L'augmentation de la protéolyse au cours de l'atrophie musculaire est ATP-dépendante, ce qui suggère que l'hydrolyse de l'ATP est importante pour l'activation de l'ubiquitine, et pour la protéolyse par le protéasome 26S. Celui-ci est un complexe enzymatique multiprotéique, qui dans le muscle squelettique possède 3 activités peptidases (chymotrypsine-like, trypsine-like, et caspase-like).

Le corps protéolytique 20S s'associe avec deux complexes régulateurs 19S pour former le protéasome 26S. Les glucocorticoïdes et le TNF α augmentent le taux d'expression de l'ARNm de la sous-unité 20S. Les glucocorticoïdes induisent aussi la transcription de la sous-unité C3 du protéasome dans les myoblastes L6 (Du et al., 2000).

2.3- L'Autophagie

L'homéostasie cellulaire dépend de l'équilibre entre la production et la destruction des macromolécules et des organites. Outre le système ubiquitine ligases / protéasome, le système lysosomal est la principale voie de dégradation des composants cellulaires. Il est responsable de la dégradation des macromolécules comme les protéines, mais il est aussi impliqué dans le turnover des organites par autophagie (Mehrpour et al., 2010)

Le terme autophagie recouvre la microautophagie (ou "chaperone-mediated autophagy" (CMA) qui consiste en la séquestration directe d'une partie du cytoplasme dans la membrane des lysosomes, et la macroautophagie qui commence avec la formation de vacuoles connues sous le nom d'autophagosomes, qui entourent des composants du cytoplasme, puis fusionnent avec les lysosomes où leur contenu est dégradé et recyclé (Mehrpour et al., 2010).

L'autophagie joue un rôle majeur dans la perte musculaire, quelle qu'en soit la cause. Deux gènes de l'autophagie (ATG, autophagy related genes), notamment, sont fortement exprimés au cours de l'atrophie musculaire : LC3 et Gabarapl, qui codent pour des protéines associées à la formation des autophagosomes (Sandri, 2008). Des souris transgéniques exprimant LC3 fusionné avec la GFP

permettent de visualiser par microscopie de fluorescence les autophagosomes formés dans le muscle au cours de l'atrophie. Ces autophagosomes ont la caractéristique d'être plus petits que ceux trouvés dans des tissus comme le foie, le cœur ou le pancréas (Mizushima et al., 2004).

Mammucari et al. ont montré que la surexpression d'une forme constitutivement active de FOXO3 induit, via l'autophagie, une atrophie des myocytes *in vivo*, qui est contrée par l'utilisation d'ARNi anti-LC3 (Mammucari et al., 2007). L'implication de l'autophagie dans l'atrophie musculaire a aussi été démontrée dans d'autres modèles tels que des souris transgéniques exprimant une superoxyde dismutase mutée spécifiquement dans les muscles squelettiques. Le stress oxydant ainsi induit provoque une atrophie musculaire due à l'autophagie (Dobrowolny et al., 2008).

D'après des études récentes, l'autophagie est aussi associée à la sarcopénie. Avec l'âge, il apparaît une détérioration de la fonction mitochondriale provoquant une activation de l'autophagie. La surexpression de PGC1 α , gène responsable de la biogénèse mitochondriale, dans les muscles squelettiques de rats âgés, atténue la perte musculaire en réduisant l'autophagie (Sandri, 2010).

2.3.1- mTOR, Akt et autophagie

L'inhibiteur le plus puissant de l'autophagie est la kinase Akt. Sa surexpression dans les muscles des souris adultes, ou dans cellules musculaire en culture, inhibe complètement la formation des autophagosomes (Mammucari et al., 2007). Le rôle de mTORC1, qui est effecteur d'Akt, est moins marqué, puisque l'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine augmente de 10% l'autophagie lysosomale, alors que l'inhibition Akt par API-2 l'inhibe de 50% ce qui suppose que Akt inhibe l'autophagie par une autre voie indépendante de la voie mTOR (Zhao et al., 2007). *In vivo*, l'inhibition de mTOR par la rapamycine ou l'utilisation d'ARNi n'est pas suffisante pour induire une atrophie musculaire et la formation des autophagosomes (Mammucari et al., 2007; Zhao et al., 2007). L'inhibition de S6 Kinase n'a pas d'effet sur l'autophagie dans des myotubes *in vitro* (Mieulet et al., 2007), alors que l'inhibition de la voie IGF1-Akt au cours du jeûne stimule l'autophagie, d'une façon indépendante de la voie mTOR (Sandri). Le contrôle de l'autophagie par Akt se fait au niveau transcriptionnel via le facteur FOXO3, qui active l'expression des ATG tels que LC3, Gabarapl, Atg4, Beclin1, etc (Zhao et al., 2007).

Cependant, mTORC1 a un rôle régulateur direct non négligeable sur l'autophagie. Plusieurs études ont montré que mTORC1 est capable de phosphoryler les ATG ULK1, ULK2 et Atg13 *in vitro*. L'inhibition de mTORC1 par la rapamycine ou la déplétion en sérum, conditions qui induisent l'autophagie, induit une déphosphorylation de ULK1, ULK2 et Atg13 dans les cellules humaines (Jung et al., 2009). Par ailleurs, l'état de phosphorylation de FIP200, effecteur en aval de ULK, est

inversement corrélé avec l'activité de mTORC1. (Jung et al., 2009). Ces résultats permettent de proposer un système dans lequel ULK1/2 interagit avec Atg13, FIP200 et la protéine Atg101. Quand mTORC1 est activé, il interagit avec le complexe ULK, et phosphoryle ULK1 et Atg13, ce qui permet à ULK1 de prendre une conformation ouverte ou inactive. Quand mTORC1 est inhibé, il est dissocié du complexe, ULK1 et Atg13 ne sont plus phosphorylés. ULK1 prend dans ce cas une conformation fermée active, et phosphoryle Atg13 et FIP200, ce qui permet d'activer tous les effecteurs impliqués dans la formation de l'autophagosome (Jung et al., 2009; Jung et al., 2010) (Figure 21).

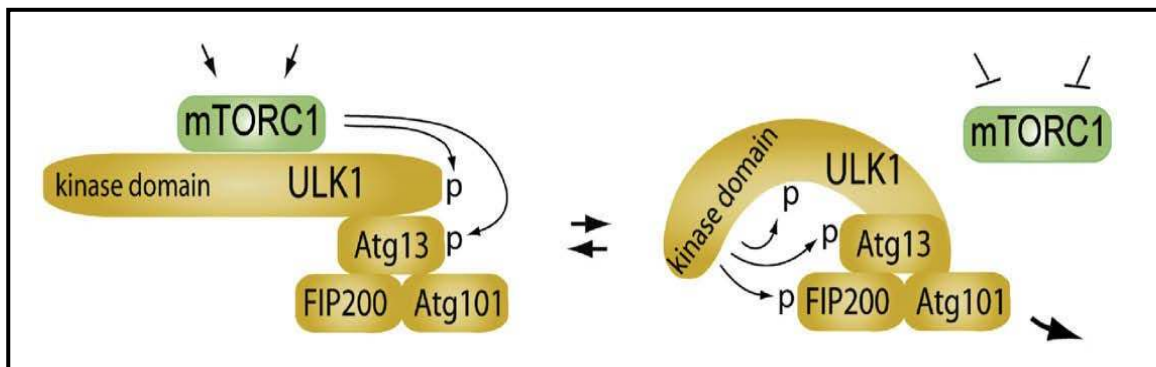


Figure 21 : mTOR et autophagie

2.4- La myostatine

La myostatine joue un rôle important dans le contrôle de la masse musculaire : d'une part, la délétion du gène myostatine engendre un phénotype hyper-musclé (McPherron and Lee, 1997), d'autre part, la surexpression de la myostatine dans le muscle adulte induit une atrophie des fibres musculaires (Durieux et al., 2007). L'effort physique permet de réduire la quantité d'ARN et de protéine de la myostatine dans les cellules musculaires humaines (Roth et al., 2003; Walker et al., 2004) et murines (Heinemeier et al., 2007). De plus, l'ARNm de la myostatine est diminué après un exercice en résistance concentrique ou isométrique, chez l'homme comme chez l'animal (Haddad and Adams, 2006; Haddad et al., 2006; Raue et al., 2006). Plusieurs études ont montré une augmentation du contenu en ARNm et/ou en protéine myostatine dans différentes situations de réduction de l'activité musculaire, telles la décharge (Wehling et al., 2000), la microgravité (Lalani et al., 2000) ou l'arthrose (Reardon et al., 2001). Par ailleurs la sécrétion de myostatine serait régulée par la titine-cap/téléthonine, une protéine de 19 kDa qui est liée à la titine (Nicholas et al., 2002). Etant donné les propriétés élastiques et le rôle de la titine dans le maintien de la structure des sarcomères, il est possible que ce système soit sensible aux contraintes mécaniques appliquées aux myofibrilles.

En plus de son rôle dans l'inhibition de l'activation des cellules satellites, la myostatine réprime l'expression des protéines myoD et myogénine (Durieux et al., 2007) et stimule la protéolyse via l'augmentation de l'expression de certains éléments du système ubiquitine/protéasome (Gilson et al., 2007). D'après cette dernière étude, l'augmentation des ARNm d'atrogine-1, MuRF1 et FOXO3a induite par la dexaméthasone est abolie chez les souris dont le gène myostatine a été invalidé. De plus, le traitement des myotubes par la myostatine est associé avec une augmentation de l'expression en ARNm de MuRF1 et d'atrogine-1, de l'ubiquitinylation des protéines, et une réduction de la proportion de FOXO1 sous forme phosphorylée (McFarlane et al., 2006). En accord avec ces données, l'expression de PGC-1 α , qui prévient l'augmentation de l'expression d'atrogine-1 et MuRF1 lors de l'atrophie, est réduite avec l'expression ectopique de myostatine (Durieux et al., 2007).

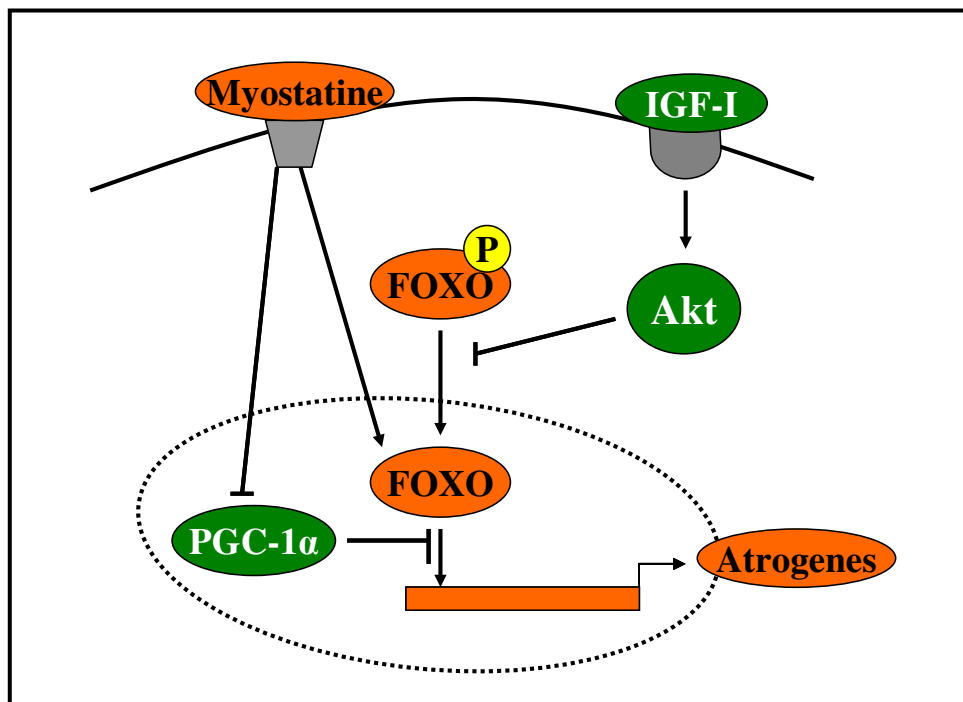


Figure 22 : Régulation inverse de l'activité transcriptionnelle de FOXO par IGF-I et myostatine.

2.5- Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont connus pour avoir un rôle catabolique. Au niveau musculaire, ils induisent l'atrophie des membres périphériques et des muscles respiratoires. Plusieurs pathologies

telles que la cachexie, l'acidose métabolique, entre autres, sont associées avec une augmentation des taux de glucocorticoïdes circulants, ce qui suggère que ces hormones sont impliquées dans l'atrophie musculaire observée chez les patients (Schakman et al., 2008).

Les glucocorticoides induisent préférentiellement l'atrophie des fibres musculaire de type II ou rapide ,notamment IIx et IIb, avec un effet moindre sur les fibres de type I. Les muscles glycolytiques rapides sont donc plus sensibles à l'effet des glucocorticoïdes que les muscles oxydatifs (Schakman et al., 2008).

2.5.1- Voies d'induction de l'atrophie glucocorticoïdes-dépendante

Les glucocorticoïdes induisent la perte musculaire en agissant sur plusieurs voies qui contrôlent la synthèse ou la dégradation protéiques. D'une part, ils activent les facteurs de transcription FOXO, notamment FOXO1 et 3, qui, à leur tour activent le système de dégradation protéique ubiquitine ligase-protéasome (Imae et al., 2003). D'autre part, ils inhibent la kinase mTOR par plusieurs voies: par activation du facteur de transcription REDD1, connu comme inhibiteur de mTOR (Wang et al., 2006), et par inhibition du facteur de transcription ATF-4, facteur anabolique permettant la captation des acides aminés essentiels par la cellule, la synthèse des acides aminés non essentiels, et la synthèse des aminoacyl ARNt. L'inhibition de ce facteur de transcription limite l'entrée des acides aminés dans la cellules, ce qui diminue la synthèse protéique (Adams, 2007).

Les glucocorticoïdes activent également GSK3 β , inhibiteur de eIF2B (eukaryotic initiation factor 2B) qui joue un rôle dans la synthèse protéique (Jefferson et al., 1999). L'inhibition de GSK3 β inhibe l'activation du système ubiquitine/protéasome induite par les glucocorticoïdes (Evenson et al., 2005).

Des études ont montré également que les glucocorticoïdes régulent l'activité de la p300-histone acétyltransférase. Dans les myotubes traités à la dexaméthasone, le taux et l'activité de p300 sont augmentés en fonction de la dose et de la durée du traitement (Yang et al., 2005). La dexaméthasone augmente l'interaction protéine/protéine entre p300 et le facteur de transcription C/EBP β (Yang et al., 2005). Cette interaction est importante puisque C/EBP β régule plusieurs gènes du système ubiquitine/protéasome (Penner et al., 2002).

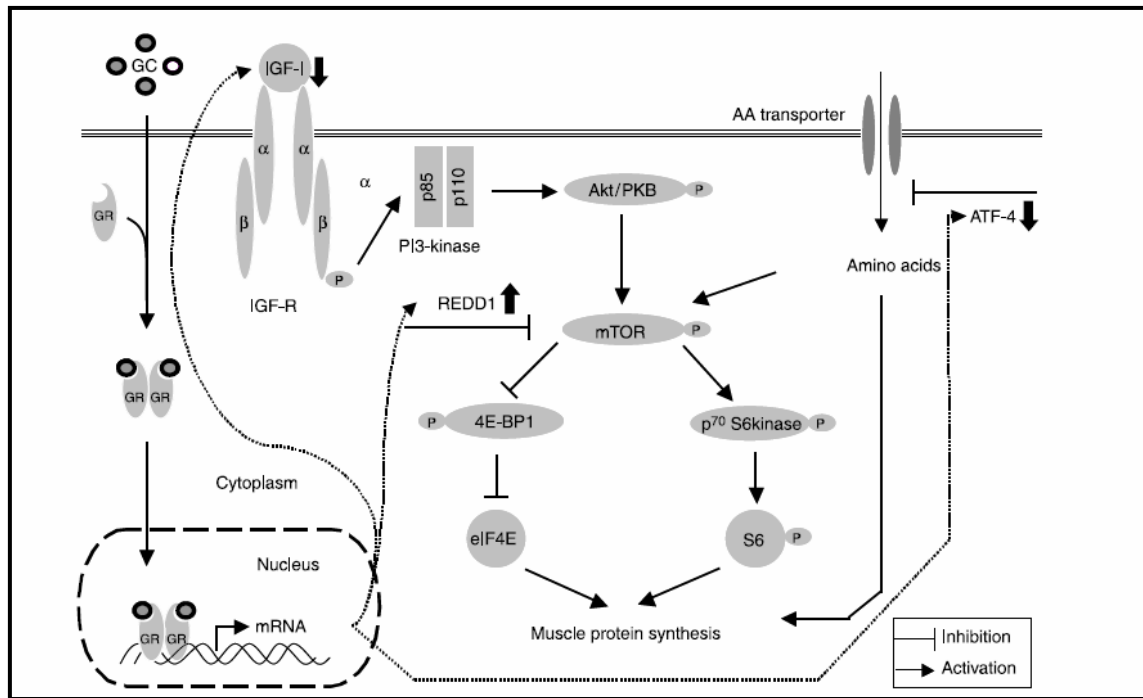


Figure 23 : Régulation de la voie mTOR par les glucocorticoïdes

D'après Schakman *et al.* 2008

CHAPITRE 5

MATERIELS ET METHODES

1- Modèles cellulaires et traitements

1.1- Modèles cellulaires

Les cellules sont cultivées en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ et 95% d'air à 37 °C dans un incubateur Stéricult.

Les cellules utilisées sont des cellules myogéniques de rat de type L6, clone 5 (L6C5) possédant une capacité de différenciation significative. Elles sontensemencées à raison de 1 million de cellules / flacon de 75 cm². Elles forment un tapis cellulaire monocouche qui devient jointif à confluence. Ces cellules sont mises en culture dans un milieu nutritif liquide DMEM de base riche en glucose (4500 mg/L) supplémenté avec 200 mM de L-glutamine, 100 µg/mL de streptomycine, de 100U/mL de pénicilline, auquel on ajoute 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) afin d'obtenir un milieu complet.

Lorsque les cellules deviennent confluentes, le milieu est aspiré, les cellules sont lavées deux fois au tampon PBS (sans Ca⁺⁺, sans Mg⁺⁺) puis incubée avec 2mL de trypsine/EDTA pendant 2 minutes à 37°C. Le détachement des cellules est ensuite suivi au microscope à contraste de phase, puis la trypsine est inactivée par addition de 10mL de milieu de culture contenant 10% de sérum. Les cellules sont récupérées, centrifugées 5 minutes à 1000g et reprises dans 10mL de milieu complet, comptées et réensemencées.

1.2- Traitements des L6C5

Une fois confluentes les cellules sont lavées deux fois avec du PBS, puis elles sont mises en présence d'un milieu DMEM dépourvu de SVF, ce qui permet de rendre les cellules quiescentes par arrêt de la prolifération cellulaire. Les cellules sont ensuite traitées pendant le temps nécessaire pour chaque expérience.

1.3- Evaluation de la différenciation

Les cellules L6C5 sont différenciées en ajoutant 10⁻⁷ M d'AVP dans le milieu DMEM dépourvu de SVF. La différenciation myogénique est évaluée 48 h après l'ajout de l'AVP, en étudiant les marqueurs précoces de la différenciation comme l'expression et l'accumulation nucléaire de la

myogénine, facteur de transcription spécifique du muscle. Son expression est déterminée par des expériences de Western-blotting, et son accumulation nucléaire est détectée par immunofluorescence.

Pour l'étude de l'atrophie musculaire, étant donné la durée des expériences, les cellules ont été différenciées 6 jours dans un milieu qui contient 1% de SVF en plus de l'AVP. L'état des myotubes et leur phénotype atrophique ont été évalués d'après des marqueurs tardifs de la différenciation, comme la mesure de l'activité créatine kinase, l'évaluation de l'expression de la myosine sarcomérique par immunofluorescence, Western Blotting ou ELISA, et par la mesure de leur surface.

2- Dosages enzymatiques

2.1- Dosage de l'activité de la PLD

La propriété de transphosphatidylolation de la PLD permet de réaliser une mesure sensible et hautement spécifique de son activité enzymatique (Morris et al., 1997). En présence d'un alcool primaire à chaîne courte comme le butan-1-ol, la PLD catalyse une réaction de transfert du groupe phosphatidyl sur le butanol pour produire de la choline et du phosphatidylbutanol aux dépens du PA. Le phosphatidylbutanol formé est un marqueur stable et sélectif de l'activité PLD dans les cellules intactes (Randall et al., 1990).

Après 24 h le milieu de culture contenant 10% SVF est remplacé par un milieu dépourvu de sérum pendant toute la nuit. Les cellules sont lavées avec du PBS et incubées pendant 2h, dans un milieu dépourvu de SVF, en présence de 2 μ Ci/mL de [³H]-acide palmitique. Elles sont ensuite traitées ou non par l'AVP en présence de 1% de 1-butanol. La rapamycine utilisée pour inhiber la voie mTOR est ajoutée au moment du changement de milieu. Les incubations sont stoppées par élimination rapide du milieu, lavage des cellules avec du PBS froid, et addition de 0,5 mL de HCl 0,1 N dans du PBS. Les cellules grattées sont transférées dans des tubes de verre. Avant l'extraction lipidique selon la technique de Bligh et Dyer (1959), de l'acide dipalmitoyl-phosphatidique marqué au [¹⁴C] (144mCi/mmmole) utilisé comme standard interne, et du phosphatidylbutanol (PBu) (1 μ g) ainsi que de l'acide phosphatidique (PA) (1 μ g), utilisés comme entraîneurs, sont rajoutés dans chaque tube.

Les lipides sont extraits dans un mélange de solvants (méthanol/chloroforme 2/1 v/v) contenant 50 μ M de buthylhydroxytoluène (BHT) utilisé comme antioxydant. Les tubes sont vortexés durant 30 secondes. Après 30 minutes à température ambiante, un mélange de PBS / chloroforme (1/1 v/v) est ajouté et les tubes sont vortexés pendant une minute. Les phases organique et aqueuse sont

séparées par centrifugation de 5 minutes à 2500 rpm. La phase organique est prélevée et évaporée à sec sous azote.

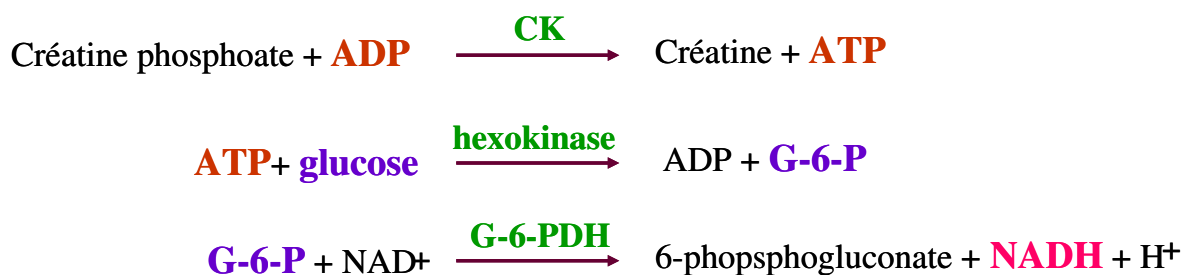
Les résidus secs sont repris par un mélange chloroforme/méthanol (2/1 v/v) et déposés sur plaque de silice. Le PBU et l'acide phosphatidique sont séparés des autres phospholipides par CCM bidimensionnelle. Le premier système de solvant est un mélange chloroforme/méthanol/ammoniaque aqueux 28% (65/35/5.5 v/v/v). Après séchage des plaques sous atmosphère réduite pendant 2h, un mélange de PBU/PA standards est déposé. La seconde migration s'effectue dans un mélange acétate d'éthyle/isooctane/acide acétique (90/50/20 v/v/v). Les plaques sont séchées et colorées au bleu de Coomassie à 0,03% dans une solution de NaCl 0,9% /méthanol 20% pendant 20 min, puis lavées par une solution de NaCl 0,9% /méthanol 20% pendant 10min. Chacun des spots d'intérêt est gratté puis sa radioactivité est mesurée par comptage en scintillation liquide dans un compteur Packard 1900TR. La quantité de PBU formé dans l'essai est exprimée en pourcentage de la radioactivité liée aux phospholipides totaux, et corrigée par le rendement de récupération de l'acide phosphatidique.

2.2- Dosage de l'activité de la CK

Ce dosage est effectué d'après les conditions de réactions optimales déterminées par Szasz et al., en 1976.

➤ *Principe*

Les réactions enzymatiques impliquées dans le dosage sont les suivantes :



La créatine kinase catalyse la réaction entre la créatine phosphate et l'adénosine diphosphate (ADP), formant la créatine et l'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP formé est utilisé pour phosphoryler le glucose, produisant le glucose-6-phosphate (G-6-P) en présence d'hexokinase (HK). Ensuite, le G-6-P est oxydé en 6-phosphogluconate (6-PG) en présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Cette réaction est catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-

PDH). Au cours de cette oxydation, une quantité équimolaire de NAD est réduite en NADH augmentant ainsi l'absorbance à 340 nm. La vitesse de variation de l'absorbance est directement proportionnelle à l'activité CK.

➤ *Mode opératoire*

Après la réalisation des traitements des myotubes, ils sont lavés au PBS, puis décollés par incubation dans du PBS contenant 1mM d'EDTA pendant 15 minutes à 37°C, et récupérés grâce à une centrifugation de 10 minutes à 2500 g. Les culots sont repris par 300 µL de tampon Tris 20mM, EDTA 1mM, pH 6,7, puis soniqués 5 secondes à 4°C afin d'obtenir une suspension homogène, puis centrifugés 15 minutes à 14000g.

Les surnageants sont récupérés et utilisés pour le dosage qui se fait sur une micro-plaque de 96 puits. Ce dernier se fait sur 4µL d'échantillon par puits en présence de 100 µL de milieu réactionnel (CK-NACLD B fourni par Sobioda) contenant 100 mmol/l de tampon imidazole, 10 mmol/l d'acétate de magnésium, 2 mmol/l d'ADP, 10 µmol/l de diadénosinepentaphosphate, 30 mmol/l de créatine phosphate, 41,7 µkat/l d'hexokinase, 20 mmol/l de D-glucose, 2 mmol/l d'EDTA, 5 mmol/l d'AMP, 20 mmol/l de N-acétylcystéine, 2 mmol/l de NADP, 25 µkat/l de G6P-DH. On suit la formation de NADH par spectrophotométrie, pour cela la quantification se fait pendant 15 minutes à 30°C par mesure de la vitesse de variation de l'absorption à 340 nm. L'appareil utilisé est un lecteur de plaque Powerwave-X (BIO-TEK INSTRUMENTS).

3- Mesure de l'expression protéique

3.1 - Western Blotting

3.1.1- Dosage protéique des échantillons, selon la méthode de Bradford

Le dosage est réalisé selon la méthode de Bradford adaptée par Pierce (1977) à l'aide d'un kit Bio-Rad Protein Assay. Le principe repose sur la fixation non covalente à la protéine du bleu de Coomassie brillant G250, qui déplace son maximum d'absorption de 465 nm à 595 nm. Un aliquot des échantillons à doser est prélevé et complété à 50µL avec de l'eau : on ajoute 200µL de la solution BioRad diluée cinq fois dans de l'eau. La densité optique est lue à 595 nm en microplaque de 96 puits à l'aide d'un lecteur spectrophotométrique de plaques multipuits Powerwave X. La quantité de protéines est déterminée par comparaison avec une gamme étalon d'albumine sérique bovine (0 à 10µg) réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons.

3.1.2- préparation des échantillons

Les cellules sont grattées dans un tampon de lyse avec 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM glycerophosphate, 50 mM NaF, 1,5 mM Na₃VO₄, 1% Triton, et le cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les lysat cellulaires sont incubés 15 min dans la glace, puis centrifugés à 13000 g pendant 15 min. Un aliquot de chaque fraction est alors dilué dans le tampon de Laemmli. Pour la PLD, on ajoute de l'urée 4M. Les échantillons sont portés à 100°C pendant 1 minute pour la PLD et 5 minutes pour les autres protéines, puis déposés sur le gel.

3.1.3- Préparation des gels

Les dépôts sont réalisés sur des minigels de polyacrylamide dont la concentration dépend de la taille des protéines à séparer, contenant du SDS 0,1%. La migration électrophorétique s'effectue grâce un appareil pour électrophorese pour minigel Biorad, à 60 V pendant 15 minutes, le temps que les protéines entrent dans le gel de séparation, et ensuite à 140 V voltage constant. La migration est suivie grâce au dépôt de marqueurs de masse moléculaire précolorés dans un puits de référence.

3.1.4- Electrotransfert

Les protéines séparées par migration sur gel sont transférées sur une membrane PVDF, le transfert se fait dans un appareil de transfert Biorad. Le transfert se déroule à 350 mA pendant une heure. Les marqueurs de masses moléculaires qui sont également transférés peuvent servir de contrôle.

3.1.5- Traitement des membranes

A l'issue du transfert, la membrane est rincée dans un tampon salin TBS-T (Tris HCl 20mM, NaCl 137mM pH 7,6 ; tween 20 à 0,1%). Les sites de liaisons non spécifiques de la membrane sont saturés par un bain dans le tampon de saturation adéquat : TBS-T /BSA 5 %, durant 2h à température ambiante. La membrane est ensuite incubée sous agitation à 4°C pendant la nuit avec l'anticorps primaire dilué à la concentration voulue.

La membrane est lavée soigneusement avec du TBS-T et incubée avec un anticorps secondaire anti IgG couplé à la peroxydase, pendant 1h à température ambiante. La membrane est à nouveau lavée abondamment, séchée rapidement sur du papier absorbant, incubée avec la solution de détection pour chimioluminescence du Kit ECL fourni par la société Pierce pendant 1 minute puis enveloppée dans un film transparent.

La révélation des protéines immunodétectées par l'anticorps se fait grâce à la peroxydase qui catalyse une réaction de chimioluminescence en présence d'eau oxygénée et de luminol. Les membranes sont révélées sur film d'autoradiographie.

3.1.6- Conditions spécifiques à chaque protéine détectée

➤ ***Myogénine (~36 KDa) :***

Le gel est à 12 %. L'anticorps monoclonal anti-myogénine est dilué à 1/50 dans du TBS-T/BSA 5 % et l'anticorps secondaire anti-IgG de souris est dilué au 1/10000.

➤ ***S6 kinase (70 et 85 KDa) :***

Le gel est à 10%. L'anticorps monoclonal anti-phospho S6 kinase est dilué à 1/1000 dans du TBST/BSA 5% et l'anticorps secondaire anti-IgG de souris est dilué au 1/10000. L'anticorps monoclonal anti-S6 kinase est dilué à 1/1000 dans du TBST/BSA 5% et l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin est dilué au 1/10000.

➤ ***Akt (60 KDa) :***

Le gel est à 10%. L'anticorps monoclonal anti-phospho Akt est dilué à 1/1000 dans du TBST/BSA 5% et l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin est dilué au 1/10000. L'anticorps monoclonal anti-Akt est dilué à 1/1000 dans du TBST/BSA 5% et l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin est dilué au 1/10000.

➤ ***PLD1 et PLD2 (~120 KDa et ~90 KDa respectivement) :***

Le gel est à 8% de polyacrylamide, 0,1% de SDS et 4M d'urée. Les deux isoformes de PLD sont détectées grâce à un anticorps anti-PLD1 ou anti-PLD2 (dilution 1/2000). L'anticorps anti-PLD1 est dirigé contre quatre peptides correspondant aux résidus 1-16, 144-162, 967-981, et 1027-1040, tandis que l'anticorps anti-PLD2 est dirigé contre une séquence d'acides aminés située en N-terminal, correspondant aux résidus 13-33. L'anticorps secondaire anti-lapin est ensuite utilisé (dilution 1/5000).

➤ ***Phospho-PKC α (82 kDa)***

Le gel est à 8%. L'anticorps monoclonal anti-phospho PKC α est dilué à 1/1000 dans du TBST/BSA 5% et l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin est dilué au 1/10000.

➤ **Myosine (250 kDa) :**

Le gel est à 6%. L'anticorps monoclonal anti-myosine est dilué à 1/200 dans du TBST/BSA 5% et l'anticorps secondaire anti-IgG de souris est dilué au 1/10000.

➤ **Rictor et raptor (200 et 130 KDa respectivement) :**

Le gel est à 6%. Les anticorps monoclonaux anti-phospho-rictor, anti-rictor et anti-raptor sont dilués à 1/1000 dans du TBST/BSA 5% et l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin est dilué au 1/10000.

3.1.7- Standardisation des signaux par rapport à la tubuline

Afin de standardiser les signaux ECL par rapport aux quantités de protéines déposées sur les gels, les membranes sont décapées des complexes anticorps primaires et secondaires puis révélées avec l'anticorps anti-tubuline. Le complexe antigène-anticorps est détaché avec une solution de "stripping" pendant 15 min à température ambiante sous agitation. Les membranes sont rincées trois fois dans du tampon TBS-T, puis un nouveau cycle de révélation avec l'anticorps anti-tubuline est réalisé après saturation de la membrane.

3.2- Immunofluorescence

3.2.1- La myogénine

Vingt-quatre heures après culture des cellules en présence ou en absence des agonistes appropriés, les cellules sont lavées dans du PBS et sont fixées par du formaldéhyde à 3,7% dans du PBS à température ambiante pendant 20 minutes. Les aldéhydes sont d'excellents fixateurs mais ils ne permettent pas souvent de perméabiliser suffisamment la membrane aux macromolécules. La perméabilisation doit donc être achevée par un traitement avec un détergent. Après trois rinçages au PBS afin d'éliminer le fixateur, les cellules sont incubées pendant 15 min avec 0,1% de triton dilué dans du PBS à température ambiante. Après lavage, les cellules sont mises en présence d'une solution de blocage constituée d'albumine sérique bovine à 1% dans du tampon PBS, pendant 20 minutes à température ambiante. Ensuite, on incube les cellules avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myogénine pendant la nuit à température ambiante. Enfin, les cellules sont lavées avec du PBS et mises en présence d'un anticorps secondaire couplé à la rhodamine ou à la fluorescéine, dilué à 1:200 dans une solution de PBS.

3.2.2- La myosine

6 jours après le début de la différenciation myogénique, les traitements appropriés sont effectués, puis les cellules sont lavées au PBS, fixées, perméabilisées et mises en présence d'une solution de blocage comme pour la myogénine. Ensuite, on incube les cellules avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myosine dilué à 1:200 dans le PBS 1% BSA, pendant une heure à température ambiante. Enfin, les cellules sont incubées une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la rhodamine, dilué à 1:1000 dans une solution de PBS.

4- Modulation de l'expression génique

4.1- Les ARNi

Ce sont des petits ARN qui interagissent avec les ARNm pour empêcher la synthèse de la protéine correspondante. Ils sont codés naturellement par le génome des mammifères afin de réguler l'expression des gènes, et sont alors appelés les micro-ARN. Le mécanisme par lequel agissent ces ARN interférents implique deux grandes étapes. Les molécules d'ARN sont d'abord transformées en petits fragments d'ARN double brin d'une vingtaine de nucléotides par une enzyme de la famille des RNase III, Dicer, puis l'un de ces brins est incorporé dans un complexe protéique RISC (RNA induced silencing complex) dans lequel il sert de guide pour la reconnaissance des séquences cibles. Si la complémentarité entre les ARNi et l'ARNm cible est parfaite, le complexe RISC clive l'ARNm cible qui est alors dégradé et n'est plus traduit en protéine.

Nous avons utilisé cette méthode pour inhiber l'expression des gènes rictor et raptor, ce qui nous permet de distinguer entre les rôles de mTORC1 et mTORC2 dans la différenciation myogénique. Nous l'avons également utilisée pour inhiber l'expression des gènes PLD1 et PLD2 et PRKCA (PKC α) pour évaluer leurs effets sur la différenciation myogénique.

Les séquences d'ARN interférents utilisés sont :

Pour PLD1 : 5'-AAGTTAAGAGGAAATTCAAGC-3'

Pour PLD2 : 5'-GACACAAAGTCTTGATGAG-3'

Pour raptor : 5'-GACAGTGGGCCTCTCAGGA-3'

Pour rictor : 5'-GTTTCGTTCCGACACTATAA-3'

Pour PKC α : 5'-GAAGCAAGCACAAGTTCAA-3'

Les cellules sont transfectées avec les ARN interférents à l'aide de Hiperfect Transfection Reagent (Qiagen), mélange de lipides neutres et cationiques, selon le protocole fourni par le fabricant.

Brièvement une solution de ARNi à 50 nM est incubée en présence de transfectant pendant 15 min à température ambiante, afin de permettre la formation de micelles contenant les ARNi.

Ce mélange est ensuite ajouté au milieu de culture des cellules. 24h plus tard le milieu de culture est changé. Le degré d'inhibition de l'expression de raptor, rictor, et PKC α est déterminé par Western blotting, celui de PLD1 et PLD2 par dosage d'ARNm par PCR quantitative.

4.2- Les adénovirus

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire sans enveloppe, à capsid icosahédrique d'un diamètre de 70 à 90 nm. On dénombre environ 50 sérotypes différents regroupés en 6 groupes distincts (de A à F) dans les souches humaines d'adénovirus. Les sérotypes 2 et 5 appartenant au groupe C sont les plus étudiés dans le cadre de la recherche en thérapie génique. Dans cette étude nous avons utilisé des adénovirus issu du sérotype 5. L'effet cytopathogène se manifeste par une rétraction des cellules donnant à la nappe cellulaire un aspect en dentelle. Ils sont capables d'infecter efficacement des cellules en division lente ou différenciées. Les virus se fixent à la surface de la cellule hôte et sont endocytés. La capsid se désintègre libérant l'ADN qui pénètre ensuite dans le noyau. Le taux d'infection est de l'ordre de 100%.

Seinsenberger et al. ont montré en utilisant des adénovirus couplés par liaison covalente à différents marqueurs fluorescents qu'au moins 50% d'entre eux sont détectés dans le noyau quinze minutes après l'entrée des virus.

L'expression des gènes adénoviraux s'effectue en trois phases : pré-précoce, précoce et tardive. Le gène E1A est immédiatement transcrit pendant la phase pré-précoce. Ce gène est indispensable à la réplication car il code pour deux protéines régulatrices qui activent la transcription des gènes précoces. Les protéines précoces E pour « Early » jouent un rôle important pour la synthèse de l'ADN viral et la synthèse de particules infectieuses. Les ADN viraux ainsi produit servent ensuite de matrice pour la transcription d'ARNm qui sont traduits par les ribosomes en protéines de structure permettant l'assemblage de nouvelles particules virales dans le noyau (phase tardive). Les virus seront ensuite libérés par lyse de la cellule.

4.2.1- Construction d'adénovirus recombinant codant pour hPLD1 et hPLD2

Pour ce faire nous disposons de plasmides pcDNA3 contenant les séquences codant pour PLD1 ou PLD2, bordées en amont par le promoteur CMV, et en aval part la queue BGHpolyA, et d'un autre type de plasmide codant pour le génome adénoviral et pour la moitié du promoteur CMV et la queue BGH poly A, ce qui permettait des recombinaisons homologues entre les deux plasmides.

Après recombinaison homologue, le plasmide résultant contiendra des séquences du génome adénoviral et la séquence codant pour PLD1 ou PLD2. Par contre, le génome adénoviral ne contient pas les séquences codant pour les protéines précoces E1, et E3. Les virus E1-moins résultants sont incapables de se répliquer. La délétion de E3 permet quant à elle d'insérer des séquences plus grandes. Ainsi les cellules infectées, si elles ne possèdent pas ces séquences dans leur génome, ne produiront pas de nouvelles particules virales.

Dans un premier temps le plasmide pcDNA3 est digéré par SaII, ce qui permet d'ôter les séquences codant pour la protéine de résistance à l'ampicilline et l'origine de répllication colE1. L'enzyme SaII est ensuite inactivée 20 min à 65°C. D'autre part, on linéarise le plasmide codant pour le génome adénoviral VmAdcDNA3 en le digérant avec SmaI. Nous avons ensuite utilisé ces vecteurs digérés pour transformer une souche de bactéries E. coli BJ5183, connue pour favoriser les recombinaisons homologues.

100µl de bactéries compétentes fraîchement décongelées sont transformées :

Soit avec 200 ng de V4 et 600 ng de pcDNA3-hPLD1

Soit avec 500 ng de V4 et 600ng de pcDNA3-hPLD2

Deux contrôles négatifs, transformés uniquement par V4 ou uniquement par pcDNA3, sont réalisés.

4.2.2- Transformation des bactéries

Les bactéries compétentes sont incubées 20 min dans la glace avant de subir un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. Elles sont ensuite de nouveau placées dans la glace. On leur ajoute alors 1 ml de milieu BL et la culture est placée à 37°C pendant 1h. Après centrifugation, le culot de bactérie est repris dans 100µl de milieu BL, puis étalé sur boîte de Petri GL, contenant de l'ampicilline. Les bactéries non transformées par le virusmide recombinant ne poussent pas, la séquence de résistance à l'ampicilline étant apportée par VmAdcDNA3. Seules les bactéries ayant intégré le virusmide pourront se développer.

4.2.3- Vérification des clones pour lesquels la recombinaison a eu lieu

Cette vérification s'effectue par PCR en utilisant une amorce spécifique du promoteur CMV présente dans la séquence de pcDNA3, mais pas dans la séquence du génome adénoviral. En présence du virusmide recombinant qui possèdent les régions reconnues par les deux amorces, un amplicon de 722 pb est attendu.

Pour ce faire, on met 100µl d'eau stérile dans un tube Eppendorf, puis on ajoute directement un peu de bactéries, et on fait bouillir 10 min à 100°C. On refroidit les échantillons dans la glace, puis

on les centrifuge 10 min à 4°C, à 7000 rpm. Dans un volume final de 40 µl, on incube 5µl de cette suspension bactérienne bouillie en présence de 4µl de tampon PCR 10X, de 1,2µl de MgCl₂ 50mM, de 0,4 µl de chaque dNTP à 5 mM, de 4 µl de chaque amorce à 10µM, de 21,2 µl d'eau et de 0,2 µl de Taq polymérase 5 U/ml. Les conditions d'amplification programmées sur le thermocycleur sont : 95°C pendant 1 min, 54°C pendant 2 min et 72°C pendant 1 min, pendant 32 cycles. Le milieu de réaction est conservé à 4°C. 4-6µl de cette réaction de PCR sont ensuite analysés sur un gel d'agarose. On utilise comme contrôle négatif le virusmide linéarisé et comme contrôle positif, un virusmide recombinant issu d'une autre expérimentation.

4.2.4- Electrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Le gel est préparé extemporanément en diluant 1g d'agarose dans 100 ml de tampon TBE (Tris-borate 90mM, pH8, EDTA 1mM). La solution est portée à l'ébullition, puis refroidie avant ajout de 5 µl d'une solution de bromure d'éthidium (BET) 5mg/ml. La solution encore tiède est coulée dans la cuve de migration horizontale, et après refroidissement le gel polymérise. Il est immergé dans le tampon de migration. Les échantillons sont déposés sur le gel en présence de 0,05% de bleu de bromophénol, 0,05% de xylène cyanol et 6% de glycérol. La migration est réalisée à ampérage constant (50mA). Le gel est photographié sous lumière UV à l'aide d'une caméra CCD (image Master VDS-CL, Amersham Biotech).

4.2.5- Amplification et purification des plasmides recombinants

Les plasmides recombinants sont ensuite amplifiés et purifiés. Les bactéries transformées sont mises en culture dans 500 ml de milieu BL. Après centrifugation, elles sont lysées en conditions alcalines et l'ADN plasmidique est extrait grâce à une résine échangeuse d'anions (Maxikit deQiagen). Après élution, l'ADN est précipité grâce à l'isopropanol. Après centrifugation, le culot d'ADN est rincé grâce à une solution d'éthanol à 75%, et le culot est ensuite repris dans de l'eau stérile. Cette méthode permet d'obtenir des solutions d'ADN suffisamment concentrées.

4.2.6- Obtention et amplification des adénovirus codant pour PLD1 et PLD2

L'obtention et l'amplification des adénovirus ont été réalisées grâce à une lignée cellulaire complémentaire des constructions virales, les cellules HEK 293. En effet, ces cellules expriment les protéines précoces E1 et E3, ce qui rend possible l'amplification virale.

Au préalable, on digère le virusmide recombinant avec PacI, afin d'oter les séquences codant pour l'origine de répllication bactérienne et pour une protéine de résistance à l'ampicilline, et afin de laisser

les séquences ITR (Internal Terminal Repeat) libres, ce qui permettra la synthèse des particules virales. Après avoir vérifié que le virusmide a été linéarisé sur un gel d'agarose en utilisant 10µl d'un mélange de digestion, on transfecte les cellules HEK 293 grâce à la méthode au phosphate de calcium.

4.2.7- Transfection des cellules HEK 293

Les HEK sont transfectées avec les virusmides; deux contrôles de transfection sont réalisés : un contrôle sans ADN, et un contrôle avec le virusmide codant pour la GFP non coupé par PacI. Au bout de 7 jours de transfection, lorsque l'effet cytopathique sur les cellules est d'environ 90% (40-48 heures), les cellules sont récoltées dans un tube Falcon de 50 ml, et centrifugées à 1000 rpm pendant 10 min, le surnageant est éliminé et le culot de cellules est resuspendu dans 500 µl de PBS-glycérol 10%. Les cellules sont ensuite soumises à quatre ou cinq cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide et à 37°C. Les cellules sont ainsi lysées et les virus sont libérés. On centrifuge ensuite à 3000 rpm pendant 30 min. Le surnageant contenant les adénovirus est récupéré et stocké à -20°C.

4.2.8- Amplification

On utilise 5 boîtes de 10 cm. Les cellules HEK293 sont infectées à pratiquement 100% de confluence. Lorsque l'effet cytopathique des cellules est d'environ 90% (40-48 heures), les adénovirus sont récoltés comme décrit plus haut

4.2.9- Titration

La titration de la solution adénovirale consiste à déterminer le titre infectieux de la solution, c'est-à-dire, la concentration de la solution en adénovirus capables d'infecter une cellule.

La titration est réalisée sur des cellules HEK 293,ensemencées en plaques 12 puits. Les cellules sont infectées par des dilutions croissantes de la solution mère d'adénovirus (10^{-2} à 10^{-8}). 48h après l'infection, il s'agit de dénombrer les cellules infectées pour calculer un nombre d'unités infectieuses par millilitre de solution mère adénovirale (IU/mL). Les cellules infectées avec un adénovirus permettant l'expression de la GFP sont comptées directement grâce à un microscope inversé à fluorescence (Axiovert, Zeiss).

Pour les adénovirus n'exprimant pas la GFP (PLD1, PLD2), la titration est réalisée grâce au kit QuickTiter Adenovirus Titer Immunoassay commercialisé par Cell Biolabs, Inc (San Diego, CA, USA). Le principe de ce kit repose sur un marquage immunocytochimique des cellules infectées

grâce à un anticorps dirigé contre une protéine des hexons constituant l'adénovirus. Cet anticorps reconnaît les 41 sérotypes humains d'adénovirus. Après immunomarquage, les cellules sont comptées sous microscope inversé à lumière blanche. Le titre d'une solution obtenue par la méthode ci-dessus varie entre 10^{10} et 5.10^{12} IU/mL.

5- Mesure de l'expression génique

5.1- Transcription inverse et PCR en temps réel

L'extraction des ARN totaux à partir des cellules est réalisée à l'aide de Trizol Reagent (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. Les ARN sont ensuite dosés avec le Nanodrop.

La transcription inverse (RT) est réalisée avec $1\mu\text{g}$ d'ARN totaux, en présence de 100 U de transcriptase Superscript II (Invitrogen) en utilisant des hexamères oligonucléotidiques non spécifiques, et un mélange dNTP. Les ARNm sont ensuite quantifiés par PCR en temps réel, en utilisant des amorces spécifiques des ADNc étudiés.

La PCR quantitative est réalisée sur $5\mu\text{l}$ du produit de RT dilué au $1/60^{\text{ème}}$ mélangé avec $15\mu\text{l}$ de milieu réactionnel AbsoluteTM QPCR SYBR Green Mix (ABgene, courtaboeuf, France) à l'aide d'un Rotor-gene 6000TM.

6- Fixation du PA sur la S6 kinase

La protéine S6 kinase est surexprimée par transfection de pMT2-S6K1 dans les L6. Les cellules sont grattées dans un tampon sans détergent, le lysat cellulaire est soniqué pendant 3 sec avec Branson Sonifer Probe, et le surnageant est récupéré après une centrifugation de 13000 g pendant 15 min. La fixation du PA sur la S6 kinase est ensuite estimée par une technique de type ELISA.

On a "coaté" les puits d'une plaque 96 puits avec de l'acide phosphatidique du jaune d'œuf (25 à $400\mu\text{g}$ /puits) toute la nuit à température ambiante, ensuite les sites aspécifiques sont bloqués par une solution de BSA 3% dans le PBS pendant 90 min. Les lysats cellulaires sont ensuite déposés dans les puits et incubés pendant une heure à température ambiante. La détection de la fixation de S6 kinase sur le PA se fait en utilisant un anticorps anti S6 kinase, puis un anticorps secondaire couplé à HRP. L'HRP fixée est révélée avec $100\mu\text{l}$ de solution de tétraméthylbenzidine (TMB, Sigma). La densité optique est ensuite mesurée à 450 nm.

Une deuxième technique a été utilisée pour évaluer la fixation de l'acide phosphatidique sur la S6 kinase, à l'aide de PA marqué au [¹⁴C]. Le lysat cellulaire est incubé avec 100µM d'acide phosphatidique radiomarqué et l'anticorps anti S6 kinase, pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite incubé avec la Protein A-Sepharose pendant 3 heures. La radioactivité du culot et du surnageant est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation.

CHAPITRE 6

RESULTATS

1- PLD, mTOR, et différenciation myogénique

1.1- La voie mTORC1 est activée lors de la différenciation des L6

Il a été montré que l'hormone neuro-hypophysaire arg8-vasopressine (AVP) est un puissant inducteur de la différenciation myogénique. L'activation de la voie mTORC1 après stimulation par l'AVP des myoblastes de rat L6, en absence de sérum, a été mise en évidence en évaluant, par Western blotting, la phosphorylation de son substrat S6 kinase 1. Nous observons que l'AVP stimule la phosphorylation des deux isoformes de S6 kinase 1, p70 et p85, au niveau de T389 et T412 respectivement, la réponse de l'isoforme longue étant plus rapide que celle de l'isoforme courte (*Figure 24*). Ceci suggère une implication de la voie mTOR dans la différenciation myogénique stimulée par l'AVP.

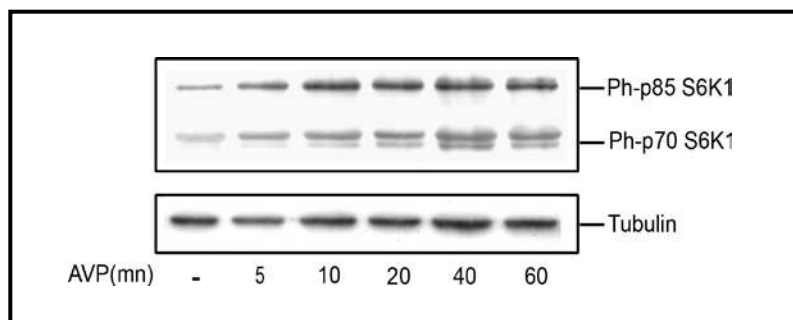


Figure 24 Effet de l'AVP sur la phosphorylation de S6 kinase 1: Les cellules sont traitées par l'AVP pendant les temps indiqués. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting, avec un anticorps monoclonal anti-phospho S6 kinase. Les bandes sont normalisées avec la tubuline.

Pour confirmer l'implication de la voie mTOR dans notre système, raptor, un des composants principaux du complexe mTORC1, et rictor, un des composants principaux du complexe mTORC2, ont été downrégulés en utilisant des ARNi spécifiques. Dans un premier temps, on a vérifié la diminution d'expression des deux protéines cibles par Western blotting (*Figure 25*). Une extinction complète de l'expression de raptor, et une diminution de plus de 70% de l'expression de rictor ont été observées, sous l'effet de l'ARNi correspondant. La downrégulation de raptor, et non pas de rictor, inhibe la phosphorylation des deux isoformes de S6 kinase induite par l'AVP (*Figure 25*). Ceci permet de vérifier que l'activation de S6 kinase par l'AVP est bien mTORC1-dépendante.

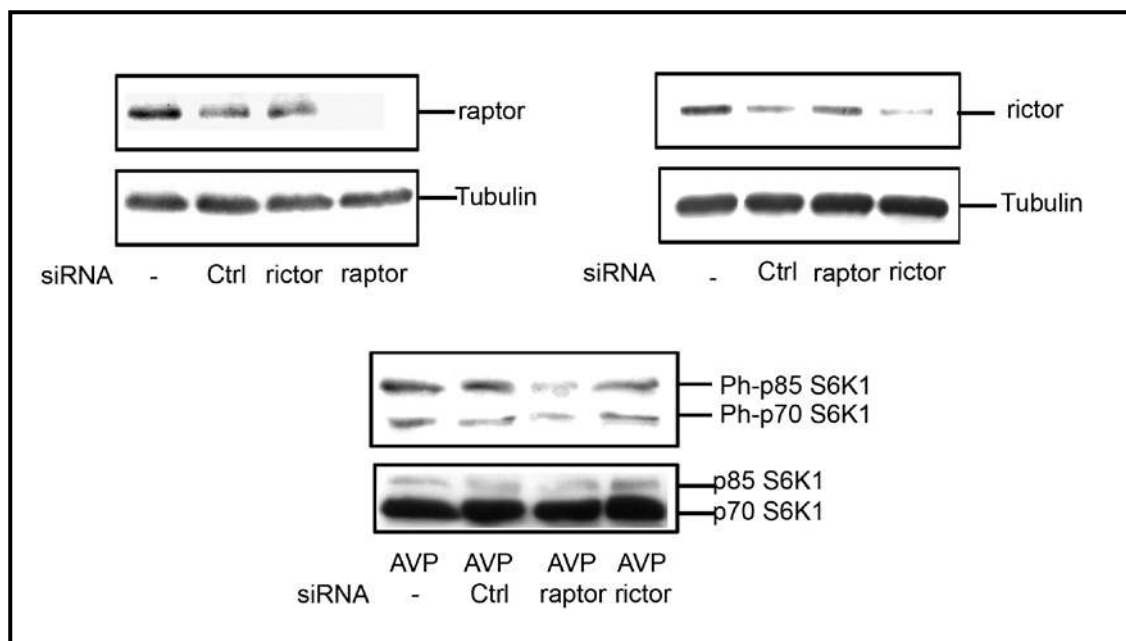


Figure 25 Effet de la downrégulation de raptor et rictor sur la phosphorylation de S6 kinase 1: Les cellules sont transfectées pendant 48h avec des ARNi anti-raptor ou anti-rictor, puis traitées ou non pendant 40 min avec l'AVP. Elles sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho S6 kinase 1, ou anti-raptor ou anti-rictor. Les bandes sont normalisées avec la tubuline pour raptor et rictor, et avec la forme totale de S6 kinase en ce qui concerne les formes phosphorylées de S6 kinase.

1.2- L'activation de la voie mTORC1 est PLD-dépendante

Il a été rapporté que l'AVP déclenche précocément l'activation des voies de la PIP2-phospholipase C (PLC) et de la phospholipase D (PLD) dans les myoblastes L6. De manière intéressante, la réponse myogénique peut intervenir pour des concentrations nanomolaires d'AVP, auxquelles seule la PLD, et non la PLC, est activée (Naro et al, 1996). Le rôle activateur de la PLD sur mTOR étant connu dans certains modèles, ceci suggérait que l'activation de la voie mTOR pourrait être dépendante de la PLD dans les L6 en différenciation. Pour répondre à cette question, on a inhibé la PLD par un alcool primaire (butanol-1) qui empêche la formation de PA. Comme contrôle pour les éventuels effets aspécifiques de l'alcool, on a utilisé le butanol-2 qui n'est pas un substrat utilisé par la PLD. L'inhibition de la formation de PA par la PLD inhibe fortement la phosphorylation des deux isoformes de S6 kinase induite par l'AVP, ce qui permet de dire que la PLD est impliquée dans la stimulation de la voie mTOR (Figure 26).

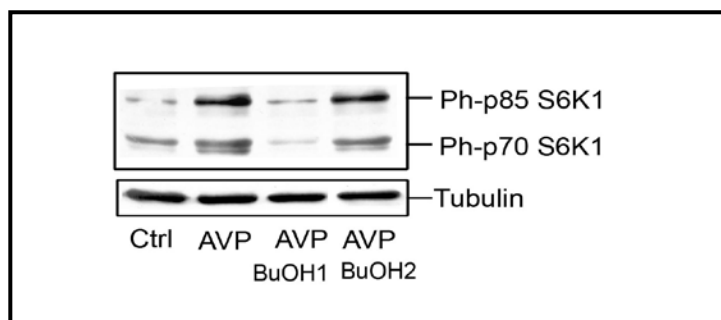


Figure 26 Effet du butanol sur la phosphorylation de S6 kinase 1 stimulée par l'AVP : Les cellules ont été prétraitées ou non pendant 40 min avec du butanol-1 ou butanol-2 1%, et stimulées ou non pendant 40 min par l'AVP. Elles sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho S6 kinase. Les bandes sont normalisées avec la tubuline.

Ces résultats ont été confirmés en utilisant des produits qui miment l'activité de la PLD, comme l'acide phosphatidique exogène, et le propranolol, qui est inhibiteur de l'acide phosphatidique phosphatase et induit une accumulation de l'acide phosphatidique endogène. Ces produits produisent une activation de la voie mTOR en absence de stimulation par l'AVP (Figure 27) ce qui confirme le rôle de la PLD dans l'activation du complexe mTORC1.

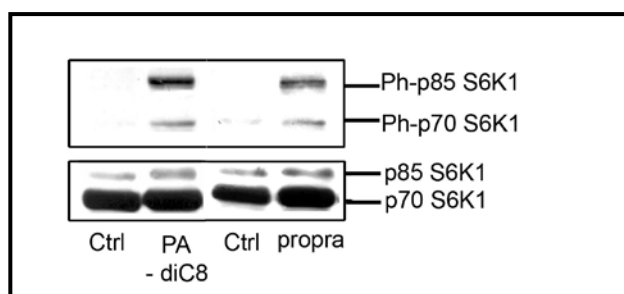


Figure 27 Effet du PA et du propranolol sur la phosphorylation de S6 kinase 1: Les cellules ont été traitées ou non pendant 40 min avec de l'acide phosphatidique diC8, ou du propranolol. Elles sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho S6 kinase 1. Les bandes sont normalisées avec la forme totale de S6 kinase.

Pour déterminer l'isoforme de la PLD impliquée dans l'activation de la voie mTOR, on a eu recours à deux techniques, l'interférence de l'ARN, et l'infection par des vecteurs adénoviraux, pour downréguler ou surexprimer spécifiquement chacune des deux isoformes de la PLD. Dans un premier temps on a vérifié l'extinction de chaque isoforme, PLD1 et PLD2, sous l'effet des ARNi correspondants, en mesurant la quantité d'ARNm spécifique par PCR quantitative (Figure 28 A). La surexpression des deux isoformes a été vérifiée par Western blotting, avec des anticorps spécifiques de chaque isoforme (Figure 28 B). L'effet de la surexpression ou de la downrégulation des PLD sur la

phosphorylation des deux isoformes de S6 kinase 1 stimulée par l'AVP a été ensuite évalué (Figure 28 C). Dans les deux conditions, les résultats montrent que l'isoforme 1 de PLD régule la phosphorylation de S6 kinase: la surexpression de PLD1 active la phosphorylation de p70 et p85; la déplétion en PLD1 l'inhibe. Les variations de PLD2 ont peu ou pas d'effet.

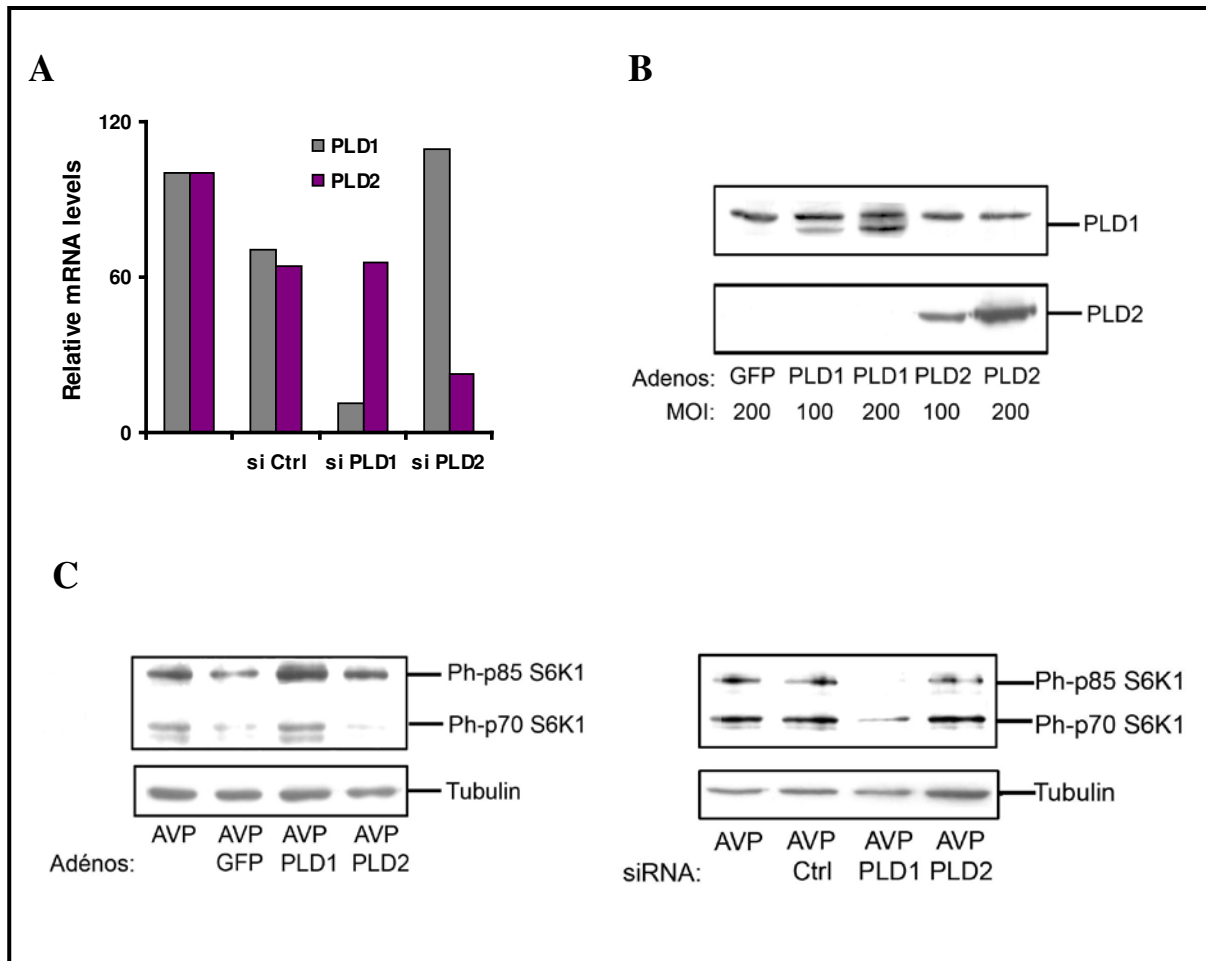


Figure 28 Effet de la downrégulation et de la surexpression des deux isoformes de PLD sur la phosphorylation de S6 kinase 1: **A)** Les cellules ont été transfectées pendant 48h avec des ARNi anti-PLD1 ou anti-PLD2; les ARN totaux ont été récupérés et l'expression des gènes PLD1 et PLD2 a été étudiée par RT-qPCR. **B)** Les cellules sont infectées avec des adénovirus codant pour la GFP, PLD1 ou PLD2, elles sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps polyclonal anti-PLD1 ou anti-PLD2. **C)** Les cellules sont infectées avec des adénovirus codant pour la GFP, PLD1 ou PLD2, ou transfectées par des ARNi anti-PLD1 ou anti-PLD2. Elles sont ensuite stimulées 40 min par l'AVP, puis lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho S6 kinase. La normalisation a été effectuées par rapport à la tubuline.

1.3- Régulation différentielle des deux isoformes de S6 kinase 1

On a remarqué dans toutes les expériences précédentes que l'isoforme p85 S6 kinase est plus sensible à la régulation par la PLD et le taux de PA que l'isoforme p70 S6 kinase. De plus, la cinétique d'activation des deux isoformes de S6 kinase est différente: la phosphorylation de p85 atteint un maximum au bout de 10 min de traitement par l'AVP, alors que p70 S6 kinase atteint un maximum au bout de 40 min de traitement (*Figure 24*), ce qui suppose une régulation différentielle des deux isoformes.

Des études ont montré que mTOR peut être directement activé par fixation de l'acide phosphatidique sur son site FRB. On s'est demandé si la PLD et l'acide phosphatidique activent S6 kinase 1 d'une façon mTORC1-dépendante, et pour répondre à cette question, les cellules ont été traitées avec de la rapamycine pendant 40 min pour inhiber l'activité mTORC1. Ce traitement inhibe complètement la phosphorylation de p70 S6 kinase induite par l'AVP ou le propranolol, ce qui permet de dire qu'elle est complètement mTORC1-dépendante (*Figure 29 ; Figure 30*). Par contre, la phosphorylation de l'isoforme p85 S6 kinase est incomplètement inhibée (*Figure 29 ; Figure 30*), ce qui montre qu'elle n'est que partiellement dépendante de l'activité du complexe mTORC1, et nous a suggéré que cette isoforme pourrait être directement activée par l'acide phosphatidique d'une façon qui court-circuite mTORC1.

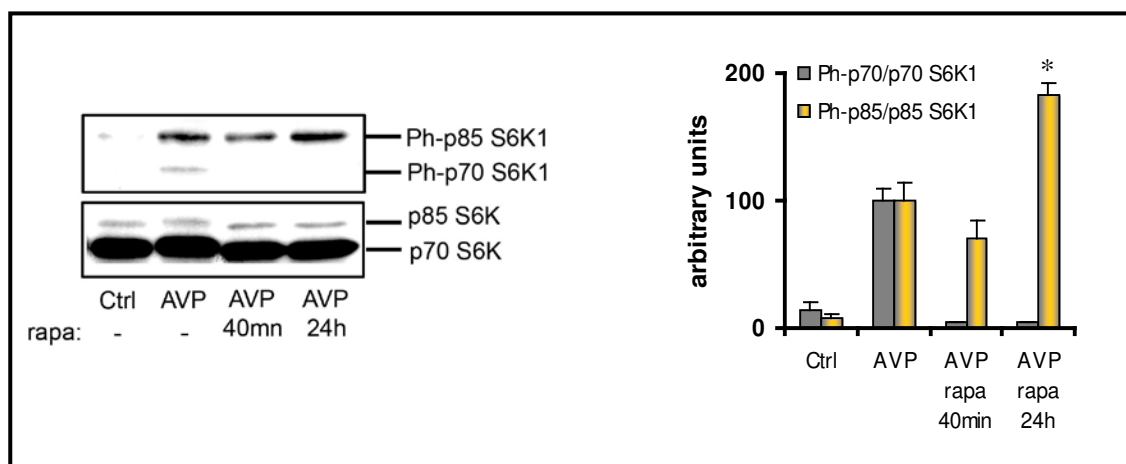


Figure 29 Effet de l'inhibition de mTORC1 et mTORC2 par la rapamycine sur la phosphorylation de S6 kinase stimulée par l'AVP. Les cellules sont traitées par la rapamycine 40 min (pour inhiber mTORC1) ou 24 h (pour inhiber les deux complexes), puis stimulées 40 min par l'AVP. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho S6 kinase. Les bandes sont quantifiées par vidéodensitométrie et les résultats sont exprimés en unité arbitraire après normalisation avec la forme totale de S6 kinase. Ils représentent la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. * différent du contrôle AVP, $p < 0,05$.

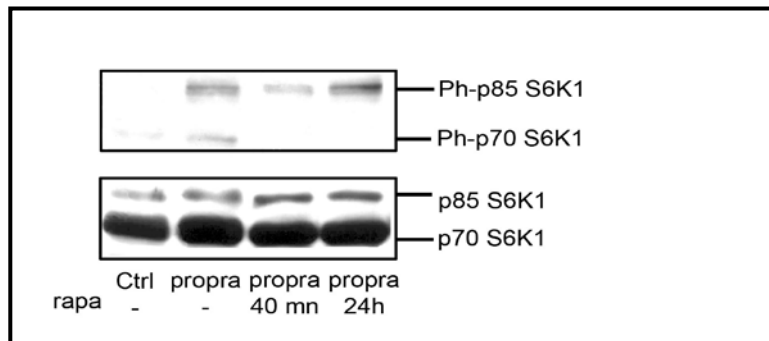


Figure 30 Effet de l'inhibition de *mTORC1* et *mTORC2* par la rapamycine sur la phosphorylation de S6 kinase stimulée par le propranolol. . Les cellules sont traitées par la rapamycine 40 min (pour inhiber *mTORC1*) ou 24 h (pour inhiber les deux complexes), puis stimulées 40 min par le propranolol. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho S6 kinase. Les bandes normalisées avec la forme totale de S6 kinase.

Pour tester cette hypothèse, on a évalué la fixation de PA sur la S6 kinase 1 par deux techniques différentes: par ELISA, et par immunoprécipitation de S6 kinase en présence de PA radiomarqué. Ces deux expériences ont montré une fixation spécifique de l'acide phosphatidique sur S6 kinase, donc la possibilité d'une régulation directe par le PA (Figure 31).

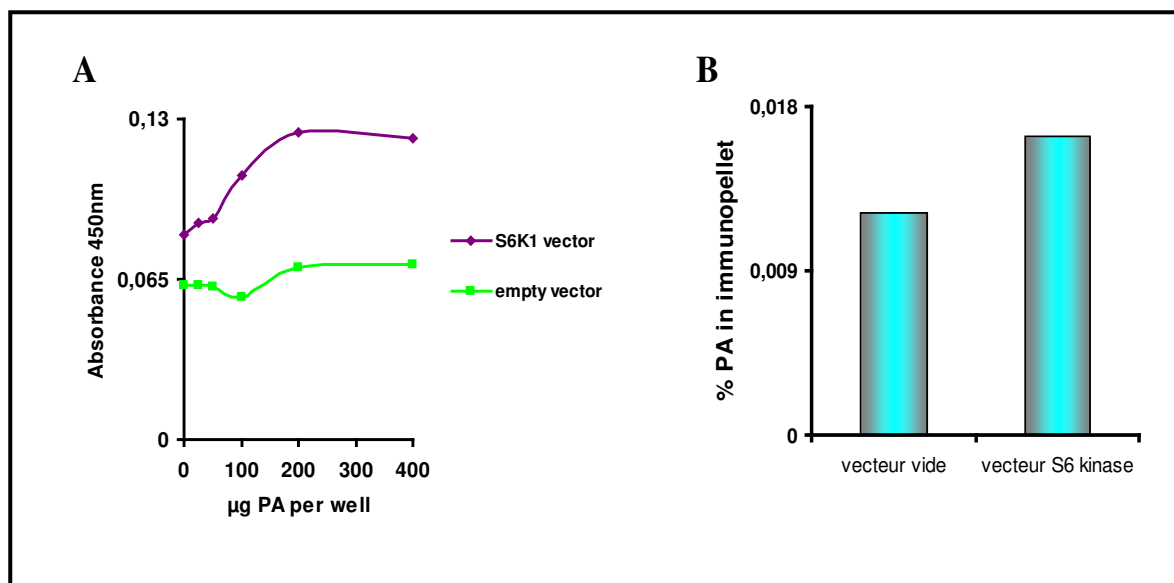


Figure 31 Fixation directe du PA sur S6 kinase : **A)** Différentes concentrations de PA de jaune d'œuf ont été immobilisées sur une plaque 96 puits. Des cellules ont été transfectées avec le vecteur pMT2 vide ou le vecteur exprimant S6 kinase, puis les extraits cellulaires ont été déposés sur le PA immobilisé, et incubés pendant 2 h. La S6 kinase immobilisée a été détectée en utilisant un premier anticorps anti-S6 kinase, et un second anticorps couplé à la peroxydase, comme décrit dans la partie "Matériels et Méthodes". Les résultats montrés sont la moyenne de deux expériences indépendantes. **B)** 100 µM de [¹⁴C] PA sont incubés pendant 2h avec des extrait de cellules transfectées avec le vecteur pMT2 vide ou le vecteur surexprimant S6 kinase. Le complexe PA/S6 kinase est immunoprécipité en utilisant un anticorps anti-S6 kinase comme décrit dans "Matériels et Méthodes". Les résultats montrés sont la moyenne de deux expériences indépendantes, donnant des résultats similaires

1.4- La voie mTORC2 est activée lors de la différenciation des L6

Pour savoir si le complexe mTORC2 est activé dans notre système, on a évalué par Western blotting la phosphorylation de Akt au niveau de Ser 473, site cible de mTORC2. La cinétique de la phosphorylation d'Akt stimulée par AVP montre une augmentation rapide qui atteint un maximum au bout de 6-7 min (Figure 32).

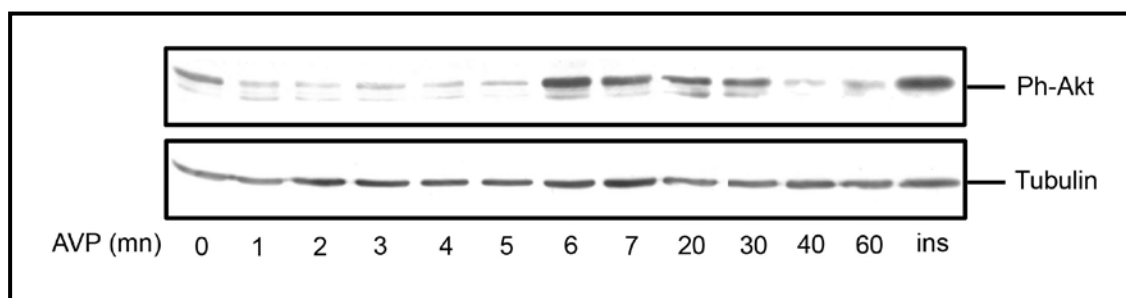


Figure 32 Effet de l'AVP sur la phosphorylation de Akt : Les cellules sont traitées pendant les temps indiqués avec AVP. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho-S473Akt. Les bandes sont normalisées avec la tubuline. Pour comparaison, l'effet d'un traitement de 20 min par l'insuline est montré.

Il est connu que la phosphorylation de Akt au niveau de Ser 473 est dépendante de l'activation du complexe mTORC2. Pour vérifier ce point, on a downrégulé raptor et rictor, les composants respectifs de mTORC1 et mTORC2, en utilisant des ARNi spécifiques de chacune de ces protéines. La suppression de rictor inhibe la phosphorylation de Akt induite par l'AVP, alors que la suppression de raptor n'a pas d'effet (Figure 33). Ceci permet de dire que cette phosphorylation est dépendante de mTORC2 et indépendante de mTORC1.

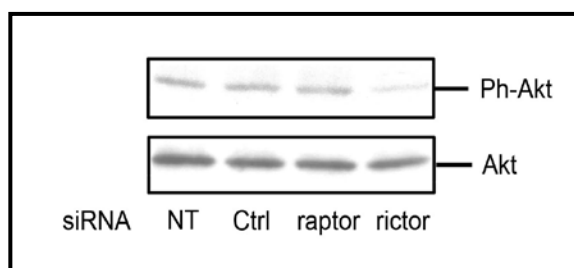


Figure 33 Effet de la downrégulation de raptor et rictor sur la phosphorylation de Akt : Les cellules sont transfectées pendant 48h avec l'ARNi anti-raptor ou anti-rictor. Les cellules sont traitées pendant 7 min avec l'AVP, elles sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho Akt. Les bandes sont normalisées avec la forme totale de Akt.

Un traitement de 24h par la rapamycine, qui permet d'inhiber, en plus de mTORC1, le complexe mTORC2, inhibe la phosphorylation de Akt induite par l'AVP ou le propranolol (Figure 34). Ceci confirme que la phosphorylation de Akt induite par l'AVP ou le propranolol est mTORC2 dépendante.

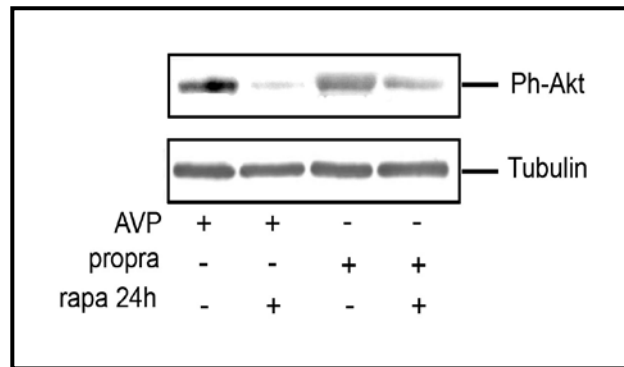


Figure 34 Effet de rapamycine-24 h sur la phosphorylation de Akt induite par l'AVP ou le propranolol: Les cellules sont prétraitées avec de la rapamycine pendant 24h avant d'être traitées pendant 7 min avec de l'AVP, ou pendant 20 min avec du propranolol. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho Akt. Les bandes sont normalisées avec la tubuline.

1.5- L'activation de la voie mTORC2 est PLD-dépendante

Le PA exogène, ainsi que le propranolol, stimulent la phosphorylation de Akt au niveau de la sérine 473 en absence d'AVP (Figure 35). Il est donc probable que l'activation de Akt par l'AVP mette en jeu la PLD.

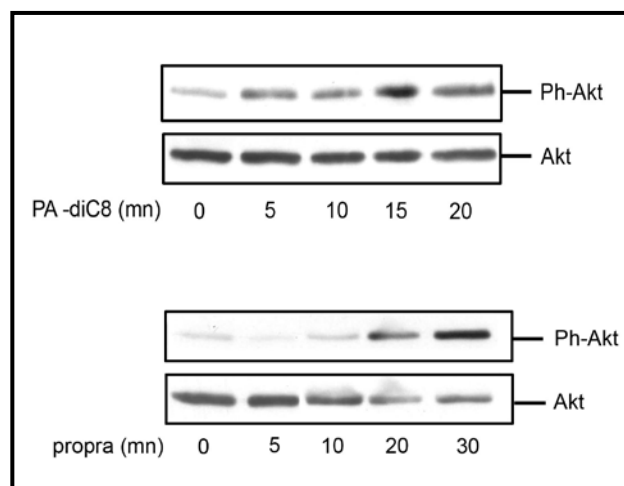


Figure 35 Effet du PA et du propranolol sur la phosphorylation de Akt : Les cellules sont traitées pendant les temps indiqués avec le PA diC8 ou le propranolol. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho Akt. Les bandes sont normalisées avec la forme totale d'Akt.

L'implication de la PLD a été confirmée en étudiant l'effet de sa surexpression et de sa downrégulation sur la phosphorylation de Akt. D'une part, la surexpression de l'isoforme PLD1 induit une augmentation de la phosphorylation de Akt stimulée par l'AVP, alors que la surexpression de l'isoforme PLD2 a peu d'effet (*Figure 36 A*). D'autre part, des expériences de downrégulation par des ARNi spécifiques de PLD1 ou de PLD2 confirment le rôle prépondérant de PLD1: la suppression de l'isoforme PLD1 inhibe fortement la phosphorylation de Akt induite par l'AVP, alors que la suppression de l'isoforme PLD2 a moins d'effet (*Figure 36 B*).

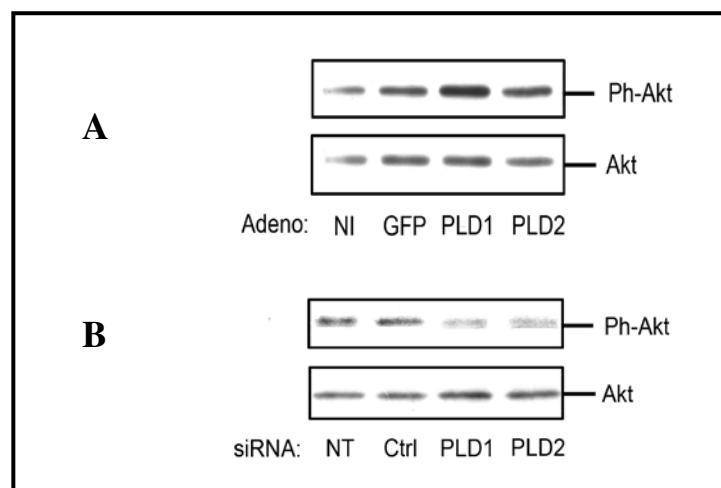


Figure 36 Effet de la surexpression ou de la downrégulation de la PLD sur la phosphorylation de Akt. **A)** Les cellules sont infectées avec des adénovirus codant pour la GFP, PLD1 ou PLD2. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho Akt. La normalisation a été effectuée par rapport à la forme totale d'Akt. **B)** Les cellules sont transfectées par des ARNi anti PLD1 ou anti PLD2, ou ARNi contrôle qui ne reconnaît aucune séquence du génome. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho Akt. La normalisation a été effectuée par rapport à la forme totale d'Akt. Dans ces expériences les cellules ont été traitées par l'AVP pendant 7 min avant d'être lysées.

Comme les résultats ci-dessus montrent que l'AVP induit une activation de mTORC2, on a recherché l'effet d'un traitement prolongé par la rapamycine, qui inhibe ce complexe, sur la phosphorylation de S6 kinase 1. Comme décrit plus haut pour un traitement de courte durée qui n'inhibe que mTORC1, le traitement prolongé inhibe complètement la phosphorylation de p70 S6 kinase. Cependant, d'une façon surprenante, il augmente la phosphorylation de p85 S6 kinase (*Figure 29 ; Figure30*). On a alors émis l'hypothèse que ceci pourrait être dû à une augmentation du taux de l'acide phosphatidique, faisant suite à une augmentation de l'activité de la PLD.

Pour vérifier cette hypothèse, on a dosé l'activité PLD après un traitement prolongé par la rapamycine (24 h), ou un traitement court par la wortmannine, pour déterminer si l'inhibition de mTORC2 ou d'Akt affectent la PLD. Nos résultats montrent que l'inhibition de mTORC2 par la

rapamycine, et non pas l'inhibition de Akt par la wortmannine, augmente l'activité de la PLD (*Figure 37*). Ce qui permet de dire qu'il y a probablement une régulation négative de la PLD par mTORC2, qui expliquerait l'augmentation de la phosphorylation de p85 S6 kinase après 24 h de rapamycine.

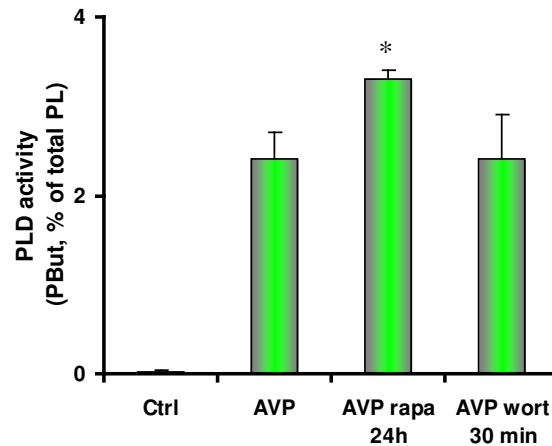


Figure 37 Effet de la rapamycine et de la wortmannine sur l'activité PLD : l'activité PLD a été testée en évaluant la formation de Phosphatidylbutanol (PBut) dans les cellules intactes. Les cellules sont prétraitées par la rapamycine 100 nM pendant 24h, ou la wortmannine 100 nM pendant 30 min. Elles sont marquées par incubation en présence de [³H]-palmitate, lavées et stimulées par AVP 10⁻⁷M pendant 40 minutes en présence de butanol-1 1%. La réaction est arrêtée par extraction des lipides puis les phospholipides sont fractionnés par chromatographie sur couche mince. La radioactivité associée au PBut est exprimée en % de la radioactivité associée aux Phospholipides totaux. Les résultats représentent la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes.

1.6- La PLD et mTOR sont nécessaires à la différenciation myogénique

Le niveau de la différenciation myogénique a été évalué en observant l'expression du facteur de transcription myogénine, marqueur précoce de la réponse myogénique, par Western blotting, ou l'accumulation nucléaire de ce facteur, par immunohistofluorescence.

Notre équipe avait déjà montré que la PLD joue un rôle important dans la différenciation des myoblastes L6. Comme confirmation supplémentaire de ces résultats, nous avons observé qu'un inhibiteur chimique nouvellement décrit de la PLD, le 2-indolyl-deschloro-halopemide, permet d'inhiber fortement la différenciation myogénique (*Figure 38*). De même, la rapamycine qui inhibe à la fois mTORC1 et mTORC2, inhibe complètement l'expression de la myogénine détectée par Western blotting (*Figure 38*).

Ces résultats permettent de dire que la PLD et mTOR jouent un rôle indispensable dans la différenciation myogénique.

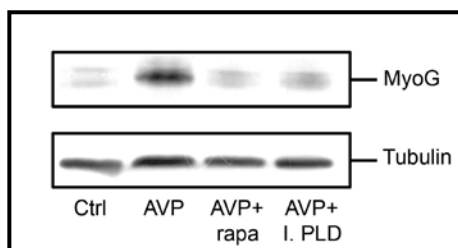


Figure 38 Effet de l'inhibition de la PLD, ou des complexes mTORC1 et mTORC2 sur la différenciation myogénique : Les cellules sont traitées ou non avec de l'AVP pendant 48 h en présence de rapamycine 100 nM, ou de I.PLD 50 μ M. Les cellules sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-myogénine. Les bandes sont normalisées avec la tubuline.

Les deux isoformes PLD1 et PLD2 ont été surexprimées, grâce à un vecteur adénoviral, dans les cellules placées en condition de différenciation. Après marquage immuno-fluorescent de la myogénine, le rapport du nombre de noyaux myogénine-positifs sur le nombre de noyaux totaux a été évalué. Il fait apparaître un rôle important de PLD1, comparé à PLD2, sur la différenciation: la surexpression de PLD1 augmente 2 fois le pourcentage des noyaux myogénine-positifs par rapport au contrôle infecté avec l'adénovirus GFP, alors que la surexpression de PLD2 n'augmente ce rapport que de 28% (Figure 39).

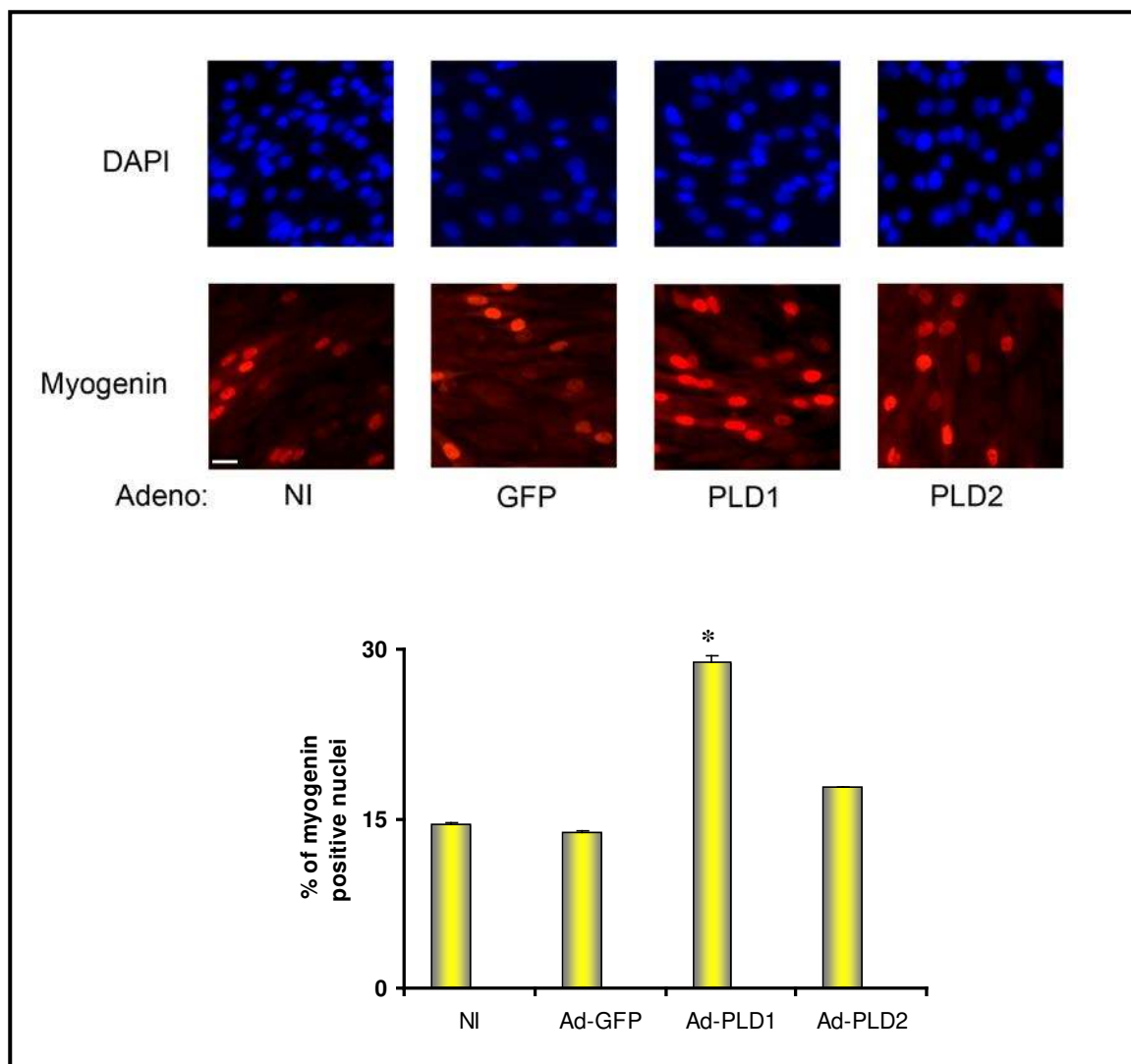


Figure 39 Effet de la surexpression de PLD1 et de PLD2 sur l'expression et la translocation nucléaire de la myogénine: les cellules sont infectées avec des adénovirus qui codent pour la GFP utilisés comme contrôle, ou pour PLD1 ou PLD2, pendant 48h, puis elles sont stimulées par l'AVP pendant 48h. Les cellules sont fixées, perméabilisées, puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myogénine, et l'anticorps secondaire Alexa anti-IgG de souris, qui permet la révélation par fluorescence au microscope. Le pourcentage de noyaux myogénine-positifs évalué par rapport au nombre de noyaux totaux est représenté dans le diagramme ci-dessus. Les résultats sont la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. * différent du contrôle GFP, $p < 0,05$.

1.7- mTORC1 inhibe, mTORC2 active la différenciation des L6

Dans les cellules L6, la rapamycine inhibe complètement la différenciation myogénique, en inhibant les étapes très précoces de la différenciation: l'expression de la myogénine (ARNm et protéine) et son accumulation nucléaire (Figure 40). Des résultats très différents avaient été trouvés dans les C2C12 (Shu and Hungton), où la rapamycine affectait la fusion cellulaire, mais peu l'expression de myogénine.

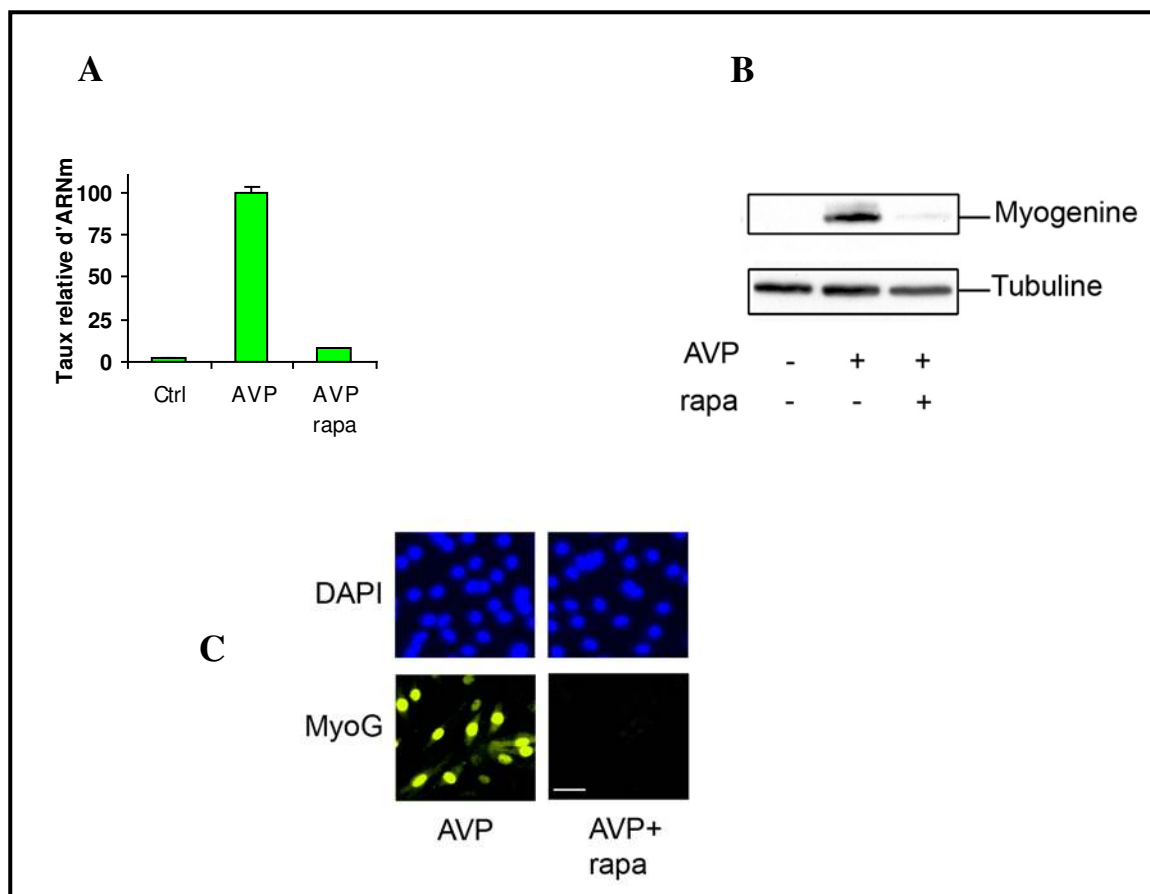


Figure 40 Effet de la rapamycine sur l'expression de la myogénine et sa translocation nucléaire : les cellules sont stimulées par l'AVP, en présence ou non de rapamycine 100 nM, pendant 48h. **A)** les ARN totaux ont été extraits et l'ARNm spécifique de la myogénine a été dosé par RT-qPCR. **B)** les cellules sont lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-myogénine. Les bandes sont normalisées par rapport à la tubuline. **C)** les cellules ont été fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myogénine et l'anticorps secondaire Alexa anti-IgG de souris qui permet la révélation par microscopie de fluorescence.

Puisque la rapamycine dans ces conditions inhibe les deux complexes mTORC1 et mTORC2, nous nous sommes demandé lequel des deux complexes est impliqué dans la différenciation myogénique. Pour répondre à cette question, nous avons inhibé spécifiquement mTORC1 ou mTORC2 grâce aux ARNi anti-raptor et anti-rictor, et nous avons observé les conséquences sur la différenciation, par Western blotting de la myogénine d'une part, et par marquage immunofluorescent de la myogénine nucléaire d'autre part. Nos expériences montrent que la downrégulation de rictor, et donc l'inhibition du complexe mTORC2, inhibe la différenciation myogénique, au niveau de l'expression de la myogénine et de son accumulation nucléaire (Figure 41). Ceci permet de conclure que le complexe mTORC2 joue un rôle positif dans la différenciation myogénique. D'une façon surprenante, on remarque que la downrégulation de raptor, et donc l'inhibition du complexe mTORC1, augmente l'expression de la myogénine et son accumulation nucléaire (Figure 41), ce qui nous amène à conclure que mTORC1 joue un rôle négatif dans la différenciation myogénique.

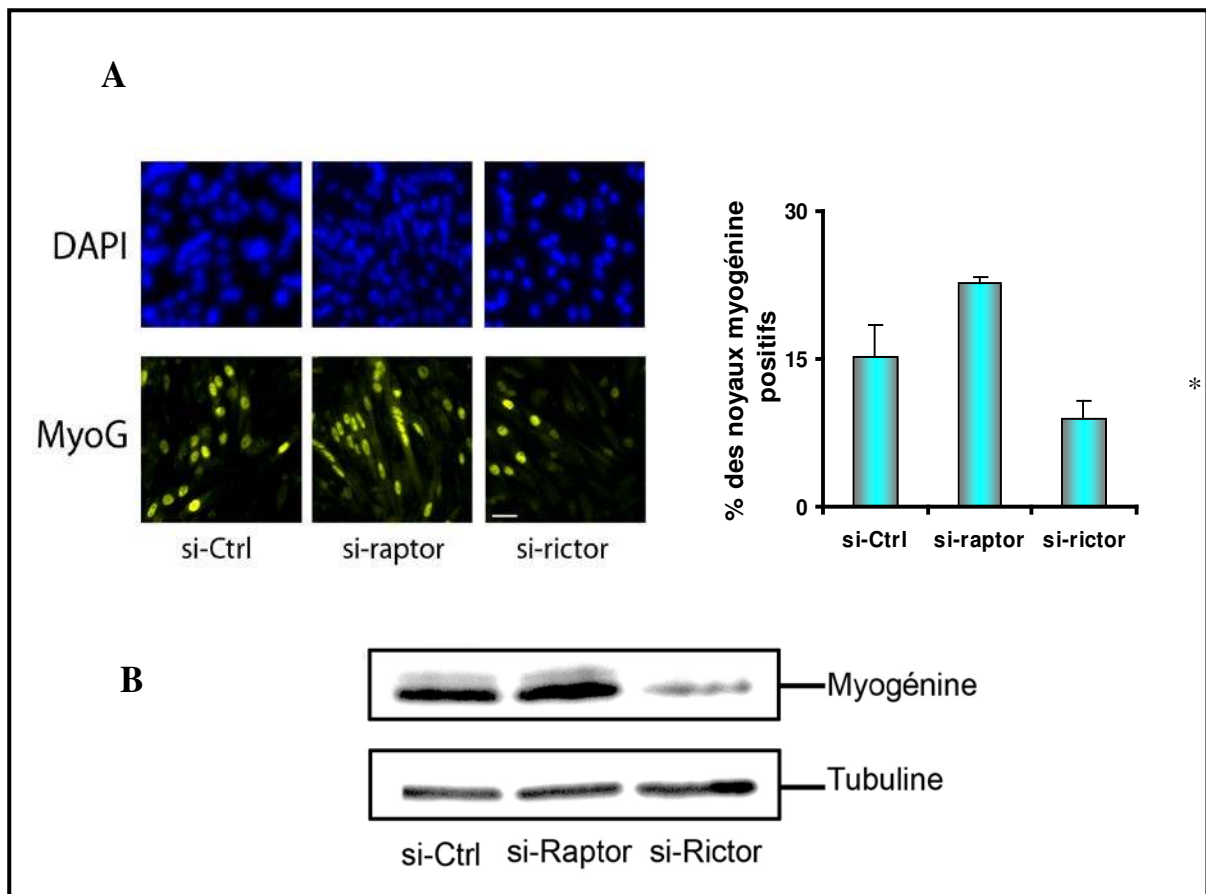


Figure 41 Effet de la downrégulation de raptor et de rictor sur l'expression et la translocation nucléaire de la myogénine: les cellules sont transfectées pendant 48h par des ARNi anti raptor, ou anti rictor ou ARNi Ctrl pendant 48h, puis elles sont stimulées par l'AVP pendant 48h. **A)** les cellules ont été fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myogénine et l'anticorps secondaire Alexa anti-souris qui permet la révélation par fluorescence au microscope. Le pourcentage de noyaux myogénine-positifs, évalué par rapport au nombre des noyaux totaux est représenté dans le diagramme ci-dessus montrant les moyennes +/- SEM de 3 expériences indépendantes. * différent d'ARNi contrôle, $p < 0,05$. **B)** les cellules sont lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-myogénine. Les bandes sont normalisées par rapport à la tubuline.

1.8- mTORC1 inhibe la différenciation des L6 via S6 kinase

Ce rôle négatif de mTORC1 dans la différenciation myogénique a été confirmé en surexprimant la S6 kinase, un de ses effecteurs principaux. La surexpression de S6 kinase diminue l'expression de la myogénine, et également l'expression de la troponine (*Figure 42 A/B*), qui est un marqueur plus tardif de la différenciation myogénique. Ces expériences montrent que le complexe mTORC1 pourrait inhiber la différenciation myogénique via son effecteur S6 kinase.

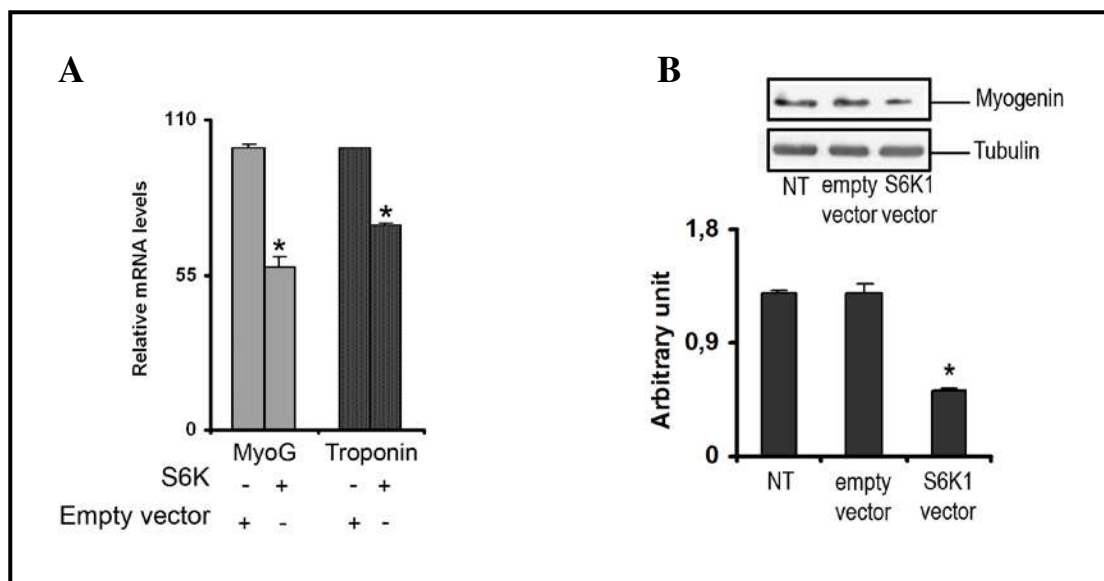


Figure 42 Effet de la surexpression de S6 kinase sur l'expression de la myogénine et de la troponine: les cellules sont transfectées pendant 48h avec un vecteur pMT2 surexprimant S6 kinase, ou par le vecteur pMT2 vide. Les cellules sont ensuite traitées par l'AVP pendant 48h. **A)** Les ARN totaux sont extraits, et l'ARNm spécifique de la myogénine et de la troponine est dosé par RT-qPCR. **B)** les cellules sont lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western Blotting avec un anticorps monoclonal anti-myogénine. Les bandes sont normalisées par rapport à la tubuline. Les résultats représentent la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. * différent du contrôle vecteur vide, $p < 0,05$

Plusieurs études ont montré que mTORC1 inhibe mTORC2 en phosphorylant rictor, via la S6 kinase, au niveau de la Thréonine 1135 (Julien et al., 2009), ce qui pourrait expliquer l'effet négatif de S6 kinase sur la différenciation. Pour tester cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de rictor au niveau de la thréonine 1135. On a observé, après stimulation par AVP, une induction rapide de la phosphorylation de rictor qui atteint un maximum entre 6-30 min (Figure 43 A). De plus, on a remarqué que la surexpression de S6 kinase augmente la phosphorylation de rictor induite par l'AVP (Figure 43 B), ce qui permet d'expliquer les effets négatifs de mTORC1 dans la différenciation.

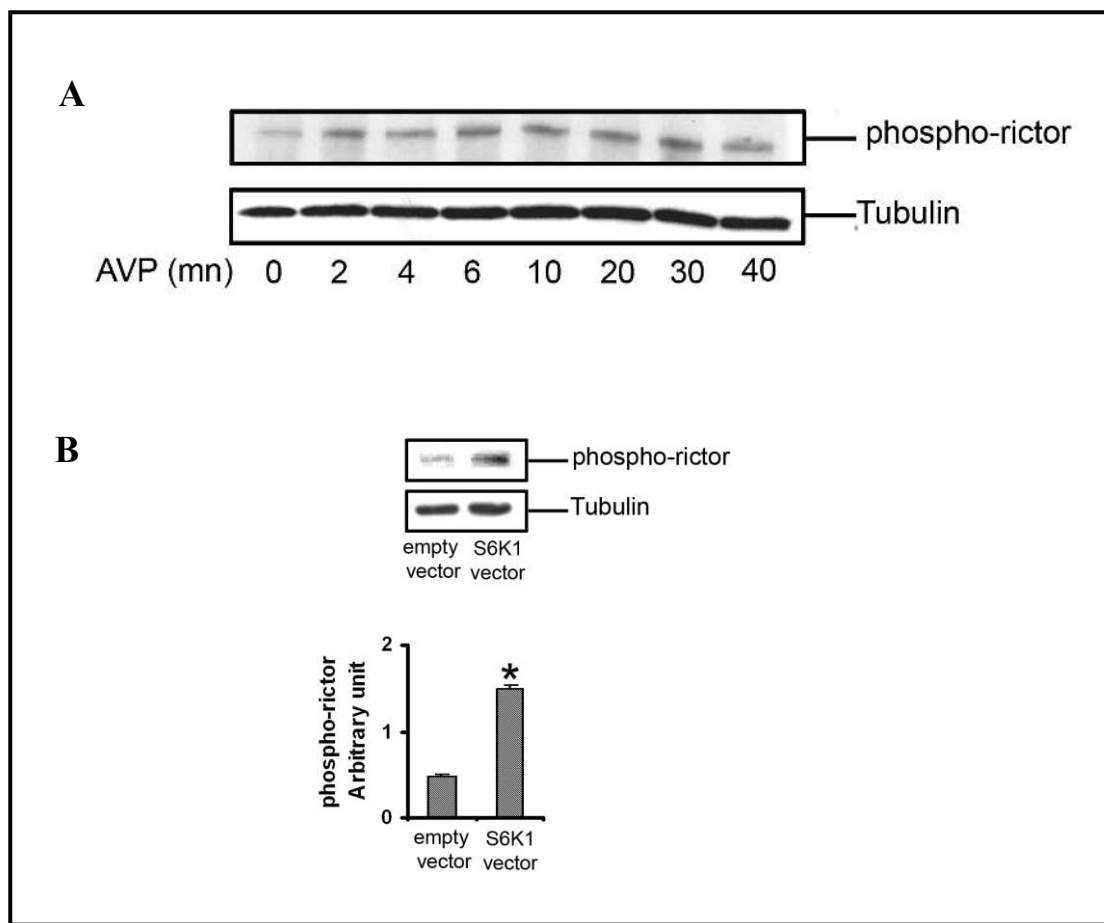


Figure 43 Cinétique de phosphorylation de rictor au niveau de la Th-1135, et effet de la surexpression de S6 kinase sur la phosphorylation de rictor : **A)** Les cellules sont traitées par l'AVP pendant les temps indiqué. Elles sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho-rictor. **B)** les cellules sont transfectées pendant 48h avec un vecteur pMT2 surexprimant S6 kinase, ou par le vecteur pMT2 vide. Les cellules sont ensuite traitées par l'AVP pendant 10 min, elles sont ensuite lysées, et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho-rictor. Les bandes sont normalisées par rapport à la tubuline. Les résultats sont la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. * différent du contrôle vecteur vide, $p < 0,001$.

1.9- mTORC2 active la différenciation indépendamment de Akt

Le rôle positif de mTORC2 dans la différenciation myogénique nous a amenés à nous demander s'il s'exerce via son effecteur Akt, et nous avons réalisé une série d'expériences pour répondre à cette question.

Nous avons d'abord utilisé la wortmannine, inhibiteur classique de la PI3K, et donc de la phosphorylation de Akt. Nous avons observé que la wortmannine, à dose courante (100 nM), inhibe la phosphorylation de Akt stimulée par l'insuline ou par l'AVP (Figure 44B), mais n'a aucun effet sur la différenciation myogénique (Figure 44A). A forte dose (500 nM), la wortmannine diminue le nombre des noyaux myogénine positifs, mais il est connu qu'à cette dose elle n'est plus spécifique, et

inhibe aussi les complexes mTORC1 et mTORC2. Certaines études conduites dans les cellules C2C12 ont montré que la rapamycine inhibe la différenciation myogénique en supprimant la synthèse d'IGF2, activateur autocrine des cellules, qui serait nécessaire à la différenciation. Pour vérifier si c'était le cas dans notre modèle, on a ajouté simultanément de la rapamycine et les facteurs de croissance IGF2 ou insuline, et observé la réponse myogénique. Aucun de ces facteurs de croissance activateurs de la voie PI3 kinase/Akt ne s'est avéré capable de réverser l'effet inhibiteur de la rapamycine (Figure 44 A).

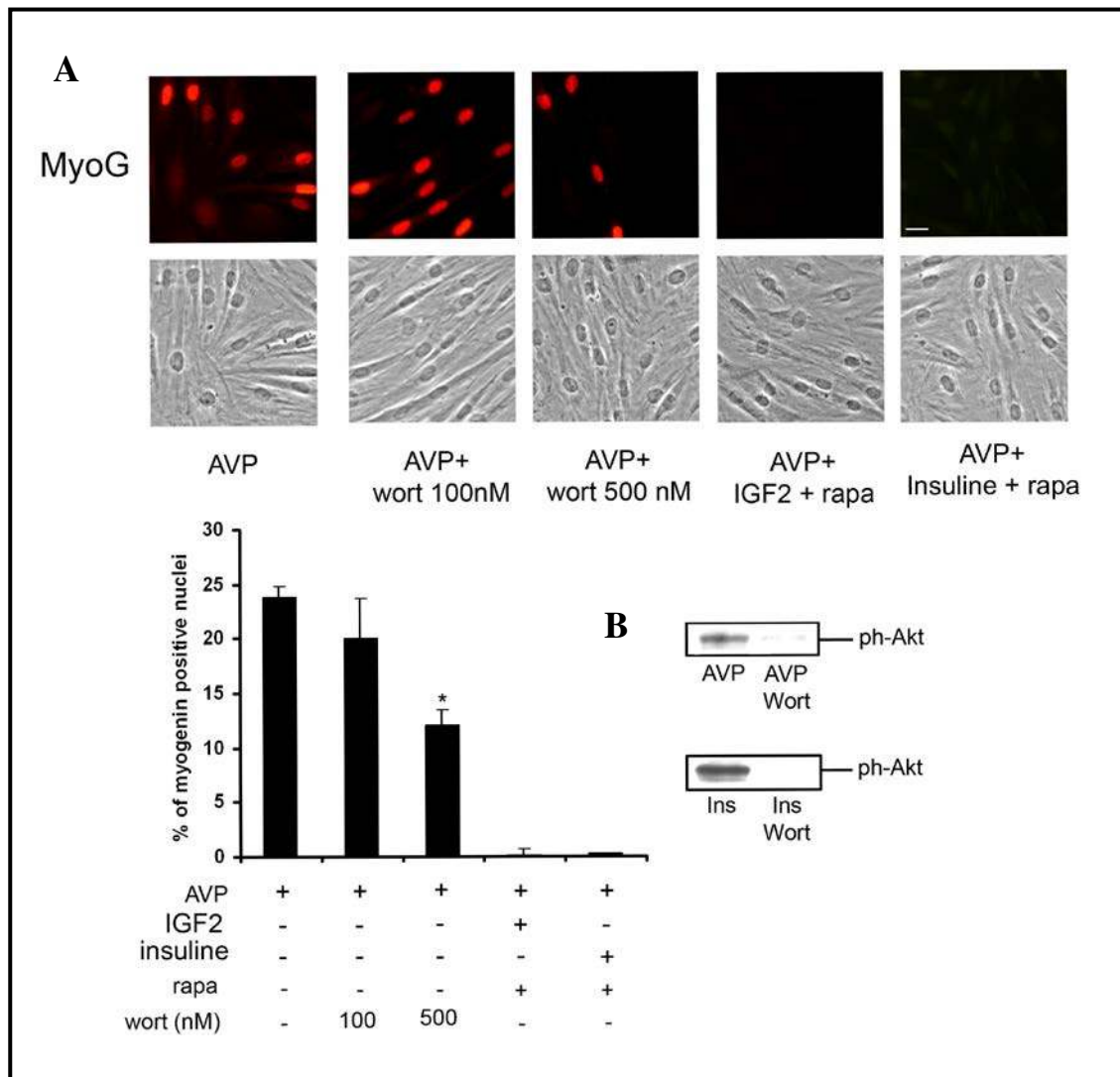


Figure 44 Effet des inhibiteurs de la voie PI3K et de mTOR sur la différenciation myogénique : **A)** les myoblastes L6 sont traités par l'AVP pendant 48h en présence ou non de rapamycine 100 nM, IGF2 300 ng/ml, insuline 100 nM, ou wortmannine 100 ou 500 nM. Puis les cellules sont fixées, perméabilisées et incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myogénine et l'anticorps secondaire Alexa anti-IgG de souris, et observées au microscope à fluorescence. Le pourcentage de noyaux myogénine-positifs est représenté dans le diagramme ci-dessus. Les résultats représentent la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. * différent du contrôle AVP, $p < 0,05$. **B)** les cellules sont prétraitées 30 min avec de la wortmannine 100 nM, puis traitées avec de l'insuline ou de l'AVP pendant 20 et 7 min respectivement, lysées, et les extraits cellulaires analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho Akt

Pour confirmer ces résultats suggérant que l'activité d'Akt n'influe pas sur la différenciation, on a surexprimé une forme sauvage d'Akt dans les myoblastes L6. La surexpression d'Akt, vérifiée par Western blotting (*Figure 45*), n'a eu aucun effet sur la différenciation myogénique induite par l'AVP, d'après le pourcentage de noyaux myogénine-positifs (*Figure 45*), ce qui confirme le fait que Akt n'a pas de rôle majeur sur l'initiation de la différenciation myogénique dans notre système.

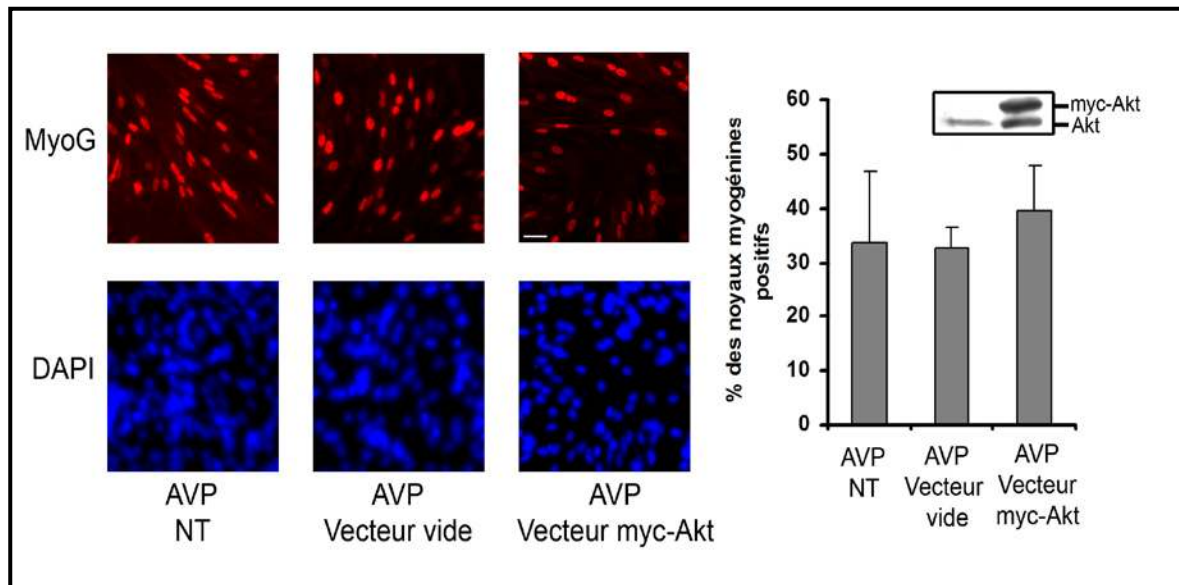


Figure 45 Effet de la surexpression de Akt sur l'accumulation nucléaire de la myogénine: les cellules sont transfectées par un plasmide pCDNA3 qui code pour Akt1 ou par le vecteur vide pendant 48h, puis elles sont stimulées par l'AVP pendant 48h. Les cellules ont été fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myogénine et l'anticorps secondaire Alexa anti-souris qui permet la révélation par fluorescence au microscope. Le pourcentage de noyaux myogénine-positifs est représenté dans le diagramme.

D'autres expériences ont été réalisées pour confirmer l'absence de rôle d'Akt, notamment la surexpression de PI3 kinase. Deux plasmides disponibles dans le laboratoire, codant pour PI3K-CA (mutant constitutivement actif) et pour PI3K-KR (mutant qui ne possède pas d'activité kinase, dominant-négatif) ont été transfectés dans les myoblastes L6, puis les cellules ont été stimulées par l'AVP pour induire la différenciation. Aucun effet n'a été observé sur la réponse myogénique précoce (*Figure 46*). Tous ces résultats nous permettent de dire que la voie PI3 kinase/Akt n'a aucun effet sur l'initiation de la différenciation myogénique dans ce modèle.

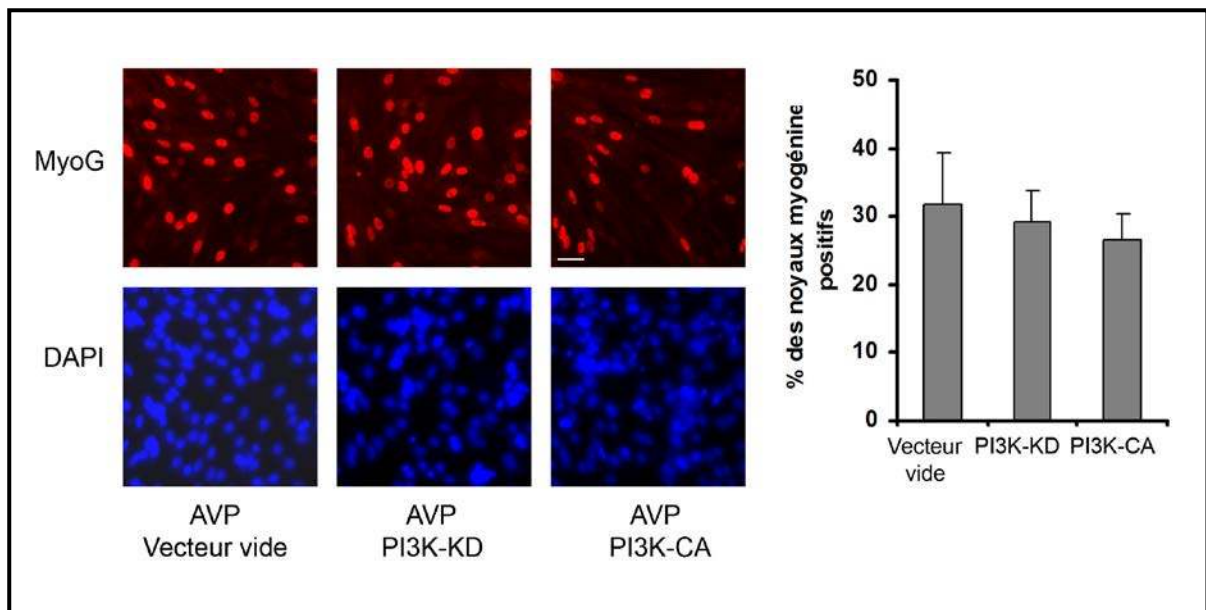


Figure 46 Effet de la surexpression de formes mutées de PI3K sur l'accumulation nucléaire de la myogénine: les cellules sont transfectées par un plasmide pEGFP qui code pour les formes mutées CA ou KR de PI3K p110 α , ou par le vecteur vide pendant 48h, puis elles sont stimulées par l'AVP pendant 48 h. Les cellules ont été fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myogénine et l'anticorps secondaire Alexa anti-IgG de souris qui permet la révélation par fluorescence au microscope. Le pourcentage de noyaux myogénine-positifs est représenté dans le diagramme

1.10- L'effet de la rapamycine sur les L6 n'implique pas la sécrétion de IGF2

Il a été démontré que la rapamycine supprime la production de IGF2 dans les C2C12, ce qui empêche son action autocrine sur les cellules, importante pour induire leur différenciation.

Comme décrit plus haut, les facteurs de croissance exogènes se sont avérés incapables d'inverser les effets inhibiteurs de la rapamycine sur la différenciation des L6, ce qui montre que les voies de signalisation qui sont impliquées dans la différenciation des L6 sont différentes de celles des C2C12.

Nous avons donc évalué l'effet de la rapamycine sur l'expression de IGF2 dans notre système. Nous observons que la rapamycine n'a aucun effet sur l'expression de IGF2, tant au niveau de la protéine qu'au niveau de l'ARNm (*Figure 47*). Ceci confirme l'existence de fortes différences entre les modèles C2C12 et L6 de différenciation myogénique in vitro. Dans le modèle L6, l'effet de mTOR sur la différenciation ne peut donc pas s'expliquer par un effet sur la sécrétion de IGF-2.

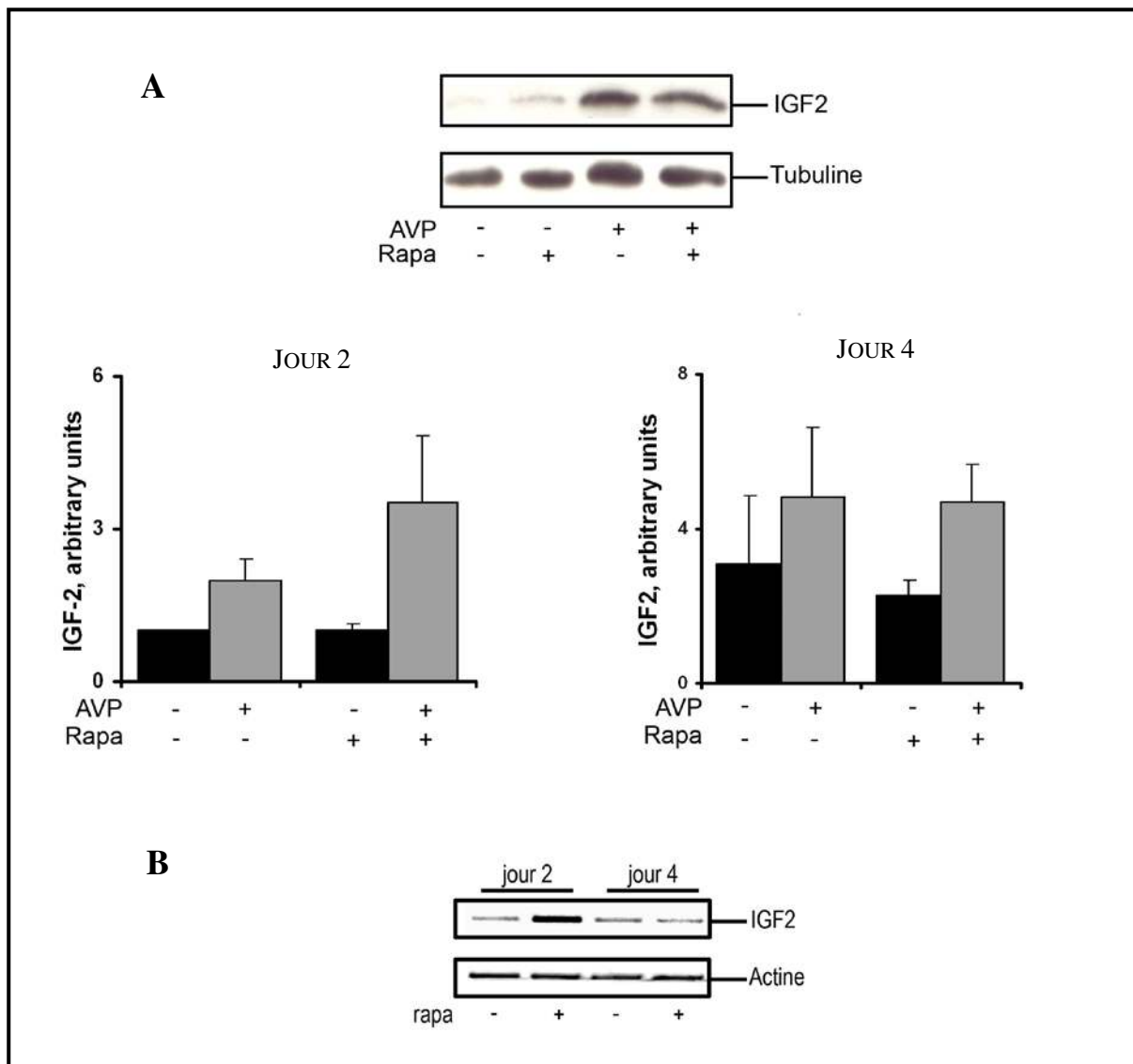


Figure 47 Effet de la rapamycine sur la production de IGF-2 : Les myoblastes L6 sont traités ou non par 100 nM de rapamycine, en présence ou absence d'AVP 10^{-7} M, pendant 2 ou 4 jours. **A)** les cellules sont ensuite lysées et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps anti-IGF-2. Panneaux supérieurs: expression d'IGF-2 à j2. Les diagrammes montrent la moyenne de 3 expériences indépendantes, à j2 et j4. **B)** Les ARN totaux sont extraits, et l'ARNm spécifique de IGF-2 est dosé par RT-PCR.

Ces résultats concordants montrent que la voie IGF/PI3K/Akt ne joue pas un rôle important dans l'initiation de la différenciation myogénique, et que l'explication de l'effet de la rapamycine par un blocage de cette voie n'est pas valide dans notre modèle.

1.11- mTORC2 active la différenciation des myoblastes via PKC α

D'après nos résultats Akt ne semble pas être l'effecteur de mTORC2 à travers lequel ce dernier contrôle la différenciation myogénique. Un autre effecteur connu de mTORC2, PKC α ,

pourrait être impliqué, au vu du rôle important des PKCs dans la différenciation myogénique (Komati et al., 2004).

On a donc dans un premier temps évalué l'effet de l'AVP sur la phosphorylation de PKC α au niveau de la sérine 657, cible de mTORC2. On a observé une phosphorylation rapide qui atteint son maximum entre 20-30 minutes (*Figure 48 A*). Considérant les effets négatifs de mTORC1/S6K1 sur la différenciation myogénique, on a recherché les effets de la surexpression de S6 kinase sur la phosphorylation de PKC α induite par l'AVP, et observé une inhibition significative, compatible avec un rôle de PKC α dans la différenciation (*Figure 48 B*).

Enfin, pour mettre en évidence l'implication de PKC α dans la différenciation myogénique, on a recherché l'effet d'une déplétion de PKC α induite par un ARNi spécifique. On a observé une forte diminution de l'expression de la myogénine, ce qui nous permet de dire que PKC α est nécessaire à la différenciation myogénique (*Figure 48 C*), et pourrait donc être l'effecteur de mTORC2 impliqué dans cette réponse.

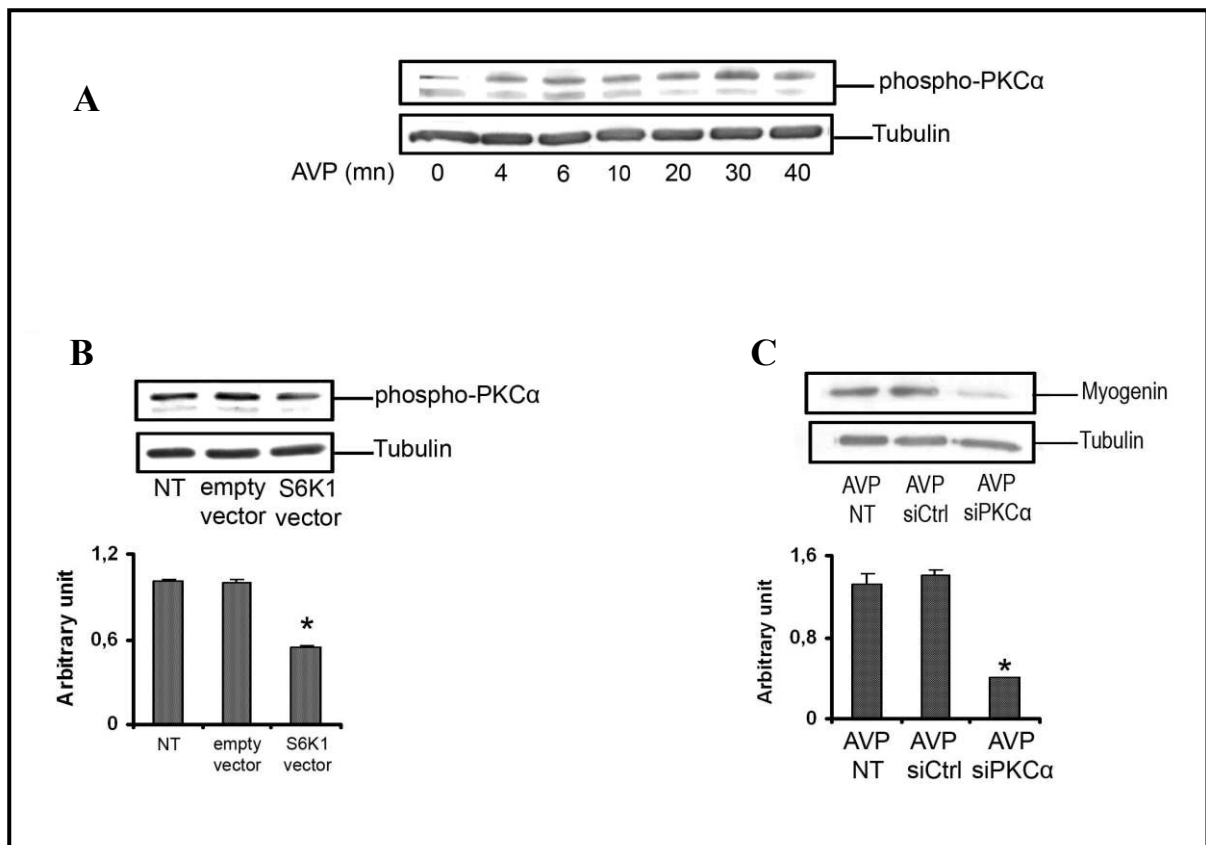


Figure 48 Implication de PKC α dans la différenciation myogénique: **A)** Les cellules traitées par l'AVP pendant les temps indiqués sont ensuite lysées, et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho-PKC α . **B)** les cellules transfectées pendant 48h avec pMT2 surexprimant S6 kinase, ou avec le vecteur pMT2 vide, sont ensuite traitées par l'AVP pendant 10 min, puis lysées, et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec l'anticorps anti-phospho-PKC α . **C)** les cellules sont transfectées pendant 48h avec un ARNi anti-PKC α , ou un ARNi contrôle. Elles sont ensuite traitées par l'AVP pendant 48 h, lysées, et les extraits cellulaires analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-myogénine. Les bandes sont normalisées par rapport à la tubuline. Moyennes +/- SEM de 3 expériences indépendantes. * différent du contrôle, $p < 0,001$.

1.12- Schéma récapitulant les résultats de la partie 1

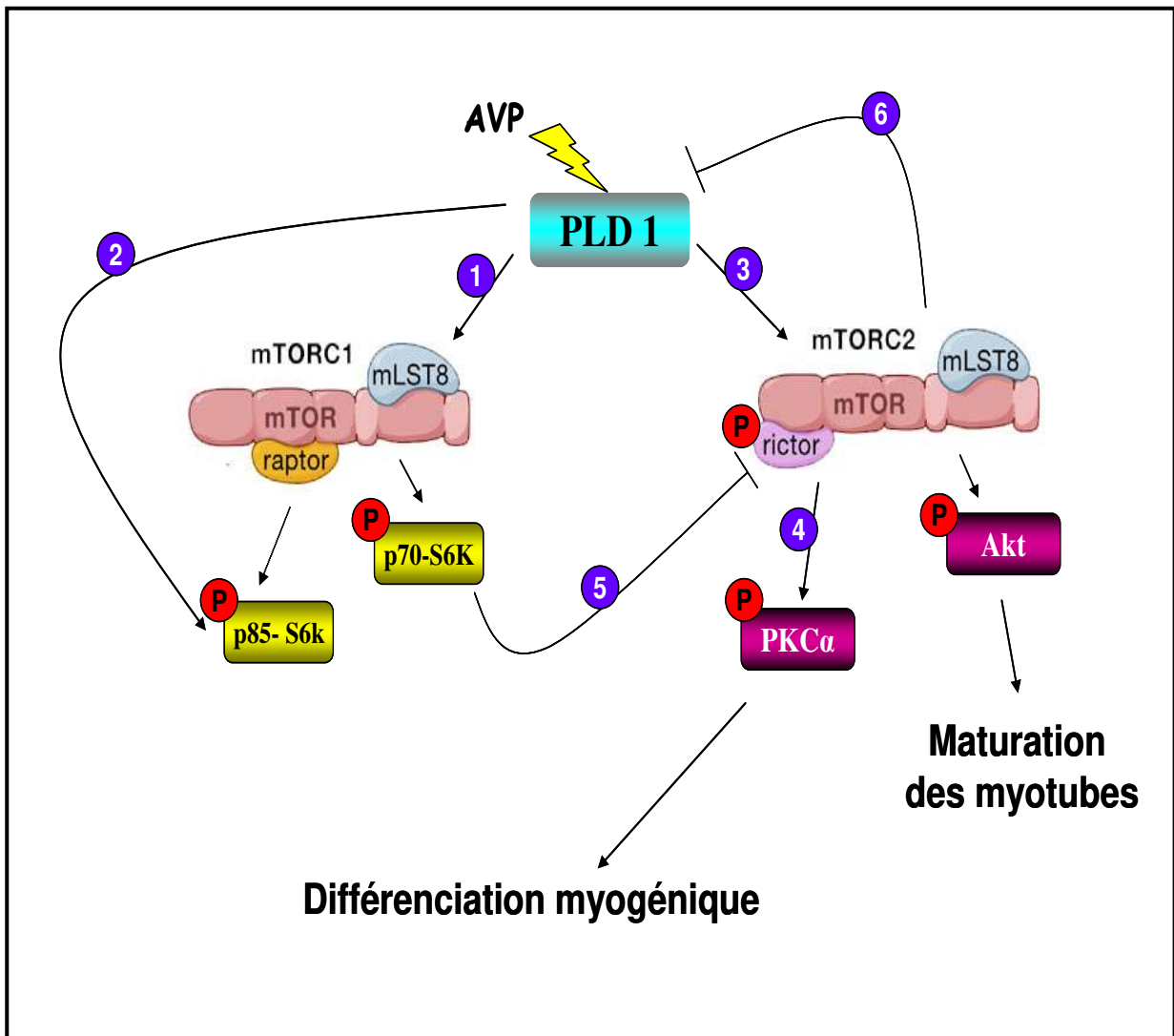


Figure 49 : Schéma récapitulant les résultats de la partie PLD, mTOR et différenciation myogénique 1: le PA produit par l'action de PLD se fixe sur, et active, mTORC1. A son tour, ce complexe active S6K1, en particulier l' isoforme p70. 2: PA pourrait aussi agir directement sur l'isoforme p85 S6K1. 3: PA active aussi mTORC2. 4: ce complexe assure alors la phosphorylation d'Akt sur S473, et via l'activation d'un autre effecteur, vraisemblablement PKCα, induit l'expression de myogénine et la différenciation myogénique précoce. L'activation d'Akt pourrait plutôt influencer sur la maturation des myotubes. 5: mTORC1 exerce un effet négatif sur mTORC2, médié par S6K1, vraisemblablement par phosphorylation de Rictor sur T1135. 6: mTORC2 exerce un effet négatif sur PLD, et en conséquence sur l'activation directe de p85-S6K1 par le PA.

2-PLD, mTOR, et atrophie musculaire

Puisque les protéines sarcomériques occupent 80% du volume des fibres musculaires, toute modification de la quantité de protéines contractiles a des répercussions sur la taille des fibres musculaires et sur la masse musculaire, de façon globale. Le maintien de la masse musculaire résulte donc d'un équilibre entre synthèse et dégradation protéique et cet équilibre est en constante variation. Ainsi, une l'activité physique soutenue va permettre d'améliorer la synthèse protéique et de diminuer la dégradation, et ainsi de tendre vers l'hypertrophie musculaire, Au contraire, un manque d'activité physique, même transitoire comme un alitement de quelques jours, va entraîner une augmentation de la protéolyse au détriment de la protéosynthèse, et entraîner une atrophie musculaire. Celle ci est également rencontrée chez les personnes âgée, ou dans des situations pathologiques telles que l'obésité morbide, le cancer ou le SIDA.

Nos résultats précédents montrent que la PLD est impliquée dans la régulation des deux complexes mTORC1 et mTORC2 dans les cellules musculaires, et d'après la littérature ces deux complexes jouent un rôle important dans le contrôle de la synthèse et de la dégradation protéique.

Nous nous sommes donc demandé si la PLD pouvait intervenir dans le contrôle de la masse musculaire, et pour répondre à cette question nous avons eu recours à diverses approches.

2.1- le butanol-1 induit une atrophie musculaire

Dans un premier temps, on a bloqué la synthèse de l'acide phosphatidique par addition de butanol-1 au milieu de culture de myotubes L6 différenciés pendant 6 jours. Le blocage de la synthèse du PA par la PLD induit une atrophie des myotubes, quantifiée en mesurant, d'une part, la surface des myotubes après immunomarquage de la myosine (*Figure 50*) (une des protéines sarcomériques les plus abondantes dans les myotubes), et d'autre part, la quantité de chaîne lourde de la myosine (MHC) par ELISA.

Le butanol-1 induit clairement une diminution de la surface des myotubes, et de leur teneur en MHC (*Figure 51 A*). Pour vérifier l'état fonctionnel des myotubes, on a mesuré, dans les mêmes conditions que ci-dessus, l'activité de la créatine kinase (CK), qui est une enzyme nécessaire à la fourniture d'énergie pour la contraction. Nos résultats montrent que l'inhibition de PLD induit une diminution de l'activité de la CK (*Figure 51 B*), indiquant une détérioration de l'état fonctionnel des myotubes.

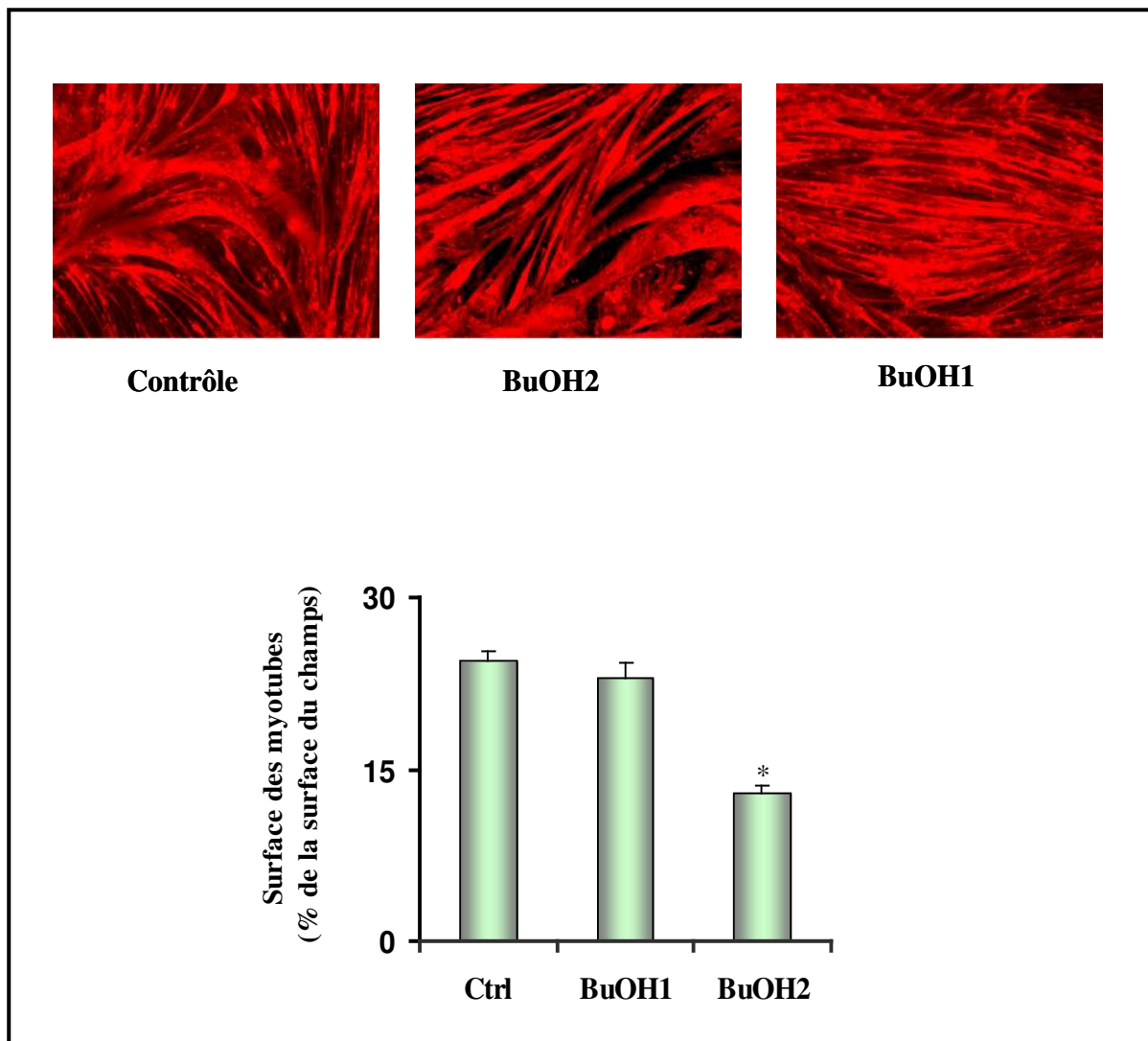


Figure 50 Effet du butanol sur la surface des myotubes : les myoblastes sont différenciés en myotubes pendant 6 jours en présence de SVF 1% et AVP $10^{-7}M$, puis le milieu de différenciation est remplacé par un milieu qui contient SVF 1%, sans ou avec 0.5% de butanol-1 ou butanol-2. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myosine et l'anticorps secondaire Alexa anti-IgG de souris, et observées par microscopie de fluorescence. La surface des myotubes, en % de la surface du champ, est mesurée à l'aide du logiciel image J. Le graphe représente la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. * différent du contrôle sans butanol, $p < 0,01$.

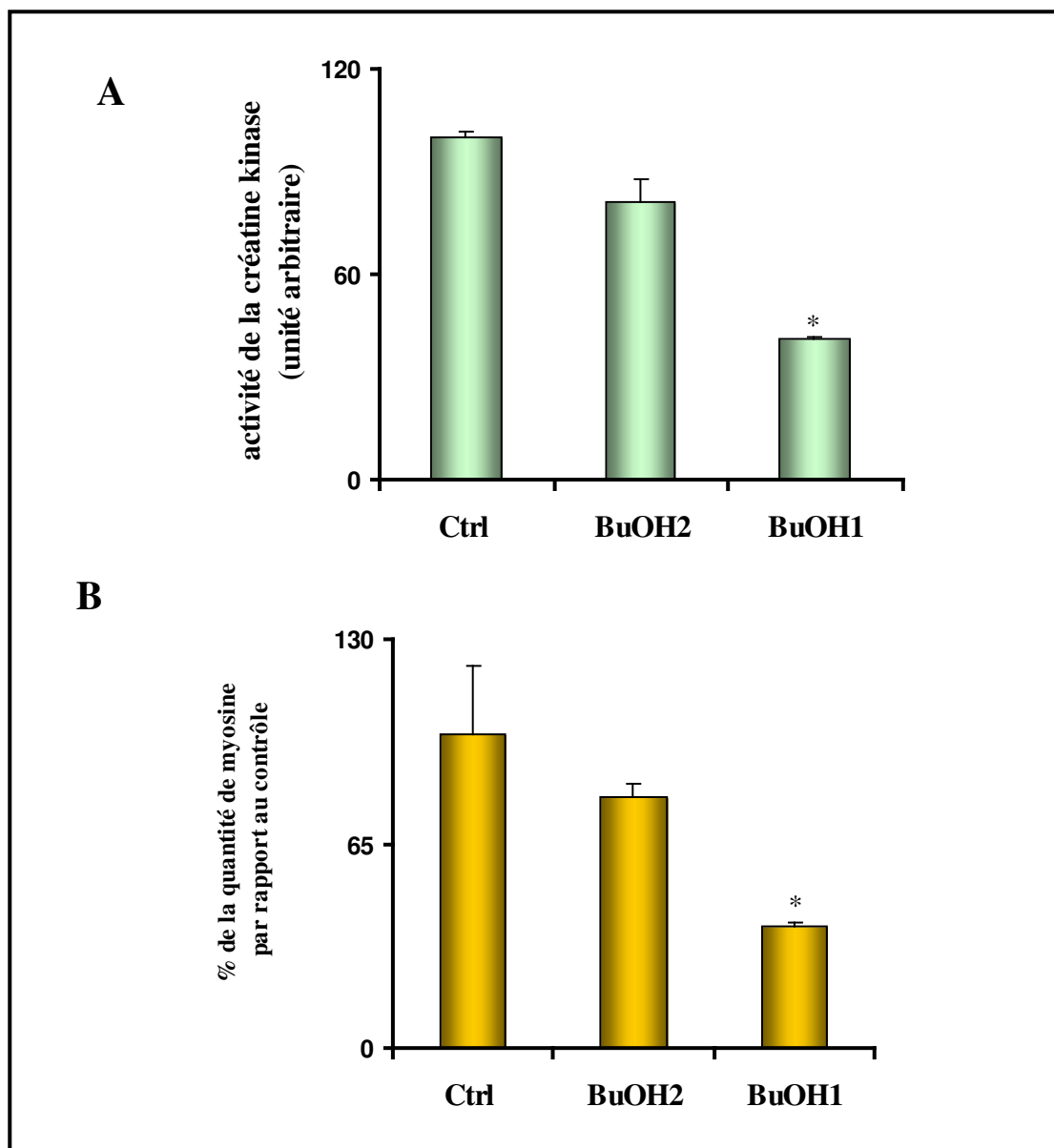


Figure 51 Effet de butanol sur la quantité de myosine et l'activité de la créatine kinase: les myoblastes sont différenciés en myotubes pendant 6 jours en présence de 1% SVF et $10^{-7}M$ AVP, puis le milieu de différenciation est remplacé par un milieu contenant SVF 1%, sans ou avec 0.5% de butanol-1 ou butanol-2. **A)** les cellules sont lysées et l'activité créatine kinase est dosée par spectrophotométrie. **B)** les cellules sont lysées, les lysats sont coatés sur une plaque 96 puits, et sont analysés par ELISA avec un anticorps anti-myosine.

2.2- La downrégulation de PLD1 induit une atrophie musculaire

Pour confirmer ces résultats, et identifier l'isoforme de PLD impliquée dans le contrôle de l'atrophie musculaire, on a downrégulé chacune des deux isoformes de PLD en utilisant des ARNi spécifiques anti-PLD1 ou anti-PLD2. On observe que la downrégulation de PLD1, et non pas de PLD2, induit une atrophie des myotubes évaluée par une diminution de leur surface (*Figure 52*).

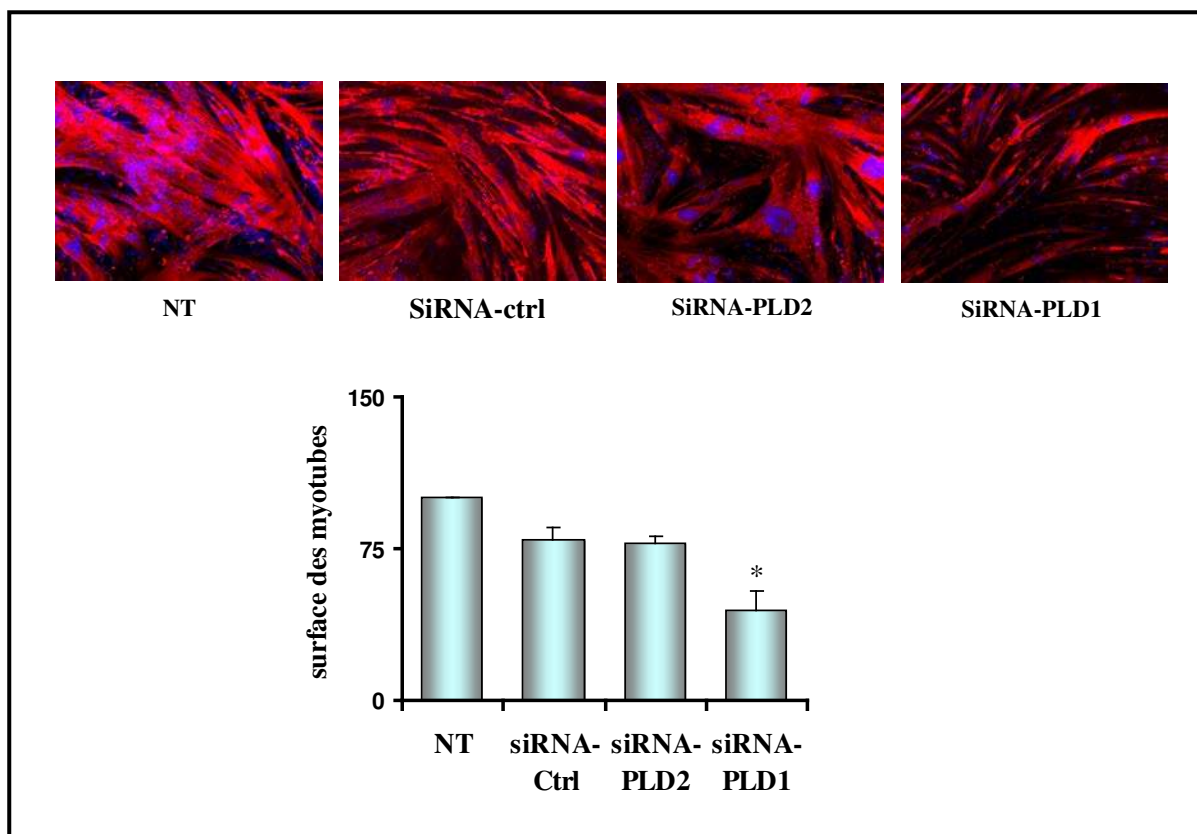


Figure 52 Effet de la downregulation des isoformes de PLD sur la surface des myotubes : les myoblastes sont différenciés en myotubes pendant 6 jours en présence de 1% SVF et 10^{-7} M AVP, puis le milieu de différenciation est remplacé par un milieu qui contient 1% SVF sans ou avec ARNi anti-PLD1, ARNi anti-PLD2 ou ARNi contrôle. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myosine et l'anticorps secondaire Alexa anti-IgG de souris qui permet la révélation par fluorescence au microscope. La surface des myotubes est mesurée à l'aide du logiciel image J. Elle est donnée en % de la valeur du témoin non transfecté. Le graphe représente la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. * différent de ARNi contrôle, $p < 0,01$

2.3- La surexpression de PLD1 induit une hypertrophie musculaire

Après surexpression des deux isoformes de PLD, par infection avec des adénovirus codant pour chacune d'elles, on a mesuré la surface des myotubes et remarqué que la surexpression de PLD1 l'augmente significativement par rapport aux myotubes infectés avec les adénovirus contrôles, alors que la surexpression de PLD2 n'a pas d'effet (Figure 53).

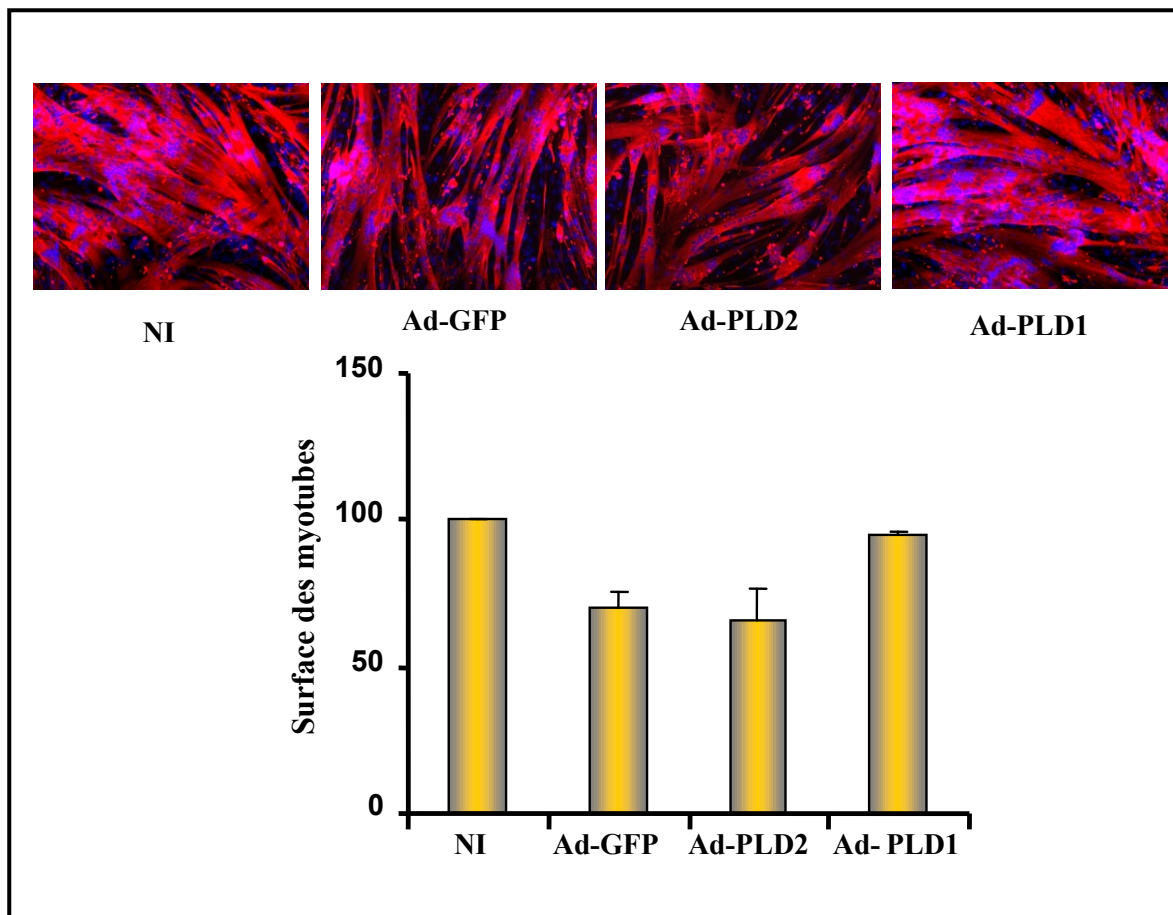


Figure 53 Effet de la surexpression des isoformes de PLD sur la surface des myotubes : les myoblastes sont différenciés en myotubes pendant 6 jours en présence de 1% SVF et 10^{-7} AVP, puis le milieu de différenciation est remplacé par un milieu qui contient 1% SVF sans ou avec Adénovirus-GFP, Adénovirus-PLD1, Adénovirus-PLD2. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées, puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myosine et l'anticorps secondaire Alexa anti-IgG de souris qui permet la révélation par fluorescence au microscope. La surface des myotubes est mesurée à l'aide du logiciel image J. Elle est donnée en % de la valeur du témoin non transfecté. Le graphe représente la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. * différent du contrôle GFP, $p < 0,01$.

2.4- La PLD régule les voies mTORC1 et mTORC2

Pour comprendre le mécanisme par lequel la PLD pourrait réguler la taille des myotubes, nous nous sommes intéressés à la voie mTOR, cible reconnue de la PLD. Dans un premier temps, nous avons déterminé l'effet de l'inhibition de la PLD par le butanol-1 sur la phosphorylation des deux effecteurs de mTORC1, S6 kinase 1 et 4E-BP1.

On a remarqué que le butanol-1 inhibe la phosphorylation des deux isoformes de S6 kinase, ainsi que la phosphorylation de 4E-BP1, ce qui indique une diminution de l'activité de la voie mTORC1 (Figure 54 A).

Inversement, la surexpression de l'isoforme PLD1 induit une augmentation de la phosphorylation des deux formes de S6 kinase (*Figure 54 B*). Ceci nous permet de conclure que la PLD, notamment l'isoforme PLD1, pourrait influencer sur la taille des myotubes via la régulation de mTORC1 et de ses effecteurs S6 kinase 1 et 4EB-P1, régulateurs majeurs de la synthèse protéique.

Dans un second temps on a recherché l'effet de la PLD sur mTORC2, d'après l'état de phosphorylation de son effecteur Akt, et on a remarqué que la surexpression de PLD1 augmente la phosphorylation au niveau de la sérine 473, site cible de mTORC2 (*Figure 54 C*). mTORC2 étant, via son effecteur Akt, un régulateur majeur de la protéolyse, la PLD pourrait donc agir sur la taille des myotubes en stimulant la synthèse protéique et inhibant la protéolyse.

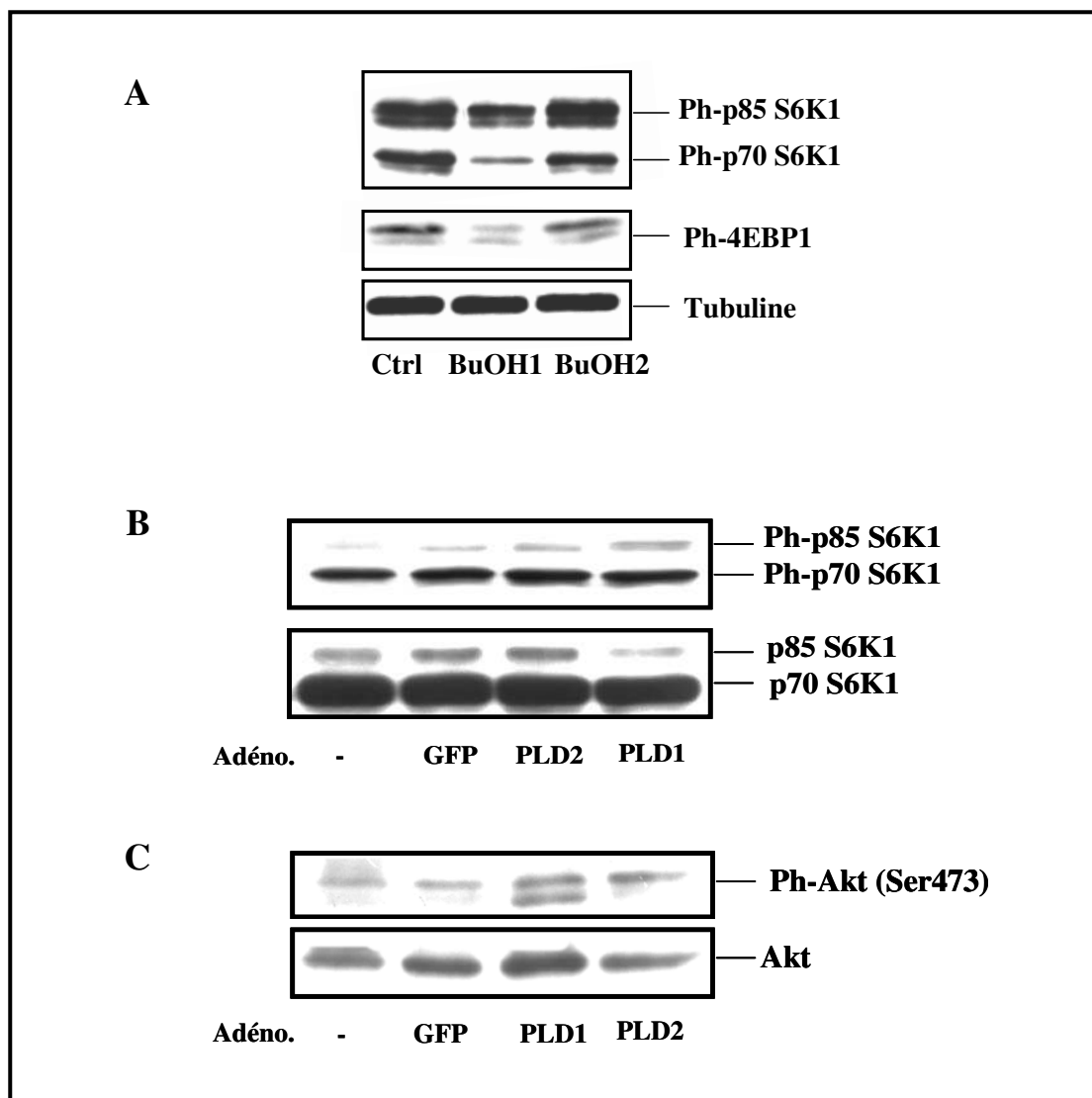


Figure 54 Effet de PLD sur mTORC1 et mTORC2 : A) les myotubes sont traités ou non avec butanol-1 ou butanol-2 pendant 48h, puis lysés, et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho-S6 kinase, ou anti-phospho 4E-BP1, ou anti-tubuline. B) les myotubes sont infectés avec des adénovirus qui codent pour la GFP utilisés comme contrôle, ou pour PLD1 ou PLD2, pendant 48h. Les myotubes sont ensuite lysés et les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho-S6 kinase ou anti-S6 kinase total. C) les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-phospho-Akt ou anti-Akt total.

2.5- La PLD régule l'expression de MuRF1

La surexpression de PLD1 dans les myotubes L6 active Akt en stimulant sa phosphorylation (Figure 54 C). Il est connu que Akt phosphoryle les facteurs de transcription FOXO, et empêche ainsi leur translocation nucléaire et l'activation de l'expression des atrogènes, notamment MuRF1 et atrogine-1, impliqués dans la dégradation des protéines musculaires. Nous avons donc mesuré par RT-qPCR l'expression de MuRF1 et atrogine-1 dans les myotubes, après surexpression ou

downrégulation des deux isoformes de PLD. La manipulation des PLDs n'a aucun effet significatif sur l'expression d'atrogine-1 (non montré). Par contre, la surexpression de PLD1 diminue l'expression de MuRF1 (*Figure 55 A*), et la downrégulation de PLD1 augmente l'expression de MuRF1 (*Figure 55 B*). PLD1 régule donc négativement l'expression de MuRF1, ce qui pourrait expliquer ses effets sur la taille des myotubes. En ce qui concerne PLD2, la situation est plus complexe, car on n'observe pas d'effet de la surexpression de PLD2 sur MuRF1, et un effet positif de l'extinction de PLD2.

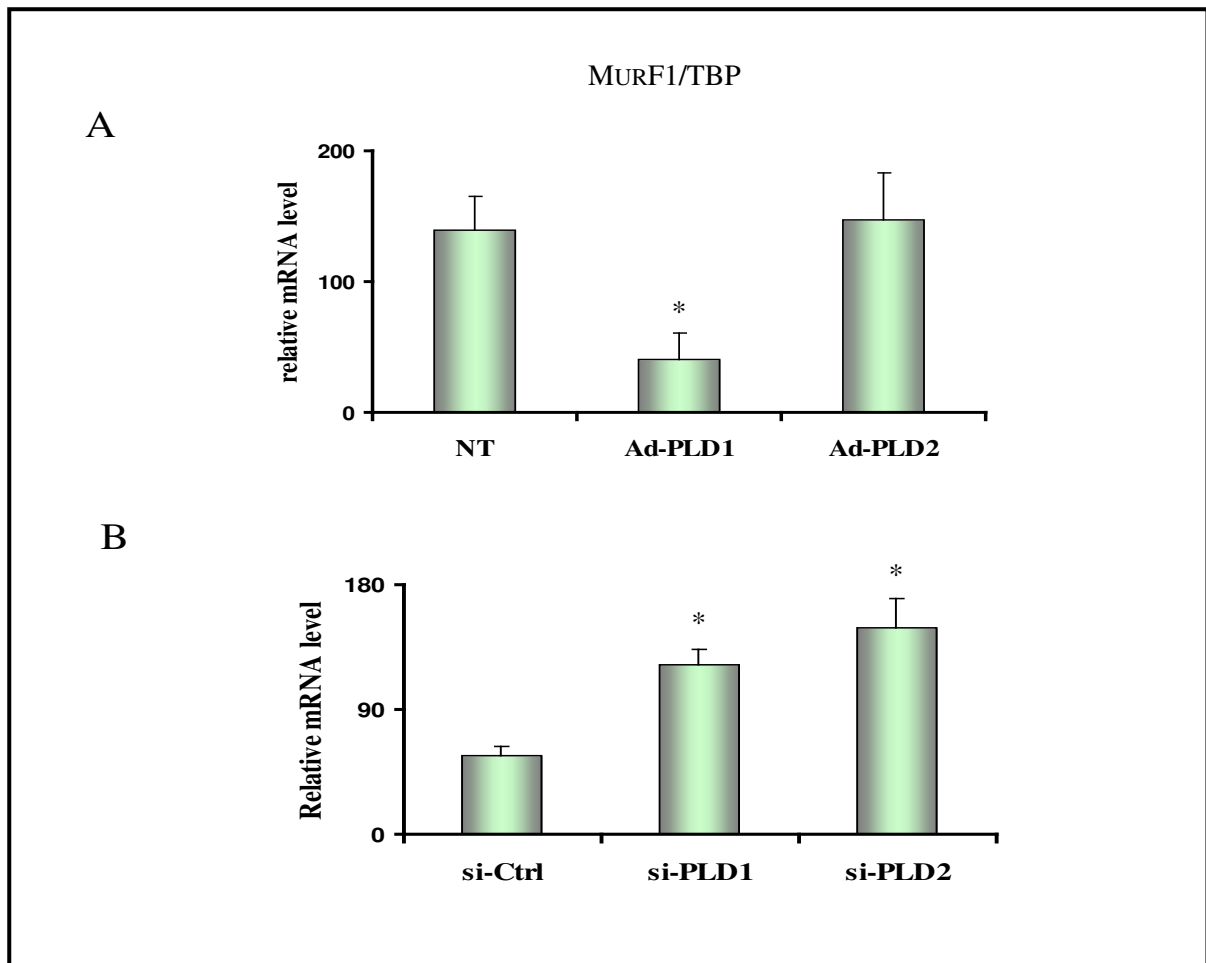


Figure 55 Effet de la surexpression ou de la downregulation des isoformes de PLD sur les atrogènes: **A)** les myoblastes sont différenciés en myotubes pendant 6 jours en présence de 1% SVF et 10^{-7} M AVP, puis les myotubes sont infectés avec Adénovirus-GFP, Adénovirus-PLD1, ou Adénovirus-PLD2. Les ARN totaux ont été extraits et l'ARNm spécifique de MuRF1 a été dosé par RT-qPCR **B)** les myotubes sont transfectés avec ARNi-Ctrl, ARNi-PLD1, ou ARNi-PLD2. Les ARN totaux ont été extraits et l'ARNm spécifique de MuRF1 a été dosé par RT-qPCR.

2.6- La PLD protège contre l'atrophie musculaire induite par la dexaméthasone

La dexaméthasone est un glucocorticoïde synthétique connu pour inhiber les voies mTORC1 et mTORC2, et pour induire une atrophie musculaire. Etant donné que la PLD régule l'activité de mTOR, et a des effets hypertrophiques, on a recherché si la PLD pouvait protéger contre l'atrophie induite par la dexaméthasone. Nous avons donc traité les myotubes avec 100 μ M de dexaméthasone pendant 3 jours, en présence d'acide phosphatidique exogène, qui mime une activité PLD, ou en présence d'AVP, un agoniste de la PLD. Le PA et l'AVP réversent partiellement les effets atrophiques de la dexaméthasone comme le montre la mesure de la surface des myotubes après immunomarquage de la myosine (Figure 56).

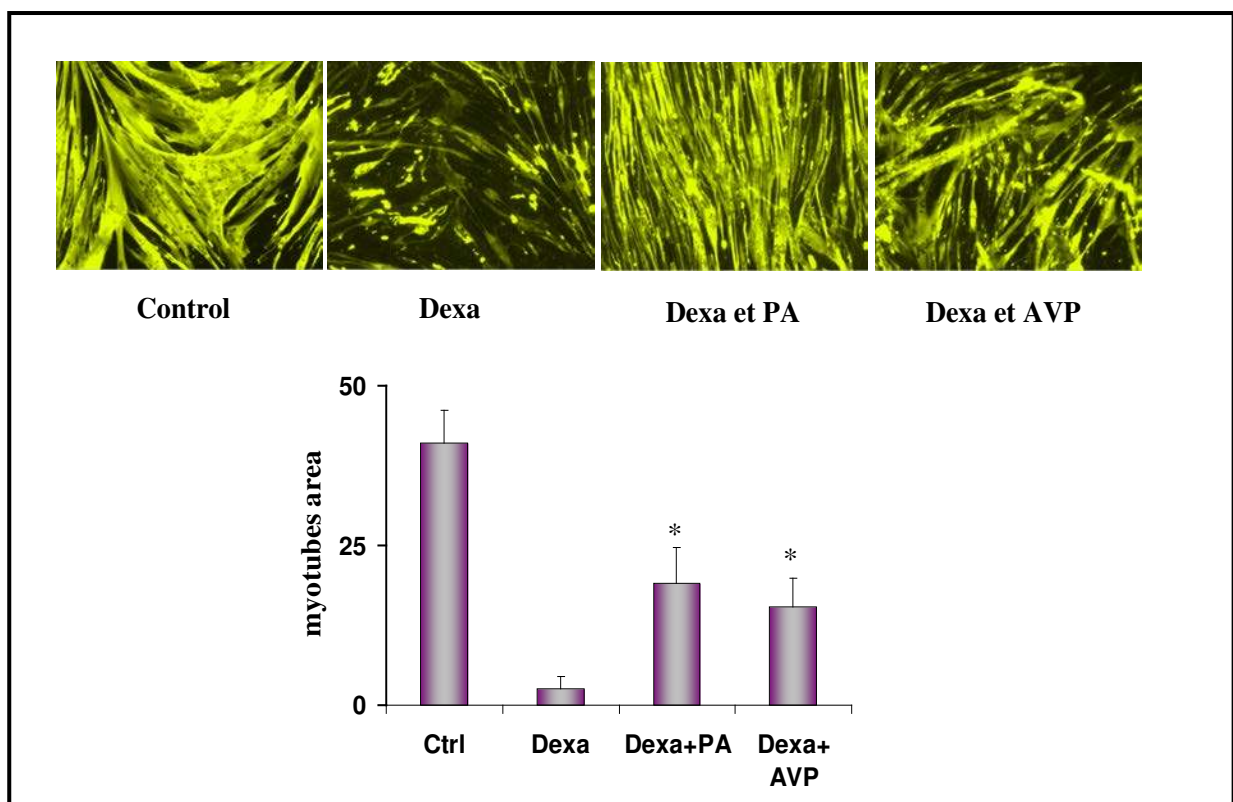


Figure 56 Réversion de l'effet de la dexaméthasone sur la surface des myotubes par le PA et l'AVP : les myoblastes sont différenciés en myotubes pendant 6 jours en présence de 1% SVF et 10^{-7} AVP, puis les myotubes sont traités ou non avec 100 μ M de dexaméthasone, en présence ou pas de 100 μ M de PA diC8, ou de 10^{-7} M AVP. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myosine et l'anticorps secondaire Alexa anti-IgG de souris qui permet la révélation par fluorescence au microscope. La surface des myotubes est mesurée à l'aide du logiciel image J. Elle est exprimée en % de la surface du champ. Le graphe représente la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. * différent du traitement par dexaméthasone seule, $p < 0,01$.

La mesure de la créatine kinase montre une forte baisse de l'activité après traitement par la dexaméthasone. Le traitement des myotubes avec du PA ou de l'AVP protège partiellement contre les effets négatifs de la dexaméthasone (*Figure 57*). Ces résultats suggèrent un effet anti-atrophique de la PLD.

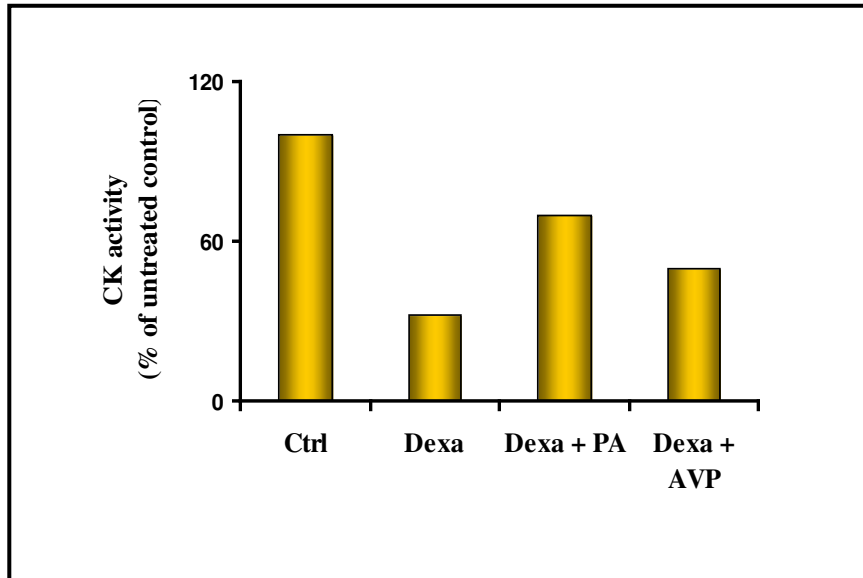


Figure 57 Effet de la dexaméthasone, du PA, de l'AVP sur l'activité créatine kinase des myotubes: les myoblastes sont différenciés en myotubes pendant 6 jours en présence de 1% SVF et 10^{-7} M AVP, puis les myotubes sont traités ou non avec 100 μ M de dexaméthasone, en présence ou pas de 100 μ M de PA diC8, ou 10^{-7} M AVP, ils sont ensuite lysés et leur activité créatine kinase dosée.

Pour le vérifier, on a surexprimé les deux isoformes de la PLD, traité les cellules avec 100 μ M de dexaméthasone, puis on a examiné la surface des myotubes après immunomarquage de la myosine. On a remarqué que la surexpression de PLD1, comme un traitement par le PA ou l'AVP, augmente significativement la surface des myotubes en présence de dexaméthasone (*Figure 58*).

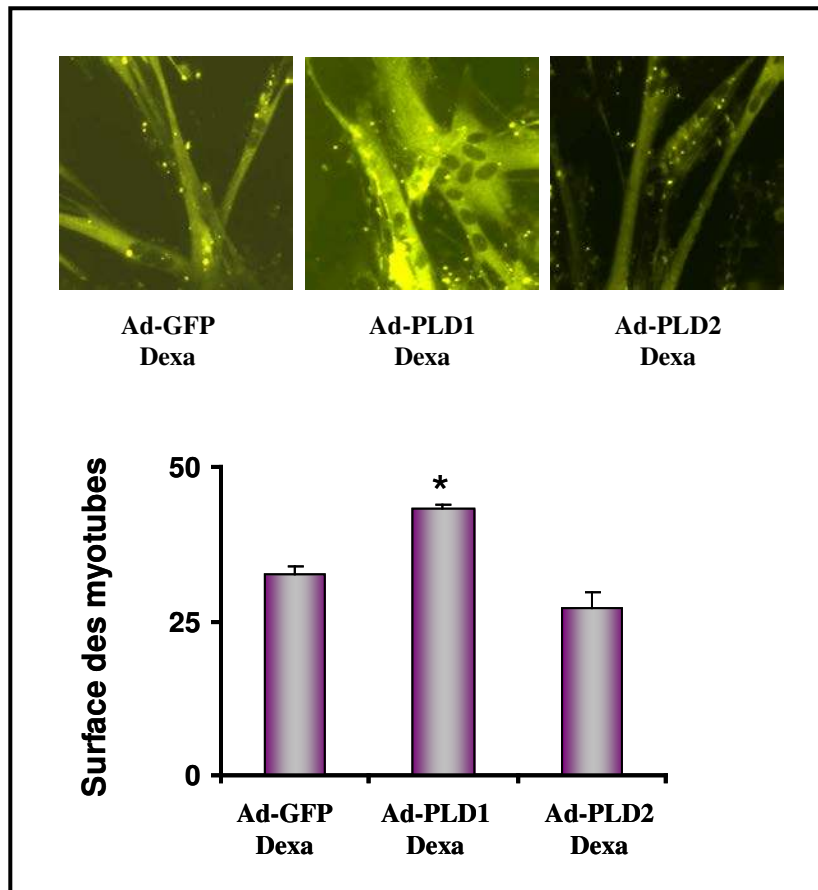


Figure 58 Réversion de l'effet de la dexaméthasone sur la surface des myotubes par la surexpression de la PLD : les myoblastes sont différenciés en myotubes pendant 6 jours en présence de 1% SVF et 10^{-7} AVP, puis les myotubes sont infectés avec les virus qui codent pour GFP, PLD1, ou PLD2 pendant 48h; ils sont ensuite traités avec 100 μ M de dexaméthasone. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-myosine et l'anticorps secondaire Alexa anti-IgG de souris qui permet la révélation par fluorescence au microscope. La surface des myotubes est mesurée à l'aide du logiciel image J. Elle est exprimée en % de la surface du champ. Le graphe représente la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. * différent du contrôle GFP, $p < 0,01$.

2.7- LA PLD inhibe l'expression des atrogènes stimulée par la dexaméthasone

Au niveau moléculaire, on a remarqué que le traitement par le PA ou l'AVP diminue l'expression des atrogènes (atrogine-1 et MurF1) induite par la dexaméthasone (Figure 59), ce qui peut contribuer à une diminution de la protéolyse expliquant l'effet protecteur de ces composés.

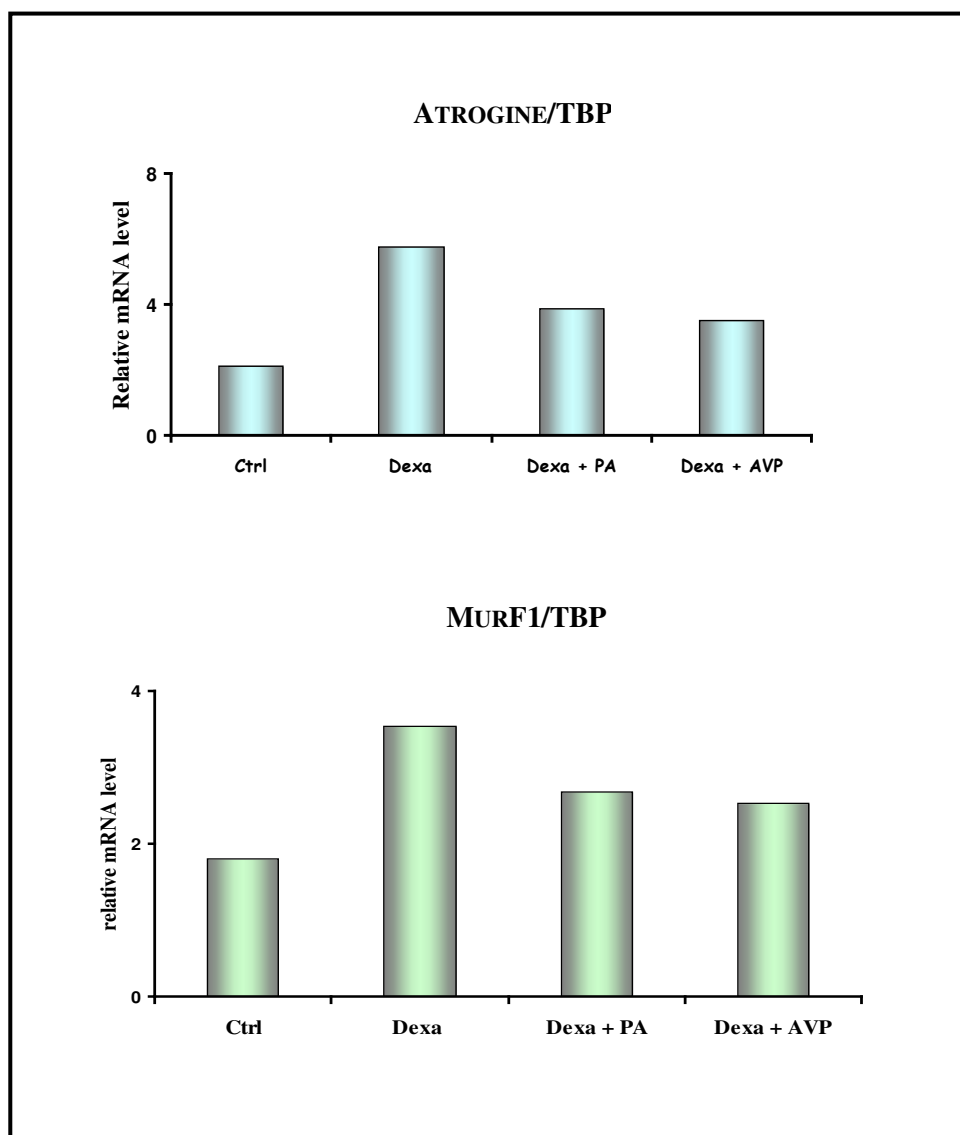


Figure 59 Effet de la dexaméthasone, du PA, de l'AVP sur l'expression des ubiquitine-ligases: les myoblastes sont différenciés pendant 6 jours en présence de 1% SVF et 10^{-7} M AVP, puis sont traités ou pas avec $100 \mu\text{M}$ de dexaméthasone, en présence ou pas de $100 \mu\text{M}$ de PA diC8, ou 10^{-7} M AVP; les ARN totaux sont ensuite extraits et les ARNm spécifiques de MuRF1 ou atrogine-1 sont dosés par RT-qPCR. Les valeurs sont la moyenne de deux mesures ne différant pas de plus de 10%.

2.8- Schéma récapitulant les résultats de la 2^e partie

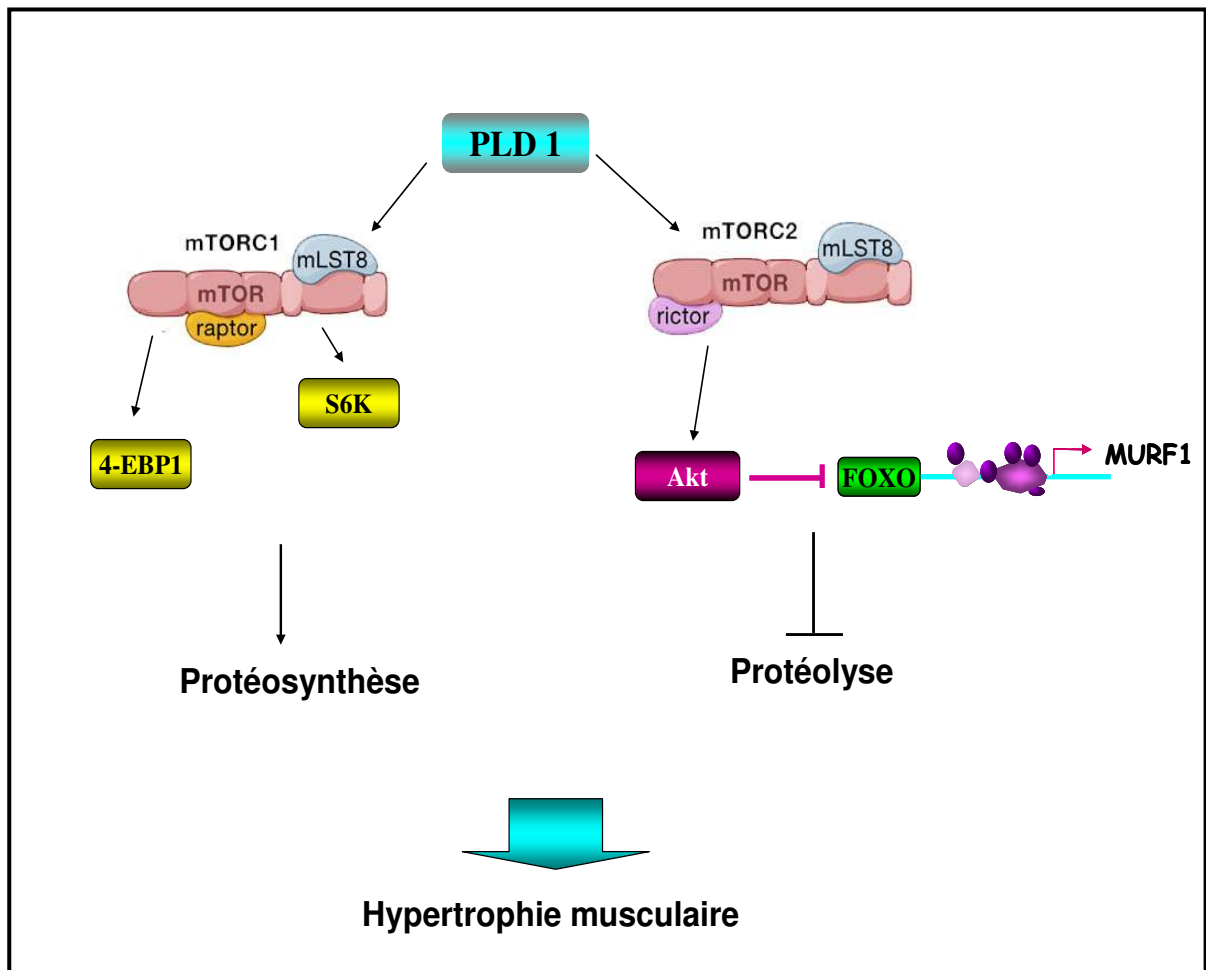


Figure 60 Schéma récapitulant les résultats de la partie PLD, mTOR et atrophie musculaire

CHAPITRE 7

DISCUSSION

PLD, mTOR et différenciation myogénique

La PLD, via son produit actif, l'acide phosphatidique, joue un rôle important dans divers processus biologiques comme l'exocytose, la phagocytose, la réorganisation du cytosquelette d'actine, la survie et la prolifération cellulaires, etc.

En ce qui concerne le tissu musculaire, la PLD est importante dans la différenciation *in vitro* des lignées myogéniques L6 (Komati et al., 2005) et C2C12 (Yoon and Chen, 2008), mais le mécanisme par lequel la PLD régule la différenciation des myoblastes n'est pas établi.

Régulation du complexe mTORC1 dans les myoblastes en cours de différenciation

Dans la présente étude, on a utilisé comme modèle cellulaire les myoblastes de rat L6, qu'on différencie dans un milieu sans sérum en présence d'AVP. L'AVP, via sa fixation sur des récepteurs à sept domaines transmembranaires, active diverses protéines G trimériques et déclenche toute une série de signaux cellulaires, impliquant les phospholipase A2, C, D. Notre équipe a montré précédemment que la différenciation des L6 stimulée par l'AVP est PLD-dépendante, et a proposé un mécanisme suivant lequel l'AVP pourrait induire la différenciation des myoblastes L6 (Komati et al., 2005), via l'activation séquentielle de G_{13} , de la petite protéine G Rho, et de la PLD.

Ghosh et al. ont montré que l'AVP stimule la phosphorylation de p70S6 kinase, qui est un effecteur du complexe mTORC1, dans les cellules mésangiale de rat (Ghosh et al., 2004). D'autre part, Sun et al. ont montré une interaction entre la PLD et la petite protéine G Rheb, qui est un activateur de la voie mTOR, et ont suggéré que la PLD est un effecteur de Rheb (Sun et al., 2008). De plus, la PLD est maintenant reconnue comme un des systèmes activateurs de mTOR.

Nous avons donc émis l'hypothèse que, dans notre modèle L6, la stimulation myogénique par l'AVP active la voie de signalisation de mTOR. Dans un premier temps, nous avons observé que l'AVP active la phosphorylation des deux isoformes p70 et p85 de S6 kinase 1, substrats de mTORC1, ce qui mettait en évidence l'activation de la voie mTORC1. Cependant, la réponse de S6 kinase apparaissait complexe, avec une phosphorylation rapide de p85 S6 kinase, maximale dès 10 min de traitement par l'AVP, et plus lente pour p70 S6 kinase, maximale après 40 min. De nombreuses études ont porté sur la régulation de l'isoforme p70 S6 kinase, mais rares sont les articles qui décrivent la régulation de p85 S6 kinase. Quelques études montrent une localisation nucléaire de p85 et cytoplasmique de p70 (Coffer and Woodgett, 1994; Kim and Kahn, 1997; (Kim et al., 2009; Reinhard et al., 1994), et suggèrent des rôles et des régulations différentes des isoformes, p85 ayant

notamment un rôle spécifique dans le contrôle de la mitose. Les deux isoformes semblent donc différemment régulées dans les myoblastes squelettiques, comme cela a été décrit dans les cardiomyocytes (Kenessey and Ojamaa, 2006; Laser et al., 1998).

Nous avons ensuite considéré l'implication de la PLD dans cette activation de S6 kinase par l'AVP, et montré, grâce à des expériences mettant en jeu l'inhibition de la PLD par le butanol ou par les ARNi, ou la surexpression de PLD par des adénovirus, ou en utilisant de l'acide phosphatidique exogène ou le propranolol, que la PLD est effectivement impliquée dans l'activation de la voie mTORC1/S6 kinase par l'AVP. Là également, il apparaît une régulation différentielle des deux isoformes de S6 kinase : la PLD semble avoir un effet plus marqué sur la phosphorylation de l'isoforme p85 S6 kinase.

La downrégulation par ARNi de l'expression de raptor, composant du complexe mTORC1, qui inhibe donc spécifiquement l'activité de ce complexe, diminue la phosphorylation des deux isoformes de S6 kinase induite par l'AVP, confirmant ainsi la médiation de mTORC1. Comme attendu, la rapamycine utilisée en traitement court (40 min), inhibiteur spécifique du complexe mTORC1, inhibe complètement la phosphorylation de p70 S6 kinase induite par l'AVP, le PA et le propranolol. Par contre, elle n'inhibe que partiellement celle de p85 S6 kinase, ce qui suggère que l'isoforme p85 S6 kinase est partiellement indépendante de la voie mTORC1. Une hypothèse est qu'elle pourrait être directement activée par l'acide phosphatidique. En effet, une activation directe de S6 kinase par le PA a été proposée par Lehman et al. (2007). Nous avons évalué la fixation du PA sur la S6 kinase recombinante (obtenue par transfection d'un vecteur exprimant les deux isoformes), et observé une fixation spécifique, qui permet de supposer que le PA se fixe effectivement sur S6 kinase, et potentiellement, sélectivement sur p85.

Ces résultats montrent que la voie mTORC1 est activée après stimulation de la différenciation des myoblastes par l'AVP, et que cette activation est PLD-dépendante. La régulation de mTOR par la PLD a été clairement mise en évidence. Notamment, Toschi et al. ont montré que l'acide phosphatidique produit par la PLD est nécessaire à l'assemblage des complexes mTORC1 et mTORC2 (Toschi et al., 2009). D'autres études ont montré par plusieurs techniques que l'acide phosphatidique est capable de se fixer directement sur le site FRB de la sous-unité mTOR (Toschi et al., 2009; Veverka et al., 2008). Il a été également montré que l'acide phosphatidique favorise l'oligomérisation de mTORC1 et mTORC2 et a ainsi un effet sur leur activité (Takahara et al., 2006). Cependant, malgré l'établissement d'un modèle tridimensionnel d'interaction de l'acide phosphatidique avec mTOR (Veverka et al., 2008), le mécanisme par lequel mTOR est activé n'est pas connu, aucun changement de conformation du domaine FRB n'étant observé (Veverka et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré dans les cellules endothéliales que le PA est nécessaire à la

translocation de mTORC2 au niveau des rafts membranaires, où le complexe est activé (Partovian et al., 2008).

Un résultat étonnant est l'effet du traitement de 24h par la rapamycine sur la phosphorylation de S6 kinase. La rapamycine utilisée pendant 24h inhibe mTORC1 et mTORC2. Comme observé lors d'un traitement court, elle inhibe complètement p70 S6 kinase, mais elle augmente au contraire la phosphorylation de p85 S6 kinase. Comme on a fait l'hypothèse que p85 S6 kinase pourrait être directement activée par la PLD, on a supposé l'existence d'une régulation négative de l'activité PLD par mTORC2. Pour le vérifier, on a dosé l'activité PLD après inhibition de mTORC2 par 24 h de rapamycine, et on a observé une stimulation de 30%. Cette régulation intervient au niveau post-traductionnel et non transcriptionnel, puisque il y n'y a aucun changement d'expression de l'ARNm. Cette régulation de la PLD par mTORC2 n'a jamais été décrite, et ajoute un degré de complexité à ce système. Il est connu que la phosphorylation par la PKC α est capable d'inhiber PLD1 (Hu and Exton, 2003). Comme il est également connu que PKC α est un effecteur direct de mTORC2, une inhibition de PLD1 par PKC α pourrait expliquer la boucle de rétrocontrôle négatif de mTORC2 sur la PLD.

Régulation du complexe mTORC2 dans les myoblastes en cours de différenciation

Pour vérifier dans notre modèle de myoblastes L6 stimulés par l'AVP que le complexe mTORC2 est lui aussi activé, nous avons observé l'état de phosphorylation de Akt, dont le résidu S473 est une cible directe de mTORC2. Les résultats obtenus montrent que l'AVP induit la phosphorylation d'Akt, et que cette réponse est inhibée par la downrégulation de Rictor, et par un traitement long à la rapamycine, et est donc mTORC2-dépendante. On a également montré que la phosphorylation d'Akt est PLD1-dépendante.

La stimulation de la phosphorylation d'Akt par l'AVP a été décrite dans les cellules aortiques de l'embryon de rat A10. La régulation d'Akt par la PLD a été décrite dans d'autre modèle cellulaire comme les lignées 786-O et MDA-MB-231 (Toschi et al., 2009). Nos résultats permettent d'étendre ces observations aux cellules myogéniques.

Rôles de mTORC1 et mTORC2 dans la myogénèse

Comme montré dans la littérature, la différenciation myogénique est dépendante de mTOR parce que, ainsi que nous l'avons vérifié dans notre modèle, la rapamycine inhibe complètement la différenciation myogénique (Cuenda and Cohen, 1999).

Le lien entre mTOR et la différenciation myogénique n'est pas encore clarifié, et notamment, la nature du complexe mTOR qui est impliqué est controversée.

D'après la littérature, mTOR affecterait la différenciation via l'activation de p38-MAP kinase (Cuenda and Cohen, 1999), ou de la kinase cycline-dépendante 5 (Sarker and Lee, 2004). Le groupe de Chen a montré que mTOR contrôle la différenciation myogénique indépendamment de son activité kinase, en permettant l'expression de IGF-2 qui agit d'une façon autocrine sur les cellules. La rapamycine bloquerait la différenciation myogénique en supprimant la synthèse de IGF2 (Erbay and Chen, 2001).

Initialement, les effets inhibiteurs de la rapamycine ont été décrits comme spécifiques du complexe mTORC1, mTORC2 étant considéré comme résistant, ainsi que le dénote le terme Rictor, qui signifie "Rapamycin Insensitive Companion of TOR". Sarbassov et al. ayant montré en 2006 que la rapamycine peut inhiber aussi le complexe mTORC2, la question s'est alors posée de savoir lequel des deux complexes est impliqué dans la différenciation myogénique.

Les études qui répondent à cette question sont rares. Récemment une étude a montré que dans les C2C12 la rapamycine inhibe la différenciation en inhibant mTORC2, qui induirait la différenciation via Akt, la kinase Rho-dépendante ROCK1, et FoxO1 (Shu and Houghton, 2009).

Dans notre modèle de cellules L6, pour distinguer le complexe qui est impliqué dans la myogénèse, on a eu recours aux ARNi, pour inhiber le complexe mTORC1 en downrégulant raptor, et inhiber le complexe mTORC2 en downrégulant rictor. En accord avec Shu et Houghton, nos résultats montrent clairement que le complexe mTORC2 a un rôle positif dans la différenciation, parce que la downrégulation de rictor inhibe l'expression de la myogénine et son accumulation nucléaire.

A l'opposé, la downrégulation de raptor a un effet positif sur la différenciation myogénique. Ce résultat a été confirmé en surexprimant l'effecteur de mTORC1 S6 kinase. Cette surexpression inhibe l'expression de la myogénine, et également l'expression de la troponine qui est un marqueur tardif de la différenciation myogénique. Ceci va dans le sens d'un rôle négatif de mTORC1 dans la différenciation myogénique, médié par S6 kinase. Cette observation est entièrement nouvelle. Elle pose plusieurs questions: comment s'exerce l'effet négatif de mTORC1 ? Comment, en réponse à l'activation de PLD par l'AVP, l'activation de mTORC1 régulateur négatif, et de mTORC2, régulateur positif, résulte-t-elle en la différenciation ?

mTORC1 inhibe mTORC2

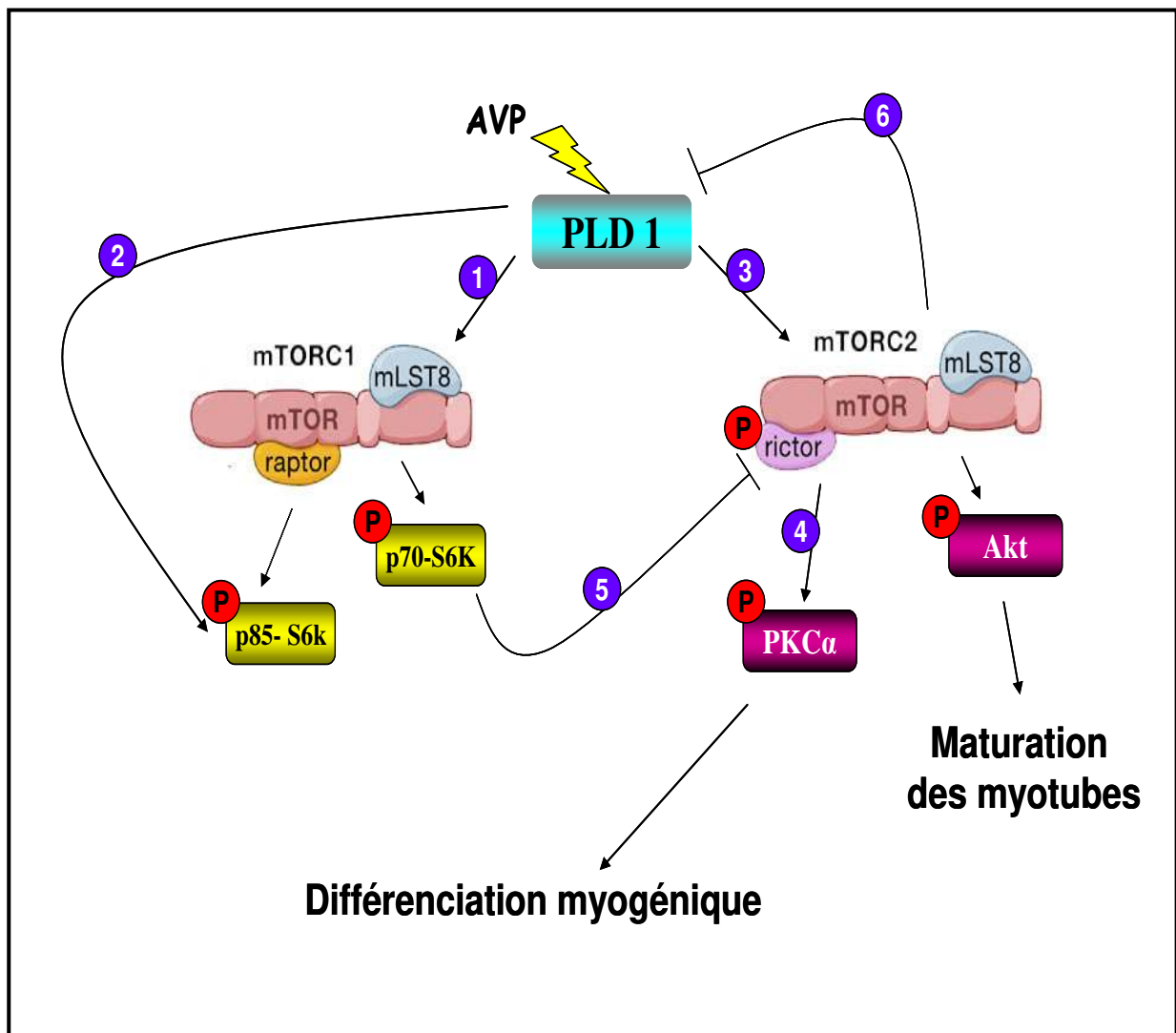
Les équipes de Dibble et de Julien, ont montré, en 2009, que S6 kinase inhibe le complexe mTORC2 en phosphorylant rictor au niveau de la thréonine 1135 (Dibble et al., 2009; Julien et al., 2009). Nous avons donc évalué la phosphorylation de Rictor en réponse à l'AVP, et observé une stimulation rapide, compatible avec un effet médié par mTORC1/S6 kinase. Cette interprétation est confirmée par une augmentation de la phosphorylation de T1135 après surexpression de S6 kinase. Ces résultats montrent qu'une boucle de retrocontrôle négatif exercée par mTORC1 sur mTORC2 pourrait expliquer les effets négatifs de mTORC1 sur la différenciation. On peut donc considérer que la voie mTORC1 sert de "frein" à l'effet pro-myogénique de la voie mTORC2.

mTORC2 stimule la différenciation via PKC α

Dans le modèle C2C12, Akt joue un rôle important dans l'initiation de la différenciation myogénique. Ce rôle d'Akt est moins évident dans notre modèle cellulaire : la surexpression d'Akt n'a pas d'effet sur la différenciation, les inhibiteurs de PI3K n'ont d'effet sur la différenciation qu'à forte dose, non spécifiques. De plus, la surexpression d'une forme KD (kinase dead) de PI3K n'inhibe pas la différenciation, et la surexpression d'une forme constitutivement active de PI3K a peu d'effet. Nous en déduisons que dans les L6 Akt n'est pas impliquée dans l'initiation de la différenciation, mais pourrait plutôt jouer un rôle plus tardivement, dans la maturation des myotubes ou dans le maintien du phénotype différencié.

D'autres effecteurs de mTORC2 ont été identifiés (Huang and Manning, 2009), qui pourraient être impliqués dans la différenciation myogénique. Notamment PKC α , qui d'après une ancienne étude de l'équipe est impliquée dans la réponse myogénique (Komati et al., 2004). Nous avons donc étudié l'implication de PKC α dans notre système, et observé une stimulation de la phosphorylation de la sérine 657, connue pour être médiée par mTORC2 (Sarbasov et al., 2004), au cours de la différenciation. Cette phosphorylation est importante pour la stabilité et l'activité de cette protéine (Ikenoue et al., 2008). De plus, la downrégulation de PKC α par un ARNi spécifique inhibe fortement l'expression de la myogénine, ce qui montre que PKC α est indispensable à la différenciation myogénique. Donc on peut proposer un modèle dans lequel mTORC2 active la différenciation myogénique via PKC α . En accord avec ce modèle, nos résultats montrent un effet négatif de la surexpression de S6 kinase sur la phosphorylation de PKC α au niveau de la sérine 657.

Un schéma récapitulatif nos observations et nos hypothèses est le suivant:



1: le PA produit par l'action de PLD se fixe sur, et active, mTORC1. A son tour, ce complexe active S6K1, en particulier l'isoforme p70. **2:** PA pourrait aussi agir directement sur l'isoforme p85 S6K1. **3:** PA active aussi mTORC2. **4:** ce complexe assure alors la phosphorylation d'Akt sur S473, et via l'activation d'un autre effecteur, vraisemblablement PKCα, induit l'expression de myogénine et la différenciation myogénique précoce. L'activation d'Akt pourrait plutôt influencer sur la maturation des myotubes. **5:** mTORC1 exerce un effet négatif sur mTORC2, médié par S6K1, vraisemblablement par phosphorylation de Rictor sur T1135. **6:** mTORC2 exerce un effet négatif sur PLD, et en conséquence sur l'activation directe de p85-S6K1 par le PA.

PLD, atrophie et hypertrophie musculaires

La PLD est importante dans la différenciation myogénique, mais son rôle éventuel dans le contrôle de la masse musculaire n'est pas connu. Une équipe a toutefois impliqué la PLD dans la réponse du muscle à une stimulation mécanique, suggérant un rôle dans l'hypertrophie liée à l'exercice (Hornberger and Chien, 2006; Hornberger et al., 2006a; Hornberger et al., 2001; Hornberger et al., 2004; Hornberger et al., 2006b). La capacité de la PLD à réguler mTOR et ses effecteurs régulateurs de la traduction protéique S6 kinase et 4E-BP1, ainsi que le principal régulateur de la protéolyse Akt, nous a incités à considérer son influence sur la masse musculaire.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons étudié le rôle de la PLD sur la taille de la cellule musculaire, en évaluant l'impact de la modulation de l'activité PLD sur des myotubes L6 en culture.

La PLD joue un rôle important dans le maintien de la taille des cellules musculaires

Nous avons d'abord montré que le butanol-1, qui bloque spécifiquement la production de l'acide phosphatidique par la PLD, a un effet négatif sur la surface des myotubes, ce qui suggère un effet positif de la PLD sur la taille des myotubes. Le traitement des myotubes par le butanol-1 diminue également leur activité créatine kinase, qui est un marqueur de la fonctionnalité des myotubes différenciés. Ces résultats sont cohérents avec une étude portant sur les effets négatifs de l'éthanol, qui, en tant qu'alcool primaire, est comme le butanol substrat de la PLD. Cette étude montre que chez la souris l'éthanol aggrave l'état atrophique de muscles immobilisés en stimulant la dégradation protéique, via une forte activation de la voie ubiquitine-protéasome et une forte inhibition de la voie mTOR (Vargas and Lang, 2008). Une autre étude de la même équipe a montré que l'injection intrapéritonéale d'éthanol induit une augmentation de l'expression de REDD1, qui inhibe la voie mTOR et en conséquence 4-EBP1, S6 kinase, et la synthèse protéique (Lang et al., 2008). De même, des études de 1987 ont montré que 40% à 60% des patients alcooliques ont des problèmes au niveau des muscles squelettiques (Trounce et al., 1987).

Au niveau moléculaire, nos observations de l'effet du butanol sur les myotubes sont similaires à celles publiées par l'équipe de Lang pour l'éthanol, c'est à dire une inhibition de la voie mTOR notamment une diminution de la phosphorylation de S6 kinase et de 4-EBP1.

L'implication de la PLD dans le contrôle de la taille des myotubes est confirmée et précisée par l'effet de la downrégulation, induite par ARNi, des deux isoformes de PLD: la déplétion de

PLD1, mais pas celle de PLD2, provoque une diminution de la surface des myotubes. D'autre part, la surexpression de l'isoforme PLD1 augmente la surface des myotubes, PLD2 n'ayant pas d'effet.

Ces résultats suggèrent une influence importante de la PLD sur la masse musculaire, et pourraient expliquer les effets atrophiques de l'éthanol chez les souris, et les problèmes musculaires observés chez les alcooliques.

Le maintien de la masse musculaire résulte d'un équilibre délicat entre synthèse et dégradation des protéines. Les protéines myofibrillaires représentant 85 % du volume d'une fibre, toute modification dans la teneur de ces protéines a des répercussions sur la taille des fibres. Nous vérifions que l'inhibition de la PLD par le butanol-1 provoque une diminution drastique de la quantité de myosine, dosée par ELISA, ce qui traduit une atrophie marquée. La réduction de l'expression des protéines sarcomériques peut résulter soit d'une augmentation de leur dégradation, soit d'une diminution de leur synthèse.

La PLD et la synthèse protéique

L'implication de la voie mTOR dans le contrôle de la masse musculaire a été largement étudiée. Park et al., par exemple, ont montré que l'hypertrophie des myocytes nécessite l'activité kinase de mTOR et de S6 kinase (Park et al., 2005). De même, Ohanna et al. ont montré que les myotubes S6K1^{-/-} sont plus petits que les myotubes sauvages, bien qu'ils aient le même nombre de noyaux (Ohanna et al., 2005). Nos résultats montrent une stimulation de la voie mTORC1 par la PLD dans les myotubes L6, notamment une augmentation de la phosphorylation des deux isoformes de S6 kinase sous l'effet de la surexpression de PLD1. S6 kinase contrôlant positivement la synthèse protéique, ceci pourrait expliquer les effets hypertrophique de la surexpression de PLD1.

La PLD et la protéolyse

Il est communément admis que l'atrophie musculaire résulte principalement d'une dégradation massive des protéines myofibrillaires, via l'activation du système ubiquitine-protéasome, composant majeur de la machinerie protéolytique des cellules eucaryotes. Deux principaux acteurs de la protéolyse au cours de l'atrophie musculaire sont les ubiquitine-ligases MAFbx/Atrogine-1 et MuRF-1 (Bodine et al., 2001). L'expression de ces deux facteurs atrogènes est en effet fortement activée au cours de la plupart des situations d'atrophie comme la décharge, la dénervation, l'administration de glucocorticoïdes ou la cachexie associée au cancer ou au diabète. Parmi les cibles directes décrites de MAFbx/Atrogine-1 et MuRF-1, on trouve les protéines myofibrillaires Troponine

I et Titine, ainsi que MyoD (Lagirand-Cantaloube et al., 2009). Leur expression est principalement régulée par les facteurs de transcription FOXO (Sandri et al., 2004).

L'inhibition ou la downrégulation de la PLD dans des myotubes L6 provoquent une importante atrophie, mais n'induisent pas de variations d'expression de MAFbx/Atrogine-1. Nous observons par contre une augmentation de l'expression de MuRF-1, ainsi que de FOXO, notamment FOXO3 (résultat non montré). Cependant, la régulation des facteurs FOXO se fait largement par phosphorylation/déphosphorylation, et nous n'avons pas évalué leur statut de phosphorylation, un effet de PLD sur leur phosphorylation n'est donc pas exclu. De manière cohérente, la surexpression de PLD inhibe l'expression de MuRF1.

Une autre voie de signalisation a été décrite pour réguler MuRF-1 : la voie NFκB, activée notamment par la cytokine pro-inflammatoire TNFα. L'activation de la voie NFκB provoque une atrophie sévère, observée notamment chez les souris MIKK, exprimant une forme constitutivement active de la kinase IκB Kinase β, contrôlant l'activation de NFκB (Cai et al., 2004). La PLD pourrait aussi réguler l'expression de MuRF1 via l'inhibition de la voie NFκB, ce qui reste à vérifier.

L'activité de FOXO est sous le contrôle de la voie PI3 Kinase-Akt. Cette voie joue un rôle central dans le maintien de la masse musculaire, à la fois en stimulant la synthèse protéique via l'activation de mTORC1, et en prévenant la dégradation protéique en inhibant l'activité de FOXO. Cette voie est donc associée à la croissance cellulaire et au contrôle de la taille des organes dans de nombreux modèles.

Nos résultats montrent que la surexpression de PLD1 augmente la phosphorylation d'Akt au niveau de Ser 473. Cette activation d'Akt pourrait expliquer à la fois la baisse de l'expression de MuRF1 et l'augmentation de la phosphorylation de S6 kinase, et ainsi être à l'origine de l'effet hypertrophique de la PLD. En se basant sur les observations faites sur les myoblastes, on peut supposer que PLD1 active Akt en activant mTORC2, dont Akt est une cible.

La PLD et les glucocorticoïdes

Au vu des effets de la PLD sur la taille des cellules musculaires, nous avons voulu évaluer ses effets dans des conditions mimant une situation pathologique d'atrophie. La dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, induit, comme attendu, une diminution de la surface des myotubes L6, ainsi qu'une diminution de leur activité créatine kinase, ce qui permet de valider un modèle in vitro d'atrophie. L'ajout de PA exogène, le produit actif de la PLD, inhibe partiellement les effets atrophiques de la dexaméthasone. De même, le traitement par l'AVP, agoniste de la PLD, limite les

effets négatifs de la dexaméthasone, ce qui va dans le sens d'un effet protecteur de la PLD contre l'atrophie musculaire induite par la dexaméthasone. Cet effet est confirmé par la surexpression de PLD1 en présence de dexaméthasone.

Les glucocorticoïdes conduisent à l'atrophie musculaire en augmentant la protéolyse et diminuant la synthèse protéique (Lofberg et al., 2002; Schakman et al., 2008). Ils agissent par plusieurs mécanismes : inhibition du transport des acides aminés, inhibition de l'action de l'insuline et des IGF, donc en aval de la kinase mTOR, stimulation des atrogènes, etc. Par ailleurs, les glucocorticoïdes inhibent la myogénèse via la downrégulation de l'expression de la myogénine (Schakman et al., 2008).

La PLD module ces mécanismes, que ce soit la voie mTOR ou l'expression de la myogénine, d'une façon opposée aux glucocorticoïdes. On a notamment montré que la PLD est capable d'inhiber l'induction de l'expression de MuRF1 et atrogine-1 par la dexaméthasone, ce qui permet d'expliquer au moins en partie ses effets protecteurs. Par ailleurs, nous avons constaté que le traitement des myotubes L6 par la dexaméthasone stimule fortement (3-5 fois) l'expression de PLD1 en 48 heures (résultat non montré). Cette stimulation semble pouvoir s'interpréter comme un rétro-contrôle cellulaire permettant de limiter l'effet atrophique du corticoïde. Nous pouvons en conclure que PLD et glucocorticoïdes interfèrent à plusieurs niveaux dans la régulation du tissu musculaire.

CHAPITRE 8

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

mTOR, PLD, et différenciation myogénique

Dans la première partie de cette thèse, nous avons confirmé, grâce au modèle *in vitro* des cellules L6 stimulées par l'AVP, un rôle important de la PLD dans la différenciation myogénique, et montré que cette action implique la régulation des complexes mTORC1 et mTORC2. Nous montrons, en accord avec d'autres, que mTORC2 active la différenciation myogénique, et nous proposons un nouveau mode d'action pour mTORC2, faisant intervenir PKC α . Nous montrons de plus que mTORC1 assure une nouvelle fonction, la régulation négative de la différenciation. Nos résultats suggèrent qu'elle s'exerce via l'inhibition de mTORC2, médiée par la phosphorylation S6 kinase-dépendante de rictor. De plus, nous apportons des arguments suggérant l'existence de régulations nouvelles de plusieurs acteurs du système, telles qu'une activation directe de l'isoforme p85-S6 kinase par le PA, et un rétro-contrôle négatif de la PLD par mTORC2.

Pour prolonger ce travail, dans un premier temps, il conviendra de préciser le rôle de PKC α . Pour conforter l'hypothèse de son implication dans la réponse myogénique en tant qu'effecteur de mTORC2, il faudra rechercher l'impact de l'extinction de rictor sur sa phosphorylation et son activité, identifier ses substrats impliqués lors de la réponse myogénique, observer les effets de sa surexpression. Comme nous faisons l'hypothèse, pour expliquer l'effet négatif de mTORC2 sur l'activité PLD, d'une phosphorylation de l'isoforme PLD1, il conviendra aussi d'évaluer la phosphorylation des sites de PLD1 ciblés par PKC α .

Nos résultats ont montré qu'un acteur négatif de la différenciation myogénique est la S6 kinase 1. On a pu montrer une régulation différentielle des deux isoformes de S6 kinase. Il serait donc intéressant de rechercher si chaque isoforme a un rôle particulier dans la différenciation myogénique, en les surexprimant séparément à l'aide de vecteurs mutants que nous avons déjà construits.

Ces vecteurs nous permettront en outre d'étudier la fixation directe de PA sur chacune des isoformes de S6 kinase, afin de vérifier notre hypothèse d'une activation préférentielle de p85-S6 kinase par fixation du PA.

Le mécanisme par lequel mTORC1 régule négativement la différenciation myogénique semble être la phosphorylation, médiée par S6 kinase, de rictor sur T1135. Pour

le vérifier, il pourrait être intéressant de surexprimer une forme mutée de rictor, dans laquelle ce site de phosphorylation serait supprimé, ou dans laquelle une mutation phosphomimétique serait introduite, et d'en rechercher l'impact sur la réponse myogénique.

mTOR, PLD et atrophie musculaire

Effet de la PLD sur la taille des cellules musculaires in vitro

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de la PLD dans le contrôle de la taille des cellules musculaires in vitro, et montré que l'inhibition de la production d'acide phosphatique induit une atrophie. Ces effets atrophiques ont été trouvés également après déplétion de l'isoforme PLD1, alors que la surexpression de cette isoforme induit une hypertrophie musculaire. Ces données mettent en évidence un nouveau rôle de la PLD, et suggèrent fortement son implication dans le contrôle de la masse musculaire.

Au niveau moléculaire, nous avons montré que la PLD augmente la phosphorylation des deux isoformes de S6 kinase, effecteurs de mTORC1, et de Akt, effecteur de mTORC2. Il serait important, dans un premier temps, d'examiner l'effet de la downrégulation ou de la surexpression des deux complexes mTOR et de leurs effecteurs, pour identifier leurs rôles dans le contrôle de la masse musculaire. En outre, nous avons observé des effets de la PLD sur l'expression des ubiquitine-ligases muscle-spécifiques. Pour en préciser le mécanisme, nous rechercherons les effets de la PLD sur l'état de phosphorylation des protéines FOXO, et l'état d'activation de la voie NF- κ B.

Il est connu que la PLD et la voie mTOR jouent un rôle important dans la survie cellulaire et le contrôle de l'apoptose. Comme l'apoptose intervient comme un des paramètres de l'atrophie musculaire, il serait judicieux d'évaluer l'apoptose des cellules musculaires en situation d'atrophie, notamment en présence de dexaméthasone, après downrégulation ou surexpression de la PLD.

Il semble aussi intéressant, pour préciser le mode d'action de la PLD sur la taille des myotubes en culture, d'établir ses effets sur la synthèse et la dégradation protéique, et donc de quantifier ces paramètres par des techniques de marquage des cellules avec la tyrosine radio-marquée disponibles au laboratoire, après surexpression ou downrégulation de la PLD. Pour

compléter cette caractérisation, il faut aussi envisager d'évaluer l'effet de la PLD sur les marqueurs de l'autophagie induits par la dexaméthasone, ce processus jouant un rôle important dans l'atrophie musculaire.

Effet de la PLD sur la masse musculaire in vivo :

Les résultats obtenus in vitro suggèrent que la PLD est un facteur protecteur contre l'atrophie musculaire, et pourrait donc être une cible intéressante pour des actions visant à préserver le muscle dans les situations d'hyper-catabolisme. Pour approfondir cette question, nous envisageons d'évaluer in vivo l'effet de la surexpression de PLD1 et PLD2 dans le muscle de souris. La surexpression de la PLD sera réalisée par injection des vecteurs adénoviraux directement dans le tibialis d'animaux non traités, ou soumis à une atrophie musculaire par traitement à la dexaméthasone, ou immobilisation d'un membre. Les conséquences sur le poids des muscles et sur la taille des fibres seront évaluées. Un éventuel effet préférentiel sur un type particulier de fibres musculaire sera recherché.

Si, comme nous l'espérons, l'action anti-atrophique ou hypertrophique de la PLD peut être mise en évidence in vivo, nous rechercherons si les voies de mTORC1 et de mTORC2 sont affectées dans le tissu musculaire.

Une autre approche de l'étude in vivo des effets de la PLD sur le tissu musculaire consistera à injecter dans le muscle de l'acide phosphatidique "cell-permeant", ou des analogues stables de ce composé, chez des animaux témoins ou atrophiés.

La confirmation in vivo d'un rôle bénéfique sur le muscle de la surexpression de PLD, ou de l'injection de son produit enzymatique, permettrait d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques pour le traitement des patients subissant une fonte musculaire, dans les situations de cachexie, sarcopénie, etc. Il est en effet reconnu que, dans de multiples pathologies, l'atrophie musculaire est un facteur aggravant majeur, et des travaux sur modèles murins ont récemment montré que la réversion de la perte de masse musculaire confère un allongement spectaculaire de la survie à des animaux porteurs de tumeur, confirmant l'intérêt de cette approche (Zhou et al., 2010)

BIBLIOGRAPHIE

A.

- Adams, C. M. (2007). Role of the transcription factor ATF4 in the anabolic actions of insulin and the anti-anabolic actions of glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry* 282, 16744-16753.
- Adams, G. R., and McCue, S. A. (1998). Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* 84, 1716-1722.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* 7, 261-269.
- Allen, D. L., Linderman, J. K., Roy, R. R., Grindeland, R. E., Mukku, V., and Edgerton, V. R. (1997). Growth hormone/IGF-I and/or resistive exercise maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscles. *J Appl Physiol* 83, 1857-1861.
- Andrade, M. A., and Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature genetics* 11, 115-116.
- Aronova, S., Wedaman, K., Aronov, P. A., Fontes, K., Ramos, K., Hammock, B. D., and Powers, T. (2008). Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2. *Cell metabolism* 7, 148-158.
- Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschlager, M., Ruther, U., and Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *The EMBO journal* 17, 6289-6299.
- Atherton, P. J., Babraj, J., Smith, K., Singh, J., Rennie, M. J., and Wackerhage, H. (2005). Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *Faseb J* 19, 786-788.
- Awede, B., Thissen, J., Gailly, P., and Lebacqz, J. (1999). Regulation of IGF-I, IGFBP-4 and IGFBP-5 gene expression by loading in mouse skeletal muscle. *FEBS letters* 461, 263-267.

B.

- Bae, C. D., Min, D. S., Fleming, I. N., and Exton, J. H. (1998). Determination of interaction sites on the small G protein RhoA for phospholipase D. *The Journal of biological chemistry* 273, 11596-11604.
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75, 73-82.
- Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2004). Initiating cellular stress responses. *Cell* 118, 9-17.
- Barton-Davis, E. R., Shoturma, D. I., Musaro, A., Rosenthal, N., and Sweeney, H. L. (1998). Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15603-15607.
- Barton, E. R. (2006). Viral expression of insulin-like growth factor-I isoforms promotes different responses in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 100, 1778-1784.
- Barton, E. R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N., and Sweeney, H. L. (2002). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *The Journal of cell biology* 157, 137-148.

- Bayol, S., Loughna, P. T., and Brownson, C. (2000). Phenotypic expression of IGF binding protein transcripts in muscle, in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 273, 282-286.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L., and Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49-59.
- Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V. J., Tapscott, S. J., Weintraub, H., and Verma, I. M. (1992). Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell* 68, 507-519.
- Bentzinger, C. F., Romanino, K., Cloetta, D., Lin, S., Mascarenhas, J. B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C. F., Brink, M., *et al.* (2008). Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell metabolism* 8, 411-424.
- Bhattacharya, M., Babwah, A. V., Godin, C., Anborgh, P. H., Dale, L. B., Poulter, M. O., and Ferguson, S. S. (2004). Ral and phospholipase D2-dependent pathway for constitutive metabotropic glutamate receptor endocytosis. *J Neurosci* 24, 8752-8761.
- Black, B. L., Martin, J. F., and Olson, E. N. (1995). The mouse MRF4 promoter is trans-activated directly and indirectly by muscle-specific transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 270, 2889-2892.
- Boarder, M. R. (1994). A role for phospholipase D in control of mitogenesis. *Trends in pharmacological sciences* 15, 57-62.
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J. C., Glass, D. J., and Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology* 3, 1014-1019.
- Bois, P. R., and Grosveld, G. C. (2003). FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts. *The EMBO journal* 22, 1147-1157.
- Bosotti, R., Isacchi, A., and Sonhammer, E. L. (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends in biochemical sciences* 25, 225-227.
- Braun, T., and Arnold, H. H. (1995). Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *The EMBO journal* 14, 1176-1186.
- Braun, T., Rudnicki, M. A., Arnold, H. H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71, 369-382.
- Breitbart, R. E., Liang, C. S., Smoot, L. B., Laheru, D. A., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1993). A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage. *Development (Cambridge, England)* 118, 1095-1106.
- Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., and Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369, 756-758.
- Brown, F. D., Thompson, N., Saqib, K. M., Clark, J. M., Powner, D., Thompson, N. T., Solari, R., and Wakelam, M. J. (1998). Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. *Curr Biol* 8, 835-838.
- Brunn, G. J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J. C., Jr., and Abraham, R. T. (1996). Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *The EMBO journal* 15, 5256-5267.
- Bryan, B. A., Li, D., Wu, X., and Liu, M. (2005). The Rho family of small GTPases: crucial regulators of skeletal myogenesis. *Cell Mol Life Sci* 62, 1547-1555.

- Buchberger, A., Ragge, K., and Arnold, H. H. (1994). The myogenin gene is activated during myocyte differentiation by pre-existing, not newly synthesized transcription factor MEF-2. *The Journal of biological chemistry* 269, 17289-17296.
- Buijs, R. M., Swaab, D. F., Dogterom, J., and van Leeuwen, F. W. (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell and tissue research* 186, 423-433.

C.

- Cai, D., Frantz, J. D., Tawa, N. E., Jr., Melendez, P. A., Oh, B. C., Lidov, H. G., Hasselgren, P. O., Frontera, W. R., Lee, J., Glass, D. J., and Shoelson, S. E. (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119, 285-298.
- Calnan, D. R., and Brunet, A. (2008). The FoxO code. *Oncogene* 27, 2276-2288.
- Carnac, G., Primig, M., Kitzmann, M., Chafey, P., Tuil, D., Lamb, N., and Fernandez, A. (1998). RhoA GTPase and serum response factor control selectively the expression of MyoD without affecting Myf5 in mouse myoblasts. *Molecular biology of the cell* 9, 1891-1902.
- Carracedo, A., and Pandolfi, P. P. (2008). The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27, 5527-5541.
- Castro, A. F., Rebhun, J. F., Clark, G. J., and Quilliam, L. A. (2003). Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 278, 32493-32496.
- Caumont, A. S., Galas, M. C., Vitale, N., Aunis, D., and Bader, M. F. (1998). Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *The Journal of biological chemistry* 273, 1373-1379.
- Cazzolli, R., Shemon, A. N., Fang, M. Q., and Hughes, W. E. (2006). Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB life* 58, 457-461.
- Chai, J., and Tarnawski, A. S. (2002). Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol* 53, 147-157.
- Chambers, A. E., Logan, M., Kotecha, S., Towers, N., Sparrow, D., and Mohun, T. J. (1994). The RSRF/MEF2 protein SL1 regulates cardiac muscle-specific transcription of a myosin light-chain gene in *Xenopus* embryos. *Genes & development* 8, 1324-1334.
- Cheadle, J. P., Reeve, M. P., Sampson, J. R., and Kwiatkowski, D. J. (2000). Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Human genetics* 107, 97-114.
- Cheatham, B., Vlahos, C. J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., and Kahn, C. R. (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Molecular and cellular biology* 14, 4902-4911.
- Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K. L., Liu, Y., and Zheng, P. (2008). TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *The Journal of experimental medicine* 205, 2397-2408.
- Chen, J., and Fang, Y. (2002). A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochemical pharmacology* 64, 1071-1077.
- Chen, W. S., Xu, P. Z., Gottlob, K., Chen, M. L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., *et al.* (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & development* 15, 2203-2208.

- Chen, Y., Rodrik, V., and Foster, D. A. (2005). Alternative phospholipase D/mTOR survival signal in human breast cancer cells. *Oncogene* 24, 672-679.
- Chen, Y., Zheng, Y., and Foster, D. A. (2003). Phospholipase D confers rapamycin resistance in human breast cancer cells. *Oncogene* 22, 3937-3942.
- Chen, Y. G., Siddhanta, A., Austin, C. D., Hammond, S. M., Sung, T. C., Frohman, M. A., Morris, A. J., and Shields, D. (1997). Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *The Journal of cell biology* 138, 495-504.
- Cheng, S. W., Fryer, L. G., Carling, D., and Shepherd, P. R. (2004). Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *The Journal of biological chemistry* 279, 15719-15722.
- Chong, L. D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G. M., and Schwartz, M. A. (1994). The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 79, 507-513.
- Chung, J., Grammer, T. C., Lemon, K. P., Kazlauskas, A., and Blenis, J. (1994). PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 370, 71-75.
- Cobb, L. J., Salih, D. A., Gonzalez, I., Tripathi, G., Carter, E. J., Lovett, F., Holding, C., and Pell, J. M. (2004). Partitioning of IGF1R actions in myogenesis: IGF-independent anti-apoptotic function. *Journal of cell science* 117, 1737-1746.
- Codogno, P., and Meijer, A. J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell death and differentiation* 12 Suppl 2, 1509-1518.
- Colley, W. C., Sung, T. C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S. M., Altshuler, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A. J., and Frohman, M. A. (1997). Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol* 7, 191-201.
- Coolican, S. A., Samuel, D. S., Ewton, D. Z., McWade, F. J., and Florini, J. R. (1997). The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 272, 6653-6662.
- Cross, M. J., Roberts, S., Ridley, A. J., Hodgkin, M. N., Stewart, A., Claesson-Welsh, L., and Wakelam, M. J. (1996). Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D. *Curr Biol* 6, 588-597.
- Cuenda, A., and Cohen, P. (1999). Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *The Journal of biological chemistry* 274, 4341-4346.
- Cunningham, J. T., Rodgers, J. T., Arlow, D. H., Vazquez, F., Mootha, V. K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450, 736-740.

D.

- Dai, Z., Wu, F., Yeung, E. W., and Li, Y. (2010). IGF-IEc expression, regulation and biological function in different tissues. *Growth Horm IGF Res* 20, 275-281.
- De Meyts, P., and Whittaker, J. (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature reviews* 1, 769-783.
- de Vries, G. J., and Miller, M. A. (1998). Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain. *Progress in brain research* 119, 3-20.
- Deldicque, L., Theisen, D., Bertrand, L., Hespel, P., Hue, L., and Francaux, M. (2007). Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. *American journal of physiology* 293, C1263-1271.

- Denmat-Ouisse, L. A., Phebidias, C., Honkavaara, P., Robin, P., Geny, B., Min, D. S., Bourgoin, S., Frohman, M. A., and Raymond, M. N. (2001). Regulation of constitutive protein transit by phospholipase D in HT29-cl19A cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 48840-48846.
- Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C., and Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science (New York, NY)* 294, 1102-1105.
- Diaz, O., Berquand, A., Dubois, M., Di Agostino, S., Sette, C., Bourgoin, S., Lagarde, M., Nemoz, G., and Prigent, A. F. (2002). The mechanism of docosahexaenoic acid-induced phospholipase D activation in human lymphocytes involves exclusion of the enzyme from lipid rafts. *The Journal of biological chemistry* 277, 39368-39378.
- Dibble, C. C., Asara, J. M., and Manning, B. D. (2009). Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Molecular and cellular biology* 29, 5657-5670.
- Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Dunaevsky, Y. E., Merrick, W. C., and Shatsky, I. N. (2003). Assembly of 48S translation initiation complexes from purified components with mRNAs that have some base pairing within their 5' untranslated regions. *Molecular and cellular biology* 23, 8925-8933.
- Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., Belia, S., Wannenes, F., Nicoletti, C., Del Prete, Z., *et al.* (2008). Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell metabolism* 8, 425-436.
- Du, G., Huang, P., Liang, B. T., and Frohman, M. A. (2004). Phospholipase D2 localizes to the plasma membrane and regulates angiotensin II receptor endocytosis. *Molecular biology of the cell* 15, 1024-1030.
- Du, J., Mitch, W. E., Wang, X., and Price, S. R. (2000). Glucocorticoids induce proteasome C3 subunit expression in L6 muscle cells by opposing the suppression of its transcription by NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry* 275, 19661-19666.
- Duan, C., Ren, H., and Gao, S. (2010). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. *General and comparative endocrinology* 167, 344-351.
- Dufner, A., Andjelkovic, M., Burgering, B. M., Hemmings, B. A., and Thomas, G. (1999). Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 19, 4525-4534.
- Duncan, R., and Hershey, J. W. (1985). Regulation of initiation factors during translational repression caused by serum depletion. Covalent modification. *The Journal of biological chemistry* 260, 5493-5497.
- Dupont, J., and LeRoith, D. (2001). Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Hormone research* 55 Suppl 2, 22-26.
- Durieux, A. C., Amirouche, A., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Padeloup, M., Mouret, C., Bigard, X., Peinnequin, A., and Freyssenet, D. (2007). Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* 148, 3140-3147.

E.

- Edmondson, D. G., Cheng, T. C., Cserjesi, P., Chakraborty, T., and Olson, E. N. (1992). Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. *Molecular and cellular biology* 12, 3665-3677.

- Erbay, E., and Chen, J. (2001). The mammalian target of rapamycin regulates C2C12 myogenesis via a kinase-independent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 276, 36079-36082.
- Erbay, E., Park, I. H., Nuzzi, P. D., Schoenherr, C. J., and Chen, J. (2003). IGF-II transcription in skeletal myogenesis is controlled by mTOR and nutrients. *The Journal of cell biology* 163, 931-936.
- Evenson, A. R., Fareed, M. U., Menconi, M. J., Mitchell, J. C., and Hasselgren, P. O. (2005). GSK-3beta inhibitors reduce protein degradation in muscles from septic rats and in dexamethasone-treated myotubes. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 2226-2238.
- Ewton, D. Z., Coolican, S. A., Mohan, S., Chernaused, S. D., and Florini, J. R. (1998). Modulation of insulin-like growth factor actions in L6A1 myoblasts by insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5: a dual role for IGFBP-5. *Journal of cellular physiology* 177, 47-57.
- Exton, J. H. (1999). Regulation of phospholipase D. *Biochimica et biophysica acta* 1439, 121-133.
- Exton, J. H. (2002a). Phospholipase D-structure, regulation and function. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 144, 1-94.
- Exton, J. H. (2002b). Regulation of phospholipase D. *FEBS letters* 531, 58-61.

F.

- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., and Chen, J. (2001). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science (New York, NY)* 294, 1942-1945.
- Favier, F. B., Benoit, H., and Freyssenet, D. (2008). Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflügers Arch* 456, 587-600.
- Fingar, D. C., Richardson, C. J., Tee, A. R., Cheatham, L., Tsou, C., and Blenis, J. (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology* 24, 200-216.
- Fitts, R. H., Romatowski, J. G., Peters, J. R., Paddon-Jones, D., Wolfe, R. R., and Ferrando, A. A. (2007). The deleterious effects of bed rest on human skeletal muscle fibers are exacerbated by hypercortisolemia and ameliorated by dietary supplementation. *American journal of physiology* 293, C313-320.
- Florini, J. R., Ewton, D. Z., and Coolican, S. A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrine reviews* 17, 481-517.
- Florini, J. R., Ewton, D. Z., and Magri, K. A. (1991a). Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annual review of physiology* 53, 201-216.
- Florini, J. R., Ewton, D. Z., Magri, K. A., and Mangiacapra, F. J. (1993). IGFs and muscle differentiation. *Advances in experimental medicine and biology* 343, 319-326.
- Florini, J. R., Magri, K. A., Ewton, D. Z., James, P. L., Grindstaff, K., and Rotwein, P. S. (1991b). "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *The Journal of biological chemistry* 266, 15917-15923.
- Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A., and Sabatini, D. M. (2006). mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 16, 1865-1870.
- Frohman, M. A., Sung, T. C., and Morris, A. J. (1999). Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochimica et biophysica acta* 1439, 175-186.

Funk, W. D., and Wright, W. E. (1992). Cyclic amplification and selection of targets for multicomponent complexes: myogenin interacts with factors recognizing binding sites for basic helix-loop-helix, nuclear factor 1, myocyte-specific enhancer-binding factor 2, and COMPI factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9484-9488.

G.

- Ganley, I. G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry* 284, 12297-12305.
- Garami, A., Zwartkruis, F. J., Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Stocker, H., Kozma, S. C., Hafen, E., Bos, J. L., and Thomas, G. (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Molecular cell* 11, 1457-1466.
- Garofalo, R. S., Orena, S. J., Rafidi, K., Torchia, A. J., Stock, J. L., Hildebrandt, A. L., Coskran, T., Black, S. C., Brees, D. J., Wicks, J. R., *et al.* (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *The Journal of clinical investigation* 112, 197-208.
- Gauthier-Rouviere, C., Vandromme, M., Tuil, D., Lautredou, N., Morris, M., Soulez, M., Kahn, A., Fernandez, A., and Lamb, N. (1996). Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscle-determining factor MyoD in both dividing and differentiating mouse C2C12 myoblasts. *Molecular biology of the cell* 7, 719-729.
- Gera, J. F., Mellinghoff, I. K., Shi, Y., Rettig, M. B., Tran, C., Hsu, J. H., Sawyers, C. L., and Lichtenstein, A. K. (2004). AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *The Journal of biological chemistry* 279, 2737-2746.
- Ghosh, P. M., Bedolla, R., Thomas, C. A., and Kreisberg, J. I. (2004). Role of protein kinase C in arginine vasopressin-stimulated ERK and p70S6 kinase phosphorylation. *Journal of cellular biochemistry* 91, 1109-1129.
- Gilbert, J. J., Pettitt, T. R., Seatter, S. D., Reid, S. D., Wakelam, M. J., and Harnett, M. M. (1998). Antagonistic roles for phospholipase D activities in B cell signaling: while the antigen receptors transduce mitogenic signals via a novel phospholipase D activity, phosphatidylcholine-phospholipase D mediates antiproliferative signals. *J Immunol* 161, 6575-6584.
- Gilson, H., Schakman, O., Combaret, L., Lause, P., Grobet, L., Attaix, D., Ketelslegers, J. M., and Thissen, J. P. (2007). Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 148, 452-460.
- Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N., and Hay, N. (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes & development* 12, 502-513.
- Glass, D. J. (2010). Signaling pathways perturbing muscle mass. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13, 225-229.
- Gohla, A., Offermanns, S., Wilkie, T. M., and Schultz, G. (1999). Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. *The Journal of biological chemistry* 274, 17901-17907.
- Goncharova, E. A., Goncharov, D. A., Eszterhas, A., Hunter, D. S., Glassberg, M. K., Yeung, R. S., Walker, C. L., Noonan, D., Kwiatkowski, D. J., Chou, M. M., *et al.* (2002). Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. *A*

- role for the TSC2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM). *The Journal of biological chemistry* 277, 30958-30967.
- Gossett, L. A., Kelvin, D. J., Sternberg, E. A., and Olson, E. N. (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Molecular and cellular biology* 9, 5022-5033.
- Gottlin, E. B., Rudolph, A. E., Zhao, Y., Matthews, H. R., and Dixon, J. E. (1998). Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9202-9207.
- Greer, E. L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410-7425.
- Gross, J. D., Moerke, N. J., von der Haar, T., Lugovskoy, A. A., Sachs, A. B., McCarthy, J. E., and Wagner, G. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115, 739-750.
- Gu, W., Schneider, J. W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1993). Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* 72, 309-324.
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J., and Sabatini, D. M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Developmental cell* 11, 859-871.
- Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R. C., and Walsh, K. (1995). MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Molecular and cellular biology* 15, 3823-3829.

H.

- Ha, K. S., and Exton, J. H. (1993). Activation of actin polymerization by phosphatidic acid derived from phosphatidylcholine in IIC9 fibroblasts. *The Journal of cell biology* 123, 1789-1796.
- Ha, K. S., Yeo, E. J., and Exton, J. H. (1994). Lysophosphatidic acid activation of phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase D and actin polymerization by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *The Biochemical journal* 303 (Pt 1), 55-59.
- Ha, S. H., Kim, D. H., Kim, I. S., Kim, J. H., Lee, M. N., Lee, H. J., Kim, J. H., Jang, S. K., Suh, P. G., and Ryu, S. H. (2006). PLD2 forms a functional complex with mTOR/raptor to transduce mitogenic signals. *Cellular signalling* 18, 2283-2291.
- Haddad, F., and Adams, G. R. (2006). Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 100, 1188-1203.
- Haddad, F., Adams, G. R., Bodell, P. W., and Baldwin, K. M. (2006). Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. *J Appl Physiol* 100, 433-441.
- Haddad, L. A., Smith, N., Bowser, M., Niida, Y., Murthy, V., Gonzalez-Agosti, C., and Ramesh, V. (2002). The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 277, 44180-44186.
- Hammond, S. M., Altshuler, Y. M., Sung, T. C., Rudge, S. A., Rose, K., Engebrecht, J., Morris, A. J., and Frohman, M. A. (1995). Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *The Journal of biological chemistry* 270, 29640-29643.

- Hammond, S. M., Jenco, J. M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G. D., Frohman, M. A., and Morris, A. J. (1997). Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C- α . *The Journal of biological chemistry* 272, 3860-3868.
- Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V. V., and Ulevitch, R. J. (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386, 296-299.
- Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B., and Hannan, R. D. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular and cellular biology* 23, 8862-8877.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177-189.
- Harsh, D. M., and Blackwood, R. A. (2001). Phospholipase A(2)-mediated fusion of neutrophil-derived membranes is augmented by phosphatidic acid. *Biochemical and biophysical research communications* 282, 480-486.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N., and Klein, W. H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501-506.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* 18, 1926-1945.
- Heinemeier, K. M., Olesen, J. L., Schjerling, P., Haddad, F., Langberg, H., Baldwin, K. M., and Kjaer, M. (2007). Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. *J Appl Physiol* 102, 573-581.
- Helliwell, S. B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., and Hall, M. N. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Molecular biology of the cell* 5, 105-118.
- Heron-Milhavet, L., Mamaeva, D., Rochat, A., Lamb, N. J., and Fernandez, A. (2008). Akt2 is implicated in skeletal muscle differentiation and specifically binds Prohibitin2/REA. *Journal of cellular physiology* 214, 158-165.
- Hodgkin, M. N., Masson, M. R., Powner, D., Saqib, K. M., Ponting, C. P., and Wakelam, M. J. (2000). Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-specific PH domain. *Curr Biol* 10, 43-46.
- Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., and Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123, 569-580.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A., and Kanaho, Y. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99, 521-532.
- Hornberger, T. A., and Chien, S. (2006). Mechanical stimuli and nutrients regulate rapamycin-sensitive signaling through distinct mechanisms in skeletal muscle. *Journal of cellular biochemistry* 97, 1207-1216.

- Hornberger, T. A., Chu, W. K., Mak, Y. W., Hsiung, J. W., Huang, S. A., and Chien, S. (2006a). The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 4741-4746.
- Hornberger, T. A., Hunter, R. B., Kandarian, S. C., and Esser, K. A. (2001). Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *American journal of physiology* *281*, C179-187.
- Hornberger, T. A., Stuppard, R., Conley, K. E., Fedele, M. J., Fiorotto, M. L., Chin, E. R., and Esser, K. A. (2004). Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *The Biochemical journal* *380*, 795-804.
- Hornberger, T. A., Sukhija, K. B., and Chien, S. (2006b). Regulation of mTOR by mechanically induced signaling events in skeletal muscle. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* *5*, 1391-1396.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., *et al.* (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell* *20*, 1981-1991.
- Hu, T., and Exton, J. H. (2003). Mechanisms of regulation of phospholipase D1 by protein kinase Calpha. *The Journal of biological chemistry* *278*, 2348-2355.
- Huang, J., and Manning, B. D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochemical Society transactions* *37*, 217-222.
- Huffman, T. A., Mothe-Satney, I., and Lawrence, J. C., Jr. (2002). Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 1047-1052.
- Hughes, W. E., and Parker, P. J. (2001). Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the C-termini of the proteins, and is independent of activity. *The Biochemical journal* *356*, 727-736.
- Hui, L., Abbas, T., Pielak, R. M., Joseph, T., Bargonetti, J., and Foster, D. A. (2004). Phospholipase D elevates the level of MDM2 and suppresses DNA damage-induced increases in p53. *Molecular and cellular biology* *24*, 5677-5686.

I.

- Ignotz, R. A., and Massague, J. (1985). Type beta transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *82*, 8530-8534.
- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., and Guan, K. L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *The EMBO journal* *27*, 1919-1931.
- Imae, M., Fu, Z., Yoshida, A., Noguchi, T., and Kato, H. (2003). Nutritional and hormonal factors control the gene expression of FoxOs, the mammalian homologues of DAF-16. *Journal of molecular endocrinology* *30*, 253-262.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* *4*, 648-657.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K. L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577-590.
- Iwasaki, Y., Horiike, S., Matsushima, K., and Yamane, T. (1999). Location of the catalytic nucleophile of phospholipase D of *Streptomyces antibioticus* in the C-terminal half domain. *European journal of biochemistry / FEBS* *264*, 577-581.

Iyer, S. S., and Kusner, D. J. (1999). Association of phospholipase D activity with the detergent-insoluble cytoskeleton of U937 promonocytic leukocytes. *The Journal of biological chemistry* 274, 2350-2359.

J.

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M. A., Hall, A., and Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology* 6, 1122-1128.

Jefferies, H. B., Fumagalli, S., Dennis, P. B., Reinhard, C., Pearson, R. B., and Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *The EMBO journal* 16, 3693-3704.

Jefferson, L. S., Fabian, J. R., and Kimball, S. R. (1999). Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31, 191-200.

Jenkins, G. M., and Frohman, M. A. (2005). Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* 62, 2305-2316.

Jones, D. H., Bax, B., Fensome, A., and Cockcroft, S. (1999). ADP ribosylation factor 1 mutants identify a phospholipase D effector region and reveal that phospholipase D participates in lysosomal secretion but is not sufficient for recruitment of coatamer I. *The Biochemical journal* 341 (Pt 1), 185-192.

Jones, J. I., and Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine reviews* 16, 3-34.

Julien, L. A., Carriere, A., Moreau, J., and Roux, P. P. (2009). mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Molecular and cellular biology* 30, 908-921.

Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D. H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell* 20, 1992-2003.

Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., and Kim, D. H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters* 584, 1287-1295.

K.

Kam, Y., and Exton, J. H. (2001). Phospholipase D activity is required for actin stress fiber formation in fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 21, 4055-4066.

Kaushal, S., Schneider, J. W., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1994). Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science* (New York, NY 266, 1236-1240.

Kemp, B. E., Mitchelhill, K. I., Stapleton, D., Michell, B. J., Chen, Z. P., and Witters, L. A. (1999). Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends in biochemical sciences* 24, 22-25.

Kenessey, A., and Ojamaa, K. (2006). Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. *The Journal of biological chemistry* 281, 20666-20672.

Keren, A., Tamir, Y., and Bengal, E. (2006). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Molecular and cellular endocrinology* 252, 224-230.

- Khurana, A., and Dey, C. S. (2002). Subtype specific roles of mitogen activated protein kinases in L6E9 skeletal muscle cell differentiation. *Molecular and cellular biochemistry* 238, 27-39.
- Kim, D., Akcakanat, A., Singh, G., Sharma, C., and Meric-Bernstam, F. (2009). Regulation and localization of ribosomal protein S6 kinase 1 isoforms. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 27, 12-21.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.
- Kim, E. (2009). Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutrition research and practice* 3, 64-71.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., and Guan, K. L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology* 10, 935-945.
- Kim, J. E., and Chen, J. (2000). Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14340-14345.
- Kim, J. E., and Chen, J. (2004). regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* 53, 2748-2756.
- Kim, Y., Han, J. M., Han, B. R., Lee, K. A., Kim, J. H., Lee, B. D., Jang, I. H., Suh, P. G., and Ryu, S. H. (2000). Phospholipase D1 is phosphorylated and activated by protein kinase C in caveolin-enriched microdomains within the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 275, 13621-13627.
- Kimura, N., Tokunaga, C., Dalal, S., Richardson, C., Yoshino, K., Hara, K., Kemp, B. E., Witters, L. A., Mimura, O., and Yonezawa, K. (2003). A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells* 8, 65-79.
- Knauss, T. C., Jaffer, F. E., and Abboud, H. E. (1990). Phosphatidic acid modulates DNA synthesis, phospholipase C, and platelet-derived growth factor mRNAs in cultured mesangial cells. Role of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 265, 14457-14463.
- Kollias, H. D., and McDermott, J. C. (2008). Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 104, 579-587.
- Komati, H., Minasi, A., Naro, F., Lagarde, M., Prigent, A. F., Adamo, S., and Nemoz, G. (2004). Phorbol ester-induced differentiation of L6 myogenic cells involves phospholipase D activation. *FEBS letters* 577, 409-414.
- Komati, H., Naro, F., Mebarek, S., De Arcangelis, V., Adamo, S., Lagarde, M., Prigent, A. F., and Nemoz, G. (2005). Phospholipase D is involved in myogenic differentiation through remodeling of actin cytoskeleton. *Molecular biology of the cell* 16, 1232-1244.
- Kops, G. J., Dansen, T. B., Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W., Coffey, P. J., Huang, T. T., Bos, J. L., Medema, R. H., and Burgering, B. M. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419, 316-321.
- Kornfeld, S. (1992). Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annual review of biochemistry* 61, 307-330.
- Kotter, K., Jin, S., and Klein, J. (2000). Inhibition of astroglial cell proliferation by alcohols: interference with the protein kinase C-phospholipase D signaling pathway. *Int J Dev Neurosci* 18, 825-831.
- Kozniowska, E., and Romaniuk, K. (2008). Vasopressin in vascular regulation and water homeostasis in the brain. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 8, 109-116.

- Kuisk, I. R., Li, H., Tran, D., and Capetanaki, Y. (1996). A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis. *Developmental biology* 174, 1-13.
- Kwiatkowski, D. J., Zhang, H., Bandura, J. L., Heiberger, K. M., Glogauer, M., el-Hashemite, N., and Onda, H. (2002). A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells. *Human molecular genetics* 11, 525-534.

L.

- Lagrand-Cantaloube, J., Cornille, K., Csibi, A., Batonnet-Pichon, S., Leibovitch, M. P., and Leibovitch, S. A. (2009). Inhibition of atrogen-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. *PloS one* 4, e4973.
- Lai, K. M., Gonzalez, M., Poueymirou, W. T., Kline, W. O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T. N., Economides, A. N., Yancopoulos, G. D., and Glass, D. J. (2004). Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Molecular and cellular biology* 24, 9295-9304.
- Lalani, R., Bhasin, S., Byhower, F., Tarnuzzer, R., Grant, M., Shen, R., Asa, S., Ezzat, S., and Gonzalez-Cadavid, N. F. (2000). Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *The Journal of endocrinology* 167, 417-428.
- Lam, E. W., Francis, R. E., and Petkovic, M. (2006). FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochemical Society transactions* 34, 722-726.
- Lang, C. H., Frost, R. A., and Vary, T. C. (2008). Acute alcohol intoxication increases REDD1 in skeletal muscle. *Alcoholism, clinical and experimental research* 32, 796-805.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., and Kambadur, R. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *The Journal of biological chemistry* 277, 49831-49840.
- Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science* 122, 3589-3594.
- Laser, M., Kasi, V. S., Hamawaki, M., Cooper, G. t., Kerr, C. M., and Kuppuswamy, D. (1998). Differential activation of p70 and p85 S6 kinase isoforms during cardiac hypertrophy in the adult mammal. *The Journal of biological chemistry* 273, 24610-24619.
- Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J. L., and Butler, A. (2001). The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine reviews* 22, 53-74.
- Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Moller, N. P., and Ullrich, A. (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 4355-4359.
- Lee, S., Park, J. B., Kim, J. H., Kim, Y., Kim, J. H., Shin, K. J., Lee, J. S., Ha, S. H., Suh, P. G., and Ryu, S. H. (2001). Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *The Journal of biological chemistry* 276, 28252-28260.
- Lee, S. J. (2004). Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 61-86.
- Lehman, N., Ledford, B., Di Fulvio, M., Frondorf, K., McPhail, L. C., and Gomez-Cambroner, J. (2007). Phospholipase D2-derived phosphatidic acid binds to and activates ribosomal p70 S6 kinase independently of mTOR. *Faseb J* 21, 1075-1087.

- Lemercier, C., To, R. Q., Carrasco, R. A., and Konieczny, S. F. (1998). The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. *The EMBO journal* *17*, 1412-1422.
- Li, H., and Capetanaki, Y. (1994). An E box in the desmin promoter cooperates with the E box and MEF-2 sites of a distal enhancer to direct muscle-specific transcription. *The EMBO journal* *13*, 3580-3589.
- Li, L., Chambard, J. C., Karin, M., and Olson, E. N. (1992a). Fos and Jun repress transcriptional activation by myogenin and MyoD: the amino terminus of Jun can mediate repression. *Genes & development* *6*, 676-689.
- Li, L., Heller-Harrison, R., Czech, M., and Olson, E. N. (1992b). Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the activity of myogenic helix-loop-helix proteins. *Molecular and cellular biology* *12*, 4478-4485.
- Li, Y., Jiang, B., Ensign, W. Y., Vogt, P. K., and Han, J. (2000). Myogenic differentiation requires signalling through both phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAP kinase. *Cellular signalling* *12*, 751-757.
- Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G., and Tang, X. (2000). Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *The Biochemical journal* *345 Pt 3*, 401-415.
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* *75*, 59-72.
- Liu, M. Y., Gutowski, S., and Sternweis, P. C. (2001). The C terminus of mammalian phospholipase D is required for catalytic activity. *The Journal of biological chemistry* *276*, 5556-5562.
- Lluis, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M., and Munoz-Canoves, P. (2005). E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *The EMBO journal* *24*, 974-984.
- Lofberg, E., Gutierrez, A., Wernerman, J., Anderstam, B., Mitch, W. E., Price, S. R., Bergstrom, J., and Alvestrand, A. (2002). Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *European journal of clinical investigation* *32*, 345-353.
- Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., and Avruch, J. (2005). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* *15*, 702-713.
- Lorberg, A., and Hall, M. N. (2004). TOR: the first 10 years. *Current topics in microbiology and immunology* *279*, 1-18.

M.

- Ma, X. M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 307-318.
- Mahajan, P. B. (1994). Modulation of transcription of rRNA genes by rapamycin. *International journal of immunopharmacology* *16*, 711-721.
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S. J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., *et al.* (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* *6*, 458-471.
- Manifava, M., Sugars, J., and Ktistakis, N. T. (1999). Modification of catalytically active phospholipase D1 with fatty acid in vivo. *The Journal of biological chemistry* *274*, 1072-1077.
- Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* *129*, 1261-1274.

- Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J., and Cantley, L. C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell* *10*, 151-162.
- Mathews, L. S., Hammer, R. E., Behringer, R. R., D'Ercole, A. J., Bell, G. I., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D. (1988). Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Endocrinology* *123*, 2827-2833.
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes & development* *18*, 423-434.
- McDermott, M., Wakelam, M. J., and Morris, A. J. (2004). Phospholipase D. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* *82*, 225-253.
- McFarlane, C., Plummer, E., Thomas, M., Hennebry, A., Ashby, M., Ling, N., Smith, H., Sharma, M., and Kambadur, R. (2006). Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *Journal of cellular physiology* *209*, 501-514.
- McPherron, A. C., and Lee, S. J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 12457-12461.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., and Codogno, P. (2010). Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *American journal of physiology* *298*, C776-785.
- Mendez, R., Myers, M. G., Jr., White, M. F., and Rhoads, R. E. (1996). Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Molecular and cellular biology* *16*, 2857-2864.
- Miano, J. M. (2003). Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *Journal of molecular and cellular cardiology* *35*, 577-593.
- Mieulet, V., Roceri, M., Espeillac, C., Sotiropoulos, A., Ohanna, M., Oorschot, V., Klumperman, J., Sandri, M., and Pende, M. (2007). S6 kinase inactivation impairs growth and translational target phosphorylation in muscle cells maintaining proper regulation of protein turnover. *American journal of physiology* *293*, C712-722.
- Min, D. S., and Exton, J. H. (1998). Phospholipase D is associated in a phorbol ester-dependent manner with protein kinase C-alpha and with a 220-kDa protein which is phosphorylated on serine and threonine. *Biochemical and biophysical research communications* *248*, 533-537.
- Min, D. S., Park, S. K., and Exton, J. H. (1998). Characterization of a rat brain phospholipase D isozyme. *The Journal of biological chemistry* *273*, 7044-7051.
- Minotti, S., Scicchitano, B. M., Nervi, C., Scarpa, S., Lucarelli, M., Molinaro, M., and Adamo, S. (1998). Vasopressin and insulin-like growth factors synergistically induce myogenesis in serum-free medium. *Cell Growth Differ* *9*, 155-163.
- Miwa, T., and Kedes, L. (1987). Duplicated CArG box domains have positive and mutually dependent regulatory roles in expression of the human alpha-cardiac actin gene. *Molecular and cellular biology* *7*, 2803-2813.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell* *15*, 1101-1111.
- Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F., and Olson, E. N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* *83*, 1125-1136.

- Moolenaar, W. H. (1995). Lysophosphatidic acid signalling. *Current opinion in cell biology* 7, 203-210.
- Moresi, V., Garcia-Alvarez, G., Pristera, A., Rizzuto, E., Albertini, M. C., Rocchi, M., Marazzi, G., Sassoon, D., Adamo, S., and Coletti, D. (2009). Modulation of caspase activity regulates skeletal muscle regeneration and function in response to vasopressin and tumor necrosis factor. *PloS one* 4, e5570.
- Morris, A. J., Frohman, M. A., and Engebrecht, J. (1997). Measurement of phospholipase D activity. *Analytical biochemistry* 252, 1-9.
- Musaro, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E. R., Sweeney, H. L., and Rosenthal, N. (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature genetics* 27, 195-200.
- Muscat, G. E., Perry, S., Prentice, H., and Kedes, L. (1992). The human skeletal alpha-actin gene is regulated by a muscle-specific enhancer that binds three nuclear factors. *Gene expression* 2, 111-126.

N.

- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., and Nabeshima, Y. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364, 532-535.
- Naidu, P. S., Ludolph, D. C., To, R. Q., Hinterberger, T. J., and Konieczny, S. F. (1995). Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. *Molecular and cellular biology* 15, 2707-2718.
- Naro, F., Donchenko, V., Minotti, S., Zolla, L., Molinaro, M., and Adamo, S. (1997). Role of phospholipase C and D signalling pathways in vasopressin-dependent myogenic differentiation. *Journal of cellular physiology* 171, 34-42.
- Navankasattusas, S., Zhu, H., Garcia, A. V., Evans, S. M., and Chien, K. R. (1992). A ubiquitous factor (HF-1a) and a distinct muscle factor (HF-1b/MEF-2) form an E-box-independent pathway for cardiac muscle gene expression. *Molecular and cellular biology* 12, 1469-1479.
- Nervi, C., Benedetti, L., Minasi, A., Molinaro, M., and Adamo, S. (1995). Arginine-vasopressin induces differentiation of skeletal myogenic cells and up-regulation of myogenin and Myf-5. *Cell Growth Differ* 6, 81-89.
- Neshat, M. S., Mellinghoff, I. K., Tran, C., Stiles, B., Thomas, G., Petersen, R., Frost, P., Gibbons, J. J., Wu, H., and Sawyers, C. L. (2001). Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10314-10319.
- Nicholas, G., Thomas, M., Langley, B., Somers, W., Patel, K., Kemp, C. F., Sharma, M., and Kambadur, R. (2002). Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *Journal of cellular physiology* 193, 120-131.
- Ning, Y., Hoang, B., Schuller, A. G., Cominski, T. P., Hsu, M. S., Wood, T. L., and Pintar, J. E. (2007). Delayed mammary gland involution in mice with mutation of the insulin-like growth factor binding protein 5 gene. *Endocrinology* 148, 2138-2147.
- Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., Byfield, M. P., Backer, J. M., Natt, F., Bos, J. L., *et al.* (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14238-14243.

O.

- O'Luanagh, N., Pardo, R., Fensome, A., Allen-Baume, V., Jones, D., Holt, M. R., and Cockcroft, S. (2002). Continual production of phosphatidic acid by phospholipase D is essential for antigen-stimulated membrane ruffling in cultured mast cells. *Molecular biology of the cell* 13, 3730-3746.
- Ohanna, M., Sobering, A. K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P. A., Sotiropoulos, A., and Pende, M. (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nature cell biology* 7, 286-294.
- Ohguchi, K., Banno, Y., Nakagawa, Y., Akao, Y., and Nozawa, Y. (2005). Negative regulation of melanogenesis by phospholipase D1 through mTOR/p70 S6 kinase 1 signaling in mouse B16 melanoma cells. *Journal of cellular physiology* 205, 444-451.
- Olsen, H. L., Hoy, M., Zhang, W., Bertorello, A. M., Bokvist, K., Capito, K., Efanov, A. M., Meister, B., Thams, P., Yang, S. N., *et al.* (2003). Phosphatidylinositol 4-kinase serves as a metabolic sensor and regulates priming of secretory granules in pancreatic beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5187-5192.
- Olson, E. N. (1993). Signal transduction pathways that regulate skeletal muscle gene expression. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) 7, 1369-1378.
- Olson, E. N., Perry, M., and Schulz, R. A. (1995). Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Developmental biology* 172, 2-14.
- Oude Weernink, P. A., Schulte, P., Guo, Y., Wetzel, J., Amano, M., Kaibuchi, K., Haverland, S., Voss, M., Schmidt, M., Mayr, G. W., and Jakobs, K. H. (2000). Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase. *The Journal of biological chemistry* 275, 10168-10174.

P.

- Panasyuk, G., Nemazanyy, I., Zhyvoloup, A., Bretner, M., Litchfield, D. W., Filonenko, V., and Gout, I. T. (2006). Nuclear export of S6K1 II is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation at Ser-17. *The Journal of biological chemistry* 281, 31188-31201.
- Park, I. H., Erbay, E., Nuzzi, P., and Chen, J. (2005). Skeletal myocyte hypertrophy requires mTOR kinase activity and S6K1. *Experimental cell research* 309, 211-219.
- Park, S. K., Min, D. S., and Exton, J. H. (1998). Definition of the protein kinase C interaction site of phospholipase D. *Biochemical and biophysical research communications* 244, 364-367.
- Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A. T., Bradley, A., Olson, E. N., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* (New York, NY) 267, 1024-1027.
- Parmacek, M. S., Ip, H. S., Jung, F., Shen, T., Martin, J. F., Vora, A. J., Olson, E. N., and Leiden, J. M. (1994). A novel myogenic regulatory circuit controls slow/cardiac troponin C gene transcription in skeletal muscle. *Molecular and cellular biology* 14, 1870-1885.
- Partovian, C., Ju, R., Zhuang, Z. W., Martin, K. A., and Simons, M. (2008). Syndecan-4 regulates subcellular localization of mTOR Complex2 and Akt activation in a PKCalpha-dependent manner in endothelial cells. *Molecular cell* 32, 140-149.
- Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S. C., and Thomas, G. (2004). S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit

- perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Molecular and cellular biology* 24, 3112-3124.
- Peng, X. D., Xu, P. Z., Chen, M. L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W. S., Crawford, S. E., Coleman, K. G., and Hay, N. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & development* 17, 1352-1365.
- Penner, G., Gang, G., Sun, X., Wray, C., and Hasselgren, P. O. (2002). C/EBP DNA-binding activity is upregulated by a glucocorticoid-dependent mechanism in septic muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R439-444.
- Perry, R. L., and Rudnick, M. A. (2000). Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci* 5, D750-767.
- Peterson, R. T., Beal, P. A., Comb, M. J., and Schreiber, S. L. (2000). FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *The Journal of biological chemistry* 275, 7416-7423.
- Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S., and Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873-886.
- Plonk, S. G., Park, S. K., and Exton, J. H. (1998). The alpha-subunit of the heterotrimeric G protein G13 activates a phospholipase D isozyme by a pathway requiring Rho family GTPases. *The Journal of biological chemistry* 273, 4823-4826.
- Podsypanina, K., Lee, R. T., Politis, C., Hennessy, I., Crane, A., Puc, J., Neshat, M., Wang, H., Yang, L., Gibbons, J., *et al.* (2001). An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten^{+/-} mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10320-10325.
- Ponting, C. P., and Kerr, I. D. (1996). A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci* 5, 914-922.
- Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J. R., Chung, Y. L., and Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell metabolism* 8, 224-236.
- Potter, C. J., Pedraza, L. G., and Xu, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature cell biology* 4, 658-665.
- Potthoff, M. J., Arnold, M. A., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2007). Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity and postnatal muscle function by Mef2c. *Molecular and cellular biology* 27, 8143-8151.
- Poulin, F., Gingras, A. C., Olsen, H., Chevalier, S., and Sonenberg, N. (1998). 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *The Journal of biological chemistry* 273, 14002-14007.
- Powers, T., and Walter, P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 10, 987-1000.
- Puri, P. L., Wu, Z., Zhang, P., Wood, L. D., Bhakta, K. S., Han, J., Feramisco, J. R., Karin, M., and Wang, J. Y. (2000). Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes & development* 14, 574-584.

Q.

Qin, W., Pappan, K., and Wang, X. (1997). Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLD γ and regulation of plant PLD γ , - β , and - α by polyphosphoinositides and calcium. *The Journal of biological chemistry* 272, 28267-28273.

R.

Radimerski, T., Montagne, J., Rintelen, F., Stocker, H., van der Kaay, J., Downes, C. P., Hafen, E., and Thomas, G. (2002). dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nature cell biology* 4, 251-255.

Randall, R. W., Bonser, R. W., Thompson, N. T., and Garland, L. G. (1990). A novel and sensitive assay for phospholipase D in intact cells. *FEBS letters* 264, 87-90.

Raue, U., Slivka, D., Jemiolo, B., Hollon, C., and Trappe, S. (2006). Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. *J Appl Physiol* 101, 53-59.

Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A. C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G. L., Polakiewicz, R. D., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. (2004). Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *The EMBO journal* 23, 1761-1769.

Reardon, K. A., Davis, J., Kapsa, R. M., Choong, P., and Byrne, E. (2001). Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle & nerve* 24, 893-899.

Reinhard, C., Fernandez, A., Lamb, N. J., and Thomas, G. (1994). Nuclear localization of p85s6k: functional requirement for entry into S phase. *The EMBO journal* 13, 1557-1565.

Ren, H., Accili, D., and Duan, C. (2010). Hypoxia converts the myogenic action of insulin-like growth factors into mitogenic action by differentially regulating multiple signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5857-5862.

Ren, H., Yin, P., and Duan, C. (2008). IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *The Journal of cell biology* 182, 979-991.

Ridley, A. J. (1999). Rho family proteins and regulation of the actin cytoskeleton. *Progress in molecular and subcellular biology* 22, 1-22.

Risson, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., Corneloup, C., Richard-Bulteau, H., Vignaud, A., Baas, D., Defour, A., *et al.* (2009). Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *The Journal of cell biology* 187, 859-874.

Rizzo, M., and Romero, G. (2002). Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacology & therapeutics* 94, 35-50.

Rogers, G. W., Jr., Komar, A. A., and Merrick, W. C. (2002). eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 72, 307-331.

Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., and Glass, D. J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology* 3, 1009-1013.

- Rosner, M., and Hengstschlager, M. (2008). Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Human molecular genetics* *17*, 2934-2948.
- Roth, S. M., Martel, G. F., Ferrell, R. E., Metter, E. J., Hurley, B. F., and Rogers, M. A. (2003). Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ *228*, 706-709.
- Rotwein, P., and Wilson, E. M. (2009). Distinct actions of Akt1 and Akt2 in skeletal muscle differentiation. *Journal of cellular physiology* *219*, 503-511.
- Rudge, S. A., Morris, A. J., and Engebrecht, J. (1998). Relocalization of phospholipase D activity mediates membrane formation during meiosis. *The Journal of cell biology* *140*, 81-90.
- Rudnicki, M. A., Braun, T., Hinuma, S., and Jaenisch, R. (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* *71*, 383-390.
- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* *75*, 1351-1359.
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & development* *19*, 2199-2211.

S.

- Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G., and Abraham, R. T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* *270*, 815-822.
- Sabourin, L. A., and Rudnicki, M. A. (2000). The molecular regulation of myogenesis. *Clinical genetics* *57*, 16-25.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., and Sabatini, D. M. (2010). Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* *141*, 290-303.
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, NY)* *320*, 1496-1501.
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., and Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular cell* *25*, 903-915.
- Sandri, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology* (Bethesda, Md *23*, 160-170.
- Sandri, M. (2010). Autophagy in skeletal muscle. *FEBS letters* *584*, 1411-1416.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S. H., and Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* *117*, 399-412.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* *14*, 1296-1302.

- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, NY)* 307, 1098-1101.
- Sarker, K. P., and Lee, K. Y. (2004). L6 myoblast differentiation is modulated by Cdk5 via the PI3K-AKT-p70S6K signaling pathway. *Oncogene* 23, 6064-6070.
- Schakman, O., Gilson, H., and Thissen, J. P. (2008). Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *The Journal of endocrinology* 197, 1-10.
- Schmidt, M., Rumenapp, U., Bienek, C., Keller, J., von Eichel-Streiber, C., and Jakobs, K. H. (1996). Inhibition of receptor signaling to phospholipase D by *Clostridium difficile* toxin B. Role of Rho proteins. *The Journal of biological chemistry* 271, 2422-2426.
- Schneider, J. W., Gu, W., Zhu, L., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1994). Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb^{-/-} muscle cells. *Science (New York, NY)* 264, 1467-1471.
- Scicchitano, B. M., Spath, L., Musaro, A., Molinaro, M., Adamo, S., and Nervi, C. (2002). AVP induces myogenesis through the transcriptional activation of the myocyte enhancer factor 2. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 16, 1407-1416.
- Sciorra, V. A., Rudge, S. A., Wang, J., McLaughlin, S., Engebrecht, J., and Morris, A. J. (2002). Dual role for phosphoinositides in regulation of yeast and mammalian phospholipase D enzymes. *The Journal of cell biology* 159, 1039-1049.
- Sekulic, A., Hudson, C. C., Homme, J. L., Yin, P., Otterness, D. M., Karnitz, L. M., and Abraham, R. T. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer research* 60, 3504-3513.
- Serra, C., Palacios, D., Mozzetta, C., Forcales, S. V., Morante, I., Ripani, M., Jones, D. R., Du, K., Jhala, U. S., Simone, C., and Puri, P. L. (2007). Functional interdependence at the chromatin level between the MKK6/p38 and IGF1/PI3K/AKT pathways during muscle differentiation. *Molecular cell* 28, 200-213.
- Sharma, P. M., Egawa, K., Huang, Y., Martin, J. L., Huvar, I., Boss, G. R., and Olefsky, J. M. (1998). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by adenovirus-mediated gene transfer and its effect on insulin action. *The Journal of biological chemistry* 273, 18528-18537.
- Shioi, T., McMullen, J. R., Tarnavski, O., Converso, K., Sherwood, M. C., Manning, W. J., and Izumo, S. (2003). Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 107, 1664-1670.
- Shore, P., and Sharrocks, A. D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *European journal of biochemistry / FEBS* 229, 1-13.
- Shu, L., and Houghton, P. J. (2009). The mTORC2 complex regulates terminal differentiation of C2C12 myoblasts. *Molecular and cellular biology* 29, 4691-4700.
- Shu, L., Zhang, X., and Houghton, P. J. (2002). Myogenic differentiation is dependent on both the kinase function and the N-terminal sequence of mammalian target of rapamycin. *The Journal of biological chemistry* 277, 16726-16732.
- Siddiqui, R. A., and English, D. (1997). Phosphatidic acid elicits calcium mobilization and actin polymerization through a tyrosine kinase-dependent process in human neutrophils: a mechanism for induction of chemotaxis. *Biochimica et biophysica acta* 1349, 81-95.
- Smith, A., Stephen, R. I., Arkley, M. M., and McIntosh, N. (1992). Immunoreactive arginine vasopressin in human fetal and neonatal skeletal muscle. *Early human development* 28, 215-222.
- Soulez, M., Rouviere, C. G., Chafey, P., Hentzen, D., Vandromme, M., Lautredou, N., Lamb, N., Kahn, A., and Tuil, D. (1996). Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Molecular and cellular biology* 16, 6065-6074.

- Spicer, D. B., Rhee, J., Cheung, W. L., and Lassar, A. B. (1996). Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science (New York, NY)* 272, 1476-1480.
- Stanacev, N. Z., and Stuhne-Sekalec, L. (1970). On the mechanism of enzymatic phosphatidylation. Biosynthesis of cardiolipin catalyzed by phospholipase D. *Biochimica et biophysica acta* 210, 350-352.
- Stolovich, M., Tang, H., Hornstein, E., Levy, G., Cohen, R., Bae, S. S., Birnbaum, M. J., and Meyuhas, O. (2002). Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 22, 8101-8113.
- Stuckey, J. A., and Dixon, J. E. (1999). Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nature structural biology* 6, 278-284.
- Suelves, M., Lluís, F., Ruiz, V., Nebreda, A. R., and Muñoz-Canoves, P. (2004). Phosphorylation of MRF4 transactivation domain by p38 mediates repression of specific myogenic genes. *The EMBO journal* 23, 365-375.
- Sun, Y., and Chen, J. (2008). mTOR signaling: PLD takes center stage. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7, 3118-3123.
- Sun, Y., Fang, Y., Yoon, M. S., Zhang, C., Roccio, M., Zwartkruis, F. J., Armstrong, M., Brown, H. A., and Chen, J. (2008). Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8286-8291.
- Sung, T. C., Altshuler, Y. M., Morris, A. J., and Frohman, M. A. (1999a). Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. *The Journal of biological chemistry* 274, 494-502.
- Sung, T. C., Roper, R. L., Zhang, Y., Rudge, S. A., Temel, R., Hammond, S. M., Morris, A. J., Moss, B., Engebrecht, J., and Frohman, M. A. (1997). Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *The EMBO journal* 16, 4519-4530.
- Sung, T. C., Zhang, Y., Morris, A. J., and Frohman, M. A. (1999b). Structural analysis of human phospholipase D1. *The Journal of biological chemistry* 274, 3659-3666.
- Sunters, A., Fernandez de Mattos, S., Stahl, M., Brosens, J. J., Zoumpoulidou, G., Saunders, C. A., Coffey, P. J., Medema, R. H., Coombes, R. C., and Lam, E. W. (2003). FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *The Journal of biological chemistry* 278, 49795-49805.
- Sunters, A., Madureira, P. A., Pomeranz, K. M., Aubert, M., Brosens, J. J., Cook, S. J., Burgering, B. M., Coombes, R. C., and Lam, E. W. (2006). Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer research* 66, 212-220.

T.

- Taaffe, D. R., Jin, I. H., Vu, T. H., Hoffman, A. R., and Marcus, R. (1996). Lack of effect of recombinant human growth hormone (GH) on muscle morphology and GH-insulin-like growth factor expression in resistance-trained elderly men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81, 421-425.
- Tabancay, A. P., Jr., Gau, C. L., Machado, I. M., Uhlmann, E. J., Gutmann, D. H., Guo, L., and Tamanoi, F. (2003). Identification of dominant negative mutants of Rheb GTPase and their use to implicate the involvement of human Rheb in the activation of p70S6K. *The Journal of biological chemistry* 278, 39921-39930.

- Takahara, T., Hara, K., Yonezawa, K., Sorimachi, H., and Maeda, T. (2006). Nutrient-dependent multimerization of the mammalian target of rapamycin through the N-terminal HEAT repeat region. *The Journal of biological chemistry* 281, 28605-28614.
- Tamir, Y., and Bengal, E. (2000). Phosphoinositide 3-kinase induces the transcriptional activity of MEF2 proteins during muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry* 275, 34424-34432.
- Tang, H., Hornstein, E., Stolovich, M., Levy, G., Livingstone, M., Templeton, D., Avruch, J., and Meyuhas, O. (2001). Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 21, 8671-8683.
- Tee, A. R., Anjum, R., and Blenis, J. (2003). Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin. *The Journal of biological chemistry* 278, 37288-37296.
- Thibonnier, M. (1992). Signal transduction of V1-vascular vasopressin receptors. *Regulatory peptides* 38, 1-11.
- Thibonnier, M., Graves, M. K., Wagner, M. S., Auzan, C., Clauser, E., and Willard, H. F. (1996). Structure, sequence, expression, and chromosomal localization of the human V1a vasopressin receptor gene. *Genomics* 31, 327-334.
- Thompson, W. R., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1991). A MyoD1-independent muscle-specific enhancer controls the expression of the beta-myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 266, 22678-22688.
- Thomson, F. J., and Clark, M. A. (1995). Purification of a phosphatidic-acid-hydrolysing phospholipase A2 from rat brain. *The Biochemical journal* 306 (Pt 1), 305-309.
- Toda, K., Nogami, M., Murakami, K., Kanaho, Y., and Nakayama, K. (1999). Colocalization of phospholipase D1 and GTP-binding-defective mutant of ADP-ribosylation factor 6 to endosomes and lysosomes. *FEBS letters* 442, 221-225.
- Toschi, A., Lee, E., Xu, L., Garcia, A., Gadir, N., and Foster, D. A. (2009). Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Molecular and cellular biology* 29, 1411-1420.
- Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* 46, 567-574.
- Treisman, R., Marais, R., and Wynne, J. (1992). Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins. *The EMBO journal* 11, 4631-4640.
- Trendelenburg, A. U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S., and Glass, D. J. (2009). Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *American journal of physiology* 296, C1258-1270.
- Trouche, D., Grigoriev, M., Lenormand, J. L., Robin, P., Leibovitch, S. A., Sassone-Corsi, P., and Harel-Bellan, A. (1993). Repression of c-fos promoter by MyoD on muscle cell differentiation. *Nature* 363, 79-82.
- Trounce, I., Byrne, E., Dennett, X., Santamaria, J., Doery, J., and Peppard, R. (1987). Chronic alcoholic proximal wasting: physiological, morphological and biochemical studies in skeletal muscle. *Australian and New Zealand journal of medicine* 17, 413-419.
- Tsang, C. K., Liu, H., and Zheng, X. F. (2010). mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 9, 953-957.
- Tschopp, O., Yang, Z. Z., Brodbeck, D., Dummler, B. A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., and Hemmings, B. A. (2005). Essential role of

protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development (Cambridge, England)* 132, 2943-2954.

U.

Ueki, K., Algenstaedt, P., Mauvais-Jarvis, F., and Kahn, C. R. (2000). Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Molecular and cellular biology* 20, 8035-8046.

Urban, R. J., Bodenbun, Y. H., Gilkison, C., Foxworth, J., Coggan, A. R., Wolfe, R. R., and Ferrando, A. (1995). Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *The American journal of physiology* 269, E820-826.

V.

Van Der Heide, L. P., Hoekman, M. F., and Smidt, M. P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *The Biochemical journal* 380, 297-309.

Vandenburgh, H. H. (1987). Motion into mass: how does tension stimulate muscle growth? *Medicine and science in sports and exercise* 19, S142-149.

Vandromme, M., Gauthier-Rouviere, C., Carnac, G., Lamb, N., and Fernandez, A. (1992). Serum response factor p67SRF is expressed and required during myogenic differentiation of both mouse C2 and rat L6 muscle cell lines. *The Journal of cell biology* 118, 1489-1500.

Vandromme, M., Rochat, A., Meier, R., Carnac, G., Besser, D., Hemmings, B. A., Fernandez, A., and Lamb, N. J. (2001). Protein kinase B beta/Akt2 plays a specific role in muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry* 276, 8173-8179.

Vargas, R., and Lang, C. H. (2008). Alcohol accelerates loss of muscle and impairs recovery of muscle mass resulting from disuse atrophy. *Alcoholism, clinical and experimental research* 32, 128-137.

Veverka, V., Crabbe, T., Bird, I., Lennie, G., Muskett, F. W., Taylor, R. J., and Carr, M. D. (2008). Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. *Oncogene* 27, 585-595.

Vezina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* 28, 721-726.

Vitale, N., Caumont, A. S., Chasserot-Golaz, S., Du, G., Wu, S., Sciorra, V. A., Morris, A. J., Frohman, M. A., and Bader, M. F. (2001). Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *The EMBO journal* 20, 2424-2434.

Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Bailly, Y., Morinaga, N., Frohman, M. A., and Bader, M. F. (2002). Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *The Journal of cell biology* 159, 79-89.

Vogt, P. K., Jiang, H., and Aoki, M. (2005). Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 4, 908-913.

W.

- Walker, K. S., Kambadur, R., Sharma, M., and Smith, H. K. (2004). Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men. *Medicine and science in sports and exercise* 36, 787-793.
- Wang, G., Yeh, H. I., and Lin, J. J. (1994). Characterization of cis-regulating elements and trans-activating factors of the rat cardiac troponin T gene. *The Journal of biological chemistry* 269, 30595-30603.
- Wang, H., Kubica, N., Ellisen, L. W., Jefferson, L. S., and Kimball, S. R. (2006). Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *The Journal of biological chemistry* 281, 39128-39134.
- Wang, J., Helin, K., Jin, P., and Nadal-Ginard, B. (1995). Inhibition of in vitro myogenic differentiation by cellular transcription factor E2F1. *Cell Growth Differ* 6, 1299-1306.
- Wang, J., Huang, Q., Tang, W., and Nadal-Ginard, B. (1996). E2F1 inhibition of transcription activation by myogenic basic helix-loop-helix regulators. *Journal of cellular biochemistry* 62, 405-410.
- Wang, L., Harris, T. E., Roth, R. A., and Lawrence, J. C., Jr. (2007). PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *The Journal of biological chemistry* 282, 20036-20044.
- Wehling, M., Cai, B., and Tidball, J. G. (2000). Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *Faseb J* 14, 103-110.
- Wei, L., Zhou, W., Croissant, J. D., Johansen, F. E., Prywes, R., Balasubramanyam, A., and Schwartz, R. J. (1998). RhoA signaling via serum response factor plays an obligatory role in myogenic differentiation. *The Journal of biological chemistry* 273, 30287-30294.
- Wendel, H. G., De Stanchina, E., Fridman, J. S., Malina, A., Ray, S., Kogan, S., Cordon-Cardo, C., Pelletier, J., and Lowe, S. W. (2004). Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 428, 332-337.
- White, M. F. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science (New York, NY)* 302, 1710-1711.
- Wienecke, R., Konig, A., and DeClue, J. E. (1995). Identification of tuberlin, the tuberous sclerosis-2 product. Tuberlin possesses specific Rap1GAP activity. *The Journal of biological chemistry* 270, 16409-16414.
- Wilson, E. M., and Rotwein, P. (2007). Selective control of skeletal muscle differentiation by Akt1. *The Journal of biological chemistry* 282, 5106-5110.
- Wilson, E. M., Tureckova, J., and Rotwein, P. (2004). Permissive roles of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt in skeletal myocyte maturation. *Molecular biology of the cell* 15, 497-505.
- Wood, A. W., Duan, C., and Bern, H. A. (2005). Insulin-like growth factor signaling in fish. *International review of cytology* 243, 215-285.
- Woods, K. A., Camacho-Hubner, C., Savage, M. O., and Clark, A. J. (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *The New England journal of medicine* 335, 1363-1367.
- Wu, Z., Woodring, P. J., Bhakta, K. S., Tamura, K., Wen, F., Feramisco, J. R., Karin, M., Wang, J. Y., and Puri, P. L. (2000). p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Molecular and cellular biology* 20, 3951-3964.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.

X.

- Xie, Z., Ho, W. T., Spellman, R., Cai, S., and Exton, J. H. (2002). Mechanisms of regulation of phospholipase D1 and D2 by the heterotrimeric G proteins G13 and Gq. *The Journal of biological chemistry* 277, 11979-11986.
- Xu, Y., Fang, Y., Chen, J., and Prestwich, G. D. (2004). Activation of mTOR signaling by novel fluoromethylene phosphonate analogues of phosphatidic acid. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 14, 1461-1464.
- Xu, Y., Seet, L. F., Hanson, B., and Hong, W. (2001). The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *The Biochemical journal* 360, 513-530.

Y.

- Yamazaki, M., Zhang, Y., Watanabe, H., Yokozeki, T., Ohno, S., Kaibuchi, K., Shibata, H., Mukai, H., Ono, Y., Frohman, M. A., and Kanaho, Y. (1999). Interaction of the small G protein RhoA with the C terminus of human phospholipase D1. *The Journal of biological chemistry* 274, 6035-6038.
- Yang, H., Menconi, M. J., Wei, W., Petkova, V., and Hasselgren, P. O. (2005). Dexamethasone upregulates the expression of the nuclear cofactor p300 and its interaction with C/EBPbeta in cultured myotubes. *Journal of cellular biochemistry* 94, 1058-1067.
- Yang, W., Zhang, Y., Li, Y., Wu, Z., and Zhu, D. (2007). Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. *The Journal of biological chemistry* 282, 3799-3808.
- Yimlamai, T., Dodd, S. L., Borst, S. E., and Park, S. (2005). Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J Appl Physiol* 99, 71-80.
- Yoon, M. S., and Chen, J. (2008). PLD regulates myoblast differentiation through the mTOR-IGF2 pathway. *Journal of cell science* 121, 282-289.

Z.

- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J., and Schultz, M. C. (1998). Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 18, 4463-4470.
- Zetser, A., Gredinger, E., and Bengal, E. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 274, 5193-5200.
- Zhang, G. F., Patton, W. A., Lee, F. J., Liyanage, M., Han, J. S., Rhee, S. G., Moss, J., and Vaughan, M. (1995a). Different ARF domains are required for the activation of cholera toxin and phospholipase D. *The Journal of biological chemistry* 270, 21-24.
- Zhang, W., Behringer, R. R., and Olson, E. N. (1995b). Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes & development* 9, 1388-1399.
- Zhang, Y., and Akhtar, R. A. (1998). Epidermal growth factor stimulates phospholipase D independent of phospholipase C, protein kinase C or phosphatidylinositol-3 kinase

- activation in immortalized rabbit corneal epithelial cells. *Current eye research* *17*, 294-300.
- Zhang, Y., Altshuller, Y. M., Hammond, S. M., Hayes, F., Morris, A. J., and Frohman, M. A. (1999). Loss of receptor regulation by a phospholipase D1 mutant unresponsive to protein kinase C. *The EMBO journal* *18*, 6339-6348.
- Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S. H., and Goldberg, A. L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism* *6*, 472-483.
- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V. V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E. N., Ulevitch, R. J., and Han, J. (1999). Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Molecular and cellular biology* *19*, 21-30.
- Zhou, D., Luini, W., Bernasconi, S., Diomedea, L., Salmona, M., Mantovani, A., and Sozzani, S. (1995). Phosphatidic acid and lysophosphatidic acid induce haptotactic migration of human monocytes. *The Journal of biological chemistry* *270*, 25549-25556.
- Zhou, X., Wang, J. L., Lu, J., Song, Y., Kwak, K. S., Jiao, Q., Rosenfeld, R., Chen, Q., Boone, T., Simonet, W. S., *et al.* (2010). Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* *142*, 531-543.

ANNEXES