



HAL
open science

Identification de marqueurs moléculaires dans une situation d'atrophie musculaire chez le rongeur

Doryan Jouanne

► **To cite this version:**

Doryan Jouanne. Identification de marqueurs moléculaires dans une situation d'atrophie musculaire chez le rongeur. *Physiologie [q-bio.TO]*. 2021. hal-04129151

HAL Id: hal-04129151

<https://hal.inrae.fr/hal-04129151>

Submitted on 15 Jun 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Clermont Auvergne

IUT département Génie Biologique
Formation DUT Génie Biologique
Option Analyses Biologiques et Biochimiques
Promotion : 2021



**IUT CLERMONT
AUVERGNE**

Aurillac - Clermont-Ferrand - Le Puy-en-Velay
Montluçon - Moulins - Vichy

Identification de marqueurs moléculaires dans une situation d'atrophie musculaire chez le rongeur



Stage de fin d'études du 19 avril au 18 juin 2021

INRAE, site Clermont-Ferrand - Theix
Unité de Nutrition Humaine – UMR 1019
Équipe Protéostasie

Tutrice :

Dr. Lydie COMBARET
Doctorante. Laura CUSSONNEAU

Rapport présenté par :

Doryan JOUANNE



Unité de Nutrition Humaine

Remerciements

Abréviations

ADN = Acide désoxyriboucléique

APS = Ammonium persulfate

ARN = Acide ribonucléique

ARNm = Acide ribonucléique messenger

ATF4 = Activating transcription factor 4

BMP = Bone morphogenetic protein

BSA = Bovine serum albumin

DTT = Dithiothréitol

eIF2 α = Eukaryotic initiation factor 2 alpha

GADD34 = Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34

GDF5 = Growth differentiation factor 5

HRP = Horseradish peroxydase

HS = Hindlimb suspension

PCR = Polymerase chain reaction

PVDF = Polyvinylidene difluoride

RT = Reverse transcription

qPCR = quantitative Polymerase Chain Reaction

SDS = Dodécylsulfate de sodium

TBS = Tris Buffer Saline

TEMED = Tétraméthyléthylènediamine

TGF- β = Transforming growth factor beta

TG = Tris Glycine

TGX = Tris-Glycine eXtended

TRB3 = Tribbles pseudokinase 3

Liste des figures

Figure 1 : Ultrastructure du muscle squelettique.

Figure 2 : La superfamille du TGF- β représentée par les voies de signalisation TGF- β et BMP.

Figure 3 : L'activation de la voie de signalisation eIF2 α -ATF4. (Bruhat and al – 2015)

Figure 4 : Mécanisme d'action de l'Halofuginone.

Figure 5 : Graphique représentant la masse du soléaire et du gastrocnémien, ainsi que le poids corporel et la consommation alimentaire prélevé sur des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues.

Figure 6 : Protocole expérimental sur l'animal.

Figure 7 : Protocole du kit RNeasy Fibrous Tissue, utilisé pour l'extraction d'ARN.

Figure 8 : Protocole du kit Qubit RNA Assay Kit, utilisé pour le dosage des ARN.

Figure 9 : Graphique représentant la masse corporelle (a.) et la masse de la consommation alimentaire (b.) chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone.

Figure 10 : Graphique représentant l'expression de la protéine p-eIF2 α chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues.

Figure 11 : Histogramme représentant la moyenne des Ct en fonction des différents groupes de souris

Figure 12 : Contrôle de dégradation des ARN sur gel d'agarose.

Figure 13 : Graphique représentant l'expression de la protéine Smad 2-3 chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues.

Figure 14 : Graphique représentant l'expression de la protéine de Smad 4, Smad 1-5 et GDF5 chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gamme étalon par la méthode Bradford.

Tableau 2 : Anticorps utilisés lors du Western Blot.

Tableau 3 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées.

Tableau 4 : Tableau des Ct obtenus pour les gènes ATF4 et TRB3 chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues.

Tableau 5 : Concentration en ARN obtenu lors des différents dosages.

Sommaire

Laboratoire d'accueil	1
I. L'INRAE	1
II. L'Unité de Nutrition Humaine	1
III. L'Équipe Protéostasie	2
Introduction	3
I. Le muscle squelettique	4
1. Généralités.....	4
2. L'atrophie musculaire.....	4
II. La superfamille du TGF-β	5
III. La voie de signalisation eIF2α-ATF4	6
IV. Objectifs	7
Matériels et Méthodes	8
I. Protocole expérimental sur l'animal	8
II. Western Blots	8
1. Extraction des protéines	8
2. Migration et révélation des protéines	9
3. Analyses statistiques	10
III. RT-qPCR	10
1. Extraction d'ARN.....	10
2. Rétrotranscription des ARNm (RT).....	11
3. qPCR.....	11
Résultats et discussion	13
I. Suivi du poids corporel et de la consommation alimentaire avec un pré-conditionnement	13
II. Effet du pré-conditionnement sur de la voie eIF2α-ATF4	13
1. Analyse de la quantité des protéines p-eIF2 α	13
2. Analyse de la quantité d'ARNm cible de la voie eIF2 α -ATF4	13
3. Discussion	15

III. Effet du pré-conditionnement sur la superfamille du TGF-β	16
1. <i>Analyse de la quantité des protéines Smad 2 et 3.....</i>	16
2. <i>Quantité de la protéine Smad 4 totale</i>	16
3. <i>Quantité de la protéine Smad 1-5 totale et GDF5.....</i>	16
4. <i>Discussion</i>	17
Conclusion.....	19
Références bibliographiques	20
Annexes	

Laboratoire d'accueil [1]

I. L'INRAE

L'Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) est un organisme de recherche scientifique publique, placé sous la double tutelle du ministère de l'enseignement Supérieur de la Recherche ainsi que du ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Il est un acteur majeur de la recherche et de l'innovation.

Il est né le 1^{er} janvier 2020 de la fusion entre l'INRA (Institut National pour la Recherche Agronomique) et l'IRSTEA (Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture). Grâce à cette fusion l'INRAE atteint une masse critique et mutualise des infrastructures de recherche importante avec plus 10 000 agents, 200 unités de recherche et 18 centres répartis dans toute la France. L'institut se consacre à des recherches en Alimentation, Agriculture et Environnement, prenant en compte des aspects liés au changement climatique, à l'écologie, aux territoires, l'alimentation durable, la santé globale...

L'INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes est composé de 20 unités réparties sur 8 sites (Clermont-Ferrand, Aurillac, Theix, Montoldre...). Parmi ces 20 unités, on retrouve 14 unités de recherche, 2 unités expérimentales et 4 unités administratives. L'INRAE de Clermont-Ferrand est composé de 6 unités différentes dont l'Unité de Nutrition Humaine (UNH).

II. L'Unité de Nutrition Humaine

L'Unité de Nutrition Humaine est située sur 2 sites, le site de Theix et celui de la Faculté de Médecine (site Henri Dunant, Clermont-Ferrand). Elle est composée de 5 équipes (Ecrein, Proteostasis, Nutrivasc, ASMS et Improving), inclue 130 agents permanents et est dirigée par Dr. Didier REMOND. L'UNH a pour objectif de développer des stratégies nutritionnelles innovantes pour réduire ou prévenir le risque de maladies métaboliques et améliorer les maladies associées au vieillissement de la population.

Pour atteindre ses objectifs elle travaille sur 3 thématiques de recherche :

- Nutrition et mécanismes d'adaptations tissulaire et cellulaire
- Maintien de la masse musculaire et osseuse
- Produits végétaux, santé et alimentation durable

III. L'Équipe Protéostasis

Dirigée par Dr. Pierre FAFOURNOUX, l'équipe Protéostasis porte ses recherches sur l'étude de la dérégulation du métabolisme des acides aminés et des protéines, qui est une caractéristique associée à de nombreuses maladies ou au vieillissement. Pour ce faire, l'équipe étudie les origines et les conséquences des dérégulations protéiques pour développer ensuite des stratégies nutritionnelles et/ou pharmacologiques pour rétablir une homéostasie.

Introduction

Le muscle squelettique représente 40 à 45% de la masse corporelle totale d'un individu. Il est essentiel pour la mobilité et le maintien de la posture, mais également pour la capacité de défense de l'organisme, car c'est un réservoir d'acides aminés important utile notamment pour la réponse immunitaire, la réponse inflammatoire, la néoglucogenèse. Néanmoins, lors de nombreuses conditions cataboliques (cachexie cancéreuse, jeûne, sepsis, vieillissement, inactivité physique etc.) le muscle subit une atrophie musculaire qui se caractérise par une perte de masse globale du muscle et de sa force de contraction. L'atrophie musculaire affecte donc le stockage des acides aminés et par conséquent perturbe l'homéostasie corporelle globale, conduisant à des réponses aux traitements thérapeutiques amoindries, augmentant la morbidité et donc entraînant des coûts de santé publique élevés. La récupération des capacités musculaires est plus ou moins longue selon le stade de l'atrophie, d'où l'importance d'identifier un moyen de la prévenir ou de la traiter.

L'atrophie musculaire est provoquée par un dérèglement de l'homéostasie protéique, où la dégradation protéique surpasse la synthèse protéique. Cette dérégulation est une conséquence d'une suractivation ou d'une inhibition d'un ensemble de voies de signalisations intracellulaires interconnectées, répondant à différents stress extracellulaires environnants. Au cours de ces dernières décennies, de nombreuses études ont étudié ces voies cellulaires, notamment la superfamille du TGF- β . Cette superfamille comprend 2 voies de signalisations impliquées dans le contrôle de la masse musculaire avec des effets qui s'opposent ; la voie TGF- β impliquée dans l'atrophie musculaire et la voie BMP impliquée dans le maintien de la masse musculaire. La voie eIF2 α -ATF4 a également été impliquée dans le contrôle de la masse musculaire. De plus, la phosphorylation d'eIF2 α a été montrée comme inhibant la voie TGF- β . Cette phosphorylation peut être stimulée par une plante extraite de la médecine traditionnelle chinoise, l'Halofuginone, mais ces mécanismes d'action en condition d'atrophie musculaire restent très peu connus.

L'objectif de ce stage a été de caractériser l'effet d'un pré-conditionnement à l'Halofuginone en amont de l'induction d'une atrophie musculaire par suspension des pattes arrière chez la souris. Lors de mon stage, j'ai étudié les protéines de la superfamille des TGF- β ainsi que les gènes cibles d'ATF4 dans les muscles gastrocnémiens des souris traitées ou non par l'Halofuginone en amont d'une suspension du train arrière ou non.

Bibliographie

I. Le muscle squelettique

1. Généralités

Le muscle squelettique est composé de plusieurs tissus tels que le tissu musculaire, conjonctif, nerveux, adipeux et vasculaire. Le tissu musculaire est le tissu le plus abondant du corps humain, correspondant à 40-45% de la masse corporelle totale [2]. Il assure la mobilité, le maintien de la posture, la stabilité des articulations, mais ces fonctions mécaniques ne représentent que 40% de son activité. Il est également un important acteur métabolique, responsable de la thermogénèse, et un important réservoir d'acides aminés utiles pour le système immunitaire, pour les réponses inflammatoires et pour la synthèse protéique à l'échelle du corps entier [3].

Le muscle est constitué de fibres musculaires, cellules plurinucléées de quelques centimètres de long (1 à 5 cm) entourées par un tissu conjonctif appelé endomysium, assemblées en faisceaux de fibres. Chaque faisceau est maintenu par un tissu conjonctif appelé le périmysium et les faisceaux sont entourés d'un tissu conjonctif appelé l'épimysium et (*cf. Figure 1*). Les fibres musculaires sont composées de myofibrilles formant l'appareil contractile du muscle qui assure de façon coordonnée la contraction du muscle.

Dans le muscle squelettique, plusieurs types de fibres existent. Les fibres rouges dites à contraction lente (type I) et les fibres blanches dites à contraction rapide (types IIa et IIb). Les fibres de type I sont riches en mitochondries, en myoglobine, et en enzymes dites oxydatives ; elles ont un métabolisme aérobie. A contrario, les fibres de types IIa et IIb sont pauvres en mitochondries et en myoglobine par rapport aux fibres rouges et ont un métabolisme anaérobie. Par conséquent, la capacité oxydante est plus élevée dans les fibres de type I, et la capacité glycolytique est plus élevée dans les fibres de types IIa et IIb [4]. Par exemple, au niveau de la jambe, le muscle soléaire est un muscle plutôt oxydatif alors que le muscle gastrocnémiens est un muscle mixte, à la fois oxydatif et glycolytique.

2. L'atrophie musculaire

L'équilibre entre la synthèse et la dégradation protéique est essentiel au maintien de la masse et des fonctions musculaires. En cas de dégradation (protéolyse) supérieure à la synthèse

protéique (protéosynthèse), cela conduit à l'atrophie musculaire. Le muscle perd de son volume et de sa force de contraction. L'atrophie musculaire est associée à de nombreuses conditions cataboliques telles que la cachexie cancéreuse, le sepsis, le jeûne, le vieillissement, la microgravité, l'inactivité physique, ou l'immobilisation prolongée... Cette atrophie entraîne une diminution de l'autonomie et un dérèglement de l'homéostasie à l'échelle du corps entier. Les individus deviennent plus vulnérables aux maladies, les traitements thérapeutiques sont moins efficaces, et par conséquent le taux de morbidité lié à l'atrophie est plus élevé.

Aujourd'hui aucun traitement préventif ou thérapeutique n'est réellement efficace contre l'atrophie. Néanmoins de nombreuses études effectuées ces dernières décennies, notamment en induisant une atrophie musculaire chez le rongeur (suspension par le train arrière, plâtrage, immobilisation etc.), ont permis de collecter de nombreuses informations quant aux différentes voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire. Ces différentes voies, comme la super famille du TGF- β (« Transforming Growth Factor Beta ») [5], conduisent à la transcription de gènes considérés comme pro-atrophique.

II. La superfamille du TGF- β

La superfamille du TGF- β régule divers processus physiologiques et comprend plus ou moins 35 cytokines qui jouent un rôle dans le développement et dans l'homéostasie tissulaire. Ces cytokines se lient aux récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase qui transmettent des signaux aux médiateurs intracellulaires appelés Smads [6]. Une dérégulation de ces voies de signalisation est associée à de nombreuses pathologies telles que l'obésité, des pathologies hépatiques ou des cancers [7].

Ces deux voies de signalisations qui ont pour acteurs intracellulaires les protéines Smads, sont impliquées dans le contrôle de la masse musculaire de manière opposée. Une fois activée par l'association ligand/récepteur, les acteurs intracellulaires Smad 2/3 pour TGF- β (*cf. figure 2*) et Smad 1/5 pour BMP (« Bone Morphogenetic Protein ») (*cf. figure 2*) vont être phosphorylés. Cette phosphorylation va permettre à Smad 2/3 et Smad 1/5 de former un complexe transcriptionnel avec une protéine commune, Smad 4. Ces complexes vont transloquer dans le noyau de la cellule pour transcrire des gènes considérés comme pro-atrophique pour TGF- β [8], et des gènes impliqués dans le maintien de la masse musculaire pour BMP [9]. Des résultats d'une récente étude permettent de suggérer que l'équilibre entre la perte de masse musculaire (atrophie musculaire) et le maintien de la masse musculaire

(hypertrophie) est dépendant du recrutement de Smad 4 entre ces deux voies de signalisations. Le ligand GDF5 (« Growth/differentiation factor 5 ») qui est un ligand de la voie BMP, a été le seul à être étudié et montré comme pro-maintien de la masse musculaire [9].

De nombreuses études ont donc permis de montrer l'implication de la superfamille du TGF- β dans le contrôle de la masse musculaire. Parmi les autres voies de signalisations impliquée dans le contrôle de la masse musculaire, l'équipe s'est intéressée à la voie eIF2 α -ATF4 (« Eukaryotic initiation factor 2 alpha - Activating transcription factor 4 »).

III. La voie de signalisation eIF2 α -ATF4

eIF2 α est un facteur d'initiation à la traduction, qui avec un important complexe protéique permet la traduction des ARN messager en protéines. En réponse à différents stress (comme un stress du réticulum endoplasmique, une infection virale, une carence en hème, ou une carence en un acide aminé indispensable (AAI)), différentes kinases (PERK, PKR, HRI, GCN2 respectivement) vont être activées et phosphoryler eIF2 α sur sa sérine 51 (*cf. Figure 3*) [10]. La phosphorylation d'eIF2 α a deux conséquences : 1) l'inhibition de la synthèse protéique globale et 2) la traduction de certains ARN messagers, qui possèdent une structure particulière dans leurs régions 5'UTR, comme le facteur de transcription ATF4. Ce facteur de transcription va induire la transcription de gènes cibles ayant un rôle dans l'autophagie, la biosynthèse et transport des acides aminés et la lutte contre le stress oxydant. Ceci permet aux cellules de rétablir l'homéostasie cellulaire. Activée trop longtemps ou trop intensément, cette voie a été montrée comme étant impliquée dans l'atrophie musculaire [11]. Cependant, certains acteurs de cette voie pourraient être importants pour le maintien de la masse musculaire comme Trb3 ou la kinase PERK. Par conséquent, il est possible que le rôle de la voie eIF2 α -ATF4 dans le contrôle de la masse musculaire dépende de la durée ou de l'intensité d'activation.

La phosphorylation d'eIF2 α est également impliquée dans l'inhibition de la voie TGF- β , en inhibant la phosphorylation de Smad 2/3 et donc la transduction du signal jusque dans le noyau [12]. Les mécanismes sous-jacents d'inhibition ainsi que cette interaction au sein du muscle squelettique restent cependant à être élucidés. L'Halofuginone, molécule synthétique issue d'une plante extraite de la médecine traditionnelle chinoise qui sert notamment dans la guérison des plaies et qui atténue la fibrose hépatique, est impliquée dans l'inhibition de la voie TGF- β (*cf. Figure 4*) [12]. Cette molécule agit en stimulant la phosphorylation d'eIF2 α , ce qui conduit à inhiber la formation du complexe p-Smad 2/3 – Smad 4. On peut donc se demander si cette

molécule empêcherait la translocation du complexe dans le noyau, et par conséquent la transcription des gènes considérés comme pro-atrophique. Un pré-conditionnement par l'Halofuginone peut être envisagé pour permettre une activation modérée de la voie eIF2 α /ATF4. Le pré-conditionnement consiste à exposer un organisme, un organe ou encore une cellule à un stress modéré dans le but de le protéger les jours suivants à un stress du même type mais plus important.

Les recherches préliminaires faites par l'équipe Protéostasis ont testé l'effet d'un pré-conditionnement de 3-4 semaines avec de l'Halofuginone à une fréquence de 3 fois par semaines, et à une concentration de 0,25g/kg (*Cf. Matériels et Méthodes*, § I). Cette dose permet de ne pas activer trop intensément la voie eIF2 α -ATF4. Les données montrent que le poids corporel et la consommation alimentaire des souris recevant de l'Halofuginone ou subissant une suspension par le train arrière ne changeait pas (*cf. Figure 5*).

IV. Objectifs

En conclusion, l'atrophie musculaire pose un problème de santé publique. La recherche pour trouver un moyen de prévenir ou de traiter celle-ci est importante pour améliorer la qualité de vie des patients ainsi que leur pronostic vital en cas de pathologies. De nombreuses études ont permis de montrer l'implication de la superfamille du TGF- β dans le contrôle de masse musculaire en montrant également l'opposition de la voie TGF- β (pro-atrophique) et de la voie BMP (pro-maintien). La voie eIF2 α -ATF4 est montrée comme inhibitrice de la voie TGF- β et peut être activée par l'Halofuginone.

C'est pourquoi, les recherches se sont donc portées sur l'hypothèse que la prévention partielle de l'atrophie musculaire observée chez les souris ayant reçu un pré-conditionnement par l'Halofuginone pourrait dépendre de l'activation modérée de la voie eIF2 α -ATF4 et/ou à une inhibition de la voie TGF- β par eIF2 α phosphorylé. Pour cela, un pré-conditionnement avec de l'Halofuginone a été fait chez des souris en amont d'une atrophie musculaire induite par une suspension.

Matériels et Méthodes

I. Protocole expérimental sur l'animal

Après avoir été validées par la législation en vigueur en France sur l'expérimentation animale (23514-2020010610021795v4), les expériences suivantes ont été réalisées. Quarante-huit souris mâles de souche C57BL/6 âgées de 8 semaines, ont reçu par gavage trois fois par semaine pendant 4 semaines une solution d'Halofuginone (0,25 g/kg) diluée dans l'eau (groupe HF, n=24) ou le véhicule (groupe H20, n=24) (*cf. Figure 6*). Au terme de ce pré-conditionnement de 4 semaines, huit souris de chaque groupe ont été suspendues par le train arrière (HS) pendant 3 jours (H20-HS3J ou HF-HS3J) ou 7 jours (H20-HS7J ou HF-HS7J). Les 8 dernières souris de chaque groupe n'ont pas été suspendues et ont donc constitué les contrôles de l'expérience (H20-Ctrl ou HF-Ctrl). Au terme du protocole les souris ont été sacrifiées. Un suivi de consommation alimentaire et de poids corporel a été mené durant les semaines de gavage et de suspension. Au sacrifice, les muscles gastrocnémiens ont été prélevés, puis conservés à - 80°C jusqu'à utilisation.

II. Western Blots

1. Extraction des protéines

Les muscles gastrocnémiens ont été broyés à l'aide d'un mortier sur glace carbonique, puis 30mg de cette poudre de muscles a été utilisée par la suite. La poudre a été homogénéisée à l'aide d'un TissueRuptor dans 300µL de tampon d'extraction (Tris-HCl pH : 7,5 - 10 mM, NaCl - 150 mM, EDTA - 1 mM, EGTA - 1 mM, Triton X100 - 1%, IGEPAL CA630 (« Octylphenyl-polyethylene glycol ») - 0,5%, PIC (Sigma « Protéase inhibitor cocktail ») - 1X, PhIC (« Phosphatase inhibitor cocktail » 50X, 50mM Na₃VO₄, 500mM NaF) - 1X). Les protéines ont été ensuite centrifugées à 11 000 rpm pendant 5 minutes et le surnageant a été récupéré pour la préparation des échantillons. Le dosage des protéines du surnageant a été fait avec la méthode de Bradford. (Biorad Protein Assay Dye Reagent 5X). Le réactif Bradford a la capacité de se lier à la chaîne aromatique des protéines, ce qui forme un complexe bleu qui absorbe au spectrophotomètre à 595nm. Une gamme étalon a été faite avec de la BSA (Bovine Serum Albumin), avec un intervalle linéaire allant de 0,1 à 1 µg/µL (*cf. Tableau 1*).

Les échantillons ont par la suite été dilués à une concentration de 2µg/µL dans du Bleu de Laemmli 1X (SDS (dodécylsulfate de sodium), bleu de bromophénol, glycérol et DTT

(dithiothréitol)). Pour finir, les protéines ont été dénaturées 5min à 95°C, puis conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

2. Migration et révélation des protéines

À partir des échantillons préalablement préparés, 20, 30 ou 40µg de protéines ont été séparés par électrophorèse par la technique biochimique SDS-PAGE (Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium). Les conditions utilisées pour les Western blots et les immuno-blots sont décrites dans le tableau récapitulatif des anticorps (cf. *Tableau 2*). Des gels d'acrylamide ont été préparés (TGX Stain-Free FastCast, Acrylamide Kit « BIO-RAD », Cat #1610183), constitués d'un gel de concentration (« stacking ») à 4% d'acrylamide puis un gel de séparation (« resolving ») à 10% d'acrylamide. La polymérisation des gels a été initiée par l'ajout d'APS 10% (Ammonium Persulfate solution) et de TEMED (Tétraméthyléthylènediamine). Pour s'assurer des poids moléculaires des cibles étudiées, une échelle protéique (Thermo Scientific Pageruler Prest Plus Prestained Protein Ladder) a également été déposée sur chaque gel. L'électrophorèse s'est faite dans un tampon de migration (« Running buffer ») Tris-Glycine-SDS 1X (Euromedex TG-SDS 10X), avec un générateur réglé à 100V constant.

Une fois les protéines séparées, les gels TGX (Tris-Glycine eXtended) ont été activés pendant 1min aux UV (G : Box ; lampe TLUM (Upper wave)). Le principe du TGX repose sur une activation des gels aux UV qui permettent aux molécules de thiol du gel de se fixer spécifiquement sur le tryptophane des protéines présentes, il a été utilisé car les protéines de ménages varient trop dans nos conditions expérimentales. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane en PVDF (polyvinylidène difluorure) 0,45 µM, préalablement humidifiée dans un tampon de transfert (Tris-glycine 1X (TG 10X Euromedex), et 20% d'éthanol 100%) en présence de papier filtrant (Extra thick blot paper, Filter paper, Biorad), puis transféré avec un courant constant de 80 V – 1A pendant 30min en semi-sec (Biorad Trans-BlotTurbo).

Après le transfert, les membranes en PVDF ont été bloquées avec de la BSA 5% dans du TBS 1X (TBS 10X Euromedex) Tween 0.01% (Sigma) pendant 1h30 à température ambiante sous agitation constante. Les membranes ont ensuite été hybridées avec l'anticorps primaire suivant différentes conditions (cf. *Tableau 2*). Les membranes ont ensuite été lavées 2 fois rapidement, puis 3 fois de 15min dans une solution de TBS 1X Tween 0.01%, avant d'être hybridées avec le second anticorps marqué à la HRP (« Horseradish Peroxydase »), qui

permet la conversion de substrats chromogènes en un composé coloré) pendant 1h30 à température ambiante sous agitation (*cf. Tableau 2*). Puis, les membranes ont été lavées de nouveau avec 2 lavages rapides suivis de 3 lavages de 15min avec une solution TBS 1X et Tween 0.01%. Pour la révélation en chimiluminescence, un substrat luminescent « Classico » (Sigma Immobilon Classico Western HRP Substrate) ou « Forte » (Sigma Immobilon Forte Western HRP Substrate) a été ajouté. Ce substrat réagit avec la HRP qui est fixé à l'anticorps secondaire. Le produit de cette réaction est luminescent et donc visible sous un automate de révélation (Gbox Syngene _ Ozyme). Les signaux ont été acquis par le logiciel « GeneSys » et ont été ensuite quantifiés à l'aide du logiciel GeneTools (Syngene). Ils ont ensuite été normalisés contre la quantité totale de protéines déterminée par les signaux TGX pour corriger une éventuelle charge inégale.

3. Analyses statistiques

Le test statistique ANOVA a été utilisé pour comparer les différents groupes à l'aide de Prism 8 (logiciel GraphPad). Le test statistique ANOVA a été fait avec 2 facteurs (facteur traitement et facteur suspension). Par la suite les données ont subi un test a posteriori de Fisher. Les différences d'expression protéique ont été considérées comme statistiquement différentes à un seuil de 5% ($P \leq 0,05$).

III. RT-qPCR

1. Extraction d'ARN

L'extraction a été réalisée avec le kit « RNeasy Fibrous Tissue » (*cf. figure 7*). 20mg de poudre de muscle de gastrocnémien a été lysé avec un TissueRuptor dans 300 μ L de tampon d'extraction. Dans ce tampon l'ajout de β -mercaptoéthanol a permis de couper les ponts disulfures des protéines. Puis, une digestion des protéines dans le mélange a été fait grâce à la protéinase K. Le surnageant a été récupéré et 0,5 volume d'éthanol 100% a été ajouté. Puis le mélange a été transféré sur une colonne d'extraction (RNeasy Mini column) qui est composé d'une membrane en silice sur laquelle les ARN se lient. Par la suite 2 lavages ont été effectués avec un tampon de lavage. Des DNases ont été ajoutés au centre de la membrane en silice de la colonne, ce qui a permis la digestion des ADN. Pour finir, les ARN ont été élués avec de l'eau sans RNase (« RNase Free Water »). Eluat

Pour avoir une meilleure pureté de l'échantillon, une précipitation a été faite en ajoutant 2,5 volumes d'éthanol 100%, 0,1 volume d'acétate de sodium (3M) et 2 μ L de glycoène

(5mg/mL) à l'éluât de l'extraction d'ARN. Les échantillons ont été ensuite placés à -80°C pendant 2h. Ils ont été ensuite centrifugés à 11 000rpm pendant 15min à 4°C. Le culot a été ensuite lavé dans 100µL d'éthanol 70%, et centrifugé à nouveau à 11 000rpm pendant 15min à 4°C. Le culot, contenant les ARNs, a été resuspendu dans 10µL d'eau sans RNase avant d'être dosé.

Un dosage de l'ARN présent dans chaque échantillon a été effectué avec 2 techniques différentes. La première technique consiste à déposer 2µL d'ARN élué, sur un appareil de mesure (Nanodrop ONE / ONEC) (spectrophotométrie UV et visible). La deuxième technique repose sur un kit (Qubit RNA Assay Kit) (*cf. Figure 8*) : il permet à un fluorochrome de se fixer sur les bases nucléotidiques de l'ARN, la fluorescence mesurée est alors proportionnelle à la quantité d'ARN présente dans l'échantillon (*cf. figure XX*).

Un contrôle de dégradation des ARN a été fait. Pour cela, un gel d'agarose à 10% a été fait, où un mélange de 2 µL de l'éluât d'ARN avec un tampon de charge 1X (6X DNA Euromedex) a été déposé en plus d'une échelle de taille ADN (Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix). Une révélation aux UV a ensuite été faite.

2. *Rétrotranscription des ARNm (RT)*

La rétrotranscriptase (Reverse transcriptase ou RT) est une enzyme permettant à des DNA polymérase de synthétiser un brin d'ADN complémentaire, de l'ADN cyclique (ADNc) avec un ARN comme matrice, pour former un hybride ADN/ARN. Pour ce faire, 500ng d'ARN précédemment extraits ont été utilisés, et un mélange composé de Random Primers (RP 250ng/µL), de désoxyribonucléoside triphosphate quelconque (dNTP 10mM), de dithiothréitol (DTT 0,1M), d'un tampon 1X « First Strand Buffer 5X » et de Super Script II 100U (SuperScript II Reverse Transcriptase 200U/ µL ; enzyme qui est génétiquement modifiée avec une activité RNase H) a été ajouté. Les échantillons ont par la suite été placés dans un thermocycleur pendant 60min à 42°C (température optimale de réaction de l'enzyme Super Script II), puis 15min à 70°C pour inactiver la réaction. Les produits de la RT ont été ensuite dilués au 1/10e avec de l'eau sans RNase.

3. *qPCR*

La PCR (« Polymérase Chain Reaction ») a été réalisée dans une plaque 96 puits (Biorad). 10ng d'équivalents ARN ont été déposés dans les puits avec 0,7µL de chaque amorce (sens/anti-sens à 10µM) (*cf. Tableau 3*), 7µL du mélange enzymatique (PerfeCTA SYBR Green SuperMix

Quanta Biosciences), et 3,6 μ L d'eau sans RNase. Le mélange enzymatique est une solution concentrée au 2X, il est composé de AccuStart II Taq ADN polymérase, SYBR vert colorant, stabilisateurs enzymatiques exclusifs et additifs et un colorant de référence. Les plaques ont ensuite été placées dans un thermocycleur CFX96TM (Biorad), et le programme suivant a été appliqué pour une réaction optimale de l'enzyme Taq DNA polymérase : 3 minutes d'activation de la Taq DNA polymérase à 95°C, puis un cycle de 10 secondes à 95°C (phase de dénaturation) et 20 secondes à 59-60°C (phase d'hybridation et d'élongation des amorces) ; ce cycle a été répété 39 fois. Une courbe de fusion (« Melt Curve ») a permis de contrôler l'unicité des amplicons et donc la spécificité des amorces, et pour cela une évaluation de la dissociation du double brin d'ADN en fonction du chauffage a été faite avec un cycle de température croissante (de 65 à 95°C) pendant 15 min.

La principale sortie pour la qPCR est la courbe d'amplification. Ces courbes montrent l'accumulation de produit amplifié au fur et à mesure que la réaction progresse. Le colorant fluorescent utilisé (SYBR Green dye I) a été mesuré lorsqu'intégré au sein du brin d'ADN néoformé. La phase exponentielle de la courbe d'amplification représente la partie où la quantité de produit formé double à chaque cycle, ce qui reflète une relation précise et quantitative entre le signal et la quantité du gène d'intérêt présent dans les échantillons. Pour une quantification précise de Ct (Cycle Threshold ou Cycle de Quantification Cq), le seuil doit être réglé de sorte que toutes les courbes d'amplification se retrouvent pendant la phase exponentielle. Pour ce faire, une courbe étalon interne à notre expérience (mélange à volume équivalent de tous nos échantillons dilués de manière sériée à facteur 2) a été réalisée afin de pouvoir positionner notre seuil d'amplification dans la partie exponentielle, et donc déterminer de manière précise les Cts de nos échantillons. Le software utilisé a été CFX Maestro Software for Biorad CFX Real-Time PCR. Pour normaliser les données, le gène d'intérêt utilisé a été le gène ADNr 18S, car les gènes de ménage utilisés habituellement varient trop entre les échantillons dans nos conditions (données du laboratoire).

Résultats et discussion

I. Suivi du poids corporel et de la consommation alimentaire avec un pré-conditionnement

Durant ce stage un préconditionnement à l'Halofuginone a été fait chez 48 souris à une fréquence de 3fois/semaine, et à une concentration de 0,25g/kg. Les souris ainsi que leur consommation alimentaire ont été pesés tous les jours. Toutes le semaines 12 souris ont été sacrifiées, et le gastrocnémien a par la suite été pesés.

Le poids corporel des souris, nous montre qu'aucune diminution du poids n'est visible (*cf. figure 9a*). Quant à la masse de consommation alimentaire il n'y a également aucun changement (*cf. figure 9b*). La suspension ou le traitement à l'Halofuginone n'influence donc pas le poids corporel et la consommation alimentaire des souris ce qui est en accord avec les résultats trouvés par l'équipe.

II. Effet du pré-conditionnement sur de la voie eIF2 α -ATF4

1. Analyse de la quantité des protéines p-eIF2 α

La *Figure 10A* montre la détection de p-eIF α . Après quantification et normalisation, la *Figure 10B* montre que de manière générale, la quantité de protéines phospho-eIF2 α est significativement plus faible dans les muscles des souris du groupe HF par rapport à celle du groupe H2O qu'elles aient été suspendues ou non. La quantité de protéines de phospho-eIF2 α dans les muscles des souris Ctrl tend à diminuer chez celles qui ont reçu le traitement HF par rapport à celle qui ont reçu l'H2O. La quantité protéique de phospho-eIF2 α reste inchangée dans les muscles des souris contrôles ou suspendues ayant reçues un traitement H2O. Pour les souris ayant reçues de l'HF, une tendance à l'augmentation est observée entre les souris Ctrl et les souris suspendues pendant 3 jours.

2. Analyse de la quantité d'ARNm cible de la voie eIF2 α -ATF4

L'objectif a été de mesurer par RT-qPCR les niveaux d'ARNm de TRB3 et d'ATF4 impliqués dans la voie eIF2 α /ATF4. Les données de Ct pour ces 2 gènes sont données dans la *Figure 11*. Pour normaliser ces résultats de PCR, l'ARN ribosomal 18S a été choisi, car la quantité de ce gène est censé rester inchangé entre toutes nos conditions expérimentales.

Les Ct enregistrés après la mesure réalisée pour l'ARNr 18S ont été très variables d'un échantillon à l'autre, alors que cette mesure est habituellement très stable. Afin d'écartier la possibilité que le jeu d'amorces utilisé était dégradé ou non conforme, une seconde mesure a été réalisée avec un deuxième jeu d'amorce. La Figure 6 montrent que les Ct mesurés sont différents entre les 2 jeux d'amorces avec des Ct systématiquement plus faibles dans tous les groupes de souris. Ceci pourrait signifier que le premier jeu d'amorces soit effectivement abîmé. Par contre, même avec ce deuxième jeu d'amorces, les Ct sont très variables d'un échantillon à l'autre (cf. Figure 11). La quantification de l'ARNr18S étant donc trop différente entre nos échantillons, la normalisation des niveaux d'ARNm d'ATF4 et de TRB3 initialement prévue n'a pu être faite (cf. Tableau 4).

Cette variabilité au niveau de l'ARNr 18S pourrait être due à un problème au niveau de l'étape de transcription inverse. Le dosage des ARN a tout d'abord été remis en cause. Ainsi un deuxième dosage au Nanodrop a été effectué. Les concentrations en ARN obtenues avec ce deuxième dosage se sont retrouvées différentes du premier dosage (cf. Tableau 5). Pour s'affranchir d'un possible souci de reproductibilité lié à l'appareil, un troisième dosage a été réalisé grâce au kit « Qubit RNA Assay Kit ». Ce troisième dosage a donné des résultats de concentration d'ARN différents des 2 premiers (cf. Tableau 5). En effet, il y a une différence qui est en moyenne de 11% entre le 1^{er} dosage au Nanodrop et le 2^{ème}. Et une différence d'en moyenne de 32% entre le 1^{er} dosage au Nanodrop et le dosage au Qubit. Cette différence est plus élevée du fait que le Qubit ne dose pas les ARN non dégradés contrairement au Nanodrop qui ne fait pas la différence entre ARN non dégradé ou dégradé.

En parallèle, un contrôle de la dégradation des ARN sur quelques échantillons a été effectué sur gel d'agarose. La Figure 12 montre que seulement 2 bandes sont visibles, l'ARN ribosomal 28S et 18S ne sont pas dégradés.

Il est donc vraisemblable que les problèmes de variabilité des Ct de l'ARNr18S soient liés à un problème au niveau de l'étape de dosage des ARNs. En effet, si les concentrations d'ARN mesurées ne sont pas justes, la quantité d'ARN utilisée pour réaliser l'étape de transcription inverse n'est pas précise et comparable entre les échantillons. Ceci était probablement responsable des différences visibles pour le gène 18S.

Des qPCR avaient été réalisées sur 2 autres gènes, ATF4 et TRB3 (« Tribbles Pseudokinase 3 »). La variabilité observée sur l'ARNr18S indique très probablement un problème lié à la variabilité de la quantité d'ARN utilisée pour l'étape de transcription inverse.

Les mesures réalisées pour ATF4 et TRB3 devront donc être réalisées de nouveau sur une nouvelle production d'ADNc après une validation du dosage des ARNs. Après le prochain dosage, tous les échantillons pourront être déposés sur gel avec la même quantité d'ARN. Si les échantillons ont une différence d'intensité cela voudra dire que le dosage n'est toujours pas représentatif de la quantité d'ARN totale.

3. Discussion

Les résultats suggèrent une baisse de la quantité de protéine p-eIF2 α entre les souris du groupe HF par rapport à celles du groupe H2O, indiquant donc un effet du pré-conditionnement à l'Halofuginone. La quantité protéique visiblement plus faible avec de l'Halofuginone pourrait s'expliquer par une augmentation de la déphosphorylation de eIF2 α . En effet, l'administration unique de l'Halofuginone entraîne une augmentation transitoire de la phosphorylation d'eIF2 α (donnée du laboratoire). Cependant, son administration de façon régulière et prolongée dans le temps (4 semaines) a pu entraîner des adaptations avec par exemple la mise en place de boucles de rétrocontrôle de phosphorylation/déphosphorylation. Il serait intéressant de quantifier l'expression en ARNm et protéines de phosphatases telles que GADD34, qui est impliquée dans la déphosphorylation de eIF2 α . De plus, il faudrait quantifier la quantité protéique de eIF2 α totale, ce que j'ai initié durant mon stage. Cependant une quantité trop faible de protéine déposée sur gel d'acrylamide a empêché une correcte quantification du signal.

Comme nous avons pu le voir précédemment (*cf. Bibliographie*), en réponse à un stress extracellulaire, la phosphorylation de eIF2 α permet la traduction de ATF4 un facteur de transcription de gènes pour lutter contre ce stress. Les données montrent que la phosphorylation d'eIF2 α tend à augmenter après 3 jours de suspension uniquement chez les souris traitées au préalable par l'HF. Ceci pourrait signifier une augmentation de la traduction d'ATF4. Une quantification d'ATF4 au niveau protéique ainsi que de ses gènes cibles en ARNm pourrait donc permettre de répondre à la question d'une traduction plus importante d'ATF4 afin de lutter de manière plus forte contre le stress de la suspension. Par contrainte de temps, une RT avec le nouveau dosage des ARN pour mesurer ensuite les niveaux d'ARNm des gènes cibles d'ATF4 par qPCR n'a pas pu être réalisée.

III. Effet du pré-conditionnement sur la superfamille du TGF- β

1. Analyse de la quantité des protéines Smad 2 et 3

Les protéines Smad 2 et Smad 3 ont été quantifiées sur membrane à l'aide d'un même anticorps dirigé contre les deux protéines, le signal donnant deux bandes distinctes ; 60 kda pour Smad 2 et 52 kda pour Smad 3 (Figure 13a). La quantification du signal a été faite en quantifiant les deux bandes ensemble ou séparément.

Chez les souris H2O, aucun changement de la quantité globale des protéines Smad 2/3 n'est visible entre les Ctrl, les HS 3J et les HS 7J (*cf. Figure 13a.*). Chez les souris ayant reçu un traitement à l'HF, il y a une tendance à la baisse d'environ 50% entre les Ctrl et les HS 7J. Une diminution significative de l'ordre de 50% est visible entre les HS 3J et les HS 7J. De plus, une diminution de la quantité globale des protéines Smad 2/3 est également observée à 7 jours de suspension entre les souris H2O et HF.

2. Quantité de la protéine Smad 4 totale

Chez les souris ayant reçu un traitement H2O, aucun changement n'est constaté entre les souris Ctrl et les souris suspendues. Cependant, une augmentation significative d'environ 50% est notable entre les souris HS 3J et les souris HS 7J (*cf. Figure 14a.*). Pour les souris ayant eu un traitement HF, aucun changement n'est visible entre les contrôles et les suspendues. Les niveaux protéiques de Smad4 après 7 jours de suspension sont aussi significativement plus bas chez les souris ayant reçu de l'HF par rapport aux souris H2O.

3. Quantité de la protéine Smad 1-5 totale et GDF5

Les protéines Smad 1 et Smad 5 ont été quantifiées par Western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les deux protéines. Le signal donne une seule bande distincte à 55 kda. La quantité protéique de Smad 1-5 est significativement différente dans les muscles des souris HF par rapport aux souris H2O (*cf. Figure 14b.*). Chez les souris ayant reçu un traitement H2O, elle reste inchangée entre les contrôles et les suspendues. Cependant, elle varie fortement en réponse à la suspension chez les souris HF. Tout d'abord, les niveaux protéiques de Smad 1/5 sont 3 fois plus élevés dans les muscles des souris HF Ctrl par rapport aux souris H2O contrôles, montrant donc un effet du pré-conditionnement. Pendant la suspension, ces niveaux protéiques

diminuent fortement dans les muscles après 3 jours de suspension et restent bas jusqu'à 7 jours chez les souris HF.

De manière générale, la quantité protéique de GDF5 tend à être plus élevée chez les souris HF par rapport aux souris H2O ($P=0,10$) (cf. *Figure 14c*). Les niveaux protéiques de GDF5 sont identiques entre les souris contrôles et suspendues qu'elles aient reçu l'eau ou l'HF.

4. Discussion

Individuellement, les profils des niveaux protéiques de Smad 2 ou Smad3 sont très similaires à celui correspondant à la quantification globale de Smad 2-3 (cf. *Figure 13b-c*). Par contre, aucune tendance n'est observée pour Smad 2 seul entre les souris Ctrl et HS7 du groupe HF. De même, la baisse des niveaux protéiques de Smad2 seul entre les souris HS7 des groupes H2O et HF est à la limite de la signification (cf. *Figure 13b*). Enfin, chez les souris traitées avec H2O, une tendance à la hausse de la quantité protéique de Smad 3 est également visible entre les Ctrl et les HS 3J (cf. *Figure 13c*).

Mes résultats montrent que la quantité des protéines Smad 2 et Smad 3 est environ 2 fois plus faible au bout de 7 jours de suspension, chez les souris ayant reçu le traitement préalable à l'Halofuginone, ce qui n'est pas le cas chez les souris ayant reçu de l'eau. Smad 2 et 3 sont des protéines impliquées dans l'induction de l'atrophie musculaire dans de nombreuses études. Le fait qu'elle soit fortement diminué à 7 jours de suspension chez les souris ayant reçu de l'Halofuginone, pourrait expliquer en partie le maintien de la masse musculaire de ce groupe. De plus, il a déjà été montré que p-eIF2 α est capable d'inhiber la phosphorylation de Smad 2-3. Nous pouvons donc imaginer que l'augmentation de la protéine p-eIF2 α à 3 jours de suspension chez les souris traitées par l'Halofuginone (cf. *Figure 13*) inhiberait la phosphorylation de Smad 2-3. Ceci pourrait avoir induit des adaptations au niveau de la forme totale de ces protéines non visibles après 3 jours de suspension mais seulement au bout de 7 jours.

La quantité protéique de Smad 1-5, facteurs de la voie BMP, est très élevée chez les Ctrl avec un traitement HF (3 fois plus que traitement H2O). En accord avec cette augmentation, la protéine GDF5 qui est un ligand de la voie BMP impliqué dans le maintien de la masse musculaire, est d'une manière générale plus élevée chez les souris HF. Ainsi par son augmentation, GDF5 a peut-être entraîné l'augmentation des acteurs intracellulaires Smad 1-5

lors du préconditionnement, tout ceci en faveur d'un maintien de la masse musculaire. Cependant, la diminution de la quantité protéique de Smad 1-5 au moment de la suspension à 3 jours pourrait signifier une inhibition de la voie BMP ou une augmentation de son renouvellement si elle est beaucoup sollicitée pour lutter contre l'atrophie musculaire.

Smad 4 est la protéine commune aux voies TGF et BMP. Elle est plus recrutée par la voie TGF (pro-atrophique), mais lorsque cette dernière est inhibée, Smad 4 est davantage recrutée par la voie BMP (maintien de la masse). L'augmentation de Smad 4 au 7^{ème} jour de suspension chez les souris ayant reçu de l'H₂O, peut suggérer un recrutement plus important de Smad 4 par la voie TGF- β dans le but de transcrire des gènes responsables de la perte de masse musculaire, qui est observable à ce temps (*cf. Figure 5*). Aucun changement n'est visible avec un traitement à l'Halofuginone, on peut donc penser que l'Halofuginone n'a pas d'impact direct sur Smad 4, ou que la quantité totale de Smad 4 reste inchangée car cette protéine est partagée de manière équilibrée entre la voie TGF- β et la voie BMP chez les souris HF.

Pour explorer l'hypothèse que la voie BMP est privilégiée par rapport à la voie TGF- β dans des conditions d'atrophie musculaire avec un pré-conditionnement à l'Halofuginone, la quantification des formes phosphorylées des protéines Smad 2-3 ainsi que Smad 1-5 devra être réalisée. Durant ce stage, plusieurs Western Blot ont été fait pour tenter de quantifier p-Smad 2-3, sans succès, malgré différents changements des conditions comme la concentration des anticorps, la solution de blocage (lait 5% ou BSA 5%), le milieu de dilution (lait 5% ou BSA 5%), ou encore la quantité de protéines déposées sur gel. Nous avons envisagé de tester d'autres anticorps commerciaux disponibles. En dernier recours, si les anticorps commercialisés pour reconnaître les formes phosphorylées ne fonctionnent pas, il sera envisagé de détecter les formes phosphorylées de ces protéines en utilisant des gels de séparation « Phos-Tag ». Ces gels contiennent une molécule fonctionnelle permettant de piéger spécifiquement les protéines phosphorylées ce qui entraîne un retard de migration. L'utilisation de l'anticorps qui détecte la forme totale permet alors de détecter la forme totale et les formes phosphorylées.

Afin de comprendre l'interaction de Smad 4 avec un pré-conditionnement, à savoir s'il interagit plutôt voie TGF- β ou plutôt voie BMP, une co-précipitation est envisagée par l'équipe.

Conclusion

Après de nombreuses études sur les voies impliquées dans le contrôle de la masse musculaire, la superfamille du TGF- β et la voie eIF2 α -ATF4 en ressortent. Ces voies sont donc des cibles d'intérêt dans l'approche d'avancer les recherches sur le traitement ou la prévention de l'atrophie.

Grace aux recherches menées au long de ce stage, il a été montré que de nombreuses manipulations reste à faire pour pouvoir répondre à nos hypothèses. En effet, selon nos résultats, la voie BMP semble plus activée en condition d'atrophie musculaire avec un pré-conditionnement à l'Halofuginone. Quant à elle la voie TGF- β semble inhibée avec un potentiel effet retard, car les effets ne sont observables qu'au bout de 7 jours de suspension. Le retard des effets sur Smad 2-3 pourrait être causé par p-eIF2 α qui lui augmente significativement dès 3 jours de suspension. Pour confirmer la tendance à ce que la voie BMP soit plus activé que la voie TGF- β une quantification de Smad 1-5 et Smad 2-3 sous leur forme phosphorylée est nécessaire et envisagée. Il est également envisagé de quantifier eIF2 α totale et la phosphatase GADD34, pour expliquer cette diminution de p-eIF2 α chez nos souris HF-Ctrl par rapport aux souris H2O-Ctrl.

Au-delà du point de vue scientifique, ce stage m'a permis d'avoir une première approche professionnelle dans le monde de la recherche et d'affiner mon projet personnel. Tout au long de ces 8 semaines j'ai pu approfondir mes connaissances théoriques et mes compétences techniques.

Références bibliographiques

- [1] « Accueil | INRAE INSTIT ». <https://www.inrae.fr/> (consulté le mai 26, 2021).
- [2] Yasutomi Kamei, Yukino Hatazawa, Ran Uchitomi, Ryoji Yoshimura, et Shinji Miura, « Regulation of Skeletal Muscle Function by Amino Acids », *Nutrients*, janv. 2020, doi: 10.3390/nu12010261.
- [3] M. A. Josep, C. Néfertiti, J. M Lopez-Pedrosa, R. Rueda, et L. Rodriguez-Manas, « Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease - PubMed », juin 2016, doi: 10.1016 / j.jamda.2016.04.019.
- [4] JR Lacour, « [Muscle activity and energy expenditure] », *Rev Mal Respir*, nov. 2011, doi: 10.1016 / j.rmr.2011.06.014.
- [5] Dulce Peris-Moreno et Laura Cussonneau, « Molecules | Free Full-Text | Ubiquitin Ligases at the Heart of Skeletal Muscle Atrophy Control », *Molecules*, janv. 14, 2021. Consulté le: mai 24, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/2/407>
- [6] Jeffrey L. Wrana, « Signaling by the TGF- β Superfamily », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, oct. 2013, doi: 10.1101 / cshperspect.a011197.
- [7] Brian Bierie et Harold L Moïse, « TGF-beta and cancer », mai 2021, Consulté le: mai 26, 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16289860/>
- [8] Johanna Abrigo, Fabian Campos, et Felipe Simon, « TGF- β requires the activation of canonical and non-canonical signalling pathways to induce skeletal muscle atrophy », *Biol Chem*, févr. 2018, doi: 10.1515 / hsz-2017-0217.
- [9] Roberta Sartori, Elija Schirwis, Bert Blaauw, et Sergia Bortolanza, « BMP signaling controls muscle mass », *Nat Genet*, nov. 2013, doi: 10.1038 / ng.2772.
- [10] A. Bruhat *et al.*, « L'activation de la voie eIF2 α -ATF4, une réponse adaptative au stress cellulaire », *médecine/sciences*, vol. 31, n° 12, Art. n° 12, déc. 2015, doi: 10.1051/medsci/20153112002.
- [11] Scott M Ebert, Alex Mas Monteys, Daniel K Fox, et Christopher M Adams, « The transcription factor ATF4 promotes skeletal myofiber atrophy during fasting », *Mol Endocrinol*, avr. 2010, doi: 10.1210/me.2009-0345.
- [12] Mingyuan Duan, Xiabing Wei, et Zhe Cheng, « Involvement of eIF2 α in halofuginone-driven inhibition of TGF- β 1-induced EMT », *J. Biosci.*, mai 2020, [En ligne]. Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12038-020-00042-5>

Annexes
