



HAL
open science

Etude de la balance protéique chez la souris ayant subi un traitement à l'halofuginone ou non en amont d'une situation d'atrophie musculaire

Timothée Pham

► **To cite this version:**

Timothée Pham. Etude de la balance protéique chez la souris ayant subi un traitement à l'halofuginone ou non en amont d'une situation d'atrophie musculaire. *Tissues and Organs [q-bio.TO]*. 2022. hal-04129161

HAL Id: hal-04129161

<https://hal.inrae.fr/hal-04129161v1>

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 : 2022

RAPPORT DE STAGE

ÉTUDE DE LA BALANCE PROTÉIQUE CHEZ LA SOURIS AYANT SUBI UN TRAITEMENT À L'HALOFUGINONE OU NON EN AMONT D'UNE SITUATION D'ATROPHIE MUSCULAIRE



Stage du 4 avril au 17 juin 2022
INRAE, site de Theix
Saint-Genès-Champanelle
Unité de Nutrition Humaine - UMR 1019
Equipe Protéostasis

Tutrices :

Dr. Lydie COMBARET

Doctorante. Laura CUSSONNEAU

Rapport présenté par :

Timothée PHAM



Remerciements

En premier lieu, je remercie le Docteur Pierre FAFOURNOUX, directeur de l'équipe Proteostasis, de m'avoir accueilli et permis de réaliser mon stage au sein de son équipe.

Je tiens à remercier la doctorante Laura CUSSONNEAU ainsi que la docteure Lydie COMBARET de m'avoir encadré au cours du stage. Elles ont su me faire confiance, me partager leurs savoirs faire et m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. Pendant ces 10 semaines, leurs connaissances scientifiques m'ont permis de m'enrichir et d'approfondir mes bases dans le domaine. Je remercie leurs gentillesse, leurs patiences et leurs bonnes humeurs tout au long de ce stage.

Je remercie également Christiane DEVAL, Valérie CARRARO ainsi que Dulce PERIS-MORENO pour tous les conseils et aides qu'elles m'ont apportés.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe Proteostasis de m'avoir chaleureusement accueilli, ainsi que pour toutes les choses apprises.

Abréviations

ADN = Acide désoxyribonucléique

ANOVA = Analysis of variance

APS = Ammonium persulfate

ARN = Acide ribonucléique

ATF4 = Activating transcription factor 4

ATG = Autophagy Gene

BET = Bromure d'éthyldium

BSA = Bovine serum albumin

CDKN1A = Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A

CTSL = Cathepsine L

EDTA = Éthylènediaminetétraacétique

eIF2 α = eukaryotic initiation factor 2 alpha

EIF4EBP1 = Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1

FBXO = F-Box Protein

FOXO3 = Forkhead Box 03

GADD45A = Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha

HF = Halofuginone

HRP = Horseradish peroxydase

HS = Hindlimb suspension

PA700 = Proteasome activator 700

PCR = Polymerase chain reaction

PhIC = Phosphatase inhibitor cocktail

PIC = Protease inhibitor cocktail

PVDF = Polyvinylidene difluoride

qPCR = quantitative Polymerase Chain Reaction

RT = Reverse transcriptase

SDS-PAGE = Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TBS = Tris buffer saline

TBST = Tris buffered saline with tween

TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphine)

TEMED = Tétraméthyléthylènediamine

TG = Tris Glycine

TGX = Tris-Glycine eXtended

TRIB3 = Tribbles Pseudokinase 3

TRIM63 = Tripartite Motif Containing 63

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la traduction d'un ARN messenger en protéine

Figure 2 : Schéma de l'incorporation de puromycine au sein des chaînes peptidiques lors de l'étape de terminaison de la traduction

Figure 3 : Schéma du mécanisme d'UPS (Ubiquitin Proteasome System) et des gènes impliqués dans cette voie de dégradation protéique

Figure 4 : Schéma du mécanisme de l'autophagie et de gènes impliqués dans cette voie de dégradation protéique

Figure 5 : Schéma de la balance protéique en condition physiologique (1) ou en condition d'atrophie musculaire (2)

Figure 6 : Schéma de la voie de signalisation eIF2 α -ATF4

Figure 7 : Schéma illustrant le protocole expérimental sur l'animal

Figure 8 : Modèle de souris suspendue par la queue (Hindlimb suspension, HS)

Figure 9 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'extraction protéique

Figure 10 : Contrôle et vérification de l'intégrité des ARN sur gel d'agarose

Figure 11 : Melting curve et Standard curve de vérification des amorces de *Fbxo21*

Figure 12 : Gel d'agarose sous UV avec visualisation de la taille des amplicons de chaque amorce

Figure 13 : Expression relative de puromycine incorporée dans les protéines chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone (HF) puis suspendues (HS) ou non

Figure 14 : Expression relative d'ARNm des atrogènes *Trim63* (a), *Fbxo32* (b), *Ctsl* (3), *Foxo3* (d), *Fbxo21* (e), *Fbxo30* (f) chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues ou non

Figure 15 : Expression relative d'ARNm des gènes cibles de la voie de signalisation ATF4 : *Cdkn1a* (a), *Eif4ebp1* (b), *Gadd45a* (c), *Trib3* (d) et *Atf3* (e) chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues ou non

Figure 16 : Expression relative d'ARNm de gènes impliqués dans l'autophagie : *Atg5* (a), *Atg12* (b), *Atg16* (c) chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues ou non

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition des tampons d'extraction B1 et B2

Tableau 2 : Condition d'utilisation de l'anticorps primaire

Tableau 3 : Condition d'utilisation de l'anticorps secondaire

Tableau 4 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la qPCR

Sommaire

Laboratoire d'accueil.....	1
I. L'INRAE.....	1
II. L'Unité de Nutrition Humaine.....	1
III. L'Equipe Proteostasis	1
Contexte de l'étude.....	2
Bibliographie.....	3
I. Généralités.....	3
a) La protéosynthèse	3
b) La protéolyse.....	4
II. L'atrophie musculaire	5
III. La voie eIF2α-ATF4	5
IV. Mes Objectifs	6
Matériels et Méthodes.....	7
I. Protocole expérimental sur l'animal in vivo.....	7
II. Western Blots	7
a) Extraction et dosage des protéines	7
b) Migration et révélation des protéines.....	8
III. RT-qPCR.....	10
a) Extraction et dosage des ARN	10
b) Vérification de l'intégrité des ARN	11
c) Reverse Transcription	11
d) Vérification des amorces	11
e) qPCR	12
f) Analyse statistique	13
Résultats et Discussion.....	14
I. Suivi du poids corporel et de la consommation alimentaire chez les souris recevant un pré-conditionnement par l'Halofuginone	14
II. Etude de la synthèse protéique	14
a) Mesure de l'incorporation de puromycine dans les protéines	14
b) Interprétation de la quantité de puromycine incorporée dans les protéines.....	15
III. Etude de l'expression des atrogènes et des gènes impliqués dans la balance protéique.....	15
a) Analyse de l'expression des atrogènes	15
b) Analyse de l'expression des gènes cibles de la voie de signalisation ATF4	16
c) Analyse de l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie	17
Conclusion.....	18
Références bibliographiques	19

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 et un acteur majeur de la recherche et de l'innovation. Il a été créé le 1^{er} janvier 2020 suite à 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). L'INRAE comprend de nos jours un effectif de plus de 12 000 agents, 200 unités de recherche et 18 centres répartis sur le territoire français. L'INRAE Auvergne-Rhône-Alpes est composé de 20 unités de recherche réparties sur 8 sites. L'INRAE de Clermont-Ferrand est composé quant à lui de 6 unités différentes dont l'Unité de Nutrition Humaine (UNH).

II. L'Unité de Nutrition Humaine (UNH)

L'Unité de Nutrition Humaine est localisée sur 2 sites : le site de la Faculté de Médecine et le site de Theix, au sein duquel j'ai réalisé mon stage. L'unité est composée de 5 équipes de recherche et de 3 infrastructures d'appui : la plateforme d'exploration du métabolisme, l'installation expérimentale en nutrition (animalerie) et l'équipe administrative. On retrouve un effectif de plus de 100 agents permanents. Dirigée par le Dr. Didier REMOND, l'UNH a pour objectif de développer des stratégies nutritionnelles innovantes afin de diminuer ou prévenir les désordres associés au vieillissement et/ou aux maladies chroniques.

III. L'Equipe Proteostasis

Dirigée par le Dr. Pierre FAFOURNOUX, l'équipe Proteostasis concentre ses recherches sur l'étude du métabolisme des acides aminés et des protéines en cas de dérégulation métabolique. L'équipe étudie ainsi les origines et les conséquences des dérégulations protéiques pour développer par la suite des stratégies nutritionnelles ou pharmacologiques. Ces dernières peuvent être de nature préventive, il faut alors agir avant afin d'empêcher l'apparition de dérégulations de l'homéostasie protéique ou alors de nature curative, et donc corriger ces dérégulations et rétablir l'homéostasie protéique.

Contexte de l'étude

Le muscle squelettique est essentiel pour l'Homme, il assure la mobilité, le maintien de la posture, la contraction musculaire mais également sert de réservoir d'acides aminés permettant la défense de notre organisme (par exemple la défense immunitaire). Il représente 40% de la masse corporelle totale d'un individu. Lors de plusieurs conditions cataboliques (inactivité physique prolongée, vieillissement...), le muscle subit une atrophie musculaire qui se caractérise ainsi par une diminution de la masse globale du muscle. L'atrophie musculaire perturbe également l'homéostasie corporelle globale entraînant des réponses moins efficaces aux traitements et une morbidité plus importante. Aucun traitement préventif ou curatif efficace n'existe à ce jour, c'est pourquoi cela reste un enjeu de santé publique.

L'atrophie musculaire est la conséquence d'un dérèglement de l'homéostasie protéique provoqué par la suractivation ou l'inhibition d'un ensemble de voies de signalisation comme la voie eIF2a-ATF4, qui répondent à différents stress. Cette voie de signalisation trop activée conduit à une protéolyse trop importante, alors qu'une activation modérée et temporaire en amont d'une situation catabolique, est suggérée par l'équipe comme pouvant prévenir en partie l'atrophie musculaire. L'équipe a donc réalisé un protocole expérimental chez des souris pour tester cette hypothèse. La voie eIF2a-ATF4 a été activée (ou non) de façon modérée et transitoire pendant 3 semaines par une molécule pharmacologique, l'halofuginone et les animaux ont ensuite été soumis (ou non) à une inactivité physique grâce au modèle de suspension par le train arrière.

L'objectif de mon stage a été de caractériser l'effet d'un pré-conditionnement à l'aide de l'halofuginone, en amont d'une atrophie musculaire provoquée par la suspension des pattes arrières chez la souris. Lors de mon stage, je me suis tout particulièrement intéressé à l'expression de différents marqueurs du dérèglement de l'homéostasie musculaire (protéolyse et synthèse protéique), ainsi qu'à l'expression de gènes cibles de la voie ATF4 dans les muscles gastrocnémiens des souris.

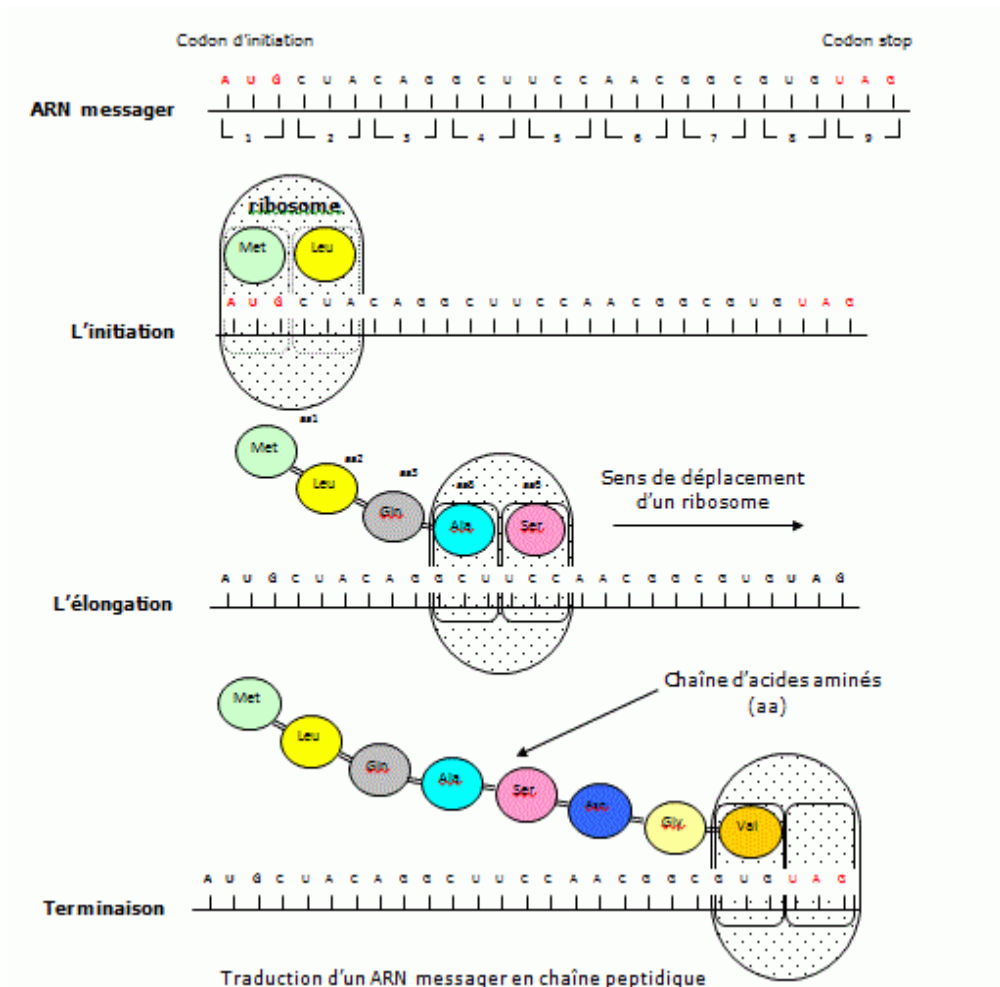


Figure 1 : Schéma de la traduction d'un ARN messenger en protéine

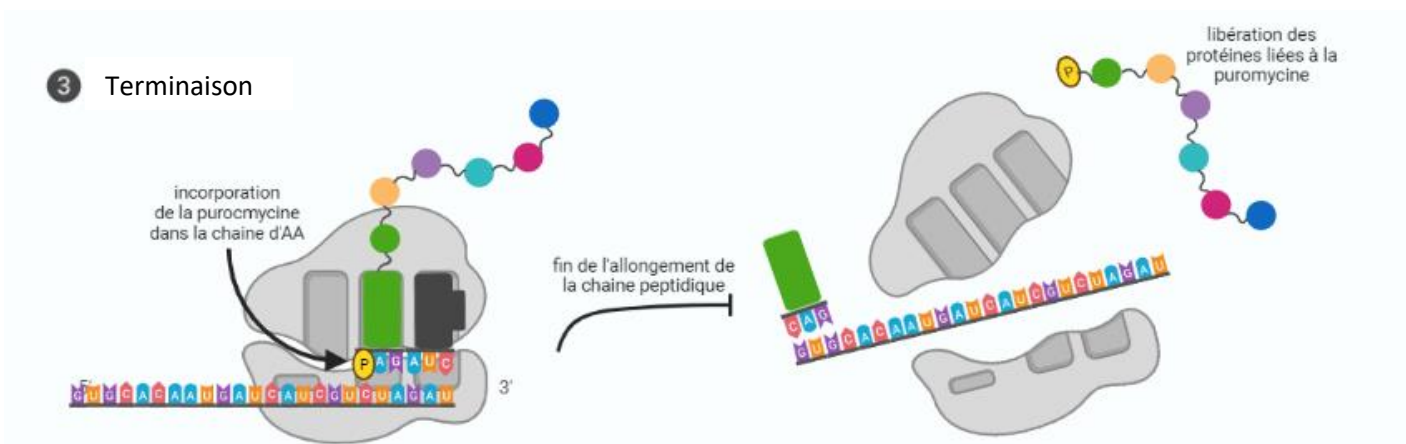


Figure 2 : Schéma de l'incorporation de puromycine au sein des chaînes peptidiques lors de l'étape de terminaison de la traduction

Bibliographie

I. Généralités

Le muscle squelettique est composé de plusieurs tissus tels que le tissu conjonctif, nerveux, adipeux ou encore le tissu musculaire. Le tissu musculaire est le tissu le plus abondant de notre corps humain, il représente 40% de notre masse corporelle [2]. Il assure la mobilité, le maintien de la posture mais surtout la contraction des muscles. De plus, il joue un rôle métabolique majeur, responsable de la thermogénèse. Le constituant majeur du muscle sont les protéines, c'est pourquoi, il a également un rôle clé en tant que réservoir, à l'échelle du corps humain, de protéines et d'acides aminés pour assurer diverses fonctions dans des situations physiologiques ou pathologiques. Ces fonctions incluent par exemple les réponses immunitaires et infectieuses, la réponse inflammatoire, ou encore la synthèse protéique de certains organes spécifiques comme le cœur ou le cerveau.

La quantité de protéines musculaires dépend de l'équilibre entre la synthèse (protéosynthèse) et la dégradation (protéolyse) des protéines, un équilibre que l'on appelle balance protéique, régulant l'homéostasie musculaire dans des conditions physiologiques. Le déséquilibre de la balance protéique en faveur de la protéosynthèse par rapport à la protéolyse entraîne un anabolisme protéique, tandis que le catabolisme protéique est la résultante d'un déséquilibre en faveur de la protéolyse. Ces deux processus biologiques se déroulent simultanément et constamment dans nos cellules, il s'agit du "turnover protéique". Ce turnover est plus ou moins long en fonction de la protéine, cela entraîne donc des demi-vies plus ou moins longues des protéines. Le turnover protéique a pour objectif l'élimination des protéines ne remplissant plus leurs fonctions cellulaires ou afin de répondre aux différents stress nutritionnels ou physiopathologiques environnants. Un muscle en condition physiologique est représenté par un juste équilibre entre ces deux processus.

a. La Protéosynthèse

La protéosynthèse qui a lieu dans le cytoplasme est un processus indispensable au bon fonctionnement de l'homéostasie protéique. C'est un ensemble de mécanismes biochimiques qui permet aux cellules de synthétiser leurs protéines à partir d'ARN messagers [3]. Cette protéosynthèse repose sur 3 étapes (*cf. figure 1*) : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation de la traduction protéique débute lorsque le ribosome, une fois fixé à la coiffe méthylée de l'ARNm, reconnaît un codon d'initiation, codant pour la méthionine. Puis, le

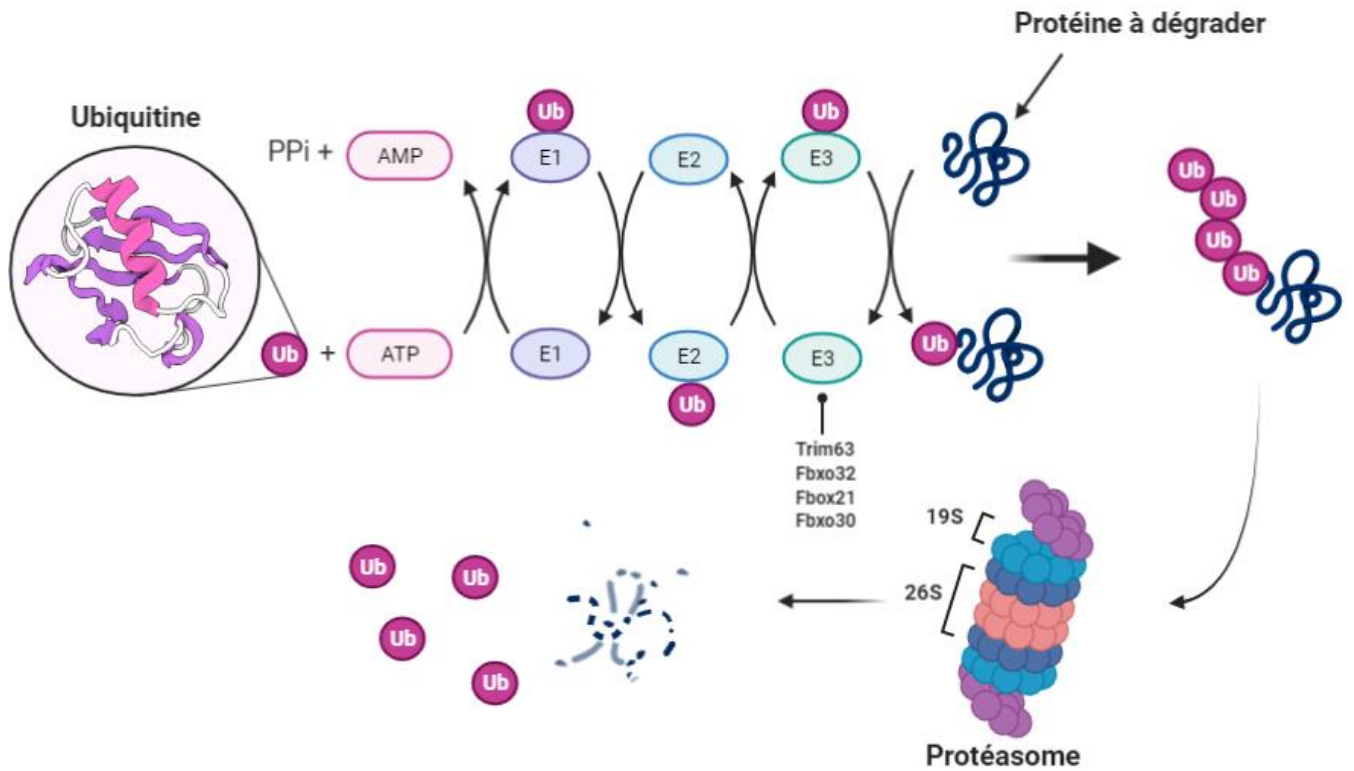


Figure 3 : Schéma du mécanisme d'UPS (Ubiquitin Proteasome System) et des gènes impliqués dans cette voie de dégradation protéique

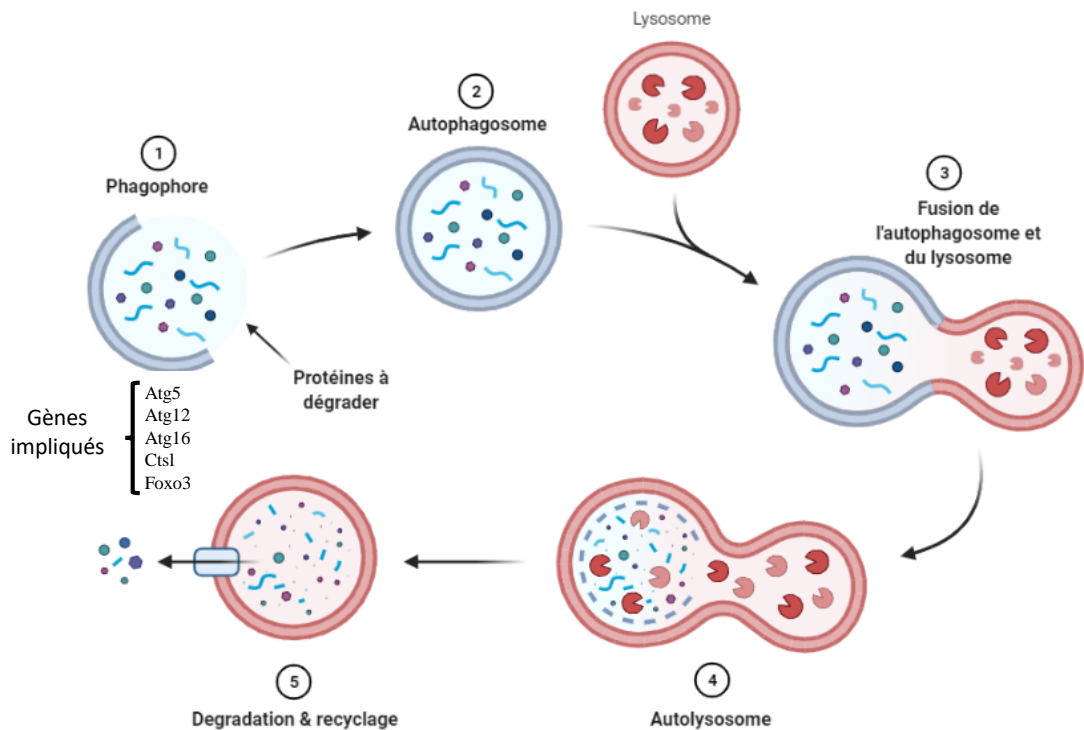


Figure 4 : Schéma du mécanisme de l'autophagie et de gènes impliqués dans cette voie de dégradation protéique

ribosome parcourt l'ARNm par translocation, et ajoute, par l'intermédiaire des ARNt, des acides aminés à la chaîne peptidique en cours de synthèse (élongation). Enfin, la traduction s'arrête lorsque le ribosome rencontre un codon STOP (UAG/UAA/UGA). La protéine nouvellement synthétisée est alors libérée.

Il est possible de mesurer la synthèse protéique *in vivo* et *in vitro* par une méthode utilisant la puromycine. Cette dernière mime l'extrémité 3' d'un aminoacyl-ARNt, s'incorpore dans les chaînes peptidiques en cours d'élongation, et entraîne l'arrêt de la traduction (*cf. figure 2*). La fin de l'élongation s'explique par le manque d'une liaison ester hydrolysable sur la puromycine, ce qui lui empêche de se fixer à un autre acide aminé et donc poursuivre l'élongation. Ainsi la quantification de puromycine incorporée dans les protéines reflète le taux de synthèse protéique dans un organe ou une cellule à un instant donné.

b. La Protéolyse

La protéolyse correspond à la dégradation des protéines dans la cellule [4], elle est le deuxième versant de la balance protéique. Il existe plusieurs mécanismes de dégradation des protéines dans notre organisme, et deux sont majoritaires dans le muscle, l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome dépendant. Le système ubiquitine-protéasome dépendant se déroule dans le cytosol et implique l'étiquetage de la protéine à éliminer par l'addition de molécules d'ubiquitine. Il s'agit d'un processus en trois étapes impliquant trois enzymes [5] : l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et l'ubiquitine-protéine ligase (E3) (*cf. figure 3*). La protéine étiquetée est ensuite reconnue par le protéasome 26S qui permet la dégradation de la protéine, car ce dernier est composé d'un complexe catalytique (20S) et de deux complexes régulateurs (19S/PA700). Le second mécanisme de dégradation majoritaire des protéines dans le muscle, l'autophagie, se fait par voie lysosomale. L'incorporation des protéines à dégrader se fait ainsi par autophagie (*cf. figure 4*) avec la formation d'un autophagosome, qui va fusionner avec le lysosome contenant des protéases actives produites dans l'appareil de Golgi, les cathepsines, qui vont dégrader les protéines présentes.

Ainsi l'étude de l'expression de gènes impliqués dans ces 2 systèmes protéolytiques par q-PCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) permet d'évaluer les niveaux de protéolyse dans des situations expérimentales, et d'étudier quel mécanisme (autophagie ou UPS) est le plus activé.

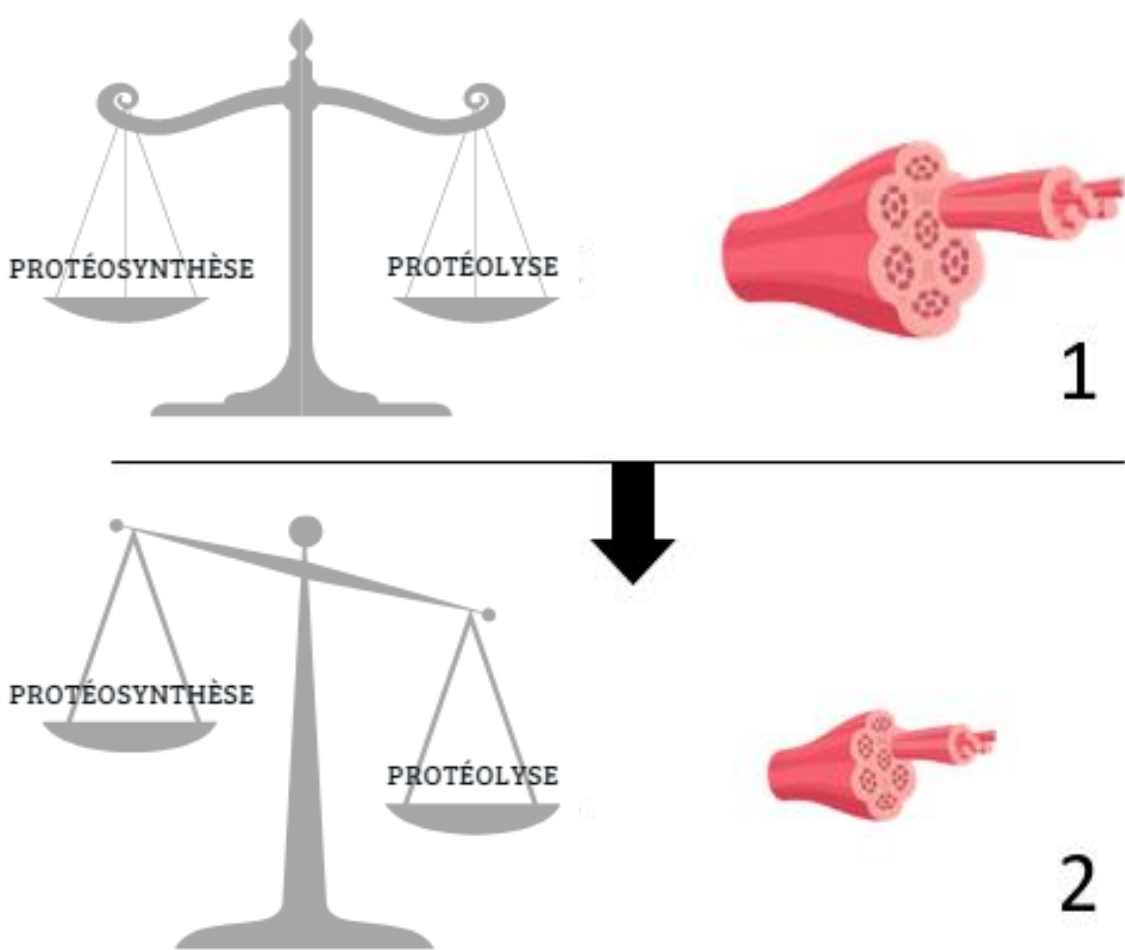


Figure 5 : Schéma de la balance protéique en condition physiologique (1) ou en condition d'atrophie musculaire (2).

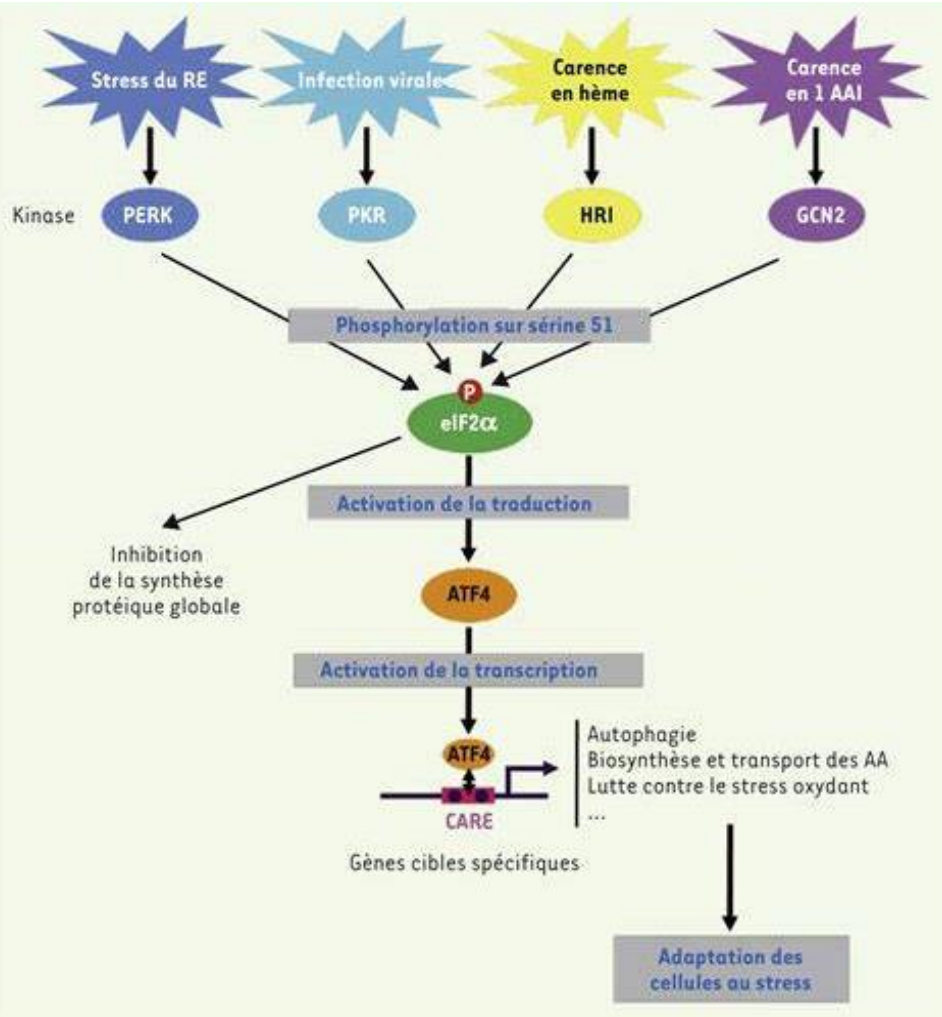


Figure 6 : Schéma de la voie de signalisation eIF2α-ATF4 (Bruhat and al. - 2015)

II. L'atrophie musculaire

L'équilibre entre la synthèse et dégradation protéique est essentiel au maintien de la masse et des fonctions musculaires. Néanmoins, dans le cas où la dégradation (protéolyse) est plus importante que la synthèse protéique (protéosynthèse), cela conduit à une atrophie musculaire (cf. *figure 5*). Les individus atteints d'atrophie musculaire deviennent plus vulnérables et fragiles face à des maladies, les traitements sont moins efficaces et par conséquent, le taux de morbidité est plus élevé [6]. Lors de l'atrophie musculaire, le muscle va donc subir des altérations morphologiques (diminution de son volume) et fonctionnelles (diminution de sa force musculaire). L'inactivité physique prolongée, le jeûne, le vieillissement, la paralysie, le sepsis sont des exemples de conditions physiopathologiques entraînant une atrophie musculaire. De nos jours, aucun traitement n'est réellement efficace contre l'atrophie, que ce soit de manière préventive ou curative. Plusieurs études démontrent l'implication de certaines voies de signalisation dans l'établissement de l'atrophie musculaire. De nombreux mécanismes intracellulaires ont été découverts grâce à l'utilisation de rongeurs de laboratoire, chez lesquels on induit de l'atrophie musculaire volontairement (suspension par la queue, immobilisation par plâtrage...). Il a été découvert que des marqueurs communs étaient exprimés lors d'une situation d'atrophie musculaire, ces acteurs sont nommés des atrogènes (*Trim63*, *Fbox21*...). Ce sont des gènes qui sont systématiquement différenciellement exprimés (augmentés ou diminués) lors d'une situation d'atrophie musculaire.

Parmi les mécanismes d'adaptation, la cellule est capable d'activer la voie de signalisation eIF2 α -ATF4 qui est une réponse naturelle au stress.

III. La voie de signalisation eIF2 α -ATF4

En réponse à différents stress (cf. *figure 6*), différentes kinases (PERK, PKR, HRI, GCN2) peuvent être activées entraînant la phosphorylation de eIF2 α sur la sérine 51 [7]. Cette phosphorylation de eIF2 α a deux conséquences : l'inhibition de la synthèse protéique globale et l'activation de la traduction de certains ARNm, comme le facteur de transcription ATF4. Ce dernier entraîne la transcription de gènes cibles ayant un rôle dans l'autophagie, la biosynthèse et le transport des acides aminés, et la lutte contre le stress oxydant ; ceci permet aux cellules de mieux s'adapter à un stress. Cependant, cette voie est connue pour favoriser l'atrophie musculaire quand elle est fortement activée, avec l'expression de gènes tels que *Cdkn1a* [8] ou

Eif4ebp1. Néanmoins plusieurs travaux de l'équipe convergent vers l'hypothèse qu'une activation modérée et temporaire de la voie pourrait au contraire limiter la perte de masse musculaire en permettant une meilleure réponse musculaire au stress. Ainsi, activer la voie eIF2 α -ATF4 dans des conditions optimales avant un stress, ce que l'on appelle un pré conditionnement, pourrait avoir un effet bénéfique sur la préservation de la masse musculaire.

C'est pourquoi, l'équipe Proteostasis, a émis l'hypothèse qu'une activation modérée, transitoire et répétée dans le temps de la voie eIF2 α -ATF4 pouvait permettre de préparer le muscle à mieux répondre à un stress catabolique induit par une immobilisation prolongée (suspension par la queue) chez le rongeur. Ce pré-conditionnement a duré 3 semaines, à une fréquence de trois gavages par semaine d'halofuginone, qui est une molécule pharmacologique très bien décrite dans la littérature pour activer la voie eIF2 α -ATF4. Une préservation partielle de la masse des muscles gastrocnémiens des souris a été observée pour ces souris traitées à l'halofuginone en amont d'une suspension par le train arrière.

IV. Mes objectifs

Mes objectifs au sein du stage ont été d'étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents impliqués dans la préservation partielle de muscles gastrocnémiens chez la souris ayant subi un traitement à l'halofuginone (HF) ou non en amont d'une situation d'atrophie musculaire (suspension par la queue). Pour ce fait, j'ai étudié l'expression de différents marqueurs du dérèglement de l'homéostasie musculaire (protéolyse et synthèse protéique), ainsi que l'expression de gènes cibles de la voie ATF4 dans les muscles gastrocnémiens des souris.

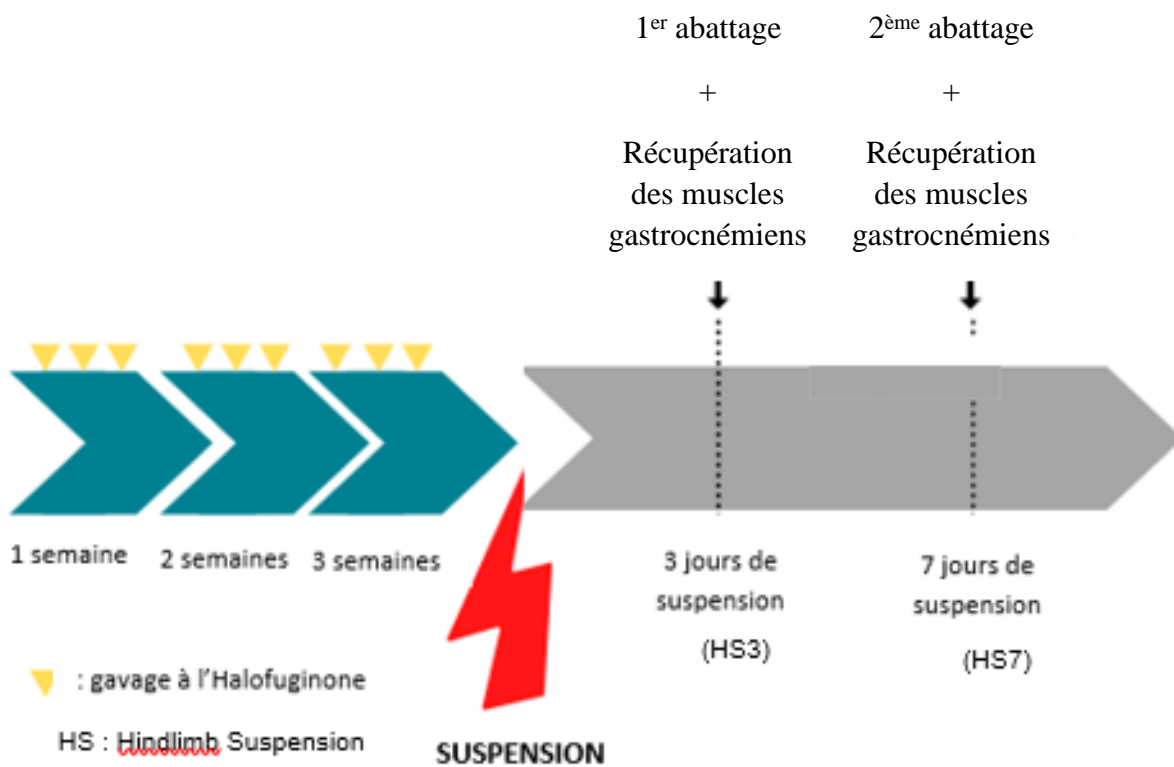


Figure 7 : Schéma illustrant le protocole expérimental sur l'animal

Les souris ont reçu un pré-conditionnement à l'Halofuginone ($0.25\mu\text{g/g}$) pendant 3 semaines à une fréquence de 3 gavages par semaine, puis ont été suspendues par le train arrière pendant 3 (HS3) ou 7 (HS7) jours.

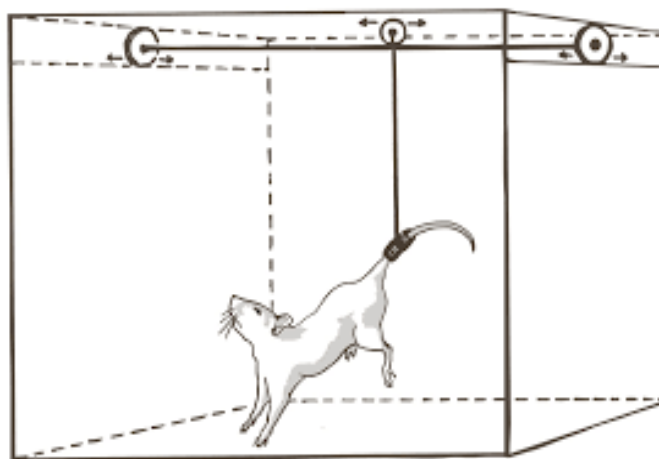


Figure 8 : Modèle de souris suspendue par la queue (Hindlimb suspension, HS)

Matériels et Méthodes

I. Protocole expérimental sur l'animal *in vivo*

L'équipe a réalisé le protocole d'expérimentation animale avant le début de mon stage (cf. *figure 7*). Brièvement, 48 souris ont subi trois gavages par semaine, soit d'eau (H₂O) soit d'halofuginone (HF, 0.25µg/g), et ce pendant 3 semaines.

Suite aux 3 semaines, 8 souris de chaque groupe ont été suspendues par la queue (cf. *figure 8*) pendant 3 jours (souris HS3) et 8 autres pendant 7 jours (souris HS7). Les 8 dernières souris de chaque groupe ont servi de contrôle à l'expérience puisqu'elles n'ont pas été suspendues. De plus, 30 minutes avant le sacrifice, les souris ont reçu une injection de puromycine par voie intrapéritonéale à une dose de 0.04 µmol/g de poids corporel dans le but d'estimer la synthèse protéique musculaire (cf. *figure 2*). Au terme du protocole, les souris ont été sacrifiées, puis l'équipe a ainsi récupéré les muscles gastrocnémiens pour les peser et les conserver à -80°C jusqu'à utilisation.

II. Western Blots

a) Extraction et dosage des protéines

Nous avons utilisé un protocole pour séparer les protéines nucléaires des protéines cytosoliques. Les muscles gastrocnémiens ont été broyés à l'aide d'un mortier sur glace carbonique, puis environ 50mg de cette poudre a été homogénéisée à l'aide d'un Tissue Ruptor dans 1mL de tampon d'extraction B1 (cf. *tableau 1*). Les protéines ont été ensuite centrifugées à 800g pendant 15 minutes et à 4°C (cf. *figure 9*).

Le surnageant *S0* contenant les protéines cytosoliques a été récupéré afin d'être centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions mais pendant 10 minutes. A la fin de ces 10 minutes, le surnageant résultant *S1* a été de nouveau centrifugé 10 minutes à 11 000g ; ce dernier surnageant *S2* contenait les protéines cytosoliques. Il a été congelé et stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

Fractions protéiques nucléaires et cytosoliques

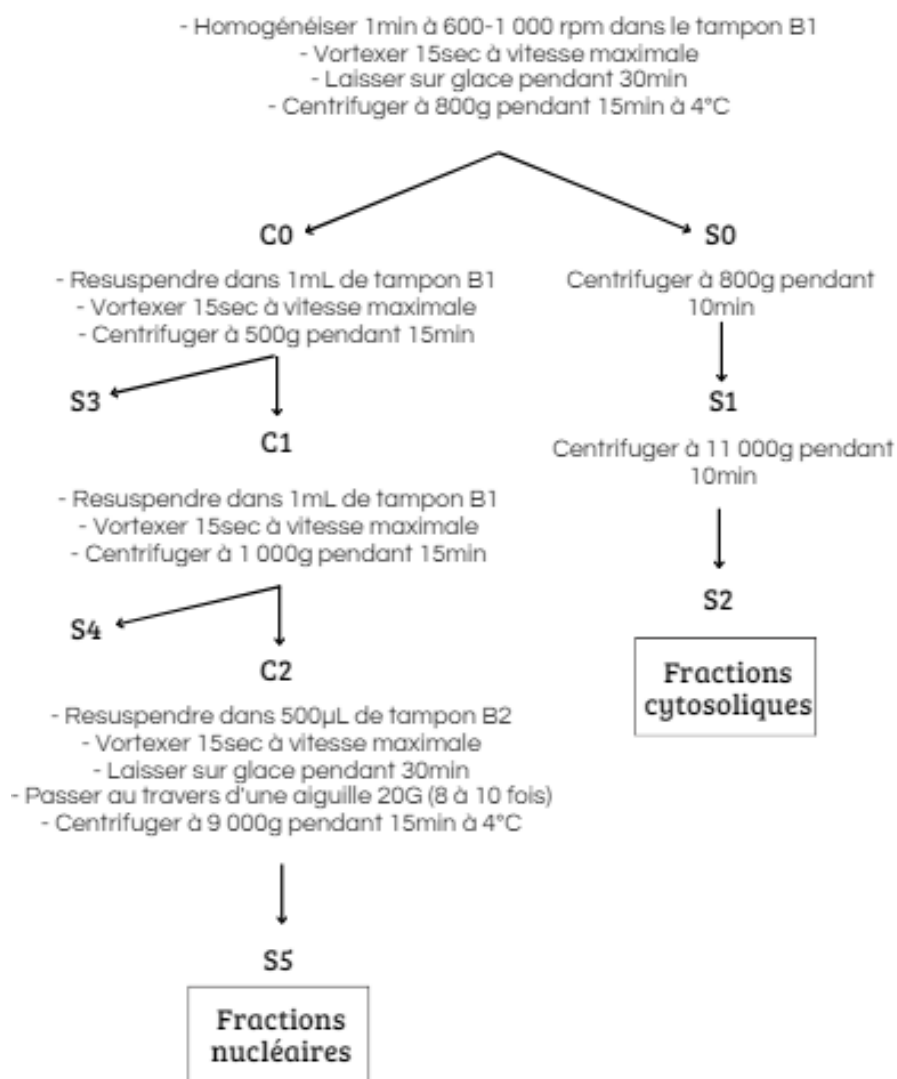


Figure 9 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'extraction protéique

Tableau 1 : Composition des tampons d'extraction B1 et B2

PIC : Protease inhibitor cocktail / PhIC : Phosphatase inhibitor cocktail

Tampon extraction = Tampon B1			
	Finale	Initiale	Volume à mettre µL
Hepes	10mM	1M	500
MgCl2	10mM	1M	500
KCl	5mM	1M	250
EDTA	0.1mM	500mM	10
Triton X-100	0,10%	100%	50
PIC	1X	100X	500
PhIC	1X	50X	1000
H2O			47190

Tampon extraction des noyau = Tampon B2			
	Finale	Initiale	Volume à mettre µL
Hepes	20mM	1M	500
MgCl2	1.5mM	1M	37,5
Glycérol	25%	50%	12500
NaCl	500mM	2M	6250
EDTA	0.2mM%	500mM	10
PIC	1X	100X	250
PhIC	1X	50X	500
H2O			4952,5

Le culot *C0* issu de la première centrifugation a été repris une première fois dans 1mL de tampon d'extraction B1 puis centrifugé à 500g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot *C1* issu de cette dernière centrifugation a été de nouveau repris dans 1mL de tampon B1 et centrifugé à 1000g pendant 15 minutes à 4°C. A cette étape, les protéines nucléaires ont été extraites en reprenant le culot *C2* dans 500µL de tampon d'extraction B2 (cf. *tableau 1*). Après agitation et incubation sur glace pendant 30 minutes, le culot *C2* a été homogénéisé par des allers-retours successifs au travers d'une aiguille 20G, et a ensuite été centrifugé à 9000g pendant 30 minutes à 4°C. Ce dernier surnageant *S5* contenant les protéines nucléaires a été récupéré et stocké à -80°C.

Le dosage des protéines des différentes fractions a été réalisé par la méthode de Bradford (Bio-rad, Protein Assay). Le réactif de Bradford a la capacité de se fixer sur la chaîne aromatique des protéines, ce qui entraîne la formation d'un complexe bleu ; plus l'échantillon est bleu plus la concentration en protéines est élevée. Le réactif de Bradford ayant une « linéarité » de 0.1µg à 1µg, nous avons réalisé une gamme étalon à partir de BSA (Bovine Serum Albumin), avec ce même intervalle linéaire. Les échantillons ont été dilués au 1/10ème pour se retrouver dans l'intervalle de linéarité du réactif. Par la suite, ces échantillons ont été préparés pour être tous à une concentration équivalente de 2µg/µL dans du bleu de Laemmli (SDS (dodécylsulfate de sodium) – 4%, bleu de bromophénol – 0.05%, glycérol – 7.5% et DTT (dithiothréitol)) puis dénaturés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

b) Migration et révélation des protéines

Les gels d'acrylamide ont été préparés selon les instructions du fournisseur (TGX Stain-Free FastCast, Acrylamide Kit « BIO-RAD ») et sont constitués d'un gel de concentration « stacking » et d'un gel de migration « resolving » (cf. *annexe 1*). L'ajout d'APS 10% (Ammonium Persulfate solution) ainsi que de TEMED (Tétraméthyléthylènediamine) assure la polymérisation des gels d'acrylamide. 40µg de protéines extraites à partir des muscles gastrocnémiens ont été déposées ainsi qu'une échelle protéique (Thermo Scientific PAGERuler Prest plus Prestained Protein Ladder) afin de pouvoir identifier le poids moléculaire des cibles que l'on cherche à étudier. Les gels ont ensuite été placés dans une cuve d'électrophorèse contenant un tampon de migration « Running Buffer » (Tris-Glycine-SDS 1X). Enfin, la cuve a été branchée au générateur qui était réglé sur 70V, puis augmenté à 90/100V. Une fois la migration terminée, les gels TGX (Tris-Glycine eXtended) ont été activés sous UV à l'aide d'un

Tableau 2 : Condition d'utilisation de l'anticorps primaire

	Anticorps Primaire					
	Référence	Protéines déposées	Taille kDa	Milieu de dilution	Dilution	T° d'incubation
Puromycine	MABE343	40 µg	Smear	5% BSA 1X TBS 0,1% Tween 20	1/5 000ème	Overnight à 4°C

Tableau 3 : Condition d'utilisation de l'anticorps secondaire

	Anticorps Secondaire			
	Type d'Ac	Milieu de dilution	Dilution	T° d'incubation
Puromycine	Anti-IgG Mouse	5% BSA 1X TBS 0,1% Tween 20	1/20 000ème	1h à T°C ambiante

automate qui est la « G-Box » (Syngene), pendant une minute (Lampe TLUM, Filtre Upper wave). Cette étape est nécessaire car elle va permettre aux molécules trihalométhanes comprises dans le gel de s'associer aux acides aminés tryptophane des protéines sous l'action de la lumière UV. Ceci nous permet ainsi de visualiser les protéines contenues dans les gels. Ces images nous ont permis par la suite de quantifier la quantité de protéines déposée et de corriger les résultats d'éventuels problèmes de dépôts en normalisant la valeur des signaux anticorps par cette valeur TGX.

Ensuite, par une technique de transfert liquide, les protéines ont été transférées sur une membrane de PDVF (polyvinylidène difluorure) dans une cuve d'électrophorèse à un courant constant de 0.15A (Ampère) sur toute la nuit, sous agitation magnétique et à 4°C. Les membranes ont préalablement été activées dans de l'éthanol 100% pendant 30 secondes afin d'enlever le caractère hydrophobe de ces dernières et donc permettre le transfert des protéines sur les membranes.

A la suite du transfert, les membranes ont ensuite été plongées dans une solution de blocage (BSA 5% - TBS 1X – 0.1% Tween 20) pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. Ces dernières ont ensuite été hybridées avec l'anticorps primaire (*cf. tableau 2*). Les membranes ont ensuite subi un lavage rapide, puis une succession de 3 lavages de 15 minutes dans une solution de lavage (TBS 1X Tween 0.1%). Puis, elles ont été hybridées avec un anticorps secondaires marqué à la HRP (Horseradish Peroxydase) (*cf. tableau 3*), à température ambiante pendant 1h et sous agitation. Suite à cela, les membranes ont subi le même lavage que pour l'étape précédente.

Afin de visualiser les signaux, nous avons réalisé une révélation en chimiluminescence ; pour cela, nous avons utilisé le substrat « Forte » (Immobilon® Forte Western HRP Substrate). Ce substrat réagit avec la HRP qui est présente sur l'anticorps secondaire ; ainsi le produit de cette réaction émet une luminescence et est donc visible sous l'automate (« G-Box »). Les signaux et images capturés ont été acquis par le logiciel « Genesys » puis la quantification a été réalisée avec le logiciel « ImageJ ». Les valeurs ont ensuite été normalisées contre la quantité totale de protéines déterminée par les gels TGX.

III. RT-qPCR

a) Extraction et dosage des ARN

L'extraction d'ARN (Acide Ribonucléique) a été réalisée avec le kit « NucléoMag » ainsi qu'avec l'appareil Thermo Scientific KingFisher Duo Prime composé de pointes magnétiques; 20mg de poudre de muscle gastrocnémien ont été ajoutés dans 300 μ L de tampon de lyse composé de thiocyanate de guanidinium 60% et d'un agent réducteur qui est le TCEP (tris(2-carboxyethyl) phosphine). Suite à cela, nous avons utilisé le Precellys, un automate qui permet de broyer et d'homogénéiser nos échantillons pendant 15s à 6000 RPM. Puis nos échantillons ont été centrifugés pendant 5600g pendant 5 minutes afin de récupérer le surnageant dépourvu de débris cellulaires. Ce kit « NucléoMag » est basé sur la liaison réversible des acides nucléiques à des billes magnétiques dans des conditions tampons appropriées à température ambiante.

Dans des plaques 96 puits, nous avons donc déposé sur la première ligne les surnageants, un tampon MR2 « Binding Buffer » composé de propanol 100% afin de favoriser la liaison des acides nucléiques aux billes magnétiques ainsi que des billes magnétiques « NucleoMag® B-Beads ». L'appareil Thermo Scientific KingFisher Duo Prime est composé de pointes magnétiques permettant de réaliser les étapes suivantes : (1) une agitation de 5 minutes afin d'homogénéiser les 3 réactifs et de permettre aux acides nucléiques de se fixer sur les billes magnétiques, (2) une digestion de l'ADN vers la ligne suivante de la plaque par un mélange de rDNase (Recombinant desoxyribonuclease) pendant 15 minutes, (3) des lavages successifs à l'aide du tampon de lavage MR3 (thiocyanate de guanidinium 60% - éthanol 55%) pour éliminer les contaminants et les sels, (4) une dernière étape de lavage à l'aide du tampon MR4 (éthanol 90%) afin de retirer par séchage à l'air l'éthanol résiduel, (5) enfin une élution de l'ARN purifié avec 50 μ L d'eau sans RNase. L'ARN peut à cette étape être directement utilisé pour des applications en aval.

Suite à l'extraction, un dosage des ARNs a été réalisé. La technique consiste à déposer 1 μ L d'ARN élué, sur un appareil de mesure qui est le « Nanodrop ». Le principe du Nanodrop repose sur une spectrophotométrie UV/visible qui mesure la concentration des ARN purifiés qui absorbent à 260nm. Des ratios sont ensuite à contrôler (A260/A230 et A260/280) afin de vérifier s'il y'a des contaminations ou non.

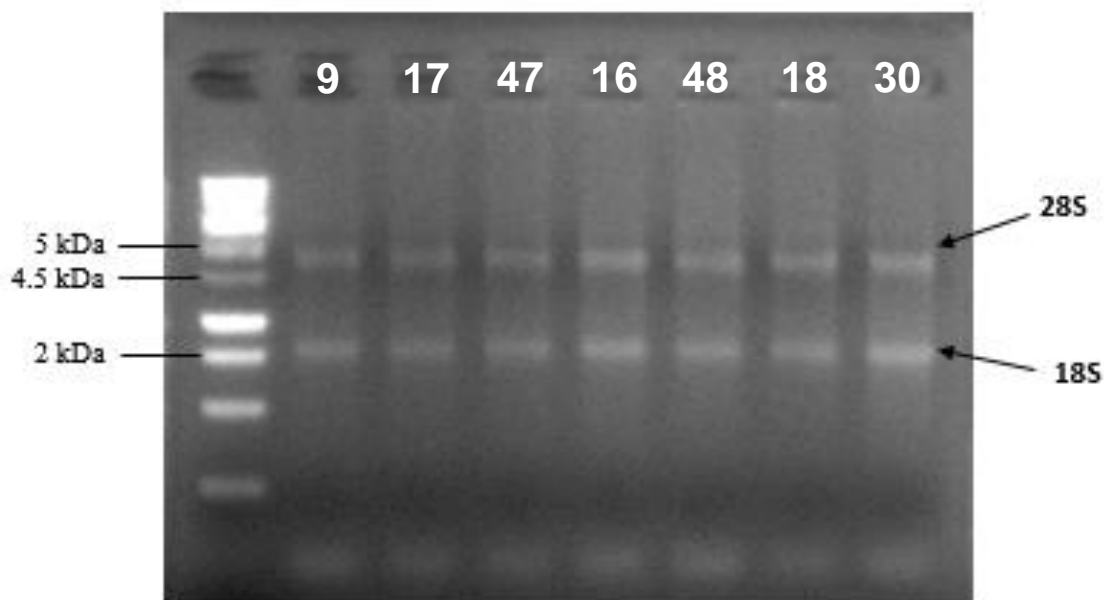


Figure 10 : Contrôle et vérification de l'intégrité des ARN sur gel d'agarose

Dépôt sur gel d'agarose de 7 échantillons d'ARN qui ont été extraits du muscle gastrocnémien de souris. Thermo Scientific™ Échelle d'ADN O'GeneRuler 1 kb Plus.

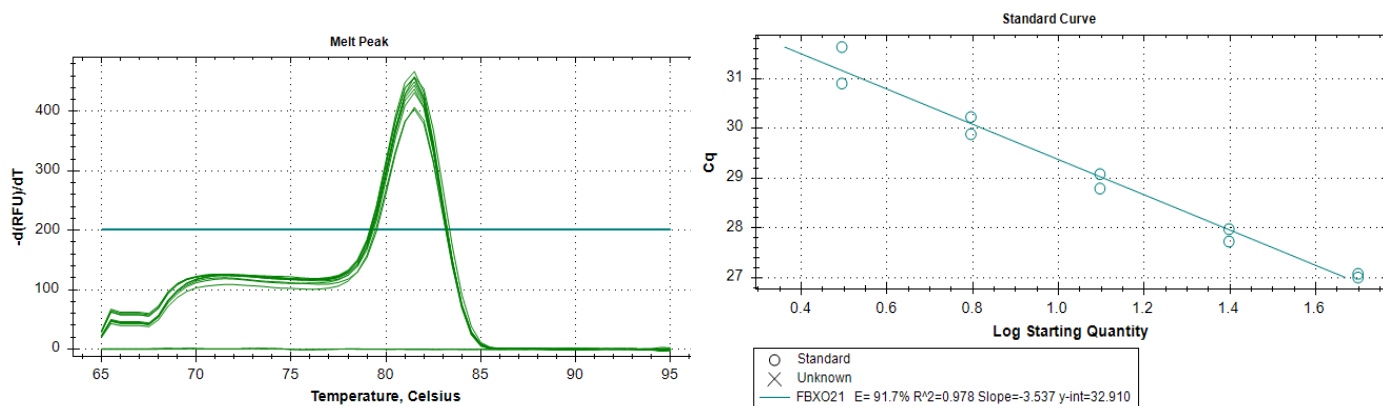


Figure 11 : Melting curve et Standard curve de vérification des amorces de *Fbxo21*

b) Vérification de l'intégrité des ARN

Nous avons réalisé un contrôle de l'intégrité des ARNs. Nous avons donc préparé un gel d'agarose à 1,5% contenant du BET (Bromure d'éthidium). Ce dernier est un intercalant des acides nucléiques qui devient fluorescent lorsqu'il est exposé aux rayons UV ce qui permet de visualiser les acides nucléiques. Une échelle de taille (Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix) ainsi que 500ng des ARNs extraits ont été déposés avec un loading buffer 6X (Bleu de bromophénol - glycérol - xylène cyanol FF) sur ce gel et nous avons visualisé, une fois le gel d'agarose sous UV, les bandes 28S (5 kDa) et 18S (2 kDa) qui sont caractéristiques de l'intégrité des ARNs ribosomiaux (*cf. figure 10*).

c) Reverse Transcription

La reverse transcriptase est une enzyme qui permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) en prenant un brin d'ARN comme matrice. Pour ce faire, nous avons utilisé 300ng d'ARN préparés précédemment auquel nous avons ajouté un mélange composé de Random Primers (RP à 250 ng/ μ L), de dNTP 10mM (désoxyribunocléotides triphosphate), de DTT 0.1mM (dithiothréitol), d'un tampon « 5X First Strand Buffer » et enfin de SuperScript II. Les échantillons ont par la suite été placés dans un thermocycleur à 42°C pendant 60 minutes, température qui correspond à la température optimale de réaction de l'enzyme SuperScript II, puis à 70°C pendant 15 minutes afin d'arrêter la réaction.

d) Vérification des amorces

Avant de réaliser la qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), il est nécessaire de vérifier les amorces afin de déterminer leurs efficacités, leurs reproductibilités et également leurs spécificités pour les gènes d'intérêts.

Nous avons déposé 2 μ L de différentes dilutions d'un pool de cDNA de nos échantillons (pur au 1/160ème) ainsi que 12 μ L de Mix (0.7 μ L d'amorce sens – 0.7 μ L d'amorce anti-sens – 7 μ L de SYBR Green et 3.6 μ L d'H₂O sans RNase). Nous avons ensuite placé la plaque dans un thermocycleur puis appliqué un programme, décrit dans la partie suivante. Il en sort, par le logiciel Bio-rad, une « melting curve » (*cf. figure 11*) qui nous permet de s'assurer qu'il n'y a bien qu'un produit d'amplification et une standard curve qui nous permet de visualiser l'efficacité ainsi que la reproductibilité des amorces. Dans notre cas, la figure n°11 indique bien un seul produit d'amplification est observable avec la melting curve et une efficacité correcte (entre 0.9 et 1).

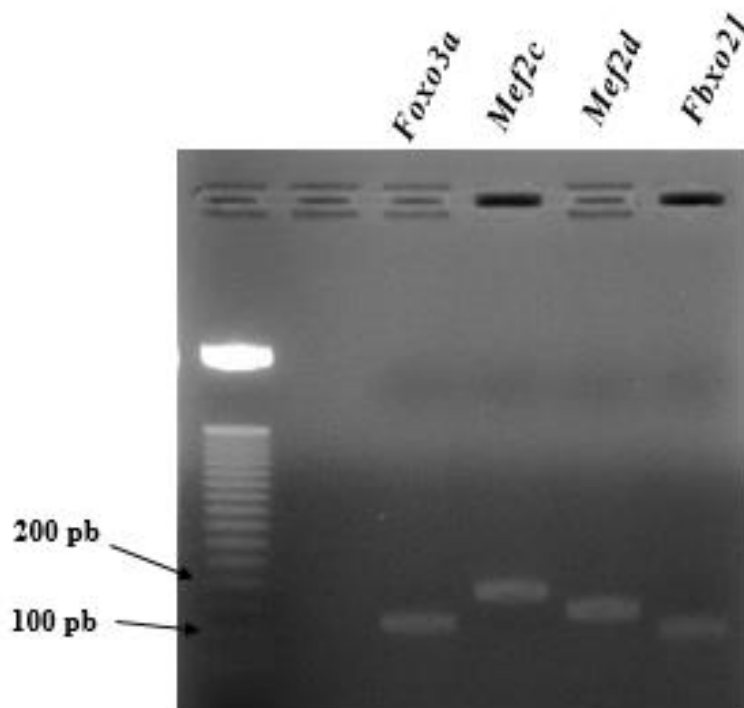


Figure 12 : Gel d'agarose sous UV avec visualisation de la taille des amplicons de chaque amorce

Les amplicons ont été déposés sur un gel d'agarose à 2 % contenant du bromure d'éthidium afin de visualiser les bandes sur UV et d'analyser leur taille par rapport à la taille théorique attendue.

Taille théorique attendue :

Foxo3a = 116pb / Mef2c = 178 pb / Mef2d = 139 pb / Fbxo21 = 95 pb

Nous pouvons ainsi voir sur le gel et grâce à l'échelle nucléique que la taille des amplicons est la même que celle attendue, ce qui a permis de valider les amorces.

Par la suite, nous avons préparé un gel d'agarose à 3%, puis déposé une échelle nucléique, ainsi qu'un Mix (5µL de cDNA au 1/10^{ème} – 5µL d'H₂O sans RNase – 2µL de Loading DNA) ; nous avons laissé migrer 30 minutes à température ambiante. Enfin, nous avons passé le gel sous UV afin de visualiser les bandes la taille des amplicons (*cf. figure 12*). L'exemple de *Fbxo21* nous a permis de dire que l'amorce est validée, et peut donc être utilisée pour des futures qPCR.

e) qPCR

La qPCR est une technique qui permet de quantifier, dans un échantillon, les niveaux d'ARNm (équivalent cDNA) pour un gène donné. On a réalisé la qPCR dans des plaques à 96 puits. Au fond de chaque puit, nous avons déposé 0.2µL de nos cDNA dilués au 1/30^{ème}, 0.7µL de chaque amorce (*cf. tableau 4*) diluée à 10µM (sens et anti-sens) ainsi que 7µL d'un mélange enzymatique « PerfeCTA SYBR® Green SuperMix » et de 3.6µL d'eau sans RNase. Ce mélange enzymatique (PerfeCTA SYBR® Green SuperMix) est une solution concentrée 2X, il est composé de AccuStart II Taq ADN polymérase, d'un fluorophore SYBR Green et de stabilisateurs enzymatiques. Le SYBR Green est un fluorochrome qui se fixe sur l'ADN et qui émet de la fluorescence. Après dépôt, les plaques ont été placées dans un thermocycleur CFX 96 (BioRad) auquel on a appliqué le programme suivant sur 39 cycle : 3 minutes à 95°C pour activer la Taq DNA polymérase, puis un cycle de 10 secondes à 95°C (phase de dénaturation) et 20 secondes à 60°C (phase d'hybridation et élongation des amorces).

Les données ont ensuite été enregistrées grâce au logiciel Bio-Rad. Ces résultats se retrouvent sous la forme de courbe d'amplification. Ces courbes (*cf. annexe 2*) illustrent l'accumulation de produits amplifiés au fur et à mesure que la réaction se déroule. La fluorescence a été mesurée pendant son intégration au sein du brin d'ADN. La phase exponentielle de cette courbe représente le moment où la quantité de produit formé double à chaque cycle, c'est dans cette phase que l'on obtient les Cts. Afin d'obtenir les Cts (Cycle Treshold) les plus précis, il est nécessaire que les courbes d'amplification se retrouvent tous pendant cette phase exponentielle. De plus, une courbe étalon a été réalisée (« Standard Curve »), elle est composée de mélange à volume équivalent de tous nos échantillons dilués de manière sériée d'un facteur 2. Le software utilisé a été CFX Masestro Software for Biorad CFX Real-Time PCR.

Les données ont ensuite été rentrées dans un tableau excel, pour chaque échantillon, une moyenne des duplicats expérimentaux a été réalisée. Un facteur d'efficacité a par la suite été appliqué aux moyennes, ce facteur d'efficacité résultant de notre gamme étalon réalisée.

Tableau 4 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la q-PCR

	Brin Sens	Brin Anti-sens
<i>Tbp</i>	CGGCTGTTTAACTTCGCTTCC	TGGGTTATCTTCACACGCCAAG
<i>Trim63</i>	ATGGAGAACCTGGAGAAGCA	AACGACCTCCAGACATGGAC
<i>Fbxo32</i>	AGTGAGGACCGGCTACTGTG	GATCAAACGCTTGCGAATCT
<i>Ctst</i>	CTGTTGCTATGGACGCAAGC	ACCAACGAACCCCATGGTC
<i>Foxo3</i>	AACTCATGGATGCTGACGGG	GCTTTGAGATGAGGCCTGCT
<i>Fbxo21</i>	TGAGCGTAAGAAGGAGGAGG	GCTTCATCACAAGCCCGATG
<i>Fbxo30</i>	GTTGGGATTGCGTAGTGACC	CCCTCATTAGCCGGGATACA
<i>Cdkn1a</i>	GTCTTGCACTCTGGTGTC	CTTGGAGTGATAGAAATCTG
<i>Gadd45a</i>	AGTCAACTTATTTGTTTTTGC	GCAATTTGGTTCAGTTATTT
<i>Eif4ebp1</i>	CAGGCGGTGAAGAGTCACA	CCTTGGGGGACATAGAAGCA
<i>Trib3</i>	CCAGAGATACTCAGCTCCG	GAGGAGACAGCGGATCAGAC
<i>Atf3</i>	CCAGGTCTCTGCCTCAGAAG	CATCTCCAGGGGTCTGTTGT
<i>Atg5</i>	TCAACCGGAAACTCATGGAA	TGAGCGTAAGAAGGAGGAGG
<i>Atg12</i>	TAAACTGGTGGCCTCGGAAC	CCATCACTGCCAAAACACTCA
<i>Atg16</i>	TCCCGTGATGACCTGCTAAA	CAGTCAGAGCCGCATTTGAA

Les valeurs obtenues ont été normalisées par le gène de ménage TBP (TATA binding protein), gène ne présentant pas de variation d'expression dans nos conditions expérimentales. Enfin, les valeurs normalisées ont été rentrées dans le logiciel « GraphPad » afin de tracer les graphiques et de réaliser des tests statistiques.

f) Analyse statistique

Le test statistique ANOVA (Analysis of variance) à deux facteurs (facteur traitement et facteur suspension) a été utilisée pour comparer les différents groupes. Par la suite les données ont été comparées 2 à 2 par un test de Fisher. Les différences d'expression d'ARNm ont été considérées comme statistiquement différentes à un seuil de 5% ($P < 0.05$).

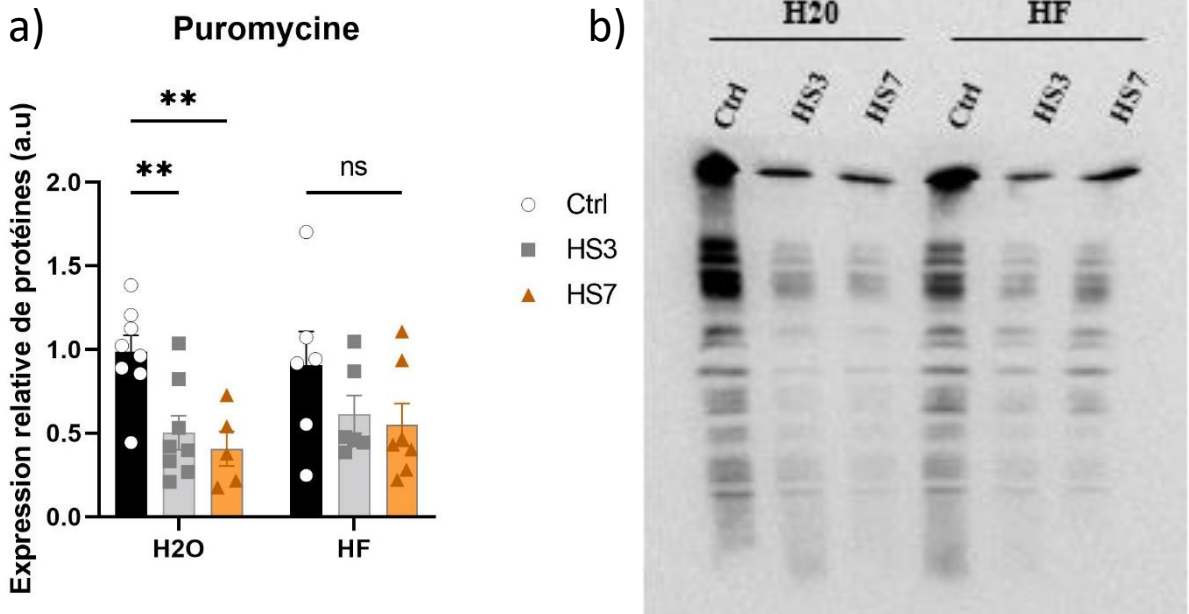


Figure 13 : Expression relative de puromycine incorporée dans les protéines chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone (HF) puis suspendues (HS) ou non

Avant le sacrifice, la puromycine a été injectée ($0,04\mu\text{g}/\text{mg}$) chez toutes les souris par voie intrapéritonéale. La puromycine incorporée dans les protéines a été analysée par Western Blot à partir de $40\mu\text{g}$ d'échantillons cytosoliques grâce à un anticorps dirigé contre la puromycine (cf. annexe 3). La membrane (b) ci-dessus est représentatif des signaux des groupes de souris préconditionnées par l'eau (H20) ou l'halofuginone (HF) ayant été ensuite suspendues pendant 3 (HS3) ou 7 (HS7) jours, ou non suspendues (Ctrl).

La quantification des signaux a été réalisée sur les 4 membranes présentées en annexe 4 sans prendre en compte les pistes sans signal. La normalisation a été réalisé avec les gels TGX (cf. annexe 3). Les données (a) ont été exprimées par rapport au groupe « H20 Ctrl » corrigé à 1 et sont des moyennes \pm SEM pour $n = 48$. * : $P < 0,05$ / ** : $P < 0,01$ et ns : non significatif (test ANOVA).

Résultats et discussion

I. Suivi du poids corporel et de la consommation alimentaire chez les souris recevant un pré-conditionnement par l'Halofuginone

Avant mon arrivée, un protocole sur souris avait été réalisé. Le pré-conditionnement par l'halofuginone (HF) ou l'eau (H₂O) (3 fois/semaine pendant 3 semaines, 0.25 µg/g) a été réalisé chez 48 souris. Entre les différents groupes H₂O ou HF, l'équipe n'a observé aucune différence ni de poids corporel ni de consommation alimentaire. Les souris ont ensuite été suspendues ou non par le train arrière. La prise alimentaire et le poids corporel ont diminué les 2 premiers jours pour les souris suspendues et se sont ensuite stabilisés. Une atrophie du muscle gastrocnémien a été observée après 7 jours de suspension chez les souris ayant reçu de l'eau. Cette atrophie est légèrement moindre chez les souris ayant été préconditionnées au préalable par l'HF. C'est pourquoi, afin d'approfondir cette étude, nous avons étudié la synthèse protéique (grâce à la puromycine), la protéolyse (expression d'atrogènes) et la voie eIF2 α -ATF4.

II. Etude de la synthèse protéique

a) Mesure de l'incorporation de puromycine dans les protéines

L'incorporation de la puromycine dans les protéines a été mesurée par Western Blot. Lors de la manipulation, nous avons déposé la même quantité de protéines cytosoliques (40µg) dans toutes les pistes pour tous les groupes. Les gels TGX (*cf. annexe 3*) illustrent que les dépôts sont équivalents. La quantification des signaux révélés par le TGX a été ensuite utilisée pour normaliser les données issues de la quantification de puromycine.

Suite à l'incubation avec l'anticorps anti-puromycine et la révélation par chimiluminescence, nous avons observé plusieurs pistes sans signal sur nos membranes (*cf. annexe 3*). Ceci ne semble pas être spécifique à un groupe en particulier car elles sont présentes de manière aléatoire pour tous les groupes. L'équipe a déjà rencontré ce type de problème. L'hypothèse la plus probable est une mauvaise injection en IP (Intrapéritonéal) de la puromycine chez les souris. L'injection en IP peut présenter des difficultés de reproductibilité car parfois le produit peut être injecté dans un organe, comme l'intestin ou la vessie par exemple. Dans ce cas, le produit (ici la puromycine) peut avoir été absorbé de façon plus ou moins efficace et/ou selon une cinétique différente chez certaines souris. Il est donc possible que la puromycine n'ait pas

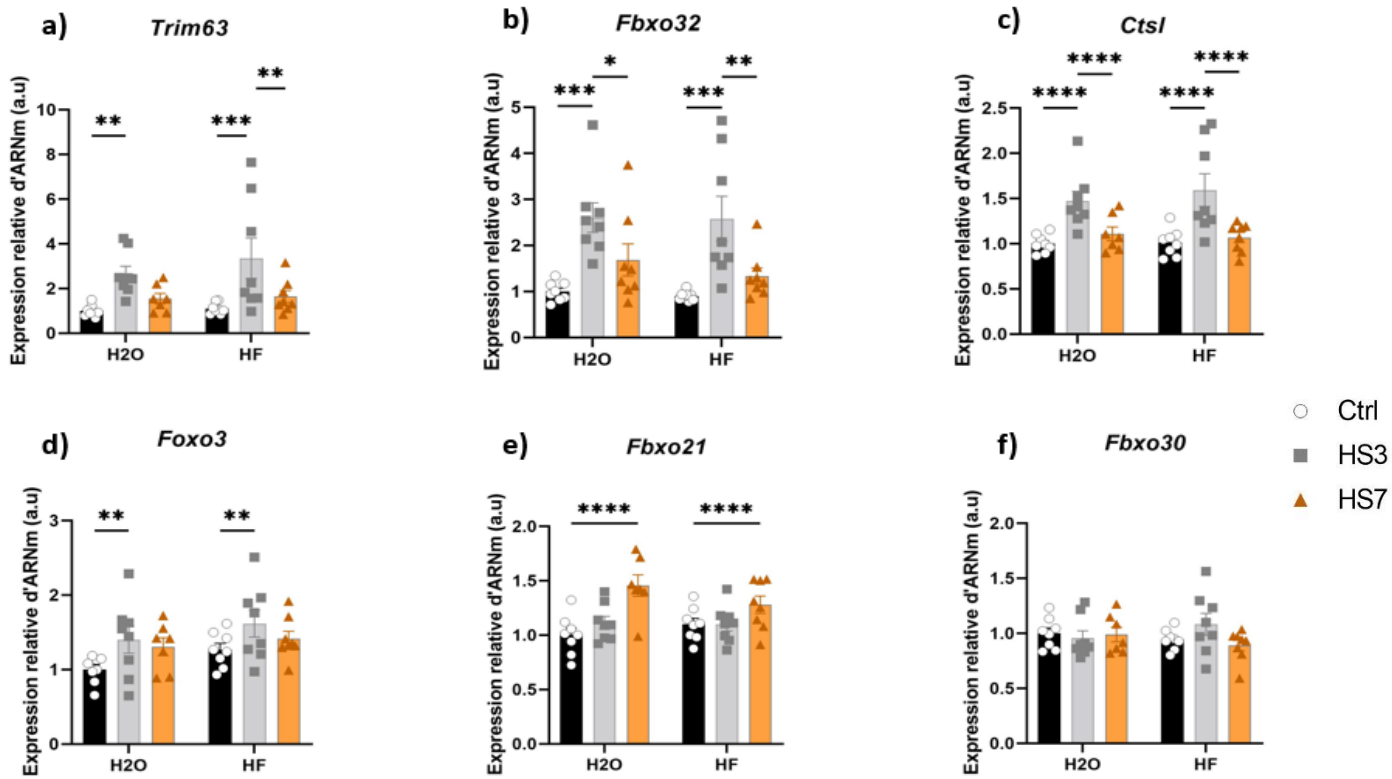


Figure 14 : Expression relative d'ARNm d'atrogènes chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues ou non

L'expression relative de *Trim63* (a), *Fbxo32* (b), *Ctsl* (3), *Foxo3* (d), *Fbxo21* (e), *Fbxo30* (f) a été mesurée dans le muscle gastrocnémien des souris préconditionnées à l'eau (H2O) ou l'halofuginone (HF) et ensuite suspendues pendant 3 et 7 jours (HS3, HS7) ou non (Ctrl).

Les données ont été exprimées par rapport au groupe « H2O Ctrl » corrigé à 1 et sont des moyennes \pm SEM pour n = 48. * : P < 0,05 / ** : P < 0,01 / *** : P < 0,001 / **** : P < 0,0001 (test ANOVA).

été disponible pour les muscles chez certaines souris et qu'elle n'ait donc pas atteint les muscles ciblés. Nous avons donc quantifié les signaux de puromycine dans les 4 gels présentés en Annexe 3, sans prendre en compte les pistes sans signal. Le résultat de cette quantification est présenté Figure 13.

Afin d'obtenir une membrane représentative de la quantification de ces 4 premières membranes, nous avons préparé des pools contenant des quantités équivalentes de protéines de chaque échantillon d'un même groupe (sans les échantillons négatifs à la puromycine). Nous avons ensuite réalisé un second Western Blot où 40 µg de protéines de chaque pool ont été déposés (*cf. figure 13*).

b) Interprétation de la quantité de puromycine incorporée dans les protéines

La figure n°13 nous montre tout d'abord que la quantité de puromycine intégrée dans les protéines est identique chez les souris Ctrl qu'elles aient été traitées ou non par l'HF. Puis, on peut observer que la quantité de puromycine incorporée dans les protéines est plus faible dans les muscles après 3 (-50%) ou 7 (-60%) jours de suspension chez les souris ayant reçu de l'eau. Ceci n'est pas le cas chez les souris traitées à l'HF où la quantité de puromycine incorporée dans les protéines a diminué de façon moins importante après 3 jours de suspension (-40%, ns) et s'est stabilisée après 7 jours de suspension (P=0.0579).

La baisse moins importante de la quantité de puromycine incorporée dans les protéines chez les souris suspendues ayant reçu le traitement à l'HF par rapport aux souris traitées à l'H2O suggère que le pré-conditionnement par l'HF a préservé en partie la synthèse protéique dans les muscles de ces souris pendant la suspension.

III. Etude de l'expression des atrogènes et des gènes impliqués dans la balance protéique

a. Analyse de l'expression des atrogènes

La figure n°14 présente plusieurs atrogènes impliqués dans la protéolyse UPS (*Trim63*, *Fbox32*, *Fbox21*, *Fbox30*, *Foxo3*) et lysosomale (*Ctsl*, *Foxo3*).

La figure n°14 illustre l'expression relative d'ARNm de différents atrogènes, connus pour être augmentés au cours de processus cataboliques. Il est important de préciser que l'expression d'ARNm est restée identique chez les souris Ctrl qu'elles aient été traitées ou non par l'HF et ce, pour tous les atrogènes.

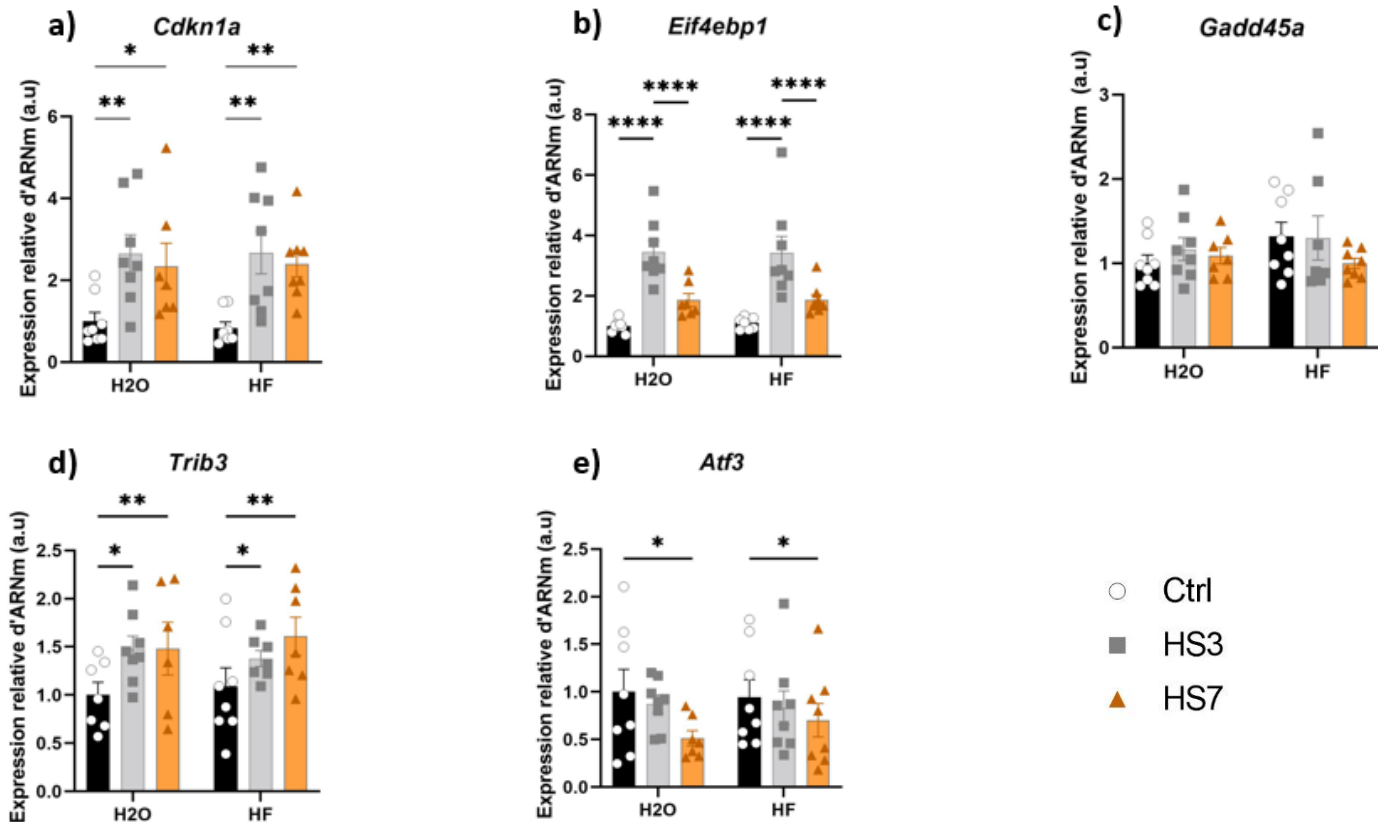


Figure 15 : Expression relative d'ARNm des gènes cibles de la voie de signalisation ATF4 chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues ou non

L'expression relative de *Cdkn1a* (a), *Eif4ebp1* (b), *Gadd45a* (c), *Trib3* (d) et *Atf3* (e) a été mesurée dans le muscle gastrocnémien des souris préconditionnées à l'eau (H2O) ou l'halofuginone (HF) et ensuite suspendues pendant 3 et 7 jours (HS3, HS7) ou non (Ctrl).

Les données ont été exprimées par rapport au groupe « H2O Ctrl » corrigé à 1 et sont des moyennes \pm SEM pour n = 48. * : P < 0,05 / ** : P < 0,01 / **** : P < 0,0001 (test ANOVA).

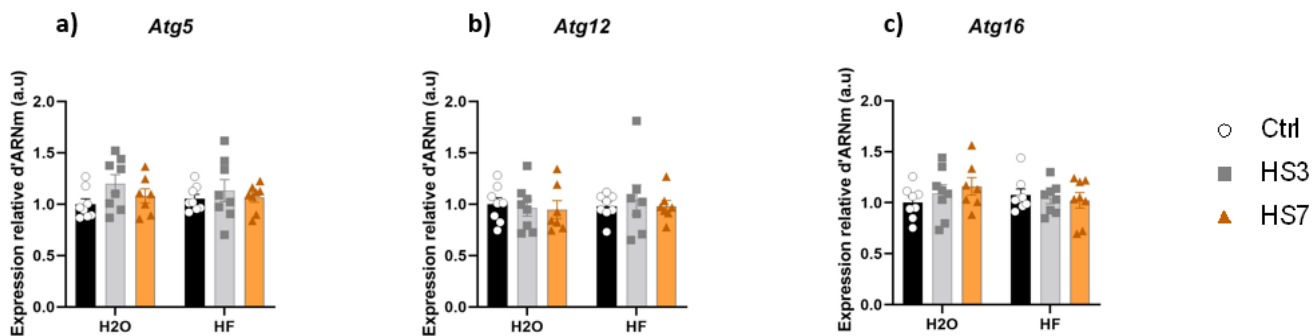


Figure 16 : Expression relative d'ARNm de gènes impliqués dans l'autophagie chez des souris pré-conditionnées à l'Halofuginone puis suspendues ou non

L'expression relative de *Atg5* (a), *Atg12* (b), *Atg16* (c) a été mesurée dans le muscle gastrocnémien des souris préconditionnées à l'eau (H2O) ou l'halofuginone (HF) et ensuite suspendues pendant 3 et 7 jours (HS3, HS7) ou non (Ctrl).

Les données ont été exprimées par rapport au groupe « H2O Ctrl » corrigé à 1 et sont des moyennes \pm SEM pour n = 48 (test ANOVA).

Pour *Trim63* (a), nous observons une augmentation de l'expression d'ARNm dans les muscles après 3 jours de suspension (30%) pour les 2 traitements. Cependant, chez les souris traitées à l'HF, cette expression a diminué significativement après 7 jours (-60% vs HS3) pour retourner à un niveau basal ce qui n'est pas le cas chez les souris ayant reçues de l'eau. La quantité d'ARNm pour les atrogènes *Fbxo32* (b), *Ctsl* (c) et *Foxo3* (d) a augmenté dans les muscles après 3 jours de suspension quelque soit le traitement, et a ensuite été normalisée à 7 jours excepté pour *Foxo3* (d), qui reste élevée après 7 jours de suspension. Pour *Fbxo21* (e), la quantité d'ARNm a augmenté significativement dans les muscles des souris suspendues plus tardivement que pour les autres atrogènes car on observe une hausse de 15% uniquement à 7 jours de suspension, autant chez le groupe H20 que le groupe HF. Enfin, pour *Fbxo30* (f), aucun changement n'est visible, l'expression d'ARNm est restée au même niveau entre les différents groupes.

Pour ces atrogènes communément étudiés, nous pouvons constater que leur expression augmente à 3 ou 7 jours de suspension, ce qui est en accord avec leurs rôles biologiques dans la mise en place de l'atrophie musculaire. Néanmoins, pour *Trim63*, son expression tend à être plus faible à 7 jours de suspension pour les souris HF que les souris H20. En outre, nous n'observons aucune différence majeure sur l'expression de ces atrogènes entre les deux traitements.

b. Analyse de l'expression des gènes cibles de la voie de signalisation ATF4

La figure n°15 présente plusieurs gènes (*Trib3* et *Atf3*) et plusieurs atrogènes (*Eif4ebp1*, *Cdkn1a* et *Gadd45a*) qui sont des cibles de la voie de signalisation ATF4. Comme pour la partie précédente, l'expression d'ARNm est identique chez les souris Ctrl qu'elles aient été traitées ou non par l'HF et ce pour toutes les cibles de la voie ATF4 étudiées.

Individuellement, pour l'atrogène *Cdkn1a* (a), nous retrouvons le même profil chez les souris traitées à l'HF ou non, c'est-à-dire une augmentation de la quantité d'ARNm à 3 jours de suspension qui reste stable dans les muscles des souris suspendues 7 jours. Pour l'atrogène *Eif4ebp1* (b), la quantité d'ARNm a augmenté fortement dans les muscles après 3 jours de suspension (80%) chez les souris traitées ou non par l'HF, et est ensuite normalisée dans les muscles suspendus 7 jours. Pour l'atrogène *Gadd45a* (c), son expression n'a pas été modulée ni par la suspension ni par le traitement. La quantité d'ARNm du gène *Trib3* (d) a été augmentée de manière significative à 3 jours de suspension et est restée élevée à 7 jours de suspension pour les souris traitées à l'eau ou à l'HF. Pour finir, la quantité d'ARNm diminue

pour le gène *Atf3* (e) dans les muscles des souris suspendues 7 jours (40%, vs. Ctrl) qu'elles aient reçu un traitement par l'HF ou non.

Dans l'ensemble, la quantité d'ARNm des différentes cibles de la voie ATF4 étudiées semble évoluer de la même façon entre les groupes de souris traitées à l'H2O ou à l'HF. On constate une augmentation de l'expression de ces gènes à 3 ou 7 jours de suspension excepté pour *Gadd45a* et *Atf3*. L'augmentation de *Cdkn1a*, *Eif4ebp1* et *Trib3* suggère que la voie ATF4 est activée en réponse à la suspension et est en accord avec leur rôle dans l'induction de l'atrophie musculaire et/ou dans la régulation de la synthèse protéique. Ces données suggèrent que la voie ATF4 est induite en réponse à la suspension, et que le pré-conditionnement n'a pas modifié cette réponse. Les données suggèrent également que la préservation partielle de la masse musculaire observée chez les souris préconditionnées au préalable par l'halofuginone n'est pas le résultat d'un effet sur l'activation de la voie ATF4.

c. Analyse de l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie

L'étude l'expression d'ARNm de gènes impliqués dans l'autophagie est un autre moyen de refléter la dégradation protéique.

De manière générale, la figure n°16 montre qu'il n'y a aucune variation de quantité d'ARNm des trois gènes étudiés *Atg5* (a), *Atg12* (b) et *Atg16* (c) puisque leur expression est identique chez les souris Ctrl et suspendues qu'elles aient reçu de l'eau ou de l'HF.

Les gènes *Atg5*, *Atg12* et *Atg16* forment un complexe et jouent un rôle important dans l'autophagie. L'invariabilité de la quantité d'ARNm sur ces gènes entre les différents groupes de souris suggère que dans notre situation catabolique qui est la suspension des souris par la queue, l'autophagie ne semble pas responsable de la perte de masse musculaire, et ce pour les deux traitements. Cependant, l'autophagie est un processus régulé par des modifications de protéines, ainsi, l'absence de variation de l'expression de ces gènes ne nous permet pas d'exclure entièrement un rôle de l'autophagie dans notre situation. Il serait donc intéressant d'étudier d'autres gènes impliqués dans l'autophagie.

Conclusion

Mes objectifs étaient d'étudier l'expression de différents marqueurs du dérèglement de l'homéostasie musculaire (protéolyse et synthèse protéique), ainsi que l'expression de gènes cibles de la voie ATF4 dans les muscles gastrocnémiens des souris, afin de préciser les mécanismes par lesquels l'HF avait permis de préserver partiellement la masse musculaire pendant une atrophie induite par la suspension.

J'ai pu montrer pendant ce stage que la synthèse protéique musculaire était réduite pendant la suspension de façon moins importante chez les souris préconditionnées par l'halofuginone. J'ai également montré que les atrogènes impliqués dans la protéolyse UPS ou lysosomale (autophagie) étaient induits pendant la suspension de la même manière quel que soit le traitement. De plus, j'ai montré que l'induction de la voie ATF4 pendant la suspension n'était pas affectée par le pré-conditionnement. Ceci suggère donc que l'effet de l'HF sur la préservation de la masse musculaire pendant la suspension s'exercerait principalement sur la synthèse protéique, sans impact ni sur la protéolyse, ni sur la voie ATF4.

Ce stage m'a apporté une première approche du monde professionnel qui est celui de la recherche. Durant ces 10 semaines, j'ai rencontré des problèmes lors de Western Blot pour le transfert ou encore la préparation des gels mais j'ai su trouver des alternatives en me tournant vers les personnes de l'équipe ayant plus d'expérience afin de m'aider. J'ai aussi suivi le protocole entier d'un RT-qPCR de l'extraction des ARN aux résultats. Ainsi j'ai pu développer mon sens critique sur mes propres résultats, approfondir mes connaissances théoriques et compétences techniques que j'ai acquises durant ces 2 ans à l'IUT mais aussi devenir plus autonome.

Références bibliographiques

- [1] « Accueil | INRAE INSTITIT ». <https://www.inrae.fr/> (consulté le mai 13, 2022).
- [2] « Regulation of Skeletal Muscle Function by Amino Acids », Yasutomi Kamei, Yukino hatazawa, Ran Uchitomi, Ryoji Yoshimura, et Shinji Miura, , *Nutrients*, janv.2020 (consulté le mai 15, 2022).
- [3] « Expression des gènes, synthèse des protéines » Suzette Bazetoux *et al.*. [En ligne]. Disponible sur : https://uel.unisciel.fr/biologie/introgen/introgen_ch03/co/introgen_ch03.html (consulté le mai 26, 2022)
- [4] « La dégradation des protéines : protéolyse » [En ligne]. Disponible sur : https://ressources.unisciel.fr/biocell/chap7/co/module_Chap7.html (consulté le mai 26, 2022)
- [5] « Molecules | Free Full-Text | Ubiquitin Ligases at the Heart of Skeletal Muscle Atrophy Control », Dulce Peris-Moreno et Laura Cussonneau, *Molecules*, janv. 14, 2021 (consulté le mai 21, 2022).
- [6] « Atrophie musculaire », Bertrand Léger *et al.*. [En ligne]. Disponible sur : https://ssms.ch/fileadmin/user_upload/Zeitschrift/59-2011-1/Atrophie_59_1_11_Leger.pdf
- [7] « L'activation de la voie eIF2 α -ATF4, une réponse adaptative au stress cellulaire », A.Bruhat *et al.*, médecine/sciences, vol. 31, n°12, Art. n°12, déc.2015 (consulté le mai 21, 2022)
- [8] « CDKN1A protein expression summary » [En ligne]. Disponible sur : <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000124762-CDKN1A> (consulté le mai 29, 2022).

Annexe

Gel de migration

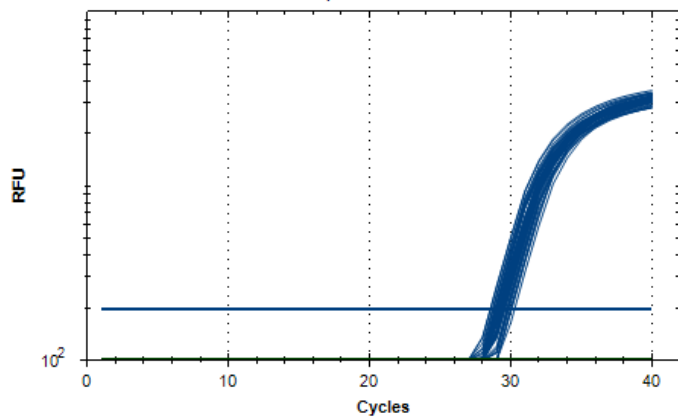
	1,5 mm Bio-rad Glass Plates for 4 gels
Resolver A	15 mL
Resolver B	15 mL
TEMED	30 μ L
10% APS	300 μ L

Gel de « stacking »

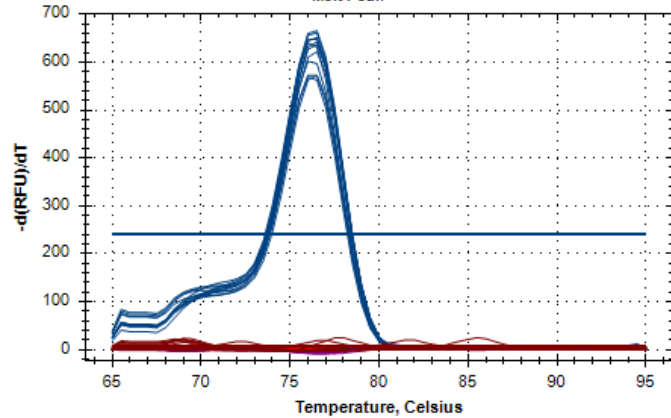
	1,5 mm Bio-rad Glass Plates for 4 gels
Stacker A	5 mL
Stacker B	5 mL
TEMED	10 μ L
10% APS	100 μ L

Annexe 1 : Composition des Gels TGX

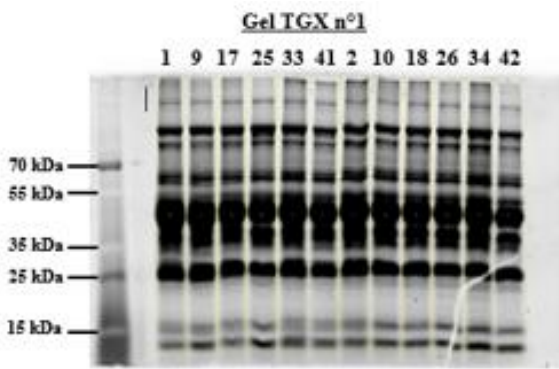
Amplification



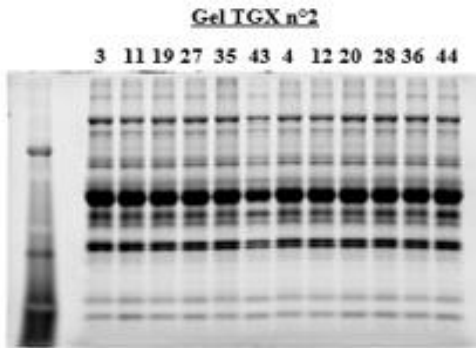
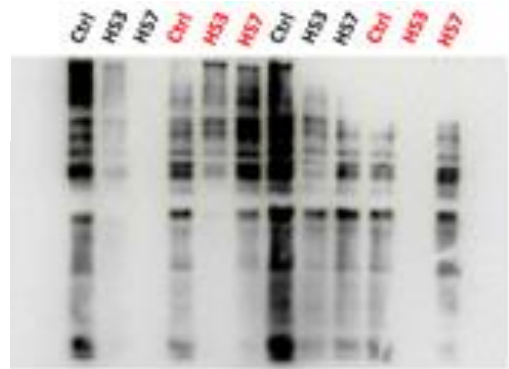
Melt Peak



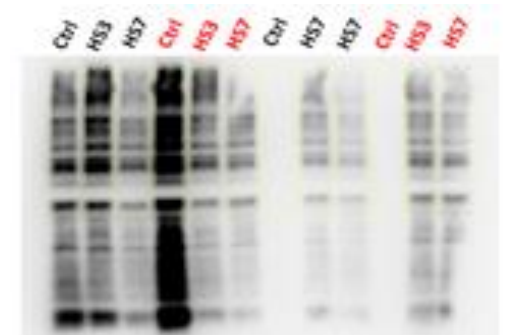
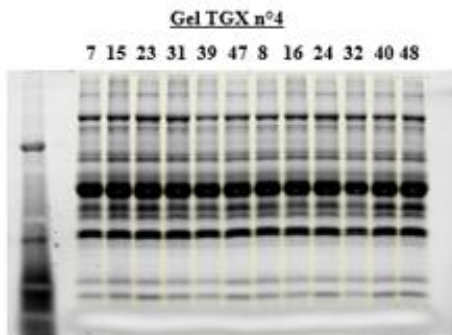
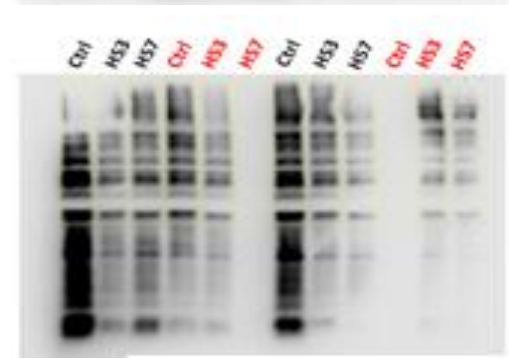
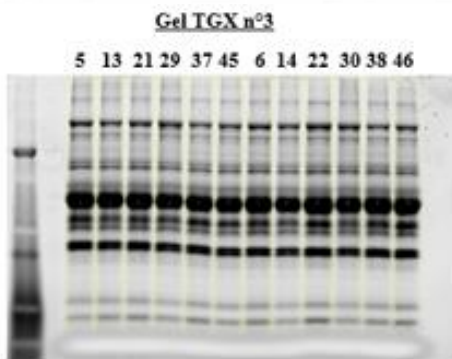
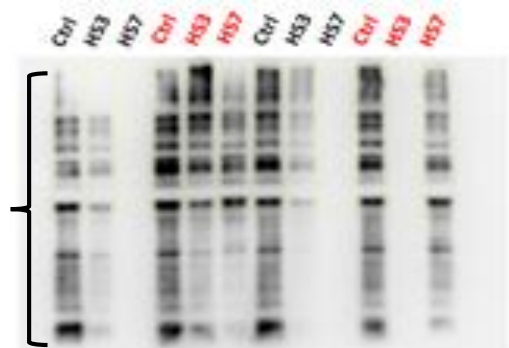
Annexe 2 : Courbe d'amplification et Melting Curve obtenue après RT-qPCR du gène de ménage TBP



Noir = H2O
Rouge = HF



Étendue
du signal
quantifié



Quantité de protéines totales déposées
sur les gel TGX

Quantité de puromycine incorporée dans
les protéines (membranes)

Annexe 3 : Représentation des 4 gels TGX et des 4 membranes des Western Blot de la puromycine

Les souris ont reçu un traitement par l'halofuginone (HF) (0,25 mg/kg) ou de l'eau (H2O) 3 fois par semaine pendant 3 semaines en amont d'une atrophie musculaire induite par la suspension par le train arrière pendant 3 (HS3) ou 7 (HS7) jours (n = 48). La quantité de puromycine incorporée dans les protéines a été analysée par Western Blot à partir de 40µg de protéines.

Résumé

Mots-clés : Atrophie musculaire, Halofuginone, Homéostasie protéique, Pré-conditionnement

De nos jours, il existe toujours des pathologies auxquelles aucun réel traitement n'est vraiment efficace, c'est le cas de l'atrophie musculaire. L'atrophie musculaire est représentée par la perte de masse musculaire dans diverses situations cataboliques, elle est due à une dérégulation de l'homéostasie protéique. La voie de signalisation eIF2 α - ATF4 est impliquée dans cette homéostasie protéique, ainsi, l'étude de l'expression de gènes cibles de cette voie par qPCR nous permet donc de visualiser l'intensité de l'activation de la voie dans une situation d'atrophie musculaire. L'halofuginone (HF) est une molécule induisant la phosphorylation d'eIF2 α et donc l'activation d'ATF4. Un pré-conditionnement a été effectué sur des souris, l'HF a été administré pendant 3 semaines en amont d'une atrophie musculaire induite par la suspension du train arrière. Mes objectifs étaient d'étudier (1) l'expression de différents marqueurs du dérèglement de l'homéostasie musculaire (protéolyse et synthèse protéique), ainsi que (2) l'expression de gènes cibles de la voie ATF4. Nos résultats montrent que l'HF limite la baisse de la synthèse protéique musculaire lors de l'atrophie. De plus, les résultats de l'étude de l'expression de gènes cibles de la voie ATF4 et d'atrogènes suggèrent une induction pendant la suspension de la même manière quel que soit le traitement. L'effet de l'HF pourrait alors agir principalement sur la synthèse protéique sans avoir d'impact ni sur la protéolyse ni sur la voie ATF4.

Abstract

Keywords : Muscle atrophy, Halofuginone, Protein homeostasis, Preconditioning

Nowadays, there are pathologies with no real effective treatment, such as muscle atrophy. Muscle atrophy is represented by a loss of muscle mass in various catabolic situations due to a deregulation of protein homeostasis. The eIF2 α - ATF4 signalling pathway is involved in this protein homeostasis, so studying the expression of its target genes by qPCR allows us to visualize the intensity of pathway activation in muscle atrophy situation. Halofuginone (HF) is a molecule that induces the phosphorylation of eIF2 α and thus the activation of ATF4. A pre-conditioning was carried out on mice, HF was administered for 3 weeks upstream of a muscle atrophy induced by hindlimb suspension. My objectives were to study (1) the expression of different markers of muscular homeostasis (proteolysis and protein synthesis), as well as (2) the expression of ATF4 pathway target genes. Our results show that HF limits the decrease in muscle protein synthesis during atrophy. In addition, the results of the expression of ATF4 target genes and atrogenes suggest an increase during suspension in the same way regardless of treatment. The effect of HF could then act primarily on protein synthesis without impacting proteolysis or ATF4 pathway.