



HAL
open science

Le métabolisme lipidique dans les altérations mitochondriales induites par l'absence de myostatine : impact de l'entraînement en endurance

Narjes Baati

► To cite this version:

Narjes Baati. Le métabolisme lipidique dans les altérations mitochondriales induites par l'absence de myostatine : impact de l'entraînement en endurance. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONT4002 . tel-02790900

HAL Id: tel-02790900

<https://hal.inrae.fr/tel-02790900>

Submitted on 5 Jun 2020

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Physiologie de l'exercice (PE)

École doctorale Sciences du Mouvement Humain

Unité de recherche UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme

Le métabolisme lipidique dans les altérations mitochondriales induites par l'absence de myostatine: Impact de l'entraînement en endurance

Présentée par Narjes BAATI

Le 24 Avril 2018

Sous la direction de Anne BONNIEU
et Christelle KOEHLIN-RAMONATXO

Devant le jury composé de

Stéphane Servais, Professeur, Université de Tours

Pascal Sirvent, Maître de conférences, Université Clermont Auvergne

Anne-Dominique Lajoix, Professeur, Université de Montpellier

Anne-Cécile Durieux, Ingénieur d'études, Université Jean Monnet

Anne Bonnieu, Directeur de recherche, INRA, Université de Montpellier

Christelle Koechlin-Ramonatxo, Maître de conférences, Université de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

À mes parents
À mon chéri
À tous ceux qui m'aiment
et m'ont toujours soutenu tout au long de cette thèse
Dans les hauts et dans les bas...

Merci... Je vous aime!

«Tous nos rêves peuvent se réaliser si nous avons le courage de les poursuivre»

- Walt Disney

Remerciements

Je tiens à remercier ici les personnes, qui de près de loin, m'ont apporté un soutien professionnel mais surtout personnel durant cette thèse.

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury, du temps précieux qu'ils ont accordé pour évaluer ce travail de recherche:

Monsieur Stéphane Servais et Monsieur Pascal Sirvent d'être les rapporteurs de ma thèse.

Madame Anne-Dominique Lajoix et Madame Anne-Cécile Durieux de faire partie de mon jury en tant qu'examinatrices.

Je remercie particulièrement mes deux directrices de thèse Anne Bonnieu et Christelle Koechlin-Ramonatxo de m'avoir accueillie au sein l'équipe « Remodelage Musculaire et Signalisation » et de m'avoir co-encadrée d'une manière exceptionnelle tout au long de cette thèse.

Anne, merci d'avoir été toujours disponible et trouvé le temps de répondre à mes questions. J'ai beaucoup appris durant ces trois années à tes côtés, au travers de ta rigueur scientifique, ton organisation et ton honnêteté. Merci de m'avoir apporté tes connaissances scientifiques, elles ont toujours été de bons conseils !

Christelle, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir confié ce projet. Ton énergie positive et ton enthousiasme m'ont « booster » tout au long de cette aventure. Je te remercie pour ton efficacité, ta bonne humeur et ta pédagogie indéniable. Je ne peux pas oublier tes qualités humaines et ton soutien moral, elles m'ont toujours apporté un grand réconfort.

Merci à toutes les deux pour tout, je vous en suis tellement reconnaissante! Vous avez rempli votre mission avec excellence et humanité !

Je remercie chaleureusement tout les membres de l'UMR DMEM et toutes les personnes avec lesquelles j'ai partagé ma vie quotidienne dans le laboratoire tout au long de ces années de thèse.

Merci Barbara pour ta disponibilité et d'avoir partagé des heures autour des Western Blot et des membranes pour m'apprendre la bonne technique. Merci pour ta gentillesse et pour tes précieux conseils, tout au niveau professionnel ou personnel.

Merci Bénédicte pour ta disponibilité et de m'avoir transmis tes savoirs sur le métabolisme lipidique et la bonne technique de la RT-PCR. Merci d'avoir été toujours à l'écoute et de m'avoir donné les bons conseils.

Merci Béa pour tes conseils et les moments de discussion qu'on a passés autour des résultats du Cardiolipide et de la mitochondrie.

Vous m'avez toutes apporté des compétences techniques remarquables!

Je tiens à remercier Madame Christine Feuillet-Coudray et Mr Gilles Fouret pour m'avoir bien accueillie dans l'équipe « Endocrinologie Mitochondriale et Nutrition » dans laquelle j'ai passé pas mal du temps. Merci pour votre disponibilité et pour m'avoir accompagnée et encadrée sur toutes les manipulations lipidiques.

Un grand remerciement à tous les membres de l'équipe RMS et EMN et toute personne qui a contribué du près ou du loin à une bonne réalisation de ce projet (Arnaud, François, Vincent, Fabienne, Laurence...)

Je tiens également à remercier Jérôme Lecomte de m'avoir reçue dans son unité de recherche IATE- CIRAD pour réaliser mes analyses lipidiques. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Un grand merci à l'équipe de l'animalerie Mélanie, Romain, Sylvain et Christelle qui veillent sur le bien être de nos petites souris.

Merci à tout le service administratif et technique du laboratoire, Evelyne, Suzy, Ebru, Marie-France, Robin

Merci à tous les stagiaires, les thésards et les personnels non-permanents de la DMEM qui se sont succédés dans l'équipe, merci pour votre bonne humeur et votre amitié.

Merci aussi Emilie pour tes conseils, ta gentillesse et de m'avoir montré les techniques de l'histologie avant de partir. J'espère garder cette amitié pour longtemps.

Des remerciements très chaleureux vont à mes amis de France et aussi de l'autre coté de la Méditerranée... merci pour votre soutien sans faille et votre amitié.

Je ne saurais finir sans exprimer mes remerciements les plus sincères à ma très chère famille, malgré toute la distance qui nous séparait, leur aide et leur soutien m'étaient les plus réconfortants tout au long de ce périple.

Sommaire

Curriculum Vitae.....	8
Liste des publications et communications au cours du doctorat.....	9
Liste des abréviations.....	11
Liste des illustrations	14
Avant-propos	16
A-Revue de Littérature.....	17
I Paradoxe du tissu musculaire déficient en myostatine.....	18
I.1 Le gène myostatine et sa structure protéique	18
I.2 Inhiber la myostatine, un modèle d'hypertrophie musculaire.....	21
<i>I.2.1 Les mutations naturelles.....</i>	<i>21</i>
<i>I.2.2 Les modèles génétiques de déficience en mstn</i>	<i>22</i>
<i>I.2.3 Les stratégies thérapeutiques d'inhibition.....</i>	<i>25</i>
I.3 Impact sur l'homéostasie protéique	28
<i>I.3.1 Rappel sur la régulation de la masse musculaire.....</i>	<i>28</i>
<i>I.3.2 Action de la mstn sur les voies signalétiques régulant la masse musculaire.....</i>	<i>35</i>
<i>I.3.3 Action sur la prolifération et la différenciation cellulaire.....</i>	<i>37</i>
I.4 Un tissu fatigable avec un métabolisme oxydatif altéré.....	40
<i>I.4.1 Le phénotype musculaire contractile: rappels sur la force et endurance.....</i>	<i>40</i>
<i>I.4.2 Le phénotype métabolique musculaire: focus sur le métabolisme aérobie.....</i>	<i>41</i>
<i>I.4.3 Altérations fonctionnelles du tissu musculaire déficient en mstn.....</i>	<i>49</i>
<i>I.4.4 Altérations métaboliques du tissu musculaire déficient en mstn.....</i>	<i>50</i>
II Métabolisme lipidique, lipidome.....	53
II.1 Acides Gras et triglycérides, Structure et classification.....	53
<i>II.1.1 Les Acides Gras Saturés.....</i>	<i>54</i>
<i>II.1.2 Les Acides Gras Insaturés.....</i>	<i>55</i>
<i>II.1.3 Les Triglycérides, estérification des Acides Gras et réservoir d'énergie.....</i>	<i>59</i>
II.2 Voies de synthèse des acides gras	61
<i>II.2.1 Catabolisme des Acides Gras à partir du tissu adipeux.....</i>	<i>61</i>
<i>II.2.2 Entrée des Acides Gras dans le tissu musculaire.....</i>	<i>61</i>
<i>II.2.3 Synthèse de novo des Acides Gras.....</i>	<i>63</i>
<i>II.2.4 Catabolisme des Acides Gras dans le muscle squelettique.....</i>	<i>64</i>
II.3 Régulation transcriptionnelle du métabolisme lipidique.....	65

<i>II.3.1 PPARδ et métabolisme lipidique dans le muscle.....</i>	65
<i>II.3.2 PGC1α et métabolisme lipidique dans le muscle.....</i>	65
II.4 Phospholipides, Cardiolipide et métabolisme mitochondrial	69
<i>II. 4.1 Rappels sur les phospholipides, principaux constituants des membranes cellulaires et leurs fonctions dans le tissu musculaire</i>	<i>69</i>
<i>II. 4.2 Le Cardiolipide, un phospholipide spécifique de la membrane mitochondriale.....</i>	<i>73</i>
<i>II.4.3 Synthèse et remodelage du Cardiolipide.....</i>	<i>76</i>
<i>II.4.4 Impact du Cardiolipide sur la fonction mitochondriale et le métabolisme aérobie.....</i>	<i>78</i>
<i>II.4.5 Cardiolipide et bioénergétique mitochondriale dans le muscle</i>	<i>81</i>
III Entraînement en endurance.....	83
III.1 Un stimulus physiologique efficace pour booster le métabolisme aérobie.....	83
III.2 Effet de l'entraînement en endurance sur le métabolisme lipidique.....	84
<i>III.2.1 Transporteurs des Acides Gras dans le muscle pendant l'exercice.....</i>	<i>85</i>
<i>III.2.2 Lipolyse et oxydation des Acides Gras dans le muscle pendant l'exercice.....</i>	<i>85</i>
<i>III.2.3 Contribution des Triglycérides musculaires dans l'exercice.....</i>	<i>86</i>
III-3 Entraînement et composition lipidique membranaire du muscle.....	87
III.4 Le tissu musculaire déficient en mstn, un tissu remodelable par l'entraînement en endurance	89
B-Buts de la thèse et conduite des investigations.....	91
C-Matériels et Méthodes.....	93
I-Analyse de la fonction mitochondriale.....	94
<i>1.1 Isolation des mitochondries</i>	<i>94</i>
<i>1.2 Dosage des activités des enzymes mitochondriales par spectrophotométrie.....</i>	<i>94</i>
II-Etude des voies signalétiques et du métabolisme lipidique.....	96
<i>2.1 Dosage des protéines par immunoblotting.....</i>	<i>96</i>
<i>2.2 Quantification des expressions des gènes par RT-qPCR.....</i>	<i>99</i>
III-Analyse de la composition lipidique mitochondriale et musculaire.....	101
<i>3.1 Extraction des lipides des muscles et des mitochondries.....</i>	<i>101</i>
<i>3.2 Mesure du contenu en Triglycérides et lipides neutres dans le muscle.....</i>	<i>101</i>
<i>3.3 Dosage et quantification de phosphore sur les extraits Folch des muscles et des mitochondries.....</i>	<i>103</i>
<i>3.4 Analyse de la composition en phospholipides des membranes musculaires et mitochondriale.....</i>	<i>104</i>
<i>3.5 Analyse de la composition en Acide Gras dans le muscle.....</i>	<i>105</i>

IV-Fonction musculaire: Entraînement en endurance	108
<i>4.1 Mesure des capacités aérobies in vivo sur tapis de course.....</i>	<i>108</i>
<i>4.2 Protocole d'entraînement en endurance sur tapis roulant.....</i>	<i>108</i>
V-Analyse Statistique des résultats.....	108
D-Résultats.....	109
I-Etude 1: Le muscle déficient en myostatine présente des anomalies lipidomiques.....	110
<i>1.1 Plan de travail.....</i>	<i>110</i>
<i>1.2 PDF premier article.....</i>	<i>110</i>
<i>1.3 Données complémentaires non publiées en relation avec l'étude 1 : effet de Gasp 1 sur le métabolisme oxydatif et le phénotype musculaire.....</i>	<i>111</i>
II Etude 2: Nouvelle preuve des avantages de l'entraînement physique chez les souris knock-out myostatine: impact sur les anomalies lipidomiques.....	114
<i>2.1 Plan de travail.....</i>	<i>114</i>
<i>2.2 PDF deuxième article en soumission</i>	<i>115</i>
E-Discussion générale & Perspectives.....	145
I-Fonction métabolique de la myostatine.....	146
<i>I.1 Métabolisme lipidique musculaire chez la souris KO mstn.....</i>	<i>146</i>
<i>I.2 Métabolisme lipidique chez la souris KO mstn.....</i>	<i>147</i>
<i>I.3 Acides Gras et composition phospholipidique des membranes chez la souris KO mstn...149</i>	<i>149</i>
II-Adaptations métaboliques des souris KO mstn à l'entraînement en endurance.....	153
F-Bibliographie.....	157

Jeune chercheur en métabolisme musculaire



Narjes BAATI

Tel : +33 07 82 80 27 14

Mail : narjesbaati@yahoo.fr

Researchgate : Narjes BAATI

Langues

Arabe Lu, écrit et parlé: Langue maternelle
Français Lu, écrit et parlé: Très bien
Anglais Lu, écrit et parlé: Bien
Espagnol Lu, écrit et parlé: niveau scolaire

Diplômes universitaires

2014-2017 Doctorat en Biologie-santé : Université de Montpellier, UFR STAPS, UMR 866 DMEM, INRA Montpellier. Ecole doctorale science du mouvement humain (en cours 3^{ème} année)

2012-2013 Master 2 de recherche en Biologie-santé : Université de Sfax, Tunisie, Institut supérieur de sport et de l'éducation physique, collaboration avec Université Paris Sud : IUT-Orsay et service Biochimie à l'Hôpital Armand Trousseau Paris. Mention Bien

2011-2012 Master 1 de recherche Biologie santé Université de Sfax, Tunisie, Institut supérieur de sport et de l'éducation physique : Mention assez bien

2011 Licence en Education physique et sportive, Institut supérieur de sport et de l'éducation physique, Université de Sfax, Tunisie

Divers

-Membre des associations DocSMH et ACAPS
-Titulaire de (PSC1) Secourisme
-Entraîneur Gymnastique artistique féminine Club CEP 4h/sem à Montpellier (Octobre 2014- 2017)
-Animatrice scolaire : activités préscolaires (TAP) Ecole Simon Bolivar 2h/sem, Montpellier, France (Septembre 2015-2017)
- Entraîneur de Natation (diplôme 2^{ème} degré): catégorie enfants 6-10 ans, Sfax, Tunisie (2009-2010)
-Arbitrage de football, niveau régional, 2013
-Permis de conduire depuis 2008

Expertise scientifique

Recherche-Mots clés

-Physiologie, muscle squelettique, remodelage musculaire, métabolisme musculaire, myostatine, mitochondrie, lipides et phospholipides, exercice physique et entraînement

Compétences techniques

-Expérimentation animale : Adaptation de l'animal à son environnement : activité physique/Nutrition/Dissection
-Maîtrise des différentes techniques de laboratoire de biochimie et bio-cellulaire (western blot, Rt-PCR, chromatographie, spectrophotométrie, extractions et dosages, prélèvements...)
-Réalisation des devis et des commandes de produits
-Planification et gestion du temps des manipulations scientifiques

Bibliométrie et rédaction scientifique

-Valorisation des résultats et rédaction des articles scientifiques.
-Analyse des résultats scientifiques par les logiciels statistiques: Graph pad prism6, SPSS
-Maîtrise des logiciels bureautiques (Word,XL,powerpoint...)

Administration et événements scientifique

-Organisation des événements scientifiques : Journée de l'ED SMH, 27 Mai 2016, Marseille
-Membre élue: représentante des doctorants de Montpellier au sein du conseil de l'ED SMH

Formation dans le domaine de la recherche

-Stage doctoral (2014-2017), Equipe remodelage musculaire et signalisation, UMR 866 DMEM INRA Montpellier, France, co-direction Drs A.Bonnieu (DR2) et C.Ramonatxo (MCF-HDR)

-Formation et workshop, MyoGrad Summer School for Myology 15-19 Juin 2015, Paris – Berlin-Versailles

-Stage de master 2, 3 mois, service biochimie Hôpital d'enfant Armand Trousseau, direction de Pr F. Moussa : Evaluer l'impact du jeûne intermittent sur le système antioxydant chez des patients ayant des risques cardiovasculaires : analyse des échantillons biologiques, Paris, France

-Scientific littérature (English), 25 heures, efficient Reading and note taking habits.
-Recherche et gestion de l'information scientifique ,14 heures, méthodes, outils, ressources en Santé/Sciences
-Atelier génétique et animalerie ,8 heures, production, utilisation, conservation des clones CNRS Montpellier

Participation aux congrès et publications scientifiques

-**Article publié: Baati et al. 2017, premier auteur (publié à BBA Molecular and Cell Biology of Lipids (IF 5.54)**

-**2^{ème} papier: N.Baati, C.Feillet-Coudray, G.Fouret, B.Vernus, B.Goustard, C.Bertrand-Gaday, M.Jollet, C.Coudray, J.Lecomte, A.Bonnieu & C.Koechlin-Ramonatxo, New evidence of exercise training benefits in myostatin-deficient mice: effect on lipid skeletal muscle abnormalities, soumis à Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**

-**3^{ème} papier: B.Chabi, G.Fouret, J.Lecomte, F.Cortade, L.Pessemesse, N.Baati, C.Coudray, Q.Tong, C.Wrutiak-Cabello, F.Casas, C.Feillet-Coudray: Skeletal muscle overexpression of short isoform Sirt3 altered mitochondrial cardiolipin content and fatty acid composition, publié en JBB (IF 2.57).**

-Communication orale lors de la journée de l'ED SMH, 2 Juin 2017, Montpellier
-Primée par le groupe Français de bioénergétique (GFB): une bourse de voyage (600euros) au congrès international EBEC 2016.

-Communication affichée à l'EMC, 2-6 Septembre 2016, Montpellier.

-Communication affichée à l'EBEC, 2-7 Juillet 2016, Riva del Garda, Italie.

-Communication affichée, Journée ED SMH, 27 Mai 2016, Marseille.

-Communication affichée, congrès de l'ACAPS, 26-28 Octobre 2015, Nantes.

-Communication affichée + oral Cardiolipin Congress, 1-2 Octobre 2015, Florence, Italie.

Enseignement et formation pédagogique

-Enseignante vacataire, Université Montpellier (UFR STAPS) (2017- 2018) : en cours

-Enseignante vacataire, Université Montpellier (UFR STAPS) (2016- 2017) : 33heures de TD L1+L2, enseignement de physiologie

-Professeur d'éducation physique et sportive au collège : 3h/sem année scolaire 2010-2011, collège Mongi Slim, Sfax, Tunisie

-Prise de parole en public, pédagogie interactive niveau 1: 21 heures

-Savoir comment exprimer et valoriser vos acquis: 14 heures

-Préparation à la recherche d'emploi: 25 heures

Liste des publications et communication au cours du doctorat

Publications:

* *Travaux présentés dans ce mémoire*

1-* **Baati Narjes**, Feillet-Coudray Christine, Fouret Gilles, Vernus Barbara, Goustard Bénédicte, Coudray Charles, Lecomte Jérôme, Blanquet Véronique, Magnol Letitia, Bonniou Anne, Koechlin-Ramonatxo Christelle, « **Myostatin deficiency is associated with lipidomic abnormalities in skeletal muscles** », *BBA Molecular and Cell Biology of Lipids* (2017), 1862(10 Pt A):1044-105 (IF 2016= 5.54).

2-* **Baati Narjes**, Feillet-Coudray Christine, Fouret Gilles, Vernus Barbara, Goustard Bénédicte, Bertrand-Gaday Christelle, Jollet Maxence, Coudray Charles, Lecomte Jérôme, Bonniou Anne & Koechlin-Ramonatxo Christelle, « **New evidence of exercise training benefits in myostatin-deficient mice: effect on lipid skeletal muscle abnormalities** », en Révision à *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* (IF 2016= 3.33)

3- Chabi Béatrice, Fouret Gilles, Lecomte Jérôme, Cortade Fabienne, Pessemesse Lorence, **Baati Narjes**, Coudray Charles, Tong Q, Wrutniak-Cabello Chantal, Casas François, Feillet-Coudray Christine, “**Skeletal muscle overexpression of short isoform Sirt3 altered mitochondrial cardiolipin content and fatty acid composition**”, accepté et publié à *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (IF=2.57)

4- Jollet Maxence, Nay Kevin, **Baati Narjes**, Pontones Maria, Ollendorff Vincent, Vernus Barbara, Bertrand-Gaday Christelle, Bonniou Anne, Lepage Patricia, Benedicte Goustard, Koechlin-Ramonatxo Christelle, « **Mstn deficiency is associated with altered gut microbiota composition reversed by endurance training, en preparation** »

Communications lors de congrès nationaux et internationaux:

❖ *Communications orales:*

« *Myostatine, lipidome et cardiolipide dans l'intimité « d'un ménage à trois » au sein du muscle squelettique, Quand l'entraînement s'en mêle...* »

➤ Journée de l'ED SMH, 2 Juin 2017, Montpellier

“*Myostatin deficiency in skeletal muscle alters the lipid composition of mitochondrial membranes*”

➤ Cardiolipin Congress, 1-2 Octobre 2015, Florence, Italie.

❖ *Posters:*

«*Myostatin deficiency in skeletal muscle alters lipid metabolism and mitochondrial membranes lipid composition*»

Narjes Baati, Christine Feillet-Coudray, Gilles Fouret, Barbara Vernus, Bénédicte Goustard, Charles Coudray, Jérôme Lecomte, Anne Bonnieu & Christelle Ramonatxo

- European Bioenergetics Conference (EBEC), 2-7 Juillet 2016, Riva del Garda, Italie. Primée par le groupe Français de bioénergétique (GFB).
- European Muscle Conference (EMC), 2-6 Septembre 2016, Montpellier.
- Journée ED SMH, 27 Mai 2016 à Marseille.

“*Myostatin deficiency in skeletal muscle alters the lipid composition of mitochondrial membranes*”

Narjes Baati, Christine Feillet-Coudray, Gilles Fouret, Barbara Vernus, Beatrice Bonafos, Charles Coudray, Anne Bonnieu & Christelle Ramonatxo

- ACAPS, 26-28 Octobre 2015 à Nantes.
- Cardiolipin Congress, 1-2 Octobre 2015, Florence, Italie.

❖ *Workshop:*

MyoGrad Summer School for Myology Paris | Berlin | Versailles 15-19 Juin 2015 à Paris

Liste des abréviations

4EBP-1	eIF4E-binding protein1
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
AcétylCoA	Acétyl Coenzyme A
ACS	Acyl-CoA synthétase
ActRIIB	Activin Receptor Type IIB
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AG	Acides Gras
AGI	Acides Gras insaturés
AGL	Acides gras libres
AGMI	Acides gras monoinsaturés
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AGS	Acides Gras Saturés
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside
Akt	Protein kinase B
ALCAT-1	Acyl-CoA lysoCardiolipide acyltransfèrese-1
ALK	Activin-like Kinase
AMPK	Activated protein kinase
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
Bax	Bcl-2-like protein 4
Bcl	B-cell lymphoma 2
BMP-1	Bone Morphogenic Factor 1
Bnip 3	Bcl-2 nineteen-kilodalton interacting protein 3
CE	Cholestérol Ester
CCM	Chromatographie sur couche mince
Cdk	Cyclin dependant kinase
CDP	Cytidine diphosphate
CDP-DAG	CDP-diacylglycérol
CDS	CDP-DAG synthase
CHol	Cholestérol
CL	Cardiolipide
CLS1	Cardiolipide synthase 1
COX	Cytochrome c oxydase
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPT1	Cartinine palmetoyltransferase1
CS	Citrate synthase
CT	Comparative cycle threshold
DAG	Diacylglycérol
DGAT	Diacylglycerol acyltransferase
DO	Densité optique
DMD	Musculaire Dystrophie de Duchenne
FABPpm	Plasma membrane- associated fatty acid-bindingprotein
FADH	Flavine adénine dinucléotide
FAS	Fatty acid synthase
FAT/CD36	Fatty acid translocase 36
FATP	Fatty acid transport proteins
FLRG	Follistatin-related-gene
Foxo	Forkhead transcription factor

GASP-1	Growth and differentiation factor-associated serum protéine 1
GLUT4	Glucose membrane tranportor 4
GPAT	Glycérophosphate acyltransférase
GSK-3β	Glycogen sythase kinase-3
hSGT	Human small glutamin-rich tetratricopeptide repeat-containing protein
HSL	Hormone sensitive lipase
IGF	Insulin-like Growth Factor
I-κBα	Inhibitor kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IKKβ	Inhibitor kappa B kinase subunit beta
IKK	Inhibitor kappa B alpha kinase complex
IMF	Intermyofibrillaire
IRS1	Insulin receptor substrate-1
kDa	Kilo Daltons
KO	Knockout
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LDH	Lactate déshydrogénase
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPL	Lipoproteines lipases
MAFbx	Muscle atrophy F-box
MAGT	Monoacylglycerol Acyltransferase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MG	Monoglycérides
mg	Milligrammes
mL	Millilitres
MME	Membrane mitochondriale externe
MMI	Membrane mitochondriale interne
MLCL	Monolysocardiolipide
mstn	Myostatine
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MuRF1	Muscle-specific RING-finger protein 1
Myf5	Myogenic Factor 5
MyHC	Myosin Heavy Chain
MyoD	Myoblast Determination gene
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NF-κB	Nuclear factor kappa-B
PA	Acide phosphatidique
PAP	Phosphatidate phosphohydrolase
Pax3	Paired box gene 3
PC	Phosphotadylcholine
PCR	Polymerisation Chain Reaction
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDK	Pyruvate Dehydrogenase Kinase
PDK1	Phosphoinositide dependent kinase 1
PE	Phosphotadylethanolamine
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α
PGP	Phosphatidylglycérolphosphate
PGS1	Phosphatidylglycérolphosphate synthase
PI	Phosphotadylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4.5 bisphosphate

PPARs	Peroxisome Proliferator Activated Receptors
PS	Phosphotadylsérine
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse transcriptase – polymerase chain reaction
RXR	Retinoid X Receptor
S6K	Ribosomal serine/threonine kinase protein 1/2
SAM	Sorting and assembly machinery
SCD	Stéaroyl-CoA désaturase
SDH	Succinate déshydrogénase
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
SM	Sphingomyeline
TA	Tissu adipeux
Ta	Tibialis anterior
Taz	Taffazine
TG	Triglycérides
TGFβ	Transforming Growth Factor-β
TOM	Translocase of the outer membrane
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
TSC1	Tuberous Sclerosis Complex 1
VLDL	Very low density lipoprotein
VMA	Vitesse maximale aerobie
β-HAD	L-β-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase

Liste des illustrations

Figure 1	Structure du gène de myostatine
Figure 2	Structure de la protéine myostatine
Figure 3	Activation de la protéine myostatine
Figure 4	Transduction du signal de la mstn
Figure 5	Mutations naturelles du gène mstn dans différentes espèces
Figure 6	Modèle de souris KO mstn
Figure 7	Modèles d'inhibition constitutive /KO mstn
Figure 8	Voie signalétique IGF-1/PI3K/AKT
Figure 9	Différentes voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'hypertrophie
Figure 10	Voie de signalisation FoXO
Figure 11	Voie signalétique de NFkB dans deux types d'atrophies
Figure 12	Les différentes voies d'interaction avec la voie de mstn
Figure 13	Rôle de la mstn dans la myogenèse
Figure 14	Métabolisme des fibres musculaires
Figure 15	Transport de l'Acyl-CoA par le carnitine à travers les membranes mitochondriales
Figure 16	Les étapes de la β -oxydation dans le muscle squelettique
Figure 17	Etapes du cycle de Krebs
Figure 18	La phosphorylation oxydative mitochondriale
Figure 19	La glycolyse aérobie
Figure 20	Voie métabolique de la glycolyse anaérobie
Figure 21	Biosynthèse des AG à longues chaînes et des AGMI chez les mammifères
Figure 22	Biosynthèse des AGPI n-3 et n-6 chez les mammifères
Figure 23	La ré-estérification des AG en TG dans le muscle squelettique
Figure 24	Transport des lipides du plasma au milieu intracellulaire
Figure 25	Principales étapes de synthèse de novo des AG
Figure 26	Mécanisme d'action des PPARs
Figure 27	Mécanismes d'action de PGC1 α dans le muscle
Figure 28	Les différentes classes des lipides membranaires
Figure 29	La voie de synthèse de la Sphingomyeline
Figure 30	Les voies de synthèse des phospholipides
Figure 31	Structure chimique et moléculaire du cardiolipide en 3D
Figure 32	Phospholipides membranaires mitochondriaux
Figure 33	La voie de biosynthèse du CL
Figure 34	Implication des CL dans la chaîne respiratoire mitochondriale
Figure 35	Les différentes étapes de la technique de chromatographie sur couche mince
Figure 36	Profil final des différents lipides neutres des échantillons séparés par CCM
Figure 37	Chromatogrammes des lipides neutres séparés et détectés par le scanner
Figure 38	Chromatogrammes des phospholipides séparés et détectés par le scanner
Figure 39	Chromatogrammes des différents acides gras séparés par CPG
Figure 40	Régulation du métabolisme lipidique chez la souris KO mstn
Tableau 1	Les différentes protéines inhibitrices de l'action de mstn
Tableau 2	Typologie et caractéristiques des fibres musculaires
Tableau 3	Les différents types et classes des Acides Gras
Tableau 4	Les différents pourcentages et compositions des gels d'électrophorèses
Tableau 5	Dilutions, référence et utilisation des différents anticorps primaires

- Tableau 6** Préparation du « master mix » pour la rétrotranscription des ARN
- Tableau 7** Différents couples d'amorces correspondants aux gènes d'intérêt
- Tableau 8** Préparation des dépôts de la gamme de lipides neutres
- Tableau 9** Préparation des dépôts de la gamme de phospholipides

Avant-propos

La découverte de la protéine myostatine (mstn) en 1997 a suscité un intérêt grandissant pour la communauté scientifique. En effet, son inhibition ou la suppression de son gène induit un phénotype d'hyper-musculature que ce soit lors de mutations naturelles retrouvées dans plusieurs espèces (bœufs, chien, 1 cas chez l'homme), lors de manipulations génétiques (modèles animaux dont la souris KO mstn, le modèle d'étude) ou d'inhibitions post-natales (administrations d'inhibiteurs ou antagonistes chez l'homme ou l'animal). L'inhibition de la mstn est considérée comme une thérapie prometteuse pour les maladies caractérisées par une perte musculaire, facteur de morbidité et mortalité : myopathies, cancer, maladies chroniques. Les scientifiques vont ensuite s'interroger sur la qualité fonctionnelle, et le métabolisme de ce muscle déficient en mstn. Les études, dont celles du laboratoire, montrent que le tissu déficient en mstn est caractérisé par une atteinte fonctionnelle notamment au niveau de l'endurance, de la résistance à la fatigue associées à un métabolisme glycolytique. Il devient alors important de caractériser au mieux ce phénotype métabolique, afin d'évaluer ensuite des stratégies de correction. En effet, au regard de l'impact hypertrophique de ce traitement, les essais cliniques sont déjà en cours dans le monde.

Les lipides sont des composants fondamentaux pour le muscle de par le rôle énergétique, métabolique ou structural qu'ils exercent. Au début de ces travaux de thèse, des éléments dans la littérature laissaient deviner une atteinte de ce métabolisme dans les modèles d'inhibition de la mstn mais peu de données étaient disponibles. Cette caractérisation du métabolisme du muscle déficient en mstn est utile pour répondre à la problématique suivante : comment remodeler un muscle hypertrophié afin d'en préserver les propriétés oxydatives ? Les travaux du groupe dirigé par Patel montrent dès les années 2010 que le tissu musculaire de la souris KO mstn répond favorablement à l'entraînement en endurance, stimulus physiologique connu pour « booster » le métabolisme aérobie via notamment une amélioration de la voie énergétique liée aux lipides.

Cette revue de littérature dresse dans une première partie le bilan des recherches consacrées à l'étude de la fonction et du métabolisme du muscle déficient en mstn. Elle analyse dans une seconde partie pourquoi le métabolisme lipidique et plus largement le lipidome constitue une hypothèse intéressante des anomalies métaboliques et fonctionnelles observées dans ce tissu. Enfin, la troisième partie introduit un exemple de « stratégie de remodelage métabolique » d'un muscle hypertrophique. Elle développe en effet l'impact de l'entraînement de l'endurance sur le muscle squelettique, et notamment sur le métabolisme lipidique, avec une synthèse des études associées au modèle KO mstn.

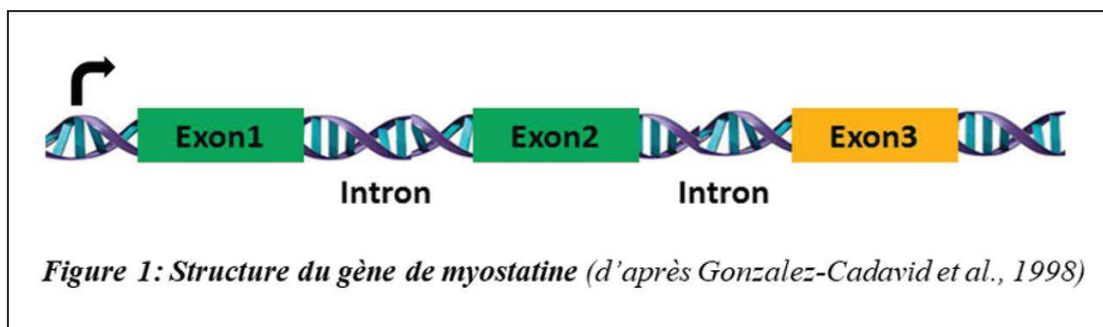
A-Revue de Littérature

I Paradoxe du tissu musculaire déficient en myostatine

Myostatine (mstn), membre de la famille des TGF β (Transforming Growth Factor- β), a été initialement identifié comme un régulateur négatif de la masse musculaire. Des mutations de ce facteur sont associées à un phénotype hypertrophié chez les souris, les bovins, les chiens, les ovins, mais aussi chez l'homme (Clop et al., 2006; Grobet et al., 1997; McPherron et al., 1997a; McPherron & Lee, 1997b; Mosher et al., 2007; Schuelke et al., 2004). Des études ont exploré les effets de l'inhibition de mstn chez l'adulte et, en accord avec les études génétiques, ont confirmé une induction de l'hypertrophie musculaire lorsque la voie mstn est bloquée (Bogdanovich et al., 2002; Grobet et al., 2003). Depuis l'inhibition de la mstn est considérée comme une thérapie prometteuse dans diverses situations pathologiques affectant le tissu musculaire.

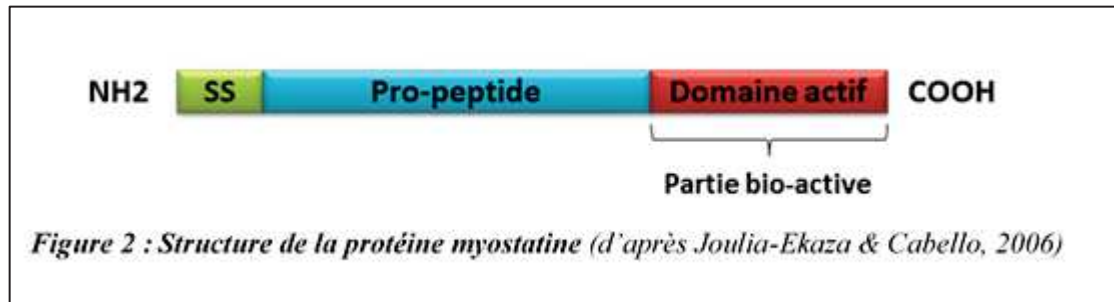
I-1 Le gène myostatine et sa structure protéique :

Le gène de la mstn est localisé sur le chromosome 2 chez l'homme et le bovin, sur le chromosome 1 chez la souris, sur le chromosome 15 chez le porc, sur le chromosome 7 chez le poulet et sur les chromosome 9 et 22 chez le zebrafish (Gonzalez-Cadavid et al., 1998, Grobet et al., 1997, Szabo et al., 1998, Sonstegard et al., 1998, Sazanov et al., 1999, Xu et al., 2003). Il comprend trois exons et deux introns avec une longueur totale de 7.8 kb alors que son ARNm est de 3.1 kb codant une protéine constituée de 375 acides aminés (Gonzalez-Cadavid et al., 1998) (Figure1). Le début de l'exon 1 code pour le peptide signal de la protéine. La fin de l'exon 1, l'exon 2 et le début de l'exon 3 codent pour le pro-domaine de la protéine. La majeure partie restante de l'exon3 code pour le domaine actif de la protéine (Gonzalez-Cadavid et al., 1998).

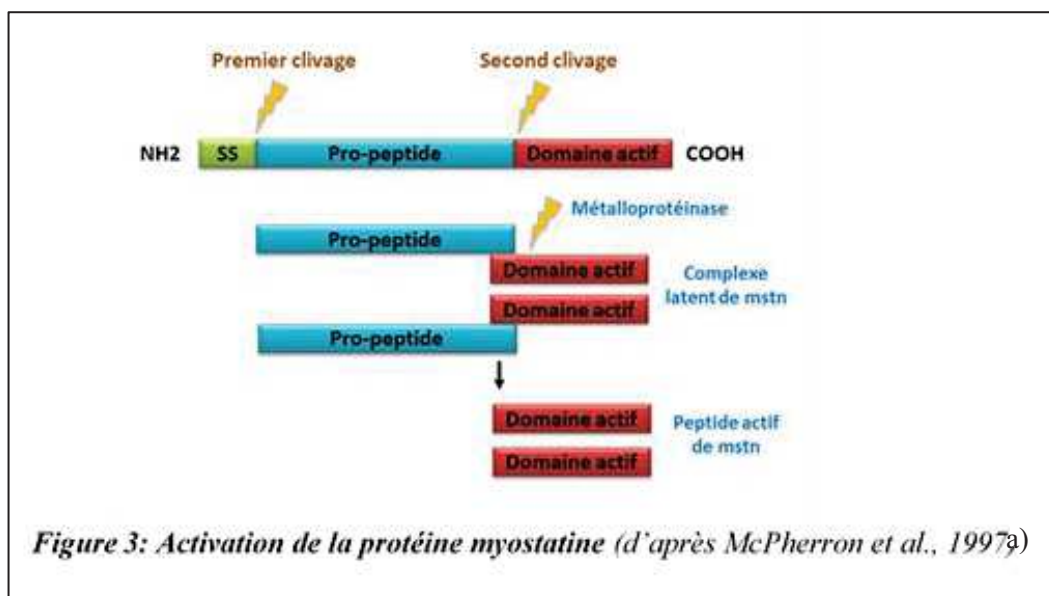


La protéine mstn est synthétisée sous forme de précurseur inactif avec un poids moléculaire de 52 kDa (McPherron et al., 1997a). Elle comporte trois parties principales. La première partie est une courte séquence signal amino-terminale pour la sécrétion. La seconde

partie contient le propeptide représentant 70% de la protéine totale non mature (site N-terminal inactif). Enfin, la troisième partie comprend une région carboxy-terminale codée par l'exon 3 et qui constitue la région bioactive de la protéine (site C-terminal actif). La dimérisation de ce fragment C-terminal par un pont disulfure forme la molécule active/mature (McPherron et al., 1997a) (Figure2).



La séquence de cette protéine est très conservée parmi les espèces. En effet, les séquences murine, humaine et porcine présentent 100% d'homologie dans la région carboxy-terminale (McPherron et al., 1997a). Pour activer la forme précurseur de mstn, plusieurs étapes de maturation sont nécessaires. Un premier clivage a lieu au niveau du réticulum endoplasmique pour éliminer le peptide signal et un deuxième au niveau de l'appareil de Golgi qui sépare le pro-peptide (N-terminal) de la région carboxy-terminale (C-terminal) bioactive. Suite à ces clivages, le domaine pro-peptide et le domaine C-terminal restent associés de façon non covalente et forment un complexe latent. Enfin, une dégradation protéolytique du pro-peptide (26 kDa) par des métalloprotéases libère finalement le peptide actif (12.5 kDa) (Wolfman et al., 2003) (Figure3).



La mstn agit sur la cellule via les récepteurs Activin Receptor type IIB (ActRIIB) et ActRIIA. Le domaine actif C-terminal sous forme de dimère de mstn se lie avec une grande affinité au récepteur de type ActRIIB et avec moins d'affinité au ActRIIA (Lee et al., 2001, Rebbapragada et al., 2003). Après cette liaison, l'initiation des signaux commence en activant par phosphorylation le récepteur de type I appelé ALK (Activin like kinase) ou ALK5. L'activation du récepteur I induit ensuite une phosphorylation activatrice de Smad2/3 qui se lie avec Smad4. Le complexe Smad2/3-Smad4 fonctionne alors comme un médiateur intracellulaire clé dans la signalisation de mstn. En entrant dans le noyau, il interagit avec des cofacteurs régulant l'expression des gènes cibles d'atrophie musculaire (Zhu et al., 2004). Un autre membre de la famille Smad, Smad7, intervient pour abroger la signalisation de mstn par un rétrocontrôle (Zhu et al., 2004). En effet, Smad7 inhibe, la phosphorylation de Smad2/3 par ALK et interfère pendant la formation du complexe Smad2/3-Smad4, le tout bloquant la transcription du gène mstn (Zhu et al., 2004, Forbes et al., 2006) (Figure 4).

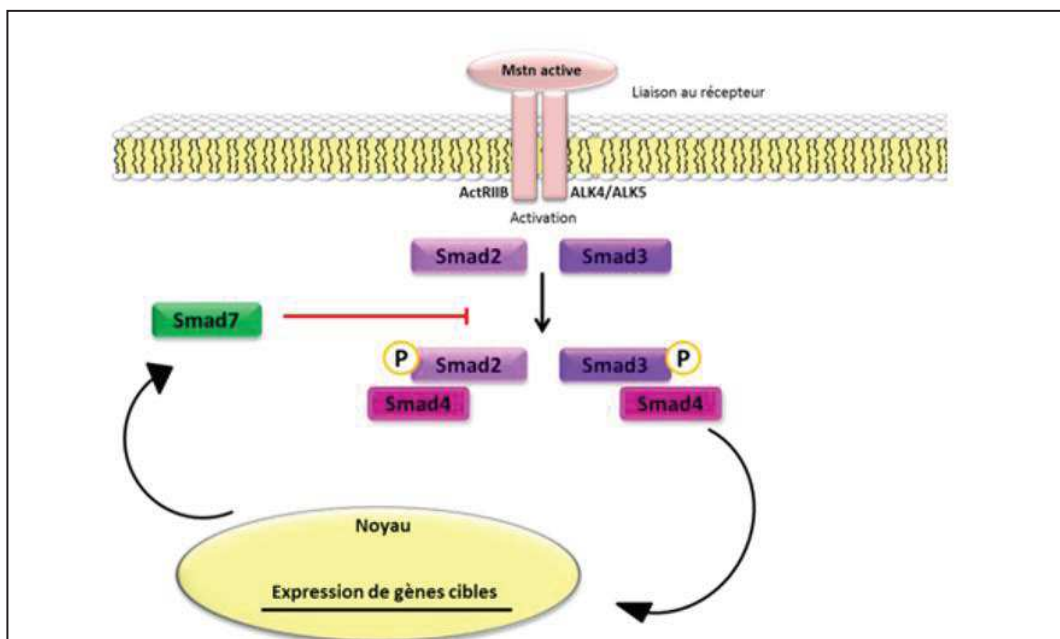


Figure 4 : Transduction du signal de la mstn (d'après revue Marcotte et al., 2015)

Une fois la mstn est liée aux récepteurs Activin Receptor type IIB (ActRIIB), elle active par phosphorylation le récepteur de type I appelé ALK (Activin like kinase) ou ALK5. L'activation du récepteur I induit ensuite une phosphorylation activatrice de Smad2/3 qui se lie avec Smad4. Le complexe Smad2/3-Smad4 rentre ensuite dans le noyau et interagit avec des cofacteurs régulant l'expression des gènes cibles d'atrophie musculaire. Smad7, intervient pour abroger la signalisation de mstn par un rétrocontrôle en inhibant la phosphorylation de Smad2/3 par ALK et interfère pendant la formation du complexe Smad2/3-Smad4.

En résumé

- ◆ **La mstn est un membre de la famille TGF β , considérée comme un régulateur négatif de la masse musculaire, dont le gène est conservé entre les différentes espèces.**
- ◆ **A partir de la forme précurseur de mstn, plusieurs étapes de maturation sont nécessaires, dont l'élimination du pro-peptide (N-terminal), permettant la libération de la partie active de la mstn (C-terminal).**
- ◆ **La voie d'action principale de la mstn implique les récepteurs cellulaires ActRIIB. Une fois liée à ces derniers, mstn active par phosphorylation le complexe SMAD 2/3/4 qui déclenche ainsi la transcription des gènes atrophiques dans le muscle squelettique.**

I.2 Inhiber la myostatine, un modèle d'hypertrophie musculaire

I.2.1 Les mutations naturelles

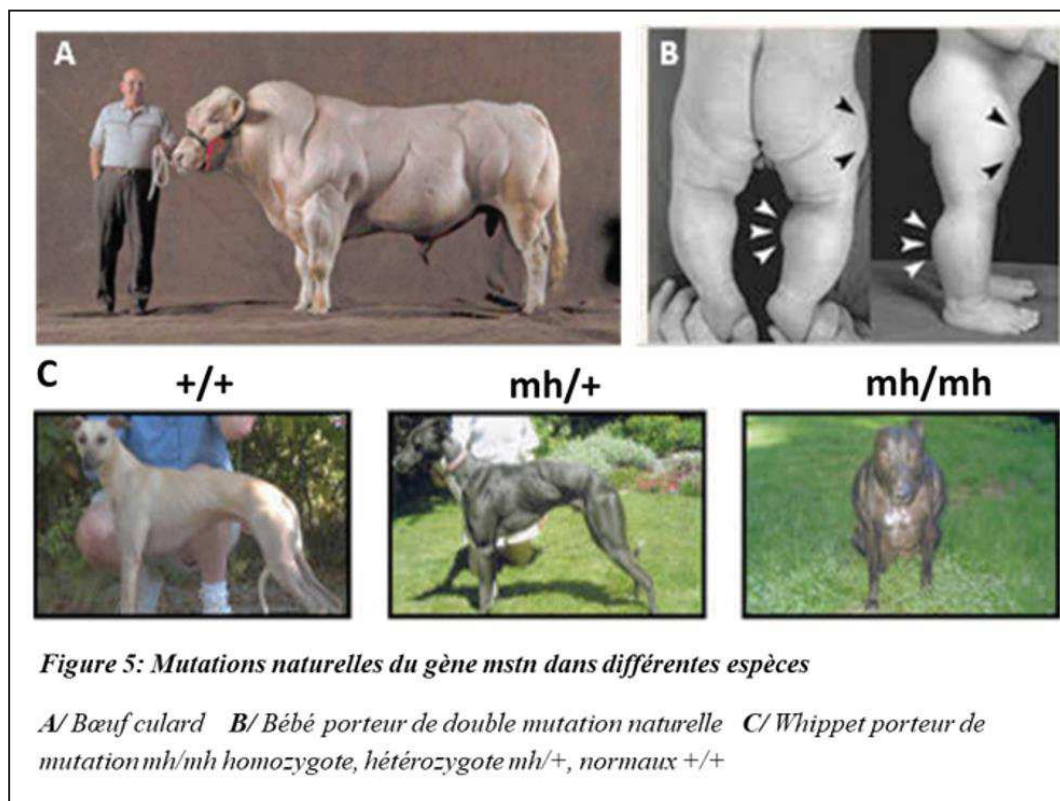
Des mutations « perte de fonction » ont été décrites chez les bovins (Grobet et al., 1997, Kambadur et al., 1997, McPherron & Lee, 1997b), la souris (Szabo et al., 1998) et plus récemment chez l'homme (Schuelke et al., 2004) et le chien (Mosher et al., 2007).

Les premières formes de mutations naturelles ont été découvertes chez les bovins, et notamment au niveau de la race bovine dite Blanc Bleu Belge. La plus connue consiste en une déplétion de 11 paires de base sur l'exon 3 du gène mstn ce qui entraîne la perte de fonction de la protéine (mutation (nt821(del11)) (Grobet et al., 1997, Kambadur et al., 1997, McPherron & Lee, 1997b) (Figure 5A). Des mutations ponctuelles au niveau des acides aminés ont été également rapportées, comme un remplacement de phénylalanine par un résidu de leucine, ou encore celle décrite par Berry et al, un remplacement d'une tyrosine par une cystéine, qui entraîne la perte d'une partie de la région C-terminal, empêchant l'acquisition de sa conformation active (mutation C313Y) (Berry et al., 2002). D'autres mutations ont été également identifiées perturbant le propeptide ou le domaine C-terminal et arrêtant la maturation de la protéine mstn (mutations nt419, Q204X, E226X, E291X) (Grobet et al., 1998, Karim et al., 2000, revue Joulia-Ekaza & Cabello, 2006).

Une délétion dans le gène mstn a été également identifiée dans d'autres espèces animales comme la souris « Compact » sélectionnées pour leur masse musculaire importante et leur haute teneur en protéines (Szabo et al., 1998). L'étude de Mosher en 2007 a montré également qu'une mutation naturelle du gène mstn (mh/mh) chez les chiens de race « Whippet » (Figure 5C) conduit à une hypermusculature. La mutation consiste ici en une délétion de 2

paires de bases dans l'exon 3 conduisant à un codon stop. De manière intéressante, les chiens hétérozygotes qui possèdent une déplétion d'une seule paire de base présentent des performances physiques en terme de vitesse de course augmentées par rapport aux chiens homozygotes ou normaux (Mosher et al., 2007) (Figure 5C). Enfin, d'autres mutations naturelles ont été retrouvées aussi chez le porc et le mouton (Stinckens et al. 2005, Clop et al., 2006).

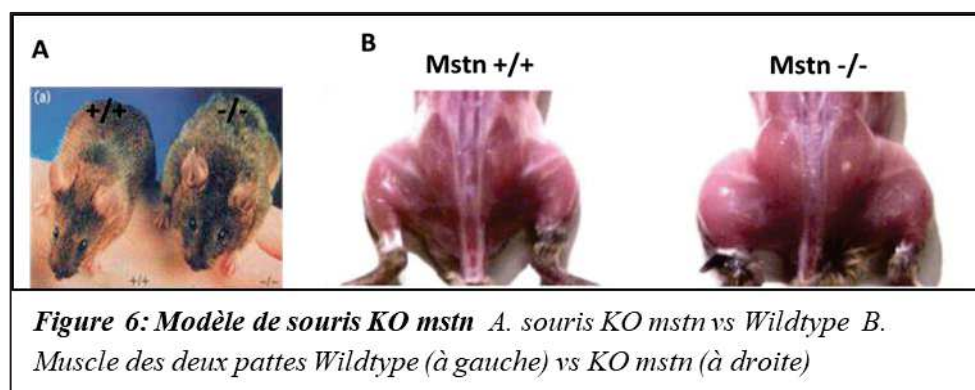
Chez l'homme, une mutation naturelle du gène *mstn*, qui correspond à une transition d'un nucléotide dans le premier intron du gène, a été découverte également chez un bébé allemand par l'équipe de Schuelke et al (Figure 5B). Cet enfant a présenté un développement musculaire visiblement important qui a attiré l'attention des médecins (Schuelke et al., 2004).



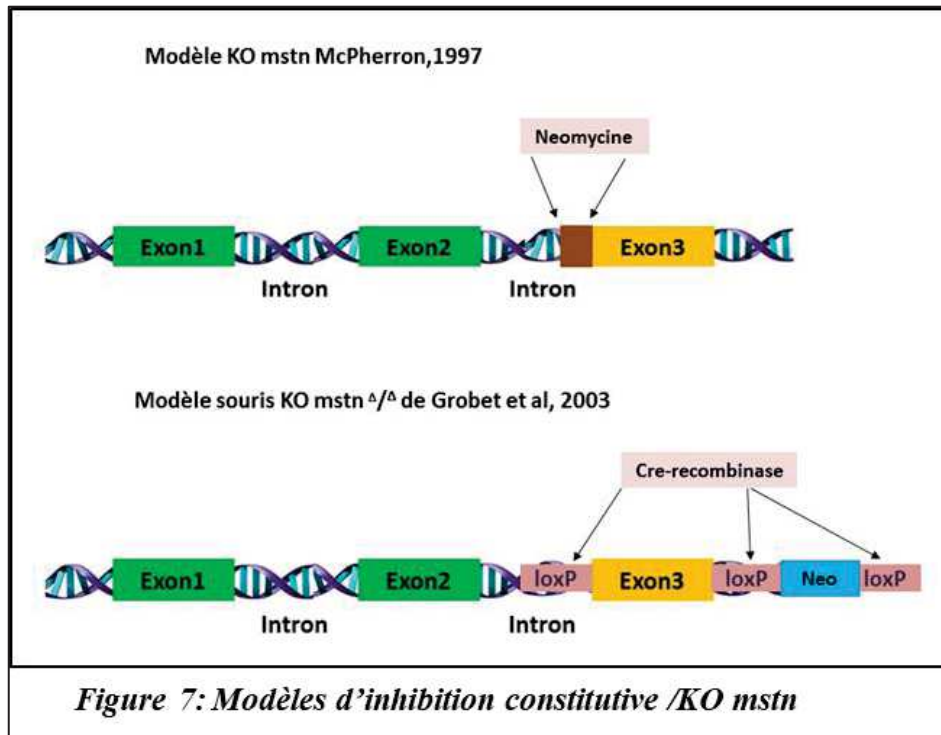
I.2.2 Les modèles génétiques de déficience en *mstn*

Le modèle de souris KO *mstn* développé par l'équipe de Mc Pherron en 1997, présente une inactivation constitutive du gène *mstn* par la suppression d'une région de l'Exon 3 codant pour le domaine C-terminal bioactif de la protéine et son remplacement par une néo-cassette, dans des cellules souches embryonnaires de souris. Ce modèle se caractérise par une hypermusculature due à la fois à une hyperplasie (augmentation du nombre de fibres) et une hypertrophie (augmentation de la taille des fibres) (McPherron et al., 1997a) (Figures 6-7).

Quelques années plus tard, cette même équipe a généré trois modèles de souris transgéniques qui sur-expriment le propeptide de *mstn*, la follistatine ou le dominant négatif des récepteurs ActRIIb, stratégies bloquant l'action de la *mstn*. Chaque lignée présente une augmentation spectaculaire de la masse musculaire surtout chez les souris sur-exprimant follistatine (Lee & McPherron, 2001). Un phénotype comparable a été observé sur des souris transgéniques sur-exprimant GASP-1 (Growth and differentiation factor-associated serum protein 1), protéine se liant à la *mstn* active ou directement également à son propeptide en l'absence du dimère C-terminal (Monestier et al., 2012). Exprimée dans le muscle squelettique, elle contient également un site de fixation de follistatin ainsi que des domaines inhibiteurs de protéase (Hill et al., 2003). De manière intéressante, les souris sur-exprimant *Gasp1* présentent l'hypertrophie, caractéristique de la déficience génétique en *mstn*, mais sans le changement phénotypique comme celui qui a été observé chez les souris KO *mstn* (shift glycolytique) (Monestier et al., 2012). Enfin, lorsque la sur-expression de la follistatine est combinée à une mutation de déplétion de *mstn* chez des souris transgéniques, les deux phénotypes se combinent et s'additionnent pour donner un phénotype hypermusclé quadruplé (4 fois les contrôles) (Lee 2007).



De façon intéressante, l'inactivation post-natale de la *mstn* est suffisante pour induire une hypertrophie musculaire sans hyperplasie (Grobet et al., 2003). Cette étude montre la possibilité d'inactiver et/ou inhiber la *mstn* en phase adulte, et donc de considérer les stratégies d'inhibition de la *mstn* comme des thérapies potentielles de lutte contre la perte de masse musculaire (Grobet et al., 2003) (Figure 7).



D'autres modèles d'animaux KO mstn ont ensuite été développés pour explorer les mécanismes de la déficience en mstn sur le tissu musculaire. Le génome de rat a ainsi été modifié par l'équipe de Mendias via une injection de « zinc finger nuclease » dans les embryons du rat permettant de déléter une partie de l'exon 2 de mstn (16 pb) responsable de la formation du pro-peptide perturbant la production d'une protéine mstn fonctionnelle (Mendias et al., 2015). Ce n'est pas réellement un modèle KO puisque la concentration sanguine de mstn chute fortement mais reste à 14%. Mais ce modèle a le mérite d'avoir été développé chez le rat, où une augmentation de 20% de la masse musculaire est également observée (Mendias et al., 2015). Récemment, des cochons KO mstn ont été générés à l'aide de la technique « Talen » : ciseaux d'ADN et « zinc finger nuclease ». Ces animaux présentent également une augmentation de la masse musculaire importante (170%) due à une hyperplasie et une diminution importante du tissu adipeux (Rao et al., 2015, Qian et al., 2015).

Enfin, les techniques actuelles de modification génétiques via le système CRISPR/Cas9 ont permis de générer des mutations ciblées sur le facteur mstn entraînant ainsi une augmentation importante de la masse musculaire chez des espèces d'intérêt agronomique comme les lapins et les moutons (Lv et al., 2016, Crispo et al., 2015).

I.2.3 Les stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition de mstn

La forme circulante de mstn est inactive jusqu'à son arrivée à son récepteur membranaire spécifique (ActRIIB). Il existe actuellement plusieurs stratégies pour bloquer l'effet de mstn : piéger la mstn active par des anticorps ou les RNA interférents, inactiver la mstn par un propeptide synthétique, augmenter l'expression des inhibiteurs naturels de mstn ou bloquer ses récepteurs (Tsuchida et al., 2008).

Anticorps anti-mstn et RNA interférents

Les premiers essais cliniques ont été lancés en 2005 par le laboratoire américain Wyeth pour bloquer la mstn via des anticorps anti-mstn chez des patients atteints des myopathies de Becker, de dystrophie facio-scapulo-humérale et myopathie de ceinture avec un anticorps synthétique appelé MYO-029 (Saitoh et al., 2017 revue). D'autres essais cliniques sont toujours en cours avec des nouveaux anticorps. Les premiers résultats sur l'homme ne sont pas miraculeux car l'augmentation de la masse musculaire chez les sujets sains et malades ne s'accompagne pas d'amélioration de la fonction et de la force musculaire. Cependant, dans le même temps, le traitement des souris mdx (modèle représentatif de la dystrophie de Duchenne) avec des anticorps mstn induit une augmentation de la masse musculaire et améliore la fonction musculaire (Bogdanovich et al., 2002, Whittmore et al., 2003). Des résultats positifs comparables ont été retrouvés aussi chez d'autres modèles animaux de cachexie ou de sarcopénie, traités par des anticorps anti-mstn (Murphy et al., 2010; 2011). Enfin, l'administration des RNA interférents avec la mstn peut être réalisée localement par injection dans le muscle ou par voie sanguine. Un traitement de plusieurs semaines induit également une augmentation de la masse musculaire (Kinouchi et al., 2008).

Traitement via le propeptide

Comme on a vu précédemment, la mstn est sécrétée sous forme latente liée à son propeptide. Il est alors impossible pour la mstn de se lier à son récepteur. Les travaux réalisés sur le modèle de souris mdx ont montré que le traitement par le propeptide atténue la dystrophie musculaire en améliorant la performance et la croissance musculaire de ses animaux (Bogdanovich et al., 2005). En parallèle, une augmentation de la masse et de la force a été retrouvée chez des souris sur-exprimant le propeptide (AAV-mediated) (Bogdanovich et al., 2002, Morine et al., 2010, Bish et al., 2011). Également, une augmentation de la masse musculaire a été rapportée chez des souris injectées avec une forme mutante du propeptide résistant au

clivage par les protéinases BMP-1/TLD (Bone morphogenetic protein-1/tolloid) membre de la famille des metalloprotéinases (Wolfman et al., 2003).

Inhibiteurs naturels de mstn

Outre le propeptide, plusieurs protéines sont connues pour exercer une action inhibitrice sur la mstn en inhibant soit sa sécrétion, soit son activation. On distingue deux types de protéines selon leur milieu d'action; molécules liant la mstn dans le sérum ou molécules liant la mstn dans le muscle. Le Tableau 1 résume la plupart de ces inhibiteurs.

La protéine FLRG (Follistatin related gene) est capable de se lier à la mstn dans le sérum et de l'inactiver. C'est un homologue structural des follistatines capable de bloquer l'activité des TGF β (Tsuchida et al., 2000). Une fois la signalisation des TGF β activée, les Smad phosphorylés se lient au promoteur FLRG en entraînant sa sécrétion (Bartholin et al., 2002). Suite à un feedback, la protéine FLRG forme alors un complexe avec la mstn et empêche sa liaison à son récepteur. *In vitro*, elle se lie sur la partie active de la mstn pour empêcher sa fixation sur son récepteur (Hill et al., 2002).

La follistatine est une protéine antagoniste à plusieurs membres de la famille des TGF β notamment la mstn. La follistatine produite dans le muscle est maintenue dans la matrice extracellulaire où elle piège et séquestre la mstn, empêchant sa libération dans le sérum (Sugino et al., 1993). Les souris KO follistatine présentent généralement un retard de croissance, une diminution de la masse musculaire et des difficultés respiratoires (Matzuk et al., 1995), tandis que les souris surexprimant la follistatine montrent une augmentation de la masse musculaire comparable à celle observée chez les souris KO mstn (Amthor et al., 2004). Chez l'humain, l'injection locale de follistatine dans le muscle quadriceps chez des patients de la myopathie de Becker a montré une amélioration au niveau de la performance de marche accompagnée d'une hypertrophie musculaire et d'une diminution de la fibrose (Mendell et al., 2015).

La protéine hSGT (human small glutamin-rich tetratricopeptide repeat-containing protein) joue un rôle important dans la régulation de l'activité et de la sécrétion de la mstn avec une interaction directe avec son peptide signal dans le muscle squelettique (Wang et al., 2003).

Titin-cap est une protéine qui se trouve dans le sarcomère et capable de se lier au mstn mature pour éviter la formation du complexe latent ce qui inhibe son activité (Nicholas et al., 2002).

Enfin, *la décorine* est un petit protéoglycan riche en leucine et présent dans la matrice extracellulaire. Elle est capable de se lier au membres de famille TGF- β et réguler leurs activités (Riquelme et al., 2001). En présence de zinc, la décorine interagit avec le peptide actif de *mstn* pour la bloquer et la garder loin de son récepteur (Miura et al., 2006).

Tableau 1 : Les différentes protéines inhibitrices de l'action de *mstn*

Localisation	Molécule de liaison	Lieu de liaison	Conséquence	Références
Sérum	Propeptide	Mstn mature	Inhibition de la liaison de <i>mstn</i> sur son récepteur	Thies et al., 2001
	FLRG	Mstn mature	Inhibition de la liaison de <i>mstn</i> sur son récepteur	Hill et al., 2002
	GASP1	Mstn mature et propeptide	Inhibition de l'activation de <i>mstn</i>	Hill et al., 2003
Muscle squelettique	Follistatine	Mstn mature	Inhibition de la liaison de <i>mstn</i> sur son récepteur	Amthor et al., 2004
	hSGT	Mstn mature	Inhibition de la sécrétion et l'activation de <i>mstn</i>	Wang et al., 2003
	Titin-cap	Mstn mature	Inhibition de complexe latent formation/sécrétion de <i>mstn</i>	Nicholas et al., 2002
	Décorine	Mstn mature	Inhibition de la liaison de <i>mstn</i> sur son récepteur	Miura et al., 2006

Inhibition des activin récepteurs IIB de *mstn* :

Des récepteurs solubles, ActRIIB-Fc, ont été développés afin de piéger le ligand, et donc de réduire la fixation de la *mstn* sur son récepteur membranaire (Relizani et al, 2014). Il a été démontré que des injections avec ActRIIB-Fc améliorent la fonction musculaire en augmentant à la fois la masse et la force musculaire dans différents modèles de myopathies (souris *mdx*, modèle des rongeurs avec atrophie musculaire ou immobilisation locale) (Puolakkainen et al., 2017, Liu et al., 2016, Morrison et al, 2009, Lawlor et al., 2011). De même, chez des modèles animaux de cachexie, l'inhibition de la voie *mstn*/ActRIIB protège les muscles de l'atrophie et augmente leur espérance de vie (Hatakeyama et al., 2016, Zhou et al., 2010). Récemment, Campbell et ses collaborateurs ont montré que le traitement par l'administration d'ACE-03 (une protéine synthétisée qui se lie à la *mstn* et empêche sa fixation sur les récepteurs de type IIB) aux patients atteints de DMD a amélioré la performance de test de marche de 6 minutes (6MWT) dans les groupes traités par rapport au groupe placebo avec une tendance d'augmentation de la masse musculaire et de la densité minérale osseuse (Campbell et al., 2017).

En résumé

◆ L'inactivation de mstn est possible par des méthodes variées, générant de nombreux modèles animaux, dont la souris KO mstn, qui présentent tous un phénotype d'hypertrophie musculaire.

◆ Des stratégies thérapeutiques ont été validées dans des essais précliniques basées sur le blocage de la mstn active soit par des anticorps anti-mstn, par des RNA interférents, par la sur-expression de son pro-peptide ou les inhibiteurs naturels, et en bloquant ses récepteurs cellulaires.

I.3 Impact sur l'homéostasie protéique

Les données de la littérature établissent une corrélation inverse entre l'expression de la mstn et la croissance musculaire.

1.3.1 Rappels sur la régulation de la masse musculaire

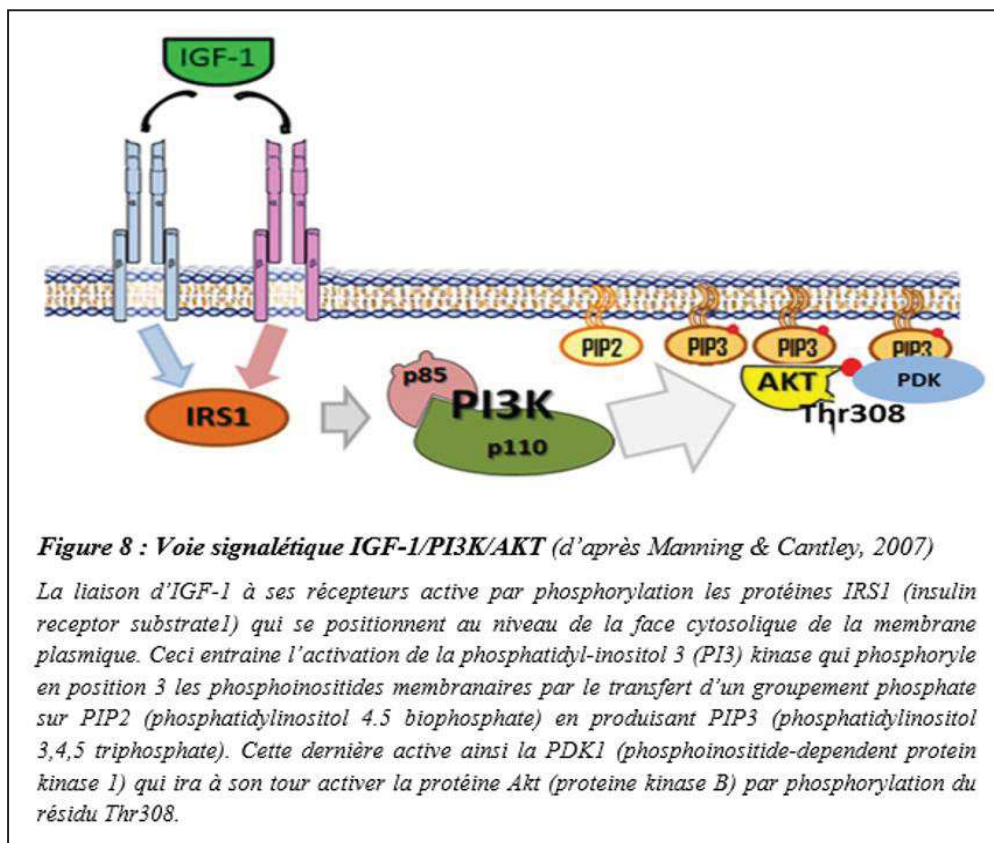
La régulation de la masse musculaire est essentielle à l'homéostasie de l'organisme en lui permettant de s'adapter et de résister aux variations des conditions environnementales. Deux processus sont impliqués dans la croissance musculaire : - la prolifération et la fusion des cellules satellites conduisant à l'accrétion de nouveaux noyaux au sein de la fibre musculaire, - la synthèse protéique participant à l'augmentation du volume musculaire.

◆ L'hypertrophie musculaire

L'hypertrophie musculaire est un gain de masse musculaire caractérisée par une augmentation de la taille (hypertrophie) et/ou le nombre des fibres (hyperplasie) musculaires. La production de nouvelles protéines (synthèse protéique) et la dégradation de protéines existantes (protéolyse) est un équilibre délicat nommé balance protéique, qui selon les conditions physiologiques ou physiopathologiques, peut induire la croissance musculaire (hypertrophie) ou la perte de muscle (atrophie).

De manière non explicite, nous développerons la principale voie responsable de la synthèse protéique, la voie IGF-1/Akt/mTOR (Figure 6). En effet, l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) est un facteur de croissance sécrété par le foie grâce à la stimulation de l'hormone de croissance. Il est impliqué dans le processus d'hypertrophie et l'augmentation de la synthèse protéique en activant la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) /Akt (proteine kinase B) et ses cibles en aval mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), S6K1 (ribosomal serine/threonine kinase protein 1/2) (Bodine et al., 2001, Lai et al., 2004). L'insuline et l'IGF1

jouent un rôle anabolisant important dans le muscle squelettique. Au niveau signalétique, IGF-1 se lie à son récepteur IGF1R qui permet la phosphorylation du récepteur nécessaire pour le recrutement de son substrat IRS1 (insulin receptor substrate-1) (Sun et al., 1991). Ceci stimule PI3K qui catalyse le transfert d'un groupement phosphate sur PIP2 (phosphatidylinositol 4.5 bisphosphate) pour produire PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate) (Cantley 2002). La PIP3 va à la suite activer PDK-1 (phosphoinositide dependant kinase 1) qui ira à son tour activer la protéine Akt par phosphorylation du résidu Thr308 (Figure 8) (Alessi et al., 1997). Les souris déficientes en IGF1R présentent une perte de masse musculaire modérée (O'neill and al., 2015).



L'activation d'Akt est suffisante pour induire une augmentation de la taille du muscle squelettique. Chez les souris transgéniques surexprimant une forme active d'Akt le phénomène d'hypertrophie est rapidement observé dans leurs muscles (Izumiya et al., 2008). Cette dernière se produit via une augmentation marquée de la taille des fibres et une activation des voies de synthèse protéique (Lai et al., 2004). Egalement, l'activité d'Akt augmente dans plusieurs modèles d'hypertrophie du muscle squelettique, tels que l'inhibition de mstn, l'entraînement physique...) (Morissette et al., 2009, Bacurau et al., 2016, Agergaard et al., 2017). Inversement, des souris dont le gène Akt a été inactivé présentent un retard de croissance et une atrophie musculaire (Yang et al., 2004).

La cible en aval d'Akt est mTORC1. Akt, en phosphorylant la protéine TSC1 (Tuberous Sclerosis complex 1), empêche la formation de complexes inhibiteurs TSC1 / TSC2 / mTORC1 et conduit à l'accumulation de complexes TORC1 activés libres (Figure 9). mTORC1 est donc un régulateur important de l'initiation de la traduction (Hay & Sonenberg, 2004, Ma & Blenis, 2009, Tee & Blenis, 2005). Il active par phosphorylation la protéine ribosomale S6K1 impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm en protéines et inhibe 4EBP-1 (eIF4E-binding protein1), un régulateur négatif de l'initiation à la traduction (Goodman., 2014, Peterson et al., 1999) (Figure 9). mTORC1 est activé par des facteurs de croissance via la voie Akt. Il est aussi activé par la disponibilité en acides aminés indépendamment de TSC2. Des souris déficientes en mTORC1 présentent une diminution de la masse musculaire et des signes de dystrophie musculaire (Risson et al., 2009). La déplétion de la S6K1 entraîne également une réduction de la masse musculaire jusqu'à l'atrophie (Ohanna et al., 2005). Cependant une sur-expression de la S6K1 est suffisante pour induire l'hypertrophie (Rommel et al., 2001).

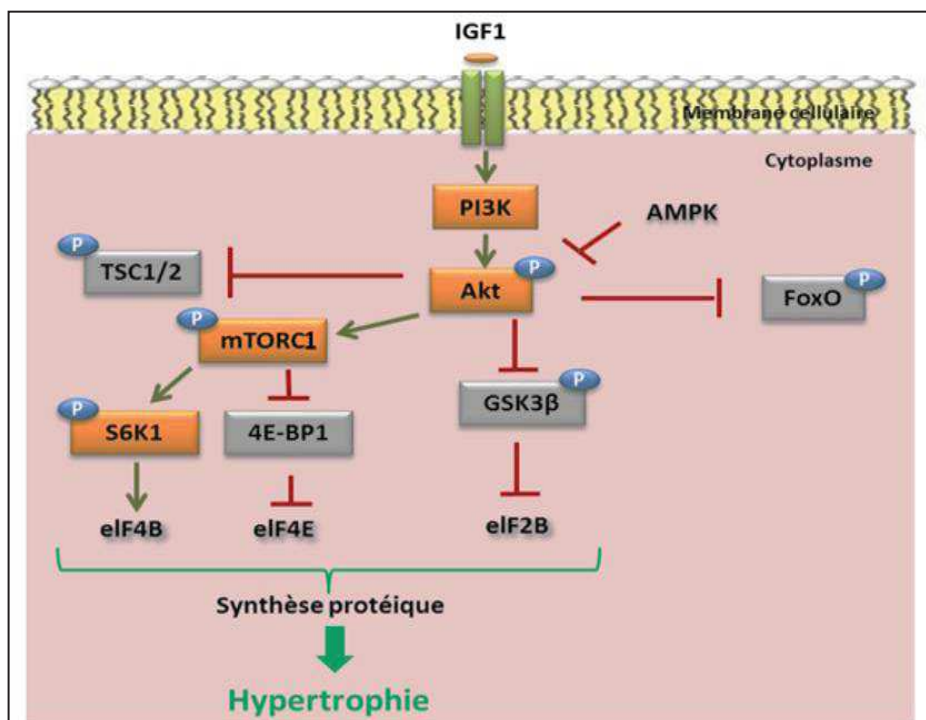


Figure 9: Différentes voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'hypertrophie (d'après Schiaffino et al., 2013).

Akt active mTORC et inhibe, en phosphorylant la protéine TSC1, la formation de complexes inhibiteurs TSC1 / TSC2 / mTORC1. Ainsi, mTORC1 active par phosphorylation la protéine ribosomale S6K1 (ribosomal serine/threonine kinase protein 1/2) impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm en protéines et inhibe 4EBP-1 (eIF4E-binding protein1), un régulateur négatif de l'initiation à la traduction. Akt phosphoryle FoxO (Forkhead box O) pour le maintenir dans le cytoplasme et éviter son entrée dans le noyau qui déclenche son activité transcriptionnelle des gènes impliqués dans la protéolyse. Akt inhibe aussi la protéine GSK3β (kinase glycogène synthase kinase 3β) impliquée dans la protéolyse à travers eIF2B (translation initiation factor 2B).

◆ L'atrophie musculaire

Elle se définit comme la perte de la masse musculaire induite par un déséquilibre de la balance protéique vers la protéolyse. Elle est caractérisée par une réduction de la force motrice, et par une diminution du diamètre et du contenu protéique des myofibrilles (pour revues, Jackman & Kandarian, 2004 ; Franch & Price, 2005). Elle survient suite à une absence ou réduction d'activité contractile rencontrée dans de nombreuses situations, pathologiques (cancer, diabète, SIDA, myopathies, ...) ou non-pathologiques (sédentarité, alitement clinique, immobilisation, vieillissement, séjour dans l'espace...) (Lee et al., 2017, Lecker et al., 2006, Baracos 2001, Haddad et al., 2003, Thomason & Booth 1990, Deschenes 2004). De même, de nombreux facteurs déclenchent l'atrophie musculaire tels les cytokines, les glucocorticoïdes, le stress oxydant, l'hypoxie (Argile & Lopez-Soriano, 1999, Howald & Hoppeler, 2003). En effet, au cours de l'atrophie musculaire, l'équilibre entre synthèse et dégradation des protéines, qui régit normalement l'homéostasie musculaire, est déplacé vers un catabolisme protéique important. Au niveau moléculaire la protéolyse musculaire est contrôlée par différentes voies de signalisation : la voie Foxo, la voie NF- κ B, l'apoptose et le stress oxydant.

La voie FoxO

Les données de la littérature illustrent le rôle direct des facteurs de transcription Forkhead box O (FoxO) dans le processus d'atrophie musculaire, et notamment FoxO1 et FoxO3 (Kamei et al., 2004, Lecker et al., 2004, Giresi et al., 2005). Présents dans le cytoplasme, leur déphosphorylation permet leur transfert dans le noyau où ils agissent comme activateurs de la transcription de gènes impliqués dans la protéolyse (Calnan & Brunet., 2008). Les gènes codant pour les ubiquitine ligases MAFbx/atrogin1 (muscle atrophy F-box/atrogin1) et MURF1 (Muscle RING finger 1) sont des gènes cibles de FoxO1 et FoxO3 (Waddell et al., 2008, Sandri et al., 2004). Il a été rapporté que FoxO3 contrôle aussi la transcription des gènes LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) et Bnip3 (Bcl-2 nineteen-kilodalton interacting protein 3) impliqués dans la protéolyse lysosomale (Mammucari et al., 2007). Des souris transgéniques sur-exprimant FoxO3 ou FoxO1 montrent une remarquable diminution de la masse musculaire avec une réduction de taille des fibres (Sandri et al., 2004, Kamei et al., 2004, Southgate et al., 2007). Au contraire, l'inhibition de FoxO protège le muscle de l'atrophie (Mammucari et al., 2008, Liu et al., 2007). Ces données illustrent le rôle direct des facteurs de transcription FoxO dans le processus d'atrophie musculaire en activant la protéolyse via le système ubiquitine-protéasome et le système des lysosomes.

L'activité des FoxO peut être modulée d'une manière directe ou indirecte par différentes voies de régulation (Figure 10). La protéine kinase Akt est au carrefour des voies signalétiques intégrant des signaux anaboliques (Akt/mTORC voir ci-dessus) et d'autre part des signaux cataboliques (Akt/FoxO) (Stitt et al., 2004, Southgate et al., 2007, Sandri et al., 2004). En réponse à l'insuline ou aux facteurs de croissance, Akt est activée, elle phosphoryle directement FoxO, maintenant ainsi ce facteur de transcription dans le cytoplasme, empêchant son action. Lorsque Akt est inactive (absence de facteurs de croissance) FoxO est déphosphorylé et transloque vers le noyau déclenchant son activité de transcription. Des travaux ont montré que FoxO3 interagit avec d'autres facteurs de transcription tels que PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α), un cofacteur critique dans la biogenèse mitochondriale (Puigserver et al. 2003a). La sur-expression de PGC-1 α dans des conditions cataboliques protège le muscle contre la perte de la masse musculaire en inhibant FoxO3 (Sandri et al., 2006, Geng et al., 2011). Le même effet a été observé en surexprimant son homologue PGC-1 β dans des myotubes (Brault et al., 2010). Ainsi, ces deux facteurs induisent la croissance des myotubes et inhibent l'atrophie des muscles adultes par le ralentissement de la dégradation des protéines et l'inhibition de FoxO3 (Brault et al., 2010).

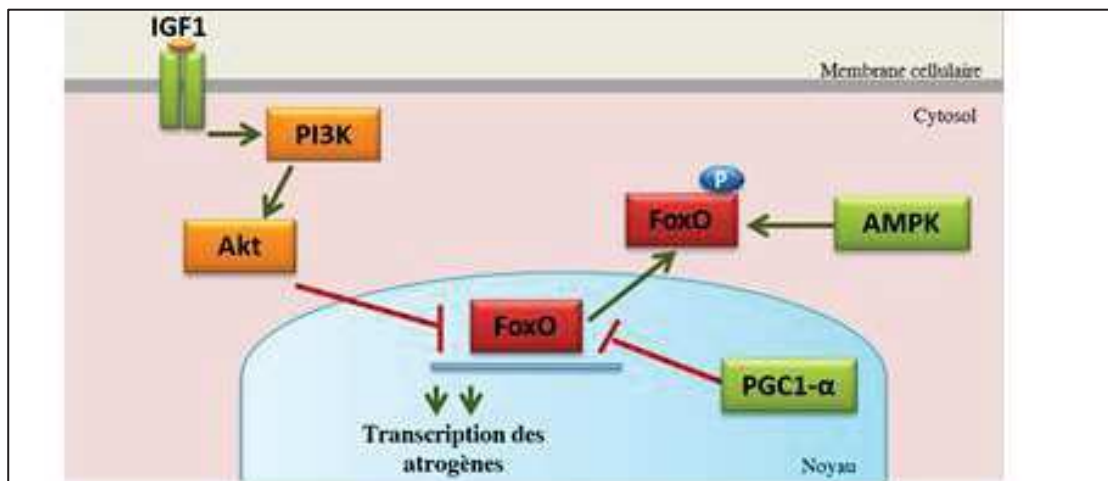


Figure 10: Voie de signalisation FoXO (d'après revue Nakae et al., 2008)

Les FoXO sont localisés dans le noyau en tant que facteurs de transcription. Quand AKT est activée, elle va phosphoryler FoXO qui va quitter le noyau vers le cytoplasme où il sera inactif. Des facteurs comme l'AMPK pourront réactiver FoXO par phosphorylation ce qui lui permet de reprendre sa fonction dans le noyau.

FoxO3 est activé aussi par l'AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase). Ce dernier est un facteur sensoriel énergétique sensible aux changements intracellulaires de ratio AMP/ATP (Hardie & Carling, 1997). Dans un état de stress énergétique, l'AMPK est activé et phosphoryle FoxO3 dans les myofibres, induisant une augmentation de l'expression d'atrogin-1 et MuRF1 (Sanchez et al., 2013) (Figure 10). De même, le traitement des myotubes C2C12 avec AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside), un activateur d'AMPK, active FoxO3 ainsi que l'expression d'atrogin-1 et MuRF1 (Nystrom & Lang 2008).

La Voie NFkB

La voie NFkB (nuclear factor-kappaB) représente une famille de cinq facteurs de transcription (p65, Rel B, c-Rel, p52 et p50) (Caamaño & Hunter 2002) (Figure 11). Pendant la cachexie, les cytokines circulantes, en particulier TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha), activent le complexe IKK (Inhibitor kappa B alpha kinase complex) entraînant la phosphorylation de I-kB α (Inhibitor kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) protéine inhibitrice de NFkB. Phosphorylée, I-kB α devient polyubiquitinée et est dégradée par le protéasome permettant la translocation nucléaire de NFkB (l'hétérodimère p65-p50) et son activation transcriptionnelle (Ghosh and Karin., 2002). Dans le cas d'une inactivité musculaire, NFkB est activé mais indépendamment des cytokines. Au niveau moléculaire il a été établi que cette activation requiert p50 et bcl3 pour l'induction de l'atrophie (Kandarian & Jackman 2006).

L'activation constitutive de NFkB chez des souris surexprimant la forme constitutivement active de la protéine IKK β (Inhibitor kappa B kinase subunit beta) induit une atrophie musculaire liée à une protéolyse ubiquitine dépendante (Cai et al., 2004). A l'opposé l'inactivation spécifique du gène IKK β dans le muscle préserve de l'atrophie induite par dénervation (de 10 à 50% selon le muscle) (Mourkioti et al, 2006, Wyke et al, 2004).

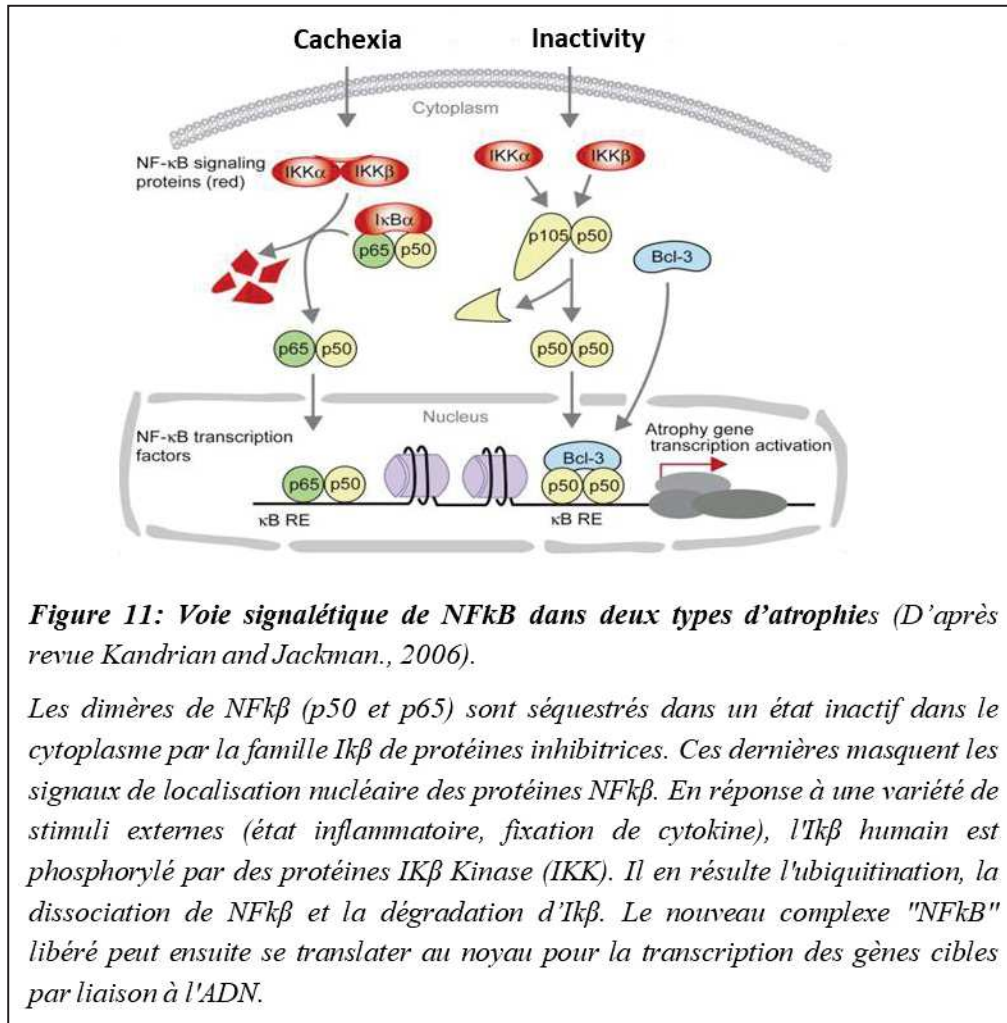


Figure 11: Voie signalétique de NFκB dans deux types d'atrophies (D'après revue Kandrian and Jackman., 2006).

Les dimères de NFκβ (p50 et p65) sont séquestrés dans un état inactif dans le cytoplasme par la famille Iκβ de protéines inhibitrices. Ces dernières masquent les signaux de localisation nucléaire des protéines NFκβ. En réponse à une variété de stimuli externes (état inflammatoire, fixation de cytokine), l'Iκβ humain est phosphorylé par des protéines IKβ Kinase (IKK). Il en résulte l'ubiquitination, la dissociation de NFκβ et la dégradation d'Iκβ. Le nouveau complexe "NFκB" libéré peut ensuite se translater au noyau pour la transcription des gènes cibles par liaison à l'ADN.

L'apoptose

Le phénomène d'apoptose (mort cellulaire, génétiquement programmée), à travers la perte de noyaux, s'est révélé un acteur potentiel du processus d'atrophie (Cheema et al., 2015). En effet, une diminution du nombre de noyaux cellulaires au sein de la fibre musculaire a été rapportée lors d'expérimentations de dénervation et d'immobilisation par suspension du train arrière (Migheli et al., 1997, Ferreira et al., 2009). Le rapport du volume de cytoplasme sur le nombre de noyaux cellulaire est réduit en situation d'atrophie (hypoactivité, microgravité) (Allen et al., 1997). Une attention particulière a été portée sur des facteurs pro-apoptotiques libérés par la mitochondrie tels les caspases. Un rapport Bax/Bcl (Bcl-2-like protein 4 /B-cell lymphoma 2) (indicateur du degré d'apoptose) plus élevé et une activation du caspase-3 ont été trouvés dans le muscle dénervé par rapport un muscle innervé (Siu et al., 2005, Siu et al., 2006, Plant et al., 2009). Les souris KO caspase-3 sont protégées de l'atrophie induite par la dénervation et la suppression de la caspase-3 diminue la dégradation de l'actine et la protéolyse (Plant et al., 2009).

Le stress oxydant

Le stress oxydant, résultant du déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant, provoque de graves altérations structurales, métaboliques et fonctionnelles au niveau musculaire (Reid et al., 1992, Reid et al., 1993). En ce qui concerne la balance protéique, le stress oxydant favorise l'apparition d'une atrophie musculaire par sa capacité à activer les différents systèmes de protéolyse et de mort cellulaire (Koechlin et al., 2004). Les dommages induits au niveau des membranes liées aux peroxydations lipidiques favorisent la libération de protéases dans le cytosol tandis que l'apparition des protéines dénaturées par le stress oxydant active le système ubiquitin-protéasome, mécanisme majeur de protéolyse musculaire (McClung et al., 2010). Des études ont montré que les marqueurs du stress oxydant augmentent dans un muscle dénervé, immobilisé, sarcopénique, ou ayant subi une situation de micro-gravité (Abruzzo et al., 2010, O'Leary & Hood, 2009)

Après activation de ces voies, la dégradation des composants protéiques est assurée par quatre systèmes protéolytiques majeurs dans les muscles squelettiques : les calpaïnes, les lysosomes, les caspases et les protéasomes dont nous ne détaillerons pas ici le fonctionnement.

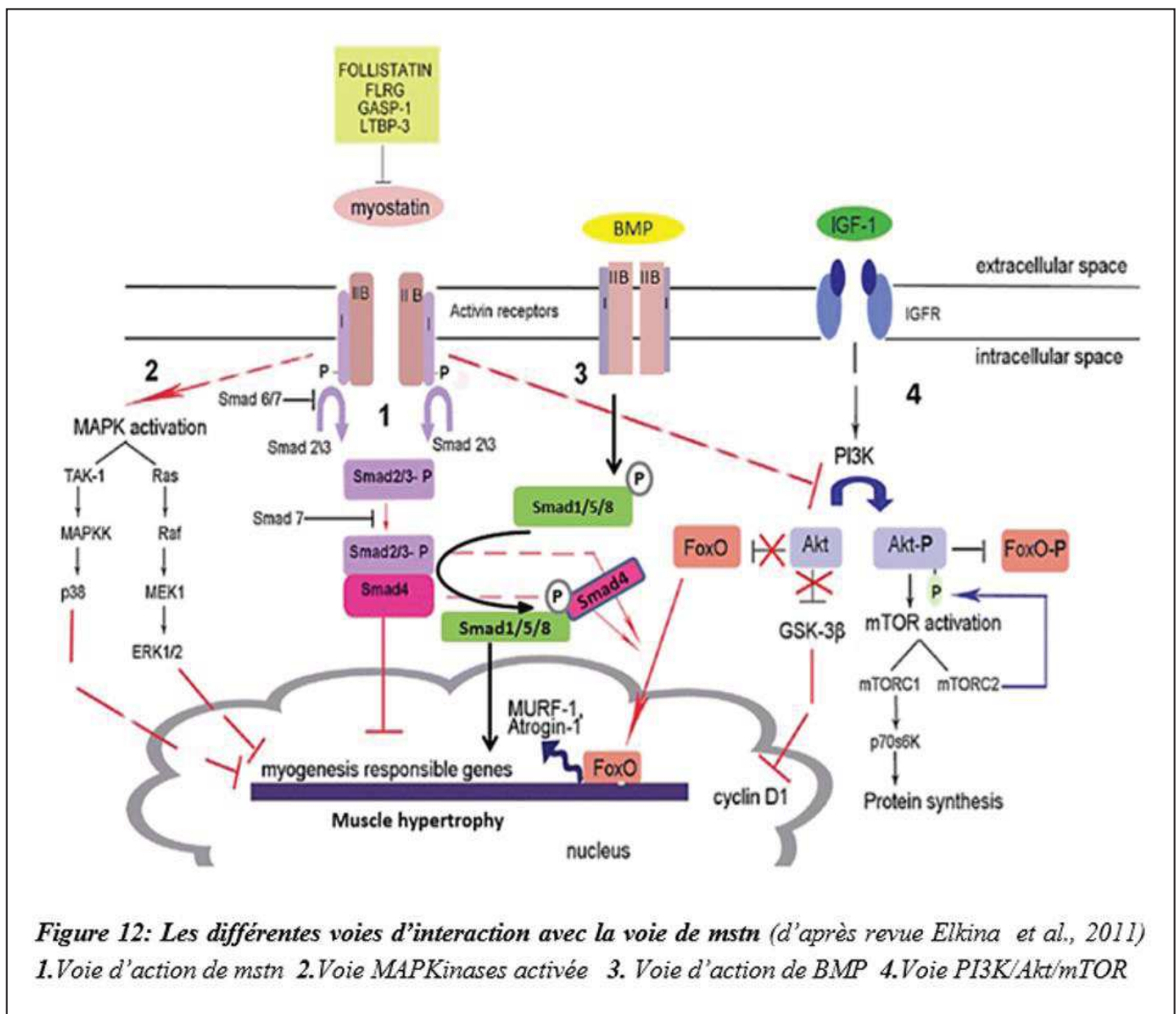
1.3.2 Action de la mstn sur les voies signalétiques

L'augmentation d'expression de mstn est observée dans diverses situations physiopathologiques associées à une perte musculaire telles l'immobilisation, la sarcopénie, la cachexie ou la myopathie du patient atteint de bronchopneumopathie chronique obstructive (Zachwieja et al., 1999, Yarasheski et al., 2002, Zimmers et al., 2002, Rodriguez et al., 2011). Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que la mstn est impliquée dans l'action atrophiante des glucocorticoïdes (Wang et al., 2016, Ma et al., 2003, Gilson et al., 2007). Ces données suggèrent un rôle de la mstn dans l'atrophie musculaire, et sur les voies signalétiques de la balance protéique, synthétisées dans la Figure 12 : la voie ActRIIB ALK4/ALK5 Smad 2/3, la voie MAPkinase (mitogen-activated protein kinase), la voie relative aux BMP (Bone Morphogenetic Protein) et l'interaction avec la voie Akt.

La voie d'action de la mstn, historique et principale, est celle concernant la phosphorylation et l'activation associée de Smad 2/3, liée à Smad4, inhibant l'expression de gènes liés à la myogénèse, et à l'inverse augmentant l'expression des gènes qui favorisent la perte musculaire (Trendelenburg et al., 2009, Tando et al., 2016). Egalement, la sur-expression de Smad3 *in vivo* et *in vitro* active MuRF-1 et FoxO3 et induit une atrophie musculaire

(Goodman et al., 2013, Bollinger et al., 2014). A l'inverse, plusieurs études ont montré que l'inhibition de la voie *mstn*-ActRIIB-ALK4/ALK5-Smad 2/3 favorise l'hypertrophie musculaire chez l'adulte (Sartori et al., 2009, Trendelenburg et al., 2009).

En parallèle, Philip et ses collaborateurs ont montré que la *mstn* est capable d'activer aussi la voie MAPkinase p38 indépendamment de la voie Smad (Philip et al., 2005). La voie MAPkinase p38 est capable de réguler l'activité transcriptionnelle de la *mstn* (Philip et al., 2005).



La mstn est également en concurrence avec d'autres voies signalétiques, essentiellement la voie BMP. Les travaux de Sartori et al ainsi que ceux de Winbanks et al ont montré une compétition entre la voie de mstn et de BMP sur la régulation de Smad4 pour réguler la masse musculaire (Sartori et al., 2013, Winbanks et al., 2013). Sartori et al ont découvert une association entre Smad4 et Smad1/5/8 dans le déclenchement de croissance musculaire (Sartori et al., 2013). Lorsque la signalisation BMP est élevée, Smad4 se déplace vers Smad1/5/8 pour l'amener au noyau en ciblant les gènes de la croissance musculaire (Figure 12). Smad4 ne peut plus alors se lier à Smad2/3, réduisant la voie d'action de mstn sur le muscle. L'inhibition de BMP entraîne une atrophie musculaire et atténue le phénotype hypertrophique chez les souris KO mstn (Sartori et al., 2013).

La mstn régule également la voie Akt-mTORC (Amirouche et al., 2009, Trendelenburg et al., 2009). En effet, il a été démontré que la mstn inhibe la voie Akt/mTORC dans le muscle squelettique et qu'à l'inverse, une déplétion génétique de mstn augmente l'activité de cette voie *in vitro* et *in vivo* (Amirouche et al., 2009, Morissette et al., 2009, Lipina et al., 2010, Rodriguez et al., 2011). De même, l'inhibition de mTORC par déplétion de Raptor dans des myotubes a augmenté l'expression de mstn via la phosphorylation de Smad2. (Trendelenburg et al., 2009) (Figure 12).

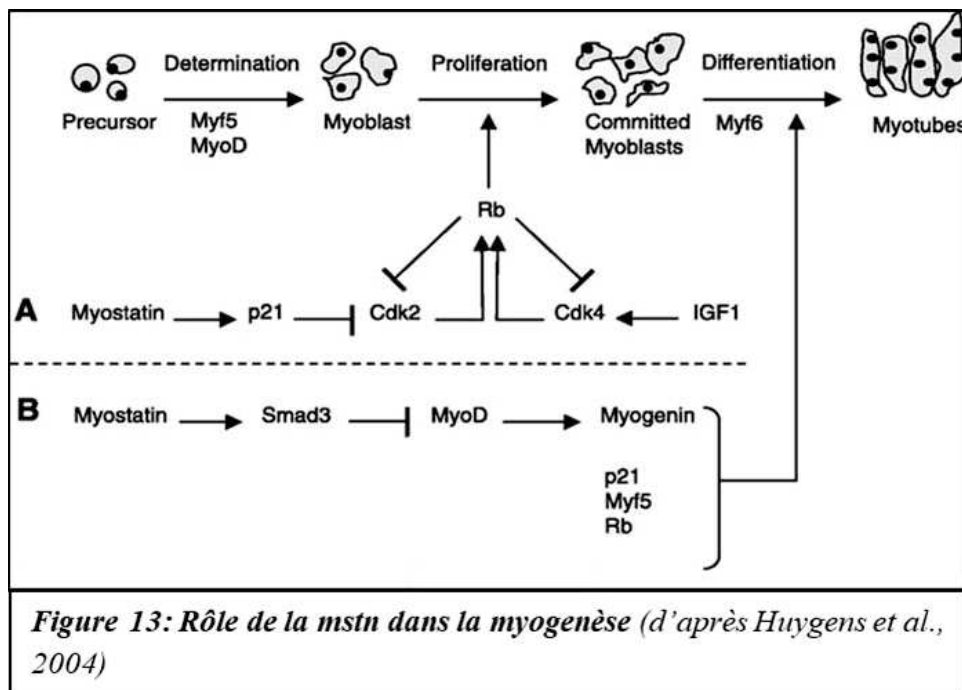
1.3.3 Action sur la prolifération et la différenciation cellulaire

La mstn inhibe la prolifération des myoblastes en empêchant la progression du cycle cellulaire et l'arrêt à la phase G (Thomas et al., 2000). Cet effet est dû à la diminution de l'expression des protéines cdk2 et ckd4 (cycline kinase dépendante 2/4) avec une augmentation des taux des p21 et p27, des inhibiteurs des cyclines kinases dépendantes dans les myoblastes (Thomas et al., 2000). D'autres cyclines sont sensibles à la mstn comme la cycline D1. En effet, la sur-expression de mstn dans la cellule induit l'activation de GSK-3 β (Glycogen synthase kinase-3) et par la suite une dégradation de cycline D1, une protéine clé dans le cycle cellulaire (Yang et al., 2007). L'absence de mstn donc, stimule la prolifération et la différenciation des cellules satellites (Joulia et al., 2003). Dans ce contexte, des études ont montré que les cellules satellites isolées des muscles KO mstn prolifèrent plus rapidement que les cellules satellite issues des muscles normaux (Wagner & Cohen 1993) (Figure 13).

La mstn régule aussi la différenciation des myoblastes par l'inhibition des facteurs de transcription Pax3 (Paired box gene 3), MyoD (Myoblast Determination gene) et Myf5 (Myogenic Factor 5) sont fortement impliqués dans ce processus (Amthor et al., 2002). La mstn

inhibe l'expression de MyoD via Smad3 (Langley et al., 2002). En effet, la sur-expression de *mstn* dans des myoblastes réduit l'expression des protéines structurales comme la MyHCIIb, la Troponine I et la Desmine ainsi qu'une diminution des facteurs de transcription MyoD, Myf5 et Myogenine (Durieux et al., 2007) (Figure 13).

La *mstn* joue un rôle négatif sur l'activation des cellules satellites (CS) et leur renouvellement chez la souris (McCroskery et al., 2003). Les CS sont des cellules souches dans le muscle adulte responsables de la croissance et la réparation musculaire. Suite à divers stimuli, les CS s'activent, prolifèrent et se différencient pour réparer ou créer une fibre musculaire. Les études *in vitro* ont montré que la sur-expression de *mstn* dans des myoblastes régule négativement le facteur Pax7 qui joue un rôle important dans l'activation des CS (McFarlane et al., 2008). La présence de *mstn* maintient les CS dans un état de quiescence et inhibe leur renouvellement en réprimant Pax7 (McFarlane et al., 2008). Inversement, une augmentation du nombre total de CS a été observée dans les myoblastes adultes présentant une inactivation de la *mstn* (McCroskery et al., 2003).



En revanche, des études s'opposent à ces résultats et montrent qu'il n'y a pas de différence au niveau du nombre des CS avec ou sans *mstn* et ils indiquent que l'hypertrophie observée est due à une augmentation du volume cytoplasmique (Amthor et al., 2009). De plus, l'hypertrophie musculaire induite par l'inhibition de la *mstn* / activin A se produit chez les souris *Sdc4* ^{-/-} ou *Pax7* ^{-/-} pour lesquelles l'activité des cellules satellites est déficiente (Lee et al.,

2012). Dans cette même condition d'inhibition de la mstn, il a été reporté que l'hypertrophie des fibres musculaires précède l'incorporation de nouveaux noyaux suggérant que l'augmentation de la taille des fibres peut être obtenue sans l'ajout de nouveaux noyaux et par le seul effet d'une activation de la synthèse protéique (Wang & McPherron 2012, Blaauw et al., 2009, Amthor et al., 2009).

Finalement, Wang et Mcpherron montrent que l'inhibition de mstn induit d'abord une augmentation de nombre de fibres puis une activation des CS dans un second temps (Wang et McPherron 2012).

En résumé

- ◆ **Les données de la littérature suggèrent fortement que des altérations de la masse musculaire squelettique sont associées à un dérèglement de l'expression de la mstn. De plus, il apparait que la mstn joue un rôle central dans l'intégration/médiation des réponses anaboliques et cataboliques dans le muscle squelettique.**
- ◆ **La mstn régule négativement l'activité de la voie AKT qui favorise la synthèse protéique, et augmente l'activité du système ubiquitine-protéasome pour induire l'atrophie.**

I.4 Un tissu fatigable avec un métabolisme oxydatif altéré :

Quelle que soit la stratégie d'inhibition de la mstn par déplétion génétique ou traitement/injection des anticorps/propeptide/molécules inhibitrices, celle-ci induit toujours le même résultat, une augmentation de la masse musculaire. Cependant les observations sur les modèles « culards » bovins ou sur la souris KO mstn révèlent des conséquences fonctionnelles et métaboliques, nous obligeant ici à détailler les mécanismes de la production de force, et de l'endurance musculaire ainsi que les métabolismes énergétiques associées.

1.4.1 Le phénotype musculaire contractile : rappels sur la force et endurance

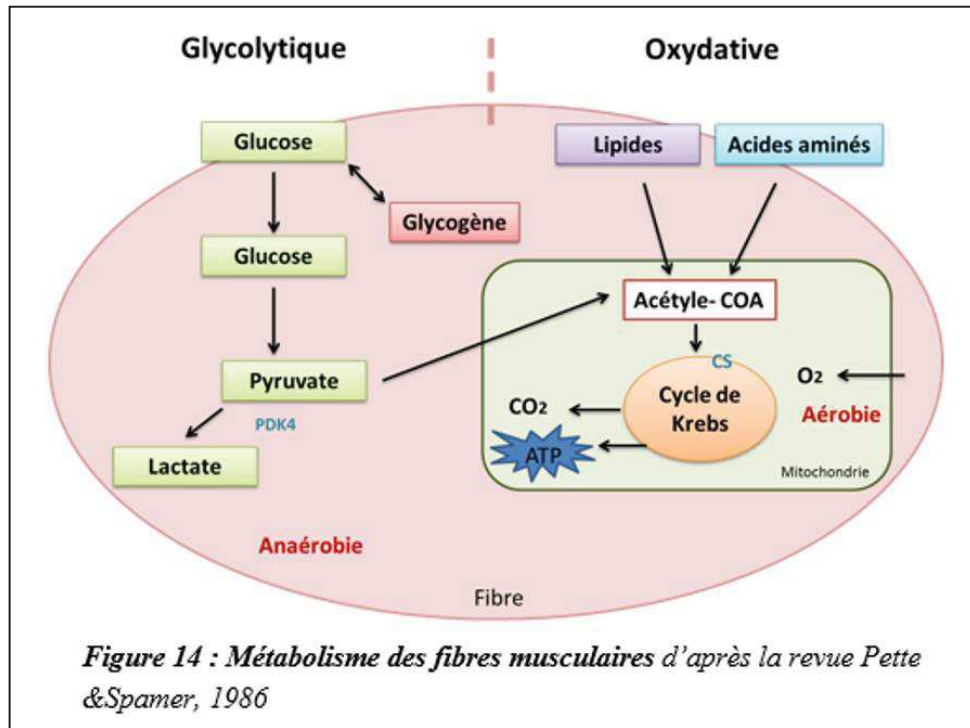
Au niveau fonctionnel, le muscle est constitué de différentes fibres musculaires aux capacités contractiles et métaboliques différentes, en lien avec l'isoforme exprimé de chaîne lourde de myosine (MyHC) et de son activité ATPasique (Tableau 2).

Ainsi, le phénotype IIb, retrouvé dans des muscles dits rapides comme le long extenseur des doigts (EDL), est associé à une production de force supérieure par rapport à un phénotype de type I. Ce type de fibre utilise la glycolyse comme voie métabolique (Figure 14). Autre élément important dans la production de force, au-delà du type de fibres musculaires est la masse musculaire. Il existe une corrélation quasi parfaite entre masse musculaire et production de force, entre fibres hypertrophiées et force développée (Glenmark 1994). Inversement, la résistance à la fatigue est conditionnée aux fibres de type I, mieux armées pour utiliser la filière énergétique aérobie, avec une densité mitochondriale élevée (Figure 14). La capacité d'endurance est ainsi favorisée dans un muscle lent comme le soléaire.

Le phénotype contractile des fibres musculaires est donc en relation étroite avec le métabolisme énergétique, métabolisme que l'on va ainsi développer dans le chapitre suivant.

Tableau 2: Typologie et caractéristiques des fibres musculaires

Type de fibre (isoforme de la myosine)	Vitesse de Contraction	Métabolisme	Activité ATPasique	Nombre de Mitochondrie
I	Lente	Oxydatif	Faible	++++
IIa	Rapide	Mixte : Oxydo-glycolytique	Forte	+++
IIx		Oxydo-glycolytique		++
IIb		Glycolytique		+



1.4.2 Le phénotype métabolique musculaire : focus sur le métabolisme aérobie

L'ATP est la seule source d'énergie immédiate disponible pour la contraction des fibres musculaires. L'ATP existe dans la cellule musculaire en très faibles quantités permettant uniquement quelques dizaines de secondes de travail musculaire. Pour assurer des exercices prolongés, il faut donc perpétuellement maintenir le renouvellement de l'ATP musculaire, par la dégradation des différents substrats énergétique issu de l'alimentation, circulants ou des réserves. La sollicitation des différentes sources d'énergie dépend des conditions de l'effort, de son intensité, de sa durée et de l'état initial du stock des différents substrats. La production de l'énergie repose essentiellement sur deux processus métaboliques qui se déroulent en présence ou non d'Oxygène (O₂), la filière aérobie et la filière anaérobie. Ces mécanismes rentrent en jeu de façon concomitante quel que soit l'effort, il n'y a pas donc une séparation nette entre les filières énergétiques mais plutôt des interrelations selon le type d'exercice.

◆ Le muscle consommateur des substrats énergétiques

Le muscle squelettique est l'effecteur de la motricité volontaire, mais aussi le plus important consommateur d'énergie de l'organisme. Il assure le maintien de l'équilibre énergétique et joue un grand rôle dans la régulation des réserves glucidiques et lipidiques.

En effet, le muscle squelettique contient 70% des réserves de glycogène (forme de stockage de glucose) strictement métabolisées *in situ*. Les 30% restant sont stockés dans le foie et contribuent à la production du glucose sanguin pour maintenir une glycémie stable (Bogardus

et al., 1981). Dans le muscle, les réserves lipidiques sont les triglycérides et les acides gras (AG), stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans les fibres musculaires. A ces réserves s'ajoutent les lipides circulants dans le sang, et ceux stockés dans le tissu adipeux (Kiens 1997).

Les réserves protidiques, sont également principalement localisées dans le muscle. Elles sont faiblement utilisées lors de la contraction musculaire. Cependant certains acides aminés, appelés les acides aminés branchés (Leucine, Isoleucine, Valine) sont directement oxydés dans le muscle. Par ailleurs, la mobilisation du pool total des acides aminés intramusculaires contribue lors d'exercices prolongés au maintien de la glycémie par le biais de la néoglucogénèse hépatique (Bourrilhon et al., 2010).

◆ **Métabolisme aérobie dans le muscle squelettique**

Le métabolisme ou filière aérobie permet la production d'ATP en présence d'O₂ via la dégradation de substrats tels que les acides gras et le glucose. Cette production d'ATP se produit à l'intérieur de la matrice mitochondriale. Le système aérobie possède un rendement énergétique intéressant adapté aux exercices d'endurance et de longue durée. En présence d'O₂, la production d'ATP provient principalement des glucides transformés en pyruvate lors de la glycolyse anaérobie ou de la dégradation des lipides. Ces derniers sont utilisés surtout dans les efforts prolongés mais peu intenses. En effet, les réserves d'énergie provenant des lipides sont plus importantes que celles provenant des glucides.

⇒ ***La mitochondrie***

La mitochondrie est un organite indispensable au métabolisme aérobie. C'est en son sein que se réalise l'oxydation des substrats énergétiques pour fournir les équivalents réduits (NADH+H (nicotinamide adénine dinucléotide), et FADH₂ (flavine adénine dinucléotide) (NADH₂ and FADH₂) indispensables à la production d'ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale. Tous les substrats sont convertis en Acétyl-CoA avant d'être dégradés dans la matrice mitochondriale.

⇒ **La β -oxydation :**

La β -oxydation ou aussi Hélice de Lynen est une étape spécifique aux acides gras (AG) qui précède le cycle de Krebs. Les AG sont activés en Acyl-CoA au niveau de la membrane externe de la mitochondrie par l'enzyme acyl-CoA synthétase (ACS). Les membranes de la mitochondrie ne laissent pas passer l'Acyl-CoA. Il est donc transporté dans la matrice mitochondriale grâce à la carnitine palmitoyltransferase (CPT1, CPT2) (Figure 15).

La voie de β -oxydation comporte quatre réactions récurrentes partant de l'acyl-CoA et aboutissant à un acyl-CoA raccourci de 2 atomes de carbones, avec une libération d'acétylCoA, d' NADH et de FADH_2 (Figure 16). Les étapes de cette voie comprennent un cycle de 4 réactions ; oxydation, hydratation, oxydation et thiololyse. La première étape consiste à une oxydation de l'acyl-CoA par l'**acylCoA déshydrogénase (1)** donnant un trans enoyl CoA et une molécule de FADH_2 . Ensuite, une hydratation de la double liaison de l'enoyle CoA se réalise au travers de l'action de l'**énoyle-CoA hydratase (2)** pour former l'isomère L du 3-hydroxyacyl-CoA. Une réaction d'oxydation suit pour convertir le L-3-hydroxyacyl-CoA en 3-étoacyl-CoA grâce à l'enzyme **L- β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (β -HAD) (3)** avec une libération d'une molécule de NADH , H^+ . Enfin, la thiololyse s'effectue pour éliminer le carbone de 3-cétoacyl-CoA à l'aide de la **β -cétoacyl-CoA thiolase (4)** en libérant une molécule d'acétyl-CoA ainsi qu'un acyl-CoA à (n-2) carbones (**1'**). Ce dernier repart dans un nouveau cycle de 4 réactions jusqu'à ce que l'AG initial soit converti totalement en acétyl-CoA (Houten & Wanders, 2010) (Figure 16).

Nous pouvons ici faire remarquer que la β -HAD est l'enzyme clé de la β -oxydation. Plusieurs travaux ont montré que son activité augmente avec l'apport lipidique dans le muscle soit suite à l'exercice ou à un régime alimentaire riche en calories (Helge & Kiens, 1997). Elle joue un rôle important dans la régulation de l'oxydation des lipides durant l'exercice (Kiens 1997).

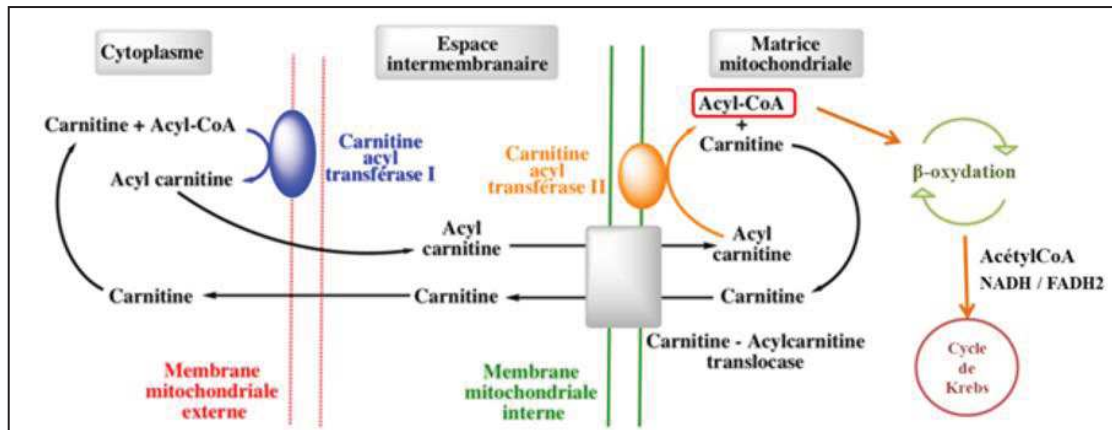


Figure 15: Transport de l'Acyl-CoA par le carnitine à travers les membranes mitochondriales (D'après Jogl & Tong, 2003)

Les AG sont activés en Acyl-CoA au niveau de la membrane externe de la mitochondrie par l'enzyme Acyl-CoA synthétase (ACS). L'Acyl-CoA ensuite est transporté au niveau des membranes vers la matrice mitochondriale grâce à la cartinine palmetoyltransferase (CPT1, CPT2). Une fois dans la mitochondrie, ils vont subir à la suite la β -oxydation afin de transformer les Acyl-CoA en Acétyl-CoA produit principal du cycle de Krebs.

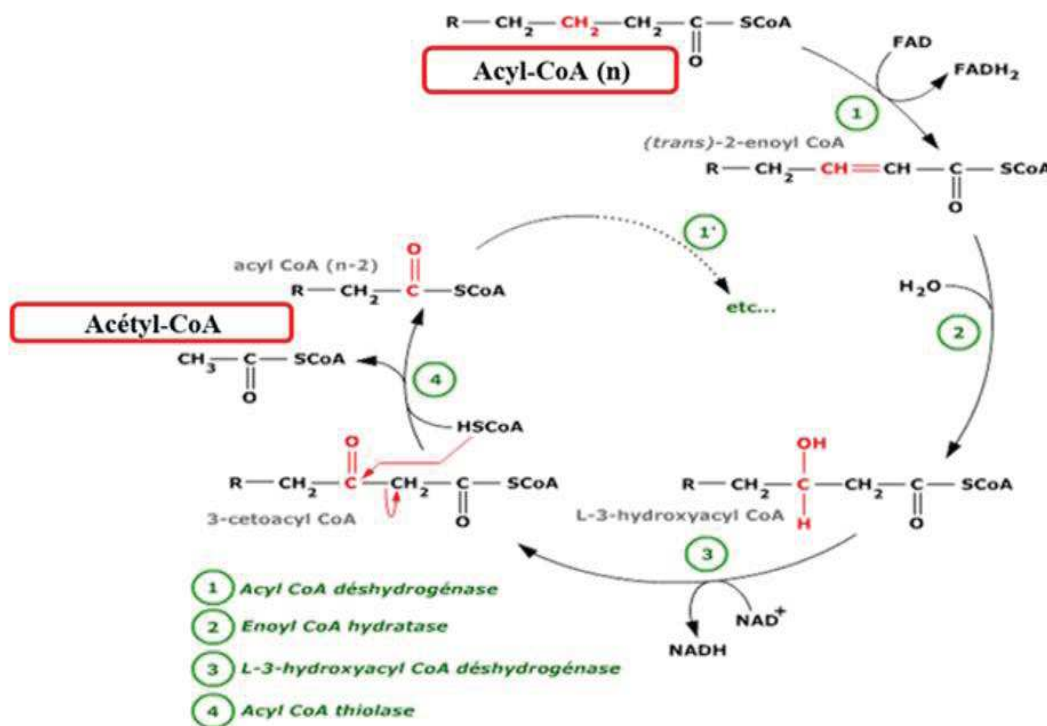


Figure 16: Les étapes de la β -oxydation dans le muscle squelettique (d'après Houten & Wanders, 2010)

C'est un cycle de 4 réactions; oxydation, hydratation, oxydation et thiolyse. La première étape consiste à une oxydation de l'acyl-CoA par l'acylCoA déshydrogénase (1) donnant un trans enoyl CoA et une molécule de FADH₂. Ensuite, une hydratation de la double liaison de l'énoyl CoA se réalise au travers de l'action de l'énoyl-CoA hydratase (2) pour former l'isomère L du 3-hydroxyacyl-CoA. Une réaction d'oxydation suit pour convertir le L-3-hydroxyacyl-CoA en 3-étoacyl-CoA grâce à l'enzyme L- β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (β -HAD) (3) avec une libération d'une molécule de NADH, H⁺. Enfin, la thiolyse s'effectue pour éliminer le carbone de 3-cétoacyl-CoA à l'aide de la β -cétoacyl-CoA thiolase (4) en libérant une molécule d'acétyl-CoA ainsi qu'un acyl-CoA à (n-2) carbones (1'). Ce dernier repart dans un nouveau cycle de 4 réactions jusqu'à que l'AG initial soit converti totalement en acétyl-CoA.

⇒ **Cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique/ acide tricarboxylique :**

Le cycle de Krebs assure l'oxydation des substrats énergétiques (Figure 17). Après leur transformation en Acétyl Coenzyme A (AcétylCoA), ils rentrent dans le cycle de Krebs subissant une série de réactions biochimiques avec l'intervention de nombreuses enzymes détaillées dans la Figure 17, qui ont pour but de produire des intermédiaires énergétiques (NADH/NAD⁺ et FADH₂/FAD⁺) permettant la fabrication ensuite d'ATP dans la chaîne respiratoire. Trois molécules de NADH et une molécule de FADH₂ sont produites à chaque cycle de Krebs qui viennent se rajouter aux molécules NADH produites dans les étapes précédentes (Figure 17).

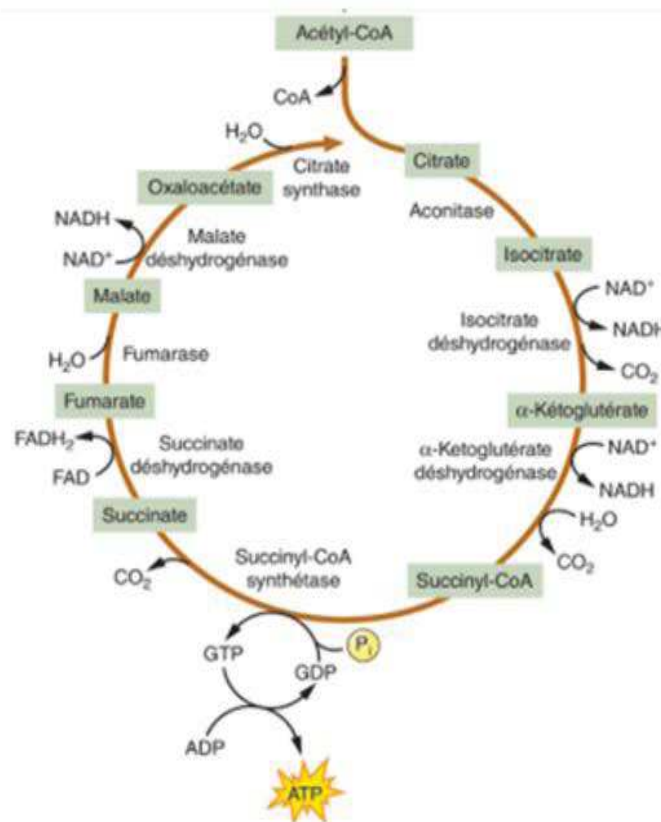


Figure 17: Etapes du cycle de Krebs (d'après Bowtell et al., 2007)

Dans un premier temps, l'acétyl-CoA réagit avec l'oxaloacétate pour donner du citrate, grâce à la citrate synthase. Le citrate ensuite sera transformé en isocitrate par l'aconitase. L'isocitrate va être décarboxylé puis oxydé pour donner l'alpha-cétoglutarate avec réduction d'un NAD⁺ en NADH + H⁺. Il va à son tour subir une décarboxylation dont l'énergie va servir à réduire un autre NAD⁺ et greffer un coenzyme A à la molécule pour produire le succinyl coenzyme A, par l'action de l'alpha cétoglutarate déshydrogénase. La libération du coenzyme A pour produire le succinate va dégager de l'énergie qui va permettre de produire une molécule d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Le succinate va alors subir une déshydrogénation par la succinate déshydrogénase pour produire du fumarate, les deux hydrogènes étant récupérés par le FAD pour donner du FADH₂. Le fumarate va être hydraté en malate par la fumarate déshydrogénase. Le malate va ensuite être oxydé en oxaloacétate avec réduction d'un autre NAD⁺ par la malate déshydrogénase. L'oxaloacétate, le substrat de départ est ainsi régénéré et prêt pour un nouveau cycle.

⇒ **La phosphorylation oxydative :**

C'est le processus détaillé dans la Figure 18 par lequel l'ATP est formé lorsque des électrons sont transférés du NADH ou du FADH₂ à l'oxygène par une série de transporteurs d'électrons. NADH et FADH₂ sont formés lors du cycle de Krebs et de la β-oxydation suite à la dégradation des pyruvates et des AG. Ils sont riches en énergie (possédant une paire d'électrons) et leur oxydation permet la formation de 2 ou 3 molécules d'ATP respectivement (Figure 18).

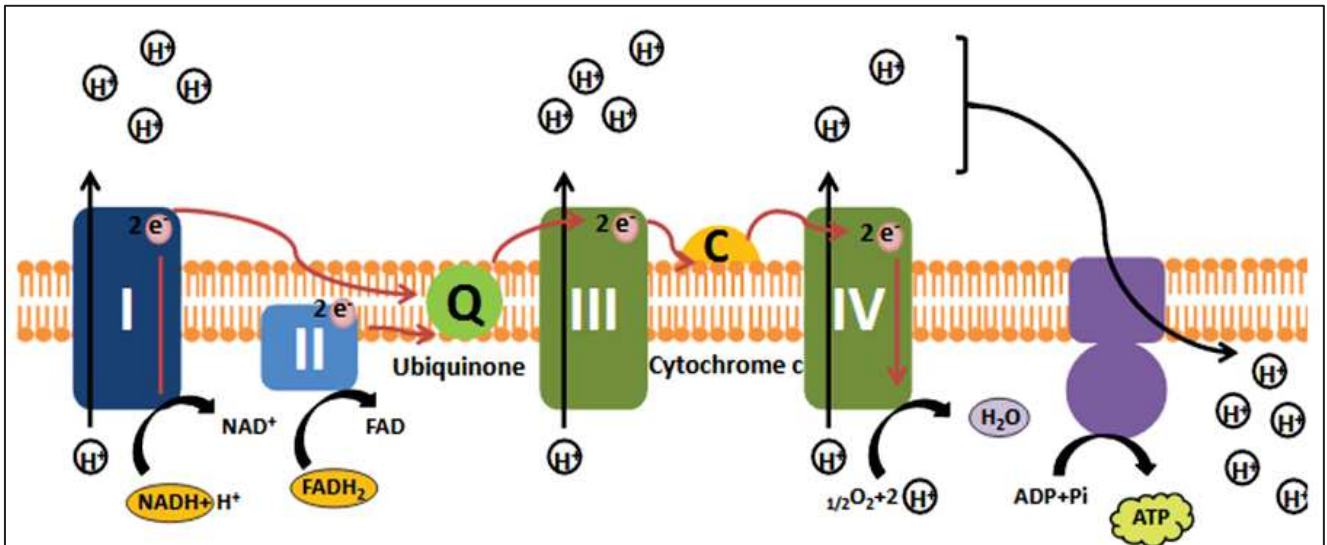


Figure 18: La phosphorylation oxydative mitochondriale (d'après Ferraro et al., 2014)

La phosphorylation oxydative se produit au niveau de la membrane interne de la mitochondrie impliquant cinq complexes avec plusieurs sous unités. L'oxydation de NADH dans le complexe I (NADH: ubiquinone reductase) et de la succinat/FADH₂ dans le complexe II (succinate:ubiquinone reductase), libère des électrons. Ces derniers seront transportés tout au long de la chaîne respiratoire passant dans un premier temps par une sous unité l'ubiquinone (Q) puis vers le complexe III. Avant d'arriver au complexe IV, ils passent par la sous unité cytochrome C (C) et au niveau de complexe IV ils seront transférés sur les molécules d'oxygène. C'est une série des réactions d'oxydo-réduction avec un échange de protons H⁺ de la matrice vers l'espace inter membranaire mitochondrial jusqu'à l'arrivée au complexe IV où se produit le couplage des électrons avec l'oxygène et 2 H⁺ pour former une molécule d'eau H₂O. Enfin, le gradient électrochimique des protons H⁺ génère une différence de potentiel membranaire qui contribue à la formation d'ATP par l'ATP synthase.

⇒ **La glycolyse aérobie :**

En présence d' O_2 , la glycolyse aérobie assure la métabolisation des substrats glucidiques. Une succession de réactions enzymatiques permet de convertir le glucose en pyruvate qui sera ensuite transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) pour intégrer le cycle de Krebs. La dégradation de l'acétylCoA dans le cycle de Krebs aboutit à la libération de 2 $NADH, H^+$ qui vont rejoindre directement la chaîne respiratoire (la dégradation complète d'une molécule de glucose donnant 32 ATP) (Figure 19).

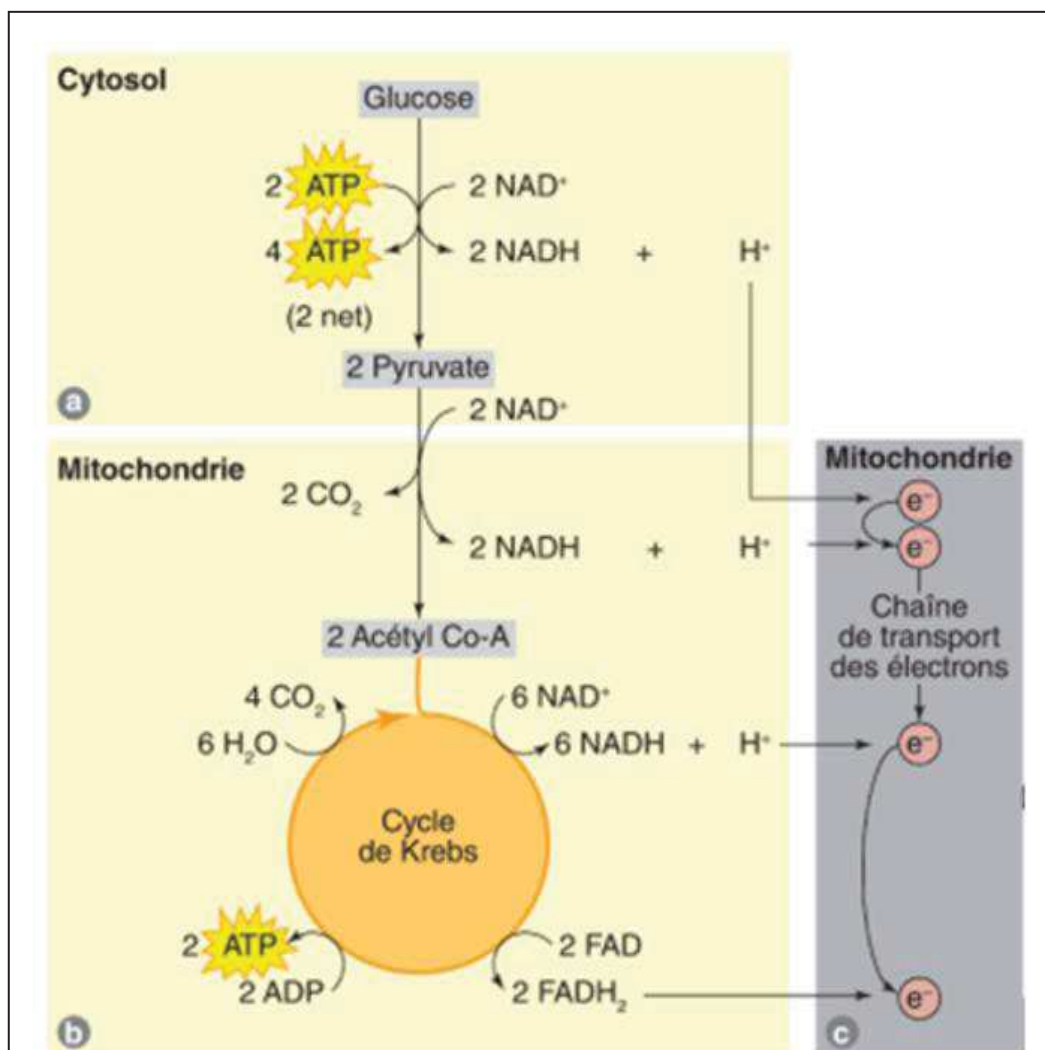


Figure 19: La glycolyse aérobie (D'après Ferraro et al., 2014)

En présence d' O_2 et après la réduction de glucose en pyruvate (a), ce dernier sera converti en Acétyl-CoA qui pourra rentrer dans le cycle de Krebs (b). Les ions hydrogènes libérés de cycle citrique se combinent à des coenzymes ($NADH, H^+$ et $FADH_2$) qui les transportent jusqu'à la phosphorylation oxydatives (c).

◆ Métabolisme anaérobie dans le muscle squelettique

En situation de manque d'oxygène, la glycolyse anaérobie assure la conversion du glucose sanguin et du glycogène musculaire en pyruvate (grâce à la phosphofructokinase ou PFK) qui est ensuite transformé en lactate dans le cytosol par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) (Figure 20). Contrairement au métabolisme oxydatif, les processus anaérobies ont lieu dans le cytoplasme de la cellule musculaire. La production d'énergie par ce métabolisme est plus rapide que celui du système oxydatif, cependant il ne génère pas de grandes quantités d'ATP. Le gain net d'une dégradation complète d'une molécule de glucose est de 2 ATP avec une formation de l'acide pyruvique. Le métabolisme glycolytique est prépondérant dans les exercices intenses de courte durée (ne dépassant pas les deux minutes), (Pette & Spamer, 1986, Gunning & Hardeman, 1991).

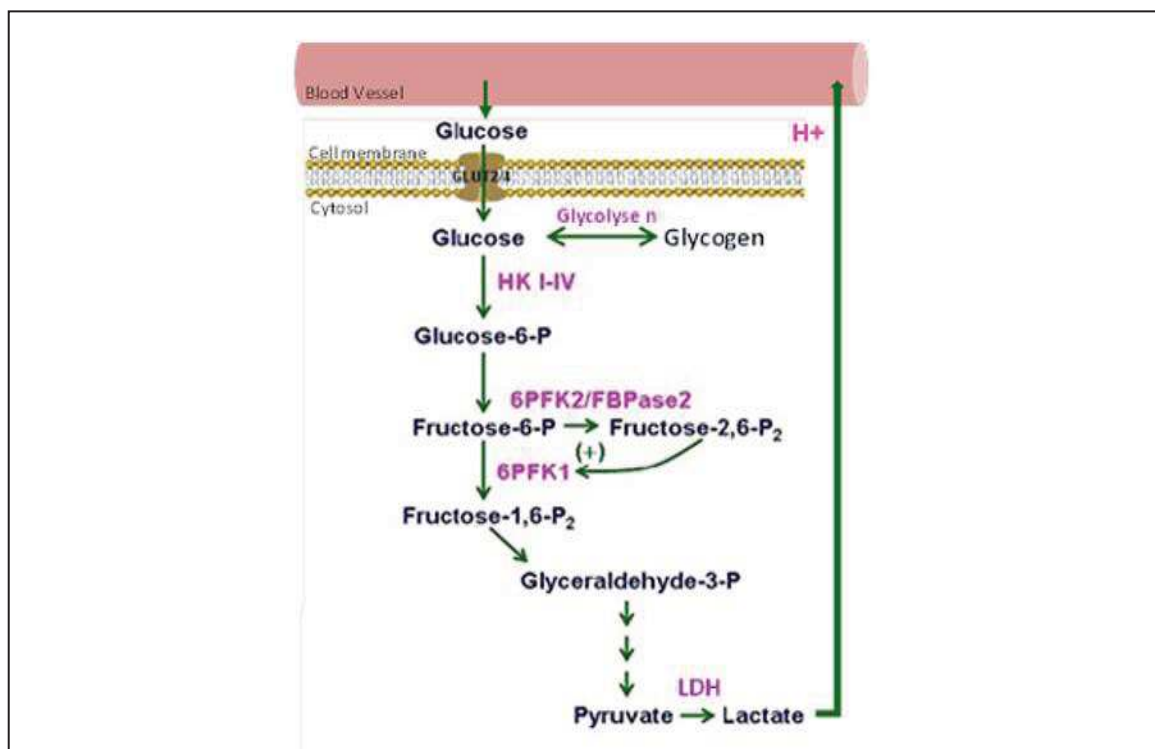


Figure 20: Voie métabolique de la glycolyse anaérobie (D'après la revue de Sylow et al., 2017)

Le glucose, véhiculé par la circulation sanguine, pénètre dans la cellule musculaire par le transporteur membranaire GLUT4 dans le cytosol cellulaire. Dans le milieu intracellulaire, la molécule de glucose est transformée en glucose-6-phosphate et/ou stockée de manière réversible sous forme de glycogène par l'intervention de l'enzyme hexokinase II ou hexokinase IV. La molécule de glucose-6-phosphate est transformée en fructose-1,6-bisphosphate par la 6-phosphofructo-1-kinase (6PFK1) contrôlée en parallèle par la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (6PFK2/FBPase2) et sera dégradée à la suite de plusieurs réactions en 2 molécules d'acide pyruvique avec la synthèse de 2 molécules d'ATP. En absence d'O₂, les 2 molécules d'acide pyruvique se transforment en 2 molécules d'acide lactique en présence d'une lactodéshydrogénase (LDH). L'accumulation progressive d'acide lactique (protons H⁺) baisse alors le PH sanguin et musculaire. Ceci pourrait être un facteur limitant de l'exercice physique qui dépend essentiellement du pouvoir tampon du muscle c'est-à-dire de sa capacité à absorber le lactate formé lors de la glycolyse anaérobie. (D'après la revue de Sylow et al., 2017).

I.4.3 Altérations fonctionnelles du tissu musculaire déficient en mstn

L'inhibition ou la déplétion de mstn est considérée comme une stratégie thérapeutique des différentes pathologies et myopathies. Cependant, de nombreux travaux suggèrent qu'en absence de mstn le muscle squelettique présente des problèmes fonctionnels.

Initialement, les travaux qui se sont intéressés à la force produite par le muscle déficient en mstn ont révélé par des tests fonctionnels des augmentations par rapport aux souris contrôles.). Le test de la force de préhension a révélé une amélioration chez les souris mstn -/- ainsi que chez les souris traitées avec des anticorps anti-myostatine (Wagner et al., 2002, Whittemore et al., 2003). Le traitement du muscle mdx dystrophique avec le propeptide mstn améliore également la tension tétanique maximale (Bogdanovich et al., 2005).

Cependant, par la suite, grâce notamment à la mesure des propriétés contractiles *ex-vivo*, l'évaluation de cette force produite a pu être réalisée sur des muscles isolés, comme l'EDL ou le soléaire, et donc être mise en rapport avec la taille du muscle. Ainsi, dans deux modèles de souris qui portent différentes mutations dans le gène de la mstn, (souris avec le knock-out constitutif (mstn -/-) et la souris compacte (BEHc/c), les auteurs montrent aucune augmentation de la génération de force tétanique maximale, et que, exprimée en fonction de la taille musculaire), la force produite (force spécifique) par le muscle déficient en mstn est même plus faible que celle des souris sauvages (Amthor et al., 2007 ; Ploquin et al., 2012). Une autre étude sur les souris mstn -/- a confirmé cette diminution de la force spécifique pour le muscle extenseur digitorum (EDL), alors que la force spécifique du soléaire est restée inchangée (Mendias et al., 2006). Le traitement de souris mdx dystrophiques avec des anticorps anti-mstn améliorent la génération maximale de force tétanique, mais la force spécifique est réduite (Bogdanovich et al., 2002). Il apparaît donc que la croissance musculaire excessive suite à l'absence de mstn n'est pas toujours associée à une augmentation de la force spécifique. L'impact fonctionnel de l'absence de mstn est plus marqué encore sur l'endurance du muscle ou sa capacité à résister à la fatigue. En effet, les travaux de Ploquin en 2012 ont montré que la production de force observée après le test d'endurance contractile était significativement plus faible dans les muscles extensor digitorum longus et soléaire des souris KO mstn par rapport aux contrôles (Ploquin et al., 2012). Dans le même contexte, Mc Pherron a montré que les souris KO mstn sont moins performantes à l'exercice d'endurance (Savage & Mc Pherron, 2010). Egalement, les souris traitées par des inhibiteur ActRIIB présentent une diminution de la durée de course et de la résistance à la fatigue dès les premières semaines de traitement (Hulmi et al.,

2013). Finalement, Rélizani et al en bloquant la signalisation de mstn dans des souris mdx, ont révélé une myopathie métabolique avec une fatigabilité et une intolérance à l'exercice associée à une perte des propriétés oxydatives de muscle (Rélizani et al., 2014).

I.4.4 Altérations métaboliques du tissu musculaire déficient en mstn

Précédemment, nous avons vu que l'absence de mstn dans le muscle induit un phénotype hypertrophié accompagné de troubles fonctionnels. Les dernières recherches mettent en évidence que ces anomalies fonctionnelles sont en lien avec des anomalies métaboliques marquées.

◆ **Un schift vers le métabolisme glycolytique**

En effet, le muscle déficient en mstn présente un transfert vers un métabolisme glycolytique qui se manifeste par une augmentation du contenu en transporteur membranaire de glucose GLUT4, de l'activité des enzymes de la glycolyse (Enolase, PDK4) et d'une diminution du contenu en mitochondries (Amthor et al., 2007, Ploquin et al., 2012, Pauly et al., 2015, Rélizani et al., 2014). Dans la continuité, un schift de typologie musculaire vers le type II est observé dans le tissu musculaire déficient en mstn. Chez les bovins culards et les souris KO mstn, une augmentation de la proportion des fibres de types II au détriment des fibres de type I, a été observée dans leurs muscles par rapport aux animaux contrôles (Bouley et al 2005, Girgenrath et al., 2005, Amthor et al., 2007), suggérant que l'absence de la mstn induit un phénotype glycolytique/rapide. Le contrôle de la typologie des fibres est assuré par Mef2 et MyoD durant la myogenèse (Hennebry et al., 2009). En effet, Mef2 est un facteur de transcription crucial dans la formation des fibres de types I et l'expression de MyoD. Or, les souris KO mstn ont une diminution de l'expression de Mef2 ce qui peut expliquer la diminution du pourcentage des fibres lentes observée dans ce type de muscle pendant le développement (Girgenrath et al., 2005).

◆ **Un métabolisme aérobie et mitochondrial altérées**

Ploquin et al, ont observé également dans le muscle KO mstn, un découplage respiratoire au niveau de la population intermyofibrillaire des mitochondries (IMF) associé à une diminution du quotient respiratoire (17%) et une consommation d'oxygène basale élevée (Ploquin et al., 2012). Ceci suggère une altération de la production d'ATP dans le muscle déficient en mstn induisant une diminution de l'apport énergétique ce qui entraîne une intolérance à l'exercice et une perte de l'endurance (Baligand et al., 2010, Ploquin et al., 2012,

Giannesini et al., 2013). Une perte des propriétés oxydatives dans le muscle suite à la déplétion ou l'inhibition de *mstn*, a été également identifiée dans plusieurs études. Une réduction de l'activité enzymatique de la citrate synthase (CS) et de la succinate déshydrogénase (SDH), une diminution de l'expression mRNA de *Pparδ* et *CPT1* ainsi que de l'expression protéique de la porine mitochondriale, ont été observées dans le muscle KO *mstn* (Amthor et al., 2007, Ploquin et al., 2012, Rélizani et al., 2014, Mouisel et al., 2014). Ceci suggère un impact de l'absence de *mstn* à la fois sur la structure (diminution du pool mitochondrial), sur la biogénèse et la fonction mitochondriales, mais également sur tout le métabolisme aérobie en amont.

Cette altération du métabolisme oxydatif dans le muscle déficient en *mstn* est en partie expliquée par le shift vers les fibres de type II. En effet, les travaux récents de Rélizani et Mouisel ont montré dès les deux premières semaines de traitement par administration de récepteur soluble activin IIB que les muscles traités perdent leur métabolisme oxydatif mais conservent leur phénotype. Ceci suggère que les altérations métaboliques dans la souris KO *mstn* ne sont pas totalement expliquées par ce shift glycolytique et met l'accent sur le rôle de *mstn* dans la conservation des propriétés aérobies (Rélizani et al., 2014, Mouisel et al., 2014).

◆ Action sur le tissu adipeux et vers un métabolisme lipidique musculaire modifié...

Les souris KO *mstn* disposent de moins de tissu adipeux par rapport aux souris normales (McPherron et al., 1997, McPherron & Lee 2002), et inversement, la sur-expression spécifique de *mstn* dans les muscles des souris transgéniques induit une augmentation du tissu adipeux (Reisz-Porszasz et al., 2003). La *mstn* est très peu exprimée dans le tissu adipeux (McPherron & Lee 1997b). Il est intéressant de noter ici que certains travaux de recherches ont alors étudié de manière plus spécifique l'impact de l'absence de *mstn* sur le métabolisme des lipides dans le muscle, principale voie énergétique du métabolisme aérobie. Au début de ce travail de thèse, peu de résultats étaient disponibles, mais des anomalies dans le métabolisme musculaire et en particulier le métabolisme lipidique avaient été mis en évidence. En effet, les premières constatations de McPherron montrent une diminution des AG libres et des TG circulaires chez les souris KO *mstn* par rapport aux souris contrôles (Savage & McPherron, 2010). Plus récemment, les travaux de Mouisel ont montré une diminution de l'expression des PPAR dans les muscles EDL et Soléaire des souris KO *mstn* par rapport aux souris contrôles (Mouisel et al., 2014). Également, plusieurs travaux ont montré dans le muscle déficient en *mstn* une atteinte au niveau des activités enzymatiques de CS, une enzyme principale de cycle de Krebs qui intervient dans la dégradation des substrats énergétiques tels que les lipides (Ploquin et al.,

2012, Mouisel et al., 2014, Pauly et al., 2015). Finalement, les travaux de Pauly et al en 2015 ont montré une diminution du transporteur membranaire des lipides FAT/CD36 chez les souris KO mstn, un nouvel indice qui nous a amené à étudier le métabolisme lipidique musculaire du modèle déficient en mstn au cours de cette thèse.

Au regard de ces premiers résultats, et des troubles fonctionnels et métaboliques décrits dans le tissu déficient en mstn, l'étude exhaustive du métabolisme lipidique dans le tissu musculaire déficient en mstn apparaît pertinente afin d'identifier par la suite des possibilités de remodelage et d'amélioration de la qualité de ce muscle hypertrophié. Le 2^{ème} chapitre de cette introduction est donc consacré au métabolisme lipidique et de manière plus générale au lipidome, et de son impact dans la fonction musculaire.

En résumé

♦ **Au niveau contractile et métabolique, le muscle squelettique présente une plasticité grâce à une typologie de fibres variée allant du type I, endurantes, au type IIx, puissantes mais peu résistantes à la fatigue. Ces propriétés contractiles des fibres musculaires sont associées à 2 filières énergétiques principales ou métabolismes dépendants de l'utilisation ou non d'oxygène dans le muscle, concourant à la production d'ATP. Le métabolisme aérobie ou oxydatif, ici développé, dégrade les substrats lipidiques et glucidiques en présence d'oxygène dans la mitochondrie après différentes étapes métaboliques : β -oxydation (seulement pour les lipides), cycle de Krebs et enfin la phosphorylation oxydative.**

♦ **Au-delà de l'hypertrophie musculaire, l'inhibition de mstn entraîne des altérations métaboliques et fonctionnelles dans le muscle. Ces conséquences sont principalement un changement phénotypique vers des fibres de type II et un métabolisme plus glycolytique, une perte des propriétés oxydatives (diminution du nombre des mitochondries, des activités enzymatiques oxydatives...) ainsi qu'une diminution de l'endurance et de la force musculaire.**

♦ **L'inhibition de mstn induit aussi une diminution de tissu adipeux chez les modèles animaux KO mstn. L'ensemble de ces travaux suggère que la mstn contrôle non seulement la masse musculaire mais aussi le métabolisme lipidique.**

II Métabolisme lipidique, lipidome

Les lipides exercent de multiples rôles biologiques. Comme nous l'avons vu, le catabolisme des lipides par la β -oxydation libère une grande quantité d'énergie. Egalement, les lipides sont des constituants importants des membranes biologiques, et notamment mitochondriales. Ils jouent aussi le rôle de médiateurs cellulaires que nous n'aborderons pas dans cette thèse.

II.1 Acides gras et Triglycérides, structure et classification

Les acides gras (AG) sont les composants majoritaires des lipides assurant leurs propriétés nutritionnelles et métaboliques. Les AG sont des acides monocarboxyliques composés d'un groupement carboxyle (-COOH) et d'une longue chaîne aliphatique de 4 à 36 carbones. La nomenclature des acides gras utilise la représentation suivante : C a:x ; « a » étant le nombre d'atomes de carbone et « x » le nombre de doubles liaisons carbone-carbone dans la chaîne hydrocarbonée. Ils sont classés sur le nombre d'atomes de carbone qui les composent et sur le nombre de doubles liaisons entre ces atomes. On distingue deux grandes familles d'acide gras ; les AG saturés (sans double liaison) et les AG mono- ou polyinsaturés (avec une ou plusieurs doubles liaisons). Ils sont répertoriés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Les différents types et classes des Acides Gras

Nom l'acide gras	Formule	Source alimentaire
Acides gras saturés		
Acide butyrique	C 4:0	Beurre
Acide caprylique	C 8:0	Huile de palme
Acide caprique	C 10:0	Huile de noix de coco
Acide laurique	C 12:0	Huile de noix de coco
Acide myristique	C 14:0	Beurre, huile de noix de coco
Acide palmitique	C 16:0	Toutes graisses et huiles
Acide stéarique	C 18:0	Toutes graisses et huiles
Acide arachidique	C 20:0	Lard, huile d'arachide
Acides gras monoinsaturés		
Acide palmitoléique	C 16:1n- 7	Toutes graisses et huiles
Acide oléique	C 18:1n-9 (cis)	Toutes graisses et huiles
Acide elaidique	C 18:1n-9 (trans)	Huiles végétales hydrogénées, beurre, graisse de bœuf
Acides gras polyinsaturés		
Acide linoléique	C 18:2n-6 (tous cis)	Toutes huiles végétales
Acide alpha-linolénique	C 18:3n-3 (tous cis)	Huiles de soja, colza, lin
Acide dihomogamma-linolénique	C 20:2n-6	Poissons gras
Acide Arachidonique	C 20:4n-6 (tous cis)	Graisse de porc, poulet
Acide eicosapentaénoïque	C 20:5n-3 (tous cis)	Poissons gras
Acide docosahexaénoïque	C 22:6n-3 (tous cis)	Poissons gras

II.1.1 Les acides gras saturés (AGS) :

Leur formule conventionnelle s'écrit ($C a:0$) dans laquelle « a » est un nombre pair compris entre 4 et 32. Ils sont d'origine principalement animale. Ils peuvent être divisés en sous-groupes selon la longueur de leur chaîne :

◆ **Les acides gras saturés à chaîne courte** (AGSCC) (tels que les acides acétique (2:0), propionique (3:0) et butyrique (4:0) se forment lors de la fermentation des fibres dans le côlon proximal où ils sont rapidement absorbés, migrent vers le foie pour y être transformés en glucose. Ce processus peut couvrir 10-20% de la dépense énergétique de repos de l'organisme humain (Tvrzicka et al., 2011).

◆ **Les AGS à chaîne moyenne** tels que les acides caproïque (6:0), caprylique (8:0) et caprique (10:0) sont absorbés et transportés dans le sang par la veine porte. Leur passage dans la mitochondrie pour subir la β -oxydation se fait directement sans l'aide de carnitine ou de carnitine palmitoyl transférases CPT1/CPT2.

◆ **Les AGS à chaîne longue** tels que les acides laurique (12:0), myristique (14:0), palmitique (16:0) et stéarique (18:0) sont issus de l'alimentation principalement par l'apport en huile de coprah, huile de palme, de beurre de cacao et le beurre d'illipé. La consommation des AGS à longues chaînes augmente les niveaux de cholestérol des lipoprotéines de faible densité (LDL) favorisant les maladies coronariennes (Astrup et al., 2010). Les AGS à très longues chaînes comme les acides arachidique (20:0), béhénique (22:0), lignocérique (24:0), cerotique (26:0), montanique (28:0) et mélissique (30:0) augmentent en concentrations dans certaines maladies métaboliques héréditaires, comme le Syndrome de Zellweger, l'adrenoleucodystrophie, la maladie de Refsum et la maladie de Menkes (Gotto & Moon 2012).

L'augmentation de la teneur en AGS membranaires diminue la fluidité des membranes. Ainsi, la mesure du ratio membranaire (Acides gras insaturés/AGS) est utilisée comme un indicateur de fluidité membranaire : plus il est bas, plus la membrane est considérée comme rigide (Holthuis & Menon 2014). Lorsqu'ils sont en excès, les AGS peuvent stimuler un stress cellulaire et une inflammation dans la cellule (Corcoran et al., 2007, Hommelberg et al., 2009, Holzer et al., 2011, Wen et al., 2011, Pillon et al., 2012, Leamy et al., 2013).

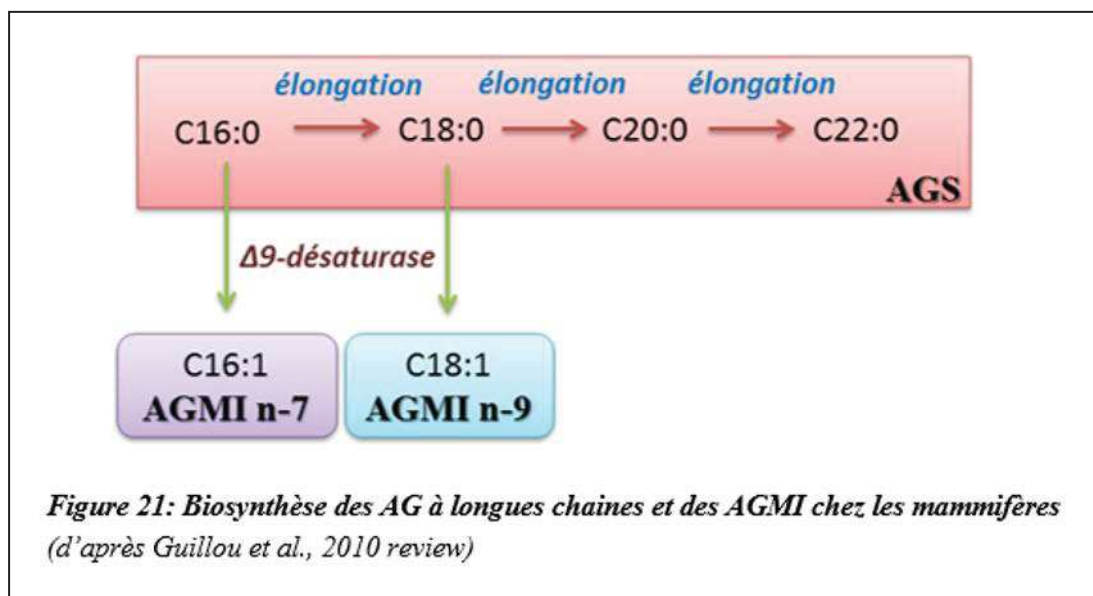
Les AGS synthétisés *de novo* ou issus de l'alimentation, sont pris en charge par des enzymes modifiant la longueur de leur chaîne et /ou insérant une double liaison. Les élongases, enzymes présentes dans l'environnement membranaire allongent les chaînes d'AG par l'ajout de deux

atomes de carbone à la fin d'acides carboxyliques. L'introduction d'une double liaison C=C dans la chaîne carbonée d'un acide gras est assurée par des acide gras désaturases.

II.1.2 Les acides gras insaturés :

Ils sont généralement issus de la lipolyse (dégradation des réserves) ou directement de l'alimentation. Leur formule conventionnelle s'écrit C a:x (n-y) où x est le nombre des double liaisons et (n-y) est la position du dernier atome de carbone impliqué dans une double liaison à partir de groupe méthyle (CH₃).

◆ **Les acides gras monoinsaturés** regroupent principalement les acides oléiques (18:1n-9), vaccénique (18:1n-7) et palmitoléique (16:1n-7) (Raff et al., 2006). D'autres acides gras synthétisés de manière endogène comme le myristoléique (14:1n-5), gondoïque (20:1n-9), érucique (22:1n-9) et nervonique (24:1n-9), ne sont présents que dans des concentrations mineures. L'acide oléique (18:1n-9) présente des propriétés antithrombotiques, car il augmente le rapport de cholestérol HDL/LDL et diminue l'agrégation des thrombocytes. L'incorporation d'acide oléique dans des triacylglycérides et des phospholipides de particules de lipoprotéines augmente leur résistance à la lipopéroxydation (Masella et al., 2001, Parthasarathy et al., 1990). L'apport alimentaire riche en acide oléique diminue également le taux sanguin de triacylglycérol (TAG), le cholestérol LDL et régule la sensibilité à l'insuline (Riccardi et al., 2004). L'huile d'olive connue pour sa richesse en acide oléique a également été testée expérimentalement pour son rôle protecteur dans la carcinogenèse (Piegari et al., 2017). La synthèse des AGMI se déroule par la désaturation des AG saturés en ajoutant une double liaison dans la position 9. Cette réaction est catalysée par des enzymes spécifiques, les Δ^9 désaturases appelées aussi stéaroyl-CoA désaturases (SCD), localisées dans le réticulum endoplasmique (Dobrzyn & Ntambi 2005, Guillou et al., 2010). Par exemple l'acide palmitoléique (C16:1n-7) et l'acide oléique (C18:1n-9) sont produits par désaturation respectivement de l'acide palmitique (C16:0) et de l'acide stéarique (C18:0). Cette réaction nécessite d'autres facteurs intervenants comme la NADH / NAD⁺, cytochrome b6, cytochrome b6 réductase et l'oxygène (Dobrzyn & Ntambi 2005) (Figure 21).



Il existe deux isoformes de SCD identifiées chez les humains (SCD1 et SCD5), quatre identifiées chez la souris (SCD1, SCD2, SCD3 et SCD4), et deux chez les rats (SCD1 et SCD2) (Wang et al., 2005). L'isoforme SCD1 est fortement exprimée dans le muscle squelettique et influence la composition des AG, l'estérification des lipides, la lipogénèse, la β -oxydation et l'absorption du glucose (Stamatikos et al., 2013). En effet, les souris KO SCD1 présentent une augmentation de l'activation de l'AMPK et de la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT-1) dans les fibres oxydatives de type I liée à une augmentation de l'oxydation des AG dans le muscle (Dobrzyn & Ntambi 2005). Cela suggère que la β -oxydation est améliorée dans le muscle squelettique des souris KO SCD1 afin de permettre aux AGS de s'oxyder au lieu de s'accumuler dans le tissu musculaire, empêchant ainsi les effets néfastes de la lipotoxicité (Rogowski et al., 2013). En outre, l'expression de SCD1 est sensible à l'exercice physique et au régime alimentaire. En effet, les athlètes entraînés en endurance présentent une expression des ARNm élevée de la SCD1 et le contenu des TG intramusculaires est élevé (Dobrzyn et al., 2010, Bergman et al., 2010, Goodpaster et al., 2001).

Il existe aussi une autre désaturase impliquée dans la synthèse d'AGMI, la $\Delta 6$ -désaturase. Cette dernière introduit une double liaison au niveau de la position 6 de la chaîne carboxylique de l'acide palmitique pour donner l'acide spiénique (C16:1n-10) (Guillou et al., 2010). Les AGMI ainsi synthétisés rentrent dans la composition de plusieurs classes lipidiques majeures telles que les phospholipides membranaires et les TG (Ntambi et al., 2004).

◆ **Les Acides gras polyinsaturés (AGPI)** sont classés selon la position du premier carbone de l'extrémité méthyle terminale engagé dans une double liaison : il y a quatre grandes familles d'AGPI : n-7, n-9, n-6 et n-3.

Les AGPI n-7 et n-9 ne sont généralement pas des acides gras de structure et sont très minoritaires dans les conditions nutritionnelles normales ; ils peuvent être synthétisés *de novo* à partir de l'acide palmitique et stérique (Simopoulos 2010).

Les animaux en général (et les mammifères en particulier) ne peuvent pas insérer des doubles liaisons en position n-6 ou n-3 contrairement aux organismes végétaux. Les mammifères sont incapables de synthétiser les AGPI précurseurs n-6 (acide linoléique ou 18:2n-6) et n-3 (acide α -linoléique ou 18:3n-3) (Burdge 2011, Wallis et al., 2002, Jump 2002). Ces deux AGPI précurseurs, doivent donc être fournis par l'alimentation, ce qui en fait des acides gras essentiels. Les huiles végétales les plus riches en 18:2n-6 sont les huiles de tournesol, de maïs, de carthame et de pépins de raisin. Celles riches en 18:3n-3 sont les huiles de colza, de soja et de noix.

Les deux familles d'AGPI (n-3) et (n-6) suivent la même voie de synthèse par une succession de désaturation et d'élongation puis une rétroconversion peroxysomale selon les AGPI formés (Holman 1988, Sprecher 2000) (Figure 22). La biosynthèse des AGPI est réalisée principalement dans le foie cependant d'autres tissus comme le muscle squelettique sont capables de les synthétiser aussi.

Le principal AGPI (n-6) contenu dans les phospholipides des tissus des mammifères est l'acide arachidonique (AA) (20:4n-6). Il peut être apporté par l'alimentation (viande, œuf...) ou synthétisé à partir du 18:2n-6. Les AGPI à longue chaîne n-6 sont des activateurs de PPAR- γ . Ainsi, une supplémentation alimentaire en AGPI n-6 entraîne une diminution des contenus plasmatiques des Triglycérides et des LDL (Dias et al., 2017).

Le principal AGPI (n-3) présent dans les tissus de mammifères est l'acide docosahexaénoïque (DHA) (22:6n-3). Il peut être apporté par l'alimentation (poisson, viande...) ou formé à partir du 18:3n-3 (Simopoulos et al., 1991). Il joue un rôle important dans le mécanisme de la transduction du signal cellulaire (Simopoulos et al., 1991). Des études ont montré que les n-3 activent les PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) en diminuant la lipogenèse et la sécrétion de lipoprotéines (LDL) (Burdge et al., 2009). En outre, une supplémentation alimentaire en huile de poisson augmente la densité mitochondriale et la β -oxydation des acides gras dans le muscle (Philp et al., 2015). Les travaux de Jicha et Markesbery en 2010 sur les cellules nerveuses montrent que les AGPI n-3 augmentent la fluidité membranaire et facilitent l'incorporation des protéines membranaires.

Les AGPI possède plusieurs rôles dans l'organisme ; un rôle structural en tant que composants indispensables des phospholipides membranaires et un rôle de signaux comme régulateurs essentiels de l'expression génique (Serhan et al., 2008).

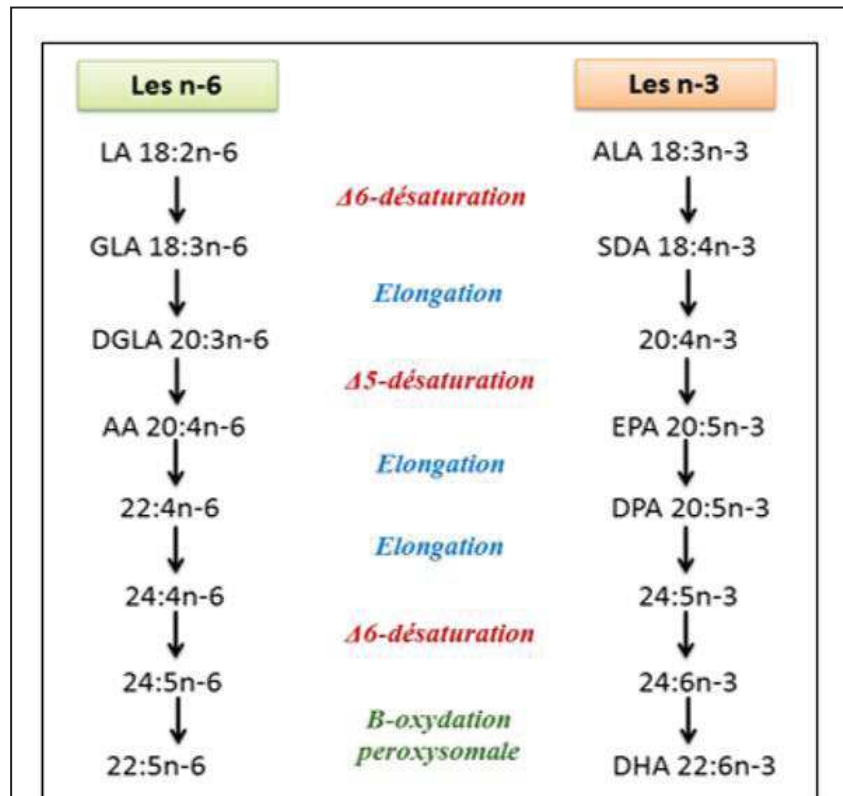


Figure 22: Biosynthèse des AGPI n-3 et n-6 chez les mammifères (d'après Guillou et al., 2010 review)

LA : acide linoléique, GLA : acide γ-linolénique, DGLA : acide dihomo-γ-linolénique, AA : acide arachidonique, ALA : acide α-linolénique, SDA : acide stéaridonique, EPA : acide eicosapentaénoïque, DPA : acide docosapentaénoïque, DHA : acide docosahexaénoïque

II.1.3 Les Triglycérides, estérification des Acides Gras et réservoir d'énergie

La majorité des AG captés dans le muscle (90% à partir du plasma) sont oxydés ou stockés sous forme des TG dans le muscle. Le reste des AG est incorporé dans la formation des phospholipides, des sphingolipides et du cholestérol (Dyck et al., 1997).

Les acyl-CoAs générés par l'enzyme Acyl-CoA synthétase (ACS) subissent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique une série de réactions d'estérifications avec le glycérol venu de la glycolyse et initiées par la glycérophosphate acyltransférase (GPAT) pour former un premier acide lysophosphatidique, puis l'acide phosphatidique. Ce dernier est hydrolysé ensuite par la phosphatidate phosphohydrolase (PAP) ou la monoacylglycerol Acyltransférase (MAGT) pour former du diacylglycérol (DAG), qui subit une acylation finale par la diacylglycerol acyltransférase (DGAT) pour obtenir les TG intracellulaires et des phospholipides (Funai & Semenkovich, 2011, Coleman et al., 2000, Farese et al., 2009, Takeuchi & Reue 2009) (Figure 23).

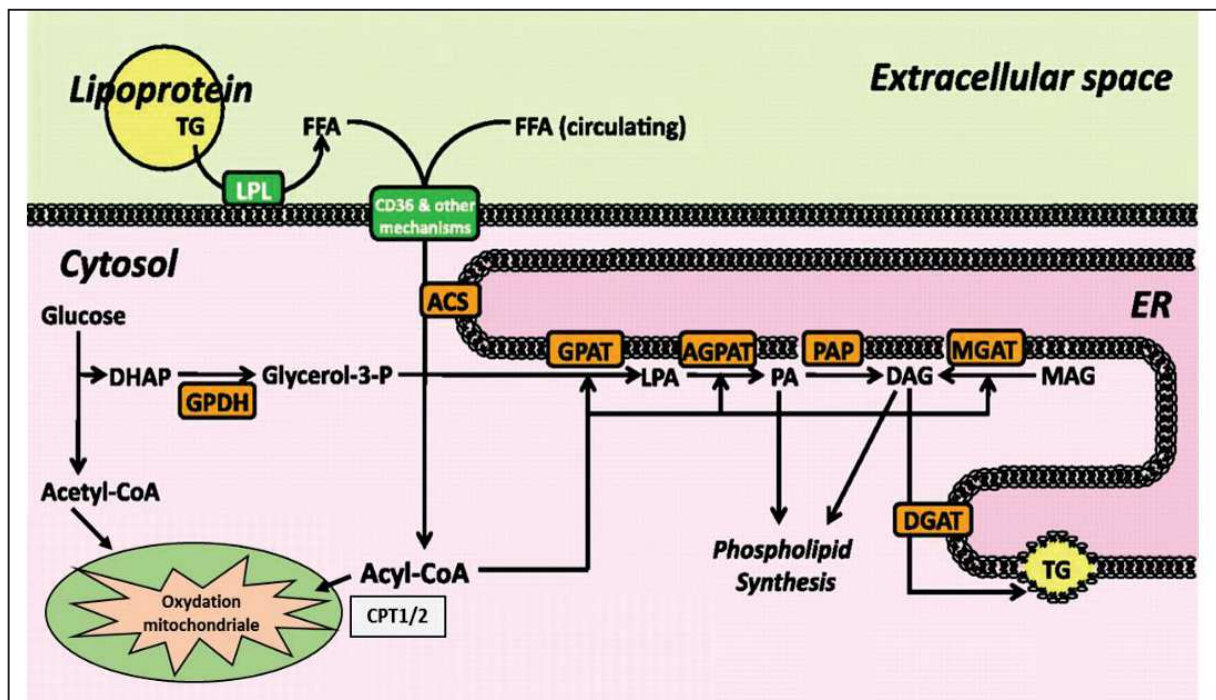


Figure 23: La ré-estérification des AG en TG dans le muscle squelettique (D'après Funai & Semenkovich, 2011)

Les AG libres transportés jusqu'à la membrane cellulaire passent dans le cytoplasme grâce aux transporteurs membranaires (exemple FAT/CD36). Ils seront ensuite convertis en Acyl-CoA par l'enzyme acyl-CoA synthétase (ACS). En absence de la demande d'oxydation mitochondriale afin de fournir l'énergie, l'Acyl-CoA ou le glycérol venu de la glycolyse subissent une série des réactions d'estérifications pour former un premier acide phosphatidique sous l'intervention de glycérophosphate acyltransférase (GPAT). Cet acide phosphatidique intégrera la formation des phospholipides ou il subira une série d'estérification afin d'être hydrolysé par la phosphatidate phosphohydrolase (PAP) ou la monoacylglycerol Acyltransférase (MAGT) pour former ensuite le diacylglycérol (DAG). Ce dernier subit une acylation finale par la diacylglycerol acyltransférase (DGAT) pour obtenir les TG intracellulaires.

Les triglycérides (TG), ou triacylglycérols, sont la forme de stockage des AG (Figure 23). Ils sont stockés dans l'organisme (au sein des adipocytes, du foie et du muscle) sous forme de gouttelettes lipidiques à proximité des organites cellulaires comme la mitochondrie et le réticulum sarcoplasmique constituant un énorme réservoir d'énergie avec une capacité de production d'ATP équivalente au glycogène musculaire (Harriman & Reed 1972, Sacchetti et al., 2002). C'est la réserve d'énergie la plus importante, représentant en moyenne 15 % de la masse corporelle d'un adulte. C'est une source d'énergie privilégiée pour les efforts prolongés. Le contenu musculaire en TG a été corrélé avec le potentiel oxydatif du muscle, ainsi une fibre musculaire de type I contient 3 fois plus de TG que la fibre de type II (Kiens 2006). En plus du type de fibre, le contenu en TG dans le muscle est variable selon le régime alimentaire, le sexe et l'entraînement physique. Il est démontré qu'un régime riche en calories (High FAT Diet) pendant 4 semaines augmente 50% le contenu en TG chez des sujets normaux (Kiens et al., 1987). Des travaux ont montré que les femmes possèdent un niveau de TG dans leurs muscles supérieur à celui des hommes (Steffensen et al., 2002). Enfin, l'entraînement en endurance également augmente le contenu en TG (Schrauwen-Hinderling et al., 2003, Phillips et al., 1996).

En résumé,

◆ **Les acides gras (AG) sont les composants majoritaires des lipides. Ils sont classés selon le nombre des atomes de carbone qui les composent et selon le nombre de doubles liaisons entre ces atomes. On distingue les AG saturés (sans double liaison) et les AG mono ou polyinsaturés (avec une ou plusieurs doubles liaisons).**

◆ **L'apport en AG saturé est essentiellement alimentaire même si l'organisme est capable de les resynthétiser de novo dans le foie ou le tissu adipeux. L'augmentation de leur taux membranaire diminue la fluidité de la membrane. L'apport en AG mono-insaturé est aussi essentiellement alimentaire mais l'organisme est capable de les synthétiser à partir des AGS (C16 :0 et C18 :0) grâce à l'activité enzymatique de la Δ^9 -désaturase. En revanche, l'organisme est incapable de synthétiser les AG polyinsaturés et l'apport en AGPI précurseurs (n-3 et n-6) est uniquement alimentaire. Ces derniers subissent une succession de désaturation et d'élongation puis une rétro-conversion péroxysomale produisant d'autres espèces d'AGPI selon le besoin de l'organisme. Ces AG sont importants dans la signalisation cellulaire et le maintien de la fluidité membranaire.**

◆ **Quand les AG sont en excès, ils sont stockés et réestérifiés par les enzymes du réticulum endoplasmique en triglycérides dans le foie, le tissu adipeux et aussi dans le muscle, représentant une réserve énergétique pour l'organisme surtout pendant l'exercice.**

II.2 Voies de synthèse des Acides Gras

Les lipides captés dans le muscle possèdent plusieurs origines. Ils sont en majorité exogènes venus de l'absorption intestinale des nutriments, des TG hépatiques transportés par les lipoprotéines (VLDL) jusqu'au sarcolemme ou issus de la lipolyse de tissu adipeux. Ces lipides sont ensuite transportés dans le cytosol cellulaire et transformés en acétyl-CoA par la β -oxydation puis métabolisés dans la matrice mitochondriale (voir paragraphe I.4.2) ou ré-estérifiés et mis en réserve sous forme des gouttelettes lipidiques appelées TG intracellulaires. Néanmoins, d'autres tissus comme le foie et le tissu adipeux (contribution limitée du muscle squelettique) sont capables de re-synthétiser des AG *de novo*, endogènes, à partir de l'acétyl-CoA. En outre, le foie, le tissu adipeux, et autres tissus essentiellement le muscle squelettique, peuvent remanier ces AG endogènes et exogènes par élongation et/ou désaturation.

II.2.1 Catabolisme des Acides gras à partir du tissu adipeux

La lipolyse du tissu adipeux se produit constamment au repos, mais 70% des AG libérés sont ré-estérifiés en TG dans le tissu adipeux. Cependant, lors de l'exercice modéré et prolongé, les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) se fixent sur leurs récepteurs adrénergiques pour activer les enzymes responsables de la lipolyse tels que l'adipose triglycéride lipase (ATGL), hormone sensitive lipase (HSL), et monoacylglycerol lipase (MGL) dans le tissu adipeux (Kiens 1997). Ainsi, la lipolyse peut augmenter trois fois en réponse aux besoins énergétiques notamment lors de l'exercice pour libérer plus d'AG dans le plasma.

II.2.2 Entrée/Transport des acides gras dans le tissu musculaire :

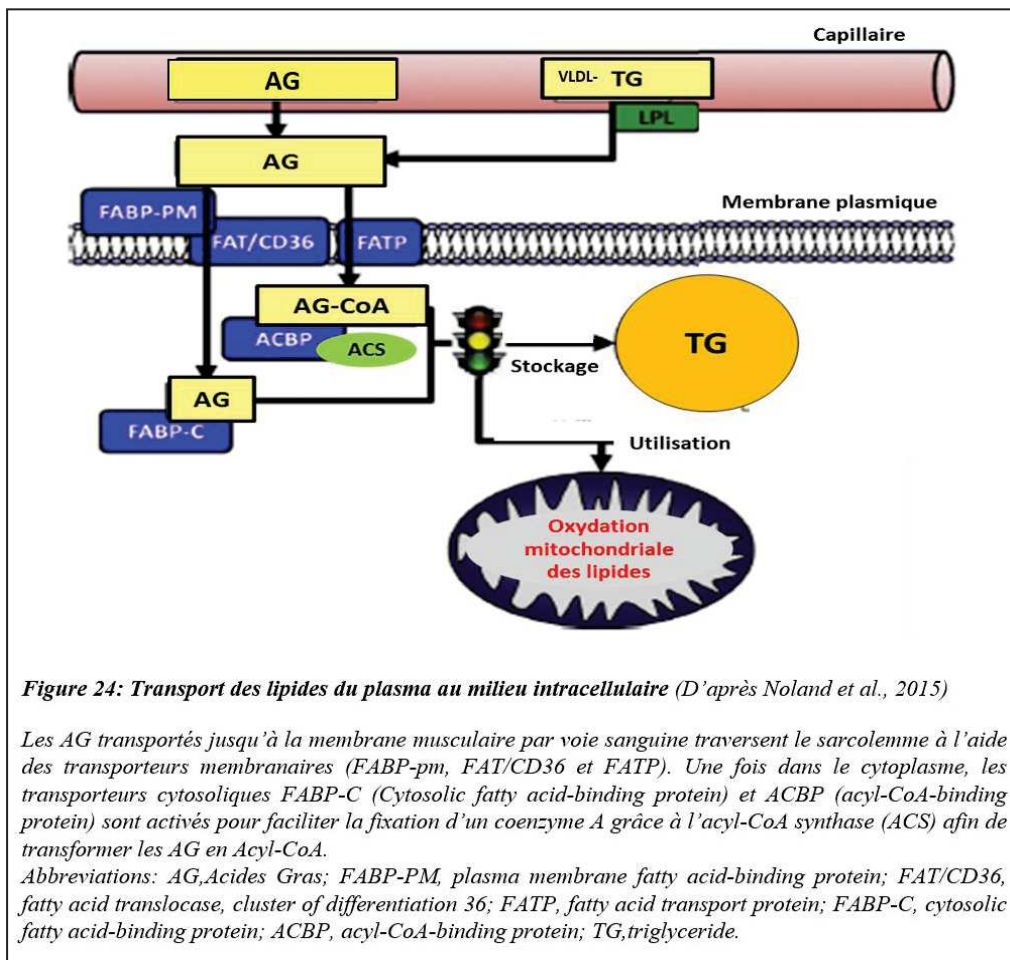
Le muscle squelettique capte les AG non estérifiés du plasma. Ces AG ont trois origines différentes : 1-en relation avec l'absorption intestinale des aliments, 2- en relation avec le tissu adipeux où les AG sont ensuite transportés par l'albumine jusqu'à la membrane musculaire, 3- en relation avec le foie, où les TG sont transportés par les VLDL (very low density lipoprotein) dans le plasma et convertis en AG non estérifiés par les lipoprotéines lipases (LPL) au niveau membranaire. A l'état basal ou en cas d'un excès alimentaire en lipides, une partie des AG absorbés par les intestins est directement stockée sous forme de TG dans le tissu adipeux. Ceci présente une réserve énergétique qui sera mobilisée et utile en cas d'un stress énergétique (Exercice, jeûne...) (Frayn et al., 2006).

L'entrée des AG au niveau de la membrane musculaire (surtout les AG à longue chaîne) se fait à l'aide des transporteurs membranaires notamment le FAT/CD36 (fatty acid translocase

36), le FABPpm (plasma membrane-associated fatty acid-binding protein) et les FATP (1-6) (fatty acid transport proteins). Ces transporteurs assurent 70% du transport lipidique basal (Luiken et al., 1999, Luiken et al., 2000, Holloway et al., 2009) (Figure 24).

FAT/CD36, FABPpm, FATP1 et FATP4 sont les transporteurs les plus abondants dans les fibres oxydatives de type I et moins exprimés dans les muscles glycolytiques (Bonen et al., 2000, Nickerson et al., 2009). Contrairement aux FAT/CD36 et FABPpm qui fonctionnent d'une manière coopérative, les FATPs sont des transporteurs autonomes. Ils ont leur propre activité enzymatique qui permet de convertir les AG de longues chaînes captés, en Acyl-CoA ce qui va faciliter leur oxydation dans la mitochondrie par la suite (Stremmel et al., 2001, Dirusso et al., 2005, Nickerson et al., 2009).

Dans le cytoplasme, les AG se lient aux transporteurs cytosoliques FABP-C (Cytosolic fatty acid-binding protein) et ACBP (acyl-CoA-binding protein) et sont activés par la fixation d'un coenzyme A grâce à l'acyl-CoA synthase (ACS) pour faciliter leur oxydation ou leur stockage en TG (Kiens 2006, Luiken et al., 2003) (Figure 24). Le contenu en FABP-C et ACBP ne change pas avec l'entraînement dans le muscle (Kiens 2006). Cependant, la suppression de FABP-C a entraîné une diminution environ de 45-50% de l'apport total des AG dans le muscle (Luiken et al., 2003).



II.2.3 Synthèse de novo des Acides Gras

La synthèse *de novo* des AG se déroule en deux étapes distinctes (Figure 25). Dans un premier temps, se produit la carboxylation de l'acétyl-CoA provenant de la β -oxydation des AG et de l'oxydation du pyruvate (glycolyse aérobie) en Malonyl-CoA. Cette réaction est catalysée dans le cytoplasme de la cellule par une enzyme clef de synthèse des AG ; l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Munday 2002). Dans un second temps, une série de réactions s'effectuent grâce à la fatty acide synthase (FAS) par fixation d'une molécule d'acétyl-CoA et l'allongement en utilisant des groupements malonyl en cours de 7 cycles de réaction pour aboutir au palmitate (C16 :0). Le malonyl-CoA va libérer ainsi, au cours de l'élongation, son groupement carboxyl sous forme de CO₂ en présence d'agent réducteur NADPH. L'allongement des AG catalysé par la FAS s'arrête à C16 en libérant l'acide palmitique (C16 :0) mais aussi d'autres AG peuvent être synthétisés comme le stéarate (C18 :0) ou à plus courte chaîne comme le myristate (C14 :0) (Semenkovich 1997). Ce sont des AG non estérifiés saturés (Figure 25).

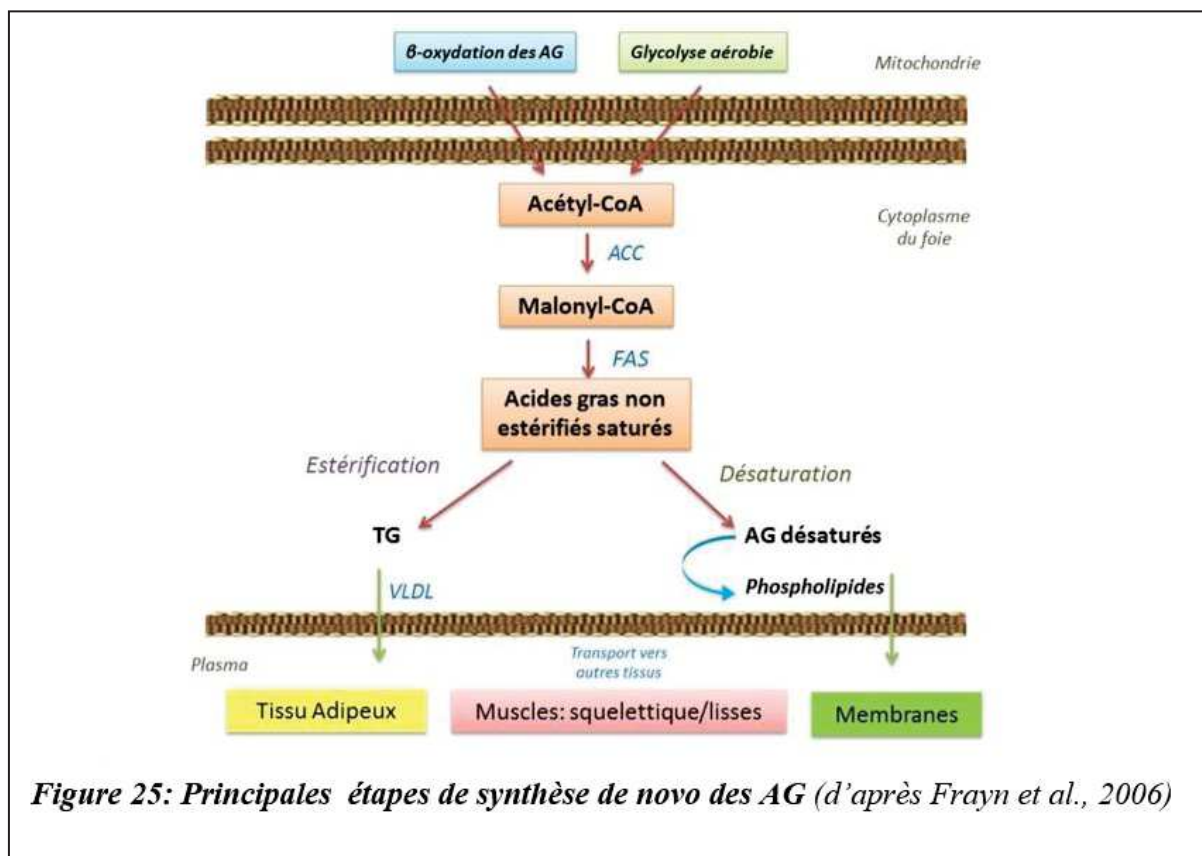


Figure 25: Principales étapes de synthèse de novo des AG (d'après Frayn et al., 2006)

Les AG synthétisés *de novo* et les AG exogènes (origine alimentaires ou tissu adipeux), vont subir ou non des transformations métaboliques pour obtenir des nouveaux types d'AG (AGS, AGMI, AGPI). Ces modifications sont l'estérification pour former des TG et l'élongation et/ou la désaturation des AG (voir partie II.2). Ces derniers sont transportés dans

le sang pour servir ultérieurement à d'autres tissus pour la synthèse des phospholipides membranaires ou la production d'énergie.

Le muscle squelettique est capable de synthétiser l'Acétyl-CoA et le malonyl-CoA (synthétisé à partir du glucose), premiers produits utilisés dans la biosynthèse des AG (Figure 25). Cependant, l'expression de la FAS, enzyme convertisseur de malonyl-CoA en AG, est faiblement exprimée ou inexistante dans le muscle. En conséquence, la contribution du muscle squelettique dans la biosynthèse des AG est limitée, donc la synthèse des TG musculaires est assurée essentiellement par l'apport plasmatique en AG alors que le malonyl-CoA servira à contrôler la β -oxydation. Ainsi, le muscle squelettique, lui-même est capable de modifier les AG exogènes captés du plasma, selon ses besoins métaboliques, par désaturation ou estérification (former ses propres TG) (Pender et al., 2006, Frayn et al., 2006).

II.2.4 Catabolisme des Acides Gras dans le muscle squelettique :

Dans le cas d'une insuffisance lipolytique du tissu adipeux ou du foie pour apporter des lipides dans le plasma, le muscle est capable de mobiliser des AG à partir de ses réserves en TG musculaires par hydrolyse sous l'action des enzymes lipases : adipose triglyceride lipase (ATGL), hormone sensitive lipase (HSL), et monoacylglycerol lipase (MGL).

Comme détaillé précédemment, une fois dans le cytosol de la cellule musculaire, les AG libérés de TG ou captés de la circulation, sont transformés en Acyl-CoA sous l'action de l'enzyme ACS. Cette réaction consomme deux molécules d'ATP pour la formation des Acyl-CoA qui seront transportés par les CPT1/2 vers la matrice mitochondriale pour subir la β -oxydation et fournir l'Acétyl-CoA (Voir partie I.4.2). Le malonyl-CoA est un inhibiteur potentiel de CPT1, ce qui entraîne une diminution du transport des AG dans la mitochondrie et leur oxydation (McGarry et al., 1983, Bavenholm et al., 2000, Chien et al., 2000). La formation de malonyl-CoA à partir de l'Acétyl-CoA (généralement issu de l'oxydation de pyruvate) est catalysée par l'ACC (acétyl-CoA carboxylase). Au repos, l'augmentation des concentrations de glucose entraîne une augmentation de concentration de malonyl-CoA dans le muscle des rongeurs (Bavenholm et al., 2000, Rasmussen et al., 2002, Saha et al., 1999). L'activité d'ACC est inhibée par l'AMPK (AMP-activated protein kinase) (Winder & Hardie 1996). Ce dernier est activé par l'exercice physique dans le muscle squelettique ce qui explique l'augmentation de la β -oxydation et la lipolyse une fois que l'AMPK est activé (Foretz et al., 2005).

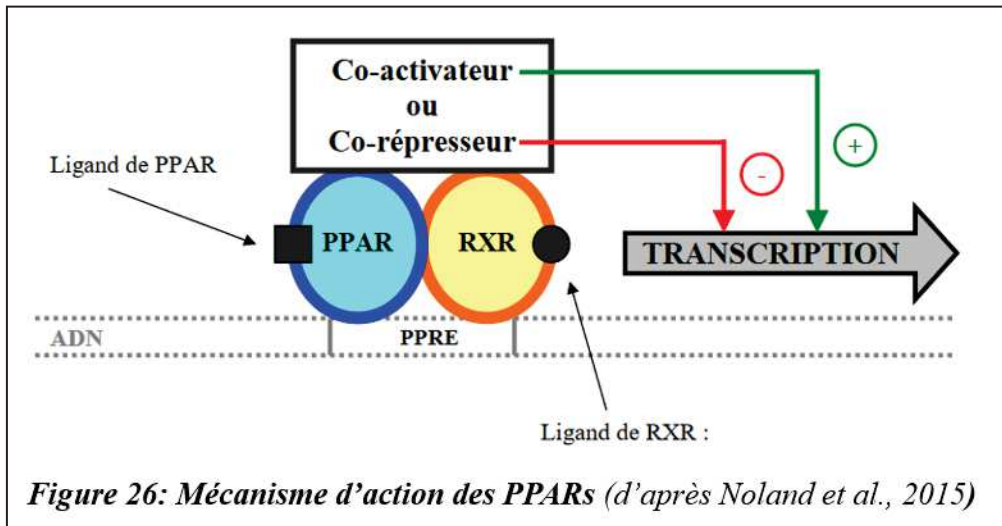
En résumé

- ◆ Les lipides captés dans le muscle proviennent de l'absorption intestinale des nutriments ou de la dégradation des stocks de triglycérides (hépatiques, adipeux et musculaires) en AG libres. Ces derniers arrivent au niveau du sarcolemme et traversent la membrane via les transporteurs membranaires FAT/CD36, FATP1-4 et FABPpm.
- ◆ Une fois dans le cytoplasme, les AG seront liés aux transporteurs cytosoliques FABP-C et ACBP afin de les acyler pour faciliter leur transport. Ils sont alors soit dégradés dans la mitochondrie, soit réestérifiés en triglycérides intracellulaires en cas de lipotoxicité.
- ◆ Le passage et la dégradation des AG dans la matrice mitochondriale nécessite un système de transport membranaire mitochondrial assuré par la carnitine palmitoyltransferase (CPT1/CPT2) pour subir dans un premier temps la β -oxydation, puis l'ensemble des réactions de cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative.

II.3 Régulation transcriptionnelle du métabolisme lipidique

II.3.1 PPAR δ et métabolisme lipidique dans le muscle

Les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) sont une famille de récepteurs nucléaires découverts depuis 1990. Comme tous les récepteurs nucléaires, ils possèdent une structure moléculaire composée de domaines fonctionnels. Les PPARs forment un hétérodimère avec le récepteur rétinoïde X (RXR) et se lient à des sites d'ADN spécifiques connus sous le nom d'éléments de réponse des PPAR (PPREs) afin de moduler la transcription (Figure 26). Les PPARs stimulent les gènes cibles en recrutant des co-activateurs. On distingue trois isotypes PPAR α , PPAR β/δ , et PPAR γ formant les sous-familles PPARs. Chaque isoforme est spécifique à un tissu. PPAR α est abondant dans le tissu oxydatif et régule l'oxydation des AG. Il est exprimé dans le foie et le cœur, les reins, la muqueuse intestinale et le muscle squelettique. Son absence entraîne une diminution de l'oxydation des AG dans le foie et le cœur cependant son effet dans le muscle squelettique est minime (Campbell et al., 2002, Muoio et al., 2002). PPAR γ est capable d'exprimer deux protéines différentes : PPARG-1, est exprimé de façon ubiquitaire, et PPARG-2 est présente principalement dans le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Son rôle est impliqué dans l'adipogenèse (Gray et al., 2005).



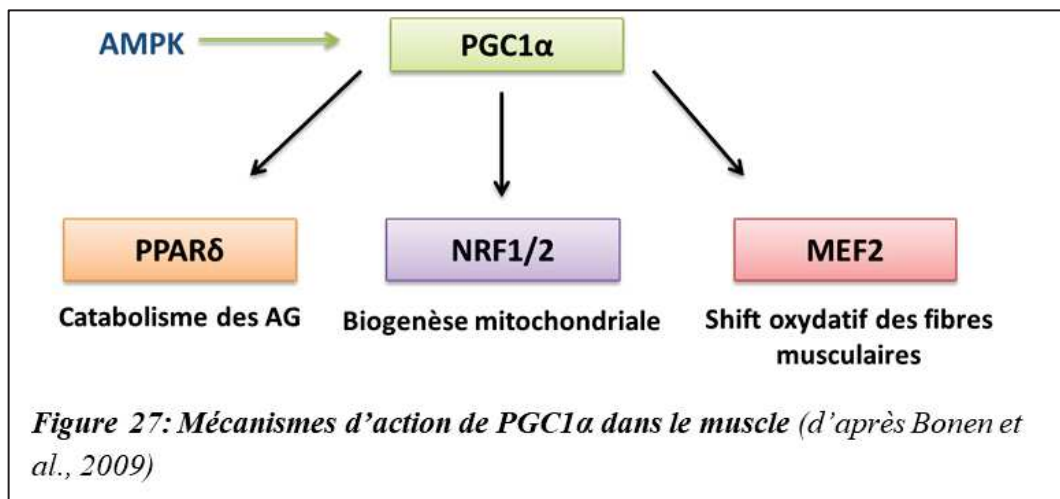
Ici on s'intéresse surtout à PPAR δ qui prédomine dans le muscle squelettique (Krämer et al., 2006). Il possède des cofacteurs comme PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha) et AMPK (Narkar et al., 2008). PPAR δ est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus oxydatifs, et dans les fibres de type I (Wang et al., 2004). Il favorise l'oxydation des AG et la production d'ATP (Gilde et Van Bilsen 2003, Kliewer et al. 2001). Il contrôle également l'expression de la SCD1 (delta 9 desaturase). En effet, l'injection de l'agoniste de PPAR δ , GW0742 dans des myotubes inhibe l'expression de SCD1 (Qin et al., 2008). En outre, PPAR β / δ stimulent l'expression de la lipoprotéine lipase (LPL) et de FAT/CD36, qui augmentent le flux des AG dans les cellules musculaires et favorise l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4), qui réduit l'oxydation du glucose (Manickam & Wahli, 2017). La sur-expression de PPAR δ chez la souris augmente l'activité enzymatique de CS et β -HAD, et transforme les fibres musculaires vers un type IIa plus oxydatif. Inversement, la suppression spécifique de PPAR δ chez les souris induit un métabolisme des AG altéré, une diminution de l'expression de PGC1 α avec une perte des propriétés oxydatives des fibres musculaires (Schuler et al., 2006).

II.3.2 PGC1 α et métabolisme lipidique dans le muscle

PGC1 α est un co-activateur des PPARs. PGC1 α active l'hétérodimère PPAR β/δ :RXR augmentant l'expression des gènes associés à la β -oxydation. En effet, FAS, FAT/CD36, FATP4 et la lipogénèse *de novo* augmentent dans le muscle des souris surexprimant PGC-1 α .

C'est également un cofacteur de transcription et régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale (Figure 27) et du développement de métabolisme oxydatif de muscle (Puigserver & Spiegelman, 2003b). Il active les facteurs respiratoires nucléaires1 (NRF1) et

NRF2, ce qui entraîne une augmentation de l'expression des gènes mitochondriaux ainsi que les gènes associés à la respiration mitochondriale et la réplication de l'ADNmt (Tfam) (Lin et al., 2002, Kang & Li Ji, 2012). La sur-expression de PGC-1 α dans les myoblastes augmente l'ARNm des complexes respiratoires, l'expression protéique du cytochrome c oxydase (COX) ainsi que l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Chabi et al., 2005).



Enfin, PGC-1 α participe aussi à la régulation de la typologie des fibres musculaires. En effet, PGC1 α active MEF2 pour stimuler l'expression des gènes de fibre musculaire à contraction lente et favorisant un phénotype de type 1 oxydatif (Lin et al., 2002, Schuler et al., 2006). En effet, Mortenson et al ont montré que la sur-expression de PGC-1 α dans les cellules primaires du muscle squelettique du rat entraîne une augmentation des ARNm des isoformes des chaîne lourdes de myosine (MHC) lentes et une diminution en revanche des taux d'ARNm des isoformes de MHCIIX et de MHCIIb rapides (Mortenson et al., 2006). Les souris déficientes en PGC-1 α présentent une diminution du contenu mitochondrial et de la capacité aérobie, qui se manifeste par une intolérance à l'exercice (Leone et al., 2005).

Nous pouvons noter ici qu'AMPK augmente l'expression de PGC-1 α et des PPARs dans le muscle notamment lors d'un stress énergétique tel que l'exercice physique. C'est un activateur du métabolisme énergétique cellulaire afin d'améliorer la performance musculaire (Lee et al., 2006, Sriwijitkamol et al., 2006).

En résumé

◆ **La régulation du métabolisme lipidique musculaire est assurée par un ensemble des facteurs de transcription dont les PPAR δ et PGC1 α .**

◆ **PPAR δ est exprimé dans le muscle surtout dans les fibres I oxydatives. Il favorise l'oxydation des AG et l'activité des enzymes oxydatives ainsi que l'expression des transporteurs membranaires des lipides notamment le FAT/CD36.**

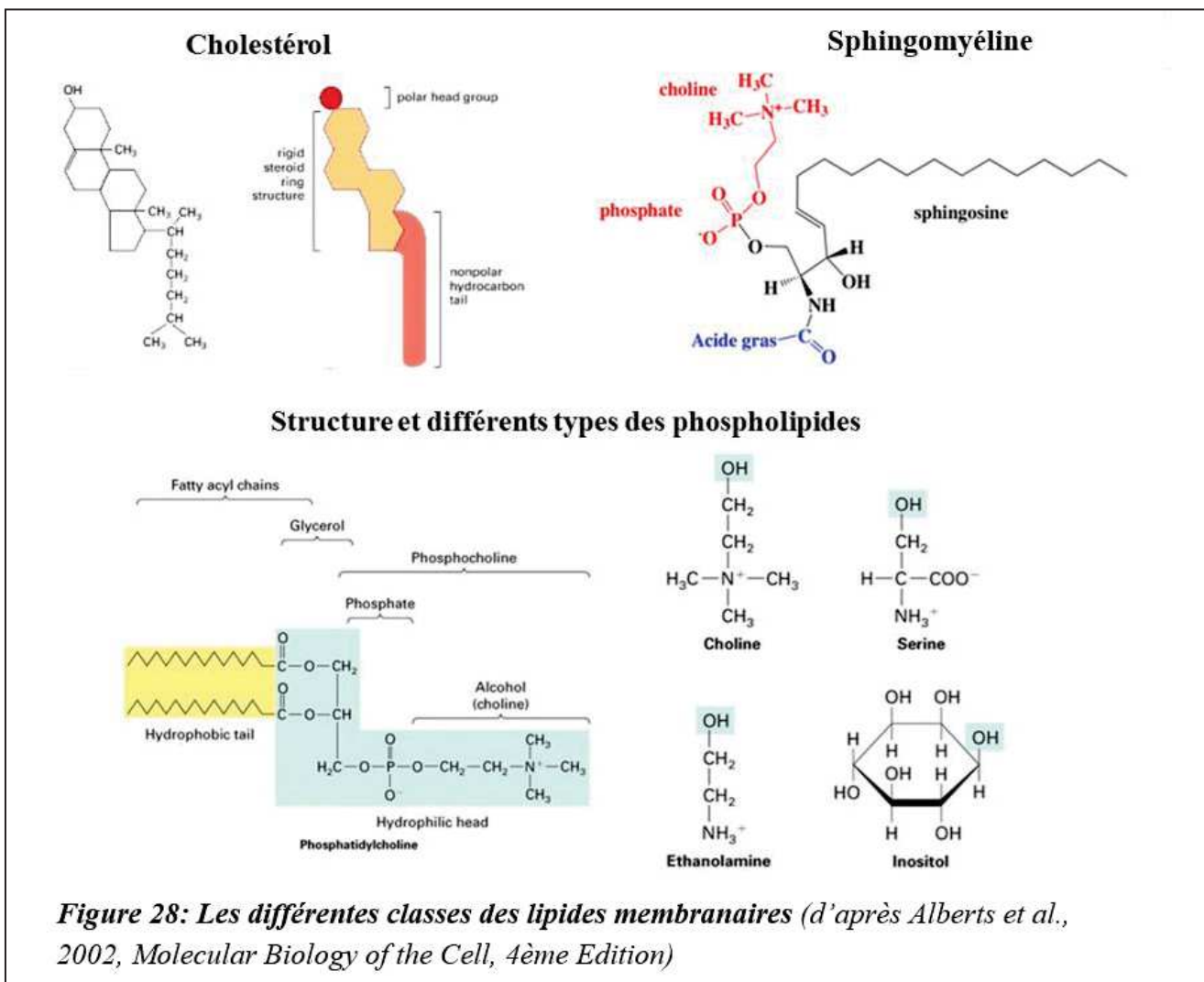
◆ **PGC1 α est un coactivateur des PPAR qui favorise à la fois le catabolisme des lipides et la lipogénèse. Quand il est surexprimé, il augmente l'expression des transporteurs membranaires (FAT/CD36, FATP4) mais aussi l'expression de FAS et la synthèse de novo des AG. PGC1 α participe aussi à la régulation de la typologie des fibres musculaire en favorisant l'expression des fibres de type I oxydatives. Il est également un régulateur majeur de la biogénèse mitochondriale et favorise le développement du métabolisme oxydatif dans le muscle.**

II.4 Phospholipides, Cardiolipide et métabolisme mitochondrial

II. 4.1 Rappels sur les phospholipides, principaux constituants des membranes cellulaires et leurs fonctions dans le tissu musculaire

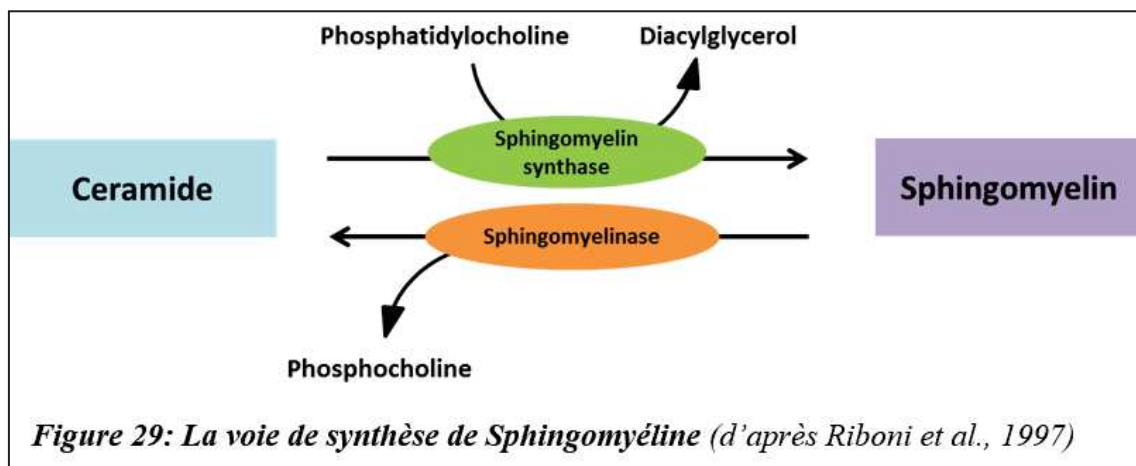
La membrane cellulaire est constituée de trois types de lipides membranaires tels que :

- le **cholestérol**, dérivé cyclique de stérol (alcool) constitué d'un noyau stérane sur lequel sont fixés une queue apolaire hydrocarbonée et un groupement hydroxyl (OH) (Figure 28).
- les **glycolipides**, dérivés du sphingosine dont la plus connue est la sphingomyéline. Cette dernière est constituée d'une unité céramide liée à un résidu de choline (alcool) par liaison phosphate-ester (Figure 28).
- les **phospholipides** (appelés aussi glycérophosphatides ou phosphoglycérides).



◆ **Les sphingolipides/sphingomyéline (SM)** sont constitués de la sphingosine (au lieu du glycérol), un acide gras, un phosphate et un alcool azoté. Les plus courants, les sphingomyélines sont des phospholipides membranaires, présentes dans toutes les membranes mais surtout dans le système nerveux (gânes de myéline). La synthèse de SM est réalisée sur la face interne de Golgi par la SM synthase qui transfère un groupement phospholine de la phosphatidylcholine au céramide en libérant un diacylglycérol pour arriver à une forme finale d'une tête phosphocholine, d'une sphingosine et d'un acide gras (Figures 28-29) (Riboni et al., 1997).

Cette composition permet à la SM de jouer un rôle important dans la transduction du signal cellulaire (Gorski et al., 2002, Massey 2001). Dans les tissus de mammifères, SM représente habituellement 2 à 15% du pourcentage des phospholipides totaux (2% seulement des phospholipides totaux de la membrane mitochondriale de muscle squelettique) (Heden et al., 2016). Les propriétés typiques de SM sont leur faible degré de saturation, leur structure moléculaire asymétrique et leurs propriétés étendues de liaison à l'hydrogène. Ces caractéristiques sont toutes très importantes pour le rôle structural du SM dans les membranes biologiques. Ils interagissent favorablement avec le cholestérol dans les membranes plasmiques des cellules et à la surface des particules de lipoprotéines (Jicha et Markesbery., 2010).



◆ **Les phospholipides** dérivent du glycérol par estérification en position 3 du glycérol par un dérivé de l'acide phosphorique. En position 1 et 2 on trouve des chaînes hydrocarbonées. Ces chaînes sont associées au glycérol en général par l'intermédiaire de liaisons esters, quelquefois par des liaisons éthers. La nature du substituant fixé sur l'acide phosphorique définit la nature du phosphoglycéride. Les phospholipides forment la classe la plus abondante des lipides de la plupart des cellules (Figure 28).

La phosphatidylcholine (PC) est un phospholipide structural majoritaire dans les membranes biologiques formé à partir d'une choline, d'un phosphate, d'un glycérol et de deux acides gras. Il présente environ 34-55% des phospholipides totaux de la membrane mitochondriale de muscle squelettique (Haden et al., 2016). Elle est synthétisée et remodelée dans le réticulum endoplasmique via la voie de choline de la cytidine diphosphate (CDP) ou la voie de Kennedy (Figure 30). La diminution de la PC induit une fragilité membranaire et l'accumulation des triglycérides dans la cellule ce qui favorise l'apoptose (Michel et al., 2011, da Costa et al., 1995). Les souris déficientes en PC mitochondriale dans leur muscle ont un potentiel membranaire faible par rapport aux souris normales associé à un dysfonctionnement mitochondrial et une atrophie musculaire (Wu et al., 2009).

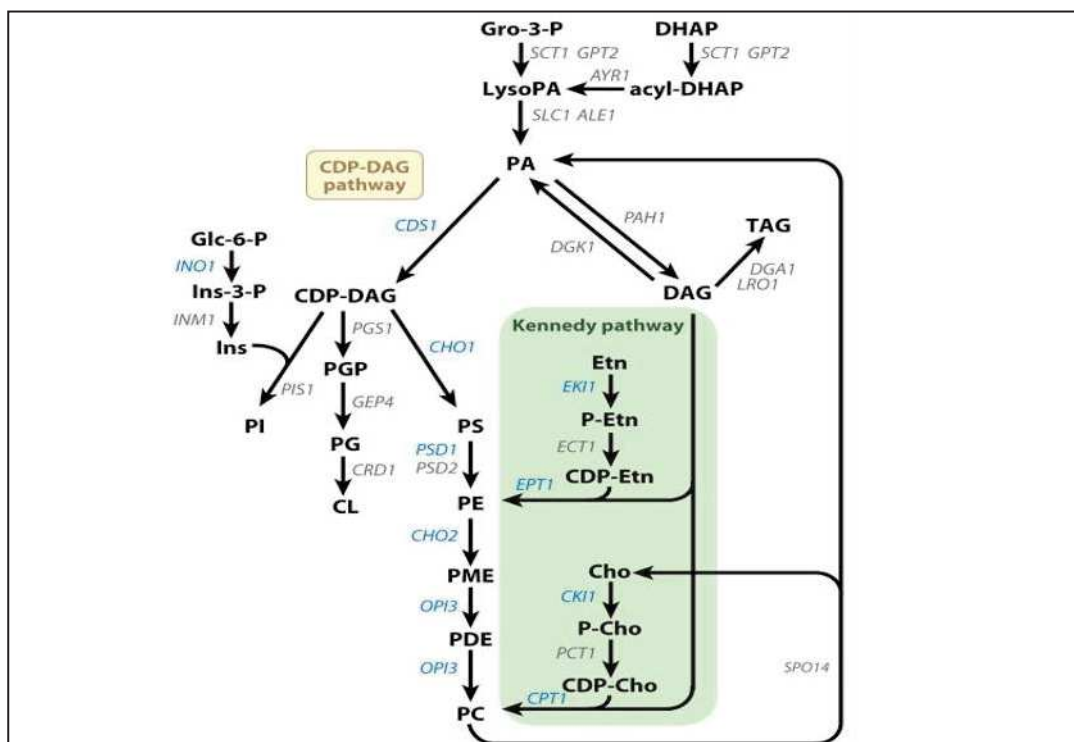


Figure 30: Les voies de synthèse des phospholipides (d'après review Carman & Han, 2009)

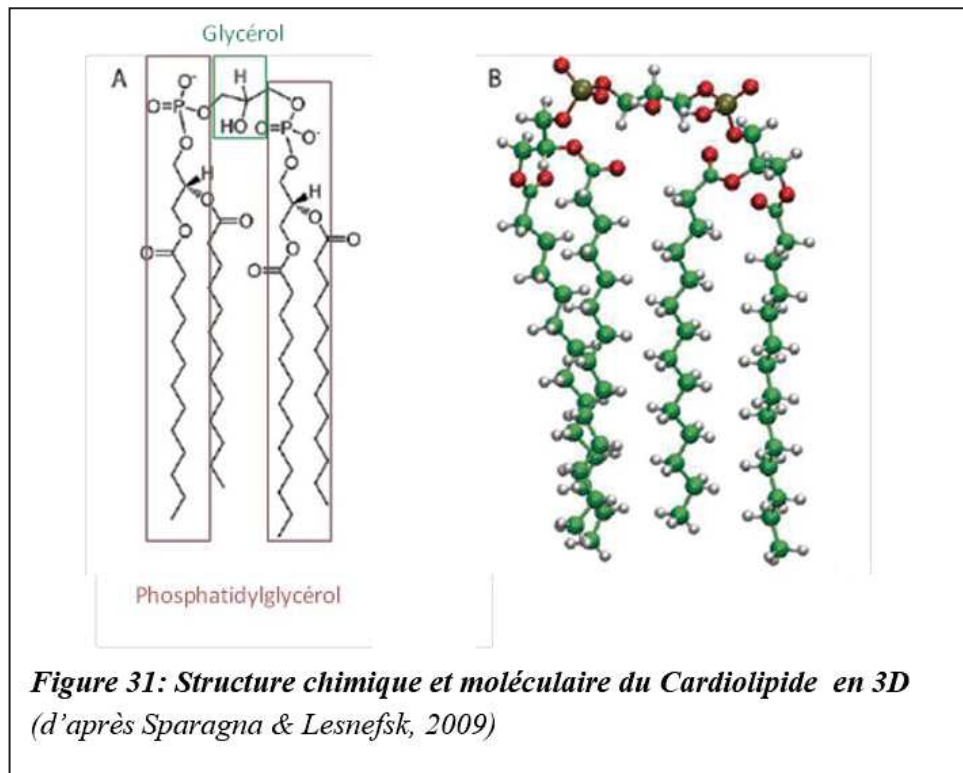
Abbreviations: CDP-DAG, CDP-diacylglycerol; Cho, choline; CL, cardiolipin; Gro, glycerol; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; Etn, ethanolamine; Glc, glucose; Ins, inositol; PA, phosphatidate; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PGP, phosphatidylglycerophosphate; PDE, phosphatidyl dimethylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PME, phosphatidylmonomethylethanolamine; PS, phosphatidylserine; TAG, triacylglycerol

La phosphatidyléthanolamine (PE) est le deuxième phospholipide le plus abondant trouvé dans les mitochondries et le muscle squelettique après la PC (20-35% des phospholipides totaux) (Heden et al., 2016). La PE peut être synthétisée par deux voies principales de biosynthèse qui sont la voie Kennedy ou via la PC dont la dernière étape a lieu sur les membranes du RE ou la voie de la décarboxylation de la PS, qui se produit sur les membranes internes mitochondriales (Kennedy 1956) (Figure 30). La PE joue un rôle important dans le cœur. En effet, la diminution de sa teneur dans les myocytes cardiaques provoque des lésions après une ischémie et une perturbation du potentiel membranaire (Post et al., 1995). Dans le même contexte, une inhibition de la voie de synthèse de la PE dans le muscle squelettique chez des souris mutées provoque une atrophie et une faiblesse musculaire (Selathurai et al., 2015, Funai et al., 2016).

Le phosphatidylinositol (PI) est synthétisé à partir des substrats CDP-DAG et myoinositol sur la membrane de RE (Kim et al., 2011) (Figure 35). Le PI agit comme molécule de signalisation lipidique pour réguler le trafic cellulaire et l'activité des canaux ioniques. L'élimination du PI de la membrane mitochondriale augmente la fission mitochondriale et la mitophagie, ce qui suggère l'importance de ce phospholipide dans la signalisation et la régulation de la biogenèse mitochondriale (Rosivatz & Woscholski 2011).

La phosphatidylsérine (PS) est un phospholipide composé de deux acides gras attachés par une liaison ester au premier et second carbone de glycérol et de sérine (acide aminé) attachés par une liaison phosphodiester au troisième carbone du glycérol. Chez les mammifères, la PS est synthétisée à partir de phosphatidyl-choline (PC) ou de phosphatidyl-éthanolamine (PE) par échange du groupe de tête original par la sérine. La réaction est catalysée par la phosphatidyl-sérine synthase 1 (utilisation de la PC comme substrat) et la phosphatidyl-sérine synthase 2 (utilisation de la PE) localisée dans le réticulum endoplasmique. Puis elle est transportée dans les mitochondries pour subir une décarboxylation via un domaine de l'ER [membranes associées aux mitochondries (MAM)] (Shephard & Hübscher 1969). En général, la concentration de PS est élevée dans les membranes plasmiques et les endosomes, et très faible dans les mitochondries, en particulier dans les membranes internes mitochondriales contrairement à la PC et à la SM qui sont préférentiellement présentes sur la partie externe des membranes (Schick et al., 1976). Dans les membranes plasmiques, la PS possède un rôle important dans le déclenchement de la coagulation sanguine et l'élimination des cellules apoptotiques (Vance & Tasseva 2013). Une élimination de la PS des cellules hépatiques provoque une altération de la fonction mitochondriale, ainsi que de l'homéostasie calcique (Ardail et al., 1991).

La diphosphatidylglycérol ou cardiolipide, est un phospholipide un peu particulier formé de l'association de deux molécules d'acide phosphatidique reliées par l'intermédiaire d'une molécule de glycérol. Il a une structure unique. C'est le seul phospholipide ayant une forme spécifique dimère, constitué de deux acides phosphatidiques liés à un squelette de glycérol au centre (Figure 31). Le nom 'cardiolipide' est dérivé du fait qu'il a été isolé pour la première fois du cœur de bœuf au début des années 1940 (Pangborn 1942). Il a été retrouvé aussi dans quelques cellules végétales et sur la membrane plasmatique des bactéries (Nowicki et al., 2005 ; Dowhan 1997). Cependant, localisé principalement sur la membrane interne mitochondriale (Hoch 1992), ce phospholipide est considéré comme une signature des mitochondries chez les mammifères. Le cardiolipide étant au cœur de ce travail de thèse, le chapitre suivant lui est consacré.



II. 4.2 Le Cardiolipide, un phospholipide spécifique de la membrane mitochondriale

Les mitochondries sont des organites indispensables dans les cellules eucaryotes et participent aux divers processus cellulaires tels que la production d'ATP, la signalisation cellulaire, l'apoptose et la croissance cellulaire. Elles possèdent une double membrane ; externe et interne qui bordent deux compartiments aqueux, l'espace inter membranaire et la matrice. Bien que les mitochondries contiennent leur propre génome, la plus grande partie du protéome mitochondrial est codée par des gènes nucléaires et synthétisée dans les ribosomes cytosoliques comme protéines "précurseurs" puis transportées dans la mitochondrie à travers les membranes

(Picard et al., 2011). Ces dernières sont constituées de protéines et de phospholipides. Les mitochondries importent la plupart de leurs phospholipides du cytoplasme pour former et maintenir leurs membranes (Moyes & Hood, 2003)

La membrane mitochondriale externe (MME) est une bicouche de phospholipides qui contient des composants essentiels tels que les protéines de transport. On trouve sur cette membrane, le complexe TOM (Translocase of the outer membrane), une protéine de transport qui facilite l'importation de protéines précurseurs dans la mitochondrie. Egalement, le complexe SAM (sorting and assembly machinery) permet l'insertion des protéines tonneau β comme la Porine (VDAC), Tom40, Sam50, Mdm10 (Mitochondrial Distribution and Morphology 10) sur la membrane (MacPherson & Tokatlidis, 2017). La MME contient une variété de lipides membranaires, les plus abondants étant la phosphatidylcholine (54%) (PC), la phosphatidylethanolamine (29%) (PE) et le phosphatidylinositol (14%) (PI) (de Kroon et al., 1997, Daum & Vance, 1997). Les autres phospholipides trouvés aussi en faible quantité (3% des lipides totaux) sont la phosphatidylserine (PS), le phosphatidylglycerol (PG), le cardiolipide (CL), l'acide phosphatidique (PA), les lysophospholipides, les stérols et la sphingomyéline (SM). La composition de la MME en phospholipides reste relativement similaire entre les différentes espèces (mammifères, plantes et levures) (Mejia & Hatch., 2015) (Figure 32).

La membrane mitochondriale interne (MMI) est structurellement plus complexe. Elle a une plus grande surface par rapport à la MME. Cela est dû aux crêtes qui forment la matrice mitochondriale. Son contenu en protéines est plus important que celui de la MME dans tous les types de cellules (Daum & Vance, 1997). Elle contient essentiellement les protéines et les complexes de la chaîne de transport d'électrons (ETC) ou la chaîne respiratoire mitochondriale où se produit finalement l'ATP. En effet, la capacité de métaboliser l'ADP et de produire l'ATP dans les mitochondries est assurée par le transporteur de nucléotides d'adénine (ANT) (Klingenberg, 2008). La MMI assure aussi d'autres fonctions comme le transport des lipides et de protéines, la régulation du métabolisme cellulaire et le stockage du calcium nécessaire à la transduction du signal (Klingenberg, 2008). Sa composition lipidique est différente de la membrane externe. PC et PE restent les phospholipides les plus abondants dans la MMI, représentant environ 75% des lipides totaux (Daum & Vance, 1997). La plus grande différence lipidique entre les deux membranes est la quantité en CL. MMI contient une plus grande concentration de CL, environ 15 à 20% de la masse totale de phospholipides (Daum & Vance, 1997). La raison pour cette richesse de MMI en CL sera discutée ultérieurement. C'est un phospholipide spécifique à la mitochondrie. Contrairement aux autres phospholipides

synthétisés totalement ou en partie dans le RE, le CL est synthétisé exclusivement dans la mitochondrie (Paradies & Ruggiero 1990) (Figure32).

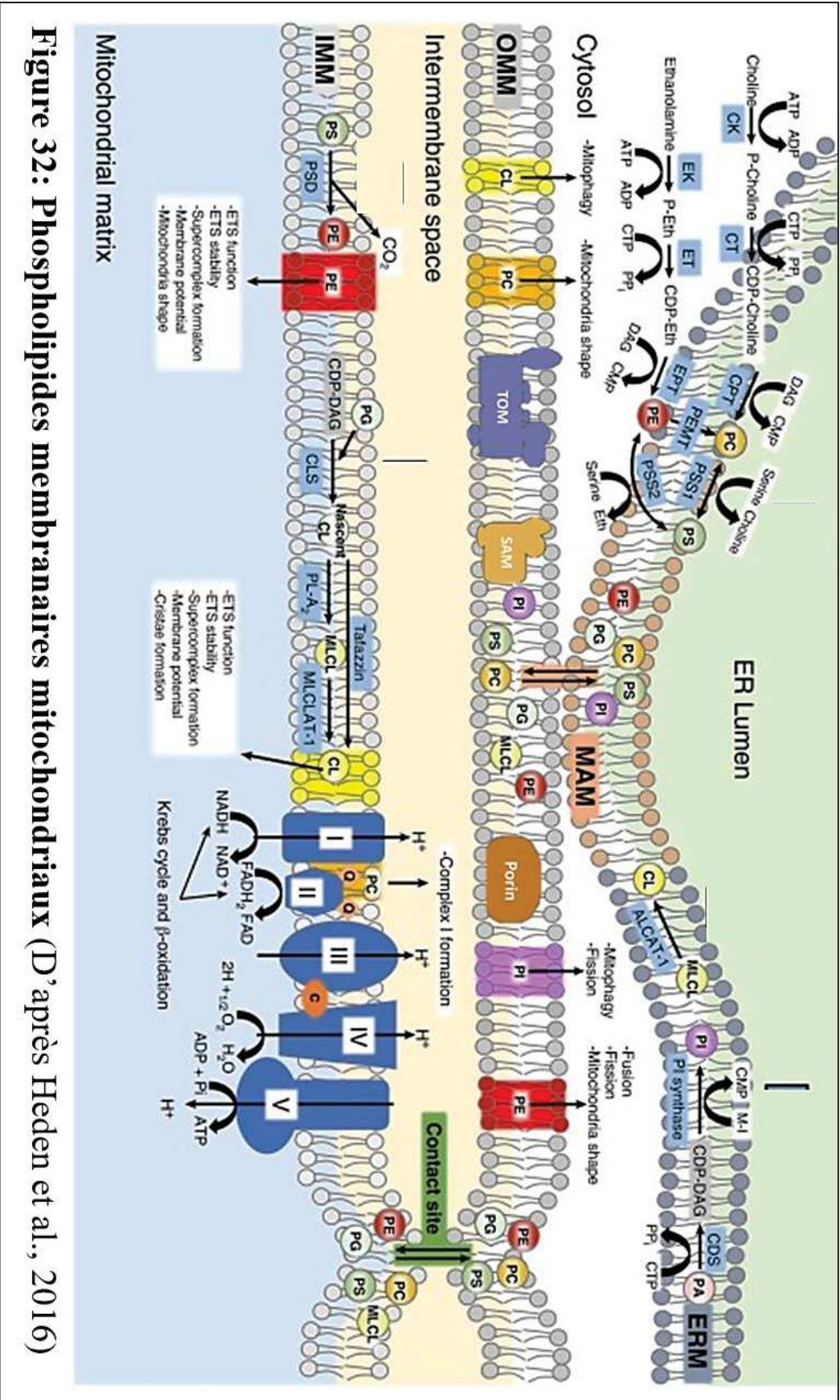


Figure 32: Phospholipides membranaires mitochondriaux (D'après Heden et al., 2016)

III.4.3 Synthèse et remodelage du Cardiolipide

Chez les mammifères, la synthèse du CL se situe dans la membrane interne de la mitochondrie sous le contrôle d'un ensemble d'enzymes de synthèse et de remodelage (Figure 38). La première étape de la voie de biosynthèse du CL est la conversion de l'acide phosphatidique (PA), transporté de la membrane externe à la membrane interne, en CDP-diacylglycérol (CDP-DAG) par la CDP-DAG synthase (CDS) (Hatch 1994).

La phosphatidylglycérolphosphate synthase (PGS1) catalyse le transfert du groupe phosphatidyl du CDP-DAG à une molécule de glycérol-3-phosphate pour générer du phosphatidylglycérolphosphate (PGP). Le PGP est ensuite déphosphorylé en phosphatidylglycérol (PG) par la PGP phosphatase (PTPMT1). La dernière étape de la voie biosynthétique est catalysée par la cardiolipide synthase 1 (CLS1), une enzyme spécifique à la synthèse du CL, afin qu'un deuxième groupe phosphatidyle s'ajoute au PG à partir d'une autre molécule CDP-DAG, pour générer des CL pré-maturés. Pour former un CL mature qui contient 4 chaînes d'acyles, la phospholipase CLS1 enlève une chaîne acyl pour produire le monolysocardiolipide (MLCL) (Mårtensson et al., 2017) (Figure 33). En effet, la CLS1 est une dé-acylase spécifique au CL localisée dans la membrane interne de la mitochondrie (Schlame et al., 1993). Sa suppression conduit à de grands changements dans la composition moléculaire du CL caractérisés par une diminution des chaînes acyls insaturées dans le CL et une réduction du ratio CL / MLCL (Beranek et al. 2009). Par la suite, la transacylase Taffazine (Taz) amène une chaîne acyl d'un second phospholipide comme PC à MLCL pour former le CL mature (Mårtensson et al., 2017).

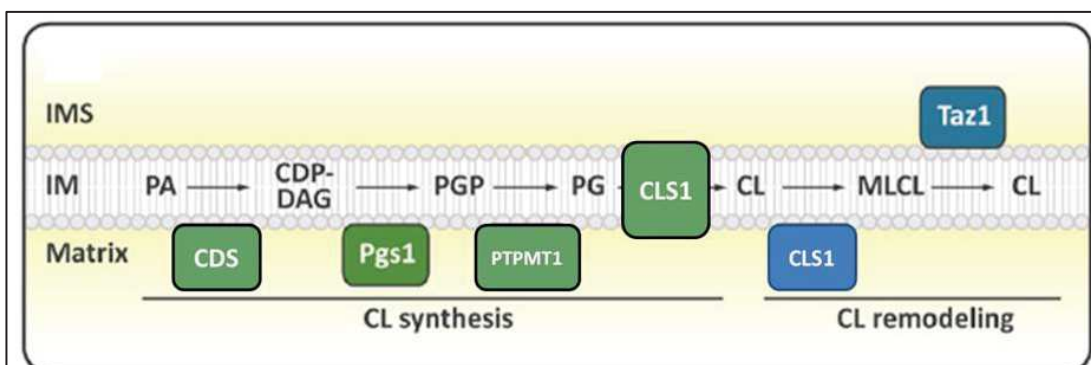


Figure 33: La voie de biosynthèse du CL (d'après Mårtensson et al., 2017)

La voie de biosynthèse du cardiolipine (CL) se passe dans la membrane interne des mitochondries. CDS convertit l'acide phosphatidique (PA) en cytidine diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG). Pgs1 ajoute du 3-glycerol-phosphate à CDP-DAG pour générer du phosphatidylglycérolphosphate (PGP), qui est ensuite déphosphorylé par la PGP phosphatase (PTPMT1) pour produire du phosphatidylglycérol (PG). La CL synthase (CLS1) Crd1 combine PG avec une seconde molécule de CDP-DAG pour produire un CL prématuré. L'activité consécutive de la lipase CLS1 et de la transacylase Taz remodèle la composition de la chaîne acyl par l'intermédiaire de la monolysocardiolipine intermédiaire (MLCL) pour donner un CL mature.

Bien que les premières étapes de biosynthèse se produisent au niveau de la membrane mitochondriale interne, la Taz s'associe avec la membrane externe et interne pour réaliser le remodelage de CL (Schlame 2013, Mårtensson et al., 2017). En effet, la Taz est l'enzyme clé du remodelage, localisée sur le côté extérieur de la membrane mitochondriale interne et sur le côté intérieur de la membrane externe, c'est-à-dire en face de l'espace intermembranaire (Claypool et al., 2006) (Figure 33). La Taz transfère des AG linoléiques au CL, créant ainsi le CL tetralinoléique mature. Les mutations au niveau de gène humain de Taz, ont été liées au syndrome de Barth, une maladie caractérisée par une neutropénie, cardiomyopathie dilatée, myopathie et retard de croissance (Barth et al., 1983).

Le CL peut être transféré de la membrane mitochondriale interne vers l'extérieur par NDPK-D, une protéine de l'espace intermembranaire (Kagan et al., 2016). Cette translocation permet l'accessibilité du CL aux facteurs cytosoliques à la surface externe des mitochondries. Ces facteurs régulent les différents événements cellulaires (apoptose, mitophagie, autophagie...) (Kagan et al., 2014)

Alternativement à la TAZ, les études montrent que la ré-acylation de MLCL peut se produire également dans le réticulum endoplasmique par l'enzyme acyl-CoA lysoCardiolipide acyltransférase-1 (ALCAT-1). Cette dernière ajoute des chaînes acyles polyinsaturées sur le CL, créant une forme immature de la molécule, détectée pendant des conditions pathologiques (Cao et al., 2004, Li et al, 2012).

Contribution des PGC1 α et PPAR dans la synthèse et le remodelage des CL

PPAR et PGC1 α sont des facteurs indispensables dans le contrôle de la biosynthèse du CL et le maintien de sa structure et sa composition en AG normale. En effet, Lai et al ont montré chez des souris KO PGC1 α et PGC1 β une diminution en contenu de CL au niveau du muscle cardiaque et une altération de leur composition en AG. Ces variations ont été corrélées avec la diminution de l'enzyme CDS qui intervient dans la première étape de la synthèse de CL. Les expériences sur des cellules en cultures, ont montré que l'activité de CDS1 est contrôlée directement par PGC1 α via son coactivateur ERR α (Lai et al., 2014). De plus, dans le muscle squelettique des souris KO PGC1 α , Ostojic et al ont confirmé la diminution de l'expression ARNm de CDS accompagnée d'une diminution de l'activité de COX mitochondriale, et une augmentation de l'expression ARNm de ALCAT (Ostojic et al., 2013). Cependant, aucune variation a été observée au niveau du contenu mitochondrial en CL même si leur composition en AG est modifiée. Ceci a été expliqué par un effet de compensation de la part de l'activité

d'ALCAT pour fournir suffisamment de CL. Dans un cas pathologique l'expression d'ALCAT augmente, cependant la présence de PGC1 diminue son expression dans le muscle ce qui suggère le rôle protecteur de PGC1 dans le maintien de la composition en AG du CL et son impact sur l'activité des enzymes de la biosynthèse de CL (Ostojic et al., 2013). Dans un autre contexte, le traitement des souris présentant un diabète type 2 avec des agonistes de PPAR γ (Rosiglitazone) augmente le contenu en CL dans le cœur ainsi qu'un remodelage de sa structure en AG (augmentation de l'acide linoléique 18:2n-6 et diminution de DHA 22:6n-3) (Watkins et al., 2002).

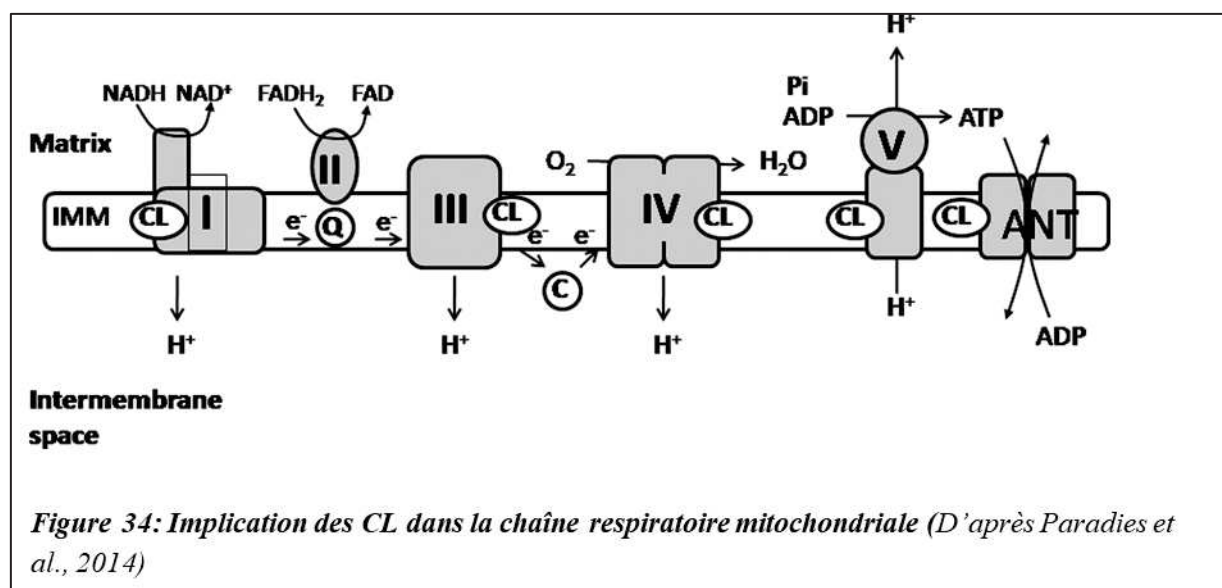
III.4.4 Impact du Cardiolipide sur la fonction mitochondriale et le métabolisme aérobie

L'impact de ce phospholipide, spécifique de la membrane mitochondriale, sur différentes fonctions de l'organe est développé ci-dessous.

◆ **Cardiolipides, chaîne respiratoire et transfert des électrons :**

Le CL est en contact direct avec les différents complexes membranaires (Figure 34) pour faciliter l'échange électron/H⁺ de part et d'autre de la MMI contribuant au gradient électrochimique. Ainsi, 9 molécules de CL sont liées au complexe I dans le cœur bovin (Sharpley et al., 2006). L'absence de CL inactive l'activité d'ubiquinone réductase dans la mitochondrie du cœur alors qu'un enrichissement exogène en CL permet la réactivation correcte du complexe (Fry & Green, 1981, Paradies et al., 2002).

De même, Schwall et al ont montré *in vitro* que la présence de CL est essentielle au maintien de l'activité enzymatique du complexe respiratoire II (succinate déshydrogénase) qui sert de lien entre le cycle de Krebs et la chaîne du transport des électrons (Schwall et al., 2012).



Le complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxido-réductase) joue un rôle dans la chaîne respiratoire, car il catalyse le transfert d'électrons de l'ubiquinone au cytochrome c et couple ce transfert d'électrons par le pompage des protons vers l'espace intermembranaire. La purification de ce complexe a montré des sites de liaisons du CL qui sont nécessaires pour maintenir sa stabilité, son intégrité fonctionnelle et structurelle (Paradies et al., 2014).

Le complexe IV (cytochrome c oxydase (COX)) est également un complexe de protéines-phospholipides. L'isolation de ce complexe du cœur de bovins a montré une liaison étroite avec le CL. Quatre à cinq molécules du CL sont étroitement liées à l'enzyme COX. Leur suppression entraîne une déstabilisation de l'activité du complexe ainsi que de ses sous-unités (Robinson 1993, Sedlák & Robinson, 1999). L'interaction du CL avec le cytochrome c entraîne souvent l'exposition de ce phospholipide aux espèces oxygénées réactives (ROS) produites lors de la chaîne du transfert des électrons. Ceci provoque en conséquent l'oxydation de CL et le changement de sa forme (Petrosillo et al., 2001, Paradies et al., 2011).

Enfin, l'ATP synthase utilise l'énergie fournie par le gradient électrochimique. Il possède également des sites de liaison directs avec le CL. Il a été démontré que ce complexe est lié (sites de liaison) au moins à deux ou trois molécules du CL qui permettent sa stabilité et sa fonction optimale (Pebay-Peyroula et al., 2003). La suppression du CL de la membrane mitochondriale entraîne une altération structurelle et fonctionnelle de ce complexe et une déstabilisation de son interaction avec les autres protéines mitochondriales (Acehan et al., 2011, Claypool 2009).

D'une manière générale, le CL organise et stabilise l'activité de la chaîne de transport d'électrons et la structure des supercomplexes respiratoires impactant la fonctionnalité première de la mitochondrie, la production d'ATP (Paradies et al., 2002, Pebay-Peyroula et al., 2003, Paradies et al., 2014).

◆ **Cardiolipide et les protéines de transports mitochondriales**

Les CL sont également associés aux différentes protéines de transport membranaires. Leur présence assure le maintien du potentiel membranaire (Böttlinger et al., 2012). La déplétion du CL est suffisante pour affecter l'activité des TOM (Transporter Outer Membrane) et déstabiliser les SAM (Sorting and Assembling Machinery) (Gebert et al., 2009). Les complexes TOM et SAM sont des protéines essentielles qui facilitent le passage du substrat dans la mitochondrie (Qiu et al., 2013). La liaison des précurseurs des protéines de transport au complexe SAM est altérée dans les mitochondries dépourvues du CL (Gebert et al., 2009). Par

exemple, la suppression du CL conduit à une dissociation partielle de la sous-unité périphérique Sam37 du complexe SAM (Gebert et al., 2009).

◆ **Cardiolipide, équilibre fusion/fission mitochondriale et apoptose**

Les mitochondries forment un réseau dans la cellule et subissent des événements de fusion et de fission constamment pour permettre leur renouvellement. Des défauts au niveau de la dynamique mitochondriale (fusion/fission) conduisent à une altération de la structure mitochondriale, une perte d'ADNm, et des défauts de la chaîne respiratoire (Friedman & Nunnari, 2014). Plusieurs travaux ont montré l'importance du CL dans la fission mitochondriale. Le CL facilite la fixation de DRP1 (dynamine-related protein1, protéine impliquée dans la division mitochondriale) à la surface mitochondriale sur son site de division (Stepanyants et al., 2015). Le CL est également associé à la fusion mitochondriale. Dans des conditions de stress oxydant, le remodelage du CL est assuré par ALCAT. Or, l'expression de MFN1/MFN2 (Mitofusines, protéines impliquées dans la fusion mitochondriale) est corrélée négativement avec les niveaux d'ALCAT (Li et al., 2012). En conséquence, le remodelage pathologique du CL dans des conditions de stress bloque la fusion mitochondriale via MFN1/MFN2 (Li et al., 2012). En raison de sa teneur élevée en acides gras insaturés, le CL est particulièrement sujet aux attaques oxydatives induites par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'oxydation de CL a été considérée comme une étape précoce de la mort cellulaire apoptotique. Un stress sévère induit l'accumulation de CL oxydée sur la membrane mitochondriale externe (OMM), ce qui entraîne le recrutement de Bax et la formation du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (MPTP) et la libération du cytochrome c (Cyt c) des mitochondries. L'inhibition de l'oxydation du CL est donc une stratégie permettant d'induire une résistance accrue à l'apoptose (Gonzalvez et al., 2007, Petrosillo et al., 2001).

◆ **Cardiolipide et métabolisme oxydatif**

La teneur en CL varie selon de type de tissu, particulièrement élevée dans les muscles avec une grande capacité oxydative, comme le soléaire et le cœur (Schlame et al., 2005, Stefanyk et al., 2010, Fajardo et al., 2017). Le CL est également impliqué dans la β -oxydation des acides gras, car une réduction du CL est associée à une altération de la voie oxydative dans le muscle squelettique et une diminution de l'activité COX mitochondriale (Robinson, 1993, Carper et al., 2008, Maguire et al., 2017, Fajardo et al., 2015).

On retrouve principalement l'acide linoléique (18:2n6) dans la composition en AG du CL. La Taz est le régulateur principal de la composition du CL en 18:2n-6. Comme détaillé dans le chapitre précédent, elle transfère l'AG linoléique de phospholipide donneur au CL immature pour générer des molécules matures (Schlame 2013). La réduction en contenu de CL 18:2n-6 est généralement dûe à une mutation au niveau du gène de Taz ce qui est le cas dans le syndrome de Barth (Phoon et al., 2012). Les modifications du contenu et de la composition en AG de CL sont associées au dysfonctionnement mitochondrial dans plusieurs pathologies y compris le vieillissement, l'ischémie, l'hypertension, le diabète, l'insuffisance cardiaque et les cancers (Mutter et al., 2000, Vreken et al., 2000, Fobker et al., 2001, Schlame et al., 2002, Han et al., 2005, Chicco et Sparagna, 2007, Sparagna et al., 2007, Kiebish et al., 2008 ; Pope et al., 2008). Certaines études aujourd'hui montrent l'implication spécifique du cardiolipide dans la bioénergétique mitochondriale du tissu musculaire.

II.4.5 Cardiolipide et bioénergétique mitochondriale dans le muscle

Le dysfonctionnement mitochondrial a été associé dans plusieurs études à des pathologies musculaires telles que la cachexie, la sarcopénie, les dystrophies musculaires (Julienne et al., 2012, Marzetti et al., 2013, Borgia et al., 2017, Bachir et al., 2017) et aussi à des pathologies métaboliques qui touchent le muscle comme le diabète (Toledo et al., 2007). L'altération de la bioénergie mitochondriale dans ces études est caractérisée par une instabilité des complexes respiratoires entraînant une diminution de la formation d'ATP (Ikeda et al., 2013). En effet, cette perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale s'accompagne souvent d'une diminution du CL qui joue un rôle important dans le maintien de l'activité des complexes respiratoires (revoir III.4.4). Il est intéressant de noter que dans les muscles portant la maladie de Kennedy (atrophie musculaire spinale et bulbaire), une diminution de la densité et de la fonction mitochondriale a été identifiée ainsi qu'une diminution du CL et de son enzyme de synthèse CRLS au niveau des mitochondries isolées avec une augmentation de la mitophagie (Borgia et al., 2017). Des résultats similaires avaient été retrouvés par Antunes et al., en 2014 montrant une réduction du contenu en CL et de l'activité de la chaîne respiratoire (Cytochrome C, ATP synthase) dans les mitochondries des muscles cachexiques (Antunes et al., 2014). De plus, une diminution de la teneur en acide linoléique, principal AG rentrant dans la composition du CL, dans le muscle atténue la fonction mitochondriale et l'activité de la cytochrome c oxydase (Cox) (Fajardo et al., 2015, Yamaoka et al., 1990).

Le rétablissement d'une teneur normale en CL dans les cellules affectées, est aujourd'hui considéré comme un nouveau défi thérapeutique. Quelques travaux proposent

l'activité physique ou le régime alimentaire riche en acide linoléique comme moyens indirects pour restaurer la teneur normale en CL dans le muscle squelettique (Toledo et al., 2007, Lumini et al., 2008, Fajardo et al., 2015). Des nouvelles techniques, basées sur la supplémentation exogène de CL dans des nanodisques (ND) ou l'administration des molécules 2S,4R ketoconazole enantiomer (agissant sur la synthèse du CL) sont également en cours de développement pour notamment le traitement du syndrome de Barth, ciblant directement les CL du cœur (Ikon et al., 2017, Malhotra et al., 2014).

En résumé

◆ **En plus de leur rôle énergétique, les lipides possèdent un rôle structural important dans le muscle. Les membranes musculaires sont constituées principalement des glycolipides, de cholestérol et des phospholipides. Les phospholipides et les acides gras qui constituent ces membranes, influencent leurs propriétés physiques et fonctionnelles.**

◆ **La membrane interne mitochondriale est particulièrement déterminante dans la fonction de l'organe. En effet, elle contient les différents complexes de la chaîne respiratoire assurant la production d'ATP, mais elle présente également une teneur majoritaire en cardiolipide, phospholipide spécifique de cette membrane.**

◆ **Le cardiolipide est un phospholipide crucial dans la fonction mitochondriale. Il contrôle le gradient de protons, assure l'interaction et la stabilisation des complexes respiratoires mitochondriaux et interagit avec les protéines de transports. Egalement, le cardiolipide contrôle l'apoptose ainsi que la fusion/fission mitochondriale.**

◆ **La synthèse du CL mature au niveau de la mitochondrie se réalise au travers de deux étapes distinctes : un processus de synthèse au niveau de la membrane interne via diverses réactions enzymatiques contrôlées notamment par la CL synthase, et un processus de remodelage dont l'enzyme clé est la transacylase Taffazine.**

III Entraînement en endurance

Le muscle squelettique est composé d'un mélange hétérogène de fibres musculaires variable d'un muscle à l'autre qui signe son identité contractile et métabolique. Cette identité est fixée en grande partie par la loi génétique (Komi et al., 1977, Bouchard et al., 1986). Cependant, d'autres facteurs pharmacologiques (drogues et médicaments) ou physiologiques comme l'entraînement en endurance influencent les caractéristiques des fibres et donc l'efficacité du muscle entier.

III.1 Un stimulus physiologique efficace pour améliorer le métabolisme aérobie

L'activité contractile est un des facteurs principaux capables de modifier le muscle et les fibres qui le composent. L'entraînement en résistance et en force favorise l'hypertrophie, effet non recherché ici dans le contexte des stratégies d'inhibitions de la mstn. Nous nous concentrons donc sur les effets de l'entraînement en endurance.

Les travaux de Pette en 1984, ont montré qu'une stimulation continue à basse fréquence dans le muscle du lapin favorise une transition vers un phénotype lent avec une proportion plus importante de fibres de type I (Pette, 1985). De même, l'entraînement en endurance permet au sein des fibres rapides une conversion vers un phénotype plus oxydatif (transition des fibres de types Ib & Ix vers des fibres de type Ia) (Acosta & Roy 1987, Simoneau et al., 1985, Brownson et al., 1988, Pette 1992, Krüger et al., 2013). L'entraînement par la répétition de stimulation du système musculaire permet d'établir des caractéristiques durables, associées à des changements structuraux mais aussi métaboliques comme une augmentation du nombre de mitochondries, de leurs fonctions, de l'activité des enzymes oxydatives ou encore une élévation de la densité capillaire pour un meilleur échange gazeux (Saltin et al., 1977, Holloszy 1967, Henriksson 1977, Hermansen & Wachtlova, 1970). Les mitochondries du muscle squelettique possèdent une plasticité extraordinaire en réponse aux différents stress métaboliques. En effet, l'entraînement aérobie active la biogenèse mitochondriale et augmente la capacité d'oxydation des substrats (Holloszy 1967). A l'inverse, la sédentarité et l'inactivité physique diminuent le contenu mitochondrial ainsi que les propriétés oxydatives de muscle (Henriksson & Reitman 1977).

L'entraînement en endurance est donc aujourd'hui reconnu comme un stimulus efficace pour améliorer le métabolisme aérobie, notamment grâce à son impact moléculaire sur les voies

signalétiques, contrôlées par les facteurs de transcription PPAR δ et PGC1 α , déterminants dans ce métabolisme.

PPAR δ est l'isoforme prédominante dans le muscle squelettique et particulièrement plus abondante dans les fibres oxydatives de type I (Braissant et al., 1996, Muoio et al., 2002, Wang et al., 2004). Il a été démontré que l'exercice à court terme ou l'entraînement en endurance augmente l'expression des PPAR δ (Ehrenborg & Krook 2009). Les souris qui sur-expriment PPAR δ sont appelées « les souris marathoniennes » en regard de leur capacité d'endurance hors norme (Wang et al., 2004, Luquet et al., 2003). En outre, AMPK et PGC1 α interagissent en permanence avec Ppar δ , ce qui augmente considérablement sa transcription pendant l'exercice. PGC1 α et AMPK se lient au complexe PPAR δ par l'intermédiaire de RXR (hétérodimère), ce qui entraîne une amélioration de la performance de l'exercice (Narkar et al., 2008). De même, AMPK et PGC1 α sont capables d'augmenter indépendamment la performance de l'exercice, cependant, l'activation de ces facteurs en présence de PPAR δ induit une meilleure capacité aérobie d'exercice (Nakar et al., 2008, Tadaishi et al., 2011, Kleiner et al., 2009). Développons maintenant ici plus spécifiquement l'impact de l'entraînement en endurance sur les voies impliquant les lipides, principal substrat énergétique (Koh et al., 2017).

En résumé

◆ **L'entraînement en endurance consiste en la répétition des exercices prolongés d'une intensité modérée, inférieure à 65% de la VO₂ max. Ce type d'exercice stimule le système aérobie et améliore les propriétés oxydatives du muscle squelettique (conversion des fibres vers des fibres oxydatives, augmentation de l'activité des enzymes oxydatives, augmentation du nombre des mitochondries, augmentation de la capillarisation...)**

III.2 Effet de l'entraînement en endurance sur le métabolisme lipidique

L'utilisation des substrats énergétiques dépend de la durée et de l'intensité de l'exercice. Pour une faible intensité d'exercice (<40% VO₂max), les lipides représentent le carburant prédominant de la cellule musculaire, plus l'intensité augmente, plus le muscle consomme des glucides (Noland 2015). En effet, les pics d'oxydation des graisses se situent entre 45% et 65% de la VO₂max (Achten & Jeukendrup, 2004, Nordby et al., 2006). Ainsi, l'oxydation des lipides augmente de 2 à 3 fois lors de l'exercice sous-maximal (65% VO₂max) selon les

adaptations du muscle squelettique (Helge et al., 2001a, Roepstroff et al., 2002). Au-delà de 60-65% de la VO_2max , le carburant devient principalement les glucides Noland 2015, Helge et al., 2001a).

III.2.1 Transporteurs des Acides Gras dans le muscle pendant l'exercice :

Pour répondre aux besoins énergétiques de muscle, les transporteurs des lipides sont les premiers à répondre à l'exercice. En effet, les études ont montré que l'absorption des AG par le muscle augmente de 50 à 75% après la contraction. Ce résultat est corrélé avec une teneur augmentée en FAT/CD36 et FABPpm (Luiken et al., 1999, Bonen et al., 2000). En effet, lors d'un exercice aigu, FAT/CD36 et FABPpm transloquent du milieu intracellulaire (à l'état basal) vers la membrane plasmique, pour augmenter l'entrée des AG dans la cellule (Kiens 2006). Avec l'entraînement intense ou modéré, il est démontré que l'expression protéique de FAT/CD36, ainsi que de FABPpm augmente dans le muscle (Tunstall et al., 2002, Talanian et al., 2007 ; Kiens 1997). En outre, il a été démontré que le contenu en FABP3 dans les muscles de sujets entraînés est plus élevé par rapport aux sédentaires (Kiens 2006). Enfin, l'expression protéique de FATP4 augmente également suite à 8 semaines d'entraînement à 45-80% de VO_2max , ceci étant associé à une amélioration de l'oxydation des AG (Jeppsen & Kiens, 2012).

III.2.2 Lipolyse et oxydation des Acides Gras dans le muscle pendant l'exercice :

Au cours des 10 à 15 premières minutes d'exercice, une diminution des concentrations plasmatiques des AG est observée due à une plus grande absorption par le muscle squelettique (Romijn et al., 1993a). Ensuite, le taux des AG circulants augmente graduellement en raison de l'augmentation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux, une réduction du taux de ré-estérification des AG est également observée dans les 30 premières minutes de l'exercice modéré (Wolfe et al., 1990).

L'entraînement en endurance entraîne une augmentation de la capacité d'oxydation des AG (β -oxydation) et de leur utilisation comme substrat énergétique. Les adaptations induites par l'exercice chez les personnes entraînées montrent une capacité oxydative mitochondriale meilleure pour répondre aux besoins énergétiques et augmenter le potentiel de production d'ATP mitochondrial (Egan et al., 2013). L'entrée des AG dans la mitochondrie est un processus, nous l'avons vu précédemment, bien décrit où les AG sont d'abord convertis en acyl-CoA par l'Acyl-CoA Synthetase (ACS) lors de la 1ère étape de la β -oxydation. Chez l'homme, 10 jours d'entraînement à 75% de la VO_2max permettent d'augmenter l'activité d'ACS du

muscle squelettique, favorisant une augmentation de la β -oxydation mitochondriale (Cortright et al., 2006). Une fois transformé, l'acyl-CoA est transféré par la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT-1) à l'intérieur de la mitochondrie. Schmitt et al ont montré que suite à un entraînement en endurance l'expression de CPT1 augmente dans le muscle entraîné (Schmitt et al., 2003). Dans la matrice mitochondriale les AG subissent la β -oxydation et la dégradation au niveau des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il est bien confirmé dans la littérature que l'entraînement en endurance améliore l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale en augmentant le contenu en protéine et l'activité enzymatique de la phosphorylation oxydative (Booth et al., 1991, Holloszy., 1967, Baldwin et al., 1972, Jacobs & Lundby 2013, Jacobs et al., 2013, Scalzo et al., 2014).

III.2.3 Contribution des Triglycérides intramusculaires dans l'exercice :

L'oxydation des AG plasmatiques contribue à 50-70% de l'oxydation totale des lipides pendant l'exercice à une intensité modérée, ceci suggère la présence d'une autre source lipidique qui participe à la formation de l'énergie cellulaire (Romijn et al., 1993b, van Loon et al., 2001, van Loon, 2004).

En effet, les TG intramusculaires (TGIM) représentent une source d'énergie importante dans le muscle squelettique. Le niveau de leur utilisation pendant l'exercice dépend de son intensité, de sa durée et de son mode (Kiens 2006). Par exemple, la lipolyse des TG intramusculaires peut augmenter 10 fois lors d'un exercice prolongé à intensité modéré (>90 min) (Jordy & Kiens, 2014, Van Loon et al., 2001, Guo et al., 2004). Ainsi les TGIM représentent jusqu'à 35 à 50% du substrat énergétique pour la β -oxydation lors de l'exercice prolongé d'intensité modérée, alors qu'ils sont moins utilisés pour une intensité d'exercice élevée (Van Loon et al., 2001, Kiens 2006). Ceci peut être lié au fait que les fibre de type I, majoritairement sollicitées lors d'exercices d'intensités faibles à modérées et largement représentées dans le muscle d'athlète en endurance, contiennent plus de TGIM (voir partie III.2) (Shepherd et al., 2012, Van Proeyen et al., 2011). L'entraînement en endurance induit une augmentation des niveaux de TGIM dans le muscle squelettique (Pruchnic et al., 2004, Schrauwen-Hinderling et al., 2003, Shepherd et al., 2012, Tarnopolsky et al., 2007). Les athlètes en endurance possèdent donc un taux élevé des TGIM dans leur muscle par rapport aux sujets non entraînés : ce phénomène est appelé le Paradoxe d'athlète (Goodpaster et al., 2001). Il peut se produire après 2 à 8 semaines d'entraînement d'endurance (Kiens 2006). Selon Van Loon et Goodpaster en 2006, il est dû au fait que l'entraînement via ses effets sur la β -oxydation et la

lipolyse favorise l'utilisation des TGIM comme pool de substrat et donc favorise la constitution de stocks. Des niveaux élevés de FAS, de SCD1 et des lipides ont été observés dans le muscle des athlètes après l'exercice (Wende et al., 2007, Summermatter et al., 2011 ; Bergman et al., 2010, Goodpaster et al., 2001). A l'inverse, les personnes sédentaires et obèses ne sont pas métaboliquement « équipées » pour pouvoir utiliser les TGIM comme substrats (Van Loon et Goodpaster 2006) et donc utilise majoritairement les AG plasmatiques lors de l'exercice (Scotto di Palumbo et al., 2017, van Hall et al., 2002, van Loon et al., 2003).

En résumé

◆ **L'entraînement en endurance améliore aussi le métabolisme lipidique musculaire en favorisant une meilleure oxydation et utilisation des lipides, une augmentation de l'expression des différents transporteurs membranaires lipidiques et une activation des voies signalétiques associées (PPAR δ et PGC1 α).**

◆ **A long terme, l'entraînement favorise le stockage des AG en TG dans le muscle ce qui représente un processus adaptatif du muscle à ce type d'exercice appelé chez les athlètes et les marathoniens le « Paradoxe d'athlète ».**

III-3 Entraînement et composition lipidique membranaire du muscle

La composition lipidique membranaire du muscle squelettique est également sensible à l'exercice physique selon plusieurs études. Il a été démontré que l'entraînement en endurance chez des sujets augmente la proportion des AG insaturés dans le muscle au détriment des AG saturés avec une amélioration de la fluidité membranaire et de l'activité enzymatique des protéines membranaires (Andersson et al., 1998, Thomas et al., 1977). Ces résultats sont en contradiction avec des travaux plus récents qui montrent que l'indice d'insaturation, les AG et l'activité de la désaturase 5 diminuent dans les muscles entraînés des rats ou des humains (Kriketos et al., 1995, Helge et al., 1999, Quiles et al., 1999, Helge et al., 2001b, Szabo et al., 2002). Ces variations des résultats ont été expliquées par la variété du type de muscles analysés. En effet, il a été démontré que le contenu total en PL est plus abondant dans les fibres de types I oxydatives que dans les fibres de type II glycolytiques. Ainsi, le pourcentage des PL est d'environ de 62% dans le muscle soléaire à 58% dans l'EDL (Górski et al., 1999, Kriketos et al., 1995, Blackard et al., 1997). Inversement, des fortes concentrations en AG polyinsaturés sont décrites dans les muscles principalement oxydatifs (partie rouge de quadriceps et soléaire),

alors que des niveaux réduits des AG polyinsaturés ont été observés dans la partie blanche glycolytique de quadriceps des rat entraînés (Kriketos et al., 1995). Pour conclure, l'entraînement modifie la teneur totale en phospholipides du muscle squelettique chez les rongeurs et les humains (Liang et al., 1993, Mitchell et al., 2004, Goto-inoue et al., 2013, Senoo et al., 2015).

On sait que l'entraînement modifie le contenu lipidique musculaire, mais peu de données existent sur ce qui se produit spécifiquement au niveau des phospholipides mitochondriaux. Les travaux de Menshikova et al ont montré que l'entraînement en endurance augmente le contenu en CL dans le muscle des personnes obèses sans augmentation du nombre des mitochondries (Menshikova et al., 2007). Ils rejoignent les résultats obtenus sur le modèle animal où les concentrations de CL augmentent également dans les muscles des rongeurs suite à l'entraînement ou à une innervation continue (Takahashi & Hood, 1993, Ostojic et al., 2013). En effet, l'entraînement permet également d'augmenter les quatre espèces principales de CL tels que les tri-linoleoyl-mono-docosahexaenoyl, tetralinoleoyl, tri-linoleoyl-mono-oleoyl et di-linoleoyl-di-oleoyl, riches en AGI dans le muscle (Menshikova et al., 2006, Faber et al., 2014). Récemment Fajardo et al ont montré que le contenu en CL et sa teneur en 18:2n6 ainsi que l'expression protéique de Taz augmente dans le muscle plantaris en surcharge. L'entraînement améliore aussi l'activité enzymatique mitochondriale et les différents complexes de la chaîne respiratoire qui sont directement corrélés au contenu de CL dans la mitochondrie (Takahashi & Hood, 1993). Enfin, des travaux ont montré que l'entraînement augmente le contenu des enzymes de synthèse de CL et le PI dans le muscle (Ostojic et al., 2013, Das et al., 2015). A l'inverse, la dénervation diminue le contenu de CL dans les mitochondries (Ostojic et al., 2013 ; Toledo et al., 2007, Das et al., 2015). De même, le contenu en CL et l'acide linoléique diminuent dans le muscle soléaire en hypoactivité alors que la quantité de Taz reste élevée (Fajardo et al., 2017). Ce résultat suggère selon Fajardo et al que la Taz peut fournir une certaine forme de compensation en cas d'une réduction de la teneur en CL et de sa composition en 18: 2n6.

Les mécanismes qui régulent ces adaptations membranaires en contenu lipidique suite à l'entraînement, ne sont pas encore connus. Des études impliquent PGC1 α dans le contrôle de ces adaptations. En effet, la sur-expression de PGC1 α dans le muscle est capable d'augmenter le PC et le PE, alors que l'absence de PGC1 α entraîne une diminution de ces phospholipides même en présence de l'exercice (Lai et al., 2014, Senoo et al., 2015). PGC1 α peut également

jouer un rôle dans la synthèse du CL comme détaillé précédemment (voire partie II.4.3) (Ostojic et al., 2013).

En résumé

◆ **Au niveau membranaire, l'entraînement en endurance est capable d'améliorer la fluidité des membranes en augmentant leur contenu en AGI et surtout en augmentant leur teneur en CL.**

III.4 Le tissu musculaire déficient en mstn, un tissu remodelable par l'entraînement en endurance

Le défi à relever est de maintenir dans ce muscle hypertrophié ses propriétés oxydatives. Or, des études ont montré que le muscle KO mstn est remodelable avec l'entraînement physique. Les travaux de Savage & McPherron ainsi que l'équipe de Patel montrent qu'il est possible de restaurer le métabolisme aérobie dans le muscle déficient en mstn par l'exercice en endurance (Savage & McPherron, 2010, Matsakas et al., 2011, Matsakas et al., 2010). En effet, l'entraînement en endurance chez souris KO mstn augmente le métabolisme oxydatif en induisant par exemple un shift phénotypique vers des fibres plus oxydatives (IIB→IIA), une augmentation de l'activité de la citrate synthase et une diminution des marqueurs de l'autophagie (Savage & McPherron, 2010, Matsakas et al., 2011, Matsakas et al., 2010). Dans le même contexte, la combinaison de l'entraînement avec l'inhibition de mstn sur des modèles animaux atteints des myopathies a été envisagée dans plusieurs études. Hulmi et al ont ainsi combiné un entraînement volontaire sur roue et une administration des inhibiteurs de signalisation solubles ActRIIB (sActRIIB-Fc) pendant 7 semaines chez des souris mdx et des souris contrôles. Les résultats montrent que l'exercice régulier augmente la capacité oxydative dans les deux groupes de souris en deux semaines (Hulmi et al., 2013).

Enfin, des études ont montré que des molécules agonistes de AMPK (AICAR) et de PPAR δ (GW501516) pourraient être utilisées comme "mimétiques d'exercice". En effet, dans des conditions telles que l'âge ou le déconditionnement, l'utilisation d'un médicament mimétique d'exercice peut représenter une stratégie thérapeutique alternative intéressante pour stimuler le métabolisme aérobie. Ainsi, l'agoniste synthétique AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-D-ribofuranoside), régule le métabolisme oxydatif et mime les effets de l'exercice aérobie dans le muscle squelettique (Narkar et al., 2008). Les souris traitées par

GW501516 (activateur des Ppar δ et coactivateur des Pgc1 α) durant 4 semaines présentent également une augmentation du nombre de fibres musculaires oxydatives ainsi qu'une amélioration de l'oxydation des lipides (Nakar et al., 2008). Comme on s'y attendait, l'impact de ces résultats a suscité un intérêt immédiat dans le domaine de la performance sportive et dans un délai d'un an après la publication de ces résultats, l'Agence mondiale d'antidopage a ajouté AICAR et GW501516 à la liste des interdictions en 2009 (Pokrywka et al., 2014). Il a aussi été montré qu'un traitement à l'AICAR de 4 semaines améliore la capacité d'endurance de souris KO mstn âgées avec une augmentation de l'expression de PGC1 α et de la fonction mitochondriale par rapport aux souris KO non traitées (Pauly et al., 2014).

Ces différentes études montrent donc que le tissu musculaire déficient en mstn reste plastique et répond favorablement à des stress physiologiques (entraînement en endurance) ou pharmacologiques (mimétiques de l'exercice) régulant le métabolisme aérobie. Ceci suggère que la combinaison de l'inhibition de la mstn et l'entraînement en endurance pourrait être une stratégie efficace afin de répondre au double challenge d'un muscle hypertrophié maintenant des qualités oxydatives et de résistance à la fatigue.

En résumé

◆ **Chez la souris KO mstn, l'entraînement aérobie a montré son efficacité pour corriger les atteintes métaboliques et fonctionnelles observées dans le muscle : amélioration de l'endurance, des activités des enzymes oxydatives.**

B- Buts de la thèse et conduite des investigations

Au regard de l'hypertrophie induite, l'inhibition de la mstn apparait comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans diverses situations pathologiques affectant le tissu musculaire. Cependant, le muscle déficient en mstn confère peu d'avantages fonctionnels, avec un déficit métabolique oxydatif et une dysfonction mitochondriale marqués. Comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces altérations est une question importante à résoudre pour les approches thérapeutiques potentielles.

Compte tenu de l'importance des lipides et phospholipides constituants essentiels des membranes biologiques dans le fonctionnement des mitochondries, nous nous sommes fixés pour but d'établir un lien entre le métabolisme lipidique et de ces composants et la fonction du muscle déficient en myostatine.

Nous avons donc dans un premier temps caractérisé au sein du muscle squelettique le métabolisme lipidique (voies d'oxydation, de stockage), ainsi que la composition lipidique membranaire mitochondriale via l'utilisation de la technique de chromatographie sur couche mince. Ces analyses ont été conduites sur deux modèles de muscle déficient en myostatine, la souris KO mstn (Etude 1, article Baati et al., 2017) et les souris Gasp surexprimant un inhibiteur de mstn (Etude 1, résultats complémentaires non publiés). Il s'agissait de démontrer l'existence d'un profil lipidique spécifique à ce tissu, défini notamment par des altérations de la composition en phospholipides des membranes mitochondriales, comme une diminution de la teneur en cardiolipide.

Dans un second temps, nous avons évalué si un entraînement en endurance, stimulus physiologique efficace pour améliorer le métabolisme aérobie, modifie la composition lipidique membranaire et améliore le profil lipidique au sein du muscle déficient en mstn (Etude 2). Il s'agissait alors de montrer que via l'impact du métabolisme lipidique, et de manière générale des phospholipides, la combinaison de l'inhibition du mstn et l'entraînement en endurance serait une stratégie efficace afin de répondre au double challenge d'un muscle hypertrophié maintenant des qualités oxydatives et de résistance à la fatigue.

C- Matériels et Méthodes

I- Analyse de la fonction mitochondriale

1.1 Isolation des mitochondries

Les mitochondries totales sont extraites d'un mélange de tissu musculaire des pattes arrières des souris selon la méthode de Cogswell publié en 1993. Les muscles sont disséqués, puis coupés et émincés jusqu'à avoir un broyat homogène.

Tampon 1: 100mM KCL, 5mM MgSO₄, 5mMEDTA, 50 mM TrisHCL, pH 7.4

Tampon+ATP : Tampon 1 + 1mM ATP, pH 7.4

Tampon de resuspension : 100mM KCL, 10mM MOPS, pH 7.4

Subtilisin A (Sigma P5380) : 10mg/mL

- Peser le muscle broyé obtenu pour calculer à la suite le volume du tampon 1 nécessaire pour l'extraction, et le transférer dans le potter
- Ajouter 4 volumes de tampon+ATP contenant de la subtilisin A à 2mg/mL final, vortexer et incubé 5 min dans la glace.
- Arrêter la réaction avec 10 mL de tampon+ATP et homogénéiser avec le potter.
- Réaliser une centrifugation (4°C) à basse vitesse 800 g, et resuspendre le culot avec 10 mL de tampon+ATP
- Effectuer une centrifugation (4°C) à haute vitesse 9000 g et éliminer le surnageant
- Reprendre le culot à 3.5 mL de tampon+ATP et refaire une centrifugation comme la précédente.
- Éliminer le surnageant et reprendre le culot contenant les mitochondries dans 100 à 200 µL de tampon de resuspension et mesurer le volume final exact.
- Réaliser à la suite un dosage protéique, les valeurs seront exprimées en mg/mL

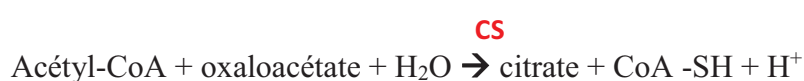
Note : Tout au long de l'expérience le travail doit être réalisé sur la glace, les tampons peuvent être conservés à 4°C pendant 2 semaines. Il est possible de laisser les muscles attendre sur glace dans le tampon 1.

1.2 Dosage des activités des enzymes mitochondriales par spectrophotométrie

Les mesures des activités enzymatiques sont réalisées sur des homogénats de muscle gastrocnémien des souris par spectrophotométrie. Les échantillons de muscle sont broyés dans la glace dans un tampon phosphate (25mM pH7.4) puis centrifugés à 3500tr/min pendant 15 min à 4°C. On récupère le surnageant puis un dosage protéique est réalisé. Cette préparation d'homogénat est la même pour tous les dosages enzymatiques réalisés.

◆ Citrate synthase (CS)

Considérée comme marqueur de contenu mitochondrial, et reflet du métabolisme oxydatif, cette enzyme joue un rôle catalyseur dans la réaction suivante :



La mesure de l'apparition de groupe -SH libre lors de la formation de CoA-SH + H⁺ permet de doser la citrate synthase (d'après la méthode de Srere 1970).

L'apparition des groupes -SH dépend de l'activité de la citrate synthase, et permet la réduction du réactif 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate) (DNTB) en TNB avec une coloration jaune dont l'absorbance est mesurée à 412nm.

La réaction est la suivante :



→ Ajouter et mélanger dans la cuve

-10 μ L d'homogénat

-790 μ L de Triton X100 1%

-100 μ L acétylCoA 1mM

-100 μ L DNTB 1mM

→ Incuber 1 min à 37°C

→ Ajouter 10 μ L d'Oxaloacétate 10mM dans la cuve

→ Lire l'absorbance à 37°C pendant 20s à 412 nm.

Les valeurs sont exprimées en mU/mg protéines.

◆ β (3)-hydroxyacyl CoA déshydrogénase (β -HAD)

C'est une enzyme activatrice de la troisième étape de la β -oxydation des AG. Elle convertit l'acétoacétyl CoA en alcool à l'aide de cofacteur NADH inversement à la réaction de β -oxydation. Le dosage est basé sur la disparition de NADH qui sera suivie par spectrophotométrie à 340nm selon la méthode de Yang et al., 2006.

La réaction est la suivante :

β -HAD



-Préparation du mélange : tampon tris-HCL 1M pH 7.0, EDTA 500mM, NADH 5mM, eamilliQ, Triton X-100 10% et incuber à 30°C

Dosage au spectrophotomètre (cuve) :

- 980 μ L mélange pré incubé à 30°C

- 10 μ L homogénat d'échantillon

- Agiter et incuber 30s à 30°C

- 10 μ L Acétoacétyl CoA

- Agiter et lire la cinétique à 340nm de 1min à 30°C avec un délai de 10s

- Calculer selon l'équation suivante :

$$[\beta\text{-HAD}] = (\text{DO}/\text{min}_{\text{ech}} - \text{DO}/\text{min}_{\text{blanc}}) * \text{Volume total } (\mu\text{L}) / \epsilon (6.22) * \text{Volume de l'échantillon}$$

* Concentration prot de l'ech (mg/mL).

La valeur de β -HAD est exprimée en μ mol/mg protéines.

◆ Cytochrome C oxydase (COX)

C'est une enzyme qui reflète l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. La mesure de l'activité de ce complexe consiste à suivre par spectrophotométrie l'oxydation du cytochrome c réduit par la COX mesurée à 550nm dans un pH 7.4 à 37°C d'après la méthode de Wharton & Tzagoloff 1967.

Préparer le cytochrome c réduit :

- Peser 0.180g de Cytochrome C (Cyt c) 10mM pour 1.5 mL de tampon phosphate
- Ajouter 15 µL de dithionite de sodium 2M, mélanger et laisser agir pendant 10 min à l'abri de la lumière et dans la glace.
- Ajouter 5µL de Cytochrome C réduit dans 995µL de tampon phosphate et régler le spectre entre 500nm et 600nm.
- Continuer la réduction du Cyt C avec dithionite jusqu'à obtenir une DO de 0.9-1.1 à 550nm

Dosage sur spectrophotomètre :

- Préparer la solution de dosage (500µL de CytC réduit pour 100mL de tampon phosphate, incubé à 37°C)
- Dans la cuve : 1mL de la solution de dosage + 20-40 µL d'homogénat muscle
- Agiter et lire la cinétique pendant 30s à 550nm à 37°C
- Calculer selon l'équation suivante :

Activité (mU/mg protéine) = $DO/min * 1000 * Volume\ final\ de\ la\ cuve\ (\mu L) / \epsilon\ (18.5) * Volume\ \mu L\ d'ech * C\ prot\ (\mu g/\mu L)$.

II- Etude des voies signalétiques et du métabolisme lipidique

2.1 Dosage des protéines par immunoblotting

Extraction et dosage des protéines

Note : Toute la manipulation doit être réalisée sur la glace

- 50 mg de muscle (morceau de muscle congelé dans l'azote liquide -195,79 °C) sont homogénéisés dans un tampon d'extraction (volume ajouté de tampon=10*poids de muscle).
- Centrifuger à 4°C à 14000rpm pendant 10 min
- Récupérer le surnageant puis réaliser un dosage de protéine avec le kit BCA ou Bradford
- Conserver les extraits à -20°C.

Tampon d'extraction: 1M Tris HCl, pH7.5, 5M NaCl, 200mM EGTA, pH8, 200mM EDTA, pH7-8, 200mM Sodium Orthovanadate (Na₃VO₄), 1M β-glycérophosphate, 1M NaF, CIP : protease inhibitor cocktail set, Triton 10%, SDS 20%. Ajuster à la fin selon le volume souhaité avec l'eau milliQ

Préparation et dénaturation des échantillons

Dans des tubes eppendorfs, préparer les échantillons musculaires en fonction des concentrations initiales (dosage protéique des extraits) afin d'obtenir une même concentration finale (50µg/µL) dans tous les échantillons pour un volume final à déposer de 30µL.

Ajouter :

- Laemmli 2X= 15µL
- Volume d'échantillon calculé par rapport au volume et concentration final
- EaumilliQ = 30µL (Vf) - (15µL(2X)- volume échantillon)
- Dénaturer les échantillons 5 min à 95°C

Tampon Leammli :

Tris base 125mM,
pH6.8, SDS 4%,
DTT 1M, Glycérol
20%, Bromophenol
Blue

Séparation des protéines sur un gel SDS-PAGE selon leur poids moléculaire : Migration

- Préparer un gel de stacking polyacrylamide 5% de 20 dépôts d'échantillons, superposé sur un gel polyacrylamide à une concentration qui peut varier de 6% à 15% selon le poids moléculaire des protéines cherchées (Tableau 4).
- Une fois polymérisé, on le fixe dans la cuve de migration et on charge délicatement les échantillons préparés dans les puits du gel.
- Charger la cuve de tampon de migration et laisser migrer entre 20-40mA pendant 2h.

Tableau 4: Les différentes pourcentages et compositions des gels d'électrophorèses

% et nb de gel	Stacking	Running			
	1 grand gel	6%	10%	12%	15%
H ₂ O (mL)	2.7	10.6	7.9	6.6	4.6
Acrylamide 30% mix (mL)	0.67	4	6.7	8	10
Tris HCL 1.5M pH8.7 (mL)		5	5	5	5
Tris HCl 1M pH 6.8 (mL)	0.5				
SDS 20% (mL)	0.04	0.2	0.2	0.2	0.2
APS 10% (mL)	0.04	0.2	0.2	0.2	0.2
Temed (mL)	0.004	0.016	0.008	0.008	0.008

Tampon de migration : TGS (Tris-Glycine-SDS)10X dilué dans l'H₂O mQ pour avoir une solution 1X. Produit

Transfert des protéines sur des membranes de nitrocellulose :

Sur la face noire de la cassette de transfert, mettre en couches successives

- éponge, deux papiers Wattman, gel, au-dessus la membrane nitrocellulose (0.2 µm, Biorad, Cat 162-0112), deux papiers Wattman et éponge.
- Insérer la cassette dans l'appareil de transfert rempli du tampon de transfert dans le bon sens
- Transférer à l'aide d'un courant de 400mA pendant 1h30à froid (bac remplie de glaçon)

Tampon de transfert : TG(Tris-Glycine) 10X dilué dans l'eaumilliQ pour avoir une solution 1X. Produit commercialisé de Bio-Rad ref :cat #161-0771

Immunomarquage:

- Blocage des sites non spécifiques : Mettre la membrane sous agitation dans le lait TBS 0.1% Tween pendant 1heure (5g lait /100mL TBS 0.1%Tween)
- Incuber la membrane avec l'anticorps primaire (voir dilutions anticorps utilisées ci-dessous) 2h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C
- Rincer dans du TBS 0.1% Tween 3 fois 5min
- Incuber 1h la membrane avec l'anticorps secondaire dilué à 1/5000
- Rinçage dans du TBS 0.1% Tween 3 fois 5 min

Révélation :

Révéler les membranes à l'aide d'un réactif de détection chemiluminescence (ECL, ThermoScientific). La détection des signaux a été réalisé par l'appareil ChemiDoc Touch Imaging system (Bio-Rad, 1.1.0.4, 732BR1121). L' α -tubuline est utilisée comme protéine de référence. Les densités des bandes sont mesurées par le logiciel Image Lab software (Version 5.2.1 for Windows7)

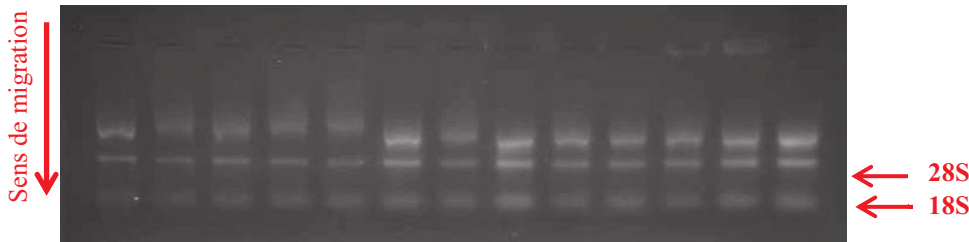
Tableau 5 : Dilutions, référence et utilisation des différents anticorps primaires

Anticorps primaires	Poids moléculaire (kDa)	Dilution WB	Source	Reference	Fournisseur
α-tubuline	50	1/2000	Mouse	T6199	Sigma-Aldrich
FAT/CD36	88	1/500	Mouse	sc-13572	Santa Cruz
FATP1	75	1/500	Rabbit	sc-25541	Santa Cruz
FATP4	70	1/500	Rabbit	sc-5834	Santa Cruz
FABP3	15	1/500	Rabbit	Ab45966	Abcam
CS	40	1/1000	Rabbit	GT1761	Genetex
FAS	273	1/1000	Rabbit	3180s	Cell signaling
SCD1	37	1/500	Mouse	sc-14719	Santa Cruz
CLS	33	1/500	Rabbit	ab105782	Abcam
GLUT4	40	1/1000	Mouse	GT41-A	Alpha Diagnostic
Hexokinase II	102	1/1000	Rabbit	2867	Cell signaling

2.2 Quantification des expressions des gènes par RT-qPCR (Real time reverse transcription)

Extraction des ARN totaux :

- Les ARN totaux sont isolés à partir de 25-35 mg de muscle gastrocnémien en utilisant le kit RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands).
- La concentration des ARN est déterminée par un dosage spectrophotométrique (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) et la pureté des extraits est vérifiée par le ratio d'absorption OD260nm/OD280nm qui doit être supérieur à 1.7.
- La qualité des ARN est visualisée par un gel d'électrophorèse Agarose 1%.



Rétrotranscription des ARN :

Le principe est de convertir des séquences d'ARN en ADN complémentaires, en vue d'amplifier les ADNc obtenus par PCR. La rétrotranscription est réalisée sur 1 µg d'ARN total en utilisant le Kit TAKARA (TAKRR037A, PrimeScripy RT reagent Kit, Perfect real Time).

- Préparer le master mix pour 1 µg d'ARN comme indiqué sur le tableau 6
- Mettre dans des tubes de 200 µL, les ARN totaux (1 µg) et ajuster avec de l'H₂Omq à 13 µL.
- Ajouter 7 µL de master mix par tube afin d'obtenir un volume final de 20 µL.
- Fermer le tube, vortexer légèrement et centrifuger brièvement.
- Lancer un Thermocyclage : 15 min à 37°C puis 5 sec à 85°C et 4°C à l'infini.

→ Les ADNc sont récupérées et dilués (1/5 ou 1/10) dans de H₂Omq conservés à -20°C.

Tableau 6: Préparation du master mix pour la rétrotranscription des ARN

Reagent	Volume µL	Concentration Finale	Exemple : 17 tubes de RT
5x PrimeScript Buffer	4	1 x	68
PrimeScript RT Enzyme Mix1	1		17
Oligo dT Primer	1	25 pmol	17
Random 6 mers	1	50 pmol	17
Volume total de master mix	7		119

Note : Travailler toujours sur la glace, avec des gants et dans un endroit propre pour éviter les contaminations des ARN

PCR quantitative (RT-qPCR) :

La validation de l'expression des différents gènes a été effectuée par la technique RT-qPCR (Polymerase Chain reaction) sur l'appareil de détection Step One Plus (AB Applied Biosystems) en utilisant comme indiqué le tableau au-dessous:

Sybr Premix Ex Taq RR420A (500 rxn, stocké à 4°C)				
Préparation du Master Mix (MM)				
Réactifs	Concentration Sauce-mère	Concentration Finale	Volume pour 1 réaction	Volume pour 40 réactions
Sybr Premix Ex Taq 2 x	2 x	1 x	10.00	130.00
Rox reference Dye	50x	1x	0.40	5.20
PF primer forward	10 µM	200	0.40	5.20
PR primer reverse	10 µM	200	0.40	5.20
H2O		1 x	6.80	88.40
Volume total (µl)			18.00	234.00

-18µL of mastermix (SYBR Premix Ex Taq II, Takara)
 - 300nM des deux primers (Forward et Reverse)
 - 2µL d'ADNc dilué
 - Eau de biologie moléculaire pour avoir un volume final 20µL

Différents couples d'amorces ont été déterminés sur le site de Roch (https://lifescience.roche.com/en_fr/brands/universal-probe-library.html) pour amplifier les gènes d'intérêt mesurés lors de ce doctorat. Ils sont résumés dans le tableau suivant:

Ajouter	2	µl ADN à	18	µl MasterMix
---------	---	----------	----	--------------

Tableau 7: Différents couples d'amorces correspondants aux gènes d'intérêt

Role	Gene	Reverse Primer (5'-3')	Forward Primer (5'-3')
Housekeeping Gene	Arp	5'-ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG-3'	5'-TCCCACCTTGTCTCCAGTCT-3'
	α-tubulin	5'CTGGAACCCACGGTCATC-3'	5'GTGGCCACGAGCATAGTTATT-3'
Lipid oxidation	Cpt1	5'CATCCCAGGCAAAGAGACA-3'	5'AAGCGACCTTTGTGGTAGACA-3'
	Ppar-δ	5'GTATGCGCATGGGACTCAC-3'	5'GTCTGAGCGCAGATGGACT-3'
	Pgc1-α	5'GGAGCCGTGACCACTGACA-3'	5'TGGTTTGTGCATGGTTCTG-3'
Cardiolipin synthesis enzyme	Pgps	5'GAGAGCCAATCAGCGTGAG-3'	5'CAGGGGTTGGACCTTTCAT-3'
	Crsl1	5'CGTGGCATAGCAAGGATTG-3'	5'TGTTGATCGCTGTGTGTTT-3'
Cardiolipin Remodeling enzyme	Taz	5'TGAAGTCCATCCCTTCTGG-3'	5'GCTGCAGACATCTGCTTAC-3'
	Alcat1	5'CTGTGTTGAGGGCAGGTGT-3'	5'CCAGCCATGTTTAACTGCT-3'
Lipogenesis	Fas	5'GCTCCTCGTTGTCTCT-3'	5'GCAACTCCCCGACATACC-3'
Fibre type distribution	MyHC-I	5'GAAGCGCAATGCAGAGTCGGTG-3'	5'CCTTGGACCAATGTCCCGGTC-3'
	MyHC-IIa	5'TCTGTTAGCATGAACTGGTAGGCG-3'	5'ATGAGCTCCGACGCCGAG-3'
	MyHC-IIb	5'GGAGACCGCAAGAACGTGCTGA-3'	5'GTGATTCTCTGTACCTCTC-3'

Les échantillons sont ensuite déposés en duplicate sur des plaques 96 puits de PCR et sont lus à l'aide de l'appareil Step One Plus (AB Applied Biosystems) en respectant les paramètres des cycles suivants: 30s à 98°C, 40 cycles d'une seconde à 95°C et 15s à 60°C.

Les ARNm sont normalisés par rapport aux gènes de référence comme la protéine ribosomal ARP et l'α-tubuline qui sont invariables avec les traitements.

Les résultats sont exprimés en utilisant les ΔΔCt (the comparative cycle threshold (CT)) et toutes les PCR ont été à 95% d'efficacité.

III- Analyse de la composition lipidique mitochondriale et musculaire

3.1 Extraction des lipides des muscles et des mitochondries

L'extraction des lipides totaux des muscles gastrocnémiens et des mitochondries musculaires a été effectuée selon la méthode de Folch et al en 1957.

A partir d'homogénats musculaires :

- Préparation de l'homogénat : 200 mg de muscle + 2 mL NaCl (11,25g/L) + Triton 0.1% puis broyer avec l'Ultraturax
- Récupérer 1mL d'homogénat et ajouter dessus le Folch BHT (mélange de chloroforme et méthanol (2 :1 v/v) + Butylated hydroxytoluène (50mg/l))
- Centrifuger à 3500t/min, 15°C pendant 20min
- Récupérer la phase inférieure (phase Chloroforme contenant les lipides) dans un tube propre 14 mL
- Ajuster le volume final avec le Folch à 2,5 mL
- Conserver les extraits lipidiques dans des petits flacons en verre pour la suite des manipulations à -20°C.

A partir d'extraits de mitochondries :

- Transférer 200µL des extraits de mitochondries isolés dans un tube de 14 mL
- Ajouter 800µL de NaCl au-dessus + 4mL de Folch BHT, vortexer 1min*2
- Centrifuger à 3500t/min, 15°C pendant 20min
- Récupérer la phase inférieure (phase Chloroforme contenant les lipides) dans un tube propre 14 mL
- Ajuster le volume final avec le Folch à 2,5 mL
- Conserver les extraits lipidiques dans des petits flacons en verre pour la suite des manipulations à -20°C.

3.2 Mesure du contenu en Triglycérides et lipides neutres dans le muscle

La technique utilisée est celle de la **chromatographie sur couche mince (CCM)**. Cette technique permet de séparer les composants d'un mélange sont les lipides neutres. Le principe général de cette technique est basé sur deux phases : une phase stationnaire, souvent le matériel adsorbant (gel de silice, de l'oxyde d'aluminium ou de la cellulose), et une phase liquide, dite aussi phase mobile ou éluant, i.e. un solvant ou un mélange de solvants qui entraîne les composés à se séparer sur la phase stationnaire (figure ci-dessous réalisée par I.Derambure).

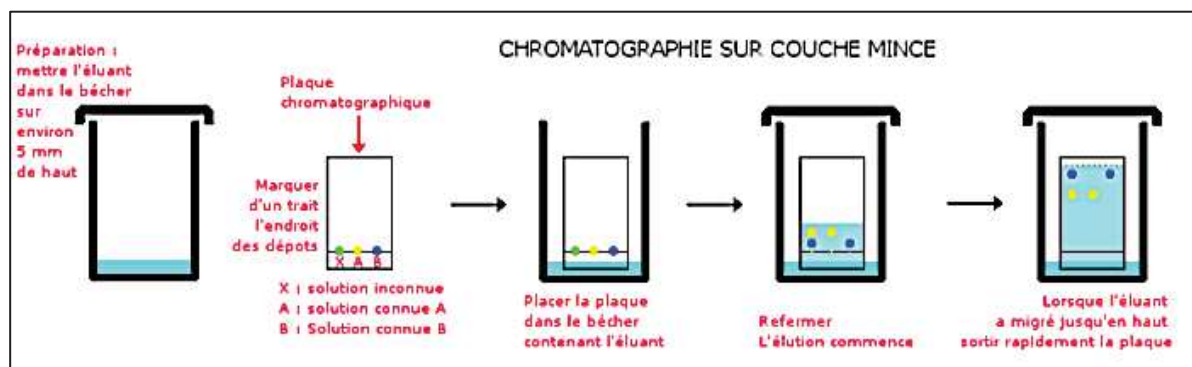


Figure 35: Les différentes étapes de la technique de chromatographie sur couche mince

Les plaques de CCM utilisées sont un support en verre avec une couche mince et uniforme de gel de silice constituant la phase stationnaire (250µm, 20*10cm ; Merck). La phase mobile est un mélange de polarités différentes qui dépend de celles des lipides à séparer le long de la phase stationnaire.

Les lipides neutres sont séparés par des solvants moyennement polaires et quantifiés contre une gamme d'étalon après révélation par du sulfate de cuivre dans de l'acide phosphorique après carbonisation à 180°C pendant 20 min (Aoun et al., 2012).

Manipulation :

La plaque de Silice est imprégnée dans l'acide borique 1,5% pendant une nuit, après traçage de la ligne de migration à 67mm de hauteur et marqués à 60 mm de chaque côté de la plaque avec un crayon à papier et une règle

La plaque est séchée pendant 60 min à 120 °C.

3 à 20µL d'extrait par échantillons et 0.5,1,2,5,7.5,10 µL de la solution étalon AFLN (tableau au-dessous) sont déposés sur la plaque HPTLC merck SI 60 20X10cm avec le linomat ATS 4 : 31 bandes de 4mm à 10 mm du bord et 10 mm du bas de la plaque.

Tableau 8: Préparation des dépôts de la gamme de lipides neutres

Lipides Neutres	Std1 0,5 µL	Std2 1 µL	Std3 2 µL	Std4 5 µL	Std5 7,5 µL	Std6 10 µL
1-MG	12,5 ng	25 ng	50 ng	125 ng	187,5 ng	250 ng
2-MG	12,5 ng	25 ng	50 ng	125 ng	187,5 ng	250 ng
AGL	25 ng	50 ng	100 ng	250 ng	375 ng	500 ng
Chol	25 ng	50 ng	100 ng	250 ng	375 ng	500 ng
1,2-DG	12,5 ng	25 ng	50 ng	125 ng	187,5 ng	250 ng
1,3DG	12,5 ng	25 ng	50 ng	125 ng	187,5 ng	250 ng
TG	37,5 ng	75 ng	150 ng	375 ng	562,5 ng	750 ng
CE	12,5 ng	25 ng	50 ng	125 ng	187,5 ng	250 ng

-Placer la plaque bien verticalement dans la première cuve de migration où il y a le premier éluant (pentane-chloroform-methanol (52/45/3 par volume) et laisser migrer jusqu'à la marque à 60mm.

-Retirer la plaque et la sécher au sèche-cheveux

-Placer la plaque bien verticalement dans la deuxième cuve de migration où il y a le deuxième éluant (pentane-diethyl ether (97/3 par volume) et laisser migrer jusqu'au trait à 67 mm.

-Retirer la plaque et sécher la plaque au sèche-cheveux sous la hotte.

-Révéler la plaque avec le réactif au sulfate de cuivre dans la cuve automatique (vitesse entrée: max, temps de trempage : 8 sec, vitesse sortie: max).

-Sécher la plaque au sèche-cheveux puis mettre au four 20 min à 180 °C°

-Scanner à 10 mm/s, scanner (550nm, 3.00x0.45mm Micro, mode Light) pour avoir un chromatogramme comme ci-dessous représentatif de la séparation de différents lipides neutres.

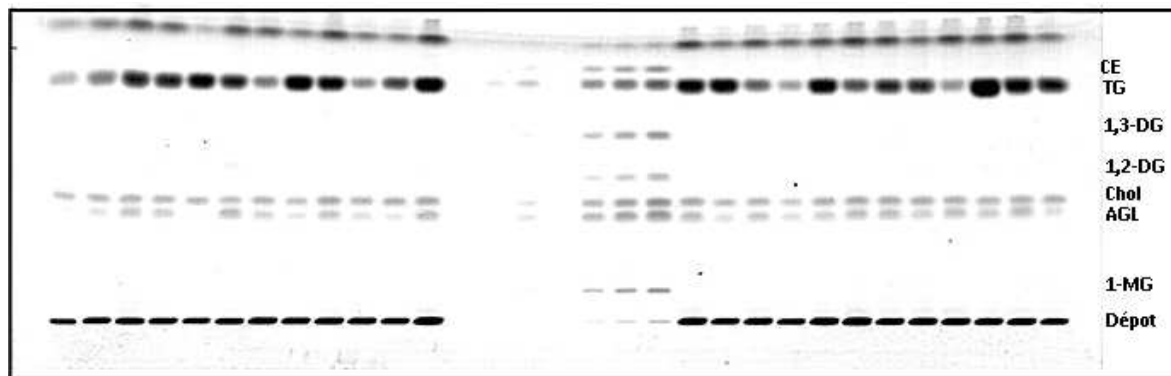


Figure 36: Profil final des différents lipides neutres des échantillons séparés par CCM (24 échantillons + 6 points de gamme)

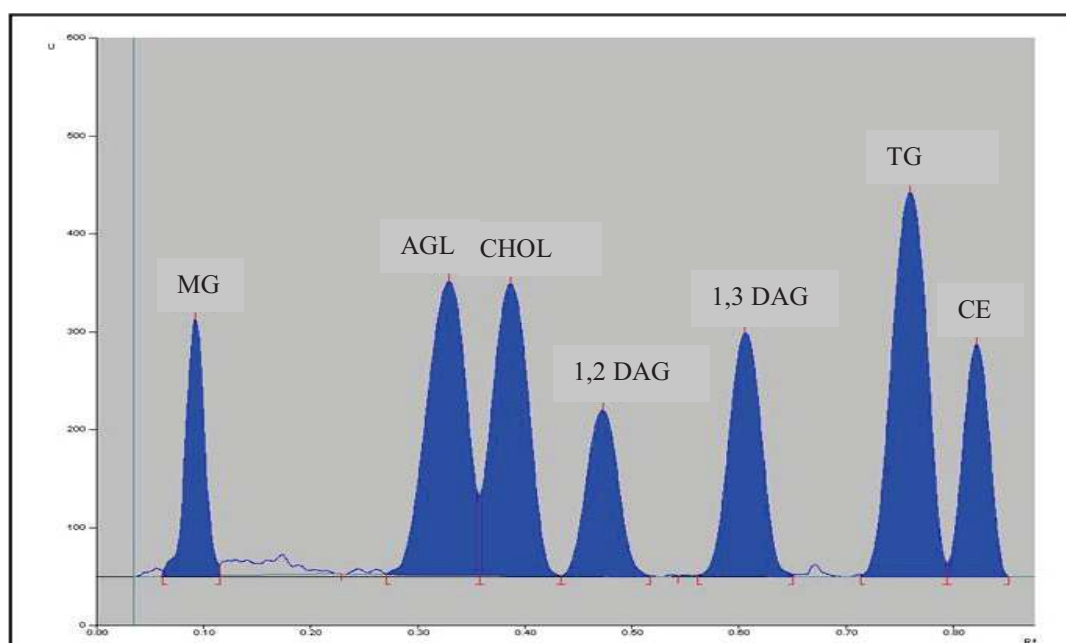


Figure 37: Chromatogrammes des lipides neutres séparés et détectés par le scanner

3.3 Dosage et quantification de phosphore sur les extraits Folch des muscles et des mitochondries

Le dosage de phosphore sur les extraits Folch permet de déterminer la quantité totale de phospholipides dans le muscle et la mitochondrie selon la méthode de Bartlett en 1959. Les phospholipides sont minéralisés à 160°C par l'acide sulfurique et l'eau oxygénée. Le phosphore minéral obtenu est transformé en complexe phosphomolybdique qui est réduit par le réactif de Fiske-Subbarow. La densité optique est lue à 830nm et la quantité de phosphore est évaluée grâce à une courbe étalon.

Manipulation :

1-Préparer la gamme : Préparer une solution mère à 20mmol/l (20µmol/mL) de phosphore : peser 0.545g de KH₂PO₄ et reprendre dans 200mL d'eau.. Faire des solution à 4,3,2,1,0.75,0.5,0.3,0.2,0.1,0.05,0.02 µmol/mL

2-Minéralisation :

- Ajouter v µL de phospholipide/extrait Folch/ dans un tube à phosphore (en verre)
- Ajouter 0.3mL d'acide sulfurique 10N
- Chauffer au moins 3heures à 150-160°C

-Ajouter 2 gouttes d'H₂O₂ à 30% et continuer la minéralisation pendant au moins 1h30min et refroidir les tubes.

Dosage :

Pour chaque échantillon on ajoute :

Echantillons	Volumes en mL
Eau	0.65
Molybdate d'ammonium	0.2
Réactif de Fiske	0.05
Acide sulfurique H ₂ SO ₄ 10N	0.12
Volume total	1.02

Pour la Gamme on ajoute :

Echantillons	Volumes en mL
Solution fille	0.1
Eau	0.37
Molybdate d'ammonium	0.2
Réactif de Fiske	0.05
Acide sulfurique H ₂ SO ₄ 10N	0.3
Volume total	1.02

Réactifs :

-Acide sulfurique 10N : 27.8mL à 96% compléter à 100mL avec l'eau
 -Solution de myoblaste d'ammonium à 50g/L
 -Réactif de Fiske et Subbarow : 1.5g de SO₃HNa ou Na₂S₂O₅ +10mLeau+0.025g d'ANSA+ 0.5g de NaSO₃

-Chauffer les tubes à 100°C pendant au moins 10 min, les refroidir : coloration bleu stable pendant 24h

-Lire la DO à 830nm contre l'eau distillée.

3.4 Analyse de la composition en phospholipides des membranes musculaires et mitochondriales

Les phospholipides sont séparés en fonction de leur polarité par chromatographie sur couche mince (CCM) dans un but de purification. Les phospholipides sont des lipides chargés et séparés par des solvants polaires. Ils sont quantifiés contre une gamme d'étalon après révélation par réactif spécifique du phosphore.

Manipulation :

- 1- La plaque de Silice est imprégnée dans l'acide borique 1,5% pour une nuit, après traçage de la ligne de migration à 7cm de hauteur avec un crayon à papier et une règle.
- 2- La plaque est séchée pendant 60 min à 120 °C. Ensuite on baisse la T° du four à 55°C.
- 3- 3-4 nmol de phosphore pour les échantillons (d'après le dosage de phosphore précédent) et 1,2,4,8,10 µL de la solution étalon AF (tableau au-dessous) sont déposés sur la plaque HPTLC merck SI 60 20X10cm avec le linomat ATS 4 : 31 bandes de 4mm à 10 mm du bord et 10 mm du bas de la plaque
- 4- Placer la plaque bien verticalement dans la première cuve de migration où il y a éluant (methanol-acetic acid-pentane-chloroforme (15/10/30/45 par volume) et laisser migrer jusqu'à la marque tracé.
- 5- Retirer la plaque et la sécher au sèche-cheveux
- 6- Révéler avec le réactif Sigma au bleu de molybdène la plaque dans la cuve automatique (Vitesse d'entrée et temps de trempage : 6sec, vitesse de sortie : max)

- 7- Sécher au sèche-cheveux et mettre au four 3 min à 55°C
 8- Scanner rapidement à 10 mm/s (3min), scanner (715nm, 3.00x0.45mm Micro, mode Light)
 puis lentement à 1mm/s (30min)

Tableau 9 : Préparation des dépôts de la gamme de phospholipides

Phospholipides	Std1 1 µL	Std2 2 µL	Std3 4 µL	Std4 6 µL	Std5 8 µL	Std6 10 µL
LPC	0.0625nmol	0.1250nmol	0.2500nmol	0.3750nmol	0.5000nmol	0.6250nmol
SM	0.0625nmol	0.1250nmol	0.2500nmol	0.3750nmol	0.5000nmol	0.6250nmol
PC	0.2500nmol	0.5000nmol	1.0000nmol	1.5000nmol	2.0000nmol	2.5000nmol
PI	0.0625nmol	0.1250nmol	0.2500nmol	0.3750nmol	0.5000nmol	0.6250nmol
PS	0.0625nmol	0.1250nmol	0.2500nmol	0.3750nmol	0.5000nmol	0.6250nmol
PE	0.2500nmol	0.5000nmol	1.0000nmol	1.5000nmol	2.0000nmol	2.5000nmol
CL	0.0625nmol	0.1250nmol	0.2500nmol	0.3750nmol	0.5000nmol	0.6250nmol

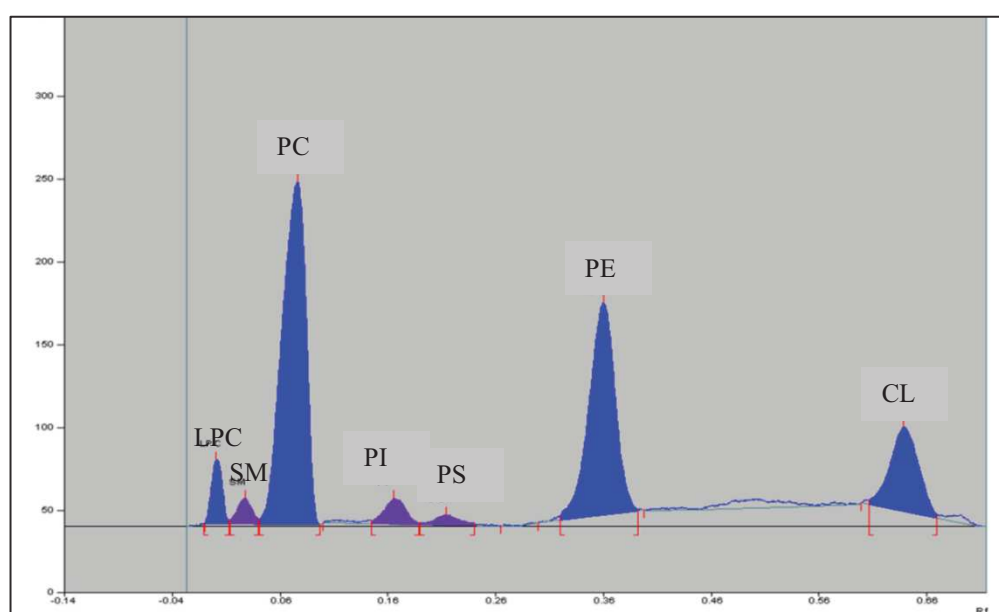


Figure 38: Chromatogrammes des phospholipides séparés et détectés par le scanner

3.5 Analyse de la composition en acide gras dans le muscle

Estérification et transestérification des extraits Folch de muscle Gastrocnémien

L'estérification est une réaction chimique basée sur la condensation d'un alcool sur un acide carboxylique avec une élimination d'une molécule d'eau. L'alcool utilisé ici est le méthanol. Cette réaction conserve les acides gras libres des échantillons en forme de méthyl esters qui seront identifiés à la suite par la Chromatographie en phase gazeuse (CPG).

La préparation des échantillons est effectuée selon la méthode de Lepage et Roy 1988.

- 1-Mettre dans un tube 10mL l'équivalence de 250µg des acides gras pour chaque échantillon (déduite par les CCM des lipides neutres) +50µL d'étalon interne C17 :0 à 237.68 µg/mL (25µg/mL final en C17 :0 Méthyl ester dans 500µL)
- 2-Evaporer à sec sous azote
- 3-Ajouter 1mL de réactif de Trans estérification, fermer sous azote.
- 4-Transestérifier 45min à 90°C en agitant régulièrement toutes les 10 min

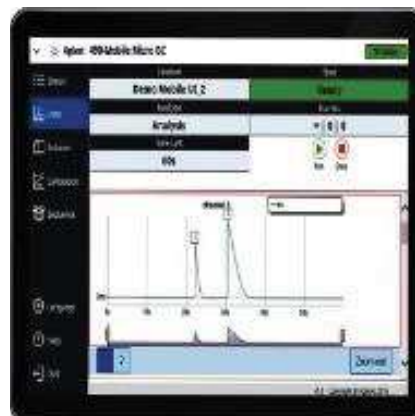
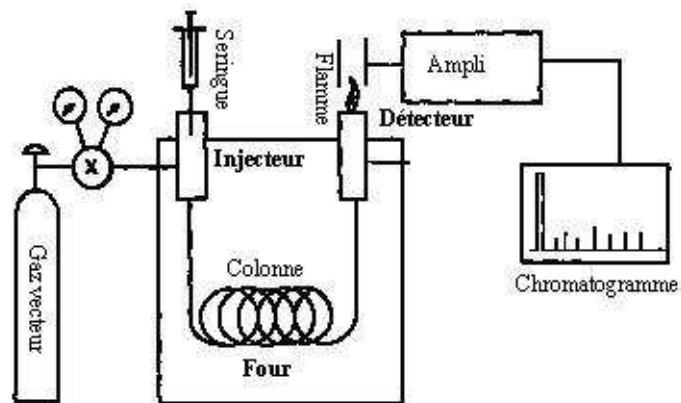
- 5-Ajouter 1mL de Solution de bicarbonate de sodium, agiter
- 6-Ajouter 2 ml de pentane pour extraire les méthyl ester
- 7-Vortexer le mélange 2 fois 30s et reposer les tubes pour la décantation.
- 8-Centrifuger 3500tr, 15°C pendant 10 min
- 9-Retirer l'eau (phase inf) avec pipette pasteur et congeler une nuit à -20°C transvaser rapidement dans un tube sec de 10 mL
- 10-Evaporer à sec sous Azote
- 11-Ajouter 500µL d'isooctane +BHT, transvaser dans un flacon CPG (Chromatographie en phase gazeuse)
- 12-Analyser par CPG les AG avec un volume d'injection 1µL

Analyse des AG par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Principe :

Comme toutes les techniques de chromatographie, la CPG permet de séparer des molécules finement d'un mélange éventuellement complexe. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée **phase stationnaire**, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.

Pour nos analyses, on a utilisé un CPG (Trace GC Ultra, Thermo Fisher Scientific) avec une colonne de Supelco Vax capillary (30m*0.32mmid*0.25µm df), un injecteur automatique AS-3000 et un détecteur d'ionisation de flamme (Thermo Electron Corporation, Thermo Fisher Scientific).



L'identification des AG est réalisée selon le temps de rétention des standards. La quantification des différents AG est faite en calculant la surface des pics des chromatogrammes affichés sur l'écran d'ordinateur lié à l'appareil par rapport l'étalon interne (standards).

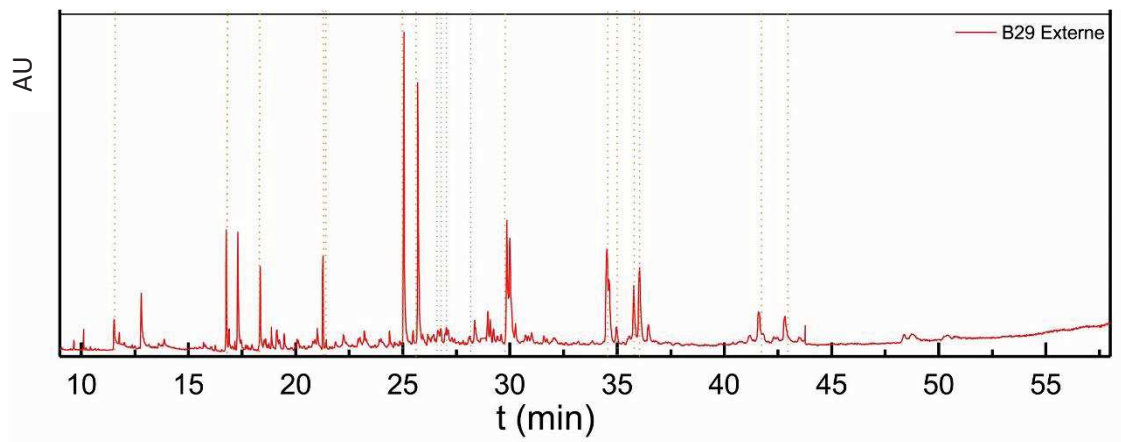


Figure 39 : Chromatogrammes des différents acides gras séparés par CPG

L'indice de saturation et d'insaturation

Puisqu'il n'est pas possible de mesurer l'activité enzymatique des élongase et des désaturases des AG, on a calculé selon les formules citées dans la littérature (Warensjö et al., 2008, Aoun et al., 2012):

IV-Fonction musculaire: Entraînement en endurance

4.1 Mesure des capacités aérobies in vivo sur tapis de course :

Mesure de la vitesse maximale aérobie (VMA) ou la puissance aérobie :

La VMA est la vitesse de course à partir de laquelle le sujet atteint sa consommation maximale d'oxygène (VO_2Max). Elle correspond à la vitesse maximale de course.

Les souris commencent à courir dans des couloirs individuels sur le tapis roulant avec calibrage de vitesse et d'angle (Columbus Instruments, OH 43204 USA). Après des sessions d'habituation, un test de mesure de la VMA est réalisé. Après un échauffement de 5 min à **8m/min**, la vitesse de départ de course est calée à **10m/min** puis la vitesse augmente chaque minute de **2m/min** jusqu'à l'épuisement de l'animal.



Mesure de la capacité aérobie ou d'endurance :

Après l'échauffement, les souris commencent à courir à 60-70% de leur VMA. Le test consiste au temps limite (ou distance) lors d'un test de course sous maximal (65-70% de la VMA) sur tapis roulant jusqu'à l'épuisement).

Les tests de VMA et de Temps limite ont été réalisés avant et après la période d'entraînement.

4.2 Protocole d'entraînement en endurance sur tapis roulant

L'entraînement utilisé dans l'étude 2 reprend le protocole de Tamura et al en 2014 : vitesse de course à 60-70% de leur VMA, 1h par jour, 5 jours par semaine, 4 semaines. La vitesse de course est réévaluée à la hausse chaque semaine, avec une augmentation de 2m/min.

V- Analyse Statistique des résultats :

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM).

La normalité des valeurs est évaluée selon les études par les tests : Shapiro-Wilk, D'Agostino-pearson, et Kolmogorov-Smirnov. En cas de normalité, la significativité entre deux génotypes WT vs KO ou WT vs Gasp (Etudes 1 et 2) est testée via des t de Student. En cas de non normalité des données, le test de Mann-Whitney est alors utilisé. Une ANOVA à deux, suivie de tests post-hoc de Tuckey si nécessaires, permet de tester la significativité du facteur génotype, entraînement, et l'interaction entre les deux facteurs dans l'étude n°3.

Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0.05$. Les données et les figures sont traitées par le logiciel GraphPad Prism version 6.02 (GraphPad software, La Jolla, California) et par Microsoft Excel 2012.

D-Résultats

Etude 1: Le muscle déficient en myostatine présente des anomalies lipidomiques

Le but de ce travail est d'établir au sein du muscle squelettique si les anomalies mitochondriales de la souris KO mstn sont associées à des anomalies lipidomiques.

Plan de travail :

- Caractériser le métabolisme lipidique du muscle déficient en mstn en étudiant l'expression des marqueurs du transport des lipides, du catabolisme des lipides, et de la lipogenèse.
- Analyser la composition lipidique membranaire mitochondriale et musculaire du muscle déficient en mstn : analyser la composition en AG (Saturés, monoinsaturés, polyinsaturés) de muscle total, la composition en phospholipides membranaires de muscle et de mitochondrie.
- Analyser l'expression des enzymes impliqués dans la voie de synthèse du cardiolipide dans le muscle des souris KO mstn et des souris Gasp.

Dans cet article, nous avons montré :

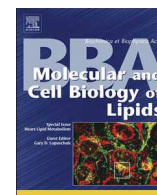
- 1) une diminution de l'expression de transporteurs membranaires des acides gras
- 2) une diminution de la voie d'oxydation des lipides (activités citrate synthase et β -HAD) et de la lipogenèse (diminution du taux de triglycérides et d'acides gras libres),
- 3) une modification importante de la composition lipidique de la membrane musculaire et mitochondriale des souris KO mstn avec :
- 4) une modification de la composition en acides gras illustrée par une augmentation de la proportion en AGS et d'AGPI au détriment de la proportion en AGMI.
- 5) une diminution de 15% environ de la teneur en cardiolipide, associée à des modifications de l'expression de CLS, une enzyme impliquée dans la voie de synthèse du cardiolipide

En conclusion, ces résultats démontrent l'existence d'un profil lipidique spécifique au tissu musculaire déficient en mstn, défini notamment par des altérations de la composition en phospholipides des membranes mitochondriales, comme une diminution de la teneur en cardiolipide. Ils suggèrent qu'une partie du mécanisme par lequel mstn régule la fonction des mitochondries est en modulant le métabolisme des lipides et la composition des phospholipides de la membrane mitochondriale.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbalip

Myostatin deficiency is associated with lipidomic abnormalities in skeletal muscles



Narjes Baati^a, Christine Feillet-Coudray^a, Gilles Fouret^a, Barbara Vernus^a, Bénédicte Goustard^a, Charles Coudray^a, Jérôme Lecomte^b, Véronique Blanquet^c, Laetitia Magnol^c, Anne Bonnieu^{a,1}, Christelle Koechlin-Ramonatxo^{a,*,1}

^a INRA, UMR866 Dynamique Musculaire Et Métabolisme, Université Montpellier, 34000 Montpellier, France

^b CIRAD, UMR IATE, Montpellier F-34398, France

^c INRA, UMR1061 Unité de Génétique Moléculaire Animale, 87060 Limoges, France

ARTICLE INFO

Keywords:

GDF-8
Thin layer chromatography
Delta-9 desaturase
Neutral lipids
Phospholipids

ABSTRACT

Myostatin (*Mstn*) deficiency leads to skeletal muscle overgrowth and *Mstn* inhibition is considered as a promising treatment for muscle-wasting disorders. *Mstn* gene deletion in mice also causes metabolic changes with decreased mitochondria content, disturbance in mitochondrial respiratory function and increased muscle fatigability. However the impact of *MSTN* deficiency on these metabolic changes is not fully elucidated. Here, we hypothesized that lack of *MSTN* will alter skeletal muscle membrane lipid composition in relation with pronounced alterations in muscle function and metabolism. Indeed, phospholipids and in particular cardiolipin mostly present in the inner mitochondrial membrane, play a crucial role in mitochondria function and oxidative phosphorylation process. We observed that *Mstn* KO muscle had reduced fat membrane transporter levels (*FAT/CD36*, *FABP3*, *FATP1* and *FATP4*) associated with decreased lipid oxidative pathway (citrate synthase and β -HAD activities) and impaired lipogenesis (decreased triglyceride and free fatty acid content), indicating a role of *mstn* in muscle lipid metabolism. We further analyzed phospholipid classes and fatty acid composition by chromatographic methods in muscle and mitochondrial membranes. *Mstn* KO mice showed increased levels of saturated and polyunsaturated fatty acids at the expense of monounsaturated fatty acids. We also demonstrated, in this phenotype, a reduction in cardiolipin proportion in mitochondrial membrane versus the proportion of others phospholipids, in relation with a decrease in the expression of phosphatidylglycerolphosphate synthase and cardiolipin synthase, enzymes involved in cardiolipin synthesis. These data illustrate the importance of lipids as a link by which *MSTN* deficiency can impact mitochondrial bioenergetics in skeletal muscle.

1. Introduction

Myostatin (*Mstn*), a secreted growth factor and member of the TGF- β superfamily, regulates levels of lean muscle mass and also body fat content in mice [1]. Inactivation of the *Mstn* gene in mice, or mutations

in the bovine [2,3], ovine [4] and human *Mstn* [5] genes result in a similar phenotype of increased muscle growth. Thus, targeted inhibition of *Mstn* gene has been considered as a promising treatment for various muscle-wasting disorders [6–9]. In this case, strategies have been developed to treat muscle dystrophies, muscle wasting and

Abbreviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase; Alcat1, ER-associated monolysol-CL acyltransferase; ATP, Adenosin triphosphate; AU, Arbitrary Unit; β -HAD, beta-hydroxyacyl CoA dehydrogenase; CHL, cholesterol; CL, cardiolipin; CLS, cardiolipin synthase; COX, Cytochrome c oxidase; CPT1, carnitine palmitoyltransferase I; CS, citrate synthase; DAG, 1,2-diacylglycerol; DMD, Duchenne muscular dystrophy; EDL, extensor digitorum longus muscle; FA, fatty acid; FABP3, fatty acid binding protein 3; FAS, fatty acid synthase; *FAT/CD36*, fatty acid translocase; *FATP1*, fatty acid transport proteins 1; *FATP4*, fatty acid transport proteins 4; FFA, free fatty acid; IMF, intermyofibrillar; KO, knock-out; GLUT4, glucose transporter-4; LPC, Lysophosphatidylcholine; MAG, Monoacylglycerol; MIM, Mitochondrial import complex; *Mstn*, Myostatin; MUFA, monounsaturated fatty acids; OXA, The oxidase assembly translocase; PA, Phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PCR, polymerase chain reaction; PE, Phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PGC1- α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; PGPS, phosphatidylglycerolphosphate synthase; PI, Phosphatidylinositol; PPAR- δ , peroxisome proliferator-activated receptor delta; PS, Phosphatidylserine; PTPMT1, Mitochondrial Phosphatase; PUFA, polyunsaturated fatty acids; Rf, retention factor; RQ, Relative Quantity; SAM, Sorting and assembly machinery of the outer membrane; SCD1, stearoyl-CoA desaturase; SFA, saturated fatty acids; SM, Sphingomyelin; TAM41, the translocator maintenance protein; TAZ, tafazzin; TCA, tricarboxylic acid cycle; TG, triglycerides; TGF- β , Transforming Growth Factor Beta; TIM22, Carrier translocase of the inner membrane; TIM23, Presequence translocase of the inner membrane; TLC, thin layer chromatography; TOM, translocase of the outer membrane; Tub, tubulin; WT, wild type

* Corresponding author at: INRA, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, Université Montpellier, F-34060 Montpellier, France.

E-mail address: christelle.ramonatxo@umontpellier.fr (C. Koechlin-Ramonatxo).

¹ These authors are co-senior authors.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.017>

Received 12 December 2016; Received in revised form 19 June 2017; Accepted 29 June 2017

Available online 01 July 2017

1388-1981/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

myopathies by blocking the Myostatin/ActRIIB pathway. Many clinical trials are in process but results are associated with undesirable adverse effects [10]. Therefore, a better understanding of the mechanisms underlying the muscle phenotype in *Mstn* knock-out (KO) model is warranted that may ultimately improve treatments.

Indeed, beyond muscle hypertrophy, *Mstn* KO mice show a disturbed muscle function with loss of muscle strength and endurance *in vivo* or *ex vivo* accompanied with a decrease in mechanical performance, and ATP production during exercise [11–14]. In parallel, many other metabolic changes have been documented in *Mstn* KO muscle such as a decrease in mitochondrial content, disturbance in mitochondrial respiratory function with a decay in the respiratory control ratio in intermyofibrillar mitochondria, and a decline in porine activity [11,13,15]. In addition, a decrease of fatty acid translocase (FAT/CD36) level, a lipid transporter, and the citrate synthase (CS) activity, one of the main mitochondrial oxidative enzyme, associated with a lower peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC1- α) expression has been observed [15,16]. Although it is clear that lack of MSTN impairs muscle oxidative metabolism and mitochondrial function, the underlying mechanisms by which this alteration occurs have not been fully elucidated.

It is known that muscle mitochondrial function and oxidative metabolism are both highly reliant on the lipid pathway. Indeed, fatty acids (FA) are the main substrate for ATP production in muscle *via* the β -oxidation pathway [17]. Entering muscle fibers from blood *via* different transporters, lipids are then oxidized to Acyl-CoA in the cytosol then to acylcarnitine before translocating through mitochondria membranes by carnitine palmitoyltransferase I and II. These substrates in turn are subjected to oxidation by beta-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (β -HAD) and CS to produce ATP. Lipogenesis encompasses the processes of fatty acid and triglyceride synthesis from glucose [18]. After glycolysis, pyruvate is produced from glucose which then enters mitochondria. Through the tricarboxylic acid cycle (TCA), pyruvate is converted to acetyl-CoA and exported to cytosol to be used as a precursor for lipid synthesis. Indeed, acetyl-CoA carboxylase (ACC) converts acetyl-CoA into malonyl-CoA, which finally activates synthesis of triglycerides, using the fatty acid synthase enzyme (FAS) [18]. In the case of high-fat diet, fatty acids are also stored as triglycerides.

In addition to their energetic role, lipids are crucial components of cell membranes, including mitochondrial membranes. Moreover, mitochondrial characteristics and function are largely dependent of FA and phospholipid composition [19]. For example, being the most abundant phospholipid in both the outer mitochondrial membrane and the inner mitochondrial membrane, phosphatidylcholine (PC) modulates skeletal muscle mitochondrial function [20]. Genetic studies in mice or humans with defects in coline kinase β , enzyme catalysing the synthesis of PC, demonstrate that reduction of mitochondrial membrane PC content induced enlarged mitochondria, reduced inner membrane potential and caused muscle weakness [20–23]. The proper lipid composition of the membranes is crucial for membrane-bound protein machineries to maintain optimal mitochondrial biogenesis and function. The recent review of Martensson et al., 2016 illustrated that phospholipids affect outer (TOM complex, MIM, SAM) and inner (TIM23, TIM22 and OXA) membrane protein translocases and thus play a crucial role in mitochondrial protein import [24]. The role of phospholipids on mitochondria protein is also highlighted by their impact on respiratory chain supercomplexes [24]. In these studies, one phospholipid, cardiolipin (CL) attracted scientific attention. Mostly present in the inner mitochondrial membrane, CL undergoes two main phases for its activity [24,25]. The first is its biosynthesis that takes place on the matrix face of the inner mitochondrial membranes, pathway catalysed by numerous and successive enzymes as Tam41, Pgs1, PTPMT1 and finally by CL synthase (also called *Crd1*), to form premature (nascent) CL. The second phase is the remodeling of its fatty acids, with recruitment of a new set of tissue-specific fatty acids, and its assembly into the inner membrane. Nascent CL is deacylated by CL deacylases/

phospholipases to monolyso-CL which is reacylated principally by the tafazzin to mature CL [19,25]. CL interacts with a number of inner mitochondrial membrane proteins, enzymes and metabolite carriers, such as the electron transport chain complexes involved in oxidative phosphorylation and ADP/ATP carriers, which optimize efficient electron/proton flux and hence, ATP synthesis [26]. CL is also involved in the β -oxidation of fatty acids, as a reduction of mature CL impairs skeletal muscle FA oxidation [27,28] and a positive correlation has been demonstrated between mitochondrial COX activity and CL content [29]. Patients with Barth Syndrome (a X-linked disorder resulting from mutations in the gene encoding for tafazzin) or mice models which lack mature CL, have shown exercise intolerance, cardiac and skeletal muscle dysfunction, mitochondrial dysfunction, ATP deficiency and premature mortality [30–32]. *In vitro*, mitochondrial respiration has been shown to be impaired in inducible pluripotent stem cell (iPSC)-derived human cardiomyocytes from Barth Syndrome patients [33]. Possible mechanisms for this disease-associated mitochondrial dysfunction include mitochondrial supercomplex destabilization [34], higher reduced levels of mitochondrial cardiolipin [35] and abnormal mitochondrial morphology [30]. Recently, Bashir et al., 2017 [36] found higher resting skeletal muscle [PCr]/[Pi] in children/adolescents and adults with Barth syndrome, suggesting that individuals with Barth syndrome rely on glycolytic metabolism to a greater extent than unaffected, age-matched controls, likely due to an impairment in fat oxidation. These findings highlight the crucial role that mitochondrial CL plays in skeletal muscle oxidative metabolism and mitochondria bioenergetics processes [26].

Due to energetic and structure function of fatty acids and phospholipids in muscle, we hypothesized that in MSTN deficient hypertrophied skeletal muscle, hence a change in the muscle and mitochondrial lipid composition could exist, in relation with metabolic and mitochondrial abnormalities observed in this phenotype. In this study, we evaluated the lipid profile of muscle and mitochondrial membranes from *Mstn* KO mice, and explored muscle lipid metabolism pathway. We demonstrated in MSTN deficient muscle a decrease of both lipogenesis and lipid oxidation associated with important modifications in the fatty acid composition of total muscle lipid profile. Interestingly, we also found that muscle mitochondrial proportion of cardiolipin is significantly decreased in *Mstn* KO mice correlating with the reduced gene expression of two enzymes involved in cardiolipin synthesis. These results reveal alterations of the phospholipid profile in skeletal muscle of *Mstn* KO mice. We suggest that this could be mechanism through which lack of MSTN impacts mitochondrial function.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male *Mstn* KO mice (10 weeks old) used in this study have been described previously and were generously provided by L. Grobet (Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium) [37]. These mice harbor a constitutive deletion of the third *Mstn* exon leading to the deletion of the entire mature COOH-terminal region of MSTN and were therefore null for MSTN function. The mice were generated on a FVB/N-C57BL genetic background. WT ($n = 20$) and *Mstn* KO mice ($n = 20$) were produced from homozygous matings. Parental genotyping were determined by polymerase chain reaction analysis of tail DNA. Mice were fed *ad libitum* and kept under a 12:12-h light-dark cycle.

The experimental protocols of this study were handled in strict accordance with European directives (86/609/CEE) and approved by the Ethical Committee of Region Languedoc Roussillon (APAFIS#2551-2015110311365663v2).

2.2. Muscle preparation and sample

Mice were weighed and killed by cervical elongation. Tibialis anterior, extensor digitorum longus (EDL), and quadriceps muscles were quickly excised and immediately placed in ice-cold buffer (100 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 5 mM EDTA, and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) for total mitochondria extraction. Gastrocnemius was removed and then frozen in liquid nitrogen. Gastrocnemius was powdered to perform analysis of protein, mRNA expression and analysis of fatty acid and enzymatic activity measures.

2.3. Mitochondria isolation

Total mitochondria were fractionated by differential centrifugation as described previously [38]. Briefly, muscles were freed of connective tissues, minced, and homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer. Then, mitochondria were obtained from the initial pellet following a treatment with Subtilisin A (0.25 mg/g wet muscle) and subsequent centrifugations at 800 and 9000 g. Total mitochondria were resuspended in 100 mM KCl and 10 mM MOPS, pH 7.4. Mitochondrial protein content was determined using the Bradford assay, and the yield was expressed as milligram of mitochondrial proteins per gram of muscle wet weight.

2.4. Lipids extraction and thin layer chromatography (TLC)

2.4.1. Triglyceride (TG) and free fatty acids (FFA) content in muscle lipid extracts by TLC-densitometry

Muscle lipids were extracted using a mixture of chloroform–methanol (2:1 by volume) in the presence of butylated hydroxytoluene (50 mg/L) according to [39]. The application of lipid extracts of muscle homogenate on silica gel 60 HPTLC plates (250 μ m, 20 \times 10 cm; Merck, Germany), pre-treated with 1.5% w/v boric acid in ethanol, was automatically performed on a 4-mm band width using a CAMAG ATS4 apparatus (Muttentz, Switzerland). Two developments were performed, first with pentane–chloroform–methanol (52:45:3, by volume) on 60-mm migration distance and second with pentane–diethyl ether (97:3 by volume) on 67-mm migration distance, which allowed the separation of neutral lipids. The scanning of the plates was carried out using a CAMAG TLC scanner 3 (Muttentz, Switzerland) operating in the reflectance mode. The plates were scanned at 550 nm after dipping in a solution of copper sulphate 640 mM in H₃PO₄ 1.18 M and heating for 20 min at 180 °C. The 1-monoacylglycerol (MAG), 1,2-diacylglycerol (DAG) and 1,3-DAG, TG, cholesterol (CHL) and FFA contents were finally identified by comparing their retention factor (Rf) with authentic standards and were quantified using calibration curves of the same standards [40].

2.4.2. FFA composition of muscle by gas chromatography

Fatty acid methyl esters were prepared by incubation with acidified methanol, according to the method of Lepage and Roy [41], after the addition of an internal standard (500 μ g C17:0/mL) to lipids in the Folch extract. Briefly, the methylation reagent was generated by mixing sulphuric acid (5% v.v) with methanol (95% v.v) and butylated hydroxytoluene as antioxidant (50 mg/L), and the sample was heated at 90 °C for 45 min to get the fatty acid methyl esters. After addition of sodium bicarbonate, distilled water and hexane, the sample was vortexed, centrifuged, and the upper hexane layer was transferred to a glass vial, evaporated under a nitrogen stream at 37 °C, and dissolved in iso-octane for gas chromatography analysis. Individual fatty acid methyl esters were identified according to the retention times of standards by gas liquid chromatography (Trace GC Ultra, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), with a Supelco Vax capillary column [30 m \times 0.32 mm id \times 0.25 μ m df], an AS-3000 autosampler and flame-ionization detector (Thermo Electron Corporation, Thermo Fisher Scientific). The fatty acid methyl esters were quantified using the

chromatographic peak area according to the internal standard method. The FA composition of total lipids and mitochondrial lipids were compared in terms of the percentage content of various fatty acids. The sum of the dimethylacetals DMA16:0 and DMA18:0, the main plasmalogens were also quantified, as controls and showed limited proportion in skeletal muscles.

2.4.3. Tissue desaturase indices and unsaturation index

Since it is not possible to directly measure the activity of the enzymes that catalyze the desaturation and elongation reactions in the fatty acid metabolic pathways, results in animals have supported the use of surrogate measures of desaturase activity such as the use of desaturase indices [42]. These indices are based on the ratio of product to precursor of individual fatty acids. The desaturase indices were calculated as follows: $\Delta 9$, [16:1(n – 7)/16:0]; $\Delta 6$, [18:3(n – 6)/18:2(n – 6)]; and $\Delta 5$, [20:4(n – 6)/20:3(n – 6)]. The unsaturation index (UI) was calculated from the relative percentage of each type of mono- and polyunsaturated fatty acid multiplied for the number of double bonds present in the molecule [43].

2.4.4. Phospholipid composition of muscle mitochondrial membrane by TLC-densitometry

Muscle mitochondrial suspensions were extracted by a mixture of chloroform/methanol (2:1 by volume) according to [39] in the presence of 50 mg/L of butylated hydroxytoluene. Phosphorus was quantified on Folch extracts of mitochondrial suspensions in order to determine total phospholipid quantity as previously described [44]. The application of Folch extracts of muscle mitochondrial suspensions on silica gel 60 HPTLC plates (250 μ m, 20 \times 10 cm, Merck, Germany) pretreated with 2.3% w/v boric acid in ethanol, was automatically performed on a 4 mm band width using a CAMAG ATS4 apparatus (Muttentz, Switzerland). The development was performed with methanol/acetic acid/pentane/chloroform (15/10/30/45, by volume), which allowed the separation of phospholipids on a 60 mm total migration distance. The scanning of the plates was carried out using a CAMAG TLC scanner 3 (Muttentz, Switzerland), operating in the reflectance mode. The plates were scanned at 715 nm after dipping in a solution of Blue Spray (Sigma, France) (Blue Spray/H₂SO₄ 4.2 M/acetone, 1/2/3 by volume,) and heating for 3 min at 55 °C. The different classes of phospholipids (SM, LPC, PC, PI, PS, PE, PG, PA, CL) were identified by comparing their retention factor (Rf) to authentic standards and quantified using calibration curves of the same standards [45]. Results are expressed as percentage of nmol of phosphorus in total phospholipids, and indicate for each phospholipid its proportion (%) in the composition of mitochondrial membrane. We also estimate the mitochondria CL content expressing in μ mol pf phosphorus in CL per mg of mitochondrial protein.

2.5. Enzyme activity assays

Lipids oxidation was evaluated by CS and β -HAD activities. CS activity was measured according to Srere et al. (1969) [46]: the activity of the enzyme was measured spectrophotometrically at 412 nm by following the yellow color of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, which is generated from the reaction of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid with the free-CoA liberated from the reaction of acetyl-CoA and oxaloacetate under citrate synthase action to synthesize citrate. β -HAD activity was measured according to [47]. The activity of the enzyme was measured spectrophotometrically at 340 nm by following the disappearance of NAD. The β -HAD converted the acetoacetyl-CoA in alcohol inversely β -oxidation reaction.

2.6. Protein extraction and Western blot analysis

50 mg gastrocnemius muscle powder was homogenized using an Potter-Elvehjem homogenizer Craig recrystallization tube homogenizer

(KONTES GLASS CO, Sigma, VINELAND NJ) in an ice cold extraction buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EGTA, 50 mM β -glycerophosphate, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na_3VO_4 , 10% glycerol, 1% Triton X-100, 10 μM leupeptin, 5 μM pepstatin A, 3 mM benzamide, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Proteins were denatured by mixing with an equal volume of Leammi Buffer and the linearization was achieved by heating the samples for 5 min at 95 °C. Proteins (50 μg) were separated on SDS-PAGE and then transferred (Tris-glycine 1 \times , ethanol 100%, H_2O) to a nitrocellulose membrane (nitrocellulose, 0.2 μm , Bio-RAD, CAS#9004-70-0) (90 min, 400 mA). Membranes were blocked in (Tris-buffered saline) TBS1X/0.1% Tween-20 containing either 5% fat-free milk or 5% BSA for 1 h at room temperature.

Then, membranes were incubated overnight with primary antibody against, **FAT/CD36**, **FATP1**, **FATP4**, **SCD1** (1/500; Santa Cruz Biotechnology, CA), **FABP3**, **CLS** (1/500; Abcam, Cambridge, UK), **FAS** (1/1000, Cell Signaling Technology 3180S, Danvers, MA), **CS** (1/1000; Genetex) and **α -tubulin** (1/5000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in blocking buffer. After washes in TBS1X/0.1% Tween-20 under gentle agitation, membrane was incubated for 1 h with horseradish peroxidase-labelled antibody (Anti mouse NA931V, GE, UK, Anti Rabbit NA934V, GE, UK, Anti-Goat, SC-2768, Santa Cruz Biotechnology, CA).

After further washes, antibody bound proteins were revealed using enhanced chemiluminescence detection reagents (ECL, ThermoScientific, Courtaboeuf, France). Signals detected with ChemiDoc™ Touch Imaging System instrument (Bio-RAD, 1.1.0.4, 732BR1121). α -Tubulin was used as loading reference. Gel band intensities in the membranes were measured using the Image Lab software (Version 5.2.1 for Windows 7).

2.7. Quantification of mRNA expression by real time reverse transcription (RT-qPCR)

Total RNAs were isolated from gastrocnemius muscle powder using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Venlo, The Netherlands). RNA concentration was determined by spectrophotometric analysis (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), and purity was checked by the OD260 nm/OD280 nm absorption ratio (> 1.7).

Reverse transcription reaction was performed with 1 μg of total RNA using the TAKARA kit (TAKRR037A, PrimeScript RT reagent Kit, Perfect Real Time) according to the manufacturer's instructions. One-tenth of the cDNA was used in each polymerase chain reaction (PCR).

Quantitative PCR (qPCR) analysis was performed in a MiniOpticon detection system (Bio-Rad, Hercules, CA) with 18 μL of Mastermix (SYBR Premix Ex Taq II, Takara), 300 nM of both forward and reverse primers, 2 μL of diluted cDNA template and water to a final volume of 20 μL . The forward and reverse primers used to amplify genes are listed in Table 1. We used Cpt-1 and Ppar- δ genes for lipid oxidation; Pgps for cardiolipin synthesis, Taz and Lcat1 for cardiolipin remodeling.

All PCRs were performed in duplicate using the following cycle

parameters: 30 s at 98 °C, 40 cycles of 1 s at 95 °C and 15 s at 60 °C. Relative mRNA levels were normalized to ribosomal protein ARP and α -tubulin housekeeping gene levels, which were unaffected by treatments. Results are expressed using the comparative cycle threshold (CT) method to generate $\Delta\Delta\text{CT}$ values. PCR amplification was performed with template dilutions ranging from 10^1 to 10^6 copies. Overall efficiencies (E) of PCR were calculated from the slopes of the standard curves according to the eq. $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$. All PCR efficiencies were above 95%. The relative abundance of each sample was then normalized according to the equation: Relative Quantity = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ [48].

2.8. Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM. Data were compared between the two groups of mice WT and Mstn KO using an unpaired *t*-test or a Mann-Whitney rank sum test when normality was not obtained. The significance level was set at 0.05. The data were analyzed using the statistical package GraphPad Prism version 6.02 for windows (GraphPad Software, La Jolla, California).

3. Results

3.1. Animals and muscle characteristics

Consistent with the hypermuscular phenotype, at 10 weeks of age, Mstn KO mice displayed greater body and muscle (gastrocnemius, EDL, soleus) weights compared to their WT littermates (Table 2).

3.2. Decreased lipid oxidation in Mstn KO muscle

We and others have recently shown that inhibition of Mstn represses muscle endurance and metabolic mitochondrial function [13,15]. As this metabolic phenotype is greatly dependent on lipids, we first investigated whether myostatin deletion would impact mitochondrial lipid oxidation in muscle.

Mitochondrial yield and CS quantity were significantly reduced in mstn gastrocnemius muscles (Fig. 1A and B) confirming the reduced mitochondrial pool in mstn KO mice vs. WT. The activity of isolated key mitochondrial enzymes, CS and β -HAD, was decreased in gastrocnemius muscle homogenates from KO compared to WT littermates (Fig. 1C). Supporting the decrease of lipid oxidation, we found reduced mRNA level of Cpt1, a membrane mitochondrial lipid transporter (Fig. 1D). Furthermore, mRNA levels of Ppar- δ , a key transcription factor promoting oxidative metabolism is also markedly reduced in mstn deficient muscle (Fig. 1D). Altogether, these data suggest that oxidative metabolism and lipid β -oxidation is down-regulated in the absence of myostatin. In agreement with these results, we observed decreased protein content of CD36, FABP3 (fatty acid binding protein 3), FATP1 and FATP4 (fatty acid transport proteins 1 and 4), all of which are involved in lipid membrane and cytosolic transport, in

Table 1
Primers used for real-time quantitative PCR.

Role	Gene	Reverse primer (5'–3')	Forward primer (5'–3')
Housekeeping Gene	Arp α -tubulin	5'-ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG-3' 5'-CTGGAACCCACGGTCATC-3'	5'-TCCACCTTGTCTCCAGTCT-3' 5'-GTGGCCACGAGCATAGTTATT-3'
Lipid oxidation	Cpt1 Ppar-d	5'-CATCCCAGGCAAGAGACA-3' 5'-GTATGCGCATGGACTCAC-3'	5'-AAGCGACCTTGTGGTAGACA-3' 5'-GTCTGAGCGCAGATGGACT-3'
Cardiolipin synthesis enzyme	Pgps	5'-GAGAGCCAATCAGCGTGAG-3'	5'-CAGGGTTGGACCTTTCAT-3'
Cardiolipin Remodeling enzyme	Taz Alcat1	5'-TGAAGTCCATCCCTTCTGG-3' 5'-CTGTGTTGAGGCGAGGTGT-3'	5'-GCTGCAGACATCTGCTTCCAC-3' 5'-CCAGCCCATGTTAACTGCT-3'

Table 2
Body and muscle weights in WT and *Mstn* KO mice.

Weight	WT	<i>Mstn</i> KO
Body (g)	25.7 ± 0.5	34.1 ± 0.3*
EDL (mg)	9.8 ± 0.2	18.6 ± 0.6***
Gastrocnemius (mg)	140.2 ± 0.2	259.9 ± 0.4***
Soleus (mg)	7.5 ± 0.2	14.9 ± 0.4*

Data are presented as means ± SEM; n = 20 mice in each group. WT; wild type; KO, knockout; EDL, Extensor digitorum longus.

* $p < 0.05$.

*** $p < 0.001$ vs. WT.

gastrocnemius muscle of KO mice compared to WT mice (Fig. 2A, B). Inversely, we showed that protein involved in muscle glucose uptake, as hexokinase II (HKII) and glucose transporter type 4 (GLUT4) protein content were respectively significant increased or tended to be increased in *mstn* KO muscle in comparison with control group (Fig. 3).

3.3. Decreased lipogenesis in *Mstn* KO muscles

Since lipogenesis involves synthesis of fatty acids from excess carbohydrates leading to TG storage, we next tested whether MSTN deficiency altered this metabolic pathway. Western blot analysis showed that FAS levels were decreased in *Mstn* KO gastrocnemius compared to WT (Fig. 4A). In agreement with this, we found that TG levels were 4-fold lower in *Mstn* KO mice compared with WT (Fig. 4B, C).

3.4. Modification of fatty acid composition in *Mstn* KO muscle

The structural unit of lipids is the FA, which is divided in three groups: saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). Table 3 shows distribution of 11 FAs of gastrocnemius muscle in WT and KO mice. The ratio 22:6n – 3/20:4n – 6 is 2 to 3, both in WT and KO mouse muscle, as previously reported in skeletal muscle tissue [49,50]. *Mstn* KO mice contained higher percent of SFAs (46.2 ± 3.7% vs. 40.3 ± 2.8%, $p < 0.01$), as well as PUFAs (38.6 ± 1.5% vs. 36.3% ± 1.4%,

$p < 0.01$) with increased proportion of 20:3n – 6, 20:4n – 6, 20:5n – 3 and 22:5n – 3. Interestingly, among PUFAs, an exception with the 18:2n – 6, linoleic acid is noticed with a trend of reduced expression in *mstn* KO gastrocnemius muscle compared to controls ($p = 0.092$). *Mstn* KO mice contained lower percent of MUFA (15.2 ± 3.4% vs. 23.4 ± 3.7%, $p < 0.001$) than WT. We further focused our attention on the fatty acid desaturases (Δ -9-desaturase and Δ -5-desaturase) that are involved in the synthesis of unsaturated fatty acids. Interestingly, we found a strong decrease of the index of desaturase 9 activity (16:1n – 7/16:0 and 18:1n – 9/18:0) (Table 3), which was paralleled by a strong decrease in Δ -9-desaturase protein levels (also known as stearyl-CoA desaturase SCD) in *Mstn* KO muscle (Fig. 5).

3.5. Modification in phospholipids composition in *Mstn* KO muscle

Then, we identified and compared the lipid patterns of gastrocnemius muscle from wild type and *Mstn* KO mice between the different phospholipids quantity by thin layer chromatography. Among different phospholipids analyzed, we observed a significant decrease in CL levels in *Mstn* KO suggesting modifications in mitochondria membrane phospholipid composition (Fig. 6).

3.6. Impaired phospholipid mitochondrial membrane composition in *Mstn* KO muscle

As *Mstn* deficiency led to a congenital shift towards fast glycolytic muscle fibers and a reduction in mitochondrial content, afterwards we identified and compared the lipid patterns of mitochondria membranes from wild type and *Mstn* KO mice using the same technique using mixed muscle samples. Fig. 7A shows the thin-layer chromatographic profile of the extracted lipids. The amount of SM, PI and PS was higher in *Mstn* KO mitochondria compared with WT (Fig. 7B) whereas no change in major membrane phospholipids PC and PE was observed in the two groups of mice.

Interestingly, there was a reduction in CL proportion (mean 12%) in mitochondria membrane versus the proportion of others phospholipids in *mstn* KO mice compared to WT (Fig. 7B), revealing a qualitative

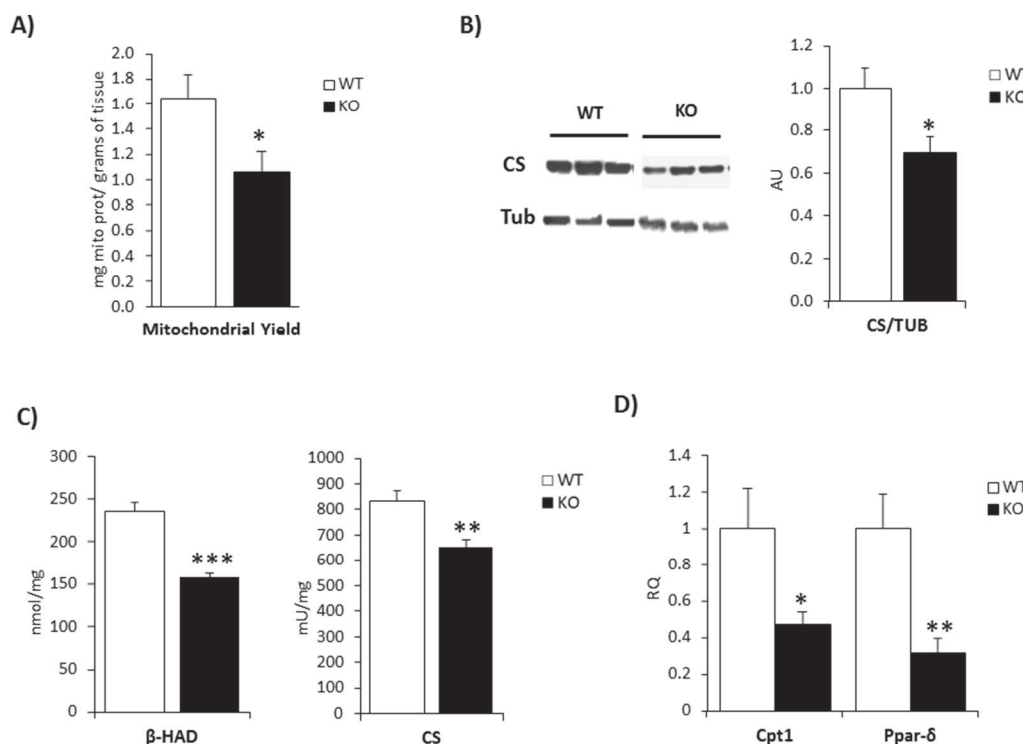


Fig. 1. Markers of mitochondrial content and β -oxidation in WT and *Mstn* KO mice. A) Mitochondrial yield in mixed muscle homogenates from WT (open bars) and *mstn* KO mice (filled bars). B) Citrate synthase quantity evaluated by Western blot in *mstn* KO muscle compared to WT muscle. A representative Western blot is presented here (each lane depicts signal obtained from 50 μ g of muscle protein from one animal after western-blot analysis) and quantification of CS protein levels expressed relative to α -tubulin levels in gastrocnemius muscle from *Mstn* KO mice compared to WT mice. The ratio is expressed relative to control WT (arbitrary taken as 1). C) Enzymatic activities evaluated by spectrophotometry of β -HAD and citrate synthase in gastrocnemius muscle homogenates from WT (open bars) and *mstn* KO mice (filled bars). D) *Cpt1* and *Ppar- δ* gene expression evaluated by RT-PCR in WT and *Mstn* KO muscle. Values are shown as means ± SEM. p -Values were calculated using the parametric test t -student, except for β -HAD and *Ppar- δ* (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. WT) mU/mg: units of activity per mg of total muscular protein. AU: Arbitrary Units. RQ: Relative Quantity. (n = 10 per group).

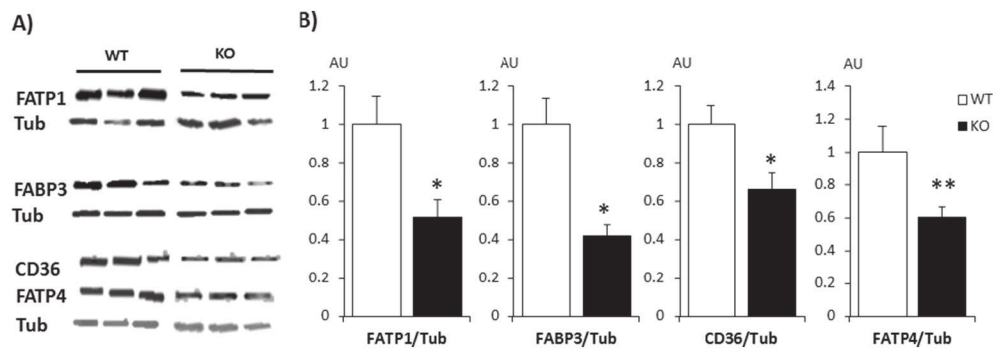


Fig. 2. Lipid transporters in WT and Mstn KO mice. A) Representative immunoblots showing protein expression levels of the lipid membrane and cytosolic transporters FATP1, FABP3, CD36 and FATP4 within the gastrocnemius of WT and Mstn KO mice. Each lane depicts signal obtained from 50 µg of muscle protein from one animal after western-blot analysis. B) Quantifications of FATP1, FABP3, CD36 and FATP4 are normalized to α-tubulin. The ratio is expressed relative to control WT (arbitrary taken as 1). Values are shown as means ± SEM. *p*-Values were calculated using the parametric test *t*-student (**p* < 0.05. ***p* < 0.01). AU: Arbitrary Units. (*n* = 10 per group).

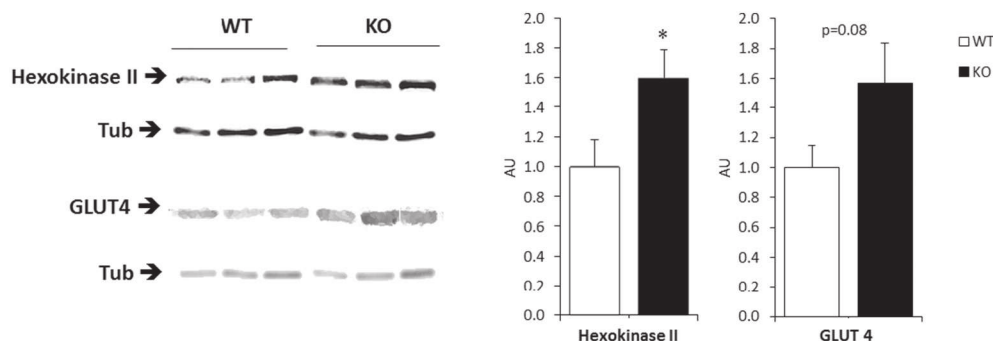


Fig. 3. Glycolytic markers in WT and Mstn KO mice. A) Representative immunoblots showing protein expression levels of the Hexokinase II and glucose transporter GLUT4 within the gastrocnemius of WT and Mstn KO mice. Each lane depicts signal obtained from 50 µg of muscle protein from one animal after western-blot analysis. B) Quantifications of hexokinase II and GLUT4 are normalized to α-tubulin. The ratio is expressed relative to control WT (arbitrary taken as 1). Values are shown as means ± SEM. *p*-Values were calculated using the parametric test *t*-student (**p* < 0.05). AU: Arbitrary Units. (*n* = 10 per group).

impact of *mstn* deficiency on mitochondrial membrane composition. We estimated the mitochondria CL content expressing in µmol of phosphorus in CL per mg of mitochondrial protein, and confirmed the reduced content (reduction of 23%) in *mstn* KO muscle compared with WT (0.07 µmol vs. 0.09 µmol of Phosphorus in CL/mg mitochondria protein, respectively, *p* < 0.05) suggesting a quantitative impact of *mstn* deficiency on CL. To determine if these impacts on CL metabolism were specific to skeletal muscles, complementary control analysis on heart mitochondria was made. Contrary to skeletal muscle, results revealed similar cardiolipin proportion and content in heart mitochondria membranes in *mstn* KO mice compared to WT (12.8 ± 1.3 vs. 12.4 ± 1.1 respectively, expressed as percentage of nmol of phosphorus in total phospholipids and 0.13 ± 0.02 vs. 0.09 ± 0.01

respectively, expressed in µmol of phosphorus in CL per mg of mitochondrial protein).

3.7. Cardiolipin synthesis pathway in Mstn KO muscle mitochondria

Thereafter, we examined the enzymes involved in CL synthesis (CLS: Cardiolipin synthase, Pgps: phosphatidylglycerolphosphate synthase) and CL remodeling (Alcat1: ER-associated monolysol-CL acyltransferase, Taz: tafazzin). At the protein level, the amount of CLS is lower in the *mstn* deficient muscle normalized by α-tubulin or by CS abundance (Fig. 8A). Furthermore mRNA level of Pgps was also significantly decreased in Mstn KO muscle (Fig. 8B) whereas the expression of the genes involved in the remodeling of CL acyl chains (Alcat1, Taz) did not change.

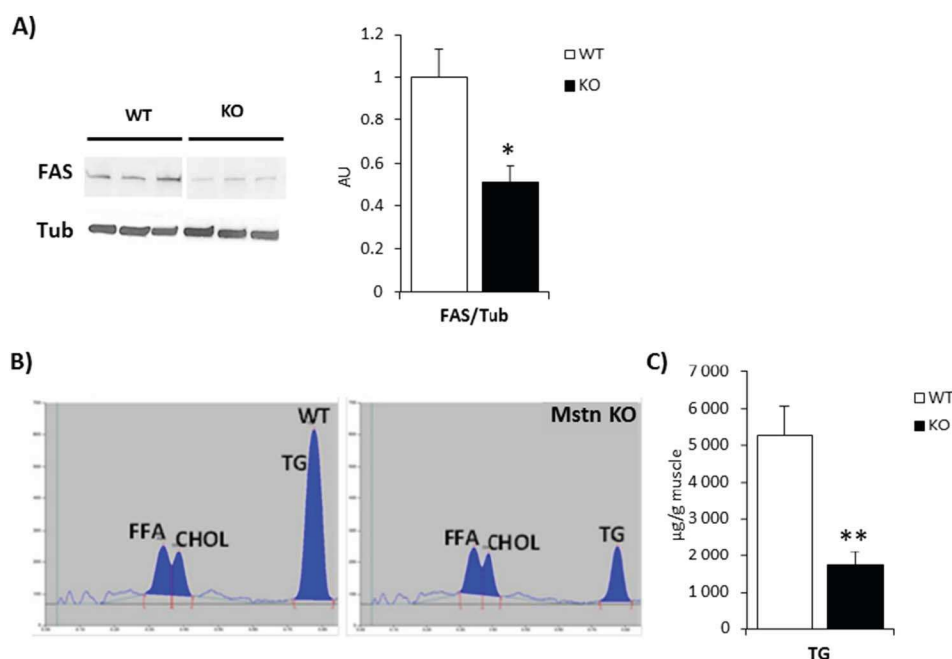


Fig. 4. Lipogenesis markers in WT and Mstn KO mice. A) Representative immunoblots showing protein expression levels and quantification of FAS evaluated by western blot (normalized to α-tubulin) in Mstn KO gastrocnemius compared with WT (*n* = 10 per group). B) Representative thin layer chromatography analysis: the profile indicates the amounts of TG, CHOL and FFA in gastrocnemius. C) Triglyceride quantity decreased in Mstn KO muscle compared with WT (*n* = 7 per group). Values are shown as means ± SEM. FAS, fatty acid synthase; Tub: α-tubulin; FFA: free fatty acids; CHOL: cholesterol, TG: triglycerides. *p*-Values were calculated using the parametric test *t*-student (**p* < 0.05. ***p* < 0.01) AU: Arbitrary Units.

Table 3

Lipid fatty acids composition in gastrocnemius muscle (mg FA/g muscle) Fatty acids distribution in WT ($n = 8$) and Mstn KO ($n = 7$) muscle evaluated by gas chromatography. SFAs, saturated fatty acids; MUFAs, monounsaturated fatty acids; PUFAs, polyunsaturated fatty acids. Relative plasmalogens amount were evaluated by quantification of the relative dimethylacetals 16 and 18 amount (DMA16:0 and DMA18:0). Values are shown as means \pm SEM. p -Values were calculated using the parametric test t -student or Mann-Whitney test when the normality was not obtained (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) Colored data represented significant differences.

Fatty acid	WT ($n=8$)	KO ($n=7$)	p values
Total SFA	40.3\pm2.8	46.2\pm3.7**	0.0043
16:0 Palmitic acid	26.8\pm1.3	29.5\pm1.7**	0.0056
18:0 Stearic acid	10.8\pm1.5	13.9\pm1.4**	0.0016
Total MUFA	23.4\pm3.7	15.2\pm3.4***	0.0008
16:1n-7 Palmitoleic acid	5.4\pm1.2	2.4\pm0.9***	0.0001
18:1n-9 Oleic acid	14.0\pm2.6	8.8\pm2.6**	0.0022
18:1n-7 Vaccenic acid	2.4\pm0.1	2.4\pm0.1	0.61
Total PUFA	36.3\pm1.4	38.6\pm1.5**	0.0078
18:2n-6 Linoleic acid	16.5\pm1.4	14.7\pm2.3	0.092
20:3n-6 Dihomo- γ -linolenic acid	0.5\pm0.7	0.7\pm0.1***	0.0001
20:4n-6 Arachidonic acid	4.5\pm0.6	6.6\pm0.5***	<0.0001
20:5n-3 Eicosapentaenoic acid	0.1\pm0.0	0.3\pm0.1**	0.0058
22:5n-3 Clupanodonic acid	1.4\pm0.2	2.1\pm0.3***	0.0002
22:6n-3 Docosahexaenoic acid	11.1\pm1.7	11.8\pm1.6	0.4
Total (n-6)	22.6\pm0.7	23.5\pm1.8	0.23
Total (n-3)	13.7\pm1.8	15.1\pm1.8	0.17
(n-6)/(n-3)	1.7\pm0.2	1.6\pm0.2	0.53
Δ-9-désaturase			
18:1n-9/18:0	1.3\pm0.4	0.6\pm0.2**	0.005
c16:1n-7/16:0	0.2\pm0.1	0.1\pm0.0***	0.0002
Δ-5-desaturase	9.4\pm0.7	9.5\pm0.6	0.66
ΣDimethylacetals	0.6\pm0.1	0.8\pm0.1	0.07

4. Discussion

MSTN is a potent inhibitor of skeletal muscle mass. Mice lacking MSTN exhibit a strong hypermuscular phenotype and a faster and more glycolytic muscle phenotype. Previous work in our laboratory revealed in Mstn KO mice significant functional abnormalities of inter-

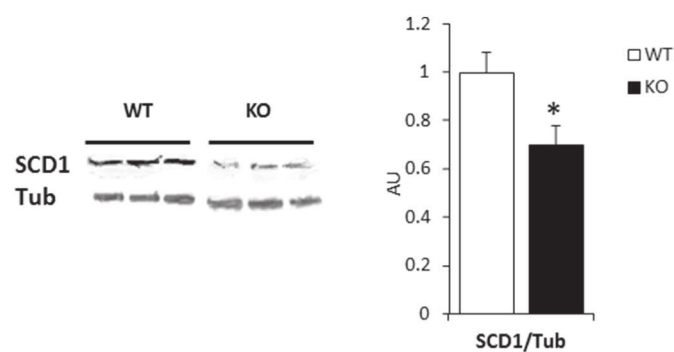


Fig. 5. Stearoyl-CoA desaturase is reduced in gastrocnemius muscles of Mstn KO mice. Quantification of SCD1 protein levels expressed relative to α -tubulin levels in gastrocnemius muscles of WT and KO mice revealed by Western blot. Each lane depicts signal obtained from 50 μ g of muscle protein from one animal after western-blot analysis. Values are means \pm SEM. p -Values were calculated using the parametric test t -student (* $p < 0.05$); $n = 8$ per group.

myofibrillar mitochondria, that are primarily involved in the process of muscle contraction [13]. These abnormalities are characterized by a decrease in the efficiency of mitochondrial respiratory coupling, resulting in excess oxygen consumption for the same production of ATP. Such mitochondrial oxidative and metabolic alterations have also been reported in mice with partial inhibition of MSTN using anti-MSTN antibody [15,51,52]. However it is still unknown how Mstn inhibition would influence the mitochondrial function. We explored the hypothesis that MSTN can impact the regulation of lipid synthesis and mitochondrial lipid content, thus affecting mitochondrial function.

In this study, we demonstrated for the first time Mstn KO mice showed alterations in lipid composition of mitochondrial membranes. In fact, we demonstrated in Mstn KO muscle a full decline in lipid pathways such as fatty acid uptake, fatty acid oxidation and fatty acid synthesis (lipogenesis) coupled to a shift in fatty acids composition illustrated by an increase in SFA and PUFA levels at the expense of MUFA levels. Interestingly, we observed a significant decrease in the proportion of CL in Mstn KO mitochondrial membranes. These findings provide evidence that at least part of the mechanism by which MSTN regulates mitochondria function is by modulating the lipid metabolism and mitochondrial membrane phospholipid composition.

4.1. Myostatin and muscle lipid metabolism

Here, we showed that Mstn gene deletion results in reduced lipolytic

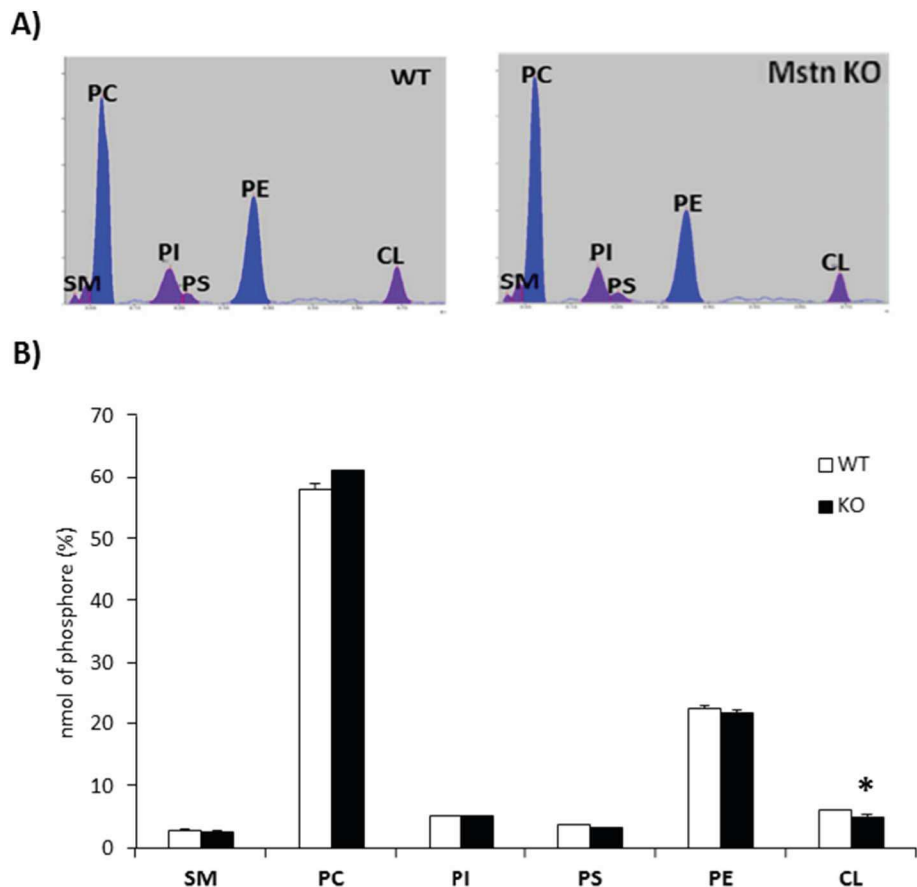


Fig. 6. Phospholipid composition of gastrocnemius muscle in WT and *Mstn* KO mice.

A) Representative thin-layer chromatographic profile of the extracted lipids. Sphingomyelin (SM), Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylethanolamine (PE) and Cardiolipin (CL) were detected with phospholipid separation. B) Quantification of phospholipids in gastrocnemius muscle of WT and *Mstn* KO mice. Results are expressed as percentage of nmol of phosphorus in total phospholipids. Values are shown as means \pm SEM, *p*-values were calculated using the parametric test *t*-student, except for CL; **p* < 0.05 vs. WT; *n* = 8 per group).

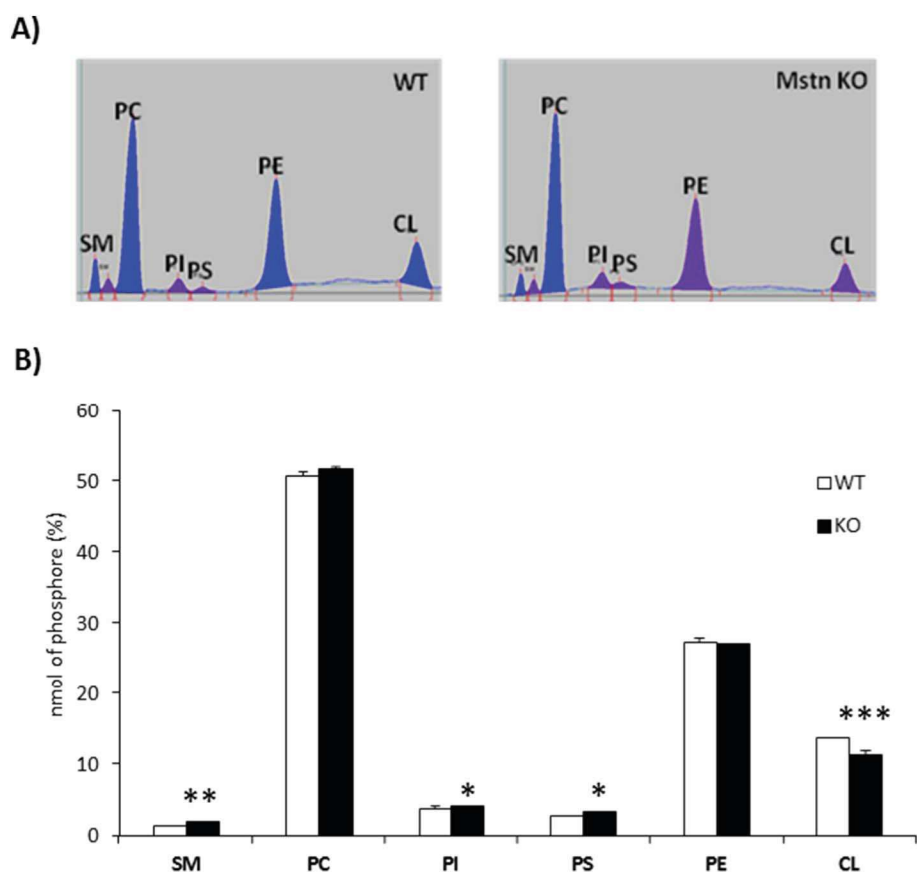


Fig. 7. Phospholipids composition of mitochondrial membrane in mixed limb muscles in WT and *Mstn* KO mice.

A) Representative thin-layer chromatographic profiles of the extracted lipids. Sphingomyelin (SM), Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylethanolamine (PE) and cardiolipin (CL) were detected with phospholipid separation. B) Quantification of phospholipids in mitochondrial membranes of mixed limb muscles of WT and *Mstn* KO mice. Results are expressed as percentage of nmol of phosphorus in total phospholipids. Values are shown as means \pm SEM, *p*-values were calculated using the parametric test *t*-student (**p* < 0.05; ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. WT). (*n* = 8 per group).

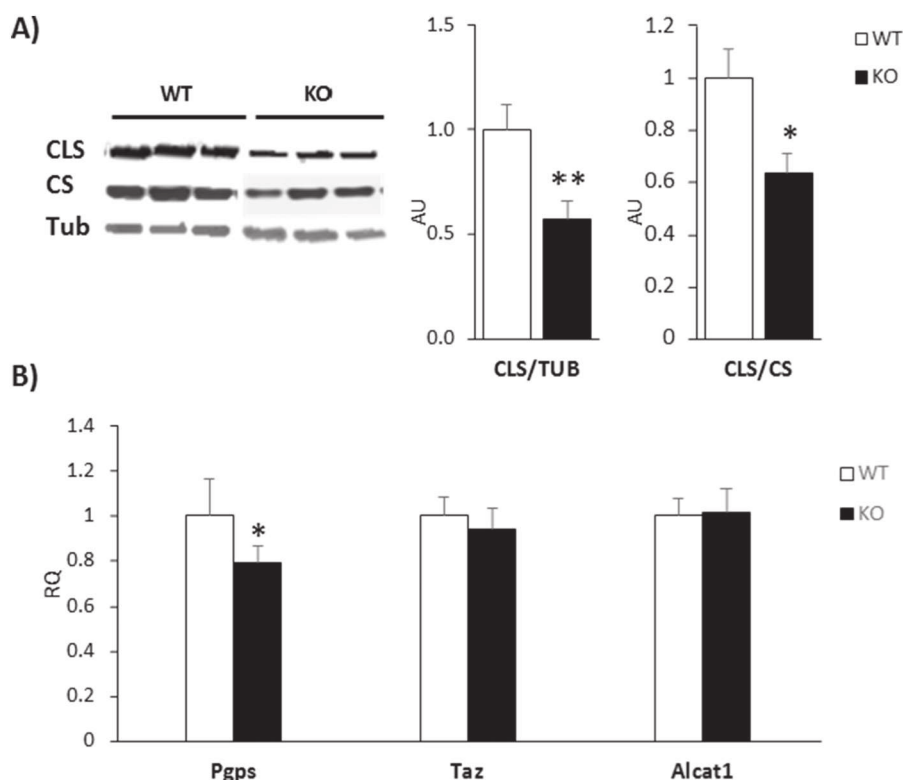


Fig. 8. Expression of enzymes of cardiolipin synthetic route. A) Endogenous CLS, CS and α -tubulin (as a loading control) were detected by western blot analysis using specific antibodies. CLS quantity was evaluated by Western Blot in KO gastrocnemius muscle and WT standardised either with α -tubulin or CS in mitochondria. Each lane depicts signal obtained from 50 μ g of muscle protein from one animal after western-blot analysis. B) Gene expression of Pggs, Taz and Alcat1 enzymes evaluated by RT-PCR in KO and WT muscle. Values are shown as means \pm SEM. *p*-Values were calculated using the parametric test *t*-student (**p* < 0.05; ***p* < 0.01). AU: Arbitrary Units, RQ: Relative Quantity. CLS: cardiolipin synthase, CS: citrate synthase, Pggs: phosphatidylglycerolphosphate synthase, Taz: taffazin, Alcat1: ER-associated monolysol-CL acyltransferase (*n* = 8 per group).

machinery in *Mstn* deficient hypertrophic muscles (impaired mitochondrial yield, CS and β -HAD activities and *Cpt1* and *Ppar- δ* gene expressions), in line with previous studies showing that oxidative metabolism is diminished in several models of *Mstn* deficiency [12,13,15,16,51]. In addition, we demonstrated that the levels of cytosolic (FABP3) and sarcolemmal lipid transporters (FATP1, FATP4) are reduced, in agreement with our previous observation showing a significant reduction of FAT/CD36 levels [16]. It should be noted that CD36, FABP3, FATP1 and FATP4 are co-expressed in skeletal muscle, and all of these proteins contributed to transport, with recent evidence suggesting that CD36 and FATP4 are qualitatively the most important [53]. Our results indicated that the process regulating fatty acids uptake into muscle by protein-mediated transport is negatively and strongly affected by MSTN deficiency. Interestingly, by evaluating lipogenesis in *Mstn* KO muscle, we found a marked decrease in triglycerides levels (70%) compared to WT muscles, correlating with the decline of FAS activity recorded. Collectively, our data pointed a role for MSTN in the regulation of muscle lipid metabolism, with a lower capacity to store, mobilize and oxidize lipids. This deficit in lipid pathway observed in our present study is counterbalanced by the increased glucose oxidation previously shown in MSTN deficient muscle by the group of McPherron. Indeed, *Mstn* KO mice have increased glucose utilization and insulin sensitivity thanks to an increase in glucose uptake in muscle and adipose tissues [54]. In the same vein, Relizani et al. reported that the blockade of *mstn* decreased mRNA levels of *Pdk4*, a regulatory protein switch of substrate utilization from glucose towards fatty acids [15]. In a previous study, we observed in aged *Mstn* KO EDL muscle a significant increase in GLUT4 protein levels, and a decrease in FAT/CD36 protein levels compared to aged WT mice [16]. In the present study, we confirm the increased content of muscle glucose uptake markers in *mstn* KO muscle. Given that FA and glucose are the main energy sources in skeletal muscle, these results suggest that MSTN could contribute to the fine regulation for the use of these two substrates. Our results demonstrate that *mstn* deficient muscle malfunctions for fat handling that could explain metabolic shift towards glycolytic pathway.

4.2. Myostatin and membrane phospholipids composition

Phospholipids affect function of protein machineries involved in respiratory metabolism, protein import, membrane architecture and mitochondrial dynamics [24]. At this point, we hypothesized that muscle lipid metabolism alterations related to MSTN deficiency can impact muscle lipid composition. We observed changes in FA composition, and components of phospholipids, in deficient *Mstn* muscles, concomitant with an increase in SFAs at the expense of MUFAs. This was accompanied by a down-regulation of *Scd1*. Of note, the promoter of *Scd1* gene contains a *Ppar* response element sequence [55]; therefore the down-regulation of *Ppar δ* that we have seen in absence of *mstn* could result in decreased gene transcription of *Scd1*. As *Scd1* converts SFA to MUFA, the down-regulation of this enzyme supports a shift away MUFA towards SFA. Biosynthesis PUFAs of the *n* - 6 and *n* - 3 series occurs via sequential desaturation, elongation and partial degradation step [56]. In our work, the impact of *mstn* deficiency on increased Δ -5 and Δ -6 desaturase activity is unlikely, as we noticed no significant change in Δ -5 desaturase activity between mice groups. Moreover, 22:6 n - 3 proportion (docosahexaenoic acid), reflecting indirectly Δ -6 desaturase activity, was not modified. The hypothesis of increased elongase and/or Δ -8 desaturase activities in *mstn* KO muscle cannot be excluded. Finally, as *mstn* KO muscle exhibited higher significant proportion of 22:5 n - 3, but not of 22:6 n - 3, the hypothesis of an inhibited peroxysomal β -oxidation can be also advanced [56].

The lipid tails of the phospholipids composing the plasma membranes can affect mechanical properties. Membrane fluidity is promoted by lipids with short, unsaturated fatty acids [57]. In DMD differentiated muscle cells, Le Borgne et al., identified an increase in PUFA and a decrease in MUFA as well as cholesterol contents. That changes affected mechanical properties, as reduced membrane fluidity was observed by fluorescence anisotropy [58]. In line with our results and these previous studies, we hypothesize a trend towards stiff and rigid membranes in *Mstn* KO skeletal muscles. The functional and clinical relevance of these modifications on muscle membrane fluidity has yet to be investigated in *mstn* KO model.

We next focused on mitochondrial membranes, where localized proteins and complexes of the respiratory chain work together to produce ATP. In *mstn* KO mitochondrial membranes, we found abnormalities in the proportion of specific lipids, including a decrease (about 12%) in the proportion of CL while SM, PI and PS are slightly but significantly increased. This result revealed a qualitative impact of *mstn* deficiency on mitochondria membrane composition, with reduced proportion of mitochondrial CL levels, an important regulator of mitochondrial metabolism. Furthermore, mitochondrial CL content reduced of 23% in *mstn* KO mice suggesting also quantitative impact of *mstn* deficiency on CL metabolism. This reduction approximates values published in previous studies related to cardiolipin and diseases, in particular those from group of Paradies et al. indicating that low levels of cardiolipin in heart mitochondria (approximating 30–40% reduction) from aged or hypothyroid rats were accompanied by lower activities of the pyruvate carrier and cytochrome oxidase and dysfunction [59–63]. Our results suggest both qualitative (reduction of 12% in the proportion) and quantitative (reduction of 23% in quantity) impacts of *mstn* deficiency on mitochondrial cardiolipin pathway.

If it is difficult to distinguish between a causal role of cardiolipin and a correlative effect, in one study, replenishment with cardiolipin of hypothyroid mitochondria restored the activity of cytochrome oxidase to control levels [60]. Synthesized in the inner mitochondrial membrane, nascent CL undergoes a remodeling process to form the mature CL [24]. Our results on enzymes involved in CL formation indicated that MSTN deficiency likely negatively affected synthesis, rather than remodeling process, that induced the lower abundance of CL. It should be added that we showed in *mstn* KO gastrocnemius a tendency towards the reduction of linoleic acid (18:2n – 6), the most abundant fatty acid in CL [64]. As a close interplay between CL biosynthesis and oxidative phosphorylation is recognized [24], our results raise the question of the link with the compromised bioenergetic capacity observed in this hypertrophic muscle. We recognize that direct evidence is still missing, and should be discussed with caution. However, our results suggest a specific effect on skeletal muscle. Indeed, no impact of *mstn* deficiency has been observed on mitochondrial CL proportion/content in heart, an organ without functional impairment in this mice model. These results strengthen and highlight correlation between cardiolipin pathway and mitochondrial impairment, as only skeletal muscle from *mstn* KO mice presents both qualitative and quantitative impacts on mitochondrial membrane cardiolipin pathway with oxidative mitochondrial and functional disorders. CL plays an essential role in maintaining an adequate membrane potential [65], but arguably, the most important function of CL in mitochondria is the effect it has on the association of protein complexes and supercomplexes [25]. Actually, this specific phospholipid of the mitochondria plays an important role in respiratory chain (biogenesis, stability and activity of the respiratory complexes), in the β -oxidation of fatty acids and is involved in the last step of energy conversion, namely the production of ATP [24–26]. Crystallographic and nuclear magnetic resonance studies showed the presence of CL, in particular the species rich in 18:2n – 6, associated with complex I, III and IV, with the ATP synthase and the ANT [66,25] and its presence is essential for the functionality structure of these proteins, and thus for their optimal activity ([25] for Review). For instance, the full transport activity of the ADP/ATP carrier depends on the presence of CL [67]. Inversely, the oligomerization state of ADP/ATP carrier in mitochondria, and its association with other protein complexes are altered in the absence of CL [68]. Interestingly, our previous data highlighted metabolic perturbations exclusively in the respiration of intermyofibrillar (IMF) mitochondria from *Mstn*-deficient muscle [13]. In diabetes mellitus type 1, cardiolipin content is decreased in the IMF subpopulation, but not in the sub-sarcolemmal subpopulation [69,70]. The decrease in CL mitochondria content, demonstrated in our study, could thus lead to the uncoupling in the mitochondria respiration (decay in the respiratory ratio control in the IMF mitochondria) and the decrease in ATP production previously reported in *mstn* KO muscle [13,71].

Consequently, we propose that the significant decrease in CL in *Mstn* KO mice, pointing to a defect of IMF, as one causative mechanism for the metabolic phenotype.

Our results reveal alterations in mitochondrial membrane lipids related to MSTN deficiency. How can we link membrane lipid changes to MSTN? We showed that MSTN deficiency down-regulates expression of PPAR δ transcription factor, which regulates fatty acid transport and oxidation in skeletal muscle [72–75]. Indeed, genes involved in energy metabolism including *Fatp*, *Pdk4* are induced by a PPAR δ specific agonist. In addition, Wang et al. showed that the PPAR δ -mediated reprogramming of muscle fiber involves the increased expression of genes related to fatty acid oxidation, mitochondrial respiration, oxidative metabolism, and slow-twitch contractile apparatus [73]. This suggests that MSTN might regulate membrane lipid changes via PPAR activity. Since *Mstn* KO mice have fiber hypertrophy in muscles composed predominantly of fast glycolytic fibers [12,76], it is possible that the decrease in oxidative metabolism and β -oxidation is an indirect effect and related to the fast-twitch phenotype. In fact, PPAR δ is preferentially found in oxidative rather than glycolytic myofibers [73]. Nevertheless, reduction of oxidative metabolism has been demonstrated using post-natal *Mstn* inhibition, where fiber type composition was not affected [15,69,77]. Furthermore, no difference has been noted in the percentage of CL in mitochondria from muscles with varying oxidative potentials, as well as in the percent of phospholipid head groups or major fatty acid subclasses [70]. However, rates of palmitate oxidation were positively correlated with both the unsaturation index and relative abundance of cardiolipin within mitochondria [69]. Overall, this suggests that the glycolytic shift cannot be the only mechanism to explain oxidative metabolism decline and membrane lipid changes in *Mstn* KO mice.

5. Conclusion and perspectives

To conclude, the results of the present study show that MSTN absence significantly alters the mitochondrial lipidome. This abnormality may be related to the impairment in mitochondrial function and the higher susceptibility to fatigue in this hypertrophic model, as lipids and in particular cardiolipin play central roles in optimal mitochondrial function. Future studies that modulate the membrane phospholipid composition in mitochondria and muscle in *Mstn* deficient models will be required for rigorous examination of how the abundance of each class of phospholipids becomes optimized, and in turn affects mitochondrial respiratory function and oxidative metabolism. In this context, nutritional regimes or endurance training are two potential strategies to induce a remodeling of mitochondrial membrane phospholipid composition [78,79], and thus should be studied in the future to elucidate the link between membrane lipid changes and *mstn* signaling pathway.

Funding

This study was supported by funds from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the University of Montpellier. N.B. is the recipient of doctoral fellowship financed by the Tunisian National Ministry of Higher Education and Research.

Ethical statements

The manuscript does not contain clinical studies or patient data. The experimental protocols of this study were handled in strict accordance with European directives on animal right (86/609/CEE) and approved by the Ethical Committee of Region Languedoc Roussillon (APAFIS#2551-2015110311365663v2).

Furthermore, the authors declare that they have no conflict of interest.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.017> associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgments

We also would like to thank the animal staff from our METAMUS platform facility, which belongs to “Montpellier animal facilities network” (RAM): Sylvain Cerda, Romain Godoye, Mélanie Macart, and Christelle Bertrand-Gaday, as well as Bruno Baréa (CIRAD, UMR IATE,F-34398) for his technical assistance on GC analysis. Special thanks go to Ayesha Saleem, Vincent Ollendorff, and Amel Zroud for critical readings of the manuscript.

References

- [1] A.C. McPherron, A.M. Lawler, S.J. Lee, Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member, *Nature* 387 (1997) 83–90.
- [2] L. Grobet, L.J. Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Ménessier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset, M. Georges, A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle, *Nat. Genet.* 17 (1997) 71–74.
- [3] R. Kambadur, M. Sharma, T.P. Smith, J.J. Bass, Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle, *Genome Res.* 7 (1997) 910–916.
- [4] A. Clop, F. Marcq, H. Takeda, D. Pirottin, X. Tordoir, B. Bibé, J. Bouix, F. Caiment, J.-M. Elsen, F. Eychenne, C. Larzul, E. Laville, F. Meish, D. Milenkovic, J. Tobin, C. Charlier, M. Georges, A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep, *Nat. Genet.* 38 (2006) 813–818.
- [5] M. Schuelke, K.R. Wagner, L.E. Stolz, C. Hübner, T. Riebel, W. Kömen, T. Braun, J.F. Tobin, S.-J. Lee, Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 2682–2688.
- [6] S. Bogdanovich, T.O.B. Krag, E.R. Barton, L.D. Morris, L.-A. Whittemore, R.S. Ahima, T.S. Khurana, Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade, *Nature* 420 (2002) 418–421.
- [7] Y. Ohsawa, T. Okada, S.-I. Nishimatsu, M. Ishizaki, T. Suga, M. Fujino, T. Murakami, M. Uchino, K. Tsuchida, S. Noji, A. Hinohara, T. Shimizu, K. Shimizu, Y. Sunada, An inhibitor of transforming growth factor beta type I receptor ameliorates muscle atrophy in a mouse model of caveolin 3-deficient muscular dystrophy, *Lab. Invest.* 92 (2012) 1100–1114.
- [8] L. Zhang, V. Rajan, E. Lin, Z. Hu, H.Q. Han, X. Zhou, Y. Song, H. Min, X. Wang, J. Du, W.E. Mitch, Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease, *FASEB J.* 25 (2011) 1653–1663.
- [9] E.L.F. Holzbaur, D.S. Howland, N. Weber, K. Wallace, Y. She, S. Kwak, L.A. Tchistiakova, E. Murphy, J. Hinson, R. Karim, X.Y. Tan, P. Kelley, K.C. McGill, G. Williams, C. Hobbs, P. Doherty, M.M. Zaleska, M.N. Pangalos, F.S. Walsh, Myostatin inhibition slows muscle atrophy in rodent models of amyotrophic lateral sclerosis, *Neurobiol. Dis.* 23 (2006) 697–707.
- [10] K.R. Wagner, Muscle regeneration through myostatin inhibition, *Curr. Opin. Rheumatol.* 17 (2005) 720–724.
- [11] H. Amthor, R. Macharia, R. Navarrete, M. Schuelke, S.C. Brown, A. Otto, T. Voit, F. Muntoni, G. Vrbóva, T. Partridge, P. Zammit, L. Bunker, K. Patel, Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 1835–1840.
- [12] C.L. Mendias, J.E. Marcin, D.R. Calderon, J.A. Faulkner, Contractile properties of EDL and soleus muscles of myostatin-deficient mice, *J. Appl. Physiol.* 1985 (101) (2006) 898–905.
- [13] C. Ploquin, B. Chabi, G. Fouret, B. Vernus, C. Feillet-Coudray, C. Coudray, A. Bonnieu, C. Ramonatxo, Lack of myostatin alters intermyofibrillar mitochondria activity, unbalances redox status, and impairs tolerance to chronic repetitive contractions in muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302 (2012) E1000–E1008.
- [14] B. Giannesini, C. Vilmen, H. Amthor, M. Bernard, D. Bendahan, Lack of myostatin impairs mechanical performance and ATP cost of contraction in exercising mouse gastrocnemius muscle in vivo, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305 (2013) E33–E40.
- [15] K. Relizani, E. Mouisel, B. Giannesini, C. Hourdè, K. Patel, S. Morales Gonzalez, K. Jülich, A. Vignaud, F. Piétri-Rouxel, D. Fortin, L. Garcia, S. Blot, O. Ritvos, D. Bendahan, A. Ferry, R. Ventura-Clapier, M. Schuelke, H. Amthor, Blockade of ActRIIB signaling triggers muscle fatigability and metabolic myopathy, *Mol. Ther.* 22 (2014) 1423–1433.
- [16] M. Pauly, B. Chabi, F.B. Favier, F. Vanterpool, S. Matecki, G. Fouret, B. Bonafos, B. Vernus, C. Feillet-Coudray, C. Coudray, A. Bonnieu, C. Ramonatxo, Combined strategies for maintaining skeletal muscle mass and function in aging: myostatin inactivation and AICAR-associated oxidative metabolism induction, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 70 (2015) 1077–1087.
- [17] E. Ojuka, B. Andrew, N. Bezuidenhout, S. George, G. Maarman, H.P. Madlala, A. Mendham, P.O. Osiki, Measurement of β -oxidation capacity of biological samples by respirometry: a review of principles and substrates, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 310 (2016) E715–E723.
- [18] C. Saponaro, M. Gaggini, F. Carli, A. Gastaldelli, The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: a critical point in metabolic homeostasis, *Nutrients* 7 (2015) 9453–9474.
- [19] E.M. Mejia, G.M. Hatch, Mitochondrial phospholipids: role in mitochondrial function, *J. Bioenerg. Biomembr.* 48 (2016) 99–112.
- [20] T.D. Heden, P.D. Neuffer, K. Funai, Looking beyond structure: membrane phospholipids of skeletal muscle mitochondria, *Trends Endocrinol. Metab.* 27 (2016) 553–562.
- [21] R.B. Sher, C. Aoyama, K.A. Huebsch, S. Ji, J. Kerner, Y. Yang, W.N. Frankel, C.L. Hoppel, P.A. Wood, D.E. Vance, G.A. Cox, A rostrocaudal muscular dystrophy caused by a defect in choline kinase beta, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 4938–4948.
- [22] G. Wu, R.B. Sher, G.A. Cox, D.E. Vance, Understanding the muscular dystrophy caused by deletion of choline kinase beta in mice, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 347–356.
- [23] S. Mitsuhashi, H. Hatakeyama, M. Karahashi, T. Koumura, I. Nonaka, Y.K. Hayashi, S. Noguchi, R.B. Sher, Y. Nakagawa, G. Manfredi, Y. Goto, G.A. Cox, I. Nishino, Muscle choline kinase beta defect causes mitochondrial dysfunction and increased mitophagy, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 3841–3851.
- [24] C.U. Mårtensson, K.N. Doan, T. Becker, Effects of lipids on mitochondrial functions, *Biochim. Biophys. Acta* 1862 (2017) 102–113.
- [25] M. Schlame, M.L. Greenberg, Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin, *Biochim. Biophys. Acta* 1862 (2017) 3–7.
- [26] G. Paradies, V. Paradies, V. De Benedictis, F.M. Ruggiero, G. Petrosillo, Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta* 1837 (2014) 408–417.
- [27] M.J. Carper, S. Zhang, J. Turk, S. Ramanadham, Skeletal muscle group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta): expression and role in fatty acid oxidation, *Biochemistry (Mosc)* 47 (2008) 12241–12249.
- [28] J.J. Maguire, Y.Y. Tyurina, D. Mohammadyani, A.A. Kapralov, T.S. Anthonymuthu, F. Qu, A.A. Amoscato, L.J. Sparvero, V.A. Tyurin, J. Planas-Iglesias, R.-R. He, J. Klein-Seetharaman, H. Bayir, V.E. Kagan, Known unknowns of cardiolipin signaling: the best is yet to come, *Biochim. Biophys. Acta* 1862 (2017) 8–24.
- [29] V.A. Fajardo, L. McMeekin, C. Saint, P.J. LeBlanc, Cardiolipin linoleic acid content and mitochondrial cytochrome c oxidase activity are associated in rat skeletal muscle, *Chem. Phys. Lipids* 187 (2015) 50–55.
- [30] P.G. Barth, H.R. Scholte, J.A. Berden, J.M. Van der Klei-Van Moorsel, I.E. Luyt-Houwen, E.T. Van't Veer-Korthof, J.J. Van der Harten, M.A. Sobotka-Plojhar, An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes, *J. Neurol. Sci.* 62 (1983) 327–355.
- [31] C.T. Spencer, B.J. Byrne, R.M. Bryant, R. Margossian, M. Maisenbacher, P. Breitenger, P.B. Benni, S. Redfearn, E. Marcus, W.T. Cade, Impaired cardiac reserve and severely diminished skeletal muscle O₂ utilization mediate exercise intolerance in Barth syndrome, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301 (2011) H2122–H2129.
- [32] C. Powers, Y. Huang, A. Strauss, Z. Khuchua, Diminished exercise capacity and mitochondrial bc1 complex deficiency in tafazzin-knockdown mice, *Front. Physiol.* 4 (2013) 74.
- [33] G. Wang, M.L. McCain, L. Yang, A. He, F.S. Pasqualini, A. Agarwal, H. Yuan, D. Jiang, D. Zhang, L. Zangi, J. Geva, A.E. Roberts, Q. Ma, J. Ding, J. Chen, D.-Z. Wang, K. Li, J. Wang, R.J.A. Wanders, W. Kulik, F.M. Vaz, M.A. Laflamme, C.E. Murry, K.R. Chien, R.I. Kelley, G.M. Church, K.K. Parker, W.T. Pu, Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies, *Nat. Med.* 20 (2014) 616–623.
- [34] F. Gonzalez, M. D'Aurelio, M. Boutant, A. Moustapha, J.-P. Puech, T. Landes, L. Arnauné-Pelloquin, G. Vial, N. Taleux, C. Slomianny, R.J. Wanders, R.H. Houtkooper, P. Bellenger, I.M. Møller, E. Gottlieb, F.M. Vaz, G. Manfredi, P.X. Petit, Barth syndrome: cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation, *Biochim. Biophys. Acta* 1832 (2013) 1194–1206.
- [35] Y. Xu, C.K.L. Phoon, B. Berno, K. D'Souza, E. Hoedt, G. Zhang, T.A. Neubert, R.M. Epanand, M. Ren, M. Schlame, Loss of protein association causes cardiolipin degradation in Barth syndrome, *Nat. Chem. Biol.* 12 (2016) 641–647.
- [36] A. Bashir, K.L. Bohnert, D.N. Reeds, L.R. Peterson, A.J. Bittel, L. de Las Fuentes, C.A. Pacak, B.J. Byrne, W.T. Cade, Impaired cardiac and skeletal muscle bioenergetics in children, adolescents, and young adults with Barth syndrome, *Physiol. Rep.* 5 (2017).
- [37] L. Grobet, D. Pirottin, F. Farnir, D. Poncelet, L.J. Royo, B. Brouwers, E. Christians, D. Desmecht, F. Coignoul, R. Kahn, M. Georges, Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene, *Genesis* 2000 (35) (2003) 227–238.
- [38] A.M. Cogswell, R.J. Stevens, D.A. Hood, Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions, *Am. J. Phys.* 264 (1993) C383–C389.
- [39] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [40] C. Coudray, G. Fouret, K. Lambert, C. Ferreri, J. Rieusset, A. Blachnio-Zabielska, J. Lecomte, R. Ebabe Elle, E. Badia, M.P. Murphy, C. Feillet-Coudray, A mitochondrial-targeted ubiquinone modulates muscle lipid profile and improves mitochondrial respiration in obese genetic diet-fed rats, *Br. J. Nutr.* 115 (2016) 1155–1166.
- [41] G. Lepage, C.C. Roy, Specific methylation of plasma nonesterified fatty acids in a one-step reaction, *J. Lipid Res.* 29 (1988) 227–235.
- [42] E. Warensjö, U. Risérus, I.-B. Gustafsson, R. Mohsen, T. Cederholm, B. Vessby,

- Effects of saturated and unsaturated fatty acids on estimated desaturase activities during a controlled dietary intervention, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 18 (2008) 683–690.
- [43] M. Aoun, G. Fouret, F. Michel, B. Bonafos, J. Ramos, J.-P. Cristol, M.-A. Carbonneau, C. Coudray, C. Feillet-Coudray, Dietary fatty acids modulate liver mitochondrial cardiolipin content and its fatty acid composition in rats with non alcoholic fatty liver disease, *J. Bioenerg. Biomembr.* 44 (2012) 439–452.
- [44] G.R. Bartlett, Phosphorus assay in column chromatography, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 466–468.
- [45] G. Fouret, E. Toikka, J. Lecomte, B. Bonafos, M. Aoun, M.P. Murphy, C. Ferreri, C. Chatgililoglu, E. Dubreucq, C. Coudray, C. Feillet-Coudray, The mitochondrial-targeted antioxidant, MitoQ, increases liver mitochondrial cardiolipin content in obesogenic diet-fed rats, *Biochim. Biophys. Acta* 1847 (2015) 1025–1035.
- [46] P.A. Srere, An eclectic view of metabolic regulation: control of citrate synthase activity, *Adv. Enzym. Regul.* 9 (1970) 221–233.
- [47] K. Yang, L. Julian, F. Rubio, A. Sharma, H. Guan, Cadmium reduces 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and expression in human placental trophoblast cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290 (2006) E135–E142, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00356.2005>.
- [48] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1101–1108.
- [49] G.C. Henderson, M.A. Tuazon, Separation of positional and geometrical fatty acid isomers as 2-nitrophenylhydrazide derivatives by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 413 (2011) 66–68.
- [50] M.A. Tuazon, G.C. Henderson, Fatty acid profile of skeletal muscle phospholipid is altered in mdx mice and is predictive of disease markers, *Metabolism* 61 (2012) 801–811.
- [51] E. Mousel, K. Relizani, L. Mille-Hamard, R. Denis, C. Hourd e, O. Agbulut, K. Patel, L. Arandel, S. Morales-Gonzalez, A. Vignaud, L. Garcia, A. Ferry, S. Luquet, V. Billat, R. Ventura-Clapier, M. Schuelke, H. Amthor, Myostatin is a key mediator between energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307 (2014) R444–R454.
- [52] J.J. Hulmi, B.M. Oliveira, M. Silvennoinen, W.M.H. Hoogaars, A. Pasternack, H. Kainulainen, O. Ritvos, Exercise restores decreased physical activity levels and increases markers of autophagy and oxidative capacity in myostatin/activin-blocked mdx mice, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305 (2013) E171–E182.
- [53] J.G. Nickerson, H. Alkhateeb, C.R. Benton, J. Lally, J. Nickerson, X.-X. Han, M.H. Wilson, S.S. Jain, L.A. Snook, J.F.C. Glatz, A. Chabowski, J.J.F.P. Luiken, A. Bonen, Greater transport efficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36 and FATP4 compared with FABPpm and FATP1 and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 16522–16530.
- [54] T. Guo, W. Jou, T. Chanturiya, J. Portas, O. Gavrilova, A.C. McPherron, Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity, *PLoS One* 4 (2009) e4937.
- [55] L. Teboul, M. Febbraio, D. Gaillard, E.Z. Amri, R. Silverstein, P.A. Grimaldi, Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation, *Biochem. J.* 360 (2001) 305–312.
- [56] H. Guillou, D. Zdravac, P.G.P. Martin, A. Jacobsson, The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: insights from transgenic mice, *Prog. Lipid Res.* 49 (2010) 186–199.
- [57] J.C.M. Holthuis, A.K. Menon, Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis, *Nature* 510 (2014) 48–57.
- [58] F. Le Borgne, S. Guyot, M. Logerot, L. Beney, P. Gervais, J. Demarquoy, Exploration of lipid metabolism in relation with plasma membrane properties of Duchenne muscular dystrophy cells: influence of L-carnitine, *PLoS One* 7 (2012) e49346.
- [59] G. Paradies, F.M. Ruggiero, Decreased activity of the pyruvate translocator and changes in the lipid composition in heart mitochondria from hypothyroid rats, *Arch. Biochem. Biophys.* 269 (1989) 595–602.
- [60] G. Paradies, G. Petrosillo, F.M. Ruggiero, Cardiolipin-dependent decrease of cytochrome c oxidase activity in heart mitochondria from hypothyroid rats, *Biochim. Biophys. Acta* 1319 (1997) 5–8.
- [61] G. Paradies, F.M. Ruggiero, P. D'Ino, G. Petrosillo, E. Quagliariello, Decreased cytochrome oxidase activity and changes in phospholipids in heart mitochondria from hypothyroid rats, *Arch. Biochem. Biophys.* 307 (1993) 91–95.
- [62] G. Paradies, F.M. Ruggiero, G. Petrosillo, E. Quagliariello, Alterations in carnitine-acylcarnitine translocase activity and in phospholipid composition in heart mitochondria from hypothyroid rats, *Biochim. Biophys. Acta* 1362 (1997) 193–200.
- [63] G. Paradies, F.M. Ruggiero, G. Petrosillo, E. Quagliariello, Age-dependent decline in the cytochrome c oxidase activity in rat heart mitochondria: role of cardiolipin, *FEBS Lett.* 406 (1997) 136–138.
- [64] M. Schlame, S. Shanske, S. Doty, T. König, T. Sculco, S. DiMauro, T.J. Blanck, Microanalysis of cardiolipin in small biopsies including skeletal muscle from patients with mitochondrial disease, *J. Lipid Res.* 40 (1999) 1585–1592.
- [65] R.H. Houtkooper, F.M. Vaz, Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65 (2008) 2493–2506.
- [66] M. Schlame, M. Ren, The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 2080–2083.
- [67] B. Hoffmann, A. St ockl, M. Schlame, K. Beyer, M. Klingenberg, The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1940–1944.
- [68] S.M. Claypool, Y. Oktay, P. Boonthueung, J.A. Loo, C.M. Koehler, Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane, *J. Cell Biol.* 182 (2008) 937–950.
- [69] G.P. Holloway, V.A. Fajardo, L. McMeekin, P.J. LeBlanc, Unsaturation of mitochondrial membrane lipids is related to palmitate oxidation in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria, *J. Membr. Biol.* 245 (2012) 165–176.
- [70] L.E. Stefanyk, N. Coverdale, B.D. Roy, S.J. Peters, P.J. LeBlanc, Skeletal muscle type comparison of subsarcolemmal mitochondrial membrane phospholipid fatty acid composition in rat, *J. Membr. Biol.* 234 (2010) 207–215.
- [71] C. Baligand, H. Gilson, J.C. Ménard, O. Schakman, C. Wary, J.-P. Thissen, P.G. Carlier, Functional assessment of skeletal muscle in intact mice lacking myostatin by concurrent NMR imaging and spectroscopy, *Gene Ther.* 17 (2010) 328–337.
- [72] G.D. Barish, V.A. Narkar, R.M. Evans, PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 590–597.
- [73] Y.-X. Wang, C.-L. Zhang, R.T. Yu, H.K. Cho, M.C. Nelson, C.R. Bayuga-Ocampo, J. Ham, H. Kang, R.M. Evans, Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta, *PLoS Biol.* 2 (2004) e294.
- [74] S. Luquet, J. Lopez-Soriano, D. Holst, A. Fredenrich, J. Melki, M. Rassoulzadegan, P.A. Grimaldi, Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability, *FASEB J.* 17 (2003) 2299–2301.
- [75] Y.Z. Feng, N. Nikoli c, S.S. Bakke, M.V. Boekschoten, S. Kersten, E.T. Kase, A.C. Rustan, G.H. Thoresen, PPAR  activation in human myotubes increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity and reduces glucose utilization by a switch in substrate preference, *Arch. Physiol. Biochem.* 120 (2014) 12–21.
- [76] A.C. McPherron, S.J. Lee, Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 12457–12461.
- [77] F. Rahimov, O.D. King, L.C. Warsing, R.E. Powell, C.P. Emerson, L.M. Kunkel, K.R. Wagner, Gene expression profiling of skeletal muscles treated with a soluble activin type IIB receptor, *Physiol. Genomics* 43 (2011) 398–407.
- [78] C. Feillet-Coudray, G. Fouret, F. Casas, C. Coudray, Impact of high dietary lipid intake and related metabolic disorders on the abundance and acyl composition of the unique mitochondrial phospholipid, cardiolipin, *J. Bioenerg. Biomembr.* 46 (2014) 447–457.
- [79] M.G. Nikolaidis, V. Mougios, Effects of exercise on the fatty-acid composition of blood and tissue lipids, *Sports Med.* 34 (2004) 1051–1076.

Données complémentaires non publiées en relation avec l'étude 1

Dans cette expérimentation, nous avons vérifié également si les changements dans le métabolisme oxydatif étaient liés tout ou en partie au changement dans la distribution des types de fibres observée chez les souris *Mstn* - / -. Pour répondre à cette question, nous avons exploité le modèle de souris transgénique surexprimant *Gasp1*, précédemment caractérisé par Monestier et al (2012). En tant qu'inhibiteur extracellulaire de la voie de signalisation de la myostatine, la sur-expression de *Gasp1* chez la souris améliore la croissance musculaire, mais sans altérer la distribution du type de fibre, ce qui diffère de ce que l'on observe chez les souris *mstn* KO.

Effet de *Gasp 1* sur le métabolisme oxydatif et le phénotype musculaire

Animaux :

Pour ces expérimentations, une collaboration avec l'UMR1061 (Unité de Génétique Moléculaire Animale, INRA, Limoges, France) a été mise en place pour fournir les animaux. 10 souris femelles WT et 10 souris femelles *surGasp1* (*surGasp*) (modèle décrit par Monestier et al. 2012), âgées de 10 semaines, ont été reçues. Les animaux ont été produits des accouplements homozygotes. Le génotypage parental a été déterminé par une analyse de PCR de l'ADN de la queue. Les souris ont été nourries et maintenues sous un cycle 12/12h jour/nuit.

Résultats :

Comme attendu, nous avons montré qu'à l'âge de 10 semaines, les souris transgéniques *surGasp1* présentent des poids corporels et musculaires (gastrocnemius, tibialis antérieur) plus élevés que leurs homologues WT (Table 1), malgré une composition de type fibre non modifiée déterminée par l'expression de l'ARNm des chaînes lourdes de myosine (MHC) (Figure 1). Il est à noter que l'augmentation de la masse musculaire dans ce modèle d'inhibition de *mstn* est moins importante que dans le modèle souris KO *mstn*.

	WT	<i>surGasp</i>
N	10	10
Poids	20.0±0.3	28.3±0.5***
TA	38.5±0.9	67.5±2.2***
GAS	104.2±2.5	159.5±3.1***

Tableau 1. Poids corporel et musculaire chez les deux génotypes WT vs *surGasp*. Les valeurs sont exprimées ± SEM. Gastro: gastrocnémien; TA: tibialis anterior. *p <0.05 *surGasp* versus WT; n=10 dans chaque groupe.

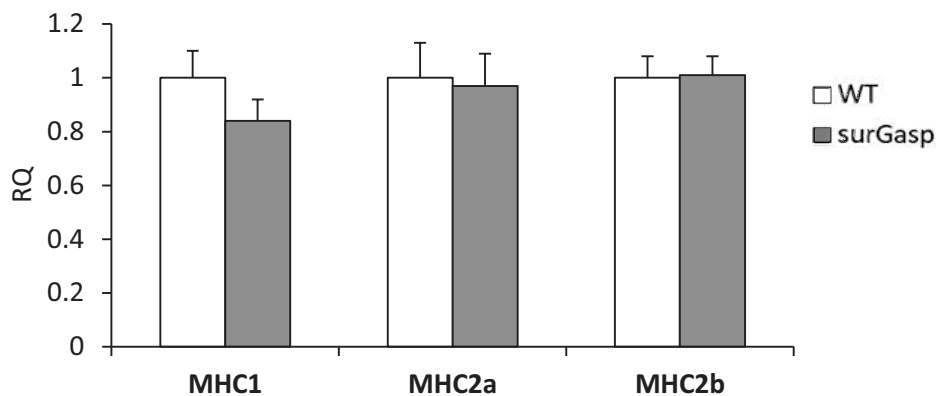


Figure 1 : Typologie des fibres musculaires dans le muscle des surGasp vs WT (n=8 dans chaque group) évaluée par RT-qPCR. Les valeurs sont exprimées par rapport la moyenne \pm SEM. Comparaison entre les deux groupes en utilisant t test de Student, MHC: myosin heavy chain, RQ : relative Quantity

Il est intéressant de noter que l'expression des transcrits de PPAR δ et de PGC1 α (figure 2A) et le taux de citrate synthase sont significativement réduits dans le muscle des souris surGasp (figure 2B) suggérant des changements dans la régulation du métabolisme oxydatif indépendamment de la typologie musculaire.

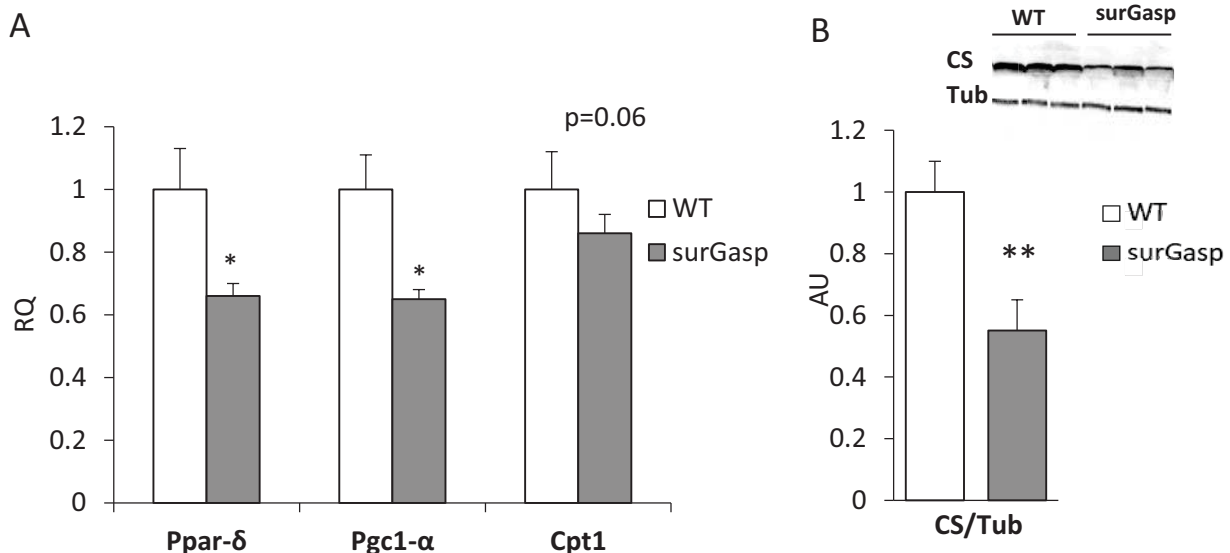


Figure 2: Evaluation de métabolisme oxydatif chez les souris surGasp1 vs les contrôles. A/Expression des gènes de Ppar- δ , Pgc1- α et Cpt1 par Rt-qPCR dans chaque group (n=8). B/ L'expression protéique de CS évaluée en Western blot et normalisé par la Tubuline dans chaque groupe de souris (n=8). Les valeurs sont exprimées par rapport à la moyenne \pm SEM. Comparaison entre les deux groupes en utilisant test *t* de Student, Ppar- δ : peroxisome proliferator-activated receptor delta, Pgc1- α : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha, Cpt1: Carnitine palmitoyltransferase I, CS: Citrate synthase, RQ: relative Quantity, AU : Arbitrary Unit.

De plus, lors de cette étude,

- 1) Nos résultats montrent que: la sur-expression de Gasp1 induit l'hypertrophie musculaire mais de manière moins prononcée que chez la souris KO mstn.
- 2) la sur-expression de Gasp1, contrairement aux souris KO mstn, n'affecte pas la composition du type fibre, alors qu'elle réduit l'expression des marqueurs du métabolisme oxydatif.

En conclusion, ces résultats complémentaires confirment que le changement glycolytique ne peut être le seul mécanisme expliquant le déclin du métabolisme oxydatif en accord avec les études précédentes concernant l'inhibition post-natale de mstn (Hulmi et al. 2013; Relizani et al., 2014; Rahimov et al., 2011).

Etude 2: Nouvelle preuve des avantages de l'entraînement physique chez les souris knock-out myostatine: impact sur les anomalies lipidomiques musculaires

Le but de ce travail est d'explorer si l'entraînement d'endurance améliore les troubles métaboliques liés au métabolisme lipidique chez les souris KO mstn. Pourquoi le choix de l'entraînement en endurance? C'est un stimulus physiologique, permettant d'optimiser la filière aérobie et le métabolisme lipidique. De plus, la souris KO mstn, malgré une intolérance à l'effort initiale, répond très bien à l'entraînement aérobie, avec des améliorations des capacités de course (Matasakas et al., 2012-2014, Savage et al., 2010).

Plan de travail :

-Evaluer l'effet de l'entraînement sur le métabolisme lipidique du muscle déficient en mstn en étudiant l'expression des marqueurs du transport des lipides, du catabolisme des lipides, et de la lipogenèse.

-Analyser l'effet de l'entraînement sur la composition musculaire en acides gras et sur les phospholipides de la membrane mitochondriale (Cardiolipide et sa voie de synthèse)

Dans cet article, nous avons montré que l'entraînement induit :

- 1) une amélioration plus marquée des performances de course, du métabolisme oxydatif et lipidique chez les souris KO mstn par rapport aux souris contrôles.
- 2) une augmentation de l'activité des enzymes mitochondriales dans le muscle des souris KO mstn entraînées.
- 3) un remodelage de la composition des phospholipides de la membrane mitochondriale, avec une augmentation significative de la proportion du Cardiolipide uniquement chez les souris KO mstn.

En conclusion, ces résultats démontrent que le tissu musculaire des souris déficientes en mstn présente une plasticité, et répond à l'entraînement en endurance par activation du métabolisme aérobie, amélioration générale du profil lipidique au sein du muscle et de manière spécifique de la composition lipidique membranaire des mitochondries. Cette restauration métabolique est associée à une amélioration des performances de course.



New evidence of exercise training benefits in myostatin-deficient mice: effect on lipid skeletal muscle abnormalities.

Journal:	Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports
Manuscript ID:	SJMSS-O-878-17.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	22-Feb-2018
Complete List of Authors:	BAATI, Narjes; INRA Centre de Montpellier, UMR 866 Dynamique Musculaire et Métabolisme; Université de Montpellier Faculté des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives Coudray, Christine; INRA Centre de Montpellier, UMR 866 DMEM Fouret, Gilles; INRA Centre de Montpellier, UMR 866 DMEM Vernus, Barbara; INRA Centre de Montpellier, UMR 866 DMEM Goustard, Benedicte; INRA Centre de Montpellier, UMR 866 DMEM Bertrand-Gaday, Christelle; INRA Centre de Montpellier, UMR 866 DMEM Jollet, Maxence; Université de Montpellier Faculté des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives Coudray, Charles; INRA Centre de Montpellier, UMR 866 DMEM Lecomte, Jerome; CIRAD Département Systèmes biologiques, UMR IATE Bonnieu, Anne; INRA Centre de Montpellier, UMR 866 DMEM Koechlin-Ramonatxo, Christelle; Université de Montpellier Faculté des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives
Keywords:	GDF-8, Thin layer chromatography, phospholipids, muscle fatigue, handling fat

SCHOLARONE[™]
Manuscripts

New evidence of exercise training benefits in myostatin-deficient mice: effect on lipid skeletal muscle abnormalities.

Narjes Baati¹, Christine Feillet-Coudray¹, Gilles Fouret¹, Barbara Vernus¹, Bénédicte Goustard¹, Christelle Bertrand-Gaday¹, Maxence Jollet¹, Charles Coudray¹, Jérôme Lecomte², Anne Bonnieu^{1a} & Christelle Koechlin-Ramonatxo^{1a*}

1 INRA, UMR866 Dynamique Musculaire Et Métabolisme, Univ Montpellier, 34000 Montpellier, France

2 Centre de recherche agronomique pour le développement (CIRAD)/SupAgro, UMR IATE,F-34398 Montpellier, France.

***Correspondence:** Christelle Koechlin-Ramonatxo

INRA, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, Université Montpellier,
F-34060, Montpellier, France

Email: christelle.ramonatxo@umontpellier.fr

Tel: +33 4 99 61 23 38

Fax: +33 4 67 54 56 94

^a These authors jointly directed to this work

Running Headline: Lipidome, mitochondria and endurance training.

Abstract

Myostatin (*Mstn*) inactivation or inhibition is considered as a promising treatment for various muscle-wasting disorders because it promotes muscle growth. However, myostatin-deficient hypertrophic muscles show strong fatigability associated with abnormal mitochondria and lipid metabolism. Here, we investigated whether endurance training could improve lipid metabolism and mitochondrial membrane lipid composition in mice where the *Mstn* gene was genetically ablated (*Mstn*^{-/-} mice). In *Mstn*^{-/-} mice, 4 weeks of daily running exercise sessions (65-70% of the maximal aerobic speed for 1 hour) improved significantly aerobic performance, particularly the endurance capacity (up to +280% compared with untrained *Mstn*^{-/-} mice), to levels comparable to those of trained wild type littermates. Endurance training increased citrate synthase level and mitochondrial protein content in both mice groups. Interestingly mitochondrial enzyme activity and the cardiolipin fraction in the mitochondrial membrane are increased by training only in *Mstn*^{-/-} mice. The expression of oxidative and lipid metabolism markers was also increased in these trained hypertrophic mice, as indicated by the upregulation of the *Cpt1*, and *Fas* genes expression and increased FAT/CD36 protein levels. These results suggest that the combination of myostatin inhibition and endurance training could increase the muscle mass while preserving the physical performance. In addition, cardiolipin and lipid-related pathways could represent new targets to improve myostatin-deficient muscle metabolism and restore mitochondrial function.

Key words: GDF-8, thin layer chromatography, phospholipids, muscle fatigue, handling fat

Introduction

Muscle mass and endurance must be both preserved for health because muscle wasting is one of many morbidity factors in humans, and muscle fatigability is associated with sedentary life, autonomy loss and muscle pathology. Research on skeletal muscle therapies, and more broadly on chronic diseases, highlighted that both muscle size and function need to be optimized. This represents a major challenge.

Myostatin, a member of the TGF-beta family of signaling molecules, controls muscle growth in mammals (1-2). Myostatin gene deletion (*Mstn*^{-/-} mice) or loss-of-function leads to excessive skeletal muscle growth and increases muscle mass up to 200%. Conversely, its overexpression or systemic administration causes muscle atrophy (1;3). Due to its effects on muscle mass, myostatin inhibitors are potentially useful in the clinic to limit muscle wasting. Their effect on muscle mass is so impressive that all myostatin blockade procedures are included in the 2008 World Anti-Doping Agency prohibited list (4). However, the muscle mass gain induced by myostatin inhibition/gene deletion is associated with increased fatigability and aerobic metabolic deficit. Specifically, muscles of *Mstn*^{-/-} mice show reduced limit endurance time in an *ex vivo* endurance contractile test (5), as well as decreased mechanical performance and ATP production during *in vivo* exercise (6). Metabolically, studies in *Mstn*^{-/-} mice provided evidence of impaired activity of oxidative enzymes, mitochondrial DNA depletion associated with uncoupling of the intermyofibrillar mitochondrial respiration (1;5), and mitochondrial deficit due to fiber type conversion leading to loss of oxidative muscle fibers and increase in glycolytic fibers (7-8). Loss of muscle oxidative properties is accompanied by marked modifications in substrate phosphorylation, and in the expression levels of molecules involved in lipid-related pathways. For instance, the levels of cytosolic and sarcolemmal lipid transporters (fatty acid transport protein, FABP3 and FATP1 and FATP4, respectively) are reduced, as well those of fatty acid translocase, cluster of differentiation 36, FAT/CD36 (fatty acid uptake) (5;9-10). Moreover, lipogenesis in *Mstn*^{-/-} muscle is significantly reduced. Specifically, triglyceride (TG) levels are 4-fold lower in *Mstn*^{-/-} than in wild type (WT) mice and this is correlated with lower fatty acid synthase (FAS) activity (10) and a shift in fatty acid (FA) composition (increase in saturated FA and polyunsaturated FA levels at the expenses of monounsaturated FA levels). Mitochondria are also significantly affected with modifications of the membrane phospholipid composition, as indicated by the significant decrease in the proportion of cardiolipin (CL), a phospholipid that is unique to the inner mitochondrial

membrane, in *Mstn*^{-/-} mitochondrial membranes (10). The recent evidence of these lipid abnormalities in *Mstn*^{-/-} skeletal muscle raised new issues linking myostatin, mitochondria function and oxidative metabolism. Indeed, lipids are major fuel in the supply of reduced equivalents for contractile activity (11) and CL is known to play a crucial role in skeletal muscle oxidative metabolism and mitochondria bioenergetics processes (12-13).

Several studies have shown that myostatin-deficient muscles can be functionally remodeled to improve oxidative metabolism through exercise training (14-15). Specifically endurance exercise reduces muscle fiber size, increases muscle oxidative properties and capillary density and improves muscle force generation in *Mstn*^{-/-} mice. However, important aspects of the mechanisms that govern such adaptive responses in mitochondria remain obscure. Recent findings (10) suggest that in *Mstn*^{-/-} muscles, the mitochondrial phospholipid profile and more broadly the lipidome could benefit from aerobic endurance training. Indeed, lipids and FA are a major fuel in resting and exercising muscles, and are used to produce ATP via β -oxidation in the mitochondrial matrix (16). It is well documented that endurance training induces a shift in skeletal muscle towards a higher lipid metabolism, with higher fat oxidation, transport capacity, mitochondrial density and muscle oxidative capacity (11;16). Moreover, FA and phospholipids are the major components of membranes and influence several aspects of membrane function, including membrane fluidity, membrane protein anchorage and the activity of the electron transport chain complexes, and thus the aerobic capacity (11;16-17). It has been shown that exercise training modifies the membrane lipid composition. For instance, total CL content is increased with exercise training in rats and humans (18-19). Conversely, CL content decreases following detraining, and this effect has been associated with a decrease in mitochondrial respiratory chain complexes and enzyme activity in skeletal muscle (19-20).

In this study, we asked whether the positive metabolic effect of endurance training could influence lipid metabolism and mitochondrial lipid composition in the hypertrophic muscles of *Mstn*^{-/-} mice. Specifically, we hypothesized that endurance training modulates positively and specifically CL content in mitochondria membrane of *Mstn*^{-/-} muscle, increases the mitochondrial enzyme activity and the ability to burn fat by activating enzymes required for lipid turnover. This positive metabolic effect would contribute to the increased aerobic performance induced by endurance training in these hypertrophic mice. By analyzing skeletal muscle from WT and *Mstn*^{-/-} mice that underwent or not 4 weeks of endurance training, we found that endurance training improved significantly the aerobic performance, particularly the

endurance capacity in *Mstn*^{-/-} mice (up to +280%), reversing the difference with WT mice. This functional gain was associated with increased mitochondrial enzyme activity in skeletal muscle of *Mstn*^{-/-} mice, as well as with specific restoration of the CL fraction in the muscle mitochondrial membrane. This study documents for the first time that endurance training induces a remodeling of mitochondrial membrane phospholipid composition in the hypertrophied *Mstn*^{-/-} muscle. CL and lipid-related pathways could represent new targets to improve myostatin-deficient muscle metabolism and mitochondrial function.

Materials/Methods

Animals

Healthy 10-week-old *Mstn*^{+/+} (WT) and *Mstn*^{-/-} male mice (n=18 for each genotype) were used in this study. These mice have been described previously and were generously provided by L. Grobet (Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium). Mice were housed in standard conditions (20–22°C, 12h–12h light–dark cycle), in normal cages with *ad libitum* access to tap water and food. The study experimental protocols complied with the European directives on animal experimentation (86/609/EEC) and were approved by the Ethical Committee of the Languedoc Roussillon Region (APAFIS#2551-2015110311365663v2). All animals included in the study completed the protocol. Specifically, the trained and non-trained groups (both genotypes) included 9 mice/group; 8 samples/group were used for biochemical analyses, and 6 samples/group for RT-qPCR assays.

Aerobic training

After 4 days of acclimation, *Mstn*^{+/+} and *Mstn*^{-/-} mice were divided in two groups: non-trained (n=9) and trained (n=9). Training consisted in running at 65–70% of the maximal aerobic speed on a treadmill (Columbus Instruments, OH 43204 U.S.A) calibrated for speed (angle 0°) for 1 hour (5 consecutive days/week) for 4 weeks. Exercise intensity was increased of 2 m/min each week.

Running performance

At the beginning and at the end of training period, all mice were tested (two treadmill running tests) without knowing to which group they belonged to (9). The maximal aerobic velocity (MAV) was determined with a running test in which the speed was gradually increased from 10 m/min by 2 m/min until exhaustion. Exhaustion was defined as the inability to maintain the

normal running position and/or after 5 consecutive seconds in contact with the shock grid (≤ 0.2 mA) at the rear of the treadmill. Endurance capacity was determined in a submaximal running test where the speed started at 10 m/min for the first 2 minutes and was then set to 70% of the maximal running speed until exhaustion. The limit endurance time was recorded. Mice were killed 48 hours after the last running test.

Muscle preparation and sample

Mice were weighed and killed by cervical dislocation. Gastrocnemius (Gastro) muscle was removed, frozen in liquid nitrogen and powdered for protein and mRNA expression analyses, measurement of FA by gas chromatography and TG content by thin layer chromatography, and finally enzymatic activity. Tibialis anterior (TA), extensor digitorum longus (EDL), and quadriceps (Quad) muscles were quickly excised and immediately placed in ice-cold buffer (100 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 5 mM EDTA, and 50 mM Tris·HCl, pH 7.4). This mixed limb muscle sample was used for total mitochondrial protein extraction, and subsequently for phospholipid mitochondrial membrane composition and mitochondrial enzymatic activity.

Protein extraction and western blot analysis in gastrocnemius muscle

50 mg Gastro muscle powder was homogenized using a Potter-Elvehjem homogenizer Craig recrystallization tube homogenizer (KONTES GLASS CO, Sigma) in ice-cold extraction buffer (1M Tris HCl, pH 7.5, 5M NaCl, 200mM EGTA, pH 8, 200mM EDTA, pH 7-8, 200mM sodium orthovanadate (Na₃VO₄), 1M β -glycerophosphate, 1M NaF, CIP: protease inhibitor cocktail set, 10% Triton-X, 20% SDS). Proteins were denatured by mixing with an equal volume of Laemmli buffer (Tris 100mM; pH 6.8, SDS 4%, Glycerol 20%, DTT 0.2M, Bromophenol Bleu; sigma B-6131) and heating at 95°C for 5 minutes. Then, proteins were separated on SDS-PAGE and transferred (1X Tris-glycine, 20% ethanol, H₂O) to nitrocellulose membranes (nitrocellulose, 0.2 μ m, Bio-Rad, Cat 162-0112) (400mA for 90 minutes). Membranes were blocked in 1X Tris-buffered saline (TBS)/0.1% Tween-20 (TBS-T) containing 5% fat-free milk at room temperature for 1 hour. Then, membranes were incubated overnight with primary antibodies against FAT/CD36 (1/500; Santa Cruz Biotechnology, CA, ref sc-13572), FATP4 (1/500; Santa Cruz Biotechnology, CA, ref: sc-5834), FABP3 (1/1000, Abcam, ref: ab45966), citrate synthase (CS) (1/1000; GeneTex, ref: GT1761) and α -tubulin (1/5000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ref: T6199) in blocking buffer. After washes in TBS-T under gentle agitation, membranes were incubated with horseradish peroxidase-labeled anti-

mouse (NA931V, GE, UK) anti-rabbit (NA934V, GE, UK) or anti-goat (SC-2768, Santa Cruz Biotechnology, CA) antibodies for 1 hour. After further washes, antibody-bound proteins were revealed using enhanced chemiluminescence detection reagents (ECL, sc-2048, Santa Cruz Biotechnology, CA). Signals were detected with a ChemiDoc™ Touch Imaging System instrument (Bio-Rad, 1.1.0.4, 732BR1121); α -tubulin was used as loading control. Band intensities were measured using Image Lab Software (Version 5.2.1 for Windows 7).

Quantification of mRNA expression in gastrocnemius muscle by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR):

Total RNA was isolated from powdered Gastro samples using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Venlo, The Netherlands). RNA concentration was determined by spectrophotometric analysis (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), and purity was checked by calculating the OD260nm/OD280nm absorption ratio (>1.7). RNA quality was verified by 1% agarose gel electrophoresis.

Reverse transcription was performed with 1 μ g of total RNA and the TAKARA kit (TAKRR037A, PrimeScript RT reagent Kit, Perfect Real Time) according to the manufacturer's instructions. One-tenth of the cDNA was used in each PCR assay.

Quantitative PCR (qPCR) analysis was performed using a Step One Plus detection system (AB Applied Biosystems) with 18 μ L of Mastermix (SYBR Premix Ex Taq II, Takara), 300nM of both forward and reverse primers, 2 μ L of diluted cDNA template and water to a final volume of 20 μ L. Forward and reverse primers are listed in **Table 1**. *Cpt-1*, *Pgc1-a* and *Ppar-d* were amplified to evaluate lipid oxidation, and *Fas* lipogenesis, *Crls1* and *Pgs1* to assess cardiolipin synthesis, and *Taz* and *Lcat1* for cardiolipin remodeling. All PCR assays were performed in duplicate using the following parameters: 98°C for 30s, followed by 40 cycles of 95°C for 1s and 60°C for 15s. Relative mRNA levels were normalized to the levels of the genes encoding the ribosomal protein Arp and α -tubulin that were unaffected by training. Results are expressed using the comparative cycle threshold (CT) method to generate $\Delta\Delta$ Ct values with template dilutions ranging from 10¹ to 10⁶ copies. The PCR overall efficiency (E) was calculated from the slopes of the standard curves according to the equation $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$ and this value was higher than 95% for all assays. The relative abundance of each sample was then normalized according to the equation: Relative Quantity (RQ) = 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

Quantification of enzyme activity linked to mitochondrial metabolism in gastrocnemius

Muscle Citrate synthase (CS) and β -HAD activities were measured as previously described (5;10). The activity of the CS is measured by following the color of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, which is generated from 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid present in the reaction of citrate synthesis, and caused by the deacetylation of acetyl-CoA. The activity of β -HAD is measured spectrophotometrically at 340 nm by following the disappearance of NAD. The β -HAD converted the acetoacetyl-CoA in alcohol inversely β -oxidation reaction. For cytochrome *c* oxidase (COX) activity, the oxidation of reduced cytochrome *c* is followed spectrophotometrically (5).

Free fatty acid composition of gastrocnemius muscle by gas chromatography

Fatty acid methyl esters were prepared by incubating lipids (extracted from powdered muscles using the Folch method) with acidified methanol, after the addition of an internal standard (500 μ g C17:0) (10). Briefly, the methylation reagent was generated by mixing sulfuric acid (5% v.v) with methanol (95% v.v) and butylated hydroxytoluene as antioxidant (50 mg/L), and samples were heated at 90°C for 45 minutes to obtain fatty acid methyl esters. After addition of sodium bicarbonate, distilled water and hexane, samples were vortexed, centrifuged, and the upper hexane layer was transferred to a glass vial, evaporated under nitrogen stream at 37°C, and dissolved in isooctane for gas chromatography analysis. Individual fatty acid methyl esters were identified on the basis of the retention times of standards by gas liquid chromatography (Trace GC Ultra, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), with a Supelco Vax capillary column [30mx0.32mm idx0.25 μ m df], an AS-3000 Autosampler and a flame-ionization detector (Thermo Electron Corporation, Thermo Fisher Scientific). Fatty acid methyl esters were quantified using the chromatographic peak area according to the internal standard method. Data were expressed as the percentage by weight of total FA. The sum of the dimethylactals DMA16:0 and DMA18:0, the main plasmalogens, was also quantified, as a control, and results showed their limited presence in skeletal muscles (data not shown).

Tissue desaturase indices and unsaturation index in gastrocnemius muscle

As it is not possible to directly measure the activity of the enzymes that catalyze the desaturation and elongation reactions in the FA metabolic pathways, surrogate measures of desaturase activity, such as the use of desaturase indices, were used. These indices are based on the ratio of product to precursor of individual FA. For this study, the Δ -9 desaturase index was calculated

as follows: [16:1(n-7)/16:0]; [18:3(n-6)/18:2(n-6)]. This desaturase is involved in the synthesis of unsaturated FA and was previously reported to be reduced in *Mstn*^{-/-} mice (10).

Triglyceride (TG) contents in gastrocnemius lipid extracts by TLC densitometry.

Muscle lipids were extracted using a mixture of chloroform–methanol (2:1, v/v) in the presence of butylated hydroxytoluene (50mg/l). The application of muscle lipid extracts on HPTLC silica gel 60 plates (250 μm, 20×10 cm; Merck), pre-treated with 1.5% p/v boric acid in ethanol (100%), was automatically performed on a 4-mm band width using a CAMAG ATS4 apparatus. Two reactions were performed: i) with pentane–chloroform–methanol (52:45:3, by volume) on a 60-mm migration distance and ii) with pentane–diethyl ether (97:3 by volume) on a 67-mm migration distance, which allowed the separation of neutral lipids. Plates were scanned using a CAMAG TLC scanner 3 in reflectance mode. Plates were scanned at 550 nm after dipping in a solution of 640mM copper sulfate in 1.18M H₃PO₄ and heating at 180°C for 20 minutes. The content of 1-monoacylglycerol (MAG), 1,2- diacylglycerol (DAG), 1,3-DAG, TG, cholesterol and free FA was determined by comparing their retention factor (R_f) with that of standards and were quantified using the calibration curves for the same standards.

Mitochondrial isolation of mixed limb muscle sample

Total mitochondria from the mixed limb muscle sample were fractionated by differential centrifugation, as described previously (10). Briefly, muscles were freed of connective tissues, minced, and homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer. Then, mitochondria were obtained from the initial pellet following incubation with Subtilisin A (0.25 mg/g wet muscle) and subsequent centrifugation at 800 g and 9,000 g. Total mitochondria were resuspended in 100mM KCl and 10mM MOPS, pH 7.4. Mitochondrial protein content was determined using the Bradford assay, and the yield was expressed as milligram of mitochondrial proteins per gram of muscle wet weight.

Lipid extraction and thin layer chromatography (TLC)

Phospholipid composition of mixed limb muscle mitochondrial membrane by TLC densitometry

Muscle mitochondrial suspensions were extracted by using a mixture of chloroform/methanol 2:1 (v/v) according to ², in the presence of 50 mg/L butylated hydroxytoluene. Phosphorus was quantified in Folch extracts of mitochondrial suspensions to

determine the total phospholipid quantity. The application of Folch extracts of muscle mitochondrial suspensions on HPTLC silica gel 60 plates (250 μm , 20/10 cm, Merck, Germany) pre-treated with 2.3%(w/v) boric acid in 100% ethanol, was automatically performed on a 4mm bandwidth using a CAMAG ATS4 apparatus (Muttenez, Switzerland). The reaction was performed with methanol/acetic acid/pentane/chloroform (15/10/30/45, by volume) to separate phospholipids and neutral lipids on a 60 mm total migration distance. Plates were scanned using a CAMAG TLC scanner 3 (Muttenez, Switzerland) in reflectance mode. Plates were scanned at 715 nm after dipping in a solution of Blue Spray (Sigma, France) (Blue Spray/H₂SO₄ 4.2 M/acetone, 1/2/3 v/v/v) and heating at 55°C for 3 minutes. The different phospholipid classes were identified by comparing their R_f to standards and quantified using the calibration curves of the same standards.

Quantification of mitochondrial enzyme activity from mitochondria of the mixed limb muscle sample.

CS, β -HAD and Cox activities were measured in total mitochondria from the mixed limb muscle sample. The methods used are similar than presented on the whole gastrocnemius sample.

Statistical analysis

All data are presented as the mean \pm SEM. Unpaired Student's *t*-tests were used to compare two groups of mice. A two-way ANOVA followed by the Tuckey post-hoc procedure was used to determine the effects of training and the animal genotype. To facilitate the analysis of the exercise training effect, the WT and *Mstn* *-/-* cohorts are presented separately and the results of the ANOVA are in the figure legends. Therefore, data are presented as the fold increase in trained compared with non- trained group for each genotype. A dashed line, arbitrarily taken as 1, shows the results for the untrained group. The significance level was set at 0.05. Data were analyzed using the statistical package GraphPad Prism version 6.02 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California).

Results

***Mstn*^{-/-} muscle: a fatiguable hypertrophic tissue with marked lipid perturbations.**

The hypertrophic muscle phenotype of *Mstn*^{-/-} was coupled with a significant impairment of the running capacity (54% of the time of WT littermates), measured during the physical exercise tests at baseline (Table 2). Concerning oxidative metabolism markers, **the supplemental Figure 1** showed in *Mstn*^{-/-} mice a significant reduction of the gastro mitochondrial protein pool and CS levels compared with WT littermates, as well decreased CS and β -HAD activities. This negative impact on mitochondria function in *Mstn*^{-/-} is further supported by the significant decreased activity of the same enzymes in mitochondria extracted from the mix limb muscle sample. These results were coupled to marked perturbations of several lipid-specific pathways in *Mstn*^{-/-} mice (**Supplemental Figure 2**): 1) attenuated lipid membrane and cytosolic transport 2) a shift in FA composition: increase in SFA and PUFA levels at the expense of MUFA levels 3) lipogenesis with 3-fold lower TG levels compared with WT 4) significant reduction of the amount of CL in mitochondrial membranes and gene expression of the cardiolipin synthase *Crkl1*, involved in CL synthesis.

Exercise training increases aerobic performance, particularly in *Mstn*^{-/-} mice

Exercise training for 4 weeks significantly increased the endurance capacity both in WT mice (+54%) and in *Mstn*^{-/-} mice (+280%) compared with non-trained controls (n=9/each group), as well as MAV (+15% in both trained groups) (**Figure 1**). The limit time of trained *Mstn*^{-/-} mice was not significantly different from that of trained WT littermates (4431 \pm 295 seconds vs 4506 \pm 336, respectively). Moreover, the beneficial effect on the running performance was associated with no muscle mass changes in both groups. Trained *Mstn*^{-/-} mice preserved their hypertrophic phenotype compared with trained controls (data not shown).

Exercise training increases muscle mitochondrial content in trained mice, and ameliorates mitochondrial enzyme activity only in *Mstn*^{-/-} trained mice.

The both mitochondrial protein content and CS protein level were increased (almost +50%) in trained animals compared with non-trained controls (ANOVA, effect group, $\$ p < 0.05$; **Figure 2A and 2B**), illustrating the positive effect of exercise training on mitochondrial biogenesis. The assessment of mitochondria function showed in WT trained mice a significant increase in CS activity in gastro muscle sample ($*p < 0.05$ vs sedentary group; **Figure 2C**), this result could be explained by the increased mitochondria content. Indeed, this result was not

observed in mitochondria extracted from mix limb muscle sample in this group. In contrast, the ANOVA analysis showed differential effect in *Mstn*^{-/-} trained mice, with a significant upregulation of mitochondrial β -HAD activity, and a trend to increased COX activity in the mitochondria extracted from the mix limb muscle sample (* $p < 0.05$ vs sedentary group , **Figure 2C**) and suggested in *Mstn*^{-/-} trained mice an increase both of mitochondria content and function. Collectively, these data reveal the functional improvement of the mitochondrial metabolism by endurance training.

Exercise training corrects partially the lipid abnormalities in *Mstn*^{-/-} mice, but fails to activate muscle FA storage into TG, as seen in WT trained mice.

Beyond structural effects, to gain an insight into the effects of endurance training on mitochondrial metabolism, we investigated the protein expression levels of the lipid membrane and cytosolic transporters. Three proteins involved in cellular FA transport and supporting the concept of facilitated lipid diffusion, were analyzed, FAT/CD36 (fatty acid translocase cluster of differentiation 36), FABP3 (fatty acid binding protein 3) and FATP4 (fatty acid transport proteins 4). We also measured the mRNA levels of *Cpt1*, a membrane mitochondrial lipid transporter as well as *Ppar- δ* a transcriptional regulator of energy metabolism and fatty acid synthase (*Fas*), a gene that encodes an enzyme involved in lipogenesis pathway. Lipogenesis consists to store FA into triglycerides (TG) that will be used as an energy source. FA uptake and lipogenesis in skeletal muscle were stimulated by training in *Mstn*^{-/-} mice, as demonstrated by the higher FAT/CD36 protein levels and *Fas* gene expression compared with non-trained controls (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs non-trained group; **Figure 3**). This was coupled with a significant increase of *Cpt1* in *Mstn*^{-/-} mice (+100% in KO vs +40% in WT) and *Ppar-d* in WT mice (+80% in WT vs +40% in *Mstn*^{-/-}) gene expression ($p < 0.05$ vs non-trained; **Figure 3C**). TG content was strongly increased upon training only in WT, but not in *Mstn*^{-/-} mice (**Figure 3D**). Thus, even after training, *Mstn*^{-/-} mice could not activate muscle FA storage into TG. Finally, training did not have any effect on muscle FA distribution and Δ -9 desaturase index in both WT and *Mstn*^{-/-} mice (data not shown). Taken together, these data related to figure 3 demonstrate that oxidative metabolism and lipid handling was improved by endurance training, enhancing the muscle performance in both genotypes, an effect which is more pronounced in *Mstn*^{-/-} muscle.

Exercise training induces a specific positive effect on mitochondrial CL composition only in *Mstn*^{-/-} mice.

Finally, upon training, the proportion of CL in mitochondrial membrane and the expression level of *Crs11*, which is involved in CL synthesis, and of *Alcat1* and *Taz*, which are involved in CL remodeling, were reduced in WT mice (**Figure 4**). In contrast, in *Mstn*^{-/-} mice, training induced a positive remodeling of the mitochondrial membrane phospholipid composition, with a significant increase of CL ($p < 0.05$; **Figure 4**).

Discussion

It is well known that the hypertrophic *Mstn*^{-/-} phenotype is associated with marked reduced exercise running capacity and oxidative mitochondrial metabolism impairment (5-7; 21-22). Recently, we highlighted, and confirmed it in the present study, that the *mstn* deficient muscle presents also marked lipid disturbances and reduced mitochondrial CL membrane proportion that could contribute to aerobic running impairment. These data focused cardiolipin and lipid related pathways, as new targets to improve the *mstn* deficient muscles, and restore mitochondrial function in this muscle phenotype. In the present work, endurance training appeared as a relevant strategy. Indeed, several studies have shown that myostatin-deficient muscles can be functionally remodeled to improve oxidative metabolism through exercise training (8;14;21). Training increases the ability of muscles to burn fat instead of glycogen, by activating muscle enzymes required for lipid turnover (11;23). Furthermore, higher CL content was observed in skeletal muscle after exercise training (18-19).

Endurance training improved significantly the aerobic performance, particularly in *Mstn*^{-/-} mice, reversing the difference with WT mice, without attenuating the hypertrophic phenotype

Here, we showed that forced treadmill exercise for 4 weeks increased muscle endurance capacity more in *Mstn*^{-/-} mice than in WT littermates, leading to similar levels of performance in both genotypes. Interestingly, this physiological improvement was not associated with a decrease in muscle mass, differently from the results reported by Savage et al. (15). Indeed, some previous studies have shown that in *Mstn*^{-/-} mice, endurance-type physical exercise effectively reverses the functional and oxidative metabolic deficits, but also attenuates the hypertrophic phenotype (8;14-15). The reason(s) for this difference could be related to the exercise type, intensity and duration as well as to the genetic background of the used mice.

However, the strain used in our study (i.e., C56BL/6) is similar to the one used in the previous study. On the other hand, we trained mice for 4 weeks, at a greater relative intensity than the mice in the previous study (16m/mn vs 12m/mn in the study by Savage et al (15), and this could have facilitated muscle weight maintenance. Consistent with our results, a recent study demonstrated that genetic manipulation leading to a greater oxidative capacity in *Mstn*^{-/-} mice is not accompanied by muscle size reduction (24). Our findings raise thus the possibility to preserve this muscle hypertrophic phenotype, and to increase running performance and endurance capacity by means of exercise training. To better understand the mechanism underlying this beneficial training effect on aerobic performance in the *Mstn*^{-/-} mice, we focused on mitochondrial metabolism, lipid-related pathways and phospholipid mitochondrial membrane composition.

Endurance training, mitochondrial metabolism and cardiolipin modulation: differential post-training effects in *Mstn*^{-/-} muscles.

The endurance training protocol boosted oxidative metabolism. In both trained groups (*Mstn*^{-/-} and WT), we observed a significant increase of mitochondrial biogenesis markers, with enhanced levels of CS protein and mitochondrial protein content in trained muscles. These results suggested that the exercise training activated mitochondrial biogenesis and could contribute to increased running capacity observed in the two groups of mice. Importantly, the training protocol induced a further improvement of mitochondrial function, only in *Mstn*^{-/-} mice, as the mitochondrial activities of β -HAD and COX activity are increased. This specific effect of training on mitochondria function of *mstn*^{-/-} mice could explain the more increase in running capacity compared with WT. In the same way, the differential transcriptional response to training in mice on FA uptake and utilization reinforced the hypothesis of a better response of *mstn*^{-/-} mice to training. Consistently, FA uptake and utilization improved with increased gene expression of *Cpt1* and *Fas*, as well increased FAT/CD36 protein content in *Mstn*^{-/-} mice, whereas only the gene expression of *Ppar- δ* , increased in WT genotype in response to exercise.

Finally, endurance training increased CL content only in *Mstn*^{-/-} mice to the level measured in WT muscle. CL is a mitochondrial-specific phospholipid enriched in the inner membrane (25). It is involved in various mitochondrial functions, including electron transport chain activity, respiratory supercomplex formation, mitochondrial transport of bioenergetic molecules, and mitochondrial bioenergetic processes (13; 26). Several studies have shown the importance of maintaining normal CL levels for mitochondrial function and structural integrity. This is exemplified by the cardiac phenotype in patients with Barth syndrome where reduced

CL levels have been associated with mitochondrial dysfunction and genetic defects in CL synthesis (27-28). Few data are available on the physiological modulation of mitochondrial phospholipid membrane composition by endurance training (18-19 ; 29), and few studies measured gene expression of cardiolipin, but not its proportion in the mitochondrial membrane by thin-layer chromatography. Regarding CL content, our findings suggest that the pattern of adaptation to endurance training differs between WT and *Mstn*^{-/-} mice. Indeed, differently from *Mstn*^{-/-} mice, mitochondrial CL content did not change in WT trained mice. In agreement, some genes involved in CL synthesis and remodeling were downregulated by endurance training in WT but not in KO mice. In WT mice, enough CL could be already present in the mitochondrial membrane at baseline to allow adapting to exercise without need of increasing CL. Conversely, the low oxidative capacity of *Mstn*^{-/-} muscles could be related to the significant alteration of CL level. Endurance training appears to be a sufficient stimulus to increase CL content, oxidative metabolism and running capacity, especially in *Mstn*^{-/-} mice, in which an underlying metabolic stress already exists. The energetic demands of endurance training could lead to remodeling of the mitochondrial membrane phospholipid composition in *Mstn*^{-/-} skeletal muscles. This is a new and original result. Interestingly, this increase in mitochondrial membrane CL proportion occurred only in *Mstn*^{-/-} mice that presented also significant increase in muscle mitochondrial enzyme activity. One limit of the study was the substantial amount of muscle tissue required for the analysis of CL content in mitochondria, then excluding the measurement of mitochondria respiration in each group. The present *in-vivo* work cannot establish direct causal effect. However, according to the growing literature linking CL composition and mitochondrial function (12-13; 26; 30), we can hypothesize that this modification of CL content in the mitochondrial membranes demonstrated with exercise training in *Mstn*^{-/-} mice would contribute to improvement in mitochondria function, and exercise capacity in this phenotype. Further studies on the modulation of CL in the mitochondrial membranes are required.

Myostatin inhibition strategies need to be combined with oxidative and lipid-related pathway metabolism stimulation for clinical applications: focus on the cardiolipin phospholipid.

Our results in the present work suggest thus that investigations on potential strategies to induce remodeling of the mitochondrial membrane phospholipid composition and aerobic metabolism activation appear relevant in this hypertrophic model. It is noteworthy that endurance training in our present study did not normalize all lipid abnormalities demonstrated

in *Mstn*^{-/-} mice. Indeed, increased muscle TG content is a very early response to training, preceding significant changes in insulin sensitivity (31-32). TG is increased in trained animals to optimally match fat oxidative capacity and serves as readily available fuel (33). Our data obtained in trained WT mice confirmed the impact of training on muscle-specific fat storage (i.e., significantly considerable higher TG levels). However, although *Fas* gene expression increased, *Mstn*^{-/-} muscle remains resistant to TG storage after training. Our results confirm that promoting muscle size expansion decreases fat mass effectively in skeletal muscle, as reported for adipose tissue (34-35). As a result, this strong difference raises the question of the impact of *mstn* deficiency on the synthesis rates of intramuscular TG, and on other lipid species within muscle, as diacylglycerol and ceramides, in relation with TG metabolism (36-37). In the same way, exercise training did not induce changes in FA distribution in *Mstn*^{-/-} mice and WT littermates, and thus could not normalize the abnormalities reported in *Mstn*^{-/-} muscle.

In addition to endurance training, others strategies existed to boost lipid pathways and phospholipid mitochondrial membrane composition and would be tested in further studies. Here, we chose to assess the effect of exercise training rather than the synthetic agonist 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) treatment, an exercise mimetic drug (9;38), because its effects on muscle lipid pathway are less characterized. However, this targeting key pharmacological molecule induces the activation of AMP-activated protein kinase and consequently increases the expression and phosphorylation of PPAR γ coactivator-1 α , PGC-1 α (38). Previous work showed that AICAR treatment improved aerobic running capacity in aged *mstn* KO mice with a marked increase in PGC-1 α expression and slight beneficial effects on mitochondrial function (9). Interestingly, the group of Hood working on PGC-1 α knockout mice suggested that some CL metabolism genes are regulated by PGC-1 α documenting a role for this coactivator in mitochondrial phospholipid synthesis (19). In such conditions, the study on AICAR impact on phospholipid mitochondrial membrane composition would be an attractive issue. Finally, supplementing the diet with linoleic acid (39) would also be potential efficient strategies to modulate CL composition in *Mstn*^{-/-} mice.

Perspectives

The effect of *mstn* inhibition on muscle mass is so impressive that all myostatin blockade procedures are included in the 2008 World Anti-Doping Agency prohibited list (4). However, this strategy represents promising therapeutic approach for muscle diseases, supported by numerous clinical human studies in progress (40). However, the muscle mass gain induced by myostatin inhibition/gene deletion is associated with increased fatigability and

aerobic metabolic deficit (5-8). The important point in our findings is that *mstn* deficient mice are able to adapt to endurance training and boosted their running performance by handling fat and plasticity of mitochondrial membrane, with an increase of mitochondrial cardiolipin, a determinant of mitochondrial bioenergetics. These benefits are associated with a preserved muscle hypertrophic phenotype. This present study opens up new areas of investigation related to cardiolipin pathway and brings new data about therapeutic perspectives-based on exercise training in the field of muscle therapies and sports medicine.

Funding

This study was supported by funds from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the University of Montpellier. N.B. is the recipient of a doctoral studentship by the Tunisian National Ministry of Higher Education and Research.

Ethical statements

The manuscript does not contain clinical studies or patient data. The study experimental protocols were performed in strict accordance with the European directives on animal rights (86/609/CEE) and approved by the Ethical Committee of the Languedoc Roussillon Region (APAFIS#2551-2015110311365663v2).

Furthermore, the authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

We also thank the animal staff from the METAMUS facility that belongs to the “Montpellier animal facilities network” (RAM): Sylvain Cerda, Romain Godoye, and Mélanie Macart, as well as Bruno Baréa (CIRAD, UMR IATE,F-34398) for technical assistance on GC analysis. Special thanks go to Elisabetta Andermarcher for english correcting of the manuscript.

References

1. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997;387:83–90.
2. Jespersen JG, Nedergaard A, Andersen LL, Schjerling P, Andersen JL. Myostatin expression during human muscle hypertrophy and subsequent atrophy: increased myostatin with detraining. *Scand J Med Sci Sports* 2011;21:215–223.

3. Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 2002;296:1486–1488.
4. Fedoruk MN, Rupert JL. Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy? *Scand J Med Sci Sports* 2008;18:123–131.
5. Ploquin C, Chabi B, Fouret G, Vernus B, Feillet-Coudray C, Coudray C, Bonnieu A, Ramonatxo C. Lack of myostatin alters intermyofibrillar mitochondria activity, unbalances redox status, and impairs tolerance to chronic repetitive contractions in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E1000-1008.
6. Giannesini B, Vilmen C, Amthor H, Bernard M, Bendahan D. Lack of myostatin impairs mechanical performance and ATP cost of contraction in exercising mouse gastrocnemius muscle in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E33-40.
7. Amthor H, Macharia R, Navarrete R, Schuelke M, Brown SC, Otto A, Voit T, Muntoni F, Vrbóva G, Partridge T, Zammit P, Bungler L, Patel K. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1835–1840.
8. Mouisel E, Relizani K, Mille-Hamard L, Denis R, Hourdé C, Agbulut O, Patel K, Arandel L, Morales-Gonzalez S, Vignaud A, Garcia L, Ferry A, Luquet S, Billat V, Ventura-Clapier R, Schuelke M, Amthor H. Myostatin is a key mediator between energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014;307:R444-454.
9. Pauly M, Chabi B, Favier FB, Vanterpool F, Matecki S, Fouret G, Bonafos B, Vernus B, Feillet-Coudray C, Coudray C, Bonnieu A, Ramonatxo C. Combined Strategies for Maintaining Skeletal Muscle Mass and Function in Aging: Myostatin Inactivation and AICAR-Associated Oxidative Metabolism Induction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2015;70:1077–1087.
10. Baati N, Feillet-Coudray C, Fouret G, Vernus B, Goustard B, Coudray C, Lecomte J, Blanquet V, Magnol L, Bonnieu A, Koechlin-Ramonatxo C. Myostatin deficiency is associated with lipidomic abnormalities in skeletal muscles. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1862:1044-1055.
- 11.. Horowitz JF, Klein S. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr* 2000;72:558S–63S.11.
12. Maguire JJ, Tyurina YY, Mohammadyani D, Kapralov AA, Anthonymuthu TS, Qu F, Amoscato AA, Sparvero LJ, Tyurin VA, Planas-Iglesias J, He RR, Klein-Seetharaman J, Bayır H, Kagan VE. Known unknowns of cardiolipin signaling: The best is yet to come. *Biochim Biophys Acta* 2017;1862:8–24.
13. Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 2014;1837:408–417.
14. Matsakas A, Macharia R, Otto A, Elashry MI, Mouisel E, Romanello V, Sartori R, Amthor H, Sandri M, Narkar V, Patel K. Exercise training attenuates the hypermuscular phenotype

- and restores skeletal muscle function in the myostatin null mouse. *Exp Physiol* 2012;97:125–140.
15. Savage KJ, McPherron AC. Endurance exercise training in myostatin null mice. *Muscle Nerve* 2010;42:355–362.
 16. Noland RC. Exercise and Regulation of Lipid Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;135:39–74.
 17. Heden TD, Neuffer PD, Funai K. Looking Beyond Structure: Membrane Phospholipids of Skeletal Muscle Mitochondria. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27:553–562.
 18. Toledo FGS, Menshikova EV, Ritov VB, Azuma K, Radikova Z, DeLany J, Kelley DE. Effects of physical activity and weight loss on skeletal muscle mitochondria and relationship with glucose control in type 2 diabetes. *Diabetes* 2007;56:2142–2147.
 19. Ostojic O, O’Leary MFN, Singh K, Menzies KJ, Vainshtein A, Hood DA. The effects of chronic muscle use and disuse on cardiolipin metabolism. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 2013;114:444–452.
 20. Wicks KL, Hood DA. Mitochondrial adaptations in denervated muscle: relationship to muscle performance. *Am J Physiol* 1991;260:C841-850.
 21. Hulmi JJ, Oliveira BM, Silvennoinen M, Hoogaars WMH, Pasternack A, Kainulainen H, Ritvos O. Exercise restores decreased physical activity levels and increases markers of autophagy and oxidative capacity in myostatin/activin-blocked mdx mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E171-182.
 22. Relizani K, Mouisel E, Giannesini B, Hourdé C, Patel K, Morales Gonzalez S, Jülich K, Vignaud A, Piétri-Rouxel F, Fortin D, Garcia L, Blot S, Ritvos O, Bendahan D, Ferry A, Ventura-Clapier R, Schuelke M, Amthor H. Blockade of ActRIIB signaling triggers muscle fatigability and metabolic myopathy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2014;22:1423–1433.
 23. Rosenkilde M, Reichkandler MH, Auerbach P, Bonne TC, Sjödin A, Ploug T, Stallknecht BM. Changes in peak fat oxidation in response to different doses of endurance training. *Scand J Med Sci Sports* 2015;25:41–52.
 24. Omairi S, Matsakas A, Degens H, Kretz O, Hansson KA, Solbrå AV, Bruusgaard JC, Joch B, Sartori R, Giallourou N, Mitchell R, Collins-Hooper H, Foster K, Pasternack A, Ritvos O, Sandri M, Narkar V, Swann JR, Huber TB, Patel K. Enhanced exercise and regenerative capacity in a mouse model that violates size constraints of oxidative muscle fibres. *eLife* 2016;5:.
 25. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, Schroder HD, Boushel R, Helge JW, Dela F, Hey-Mogensen M. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol* 2012;590:3349–3360.
 26. Mårtensson CU, Doan KN, Becker T. Effects of lipids on mitochondrial functions. *Biochim Biophys Acta* 2017;1862:102–113.

27. Gonzalvez F, D'Aurelio M, Boutant M, Moustapha A, Puech JP, Landes T, Arnauné-Pelloquin L, Vial G, Taleux N, Slomianny C, Wanders RJ, Houtkooper RH, Bellenguer P, Møller IM, Gottlieb E, Vaz FM, Manfredi G, Petit PX. Barth syndrome: cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:1194–1206.
28. Xu Y, Phoon CKL, Berno B, D'Souza K, Hoedt E, Zhang G, Neubert TA, Epand RM, Ren M, Schlame M. Loss of protein association causes cardiolipin degradation in Barth syndrome. *Nat Chem Biol* 2016;12:641–647.
29. Takahashi M1, Hood DA. Chronic stimulation-induced changes in mitochondria and performance in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1985. 1993 Feb;74 (2):934-41.
30. Shaw CS, Shepherd SO, Wagenmakers AJM, Hansen D, Dendale P, van Loon LJC. Prolonged exercise training increases intramuscular lipid content and perilipin 2 expression in type I muscle fibers of patients with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E1158-1165.
31. Schlame M, Greenberg ML. Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 2017;1862:3–7.
32. Schrauwen-Hinderling VB, van Loon LJC, Koopman R, Nicolay K, Saris WHM, Kooi ME. Intramyocellular lipid content is increased after exercise in nonexercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 2003;95:2328–2332.
33. Schrauwen-Hinderling VB, van Loon LJC, Koopman R, Nicolay K, Saris WHM, Kooi ME. Intramyocellular lipid content is increased after exercise in nonexercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 2003;95:2328–2332.
34. McPherron AC, Lee SJ. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* 2002;109:595–601.
35. Díaz M, Chacón MR, López-Bermejo A, Maymó-Masip E, Salvador C, Vendrell J, de Zegher F, Ibáñez L. Ethinyl estradiol-cyproterone acetate versus low-dose pioglitazone-flutamide-metformin for adolescent girls with androgen excess: divergent effects on CD163, TWEAK receptor, ANGPTL4, and LEPTIN expression in subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:3630–3638.
36. Liu L, Zhang Y, Chen N, Shi X, Tsang B, Yu YH. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2007;117:1679–1689.
37. Schenk S, Horowitz JF. Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2007;117:1690–1698.
38. Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang YX, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, Evans RM. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* 2008;134:405–415.
39. Mulligan CM, Sparagna GC, Le CH, De Mooy AB, Routh MA, Holmes MG, Hickson-Bick DL, Zarini S, Murphy RC, Xu FY, Hatch GM, McCune SA, Moore RL, Chicco AJ.

Dietary linoleate preserves cardiolipin and attenuates mitochondrial dysfunction in the failing rat heart. *Cardiovasc Res.* 2012 Jun 1;94(3):460-8.

40. Smith RC, Lin BK. Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2013 Dec;7(4):352-60.

Table 1: Primers used for RT-qPCR

Role	Gene	Reverse Primer (5'-3')	Forward Primer (5'-3')
Housekeeping genes	<i>Arp</i>	5'-ACTGGTCTAGGACCCGAGAAAG-3'	5'-TCCCACCTTGTCTCCAGTCT-3'
	<i>α-Tub</i>	5'CTGGAACCCACGGTCATC-3'	5'GTGGCCACGAGCATAGTTATT-3'
Lipid oxidation	<i>Cpt1</i>	5'CATCCCAGGCAAAGAGACA-3'	5'AAGCGACCTTTGTGGTAGACA-3'
	<i>Ppar-d</i>	5'GTATGCGCATGGGACTCAC-3'	5'GTCTGAGCGCAGATGGACT-3'
	<i>Pgc1-a</i>	5'GGAGCCGTGACCACTGACA-3'	5'TGGTTTGCTGCATGGTTCTG-3'
Cardiolipin synthesis enzymes	<i>Pgs</i>	5'GAGAGCCAATCAGCGTGAG-3'	5'CAGGGGTTGGACCTTTCAT-3'
	<i>Crls1</i>	5'CGTGCCATAGCAAGGATTG-3'	5'TGTGATCGCTGCTGTGTTT-3'
Cardiolipin Remodeling enzymes	<i>Taz</i>	5'TGAAGTCCATCCCTTCTGG-3'	5'GCTGCAGACATCTGCTTCAC-3'
	<i>Alcat1</i>	5'CTGTGTTGAGGGCAGGTGT-3'	5'CCAGCCCATGTTAACTGCT-3'
Lipogenesis	<i>Fas</i>	5'GCTCCTCGCTTGTCGTCT-3'	5'GCAACTTCCCCGACATACC-3'

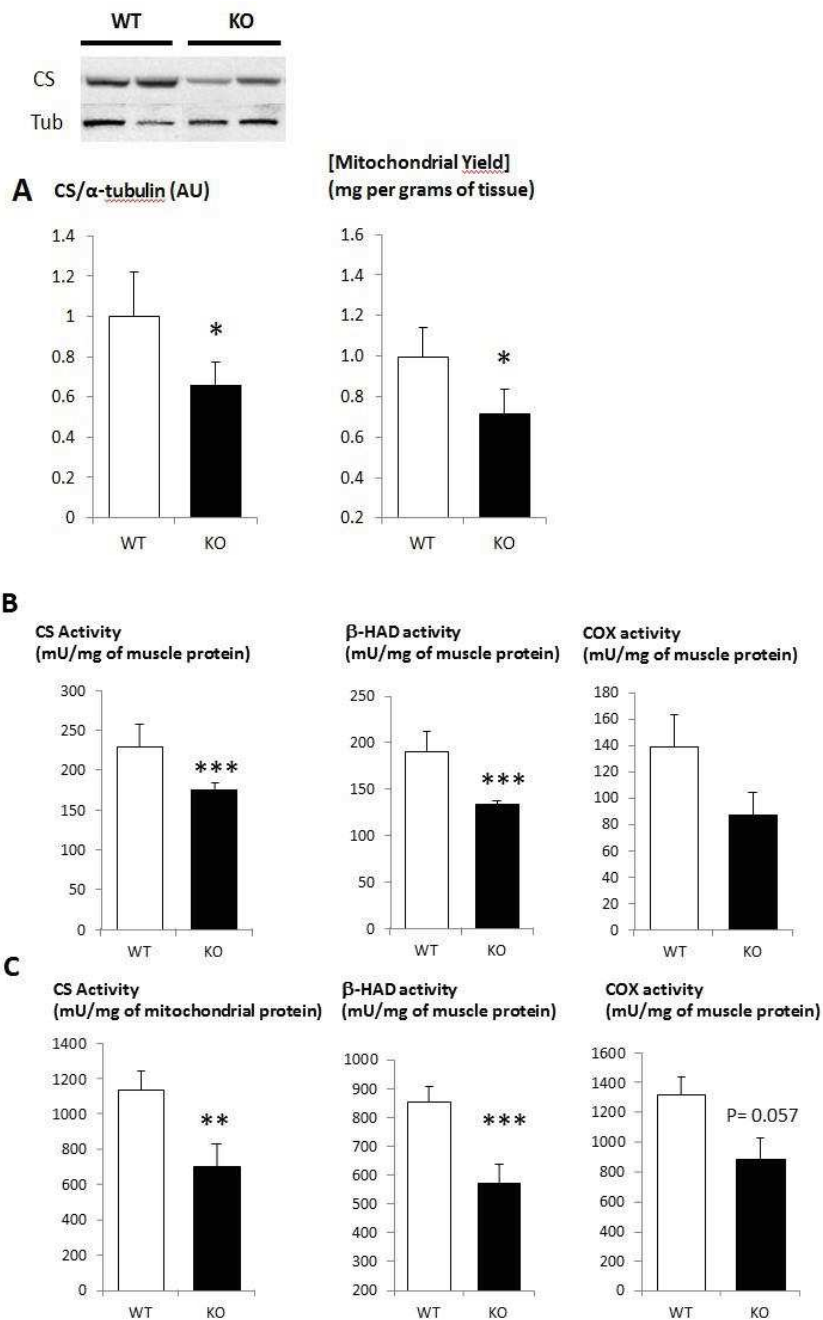
Arp: acidic ribosomal phosphoprotein, *α -Tub*: alpha Tubulin, *Cpt1*: Carnitine palmitoyltransferase I, *Ppar-d*: Peroxisome proliferator-activated receptor delta, *Pgc-1a*: Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha, *Pgs*: phosphatidylglycerophosphate synthase, *Crls1*: cardiolipin synthase 1, *Taz*: tafazzin, *Alcat1*: lysocardiolipin acyltransferase 1, *Fas*: fatty acid synthase.

Table 2. Body and muscle weight, and aerobic running performance in *Mstn*^{-/-} mice and WT littermates

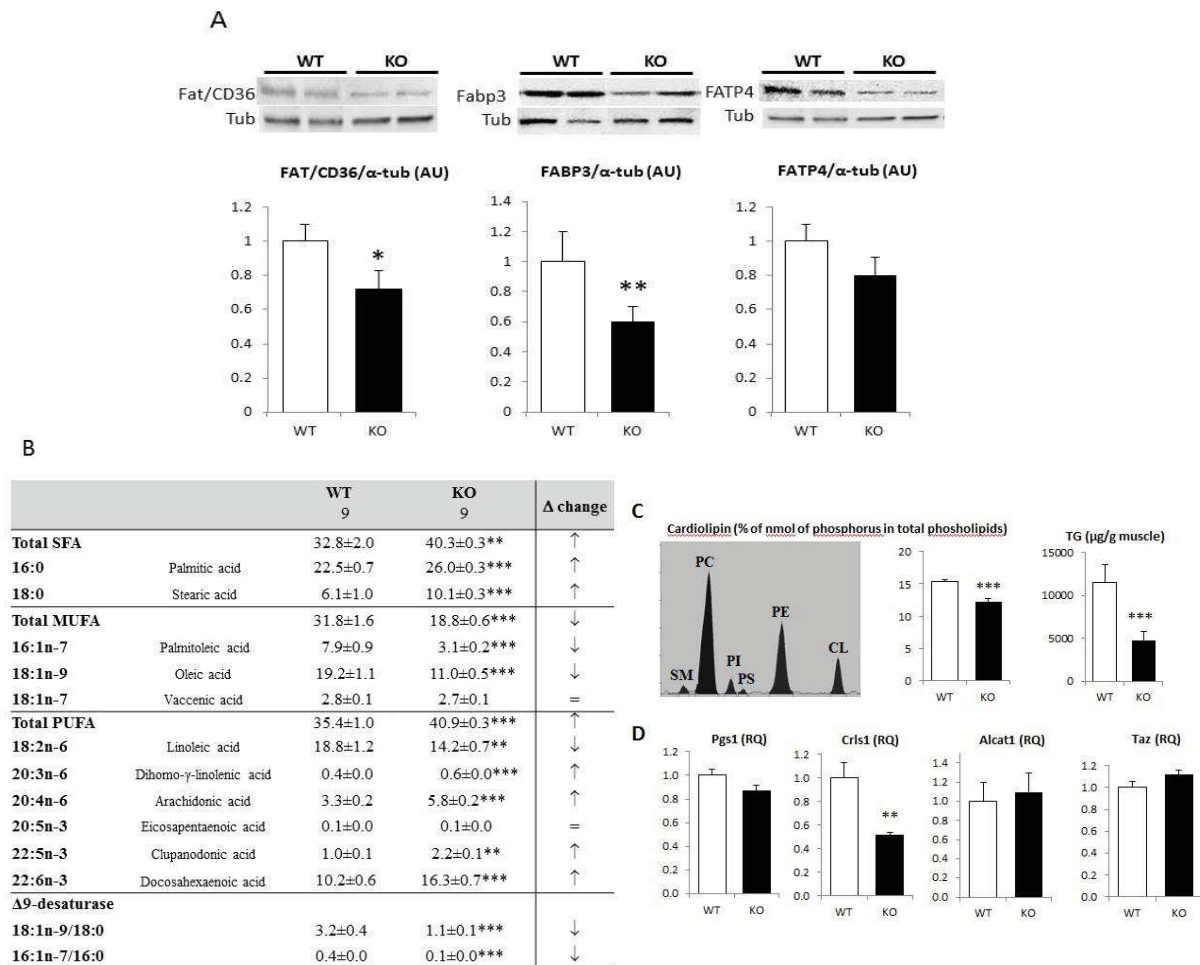
	WT	KO
Hypertrophic muscle markers		
Body weight	27.8±1.0	31.7±0.5***
TA/BW	2.08±0.05	2.60±0.09***
EDL/BW	0.41±0.01	0.62±0.02***
Quad/BW	8.80±0.15	11.10±0.30***
Gastro/BW	6.03±0.03	8.04±0.02***
Performance outcomes		
Maximal aerobic velocity	26.4±1.4	24.4±1.2
Running limit time	2920±375	1577±226*

Data are expressed as the mean ± SEM. BW: Body weight (g); TA: tibialis anterior; EDL: extensor digital longus; Gastro: gastrocnemius; Quad: quadriceps. Muscle weights are normalized to BW (mg/g). The maximal aerobic velocity is expressed in meters per minute; the running limit time is the time to exhaustion and is expressed in seconds.

* $p < 0.05$, *** $p < .001$ (ANOVA, genotype main effect); $n = 9$ animals/genotype (all non-trained).



Supplemental Figure 1 Skeletal muscle oxidative abnormalities in *Mstn*^{-/-} mice (KO) compared with WT littermate. A/ Quantitative markers linked to mitochondria metabolism measured in whole gastrocnemius muscle: citrate synthase protein (CS) quantification, mitochondrial yield. Functional markers linked to mitochondria metabolism: CS, B-HAD and COX enzymatic activities B/ in whole gastrocnemius muscle, C/ in mitochondria extracted from mixed muscles. The protein expression quantification for citrate synthase was normalized to α -tubulin. Data are expressed as the mean \pm SEM. AU: Arbitrary Units; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ KO versus WT (Genotype effect; all non-trained animals).



Supplemental Figure 2 Lipids abnormalities in *Mstn*^{-/-} mice (KO) compared with WT littermates **A)** Lipid transporters in gastrocnemius samples: protein expression level of fatty acid translocase (FAT/CD36), fatty acid binding protein 3 (FABP3), and fatty acid transport proteins (FATP4). All protein expression quantifications were normalized to α -tubulin. **B)** Distribution of the main fatty acids in gastrocnemius samples. Fatty acid distribution in WT and KO muscle evaluated by gas chromatography. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids. All compositions were expressed as the percentage by weight of total fatty acids. **C)** Representative thin-layer chromatographic profiles of the extracted lipids from mixed limb muscles. Sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE) and cardiolipin (CL) were detected by phospholipid separation. Quantification of CL in mitochondrial membranes of mixed limb muscles of WT and KO mice, and gastrocnemius triglyceride (TG) content. Results are expressed as percentage of nmol of phosphorus in total phospholipids for CL and in μ g/g muscle for TG. **D)** Graphic representation of gene expression involved in CL-related pathways (*Pgs1*, *Cris1*, *Alcat1*, *Taz*). Data are expressed as the mean \pm SEM. AU: Arbitrary Units; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ KO versus WT (Student's *t*-test, genotype effect) (all non-trained animals).

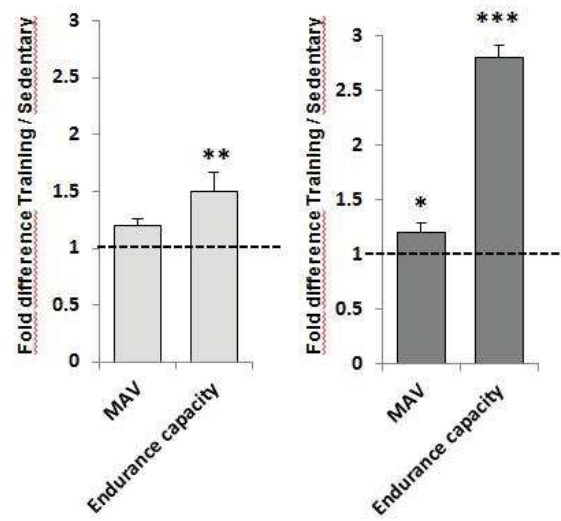


Figure 1. The effect of training on MAV and endurance limit time in WT (left panel) and *Mstn*^{-/-} mice (right panel). Data are expressed as the fold-change compared with the value in non-trained controls (same genotype) set to 1 (dashed line). *p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001 (trained vs non- trained group); n=9 mice/group.

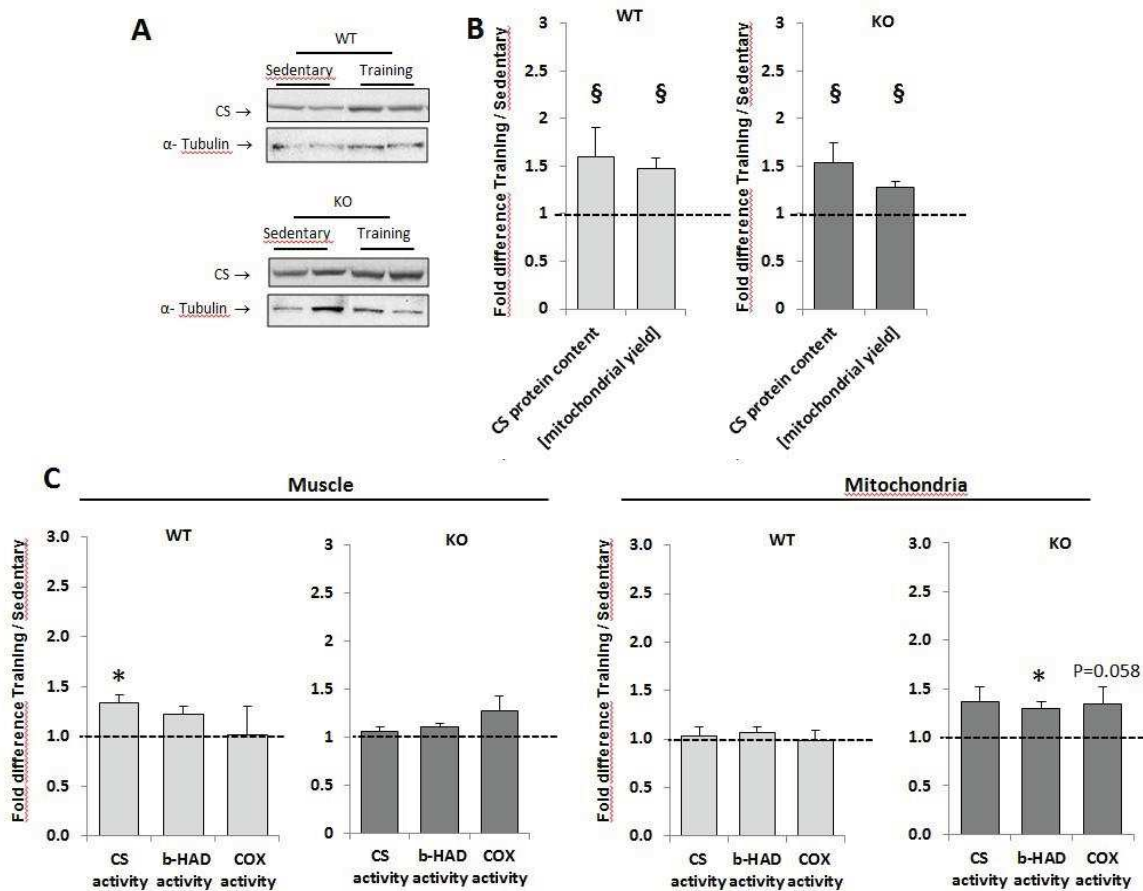


Figure 2. Effect of training on mitochondrial metabolism mice. **A.** Representative immunoblots showing the protein expression levels of CS in trained and non-trained (sedentary) WT and KO mice. All protein expression quantifications were normalized to α -tubulin. **B.** Graphic summary showing the effect of training on CS protein content, and mitochondrial protein yield. **C.** Impact of training on CS, β -HAD and COX enzymatic activities in whole gastrocnemius muscle and in mitochondria extracted from mixed muscles. Data are expressed as the fold increase in training over sedentary (control) group; $n=8$ animals/each group for protein expression and enzyme activity. The dashed line represents the control value. \S $p<0.05$ vs sedentary groups (ANOVA effect group); * $p<0.05$ vs sedentary corresponding group (ANOVA post-hoc analysis).

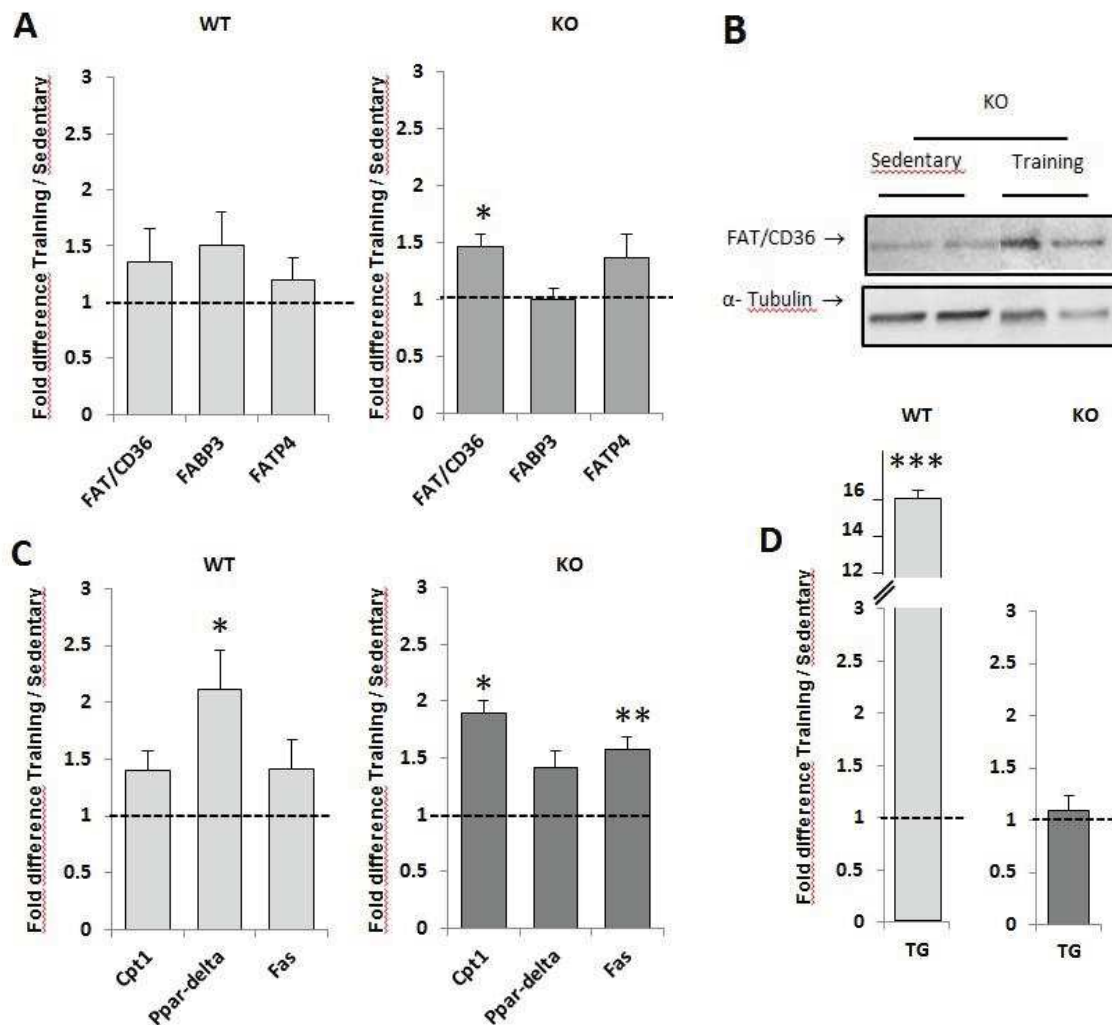


Figure 3 Effect of training on lipids-related pathways **A**. Graphic summary showing the effect of training on the protein expression levels of lipid transporters, FAT/CD36, FABP3 and FATP4 **B**. Representative immunoblot showing the protein expression levels of the transporter FAT-CD36 which significant increased under training in KO mice (immunoblot not shown when no significant changes are noted). All protein expression quantifications were normalized to α -tubulin. **C**. Graphic summary showing the effect of training on the gene expression levels of aerobic metabolism markers as *Cpt1*, *Ppar-d*, and on the lipogenesis marker *Fas*. **D**. Impact of training on gastrocnemius triglyceride (TG) content levels evaluated by TLC densitometry. Data are expressed as the fold increase in training over sedentary (control) group; ; n=8 animals/each group for protein expression, and 6 animals/each groups for gene expression. The dashed line represents the control value *p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001 vs sedentary corresponding group (ANOVA post-hoc test).

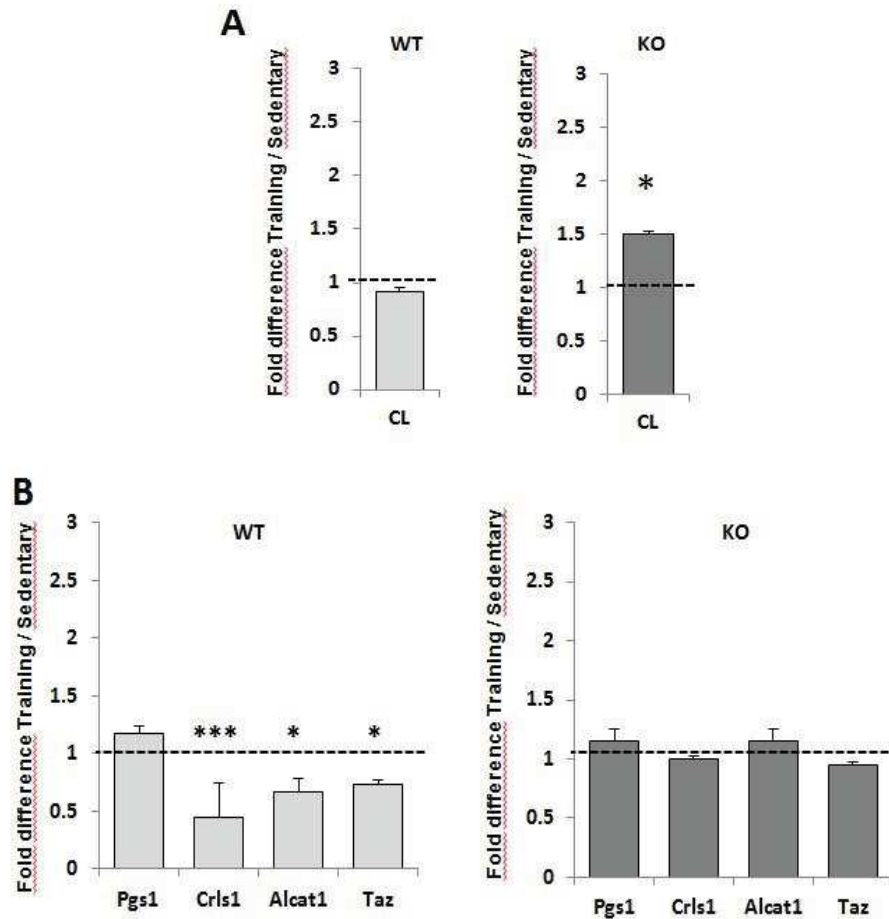


Figure 4. Effect of training on CL-related pathways **A.** Graphic summary showing the effect of training on CL fraction in mitochondrial membranes of mixed limb muscles in WT and KO mice groups. **B.** Effect of training on the expression of genes involved in CL-related pathways (*Pgs1*, *Cris1*, *Alcat1*, *Taz*). Data are expressed as the fold increase in training compared with sedentary (control) group; n=8 animals/each group for mitochondrial data, and 6 animals/each groups for gene expression. The dashed line represents the control value *p<0.05; *** p<0.001 vs sedentary corresponding group (ANOVA post-hoc test).

E-Discussion générale
&
Perspectives

L'inhibition de la mstn induit une hypertrophie musculaire mais également une diminution du métabolisme oxydatif et mitochondrial. Toutefois les mécanismes à la base de ces effets sur le métabolisme musculaire et sur la fonction mitochondriale ne sont pas totalement connus. Les travaux exposés dans cette thèse ont mis en évidence un nouveau lien entre les altérations mitochondriales induites par la perte de mstn et le métabolisme lipidique.

Plusieurs questions se posent au vu des résultats et nous allons discuter leur portée et leurs limites. Les perspectives envisageables seront présentées également au fur et à mesure de la discussion pour compléter les données de ce travail.

I Fonction Métabolique de la Myostatine

I.1 Métabolisme lipidique musculaire chez la souris KO mstn

Nos résultats révèlent que l'absence constitutive de mstn perturbe le métabolisme lipidique musculaire tant au niveau de la synthèse, du stockage que du catabolisme des AG.

En ce qui concerne le catabolisme, une diminution de la β -oxydation des AG est démontrée par la baisse de l'activité enzymatique de CS et de β -HAD ainsi que par une diminution de l'expression de Ppar δ et Cpt1. Ceci confirme le déficit oxydatif dans le muscle KO mstn précédemment décrit (Ploquin et al., 2012, Mouisel et al., 2014 et Rélizani et al., 2014). Pour approfondir l'étude de la voie d'oxydation des lipides, nous avons évalué l'expression protéique des principaux transporteurs membranaires (FAT/CD36, FATP1-4 et cytosolique des AG dans la cellule musculaire (FABP3). Ces protéines facilitent l'entrée et le passage des AG de moyennes et longues chaînes, dans le milieu intra-cellulaire. La diminution de la quantité de ces transporteurs, observée dans notre étude, pourrait expliquer la baisse de dégradation des AG (β -oxydation) dans le muscle déficient en mstn.

En outre, nous avons montré une diminution de la quantité des TG musculaires et des enzymes impliquées dans cette voie (FAS) dans le muscle KO mstn indiquant une altération de la voie de stockage des AG dans ce muscle hypertrophié.

Lipide et glucose sont les principaux substrats énergétiques dans le muscle squelettique. Si le métabolisme lipidique est altéré qu'en est-il du métabolisme glucidique ?

Nos données montrent que l'utilisation du glucose (GLUT4) est augmentée dans ce muscle KO mstn. En appui les travaux de Guo et al montrent que les souris KO mstn ont une augmentation de l'absorption du glucose dans le tissu musculaire. Egalement ceux de Pauly et al (Pauly et al., 2015) rapportent une augmentation significative des taux de protéines GLUT4

et une diminution des taux de protéines FAT / CD36 dans les muscles EDL des souris KO mstn âgées par rapport aux souris WT âgées. De façon intéressante des altérations métaboliques oxydatives et mitochondriales se retrouvent chez la souris présentant un blocage post-natal de la voie ActRIIB de signalisation de la mstn. Cette inhibition réduit l'expression des ARNm des gènes qui régulent le transport mitochondrial des AG (i.e. Cpt1), ainsi que des régulateurs transcriptionnels du métabolisme énergétique (i.e. Ppar- δ et Pgc1- α) (Relizani et al., 2014, Mouisel et al., 2014). L'ensemble de ces données illustre l'orientation de ce muscle vers un métabolisme glycolytique.

I.2 Métabolisme lipidique chez la souris KO mstn

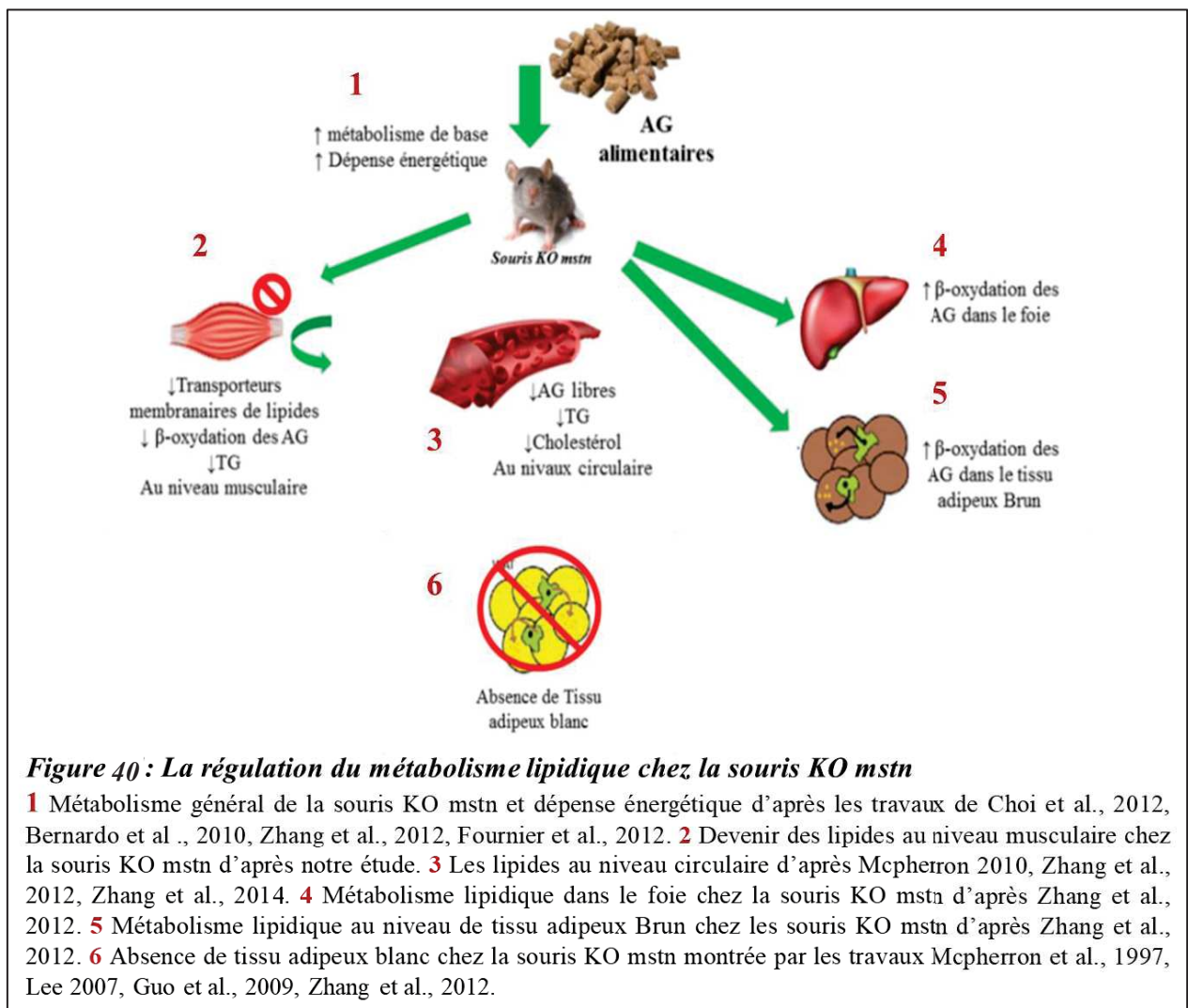
Les données de la littérature rapportent que les taux de TG, d'AG libres et de cholestérol sont diminués au niveau sanguin chez les souris KO mstn comparées aux souris sauvages (Mcpheeron & Lee 2002, Guo et al., 2009). Une réduction du tissu adipeux est également associée au phénotype d'hypermuscularité chez ces souris (Mcpheeron et al., 1997a, Lee 2007, Guo et al., 2009, Zhang et al., 2012). Ces données suggèrent que l'apport lipidique chez la souris KO mstn est assuré essentiellement par l'alimentation, puisque les réserves dans le tissu adipeux sont quasi inexistantes. Par ailleurs, aucune différence dans la prise alimentaire entre les souris contrôles et KO mstn n'a été observée (Mcpheeron & Lee 2002, Choi et al., 2011).

Au regard de ces observations se pose la question de l'utilisation et du devenir de ces lipides dans ce modèle.

Dans ce contexte nous avons émis l'hypothèse d'un défaut d'absorption au niveau intestinal. Pour cela nous avons quantifié les lipides dans les fèces des souris contrôles et KO mstn. Cependant aucune variation de la quantité des lipides fécaux entre les 2 génotypes n'a été observée lors de notre analyse ($0.09 \text{ mg} \pm 0.01$ vs $0.08 \text{ mg} \pm 0.004$ chez les WT et KO respectivement, données non publiées).

Puisque le muscle et le tissu adipeux sont en compétition pour l'utilisation métabolique des nutriments, il est possible que l'inhibition de la mstn favorise l'utilisation métabolique des nutriments par d'autres tissus métaboliques. D'après Zhang et al., l'inhibition de la mstn induit une augmentation des marqueurs de la β -oxydation des lipides et l'activité métabolique mitochondriale au niveau du tissu adipeux brun et du foie (Zhang et al., 2012, Zhang et al., 2011). Fournier et al montrent une augmentation du métabolisme de base et de la dépense énergétique chez des souris traitées par des inhibiteurs de mstn ActRIIB. Celle-ci est expliquée par une hausse de dépense énergétique au niveau du tissu adipeux brun riche en mitochondries permettant une meilleure orientation oxydative et utilisation des substrats dans ce tissu au

détriment du muscle squelettique (Fournier et al., 2012). De plus, des effets similaires sur la capacité à modifier l'oxydation des acides gras dans les tissus périphériques ont été rapportés chez des souris transgéniques présentant une hypertrophie des fibres musculaires rapides/glycolytiques suite à la sur-expression d'une forme constitutivement active d'Akt1 dans le muscle squelettique (Izumiya et al, 2007). Celles-ci résistent à un régime obésogène avec une diminution de la masse grasse et une amélioration métabolique telle une augmentation de l'oxydation des acides gras au niveau du foie. Ces résultats confortent l'idée que l'hypertrophie en absence de mstn favorise le métabolisme des acides gras et leur oxydation dans le foie au détriment du muscle (Figure 40).



L'élucidation du mécanisme par lequel la *mstn* régule le métabolisme des lipides *in vivo* nécessite finalement l'étude d'animaux génétiquement modifiés dans lesquels les composants de la voie de signalisation de la *mstn* ont été bloqués spécifiquement dans le muscle squelettique ou le tissu adipeux. Dans ce sens, il a été montré que l'inhibition spécifique de *mstn* dans le muscle induit une diminution de la masse du tissu adipeux alors que l'inhibition spécifique de *mstn* dans le tissu adipeux n'a pas d'effet sur la masse du tissu adipeux (Guo et al., 2009). Ces résultats suggèrent que les changements du métabolisme adipeux chez les souris KO *mstn* sont un effet indirect de l'absence de signalisation de la *mstn* dans le muscle squelettique.

Un autre mécanisme par lequel la *mstn* serait capable de contrôler les réserves lipidiques pourrait être la lipophagie, la voie de dégradation spécifique des lipides par le système autophagie/ lysosome. Ce processus a été décrit dans les hépatocytes, site majeur de stockage et d'accumulation des AG. L'inhibition génétique ou pharmacologique de l'autophagie dans ces hépatocytes entraîne une accumulation des TG cellulaires et une diminution de la β -oxydation mitochondriale (Singh et al., 2009). Des études futures seront nécessaires pour déterminer si la lipophagie dans les cellules métaboliquement actives, telles que les hépatocytes, les cellules musculaires, adipeuses ... est régulée par le facteur *mstn*.

I.3 Acides Gras et composition phospholipidique des membranes chez la souris KO *mstn*

Nos résultats montrent que les muscles déficients en *mstn* présentent une diminution de l'activité des acides gras synthase (FAS), un changement dans la composition des acides gras (augmentation des taux d'acides gras saturés et d'acides gras polyinsaturés au détriment des taux d'acides gras monoinsaturés) ainsi qu'une diminution de l'expression de l'enzyme SCD1 impliquée dans la conversion des acides gras saturés en acides gras monoinsaturés. Il est à noter que le promoteur du gène SCD1 contient une séquence d'éléments de réponse à Ppar. De manière intéressante nous avons montré que l'absence de *mstn* aussi réduit l'expression de Ppar, supportant l'hypothèse que *mstn* régule la composition des acides gras membranaires en ciblant SCD1 via Ppar. Toutefois on ne peut pas exclure la possibilité que *mstn* agit directement ou non sur d'autres enzymes désaturases et élongases impliquées dans les étapes de biosynthèse des acides gras monoinsaturés. Comme la fluidité membranaire est favorisée par les lipides avec des acides gras courts et insaturés (de Kroon., 2013), nos résultats suggèrent une tendance à la formation de membranes rigides dans les muscles squelettiques KO *mstn*. La pertinence fonctionnelle et clinique de ces modifications dans la composition et la fluidité de la membrane musculaire reste à être étudiée.

Une autre observation intéressante est que la déficience en *mstn* est associée à une modification du contenu membranaire en phospholipides dans la mitochondrie de muscle marquée par une diminution significative de la proportion du cardiolipide (CL). Au niveau moléculaire nous montrons une diminution de l'expression des enzymes CLS : Cardiolipin synthase, Pgps : phosphatidylglycerolphosphate synthase impliquées dans la biosynthèse du CL. Ces données suggèrent un lien entre la myostatine et la voie de synthèse du CL. Lai et al ont établi que les régulateurs transcriptionnels PGC-1, co-activateur des PPARs, régulent la biosynthèse du CL dans des myocytes cardiaques. Les muscles déficients en *mstn* présentent une expression réduite de PGC-1 (Lipina et al., 2010 ; Pauly et al., 2015). Ces résultats laissent penser que la *mstn* pourrait agir de manière indirecte sur la biosynthèse du CL via PGC-1 α . D'autres études sont nécessaires pour mettre en évidence le lien mécanistique entre *mstn* et le cardiolipide.

Nos résultats sur la diminution en CL membranaire dans le muscle KO *mstn* posent la question de l'impact fonctionnel de cette diminution en CL sur le phénotype *mstn* -/-.

Le cardiolipide est un phospholipide spécifique de la membrane mitochondriale interne, représentant un indicateur du contenu en mitochondrie dans les tissus (Schlame et al., 2005). Plusieurs études rapportent que les muscles avec une grande capacité oxydative (comme le soléaire et le cœur) sont plus riches en CL que les muscles glycolytiques, ce qui paraît logique puisque ces derniers contiennent moins de mitochondries que les premiers (Stefank et al., 2010, Fajardo et al., 2017). Il est donc possible que les changements en CL observés dans cette étude reflètent les changements dans la composition des types de fibres et, plus spécifiquement, dans la teneur en mitochondries des muscles déficients en *mstn* (voir paragraphe *anomalies lipidomiques résultent d'un effet indirect et d'une conséquence du changement congénital des types de fibres*).

Il convient de noter que le CL n'est pas juste un biomarqueur de la densité mitochondriale (Schlame et al., 2005) mais qu'il est impliqué dans diverses fonctions mitochondriales incluant les activités ETC ainsi que la formation de supercomplexes, le transport mitochondrial des molécules bioénergétiques (Schlame et al., 2005, Paradies et al., 2014). Plusieurs études ont montré l'importance de maintenir des niveaux normaux du CL pour la fonction mitochondriale et l'intégrité structurelle. Ceci est illustré par le phénotype cardiaque du syndrome de Barth humain où des niveaux réduits du CL ont été associés à un dysfonctionnement mitochondrial chez l'homme avec des défauts génétiques dans la synthèse de la cardioline (Claypool et al., 2011). En outre, il est suggéré que le CL fonctionne comme une « colle » qui maintient les

complexes respiratoires en étroite association les uns avec les autres (Unsay et al., 2013). Nos données antérieures mettent en évidence des perturbations métaboliques dans la respiration des mitochondries intermyofibrillaires du muscle déficient en *mstn* (Ploquin et al., 2012). Dans le diabète de type 1, la teneur en cardioline est diminuée dans cette sous-population, mais pas dans la sous-population sub-sarcolemmale (Dabkowski et al., 2009, Croston et al., 2013). Il est donc possible que la diminution en CL dans le muscle KO *mstn* puisse être en partie impliquée dans les altérations de la fonction mitochondriale et la respiration précédemment rapportée dans le muscle *mstn* KO (Ploquin et al. 2012, Baligand et al., 2010). Au regard de sa localisation (dans la membrane mitochondriale) il est à noter que l'importance fonctionnelle du CL s'étend bien au-delà du maintien de l'intégrité structurelle des mitochondries et comprend des processus tels que le maintien et la régulation du potentiel membranaire, le transport du substrat, l'homéostasie Ca^{2+} , l'activité des enzymes ETS et les changements morphologiques bruts des mitochondries. L'équipe d'Amthor et al a rapporté que les fibres musculaires issues de muscles rapides des souris KO *mstn* présentent une accumulation d'agrégats tubulaires au niveau du canal de libération du calcium du réticulum sarcoplasmique suggérant des problèmes d'homéostasie calcique (Amthor et al, 2007). Cela pose la question d'un rôle potentiel du CL dans cette altération. En outre, des données non publiées au sein du laboratoire indiquent une augmentation des niveaux protéiques de Gpr78 dans le muscle KO *mstn*, suggérant un stress du RE. Dans des situations pathologiques, il est rapporté que le remodelage du cardioline peut être assuré dans le RE via ALCAT1 (Ostojic et al., 2013). Etudier la relation entre le RE et la mitochondrie serait donc une piste à suivre pour comprendre l'impact du déficit en CL sur le phénotype musculaire des souris KO *mstn*.

Un autre niveau de régulation à prendre en compte est le maintien de la composition des espèces moléculaires de la cardioline. Comme le métabolisme des lipides ou des acides gras est altéré dans les muscles déficients en *mstn*, il est tentant d'imaginer un effet sur le remodelage de la cardioline dû à l'utilisation des acides gras donneurs. Bien que l'expression génique de TAZ et ALCAT1, deux enzymes impliquées dans le remodelage du CL ne sont pas modifiées dans le muscle KO *mstn*, d'autres études seront nécessaires pour tester cette hypothèse. La composition de la chaîne acyl du CL, est aussi un déterminant principal de la fonction mitochondriale et du métabolisme énergétique. Cette composition varie également selon les types de tissus, et on trouve l'acide linoléique (18 :2n6) qui domine dans la composition du CL des tissus musculaires et cardiaques (Stefank et al., 2010, Fajardo et al., 2017). Une diminution de la teneur en acide linoléique dans le muscle peut atténuer la fonction mitochondriale et

l'activité de cytochrome c oxydase (Cox) (Fajardo et al., 2015, Yamaoka et al., 1990). Dans notre étude, l'impact de la déficience en *mstn* sur la diminution de la teneur en acide linoléique dans le muscle gastrocnémien des souris KO *mstn* par rapport aux souris sauvages était bien claire dans la première étude (tendance à $p=0.09$) ensuite elle a été confirmée dans notre deuxième étude ($p<0.01$). Ces données restent en accord avec la réduction du contenu de CL dans le muscle déficient en *mstn*. Cependant dans des études à venir, il sera important de vérifier la composition acyl du CL dans le muscle déficient en *mstn*.

Une limitation de notre étude est que nous pouvons seulement spéculer que les changements dans la teneur en CL peuvent conduire à des changements dans la respiration mitochondriale dans notre modèle KO *mstn*. Néanmoins, de futures études visant à modifier la teneur en CL tout en mesurant l'impact sur la respiration mitochondriale donnera des premiers éléments de réponse dans ce modèle. Dans ce contexte, une méthode réalisable pour modifier la teneur en CL serait de cibler des enzymes de sa biosynthèse. Il est possible également d'envisager une approche nutritionnelle comme une supplémentation en acide linoléique (Mulligan et al., 2012, Valianpour et al., 2003, Julienne et al., 2014). Il serait ainsi intéressant de déterminer les effets de la modification de la teneur en CL et de la composition du CL 18:2n6 non seulement sur la respiration mitochondriale, mais aussi sur les adaptations physiologiques (masse musculaire et phénotype oxydatif / glycolytique). Enfin, il a été montré que l'entraînement physique induit des modifications de la composition lipidique de la membrane. En particulier, la concentration totale du CL augmente avec l'entraînement physique chez les rats et les humains (Das et al., 2015, Toledo et al., 2007) tandis qu'une diminution de la teneur en CL suite est observée suite au désentraînement (Takahashi & Hood, 1993). Outre des modifications quantitatives du CL, de nouvelles approches sont développées visant à conserver la qualité du CL et le protéger de l'oxydation induite par son exposition fréquente aux ROS mitochondriales. De manière intéressante de nombreux travaux ont montré le potentiel thérapeutique du peptide SS-31, capable de cibler spécifiquement le CL, de le protéger de l'oxydation et d'améliorer la bioénergétique mitochondriale (Birk et al., 2013). Cette approche a été évaluée dans de nombreux modèles précliniques de maladies impliquant un déficit bioénergétique mitochondrial (revue Szeto 2013).

*Une question résultant de nos travaux est de savoir si les anomalies lipidiques résultent d'un effet indirect et/ou d'une conséquence du changement congénital des types de fibres caractéristiques du muscle hypertrophié de souris présentant une déficience constitutive en *mstn* (McPherron 1997, Mendias et al 2006).*

Nous avons exploré le modèle des souris transgéniques surexprimant *Gasp1*, un inhibiteur de *mstn*, qui comme le modèle KO *mstn* présente une hypertrophie musculaire. Nous montrons que cette sur-expression de *Gasp1*, malgré une distribution du typage de fibre qui reste normale, réduit l'expression des marqueurs du métabolisme oxydatif. Ceci est en accord avec les données antérieures qui ont démontré une réduction du métabolisme oxydatif dans des modèles d'inhibition post-natale de *mstn*, où la composition de type de fibre n'a pas été affectée (Relizani et al., 2014).

Il est également possible que les changements lipidiques membranaires reflètent le schift de fibres vers le type II présent dans le modèle KO *mstn*. Cependant, l'étude de Stefanyk et al ne rapportent aucune différence dans le pourcentage de CL dans les mitochondries provenant de muscles ayant des potentiels oxydatifs variables, ainsi que dans le pourcentage de groupes de tête de phospholipides ou de sous-classes d'acides gras majeurs (Stefanyk et al 2010). Une autre étude montre que le taux d'oxydation des acides gras est positivement corrélé avec l'indice d'insaturation et l'abondance relative du CL dans les mitochondries (Fajardo et al., 2015). Nos données personnelles montrent une diminution de la teneur en CL dans le foie, tissu qui ne présente pas de conversion glycolytique. Collectivement, ces données suggèrent que la modification de la typologie des fibres ne peut pas être le seul mécanisme expliquant le déclin du métabolisme oxydatif et les changements lipidiques membranaires chez les souris KO *mstn*.

II Adaptation métabolique des souris KO *mstn* à l'entraînement en endurance

Plusieurs études ont montré que la fonction du tissu musculaire déficient en *mstn* peut être améliorée car il répond favorablement à des activateurs pharmacologiques ou physiologiques du métabolisme aérobie. En particulier, l'entraînement d'endurance permettant d'optimiser la filière aérobie, réduit la taille des fibres musculaires, augmente les propriétés oxydatives des muscles et la densité capillaire et améliore la génération de la force musculaire chez les souris KO *mstn* (Matsakas et al., 2010, Matsakas et al., 2012, Savage & McPherron 2010). Cependant, des aspects importants des mécanismes qui régissent ces réponses adaptatives dans les mitochondries restent obscurs. Dans ce contexte nous avons soumis des souris sauvages et KO *mstn* à un entraînement en endurance et trouvé que l'amélioration des capacités de course des souris KO *mstn* est associée à une augmentation du métabolisme

oxydatif et de l'oxydation des lipides dans le muscle squelettique des souris KO *mstn*, ainsi qu'à une restauration spécifique de la fraction CL dans la membrane mitochondriale du muscle.

Au niveau moléculaire, nos travaux suggèrent que les deux groupes de souris adaptent leur machinerie transcriptionnelle pour capter et utiliser les acides gras dans le muscle en réponse à l'entraînement. Premièrement, l'expression de Ppar- δ , un régulateur principal du métabolisme des acides gras, augmente chez les deux génotypes en réponse à l'exercice. Deuxièmement, l'absorption et l'utilisation des acides gras sont également améliorées avec l'expression accrue de Cpt1 et FAT / CD36, particulièrement chez les souris *Mstn* - / -. Toutefois la comparaison des muscles des souris sauvages et KO *mstn* entraînées montre que les muscles déficients en *mstn* contiennent de plus faibles quantités en TG malgré l'augmentation de l'activité FAS indiquant que les muscles KO *mstn* hypertrophiés restent résistants au stockage de TG après l'entraînement. Cette variation dans l'accumulation des TG entre les deux génotypes peut résulter du phénotype glycolytique du muscle KO *mstn*, et reflète le défaut du métabolisme lipidique observé dans ce modèle et de fait soulève la question de l'impact du déficit en *mstn* sur les taux de synthèse de TG intramusculaire et sur d'autres espèces lipidiques dans le muscle, comme le diacylglycérol et les céramides, en relation avec le métabolisme des TG. Ces résultats sont aussi en accord avec les données de plusieurs équipes montrant une inhibition de l'accumulation de tissu adipeux dans ce modèle d'hypertrophie musculaire (McPherron & Lee., 1997b, Lee 2007).

Compte tenu des effets de l'entraînement sur la capacité aérobie et la densité mitochondriale, il est envisageable que les changements dans l'activité contractile musculaire puissent induire un remodelage de la composition des phospholipides de la membrane mitochondriale pour s'adapter aux exigences énergétiques changeantes imposées par l'entraînement. Toutefois les données sont rares concernant les effets de l'entraînement physique sur la composition en phospholipides musculaires en particulier mitochondriaux. Les phospholipides cellulaires totaux sont affectés en réponse à l'entraînement (Goto-Inoue et al., 2013, Liang et al., 1993). Chez les rongeurs il a été rapporté que l'entraînement physique augmente la teneur totale en CL et améliore la fonction mitochondriale (Górski et al., 1999, Takahashi & Hood 1993). Nos résultats mettent en évidence que l'entraînement en endurance induit un remodelage des membranes mitochondriales du muscle squelettique avec une augmentation de la teneur en CL chez uniquement les souris KO *mstn* rejoignant la teneur du muscle WT. Cette augmentation est associée également à l'augmentation significative de l'activité des enzymes mitochondriales. Comme discuté dans le paragraphe précédent, il est

donc possible que l'augmentation de la teneur en CL dans les muscles KO mstn entraînés favorise l'association des complexes conduisant ainsi finalement à améliorer la respiration mitochondriale (non mesurée dans notre étude). Il est possible aussi que l'entraînement en endurance ait remplacé les mitochondries anciennes et/ou saines par de nouvelles mitochondries améliorant ainsi la fonction mitochondriale, comme l'augmentation des activités enzymatiques mitochondriales. De futures études sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Toutefois au regard du contenu en CL, nos résultats suggèrent que le modèle d'adaptation à l'entraînement en endurance diffère entre les souris WT et KO mstn. En effet, si la teneur en CL est augmentée chez les souris KO mstn entraînées, elle reste inchangée chez les souris WT. En parallèle, nous observons que l'expression de certains gènes impliqués dans la synthèse et le remodelage de CL est diminuée par l'entraînement en endurance chez les souris WT mais pas chez les souris KO. Comment pouvons-nous interpréter ces résultats ? Il est possible que chez les souris WT, la teneur en CL dans la membrane mitochondriale des souris WT soit suffisante pour permettre l'adaptation à l'exercice sans avoir besoin d'augmenter la CL. Contrairement au muscle WT, le muscle déficient mstn présente un défaut métabolique mitochondrial et une diminution de la teneur en CL. L'entraînement en endurance semble être alors un stimulus suffisant pour augmenter la teneur en CL, le métabolisme oxydatif dans ce phénotype présentant un stress métabolique de base. Ainsi les exigences énergétiques de l'entraînement en endurance pourraient conduire à un remodelage de la composition des phospholipides de la membrane mitochondriale dans les muscles squelettiques KO mstn.

Des études antérieures ont montré que chez les souris KO mstn, l'exercice physique de type endurance améliore les caractéristiques métaboliques fonctionnels et oxydatifs, mais atténue également le phénotype hypertrophique (Matsakas et al., 2012), suggérant que la régulation de la taille du muscle et de la capacité oxydative par la myostatine sont liées. Nos données montrent que l'exercice sur tapis roulant pendant 4 semaines augmente davantage la capacité d'endurance musculaire chez les souris KO mstn que chez les souris WT. Toutefois, cette amélioration n'est pas associée à une diminution de la masse musculaire, contrairement aux résultats rapportés par Savage et al. (Savage & McPherron 2010). Les raisons de cette différence pourraient être liées au type d'exercice, à l'intensité et à la durée, ainsi qu'au contexte génétique des souris utilisées. Cependant, nous avons utilisé la même lignée murine (C56BL / 6). Peut-être que notre protocole d'entraînement étant plus intense (16m/mn contre 12m/mn dans l'étude de Savage et al, cela a facilité le maintien de la masse musculaire.

Nos observations ci-dessus indiquent que le muscle hypertrophié KO mstn peut remodeler ses capacités oxydatives sans réduire sa taille. En accord, une étude récente a démontré que la manipulation génétique en sur exprimant le facteur ERR γ (Estrogen-related receptor gamma) marqueur du métabolisme oxydatif, entraînant ainsi une plus grande capacité d'oxydation chez les souris KO mstn ne s'accompagne pas d'une réduction de la taille du muscle (Omairi et al., 2016). Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la régulation de la taille du muscle et du phénotype métabolique par la mstn peuvent être dissociées.

En conclusion, nos résultats constituent une preuve de concept de l'intérêt de proposer l'inhibition de la mstn combinée au maintien de la capacité oxydative et de la fonction mitochondriale comme stratégie thérapeutique des troubles musculo-squelettiques ou la faiblesse musculaire liée à l'âge et aux maladies.

F-Bibliographie

- Abruzzo PM, di Tullio S, Marchionni C, Belia S, Fanó G, Zampieri S, Carraro U, Kern H, Sgarbi G, Lenaz G, Marini M. Oxidative stress in the denervated muscle. *Free Radic Res* 2010;44:563–576.
- Acehan D, Malhotra A, Xu Y, Ren M, Stokes DL, Schlame M. Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophys J* 2011;100:2184–2192.
- Achten J, Jeukendrup AE. Optimizing fat oxidation through exercise and diet. *Nutrition* 2004;20:716–727.
- Acosta L, Roy RR. Fiber-type composition of selected hindlimb muscles of a primate (cynomolgus monkey). *Anat Rec* 1987;218:136–141.
- Agergaard J, Bülow J, Jensen JK, Reitelseder S, Drummond MJ, Schjerling P, Scheike T, Serena A, Holm L. Light-load resistance exercise increases muscle protein synthesis and hypertrophy signaling in elderly men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017;312:E326–E338.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science; 2002.
- Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 1997;7:776–789.
- Allen RT, Hunter WJ, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997;37:215–228.
- Amirouche A, Durieux AC, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A, Freyssenet D. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology* 2009;150:286–294.
- Amthor H, Huang R, McKinnell I, Christ B, Kambadur R, Sharma M, Patel K. The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. *Dev Biol* 2002;251:241–257.
- Amthor H, Macharia R, Navarrete R, Schuelke M, Brown SC, Otto A, Voit T, Muntoni F, Vrbóva G, Partridge T, Zammit P, Bunker L, Patel K. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1835–1840.
- Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R, Patel K. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol* 2004;270:19–30.
- Amthor H, Otto A, Vulin A, Rochat A, Dumonceaux J, Garcia L, Mouisel E, Hourdé C, Macharia R, Friedrichs M, Relaix F, Zammit PS, Matsakas A, Patel K, Partridge T. Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:7479–7484.
- Andersson A, Sjödin A, Olsson R, Vessby B. Effects of physical exercise on phospholipid fatty acid composition in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1998;274:E432–438.
- Antunes D, Padrão AI, Maciel E, Santinha D, Oliveira P, Vitorino R, Moreira-Gonçalves D, Colaço B, Pires MJ, Nunes C, Santos LL, Amado F, Duarte JA, Domingues MR, Ferreira R. Molecular insights into mitochondrial dysfunction in cancer-related muscle wasting. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1841(6):896–905.
- Aoun M, Fouret G, Michel F, Bonafos B, Ramos J, Cristol JP, Carbonneau MA, Coudray C, Feillet-Coudray C. Dietary fatty acids modulate liver mitochondrial cardiolipin content and its fatty acid composition in rats with non alcoholic fatty liver disease. *J Bioenerg Biomembr* 2012;44:439–452.
- Ardail D, Lerme F, Louisot P. Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria. *J Biol Chem* 1991;266:7978–7981.
- Argilés JM, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Med Res Rev* 1999;19:223–248.
- Astrup A, Dyerberg J, Elwood P, Hermansen K, Hu FB, Jakobsen MU, Kok FJ, Krauss RM, Lecerf JM, LeGrand P, Nestel P, Risérus U, Sanders T, Sinclair A, Stender S, Tholstrup T, Willett WC. The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *Am J Clin Nutr* 2011;93:684–688.
- Bacurau AVN, Jannig PR, de Moraes WMAM, Cunha TF, Medeiros A, Barberi L, Coelho MA, Bacurau

- RFP, Ugrinowitsch C, Musarò A, Brum PC. Akt/mTOR pathway contributes to skeletal muscle anti-atrophic effect of aerobic exercise training in heart failure mice. *Int J Cardiol* 2016;214:137–147.
- Bashir A, Bohnert KL, Reeds DN, Peterson LR, Bittel AJ, de Las Fuentes L, Pacak CA, Byrne BJ, Cade WT. Impaired cardiac and skeletal muscle bioenergetics in children, adolescents, and young adults with Barth syndrome. *Physiol Rep*. 2017 Feb;5(3). pii: e13130.
- Baldwin KM, Klinkerfuss GH, Terjung RL, Molé PA, Holloszy JO. Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle: adaptative response to exercise. *Am J Physiol* 1972;222:373–378.
- Baligand C, Gilson H, Ménard JC, Schakman O, Wary C, Thissen JP, Carlier PG. Functional assessment of skeletal muscle in intact mice lacking myostatin by concurrent NMR imaging and spectroscopy. *Gene Ther* 2010;17:328–337.
- Baracos VE. Management of muscle wasting in cancer-associated cachexia: understanding gained from experimental studies. *Cancer* 2001;92:1669–1677.
- Barth PG, Scholte HR, Berden JA, Van der Klei-Van Moorsel JM, Luyt-Houwen IE, Van 't Veer-Korthof ET, Van der Harten JJ, Sobotka-Plojhar MA. An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci* 1983;62:327–355.
- Bartholin L, Maguer-Satta V, Hayette S, Martel S, Gadoux M, Corbo L, Magaud JP, Rimokh R. Transcription activation of FLRG and follistatin by activin A, through Smad proteins, participates in a negative feedback loop to modulate activin A function. *Oncogene* 2002;21:2227–2235.
- Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 1959;234:466–468.
- Båvenholm PN, Pigon J, Saha AK, Ruderman NB, Efendic S. Fatty acid oxidation and the regulation of malonyl-CoA in human muscle. *Diabetes* 2000;49:1078–1083.
- Beranek A, Rechberger G, Knauer H, Wolinski H, Kohlwein SD, Leber R. Identification of a cardiolipin-specific phospholipase encoded by the gene *CLD1* (YGR110W) in yeast. *J Biol Chem* 2009;284:11572–11578.
- Bergman BC, Perreault L, Hunerdosse DM, Koehler MC, Samek AM, Eckel RH. Increased intramuscular lipid synthesis and low saturation relate to insulin sensitivity in endurance-trained athletes. *J Appl Physiol* 2010;108:1134–1141.
- Berry C, Thomas M, Langley B, Sharma M, Kambadur R. Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2002;283:C135-141.
- Birk AV, Liu S, Soong Y, Mills W, Singh P, Warren JD, Seshan SV, Pardee JD, Szeto HH. The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1250–1261.
- Bish LT, Sleeper MM, Forbes SC, Morine KJ, Reynolds C, Singletary GE, Trafny D, Pham J, Bogan J, Kornegay JN, Vandenborne K, Walter GA, Sweeney HL. Long-term systemic myostatin inhibition via liver-targeted gene transfer in golden retriever muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2011;22:1499–1509.
- Blaauw B, Canato M, Agatea L, Toniolo L, Mammucari C, Masiero E, Abraham R, Sandri M, Schiaffino S, Reggiani C. Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *FASEB J* 2009;23:3896–3905.
- Blackard WG, Li J, Clore JN, Rizzo WB. Phospholipid fatty acid composition in type I and type II rat muscle. *Lipids* 1997;32:193–198.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 2001;3:1014–1019.
- Bogardus C, LaGrange BM, Horton ES, Sims EA. Comparison of carbohydrate-containing and carbohydrate-restricted hypocaloric diets in the treatment of obesity. Endurance and metabolic fuel homeostasis during strenuous exercise. *J Clin Invest* 1981;68:399–404.
- Bogdanovich S, Krag TOB, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, Khurana TS. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 2002;420:418–421.
- Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TOB, Whittemore LA, Khurana TS. Myostatin propeptide-mediated

- amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J* 2005;19:543–549.
- Bollinger LM, Witzak CA, Houmard JA, Brault JJ. SMAD3 augments FoxO3-induced MuRF-1 promoter activity in a DNA-binding-dependent manner. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2014;307:C278-287.
- Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, Glatz JF, Tandon NN. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem* 2000;275:14501–14508.
- Bonen A. PGC-1 α -induced improvements in skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009;34:307–314.
- Booth FW. Cytochrome c protein synthesis rate in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1991;71:1225–1230.
- Borgia D, Malena A, Spinazzi M, Desbats MA, Salviati L, Russell AP, Miotto G, Tosatto L, Pegoraro E, Sorarù G, Pennuto M, Vergani L. Increased mitophagy in the skeletal muscle of spinal and bulbar muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet.* 2017 Mar 15;26(6):1087-1103.
- Böttlinger L, Horvath SE, Kleinschroth T, Hunte C, Daum G, Pfanner N, Becker T. Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. *J Mol Biol* 2012;423:677–686.
- Bouchard C, Simoneau JA, Lortie G, Boulay MR, Marcotte M, Thibault MC. Genetic effects in human skeletal muscle fiber type distribution and enzyme activities. *Can J Physiol Pharmacol* 1986;64:1245–1251.
- Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette JF, Picard B. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 2005;5:490–500.
- Bourrilhon C, Lepers R, Philippe M, Beers PV, Chennaoui M, Drogou C, Beauvieux MC, Burnat P, Guezennec CY, Gomez-Merino D. Influence of protein- versus carbohydrate-enriched feedings on physiological responses during an ultraendurance climbing race. *Horm Metab Res* 2010;42:31–37.
- Bowtell JL, Marwood S, Bruce M, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL. Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size: functional importance for oxidative metabolism in exercising human skeletal muscle. *Sports Med* 2007;37:1071–1088.
- Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 1996;137:354–366.
- Brault JJ, Jespersen JG, Goldberg AL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α or 1 β overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *J Biol Chem* 2010;285:19460–19471.
- Brownson C, Isenberg H, Brown W, Salmons S, Edwards Y. Changes in skeletal muscle gene transcription induced by chronic stimulation. *Muscle Nerve* 1988;11:1183–1189.
- Burdge GC. Polyunsaturated fatty acid intakes and α -linolenic acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 2011;93:665-666; author reply 666-667.
- Burdge GC, Lillycrop KA, Phillips ES, Slater-Jefferies JL, Jackson AA, Hanson MA. Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *J Nutr* 2009;139:1054–1060.
- Caamaño J, Hunter CA. NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:414–429.
- Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Oh BC, Lidov HGW, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE. IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004;119:285–298.
- Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene* 2008;27:2276–2288.
- Campbell C, McMillan HJ, Mah JK, Tarnopolsky M, Selby K, McClure T, Wilson DM, Sherman ML, Escolar D, Attie KM. Myostatin inhibitor ACE-031 treatment of ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy: Results of a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Muscle Nerve* 2017;55:458–464.
- Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JRB, Belke DD, Severson DL, Kelly DP, Lopaschuk GD. A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPAR α are associated with higher concentrations

- of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem* 2002;277:4098–4103.
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296:1655–1657.
- Cao J, Liu Y, Lockwood J, Burn P, Shi Y. A novel cardiolipin-remodeling pathway revealed by a gene encoding an endoplasmic reticulum-associated acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase (ALCAT1) in mouse. *J Biol Chem* 2004;279:31727–31734.
- Carman GM, Han GS. Regulation of phospholipid synthesis in yeast. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S69-73.
- Carper MJ, Zhang S, Turk J, Ramanadham S. Skeletal muscle group VIA phospholipase A2 (iPLA2beta): expression and role in fatty acid oxidation. *Biochemistry* 2008;47:12241–12249.
- Chabi B, Mousson de Camaret B, Chevrollier A, Boisgard S, Stepien G. Random mtDNA deletions and functional consequence in aged human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332:542–549.
- Cheema N, Herbst A, McKenzie D, Aiken JM. Apoptosis and necrosis mediate skeletal muscle fiber loss in age-induced mitochondrial enzymatic abnormalities. *Aging Cell* 2015;14:1085–1093.
- Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2007;292:C33-44.
- Chien D, Dean D, Saha AK, Flatt JP, Ruderman NB. Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E259-265.
- Choi SJ, Yablonka-Reuveni Z, Kaiyala KJ, Ogimoto K, Schwartz MW, Wisse BE. Increased energy expenditure and leptin sensitivity account for low fat mass in myostatin-deficient mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2011;300:E1031–E1037.
- Claypool SM. Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:2059–2068.
- Claypool SM, McCaffery JM, Koehler CM. Mitochondrial mislocalization and altered assembly of a cluster of Barth syndrome mutant tafazzins. *J Cell Biol* 2006;174:379–390.
- Claypool SM, Whited K, Srijumnong S, Han X, Koehler CM. Barth syndrome mutations that cause tafazzin complex lability. *J Cell Biol* 2011;192:447–462.
- Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* 2006;38:813–818.
- Coleman RA, Lewin TM, Muoio DM. Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu Rev Nutr* 2000;20:77–103.
- Corcoran MP, Lamon-Fava S, Fielding RA. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am J Clin Nutr* 2007;85:662–677.
- Cortright RN, Sandhoff KM, Basilio JL, Berggren JR, Hickner RC, Hulver MW, Dohm GL, Houmard JA. Skeletal muscle fat oxidation is increased in African-American and white women after 10 days of endurance exercise training. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:1201–1210.
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A. Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS ONE* 2015;10:e0136690.
- Croston TL, Shepherd DL, Thapa D, Nichols CE, Lewis SE, Dabkowski ER, Jagannathan R, Baseler WA, Hollander JM. Evaluation of the cardiolipin biosynthetic pathway and its interactions in the diabetic heart. *Life Sci* 2013;93:313–322.
- da Costa KA, Garner SC, Chang J, Zeisel SH. Effects of prolonged (1 year) choline deficiency and subsequent re-feeding of choline on 1,2-sn-diradylglycerol, fatty acids and protein kinase C in rat liver. *Carcinogenesis* 1995;16:327–334.
- Dabkowski ER, Williamson CL, Bukowski VC, Chapman RS, Leonard SS, Peer CJ, Callery PS, Hollander JM. Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H359-369.
- Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, Kjaer TR, Frøkiær H. Reduced ex vivo interleukin-6 production by dietary fish oil is not modified by linoleic acid intake in healthy men. *J Nutr* 2009;139:1410–1414.
- Das S, Morvan F, Jourde B, Meier V, Kahle P, Brebbia P, Toussaint G, Glass DJ, Fornaro M. ATP

- citrate lyase improves mitochondrial function in skeletal muscle. *Cell Metab* 2015;21:868–876.
- Daum G, Vance JE. Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res* 1997;36:103–130.
- de Kroon AI, Dolis D, Mayer A, Lill R, de Kruijff B. Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim Biophys Acta* 1997;1325:108–116.
- de Kroon AIPM, Rijken PJ, De Smet CH. Checks and balances in membrane phospholipid class and acyl chain homeostasis, the yeast perspective. *Prog Lipid Res* 2013;52:374–394.
- Deschenes MR. Effects of aging on muscle fibre type and size. *Sports Med* 2004;34:809–824.
- Dias CB, Amigo N, Wood LG, Correig X, Garg ML. Effect of diets rich in either saturated fat or n-6 polyunsaturated fatty acids and supplemented with long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on plasma lipoprotein profiles. *Eur J Clin Nutr* 2017;71:1297–1302.
- DiRusso CC, Li H, Darwis D, Watkins PA, Berger J, Black PN. Comparative biochemical studies of the murine fatty acid transport proteins (FATP) expressed in yeast. *J Biol Chem* 2005;280:16829–16837.
- Dobrzyn A, Ntambi JM. The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;73:35–41.
- Dobrzyn P, Pyrkowska A, Jazurek M, Szymanski K, Langfort J, Dobrzyn A. Endurance training-induced accumulation of muscle triglycerides is coupled to upregulation of stearoyl-CoA desaturase 1. *J Appl Physiol* 2010;109:1653–1661.
- Dowhan W. CDP-diacylglycerol synthase of microorganisms. *Biochim Biophys Acta* 1997;1348:157–165.
- Durieux AC, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Padeloup M, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A, Freyssenet D. Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* 2007;148:3140–3147.
- Dyck DJ, Peters SJ, Glatz J, Gorski J, Keizer H, Kiens B, Liu S, Richter EA, Spriet LL, van der Vusse GJ, Bonen A. Functional differences in lipid metabolism in resting skeletal muscle of various fiber types. *Am J Physiol* 1997;272:E340–351.
- Egan B, O'Connor PL, Zierath JR, O'Gorman DJ. Time course analysis reveals gene-specific transcript and protein kinetics of adaptation to short-term aerobic exercise training in human skeletal muscle. *PLoS ONE* 2013;8:e74098.
- Ehrenborg E, Krook A. Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Rev* 2009;61:373–393.
- Elkina Y, von Haehling S, Anker SD, Springer J. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2011;2:143–151.
- Faber C, Zhu ZJ, Castellino S, Wagner DS, Brown RH, Peterson RA, Gates L, Barton J, Bickett M, Hagerty L, Kimbrough C, Sola M, Bailey D, Jordan H, Elangbam CS. Cardiolipin profiles as a potential biomarker of mitochondrial health in diet-induced obese mice subjected to exercise, diet-restriction and ephedrine treatment. *J Appl Toxicol* 2014;34:1122–1129.
- Fajardo VA, Mikhaeil JS, Leveille CF, Saint C, LeBlanc PJ. Cardiolipin content, linoleic acid composition, and tafazzin expression in response to skeletal muscle overload and unload stimuli. *Sci Rep* 2017;7:2060.
- Fajardo VA, McMeekin L, Saint C, LeBlanc PJ. Cardiolipin linoleic acid content and mitochondrial cytochrome c oxidase activity are associated in rat skeletal muscle. *Chem Phys Lipids* 2015;187:50–55.
- Farese RV, Walther TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 2009;139:855–860.
- Ferraro E, Giammarioli AM, Chiandotto S, Spoletini I, Rosano G. Exercise-Induced Skeletal Muscle Remodeling and Metabolic Adaptation: Redox Signaling and Role of Autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:154–176.
- Ferreira R, Vitorino R, Neuparth MJ, Appell HJ, Duarte JA, Amado F. Proteolysis activation and proteome alterations in murine skeletal muscle submitted to 1 week of hindlimb suspension. *Eur J Appl Physiol* 2009;107:553–563.
- Fobker M, Voss R, Reinecke H, Crone C, Assmann G, Walter M. Accumulation of cardiolipin and lysocardiolipin in fibroblasts from Tangier disease subjects. *FEBS Lett* 2001;500:157–162.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.

- Forbes D, Jackman M, Bishop A, Thomas M, Kambadur R, Sharma M. Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2006;206:264–272.
- Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, Thorens B, Vaulont S, Viollet B. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* 2005;54:1331–1339.
- Fournier B, Murray B, Gutzwiller S, Marcaletti S, Marcellin D, Bergling S, Brachat S, Persohn E, Pierrel E, Bombard F, Hatakeyama S, Trendelenburg AU, Morvan F, Richardson B, Glass DJ, Lach-Trifilieff E, Feige JN. Blockade of the activin receptor IIb activates functional brown adipogenesis and thermogenesis by inducing mitochondrial oxidative metabolism. *Mol Cell Biol* 2012;32:2871–2879.
- Franch HA, Price SR. Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8:271–275.
- Frayn KN, Arner P, Yki-Järvinen H. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays Biochem* 2006;42:89–103.
- Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature* 2014;505:335–343.
- Fry M, Green DE. Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* 1981;256:1874–1880.
- Funai K, Lodhi IJ, Spears LD, Yin L, Song H, Klein S, Semenkovich CF. Skeletal Muscle Phospholipid Metabolism Regulates Insulin Sensitivity and Contractile Function. *Diabetes* 2016;65:358–370.
- Funai K, Semenkovich CF. Skeletal muscle lipid flux: running water carries no poison. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301:E245-251.
- Gebert N, Joshi AS, Kutik S, Becker T, McKenzie M, Guan XL, Mooga VP, Stroud DA, Kulkarni G, Wenk MR, Rehling P, Meisinger C, Ryan MT, Wiedemann N, Greenberg ML, Pfanner N. Mitochondrial cardiolipin involved in outer-membrane protein biogenesis: implications for Barth syndrome. *Curr Biol* 2009;19:2133–2139.
- Geng T, Li P, Yin X, Yan Z. PGC-1 α promotes nitric oxide antioxidant defenses and inhibits FOXO signaling against cardiac cachexia in mice. *Am J Pathol* 2011;178:1738–1748.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109 Suppl:S81-96.
- Giannesini B, Vilmen C, Anthor H, Bernard M, Bendahan D. Lack of myostatin impairs mechanical performance and ATP cost of contraction in exercising mouse gastrocnemius muscle in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E33-40.
- Gilde AJ, Van Bilsen M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2003;178:425–434.
- Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, Ketelslegers JM, Thissen JP. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 2007;148:452–460.
- Giresi PG, Stevenson EJ, Theilhaber J, Koncarevic A, Parkington J, Fielding RA, Kandarian SC. Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol Genomics* 2005;21:253–263.
- Girgenrath S, Song K, Whittemore LA. Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2005;31:34–40.
- Glenmark B. Skeletal muscle fibre types, physical performance, physical activity and attitude to physical activity in women and men. A follow-up from age 16 to 27. *Acta Physiol Scand Suppl* 1994;623:1–47.
- Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S, Bhasin S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14938–14943.
- Gonzalvez F, Gottlieb E. Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. *Apoptosis* 2007;12:877–885.
- Goodman CA. The role of mTORC1 in regulating protein synthesis and skeletal muscle mass in response to various mechanical stimuli. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2014;166:43–95.
- Goodman CA, McNally RM, Hoffmann FM, Hornberger TA. Smad3 induces atrogen-1, inhibits mTOR and protein synthesis, and promotes muscle atrophy in vivo. *Mol Endocrinol* 2013;27:1946–1957.

- Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5755–5761.
- Górski J, Zendzian-Piotrowska M, de Jong YF, Niklińska W, Glatz JF. Effect of endurance training on the phospholipid content of skeletal muscles in the rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1999;79:421–425.
- Górski J, Dobrzyn A, Zendzian-Piotrowska M. The sphingomyelin-signaling pathway in skeletal muscles and its role in regulation of glucose uptake. *Ann N Y Acad Sci* 2002;967:236–248.
- Goto-Inoue N, Yamada K, Inagaki A, Furuichi Y, Ogino S, Manabe Y, Setou M, Fujii NL. Lipidomics analysis revealed the phospholipid compositional changes in muscle by chronic exercise and high-fat diet. *Sci Rep* 2013;3:3267.
- Gotto AM, Moon JE. Management of cardiovascular risk: the importance of meeting lipid targets. *Am J Cardiol* 2012;110:3A–14A.
- Gray SL, Dalla Nora E, Vidal-Puig AJ. Mouse models of PPAR-gamma deficiency: dissecting PPAR-gamma's role in metabolic homeostasis. *Biochem Soc Trans* 2005;33:1053–1058.
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Ménissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 1997;17:71–74.
- Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, Ménissier F, Zanotti M, Dunner S, Georges M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome* 1998;9:210–213.
- Grobet L, Pirottin D, Farnir F, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Christians E, Desmecht D, Coignoul F, Kahn R, Georges M. Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis* 2003;35:227–238.
- Guillou H, Zdravcevic D, Martin PGP, Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 2010;49:186–199.
- Gunning P, Hardeman E. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *FASEB J* 1991;5:3064–3070.
- Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, McPherron AC. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS ONE* 2009;4:e4937.
- Guo Z. Muscle fat utilization during exercise: controversial only methodologically. *J Appl Physiol* 2004;96:1569; author reply 1569-1570.
- Haddad F, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR, Baldwin KM. Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. *J Appl Physiol* 2003;95:791–802.
- Han X, Yang J, Cheng H, Yang K, Abendschein DR, Gross RW. Shotgun lipidomics identifies cardiolipin depletion in diabetic myocardium linking altered substrate utilization with mitochondrial dysfunction. *Biochemistry* 2005;44:16684–16694.
- Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 1997;246:259–273.
- Harriman DG, Reed R. The incidence of lipid droplets in human skeletal muscle in neuromuscular disorders: a histochemical, electron-microscopic and freeze-etch study. *J Pathol* 1972;106:1–24.
- Hatakeyama S, Summermatter S, Jourdain M, Melly S, Minetti GC, Lach-Trifilieff E. ActRII blockade protects mice from cancer cachexia and prolongs survival in the presence of anti-cancer treatments. *Skelet Muscle* 2016;6:26.
- Hatch GM. Cardiolipin biosynthesis in the isolated heart. *Biochem J* 1994;297 (Pt 1):201–208.
- Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004;18:1926–1945.
- Heden TD, Neuffer PD, Funai K. Looking Beyond Structure: Membrane Phospholipids of Skeletal Muscle Mitochondria. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27:553–562.
- Helge JW, Ayre KJ, Hulbert AJ, Kiens B, Storlien LH. Regular exercise modulates muscle membrane phospholipid profile in rats. *J Nutr* 1999;129:1636–1642.
- Helge JW, Kiens B. Muscle enzyme activity in humans: role of substrate availability and training. *Am J Physiol* 1997;272:R1620-1624.
- Helge JW, Watt PW, Richter EA, Rennie MJ, Kiens B. Fat utilization during exercise: adaptation to a

- fat-rich diet increases utilization of plasma fatty acids and very low density lipoprotein-triacylglycerol in humans. *J Physiol (Lond)* 2001a;537:1009–1020.
- Helge JW, Wu BJ, Willer M, Dugaard JR, Storlien LH, Kiens B. Training affects muscle phospholipid fatty acid composition in humans. *J Appl Physiol* 2001b;90:670–677.
- Hennebry A, Berry C, Siriatt V, O’Callaghan P, Chau L, Watson T, Sharma M, Kambadur R. Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2009;296:C525–534.
- Henriksson J. Training induced adaptation of skeletal muscle and metabolism during submaximal exercise. *J Physiol (Lond)* 1977;270:661–675.
- Henriksson J, Reitman JS. Time course of changes in human skeletal muscle succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities and maximal oxygen uptake with physical activity and inactivity. *Acta Physiol Scand* 1977;99:91–97.
- Hermansen L, Wachtlova M. Capillary density of skeletal muscle in well-trained and untrained men. *Acta Physiol Scand* 1970;79:16A.
- Pette & Spamer, 1986 Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, Qiu Y. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* 2002;277:40735–40741.
- Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, Wolfman NM. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol* 2003;17:1144–1154.
- Hoch FL. Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim Biophys Acta* 1992;1113:71–133.
- Holloszy JO. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1967;242:2278–2282.
- Holloway GP, Bonen A, Spriet LL. Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals. *Am J Clin Nutr* 2009;89:455S–62S.
- Holman RT. George O. Burr and the discovery of essential fatty acids. *J Nutr* 1988;118:535–540.
- Holthuis JCM, Menon AK. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 2014;510:48–57.
- Holzer RG, Park EJ, Li N, Tran H, Chen M, Choi C, Solinas G, Karin M. Saturated fatty acids induce c-Src clustering within membrane subdomains, leading to JNK activation. *Cell* 2011;147:173–184.
- Hommelberg PPH, Plat J, Langen RCJ, Schols AMWJ, Mensink RP. Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E114–120.
- Houten SM, Wanders RJA. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inher Metab Dis* 2010;33:469–477.
- Howald H, Hoppeler H. Performing at extreme altitude: muscle cellular and subcellular adaptations. *Eur J Appl Physiol* 2003;90:360–364.
- Hulmi JJ, Oliveira BM, Silvennoinen M, Hoogaars WMH, Pasternack A, Kainulainen H, Ritvos O. Exercise restores decreased physical activity levels and increases markers of autophagy and oxidative capacity in myostatin/activin-blocked mdx mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E171–182.
- Ikeda K., Shiba S., Horie-Inoue K., Shimokata K., and Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat. Commun* (2013). 4, 2147.
- Ikon N, Hsu FF, Shearer J, Forte TM, Ryan RO. Evaluation of cardiolipin nanodisks as lipidreplacement therapy for Barth syndrome. *J Biomed Res.* 2017 Nov 1.
- Izumiya Y, Hopkins T, Morris C, Sato K, Zeng L, Viereck J, Hamilton JA, Ouchi N, LeBrasseur NK, Walsh K. Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab* 2008;7:159–172.
- Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2004;287:C834–843.
- Jacobs RA, Lundby C. Mitochondria express enhanced quality as well as quantity in association with aerobic fitness across recreationally active individuals up to elite athletes. *J Appl Physiol* 2013;114:344–350.

- Jacobs RA, Flück D, Bonne TC, Bürgi S, Christensen PM, Toigo M, Lundby C. Improvements in exercise performance with high-intensity interval training coincide with an increase in skeletal muscle mitochondrial content and function. *J Appl Physiol* 2013;115:785–793.
- Jeppesen J, Kiens B. Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise. *J Physiol (Lond)* 2012;590:1059–1068.
- Jicha GA, Markesbery WR. Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2010;5:45–61.
- Jogl G, Tong L. Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport. *Cell* 2003;112:113–122.
- Jordy AB, Kiens B. Regulation of exercise-induced lipid metabolism in skeletal muscle. *Exp Physiol* 2014;99:1586–1592.
- Jouliia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B, Cabello G. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res* 2003;286:263–275.
- Jouliia-Ekaza D, Dominique JE, Cabello G, Gérard C. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res* 2006;312:2401–2414.
- Julienne CM, Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Berri C, Collin A, Tesseraud S, Couet C, Servais S. Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2012;3:265–275.
- Julienne CM, Tardieu M, Chevalier S, Pinault M, Bougnoux P, Labarthe F, Couet C, Servais S, Dumas JF. Cardiolipin content is involved in liver mitochondrial energy wasting associated with cancer-induced cachexia without the involvement of adenine nucleotide translocase. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:726–733.
- Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:155–164.
- Kagan VE, Jiang J, Huang Z, Tyurina YY, Desbourdes C, Cottet-Rousselle C, Dar HH, Verma M, Tyurin VA, Kapralov AA, Cheikhi A, Mao G, Stolz D, St Croix CM, Watkins S, Shen Z, Li Y, Greenberg ML, Tokarska-Schlattner M, Boissan M, Lacombe ML, Epand RM, Chu CT, Mallampalli RK, Bayir H, Schlattner U. NDPK-D (NM23-H4)-mediated externalization of cardiolipin enables elimination of depolarized mitochondria by mitophagy. *Cell Death Differ* 2016;23:1140–1151.
- Kagan VE, Chu CT, Tyurina YY, Cheikhi A, Bayir H. Cardiolipin asymmetry, oxidation and signaling. *Chem Phys Lipids* 2014;179:64–69.
- Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 1997;7:910–916.
- Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, Ezaki O. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem* 2004;279:41114–41123.
- Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 2006;33:155–165.
- Kang C, Li Ji L. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1271:110–117.
- Kang Y, Fielden LF, Stojanovski D. Mitochondrial protein transport in health and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2017;
- Karim L, Coppieters W, Grobet L, Valentini A, Georges M. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Anim Genet* 2000;31:396–399.
- Kennedy EP. The synthesis of cytidine diphosphate choline, cytidine diphosphate ethanolamine, and related compounds. *J Biol Chem* 1956;222:185–191.
- Kiebish MA, Han X, Cheng H, Chuang JH, Seyfried TN. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J Lipid Res* 2008;49:2545–2556.

- Kiens B. Effect of endurance training on fatty acid metabolism: local adaptations. *Med Sci Sports Exerc* 1997;29:640–645.
- Kiens B, Essen-Gustavsson B, Gad P, Lithell H. Lipoprotein lipase activity and intramuscular triglyceride stores after long-term high-fat and high-carbohydrate diets in physically trained men. *Clin Physiol* 1987;7:1–9.
- Kiens B. Skeletal Muscle Lipid Metabolism in Exercise and Insulin Resistance. *Physiological Reviews* 2006;86:205–243.
- Kim YJ, Guzman-Hernandez ML, Balla T. A highly dynamic ER-derived phosphatidylinositol-synthesizing organelle supplies phosphoinositides to cellular membranes. *Dev Cell* 2011;21:813–824.
- Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K, Noji S. Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Ther* 2008;15:1126–1130.
- Kleiner S, Nguyen-Tran V, Baré O, Huang X, Spiegelman B, Wu Z. PPAR δ agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1 α but does not increase mitochondrial gene expression and function. *J Biol Chem* 2009;284:18624–18633.
- Kliwer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:239–263.
- Klingenberg M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:1978–2021.
- Koechlin C, Couillard A, Simar D, Cristol JP, Bellet H, Hayot M, Prefaut C. Does oxidative stress alter quadriceps endurance in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1022–1027.
- Koh JH, Hancock CR, Terada S, Higashida K, Holloszy JO, Han DH. PPAR β Is Essential for Maintaining Normal Levels of PGC-1 α and Mitochondria and for the Increase in Muscle Mitochondria Induced by Exercise. *Cell Metab*. 2017 May 2;25(5):1176–1185.e5.
- Komi PV, Viitasalo JH, Havu M, Thorstensson A, Sjödin B, Karlsson J. Skeletal muscle fibres and muscle enzyme activities in monozygous and dizygous twins of both sexes. *Acta Physiol Scand* 1977;100:385–392.
- Krämer DK, Ahlsén M, Norrbom J, Jansson E, Hjeltnes N, Gustafsson T, Krook A. Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPAR alpha, PPAR delta and PGC-1 alpha mRNA. *Acta Physiol (Oxf)* 2006;188:207–216.
- Kriketos AD, Pan DA, Sutton JR, Hoh JF, Baur LA, Cooney GJ, Jenkins AB, Storlien LH. Relationships between muscle membrane lipids, fiber type, and enzyme activities in sedentary and exercised rats. *Am J Physiol* 1995;269:R1154–R1162.
- Krüger K, Gessner DK, Seimetz M, Banisch J, Ringseis R, Eder K, Weissmann N, Mooren FC. Functional and muscular adaptations in an experimental model for isometric strength training in mice. *PLoS ONE* 2013;8:e79069.
- Lai KMV, Gonzalez M, Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, Stitt TN, Economides AN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol* 2004;24:9295–9304.
- Lai L, Wang M, Martin OJ, Leone TC, Vega RB, Han X, Kelly DP. A role for peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 (PGC-1) in the regulation of cardiac mitochondrial phospholipid biosynthesis. *J Biol Chem* 2014;289:2250–2259.
- Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 2002;277:49831–49840.
- Lawlor MW, Read BP, Edelstein R, Yang N, Pierson CR, Stein MJ, Wermer-Colan A, Buj-Bello A, Lachey JL, Seehra JS, Beggs AH. Inhibition of activin receptor type IIB increases strength and lifespan in myotubularin-deficient mice. *Am J Pathol* 2011;178:784–793.
- Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res* 2013;52:165–174.
- Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1807–1819.
- Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene

- expression. *FASEB J* 2004;18:39–51.
- Lee CY, Hu SY, Gong HY, Chen MHC, Lu JK, Wu JL. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;387:766–771.
- Lee DE, Brown JL, Rosa-Caldwell ME, Blackwell TA, Perry RA, Brown LA, Khatri B, Seo D, Bottje WG, Washington TA, Wiggs MP, Kong BW, Greene NP. Cancer cachexia-induced muscle atrophy: evidence for alterations in microRNAs important for muscle size. *Physiol Genomics* 2017;49:253–260.
- Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9306–9311.
- Lee SJ. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS ONE* 2007;2:e789.
- Lee SJ, Huynh TV, Lee YS, Sebald SM, Wilcox-Adelman SA, Iwamori N, Lepper C, Matzuk MM, Fan CM. Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:E2353-2360.
- Lee WJ, Kim M, Park HS, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, Koh EH, Won JC, Kim MS, Oh GT, Yoon M, Lee KU, Park JY. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:291–295.
- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, Kelly DP. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 2005;3:e101.
- Lepage G, Roy CC. Specific methylation of plasma nonesterified fatty acids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1988;29:227–235.
- Li J, Liu X, Wang H, Zhang W, Chan DC, Shi Y. Lysocardiolipin acyltransferase 1 (ALCAT1) controls mitochondrial DNA fidelity and biogenesis through modulation of MFN2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:6975–6980.
- Liang MT, Meneses P, Glonek T, Kopp SJ, Paulson DJ, Schwartz FN, Gierke LW. Effects of exercise training and anabolic steroids on plantaris and soleus phospholipids: a 31P nuclear magnetic resonance study. *Int J Biochem* 1993;25:337–347.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 2002;418:797–801.
- Lipina C, Kendall H, McPherron AC, Taylor PM, Hundal HS. Mechanisms involved in the enhancement of mammalian target of rapamycin signalling and hypertrophy in skeletal muscle of myostatin-deficient mice. *FEBS Lett* 2010;584:2403–2408.
- Liu M, Hammers DW, Barton ER, Sweeney HL. Activin Receptor Type IIB Inhibition Improves Muscle Phenotype and Function in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *PLoS ONE* 2016;11:e0166803.
- Liu TJ, Lai HC, Ting CT, Wang PH. Bidirectional regulation of upstream IGF-I/insulin receptor signaling and downstream FOXO1 in cardiomyocytes. *J Endocrinol* 2007;192:149–158.
- Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. Fatty acid transport proteins facilitate fatty acid uptake in skeletal muscle. *Can J Appl Physiol* 2000;25:333–352.
- Luiken JJ, Schaap FG, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF. Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids* 1999;34 Suppl:S169-175.
- Luiken JJFP, Coort SLM, Willems J, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JFC. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* 2003;52:1627–1634.
- Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, Grimaldi PA. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J* 2003;17:2299–2301.
- Lumini JA, Magalhães J, Oliveira PJ, Ascensão A. Beneficial effects of exercise on muscle mitochondrial function in diabetes mellitus. *Sports Med.* 2008;38(9):735-50.
- Lv Q, Yuan L, Deng J, Chen M, Wang Y, Zeng J, Li Z, Lai L. Efficient Generation of Myostatin Gene

- Mutated Rabbit by CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 2016;6:25029.
- Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J, Salehian B. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E363-371.
- Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:307–318.
- MacPherson L, Tokatlidis K. Protein trafficking in the mitochondrial intermembrane space: mechanisms and links to human disease. *Biochem J* 2017;474:2533–2545.
- Maguire JJ, Tyurina YY, Mohammadyani D, Kapralov AA, Anthonymuthu TS, Qu F, Amoscato AA, Sparvero LJ, Tyurin VA, Planas-Iglesias J, He RR, Klein-Seetharaman J, Bayr H, Kagan VE. Known unknowns of cardiolipin signaling: The best is yet to come. *Biochim Biophys Acta* 2017;1862:8–24.
- Malhotra A, Kahlon P, Donoho T, Doyle IC1. Pharmacogenomic considerations in the treatment of the pediatric cardiomyopathy called Barth syndrome. *Recent Pat Biotechnol.* 2014;8(2):136-43.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 2007;6:458–471.
- Mammucari C, Schiaffino S, Sandri M. Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* 2008;4:524–526.
- Manickam R, Wahli W. Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ in skeletal muscle physiology. *Biochimie* 2017;136:42–48.
- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261–1274.
- Marcotte GR, West DWD, Baar K. The molecular basis for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *Calcif Tissue Int* 2015;96:196–210.
- Mårtensson CU, Doan KN, Becker T. Effects of lipids on mitochondrial functions. *Biochim Biophys Acta* 2017;1862:102–113.
- Marzetti E., Calvani R., Cesari M., Buford T.W., Lorenzi M., Behnke B.J., and Leeuwenburgh C.. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int. J. Biochem. Cell Biol* (2013). 45, 2288–2301.
- Masella R, Giovannini C, Vari R, Di Benedetto R, Coni E, Volpe R, Fraone N, Bucci A. Effects of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. *Lipids* 2001;36:1195–1202.
- Massey JB. Interaction of ceramides with phosphatidylcholine, sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers. *Biochim Biophys Acta* 2001;1510:167–184.
- Matsakas A, Macharia R, Otto A, Elashry MI, Mouisel E, Romanello V, Sartori R, Amthor H, Sandri M, Narkar V, Patel K. Exercise training attenuates the hypermuscular phenotype and restores skeletal muscle function in the myostatin null mouse. *Exp Physiol* 2012;97:125–140.
- Matsakas A, Mouisel E, Amthor H, Patel K. Myostatin knockout mice increase oxidative muscle phenotype as an adaptive response to exercise. *J Muscle Res Cell Motil* 2010;31:111–125.
- Matzuk MM, Lu N, Vogel H, Sellheyer K, Roop DR, Bradley A. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* 1995;374:360–363.
- McClung JM, Judge AR, Powers SK, Yan Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2010;298:C542-549.
- McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 2003;162:1135–1147.
- McFarlane C, Hennebry A, Thomas M, Plummer E, Ling N, Sharma M, Kambadur R. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Exp Cell Res* 2008;314:317–329.
- McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* 1983;214:21–28.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997a;387:83–90.
- McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997b;94:12457–12461.
- McPherron AC, Lee SJ. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest*

- 2002;109:595–601.
- Mejia EM, Hatch GM. Erratum to: Mitochondrial phospholipids: role in mitochondrial function. *J Bioenerg Biomembr* 2015;47:279–280.
- Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP, Alfano LN, Berry K, Meadows E, Lewis S, Braun L, Shontz K, Rouhana M, Clark KR, Rosales XQ, Al-Zaidy S, Govoni A, Rodino-Klapac LR, Hogan MJ, Kaspar BK. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther* 2015;23:192–201.
- Mendias CL, Lynch EB, Gumucio JP, Flood MD, Rittman DS, Van Pelt DW, Roche SM, Davis CS. Changes in skeletal muscle and tendon structure and function following genetic inactivation of myostatin in rats. *J Physiol (Lond)* 2015;593:2037–2052.
- Mendias CL, Marcin JE, Calderon DR, Faulkner JA. Contractile properties of EDL and soleus muscles of myostatin-deficient mice. *J Appl Physiol* 2006;101:898–905.
- Menshikova EV, Ritov VB, Fairfull L, Ferrell RE, Kelley DE, Goodpaster BH. Effects of exercise on mitochondrial content and function in aging human skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006;61:534–540.
- Menshikova EV, Ritov VB, Ferrell RE, Azuma K, Goodpaster BH, Kelley DE. Characteristics of skeletal muscle mitochondrial biogenesis induced by moderate-intensity exercise and weight loss in obesity. *J Appl Physiol* 2007;103:21–27.
- Michel V, Singh RK, Bakovic M. The impact of choline availability on muscle lipid metabolism. *Food Funct* 2011;2:53–62.
- Migheli A, Mongini T, Doriguzzi C, Chiadò-Piat L, Piva R, Ugo I, Palmucci L. Muscle apoptosis in humans occurs in normal and denervated muscle, but not in myotonic dystrophy, dystrophinopathies or inflammatory disease. *Neurogenetics* 1997;1:81–87.
- Mitchell TW, Turner N, Hulbert AJ, Else PL, Hawley JA, Lee JS, Bruce CR, Blanksby SJ. Exercise alters the profile of phospholipid molecular species in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2004;97:1823–1829.
- Miura T, Kishioka Y, Wakamatsu J ichi, Hattori A, Henneby A, Berry CJ, Sharma M, Kambadur R, Nishimura T. Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:675–680.
- Monestier O, Brun C, Heu K, Passet B, Malhouroux M, Magnol L, Vilotte JL, Blanquet V. Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype. *BMC Genomics* 2012;13:541.
- Morine KJ, Bish LT, Selsby JT, Gazzara JA, Pendrak K, Sleeper MM, Barton ER, Lee SJ, Sweeney HL. Activin IIB receptor blockade attenuates dystrophic pathology in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2010;42:722–730.
- Morissette MR, Cook SA, Buranasombati C, Rosenberg MA, Rosenzweig A. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2009;297:C1124–1132.
- Morrison BM, Lachey JL, Warsing LC, Ting BL, Pullen AE, Underwood KW, Kumar R, Sako D, Grinberg A, Wong V, Colantuoni E, Seehra JS, Wagner KR. A soluble activin type IIB receptor improves function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2009;217:258–268.
- Mortensen OH, Frandsen L, Schjerling P, Nishimura E, Grunnet N. PGC-1alpha and PGC-1beta have both similar and distinct effects on myofiber switching toward an oxidative phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E807–816.
- Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet* 2007;3:e79.
- Mouisel E, Relizani K, Mille-Hamard L, Denis R, Hourdé C, Agbulut O, Patel K, Arandel L, Morales-Gonzalez S, Vignaud A, Garcia L, Ferry A, Luquet S, Billat V, Ventura-Clapier R, Schuelke M, Amthor H. Myostatin is a key mediator between energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014;307:R444–454.
- Mourkioti F, Kratsios P, Luedde T, Song YH, Delafontaine P, Adami R, Parente V, Bottinelli R, Pasparakis M, Rosenthal N. Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *J Clin Invest* 2006;116:2945–2954.
- Moyes CD, Hood DA. Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle. *Annu*

- Rev Physiol 2003;65:177–201.
- Mulligan CM, Sparagna GC, Le CH, De Mooy AB, Routh MA, Holmes MG, Hickson-Bick DL, Zarini S, Murphy RC, Xu FY, Hatch GM, McCune SA, Moore RL, Chicco AJ. Dietary linoleate preserves cardiolipin and attenuates mitochondrial dysfunction in the failing rat heart. *Cardiovasc Res* 2012;94:460–468.
- Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 2002;30:1059–1064.
- Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL, Kraus WE. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem* 2002;277:26089–26097.
- Murphy KT, Chee A, Gleeson BG, Naim T, Swiderski K, Koopman R, Lynch GS. Antibody-directed myostatin inhibition enhances muscle mass and function in tumor-bearing mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;301:R716-726.
- Murphy KT, Koopman R, Naim T, Léger B, Trieu J, Ibebunjo C, Lynch GS. Antibody-directed myostatin inhibition in 21-mo-old mice reveals novel roles for myostatin signaling in skeletal muscle structure and function. *FASEB J* 2010;24:4433–4442.
- Mutter T, Dolinsky VW, Ma BJ, Taylor WA, Hatch GM. Thyroxine regulation of monolysocardiolipin acyltransferase activity in rat heart. *Biochem J* 2000;346 Pt 2:403–406.
- Narkar VA, Downes M, Yu RT, Emblar E, Wang YX, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, Evans RM. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* 2008;134:405–415.
- Nicholas G, Thomas M, Langley B, Somers W, Patel K, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R. Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *J Cell Physiol* 2002;193:120–131.
- Nickerson JG, Alkhateeb H, Benton CR, Lally J, Nickerson J, Han XX, Wilson MH, Jain SS, Snook LA, Glatz JFC, Chabowski A, Luiken JJFP, Bonen A. Greater transport efficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36 and FATP4 compared with FABPpm and FATP1 and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 2009;284:16522–16530.
- Noland RC. Exercise and Regulation of Lipid Metabolism. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2015;135:39–74.
- Nordby P, Saltin B, Helge JW. Whole-body fat oxidation determined by graded exercise and indirect calorimetry: a role for muscle oxidative capacity? *Scand J Med Sci Sports* 2006;16:209–214.
- Nowicki M, Müller F, Frentzen M. Cardiolipin synthase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 2005;579:2161–2165.
- Ntambi JM, Miyazaki M, Dobrzyn A. Regulation of stearyl-CoA desaturase expression. *Lipids* 2004;39:1061–1065.
- Nystrom GJ, Lang CH. Sepsis and AMPK Activation by AICAR Differentially Regulate FoxO-1, -3 and -4 mRNA in Striated Muscle. *Int J Clin Exp Med* 2008;1:50–63.
- O’Leary MFN, Hood DA. Denervation-induced oxidative stress and autophagy signaling in muscle. *Autophagy* 2009;5:230–231.
- O’Neill BT, Lauritzen HPMM, Hirshman MF, Smyth G, Goodyear LJ, Kahn CR. Differential Role of Insulin/IGF-1 Receptor Signaling in Muscle Growth and Glucose Homeostasis. *Cell Rep* 2015;11:1220–1235.
- Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, Sonenberg N, Kelly PA, Sotiropoulos A, Pende M. Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol* 2005;7:286–294.
- Omairi S, Matsakas A, Degens H, Kretz O, Hansson KA, Solbrå AV, Bruusgaard JC, Joch B, Sartori R, Giallourou N, Mitchell R, Collins-Hooper H, Foster K, Pasternack A, Ritvos O, Sandri M, Narkar V, Swann JR, Huber TB, Patel K. Enhanced exercise and regenerative capacity in a mouse model that violates size constraints of oxidative muscle fibres. *Elife* 2016;5:.
- Ostojic O, O’Leary MFN, Singh K, Menzies KJ, Vainshtein A, Hood DA. The effects of chronic muscle use and disuse on cardiolipin metabolism. *J Appl Physiol* 2013;114:444–452.
- Pangborn MC. A simplified preparation of cardiolipin, with note on purification of lecithin for serologic use. *J Biol Chem* 1945;161:71–82.

- Paradies G, Ruggiero FM. Age-related changes in the activity of the pyruvate carrier and in the lipid composition in rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1990;1016:207–212.
- Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E. Age-dependent decline in the cytochrome c oxidase activity in rat heart mitochondria: role of cardiolipin. *FEBS Lett* 1997;406:136–138.
- Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:14205–14218.
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM. Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochem Int* 2011;58:447–457.
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 2002;286:135–141.
- Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3894–3898.
- Pauly M, Chabi B, Favier FB, Vanterpool F, Matecki S, Fouret G, Bonafos B, Vernus B, Feillet-Coudray C, Coudray C, Bonnieu A, Ramonatxo C. Combined Strategies for Maintaining Skeletal Muscle Mass and Function in Aging: Myostatin Inactivation and AICAR-Associated Oxidative Metabolism Induction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2015;70:1077–1087.
- Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trézéguet V, Lauquin GJM, Brandolin G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 2003;426:39–44.
- Pender C, Trentadue AR, Pories WJ, Dohm GL, Houmard JA, Youngren JF. Expression of genes regulating malonyl-CoA in human skeletal muscle. *J Cell Biochem* 2006;99:860–867.
- Peterson RT, Desai BN, Hardwick JS, Schreiber SL. Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4438–4442.
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Lett* 2001;509:435–438.
- Pette D. Metabolic heterogeneity of muscle fibres. *J Exp Biol* 1985;115:179–189.
- Pette D. Fiber transformation and fiber replacement in chronically stimulated muscle. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:S299–305.
- Pette D, Spamer C. Metabolic properties of muscle fibers. *Fed Proc* 1986;45:2910–2914.
- Philip B, Lu Z, Gao Y. Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cell Signal* 2005;17:365–375.
- Phillips SM, Green HJ, Tarnopolsky MA, Heigenhauser GF, Hill RE, Grant SM. Effects of training duration on substrate turnover and oxidation during exercise. *J Appl Physiol* 1996;81:2182–2191.
- Philp LK, Heilbronn LK, Janovska A, Wittert GA. Dietary enrichment with fish oil prevents high fat-induced metabolic dysfunction in skeletal muscle in mice. *PLoS ONE* 2015;10:e0117494.
- Phoon CKL, Acehan D, Schlame M, Stokes DL, Edelman-Novemsky I, Yu D, Xu Y, Viswanathan N, Ren M. Tafazzin knockdown in mice leads to a developmental cardiomyopathy with early diastolic dysfunction preceding myocardial noncompaction. *J Am Heart Assoc* 2012;1:.
- Picard M, Taivassalo T, Gouspillou G, Hepple RT. Mitochondria: isolation, structure and function. *J Physiol (Lond)* 2011;589:4413–4421.
- Piegari M, Soria EA, Eynard AR, Valentich MA. Delay of Lung Adenocarcinoma (LAC-1) Development in Mice by Dietary Oleic Acid. *Nutr Cancer* 2017;69:1069–1074.
- Pillon NJ, Arane K, Bilan PJ, Chiu TT, Klip A. Muscle cells challenged with saturated fatty acids mount an autonomous inflammatory response that activates macrophages. *Cell Commun Signal* 2012;10:30.
- Plant PJ, Bain JR, Correa JE, Woo M, Batt J. Absence of caspase-3 protects against denervation-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* 2009;107:224–234.
- Ploquin C, Chabi B, Fouret G, Vernus B, Feillet-Coudray C, Coudray C, Bonnieu A, Ramonatxo C. Lack of myostatin alters intermyofibrillar mitochondria activity, unbalances redox status, and impairs tolerance to chronic repetitive contractions in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E1000–1008.

- Pokrywka A, Cholbinski P, Kaliszewski P, Kowalczyk K, Konczak D, Zembron-Lacny A. Metabolic modulators of the exercise response: doping control analysis of an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor δ (GW501516) and 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR). *J Physiol Pharmacol* 2014;65:469–476.
- Pope S, Land JM, Heales SJR. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target? *Biochim Biophys Acta* 2008;1777:794–799.
- Post JA, Bijvelt JJ, Verkleij AJ. Phosphatidylethanolamine and sarcolemmal damage during ischemia or metabolic inhibition of heart myocytes. *Am J Physiol* 1995;268:H773-780.
- Pruchnic R, Katsiaras A, He J, Kelley DE, Winters C, Goodpaster BH. Exercise training increases intramyocellular lipid and oxidative capacity in older adults. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E857-862.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature* 2003;423:550–555.
- Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 2003;24:78–90.
- Puolakkainen T, Rummukainen P, Lehto J, Ritvos O, Hiltunen A, Säämänen AM, Kiviranta R. Soluble activin type IIB receptor improves fracture healing in a closed tibial fracture mouse model. *PLoS ONE* 2017;12:e0180593.
- Qian L, Tang M, Yang J, Wang Q, Cai C, Jiang S, Li H, Jiang K, Gao P, Ma D, Chen Y, An X, Li K, Cui W. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscled phenotype in Meishan pigs. *Sci Rep* 2015;5:14435.
- Qin X, Xie X, Fan Y, Tian J, Guan Y, Wang X, Zhu Y, Wang N. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 2008;48:432–441.
- Qiu J, Wenz LS, Zerbos RM, Oeljeklaus S, Bohnert M, Stroud DA, Wirth C, Ellenrieder L, Thornton N, Kutik S, Wiese S, Schulze-Specking A, Zufall N, Chacinska A, Guiard B, Hunte C, Warscheid B, van der Laan M, Pfanner N, Wiedemann N, Becker T. Coupling of mitochondrial import and export translocases by receptor-mediated supercomplex formation. *Cell* 2013;154:596–608.
- Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Battino M, Mataix J. Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed with virgin olive oil or sunflower oil. *Br J Nutr* 1999;81:21–24.
- Raff M, Tholstrup T, Sejrnsen K, Straarup EM, Wiinberg N. Diets rich in conjugated linoleic acid and vaccenic acid have no effect on blood pressure and isobaric arterial elasticity in healthy young men. *J Nutr* 2006;136:992–997.
- Rahimov F, King OD, Warsing LC, Powell RE, Emerson CP, Kunkel LM, Wagner KR. Gene expression profiling of skeletal muscles treated with a soluble activin type IIB receptor. *Physiol Genomics* 2011;43:398–407.
- Rao S, Fujimura T, Matsunari H, Sakuma T, Nakano K, Watanabe M, Asano Y, Kitagawa E, Yamamoto T, Nagashima H. Efficient modification of the myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knockout piglets. *Mol Reprod Dev* 2016;83:61–70.
- Rasmussen BB, Holmbäck UC, Volpi E, Morio-Liondore B, Paddon-Jones D, Wolfe RR. Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 2002;110:1687–1693.
- Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23:7230–7242.
- Reid MB, Khawli FA, Moody MR. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *J Appl Physiol* 1993;75:1081–1087.
- Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol* 1992;73:1805–1809.
- Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen R, Sinha-Hikim I, Hogue A, Fielder TJ, Gonzalez-Cadavid NF. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E876-888.
- Relizani K, Mouisel E, Giannesini B, Hourdé C, Patel K, Morales Gonzalez S, Jülich K, Vignaud A,

- Piétri-Rouxel F, Fortin D, Garcia L, Blot S, Ritvos O, Bendahan D, Ferry A, Ventura-Clapier R, Schuelke M, Amthor H. Blockade of ActRIIB signaling triggers muscle fatigability and metabolic myopathy. *Mol Ther* 2014;22:1423–1433.
- Riboni L, Viani P, Bassi R, Prinetti A, Tettamanti G. The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res* 1997;36:153–195.
- Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2004;23:447–456.
- Riquelme C, Larrain J, Schonherr E, Henriquez JP, Kresse H, Brandan E. Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor beta and accelerates skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 2001;276:3589–3596.
- Risson V, Mazelin L, Roceri M, Sanchez H, Moncollin V, Corneloup C, Richard-Bulteau H, Vignaud A, Baas D, Defour A, Freyssenet D, Tanti JF, Le-Marchand-Brustel Y, Ferrier B, Conjard-Duplany A, Romanino K, Bauché S, Hantaï D, Mueller M, Kozma SC, Thomas G, Rüegg MA, Ferry A, Pende M, Bigard X, Koulmann N, Schaeffer L, Gangloff YG. Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *J Cell Biol* 2009;187:859–874.
- Robinson NC. Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr* 1993;25:153–163.
- Rodriguez J, Vernus B, Toubiana M, Jublanc E, Tintignac L, Leibovitch S, Bonniou A. Myostatin inactivation increases myotube size through regulation of translational initiation machinery. *J Cell Biochem* 2011;112:3531–3542.
- Roepstorff C, Steffensen CH, Madsen M, Stallknecht B, Kanstrup IL, Richter EA, Kiens B. Gender differences in substrate utilization during submaximal exercise in endurance-trained subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E435–447.
- Rogowski MP, Flowers MT, Stamatikos AD, Ntambi JM, Paton CM. SCD1 activity in muscle increases triglyceride PUFA content, exercise capacity, and PPAR δ expression in mice. *J Lipid Res* 2013;54:2636–2646.
- Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, Wolfe RR. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol* 1993a;265:E380–391.
- Romijn JA, Klein S, Coyle EF, Sidossis LS, Wolfe RR. Strenuous endurance training increases lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling at rest. *J Appl Physiol* 1993b;75:108–113.
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 2001;3:1009–1013.
- Rosivatz E, Woscholski R. Removal or masking of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate from the outer mitochondrial membrane causes mitochondrial fragmentation. *Cell Signal* 2011;23:478–486.
- Sacchetti M, Saltin B, Osada T, van Hall G. Intramuscular fatty acid metabolism in contracting and non-contracting human skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 2002;540:387–395.
- Saha AK, Laybutt DR, Dean D, Vavvas D, Sebokova E, Ellis B, Klimes I, Kraegen EW, Shafir E, Ruderman NB. Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo. *Am J Physiol* 1999;276:E1030–1037.
- Saitoh M, Ishida J, Doehner W, von Haehling S, Anker MS, Coats AJS, Anker SD, Springer J. Sarcopenia, cachexia, and muscle performance in heart failure: Review update 2016. *Int J Cardiol* 2017;238:5–11.
- Saltin B, Henriksson J, Nygaard E, Andersen P, Jansson E. Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *Ann N Y Acad Sci* 1977;301:3–29.
- Sanchez AMJ, Csibi A, Raibon A, Docquier A, Lagirand-Cantaloube J, Leibovitch MP, Leibovitch SA, Bernardi H. eIF3f: a central regulator of the antagonism atrophy/hypertrophy in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:2158–2162.
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, Spiegelman BM. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:16260–16265.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH,

- Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004;117:399–412.
- Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R, Sandri M. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2009;296:C1248-1257.
- Sartori R, Schirwis E, Blaauw B, Bortolanza S, Zhao J, Enzo E, Stantzou A, Mouisel E, Toniolo L, Ferry A, Stricker S, Goldberg AL, Dupont S, Piccolo S, Amthor H, Sandri M. BMP signaling controls muscle mass. *Nat Genet* 2013;45:1309–1318.
- Savage KJ, McPherron AC. Endurance exercise training in myostatin null mice. *Muscle Nerve* 2010;42:355–362.
- Sazanov A, Ewald D, Buitkamp J, Fries R. A molecular marker for the chicken myostatin gene (GDF8) maps to 7p11. *Anim Genet* 1999;30:388–389.
- Scalzo RL, Peltonen GL, Binns SE, Shankaran M, Giordano GR, Hartley DA, Klochak AL, Lonac MC, Paris HLR, Szallar SE, Wood LM, Peelor FF, Holmes WE, Hellerstein MK, Bell C, Hamilton KL, Miller BF. Greater muscle protein synthesis and mitochondrial biogenesis in males compared with females during sprint interval training. *FASEB J* 2014;28:2705–2714.
- Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 2013;280:4294–4314.
- Schick PK, Kurica KB, Chacko GK. Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *J Clin Invest* 1976;57:1221–1226.
- Schlame M, Brody S, Hostetler KY. Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species. *Eur J Biochem* 1993;212:727–735.
- Schlame M. Cardiolipin remodeling and the function of tafazzin. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:582–588.
- Schlame M, Ren M, Xu Y, Greenberg ML, Haller I. Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem Phys Lipids* 2005;138:38–49.
- Schlame M, Towbin JA, Heerdt PM, Jehle R, DiMauro S, Blanck TJJ. Deficiency of tetralinoleoyl-cardiolipin in Barth syndrome. *Ann Neurol* 2002;51:634–637.
- Schmitt B, Flück M, Décombaz J, Kreis R, Boesch C, Wittwer M, Graber F, Vogt M, Howald H, Hoppeler H. Transcriptional adaptations of lipid metabolism in tibialis anterior muscle of endurance-trained athletes. *Physiol Genomics* 2003;15:148–157.
- Schrauwen-Hinderling VB, van Loon LJC, Koopman R, Nicolay K, Saris WHM, Kooi ME. Intramyocellular lipid content is increased after exercise in nonexercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2003;95:2328–2332.
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 2004;350:2682–2688.
- Schuler M, Ali F, Chambon C, Duteil D, Bornert JM, Tardivel A, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Metzger D. PGC1 α expression is controlled in skeletal muscles by PPAR β , whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab* 2006;4:407–414.
- Schwall CT, Greenwood VL, Alder NN. The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent. *Biochim Biophys Acta* 2012;1817:1588–1596.
- Scotto di Palumbo A, Guerra E, Orlandi C, Bazzucchi I, Sacchetti M. Effect of combined resistance and endurance exercise training on regional fat loss. *J Sports Med Phys Fitness* 2017;57:794–801.
- Sedláč E, Robinson NC. Phospholipase A(2) digestion of cardiolipin bound to bovine cytochrome c oxidase alters both activity and quaternary structure. *Biochemistry* 1999;38:14966–14972.
- Selathurai A, Kowalski GM, Burch ML, Sepulveda P, Risis S, Lee-Young RS, Lamon S, Meikle PJ, Genders AJ, McGee SL, Watt MJ, Russell AP, Frank M, Jackowski S, Febbraio MA, Bruce CR. The CDP-Ethanolamine Pathway Regulates Skeletal Muscle Diacylglycerol Content and Mitochondrial Biogenesis without Altering Insulin Sensitivity. *Cell Metab* 2015;21:718–730.
- Semenkovich CF. Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog Lipid Res* 1997;36:43–53.
- Senoo N, Miyoshi N, Goto-Inoue N, Minami K, Yoshimura R, Morita A, Sawada N, Matsuda J, Ogawa Y, Setou M, Kamei Y, Miura S. PGC-1 α -mediated changes in phospholipid profiles of exercise-trained skeletal muscle. *J Lipid Res* 2015;56:2286–2296.

- Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol* 2008;3:279–312.
- Sharpley MS, Shannon RJ, Draghi F, Hirst J. Interactions between phospholipids and NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine mitochondria. *Biochemistry* 2006;45:241–248.
- Shephard EH, Hübscher G. Phosphatidate biosynthesis in mitochondrial subfractions of rat liver. *Biochem J* 1969;113:429–440.
- Shepherd SO, Cocks M, Tipton KD, Ranasinghe AM, Barker TA, Burniston JG, Wagenmakers AJM, Shaw CS. Preferential utilization of perilipin 2-associated intramuscular triglycerides during 1 h of moderate-intensity endurance-type exercise. *Exp Physiol* 2012;97:970–980.
- Simoneau JA, Lortie G, Boulay MR, Thibault MC, Thériault G, Bouchard C. Skeletal muscle histochemical and biochemical characteristics in sedentary male and female subjects. *Can J Physiol Pharmacol* 1985;63:30–35.
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991;54:438–463.
- Simopoulos AP. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010;235:785–795.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009;458:1131–1135.
- Siu PM, Alway SE. Deficiency of the Bax gene attenuates denervation-induced apoptosis. *Apoptosis* 2006;11:967–981.
- Siu PM, Pistilli EE, Butler DC, Alway SE. Aging influences cellular and molecular responses of apoptosis to skeletal muscle unloading. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2005;288:C338-349.
- Sonstegard TS, Rohrer GA, Smith TP. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Anim Genet* 1998;29:19–22.
- Southgate RJ, Neill B, Prelovsek O, El-Osta A, Kamei Y, Miura S, Ezaki O, McLoughlin TJ, Zhang W, Unterman TG, Febbraio MA. FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* 2007;282:21176–21186.
- Sparagna GC, Chicco AJ, Murphy RC, Bristow MR, Johnson CA, Rees ML, Maxey ML, McCune SA, Moore RL. Loss of cardiac tetralinoleoyl cardiolipin in human and experimental heart failure. *J Lipid Res* 2007;48:1559–1570.
- Sparagna GC, Lesnefsky EJ. Cardiolipin remodeling in the heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;53:290–301.
- Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:219–231.
- Srere PA. An eclectic view of metabolic regulation: control of citrate synthase activity. *Adv Enzyme Regul* 1970;9:221–233.
- Sriwijitkamol A, Ivy JL, Christ-Roberts C, DeFronzo RA, Mandarino LJ, Musi N. LKB1-AMPK signaling in muscle from obese insulin-resistant Zucker rats and effects of training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E925-932.
- Stamatikos AD, Paton CM. Role of stearoyl-CoA desaturase-1 in skeletal muscle function and metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E767-775.
- Stefanyk LE, Coverdale N, Roy BD, Peters SJ, LeBlanc PJ. Skeletal muscle type comparison of subsarcolemmal mitochondrial membrane phospholipid fatty acid composition in rat. *J Membr Biol* 2010;234:207–215.
- Steffensen CH, Roepstorff C, Madsen M, Kiens B. Myocellular triacylglycerol breakdown in females but not in males during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E634-642.
- Stepanyants N, Macdonald PJ, Francy CA, Mears JA, Qi X, Ramachandran R. Cardiolipin's propensity for phase transition and its reorganization by dynamin-related protein 1 form a basis for mitochondrial membrane fission. *Mol Biol Cell* 2015;26:3104–3116.
- Stinckens A, Bijttebier J, Luyten T, Van Den Maagdenberg K, Harmegnies N, De Smet S, Georges M, Buys N. Detection of polymorphisms in the myostatin gene in Belgian Pietrain pigs. *Commun Agric Appl Biol Sci* 2005;70:37–41.
- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD,

- Glass DJ. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 2004;14:395–403.
- Stremmel W, Pohl L, Ring A, Herrmann T. A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids. *Lipids* 2001;36:981–989.
- Sugino K, Kurosawa N, Nakamura T, Takio K, Shimasaki S, Ling N, Titani K, Sugino H. Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *J Biol Chem* 1993;268:15579–15587.
- Summermatter S, Troxler H, Santos G, Handschin C. Coordinated balancing of muscle oxidative metabolism through PGC-1 α increases metabolic flexibility and preserves insulin sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;408:180–185.
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991;352:73–77.
- Sylov L, Kleinert M, Richter EA, Jensen TE. Exercise-stimulated glucose uptake - regulation and implications for glycaemic control. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:133–148.
- Szabó G, Dallmann G, Müller G, Patthy L, Soller M, Varga L. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mamm Genome* 1998;9:671–672.
- Szeto HH. First-in-class cardioprotective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol* 2014;171:2029–2050.
- Tadaishi M, Miura S, Kai Y, Kano Y, Oishi Y, Ezaki O. Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 α -b, an exercise-responsive isoform, increases exercise capacity and peak oxygen uptake. *PLoS ONE* 2011;6:e28290.
- Takahashi M, Hood DA. Chronic stimulation-induced changes in mitochondria and performance in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1993;74:934–941.
- Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E1195-1209.
- Talanian JL, Galloway SDR, Heigenhauser GJF, Bonen A, Spriet LL. Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. *J Appl Physiol* 2007;102:1439–1447.
- Tando T, Hirayama A, Furukawa M, Sato Y, Kobayashi T, Funayama A, Kanaji A, Hao W, Watanabe R, Morita M, Oike T, Miyamoto K, Soga T, Nomura M, Yoshimura A, Tomita M, Matsumoto M, Nakamura M, Toyama Y, Miyamoto T. Smad2/3 Proteins Are Required for Immobilization-induced Skeletal Muscle Atrophy. *J Biol Chem* 2016;291:12184–12194.
- Tarnopolsky MA, Rennie CD, Robertshaw HA, Fedak-Tarnopolsky SN, Devries MC, Hamadeh MJ. Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondrial enzyme activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R1271-1278.
- Tee AR, Blenis J. mTOR, translational control and human disease. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:29–37.
- Thies RS, Chen T, Davies MV, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA, Wolfman NM. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* 2001;18:251–259.
- Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 2000;275:40235–40243.
- Thomas TR, Londree BR, Gerhardt KO, Gehrke CW. Fatty acid profile and cholesterol in skeletal muscle of trained and untrained men. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1977;43:709–713.
- Thomason DB, Booth FW. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 1990;68:1–12.
- Toledo FGS, Menshikova EV, Ritov VB, Azuma K, Radikova Z, DeLany J, Kelley DE. Effects of physical activity and weight loss on skeletal muscle mitochondria and relationship with glucose control in type 2 diabetes. *Diabetes* 2007;56:2142–2147.
- Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces

- Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2009;296:C1258-1270.
- Tsuchida K, Arai KY, Kuramoto Y, Yamakawa N, Hasegawa Y, Sugino H. Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family. *J Biol Chem* 2000;275:40788–40796.
- Tsuchida K. Targeting myostatin for therapies against muscle-wasting disorders. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2008;11:487–494.
- Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M, Cameron-Smith D. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E66-72.
- Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011;155:117–130.
- Unsay JD, Cosentino K, Subburaj Y, García-Sáez AJ. Cardioliipin effects on membrane structure and dynamics. *Langmuir* 2013;29:15878–15887.
- Valianpour F, Wanders RJA, Overmars H, Vaz FM, Barth PG, van Gennip AH. Linoleic acid supplementation of Barth syndrome fibroblasts restores cardioliipin levels: implications for treatment. *J Lipid Res* 2003;44:560–566.
- Van Hall G, Bülow J, Sacchetti M, Al Mulla N, Lyngso D, Simonsen L. Regional fat metabolism in human splanchnic and adipose tissues; the effect of exercise. *J Physiol (Lond)* 2002;543:1033–1046.
- van Loon LJ, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Saris WH, Wagenmakers AJ. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J Physiol (Lond)* 2001;536:295–304.
- van Loon LJC. Use of intramuscular triacylglycerol as a substrate source during exercise in humans. *J Appl Physiol* 2004;97:1170–1187.
- van Loon LJC, Goodpaster BH. Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch* 2006;451:606–616.
- van Loon LJC, Koopman R, Stegen JHCH, Wagenmakers AJM, Keizer HA, Saris WHM. Intramyocellular lipids form an important substrate source during moderate intensity exercise in endurance-trained males in a fasted state. *J Physiol (Lond)* 2003;553:611–625.
- Van Proeyen K, Szlufcik K, Nielens H, Deldicque L, Van Dyck R, Ramaekers M, Hespel P. High-fat diet overrules the effects of training on fiber-specific intramyocellular lipid utilization during exercise. *J Appl Physiol* 2011;111:108–116.
- Vance JE, Tasseva G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831:543–554.
- Vreken P, Valianpour F, Nijtmans LG, Grivell LA, Plecko B, Wanders RJ, Barth PG. Defective remodeling of cardioliipin and phosphatidylglycerol in Barth syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:378–382.
- Waddell DS, Baehr LM, van den Brandt J, Johnsen SA, Reichardt HM, Furlow JD, Bodine SC. The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E785-797.
- Wagner KR, Cohen JS. 1993. Myostatin-Related Muscle Hypertrophy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Mefford HC, Stephens K, Amemiya A, Ledbetter N, eds. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, .
- Wagner KR, McPherron AC, Winik N, Lee SJ. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol* 2002;52:832–836.
- Wallis JG, Watts JL, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci* 2002;27:467.
- Wang H, Zhang Q, Zhu D. hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:877–883.
- Wang J, Yu L, Schmidt RE, Su C, Huang X, Gould K, Cao G. Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332:735–742.
- Wang Q, McPherron AC. Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell

- activation. *J Physiol (Lond)* 2012;590:2151–2165.
- Wang R, Jiao H, Zhao J, Wang X, Lin H. Glucocorticoids Enhance Muscle Proteolysis through a Myostatin-Dependent Pathway at the Early Stage. *PLoS ONE* 2016;11:e0156225.
- Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2004;2:e294.
- Warensjö E, Risérus U, Gustafsson IB, Mohsen R, Cederholm T, Vessby B. Effects of saturated and unsaturated fatty acids on estimated desaturase activities during a controlled dietary intervention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18:683–690.
- Watkins SM, Reifsnnyder PR, Pan H ju, German JB, Leiter EH. Lipid metabolome-wide effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone. *J Lipid Res* 2002;43:1809–1817.
- Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MTH, Brickey WJ, Ting JPY. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 2011;12:408–415.
- Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C, Han DH, Chen MM, Hancock CR, Lehman JJ, Huss JM, McClain DA, Holloszy JO, Kelly DP. A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *J Biol Chem* 2007;282:36642–36651.
- Wharton DC, Tzagoloff A. [45] Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods in Enzymology* 1967;10:245–250.
- Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan XY, Tomkinson KN, Veldman GM, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao L, Wolfman NM. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:965–971.
- Winbanks CE, Chen JL, Qian H, Liu Y, Bernardo BC, Beyer C, Watt KI, Thomson RE, Connor T, Turner BJ, McMullen JR, Larsson L, McGee SL, Harrison CA, Gregorevic P. The bone morphogenetic protein axis is a positive regulator of skeletal muscle mass. *J Cell Biol* 2013;203:345–357.
- Winder WW, Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 1996;270:E299-304.
- Wolfe RR, Klein S, Carraro F, Weber JM. Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *Am J Physiol* 1990;258:E382-389.
- Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS, Lee SJ. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15842–15846.
- Wu G, Sher RB, Cox GA, Vance DE. Understanding the muscular dystrophy caused by deletion of choline kinase beta in mice. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:347–356.
- Wyke SM, Russell ST, Tisdale MJ. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer* 2004;91:1742–1750.
- Xu C, Wu G, Zohar Y, Du SJ. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J Exp Biol* 2003;206:4067–4079.
- Yamaoka S, Urade R, Kito M. Cardiolipin molecular species in rat heart mitochondria are sensitive to essential fatty acid-deficient dietary lipids. *J Nutr* 1990;120:415–421.
- Yang K, Julian L, Rubio F, Sharma A, Guan H. Cadmium reduces 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and expression in human placental trophoblast cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E135–E142.
- Yang L, Dan HC, Sun M, Liu Q, Sun X meng, Feldman RI, Hamilton AD, Polokoff M, Nicosia SV, Herlyn M, Sebti SM, Cheng JQ. Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res* 2004;64:4394–4399.
- Yang W, Zhang Y, Li Y, Wu Z, Zhu D. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. *J Biol Chem* 2007;282:3799–3808.
- Yarasheski KE, Bhasin S, Sinha-Hikim I, Pak-Loduca J, Gonzalez-Cadavid NF. Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *J Nutr Health Aging* 2002;6:343–348.
- Zachwieja JJ, Smith SR, Sinha-Hikim I, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S. Plasma myostatin-

- immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. *J Gravit Physiol* 1999;6:11–15.
- Zhang C, McFarlane C, Lokireddy S, Bonala S, Ge X, Masuda S, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R. Myostatin-deficient mice exhibit reduced insulin resistance through activating the AMP-activated protein kinase signalling pathway. *Diabetologia* 2011;54:1491–1501.
- Zhang C, McFarlane C, Lokireddy S, Masuda S, Ge X, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R. Inhibition of myostatin protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation and promoting a brown adipose phenotype in mice. *Diabetologia* 2012;55:183–193.
- Zhang L, Rajan V, Lin E, Hu Z, Han HQ, Zhou X, Song Y, Min H, Wang X, Du J, Mitch WE. Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. *FASEB J* 2011;25:1653–1663.
- Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2002;277:43553–43556.
- Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, Rosenfeld R, Chen Q, Boone T, Simonet WS, Lacey DL, Goldberg AL, Han HQ. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 2010;142:531–543.
- Zhu X, Topouzis S, Liang LF, Stotish RL. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* 2004;26:262–272.
- Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 2002;296:1486–1488.

Résumé

L'inhibition ou l'inactivation de la myostatine (mstn) entraîne une hypertrophie musculaire qui permet d'envisager des thérapies efficaces dans la lutte contre la fonte musculaire dans de nombreuses pathologies (myopathies, maladies chroniques, sarcopénie). Cependant, le muscle déficient en mstn présente une fatigabilité musculaire accrue, associée à des altérations du métabolisme mitochondrial et lipidique. Or, les membranes musculaires et mitochondriales sont constituées principalement de lipides et phospholipides. Ces derniers participent au maintien de la structure et de la fonction métabolique de la fibre. Ils interviennent également dans la chaîne respiratoire jouant un rôle clé dans la bioénergétique mitochondriale. Dans ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse que la composition lipidique musculaire et mitochondriale est altérée dans le muscle KO mstn, expliquant en partie les altérations métaboliques et fonctionnelles de ce phénotype. Dans un second temps, nous avons recherché si l'entraînement en endurance normalise ces altérations phénotypiques musculaires. Nos résultats ont montré dans le muscle KO mstn une diminution de l'expression des différents transporteurs membranaires des lipides (FAT/CD36, FABP3, FATP1 et FATP4) associé à une réduction de l'activité des enzymes impliquées dans l'oxydation lipidique (Citrate synthase et β HAD) et une diminution de la lipogenèse (chute du contenu en triglycérides et en acides gras libres). D'une manière intéressante, nos résultats montrent une diminution de la proportion en cardiolipide au niveau de la membrane mitochondriale, en relation avec une réduction de l'expression des gènes PGPS et CRLS1, impliqués dans le processus de synthèse de cardiolipide. Nous avons également établi que 4 semaines d'entraînement en endurance sur tapis roulant améliorent en particulier la performance aérobie des souris KO mstn, qui retrouvent une capacité d'endurance comparable à celle des souris contrôles entraînées. L'expression des marqueurs de l'oxydation lipidique et du métabolisme oxydatif est également améliorée (Cpt1, Ppar δ , Fas, contenu mitochondrial et citrate synthase). L'entraînement permet aussi d'augmenter l'activité des enzymes mitochondriales et la proportion membranaire en cardiolipide uniquement chez les souris KO mstn. En conclusion, ces résultats suggèrent que les qualités oxydatives du muscle hypertrophié KO mstn peuvent être remodelées sans impacter l'effet bénéfique hypertrophique. Enfin, ils présentent le métabolisme lié au cardiolipide et lipidique de manière générale comme de nouvelles pistes à explorer pour améliorer le métabolisme du muscle KO mstn et sa fonction mitochondriale.

Mots clés: GDF-8, Chromatographie sur couche mince, voie lipidique, delta-9 désaturase, lipides neutres

Abstract

Myostatin (mstn) inactivation or inhibition is considered as a promising treatment for various muscle-wasting disorders because it promotes muscle growth. However, mstn-deficient hypertrophic muscles show strong fatigability associated with abnormal mitochondria and lipid metabolism. Muscle membrane maintains the structure and the metabolic function of the fibre, and mitochondrial membrane including respiratory chain complexes, are composed mainly of lipids and phospholipids playing functional role in mitochondrial bioenergetics. In our study, we hypothesized first that changes in the muscle and mitochondrial lipid composition could exist in the KO mstn muscle, in relation with the metabolic and functional alterations, secondly that endurance training can normalize these phenotypic muscle alterations. We reported in KO mstn muscles a decrease of fat membrane transporter levels (FAT/CD36, FABP3, FATP1 and FATP4) associated with decreased lipid oxidative pathway (citrate synthase and β HAD activities) and decreased lipogenesis (decreased triglyceride and free fatty acids content). Interestingly, we demonstrated a decrease in mitochondrial cardiolipin content, in relation with a decrease in PGPS and CRLS1 gene expressions. Then, we showed in KO mstn mice that 4 weeks of daily running exercise session (65-70% of the maximal aerobic speed for 1 hour) improved significantly aerobic performance, particularly the endurance to levels comparable to those of trained wild type littermates. The expression of oxidative and lipid metabolism markers also was increased, as indicated by the upregulation of the Cpt1, Ppar, Fas genes, and increased citrate synthase level and mitochondrial protein content in KO mstn muscle. Interestingly, mitochondrial enzyme activity and the cardiolipin fraction in the mitochondrial membrane are increased by training only in KO mstn mice. In conclusion, these results suggest that the combination of mstn inhibition and endurance training could increase the muscle mass while preserving the physical performance. In addition, cardiolipin and lipid-related pathways could represent new targets to improve mstn-deficient muscle metabolism and restore mitochondrial function.

Keys words: GDF-8, thin layer chromatography, handling fat, delta-9desaturase, neutral lipids.