Le rôle de SRF au cours de l'atrophie du muscle squelettique adulte & dans les cellules satellites

Gaelle Herledan

▶ **To cite this version:**

Gaelle Herledan. Le rôle de SRF au cours de l'atrophie du muscle squelettique adulte & dans les cellules satellites. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. hal-01521070

HAL Id: hal-01521070
https://ephe.hal.science/hal-01521070

Submitted on 11 May 2017

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.

École Pratique
des Hautes Études

PSL
RESEARCH UNIVERSITY PARIS

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté
par

Gaëlle HERLEDAN

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Le rôle de SRF au cours de l'atrophie du muscle squelettique adulte & dans les cellules satellites

soutenu le 23 mars 2017 devant le jury suivant :

Dr. Giovanni STEVANIN **- Président**
Dr. Athanassia SOTIROPOULOS **- Tuteur scientifique**
Dr. Thi My Anh NEILDEZ **- Tuteur pédagogique**
Dr. Mathias MERICSKAY **- Rapporteur**
Dr. Vincent MOULY **- Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :
Dr. Athanassia SOTIROPOULOS
Institut Cochin
INSERM (Unité 1016), CNRS (UMR 8104), Université Paris Descartes (UMR-S 1016)
Département Développement, Reproduction & Cancer
Développement neuromusculaire, génétique et physiopathologie

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté
par

Gaëlle HERLEDAN

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Le rôle de SRF au cours de l'atrophie du muscle squelettique adulte & dans les cellules satellites

soutenu le 23 mars 2017 devant le jury suivant :

Dr. Giovanni STEVANIN **- Président**
Dr. Athanassia SOTIROPOULOS **- Tuteur scientifique**
Dr. Thi My Anh NEILDEZ **- Tuteur pédagogique**
Dr. Mathias MERICSKAY **- Rapporteur**
Dr. Vincent MOULY **- Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :
Dr. Athanassia SOTIROPOULOS
Institut Cochin
INSERM (Unité 1016), CNRS (UMR 8104), Université Paris Descartes (UMR-S 1016)
Département Développement, Reproduction & Cancer
Développement neuromusculaire, génétique et physiopathologie

Remerciements

Jai eu un réel coup de coeur pour cochin qui a été une Aventure humaine et un carrefour de rencontres.

Je remercie...

Le jury, Mathias Mericskay, Vincent Mouly & Giovanni Stevanin pour leur temps consacré à l'évaluation de ce travail. Je remercie particulièrement Thi My Anh de m'avoir proposé d'être ma tutrice pédagogique, que j'ai rencontré quelques années plus tôt lors d'une formation.

L'équipe Maire où il fait bon vivre, la bonne ambance, et l'entraide constante entre les membres, même des coups de téléphone soirs et week-ends.

Nassia, pour ta qualité de chef, ta patience, ton investissement dans le labo, ton enthousiasme, tes fameux « ALORS ?? » la manip à peine terminée, le binôme de paillasse que l'on pouvait former, les crises de rire que tu m'as provoqué, la liberté que tu m'as accordé de pouvoir faire des choses annexes au labo, les responsabilités que tu m'as donné, de m'avoir fait confiance et de m'avoir tirée vers le haut.

Pascal, pour ta gentillesse, le fromage que tu nous rapportais du Jura, les "bon courage et à demain" qui nous motivaient passé 19h.

Maud, pour ton aide et ton soutien, ta maladresse en culture qui me faisait bien rire, ta brillance, ton coté fun, ta bonne humeur dans le labo, de m'avoir concurrencé sur le titre de la personne dont le timer sonne le plus longtemps, pour l'écharpe qui a été un cadeau très touchant, de nous avoir fait entrer dans ta vie.

Francesc le petit poulet catalan, pour tes phrases approximatives, ta passion pour les brocolis, les discussions improbables que nous pouvions avoir, ta débilité quand t'es saoul, et la bonne ambiance que tu as apporté dans ce bureau des étudiants.

Morgane, pour ta capacité à profiter de la vie, de m'avoir ouvert les yeux et appris à relativiser.

Philippe, pour les discussions paternelles que tu m'accordais, et la petite place bien tranquille dans ton bureau qui m'a permis de me lancer dans le mémoire.

Tof, pour ton expérience, ton professionnalisme, ta qualité à être patient, et les bons gâteaux dignes d'un grand pâtissier.

Josiane & Iori, pour m'avoir donné le courage de partir en Angleterre.

Nathalie & Steph pour vos longues discussions autour d'une eau chaude et de gâteaux bien gras (ou trop secs). Le gras c'est la vie !

Evelyne, pour ton sourire au quotidien.

Ulduz, Kat, Chiara, Anissa & Laura pour votre gentillesse et la bonne humeur que vous avez apporté dans l'équipe.

Alessandra, Voahanguy & Matthieu pour votre aide technique.
Kat, Laura, Emilie & Caro pour vos manuscrits dont je me suis lourdement inspirée.

Anne Lombès pour le travail réalisé sur les mitochondries et Stéphane Vassilopoulos pour les manips de microscopie électronique du cytosquelette d'Actine.

L'équipe Le-Grand, notamment à Elsa, mon acolyte d'associations avec qui nous avons fait de nombreuses soirées nocturnes au labo. Alice, merci pour ton aide au quotidien. Fab, on se recroise à l'Institut de Myologie !

Merci aux gestionnaires (Maryse, Yannig, Patricia, Michèle, Laetitia, Christine), aux Dames de la laverie (Nathalie, Mimi, Josiane), au magasiniers (Emilie, Nicolas), à la plateforme du petit animal (Otilia, Agnès, Yoann), à la plateforme de microscopie (Thomas, Béatrice, Pierre), à Tacko notre dame de ménage, Georges du service technique, et Serge, un des gardiens du bât Fac.

Sarah, pour nos longues discussions à la pause déjeuner au cloitre et au jardin suspendu. Merci de m'avoir mis a disposition tes 2 épaules, l'une pour rire et l'autre pour pleurer.

JeCCo 2015 & JeCCocos 2016, merci pour votre investissement, il a fallut une bonne cohésion d'équipe pour tenir le coup. A certaines soirées on pouvait entendre : "j'ai bu n=15 bières et je suis positivement bourré!". Merci à Marie-Anges & Laurence pour votre aide cruciale, et à POC, Karine Lanini & Marie-Andrée pour votre soutien porté a l'asso. JeCCo c'est lamour!

Sabine, Mariangela, Tic & Tac, Cyril, Benjamin, Nadège, Rozenn, Cécile, Robin, Jean-Christophe, Ambre, Séverine, Jocelyne, Antoine, Caro, Aya, Fadila, Tiphaine, Emilie, Antoine, Julie, Pierre, Emilie, Rémi, Maryline, pour nos discussions en tout genre, votre aide technique et vos recommandations. ...et bien d'autres que j'aurais certainement oublié, je m'en excuse d'avance.

Merci à Laurence, Carole, Nassia, Philippe, Nathalie, Cesc, Sarah & Anne Hosmalin, pour votre aide financière qui m'a permis de participer aux World Ultimate and Guts Championships 2016, un projet qui me tenait très à coeur.

Merci à toutes les personnes que j'ai rencontré au bât Fac, à Méchain ou à Roussy, dans l'asso, en interasso, pour votre aide à passer les concours, relire mon mémoire, refaire CV & LM, chercher un emploi, échanger un anticorps, un café, une bière, ou des idées voyage, je vous suis très reconnaissante !

Merci à Chantal pour la relecture orthographique.

Merci à mon père d'avoir cru en moi et de m'avoir ainsi indirectement poussée à faire ce diplôme. Je lui avais promis qu'il serait fier de moi. J'espère que ces dernières années le prouvent. J'ai été fière de lui, de la façon dont il s'est battu ; pour cela je continuerai à me battre même s'il faut gravir des montagnes.

"Le plus important […] n'est pas de gagner mais de participer, car l'important dans la vie ce n'est point le triomphe mais le combat ; l'essentiel, ce n'est pas d'avoir vaincu mais de s'être bien battu."

Pierre de Courbertin

Table des matières

INTRODUCTION……17

1-Le muscle squelettique adulte……19
1-1-Le rôle du muscle squelettique adulte……19
1-2-La myogenèse……19
a)-La mise en place muscle squelettique……19
b)-Les progéniteurs embryonnaires au cours du développement……21
1-3-Les cellules satellites……21
1-4-Les fibres musculaires……23
1-4-1-Le système contractile des fibres musculaires……23
1-4-2-Le typage des fibres musculaires……25
1-4-3-Le transfert d'énergie……26
1-4-4-Le métabolisme énergétique……27
a)-La glycolyse……28
b)-Le métabolisme mitochondrial……28
1-5-La plasticité du muscle squelettique……29
1-5-1-L'hypertrophie……29
a)-Les voies de signalisation importantes pour la croissance des fibres……30
b)-La contribution des cellules satellites……32
c)-Les signaux paracrines……32
1-5-2-L'atrophie……32
a)-L'autophagie……33
b)-Le système ubiquitine-protéasome……34
c)-Les calpaines & caspases……35
d)-Le phénomène Redox……35
1-5-3-La régénération……36
a)- Les voies de signalisation impliquées au cours de la régénération ……36
b)-Le système immunitaire……37
c)-Les micros ARN……37

2-Le facteur de transcription Serum Response Factor (SRF) ……37
2-1-La régulation de l'activité de SRF……37
a)-La voie Rho-Actine……38
b)-La voie MAPK/TCF……38
2-2-Les gènes cibles de SRF……39
2-3-SRF dans le muscle squelettique……40

3-Les objectifs du projet……41
a)-Le rôle de SRF dans l'atrophie du muscle squelettique induite par dénervation……41
b)-Le rôle de SRF dans les cellules satellites……41

MATERIEL & METHODE……43

1-Le rôle du facteur de transcription SRF dans les cellules satellites adultes……45
1-1-Les modèles animaux……45
a)-Le modèle KO conditionnel et inductible de SRF……45
b)-Le modèle KO total d'EGR1……45
1-2-Les modèles cellulaires……45
a)-La séparation des cellules satellites……45

b)-La culture de cellules satellites……46
c)-La transfection des cellules satellites par siRNA……46
d)-La mise en différenciation des cellules satellites……46

2-Le rôle du facteur de transcription SRF dans l'atrophie du muscle squelettique adulte……46
2-1-Le modèle animal……46
2-2-Les analyses cellulaires……46
a)-Les coupes de muscle au cryostat……46
b)-L'immunomarquage……47
c)-La prolifération par incorporation d'EdU.……47
d)-L'acquisition des images……47
e)-Les analyses des images……47
2-3-Les analyses biochimiques……48
2-3-1-L'analyse des protéines par western blot……48
a)-La préparation et mesure des échantillons de protéines……48
b)-La séparation des fractions F & G d'Actine……48
c)-La migration et transfert des protéines sur membrane……48
d)-L'immunomarquage.……49
e)-La révélation……49
f)-L'analyse……49
2-3-2-La mesure spectrophotométrique des activités de la chaîne respiratoire……49
2-3-2-1-Le dosage du complexe I……49
a)-Le principe……49
b)-Le protocole……50
2-3-2-2-Le dosage du complexe II……50
a)-Le principe……50
b)-Le protocole……50
2-3-2-3-Le dosage du complexe IV……50
a)-Le principe……50
b)-Le protocole……50
2-3-2-4-Le dosage de la Citrate Synthase……51
a)-Le principe……51
b)-Le protocole……51
2-3-3-La mesure de la respiration par polarographie……51
a)-Le principe……51
b)-Le protocole……52
2-4-Les analyses moléculaires……52
2-4-1-Le génotypage des animaux par PCR……52
a)-L'extraction d'ADN……52
b)-L'analyse par PCR……52
2-4-2-La validation de l'expression des transcrits de gènes obtenus par séquençage……52
a)-L'extraction d'ARN à partir de cellules……52
b)-L'extraction d'ARN à partir de muscle……53
c)-La mesure des acides nucléiques……53
d)-L'analyse par RT-qPCR (SYBr green) ……53
2-4-3-L'évaluation du nombre de copies d'ADN mitochondrial……54
a)-L'extraction d'ADN……54
b)-Le dosage de l'ADN total par fluorescence……54
c)-Le dosage de l'ADN mitochondrial par qPCR……54

3-Les analyses statistiques……54

RESULTATS……..55

Partie 1 - Le rôle du facteur de transcription SRF dans l'atrophie du muscle squelettique adulte

1-Le rôle de SRF dans l'atrophie par dénervation.....57
1-1-Les données préliminaires de SRF dans l'atrophie par dénervation.....57
1-2-Les fonctions altérées des muscles dénervés chez les mutants SRF.....58
1-3-L'étude de l'atrophie par dénervation des mutants SRF.....58
1-3-1-Les voies cataboliques : autophagie & système Ubiquitine-Protéasome.....58
a)-L'autophagie……58
b)-Le système Ubiquitine-Protéasome……60
1-3-2-Les fonctions mitochondriales & transfert et régulation énergétiques.....61
1-3-2-1-Les fonctions mitochondriales.....61
a)-La quantification des mitochondries.……61
b)-La respiration mitochondriale……61
c)-L'activité des complexes isolés (Vmax) de la chaîne respiratoire...62
1-3-2-2-Le transfert & régulation énergétiques.....63
a)-La Créatine Kinase……63
b)-L'AMPK.……63
1-4-Conclusion - Rôle de SRF dans l'atrophie du muscle squelettique adulte.....63

Partie 2 - Le rôle du facteur de transcription SRF dans les cellules satellites adultes

2-Le rôle de SRF dans dans les cellules satellites adultes.....65
2-1-Les fonctions altérées des cellules satellites mutantes SRF.....65
2-2-L'étude du phénotype des cellules satellites en absence de SRF.....65
a)-La prolifération cellulaire……65
b)-La vélocité.……66
c)-Le potentiel de différenciation myogénique.……66
d)-Le potentiel de fusion des cellules myogéniques.……68
2-3-L'expression transcriptionnelle de gènes cibles de SRF.....69
a)-La diminution de l'expression de l'Actine chez les mutants SRF et tentative de sauvetage du cytosquelette d'Actine.……73
b)-La perte de fonction du gène *Egr1* 77
c)-La perte de fonction du gène *Fhl2* dans les cellules satellites……79
d)-La perte de fonction du gène *Hic5* dans les cellules satellites.……81
e)-La restauration de l'expression de KRT18 chez les mutants SRF……83
2-4- Conclusion - Rôle de SRF dans les cellules satellites adultes.....85

DISCUSSION & PERSPECTIVES……..87

ANNEXES……..93

Annexe 1 - Nuclear actin and myocardin-related transcription factors control disuse muscle atrophy through regulation of SRF activity – Collard et al. 2014.……95

Annexe 2 - SRF controls satellite cell fusion during skeletal muscle hypertrophy through the maintenance of actin architecture – Papaefthymiou et al. en soumission.……113

Annexe 3 – Présentations à des congrès……145

REFERENCES……147

Liste des abréviations

Ac-CoA : Acetyl-coenzyme A
Ach : Acétylcholine
ADNc : ADN complémentaire
ADP : Adénosine diphosphate
AK : Adénylate kinase
AMP : Adénosine monophosphate
ATP : Adénosine triphosphate
BSA : Bovine serum albumin
CAT : Chloramphenicol acetyl transferase
Cccp : Protonophore carbonyl cyanide m-chloro- phenyl hydrazone
CK : Créatine Kinase
CKm : CK cytosolique
CKmit : CK mitochondriale
CMV : Cytomegalovirus
CrP : Phosphocréatine
CS : Citrate synthase
CSA : Cross section area
CTX : Cardiotoxin
DAPI : Di Aminido Phenyl Indol
DHP : Dihydropyridine
DML : Dorso-Medial Lip
DO : Absorbance
ECL : Enhanced chemiluminescence
FACS : Fluorescence-activated cell sorting
GAS : *Gastronemius*
GP : *Gastronemius* et *Plantaris*
GS : Sérum de chèvre
HDAC-MEF2 : histone deacetylase-myocyte enhancer factor 2
HRP : Horseradish peroxidase
HS : Sérum de cheval
HSA : Human alpha-skeletal Actin
IEG : Immediate early genes
IGF1 : insulin-like growth factor 1
LC3 : Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LC3-I : LC3 cytosolique
LC3-II : conjugué LC3-phosphatidylethanolamine
miRNA : micros ARN
MRF : facteurs de transcriptions myogéniques
MRTF : Myocardin-related transcription factor
MYHC : Chaines lourdes de Myosine
MYLC : Chaines légères de Myosine
ON : Over night
PAX7 : Paired box gene 7
PBS : tampon phosphate salin
PFA : Paraformaldéhyde
PL : *Plantaris*
RCR : Rapport de contrôle respiratoire
RIPA : Radio immunoprecipitation assay buffer
RyR : Récepteur à la Ryanodine

SC : cellule satellite
SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca 2+-ATPase
SOL : *Soleus*
SRF : Serum Response Factor
TA : Température ambiante
TA : *Tibialis anterior*
TBS : Tris- buffered saline
TCF : Ternary Complex Factor
TMX : Tamoxifène
ULK : Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase
VLL : Ventro-Lateral Lip

Table des figures

Figure 1 : Les 3 types de muscle
Figure 2 : La myogenèse
Figure 3 : L'origine embryonnaire des muscles squelettiques
Figure 4 : L'origine embryonnaire des muscles squelettiques
Figure 5 : La myogenèse adulte
Figure 6 : Les cellules satellites en quiescence
Figure 7 : La structure du muscle squelettique
Figure 8 : La transmission neuromusculaire
Figure 9 : L'organisation de la voie calcique de l'appareil contractile du muscle squelettique
Figure 10 : Les étapes du cycle de contraction des fibres musculaires
Figure 11 : Le transfert d'énergie
Figure 12 : La production d'énergie par la mitochondrie
Figure 13 : La plasticité musculaire
Figure 14 : Les voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire
Figure 15 : L'AMPK
Figure 16 : Les principales origines de l'atrophie musculaire
Figure 17 : Les étapes de la macro-autophagie
Figure 18 : Le protéasome 26S
Figure 19 : Les voies de signalisation impliquées au cours la régénération
Figure 20 : Les différentes classes de gènes cibles de SRF
Figure 21 : Les deux principales voies régulatrices de SRF
Figure 22 : La médiation de la mécano-transduction par SRF dans le muscle squelettique
Figure 23 : L'atrophie par dénervation et restriction calorique : modèle murin et expérimentations
Figure 24 : Les fonctions altérées des muscles atrophiés par dénervation chez les mutants SRF
Figure 25 : L'autophagie
Figure 26 : Les système Ubiquitine-Protéasome
Figure 27 : Les fonctions mitochondriales
Figure 28 : Le transfert et régulation énergétiques
Figure 29 : Statut EOPS versus conventionnel
Figure 29 : Le modèle murin et expérimentation
Figure 30 : La prolifération cellulaire et la motilité
Figure 31 : L'entrée des cellules satellites dans le lignage musculaire et différenciation myogénique
Figure 32 : La fusion des cellules satellites
Figure 33 : L'expression transcriptionnelle de gènes cibles de SRF, et fonctions associées
Figure 34 : La validation de l'expression transcriptionnelle de gènes cibles de SRF
Figure 35 : La surexpression de l'Actine-alpha dans les myoblastes mutants SRF
Figure 36 : La surexpression d'Actine : fusion symétrique versus asymétrique
Figure 37 : La perte de fonction du gène *Egr1*
Figure 38 : La perte de fonction du gène *Fhl2*
Figure 39 : La perte de fonction du gène *Hic5*
Figure 40 : La restauration de l'expression de Krt18 chez les mutants SRF
Figure 41 : Statut EOPS versus conventionnel

Table des tableaux

Tableau 1 : Le typage des fibres musculaires adultes et leur métabolisme
Tableau 2 : Le récapitulatif des gènes cibles de SRF dont les fonctions cellulaires copies le phénotype des mutants SRF

INTRODUCTION

1-Le muscle squelettique adulte

1-1-Le rôle du muscle squelettique adulte

L'activité musculaire engendre la locomotion, une capacité essentielle de la vie, celle de se déplacer et d'effectuer des tâches simples à complexes au quotidien. Elle s'avère primordiale à la prévention et à la cure de maladies chroniques par l'effet bénéfique qu'elle procure [1] [2] et améliore ainsi la qualité de vie des patients. Une meilleure compréhension des mécanismes maintenant l'intégrité musculaire permettra d'identifier des cibles thérapeutiques, et ainsi d'améliorer les conditions de vie humaine.

Le muscle squelettique est l'un des 3 muscles nécessaires au fonctionnement des mammifères, constituant 40% du poids corporel. Il existe environ 640 muscles chez l'homme, divisés en 3 catégories : les muscles lisse, cardiaque et squelettique (figure 1). Le muscle cardiaque distribue l'oxygène nécessaire aux organes, et les muscles lisses tapissent les organes creux comme la vessie, les vaisseaux sanguins et les intestins, leur permettant de se contracter, et d'aider au transit intestinal par exemple. Tous deux se contractent spontanément. A l'inverse, le muscle squelettique est soumis à une demande de contraction par influx nerveux de neurones moteurs, permettant d'induire une motricité. Il est un organe plastique, qui s'adapte aux signaux environnementaux et aux stimulations physiologiques. Le tissus musclulaire squellettique est composé de myofibres plurinucléées post-mitotiques et de cellules souches musculaires, les cellules satellites.

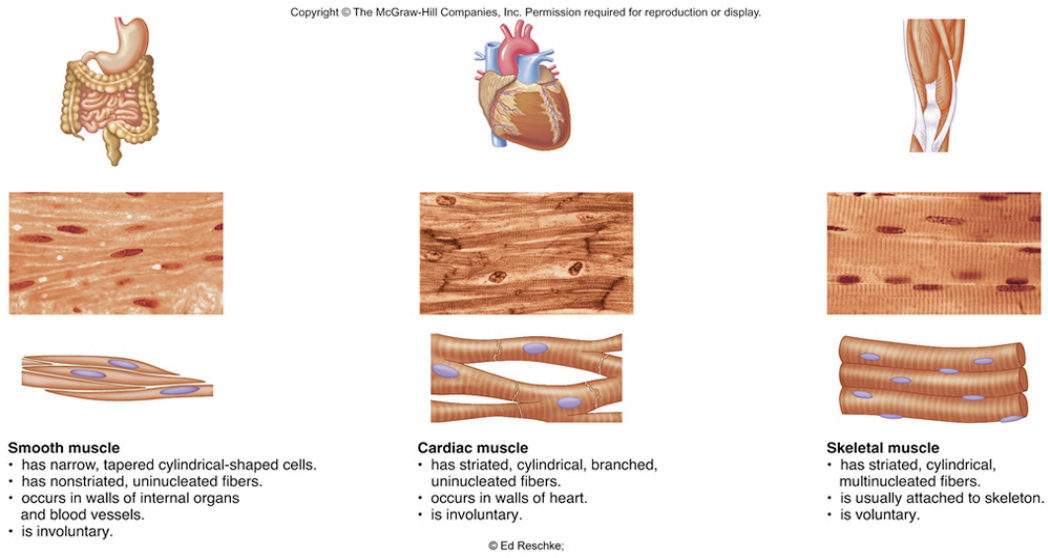


Figure 1 : Les 3 types de muscle. Représentation schématique des organes des muscles lisse cardiaque et squelettique, photos des coupes longitudinales des tissus, et représentation schématique des cellules de chacun des 3 types musculaires (d'après The McGraw-Hill Companies, Inc.).

1-2-La myogenèse

a)-La mise en place muscle squelettique

Le processus de formation du muscle, appelé myogenèse, forme les myofibres à l'issue de l'activation des cellules satellites, de la différenciation des myoblastes, et de la fusion des myocytes. (figure 2). Le terme myogenèse est le processus de formation du muscle pendant le développement embryonnaire par les progéniteurs myogéniques et lors de la régénération dans le muscle adulte par les cellules souches adultes, appelées cellules satellites (figure 3) [3] [4]. La myogenèse adulte est le processus de formation du muscle qui fait intervenir les cellules satellites dans le but de former des fibres musculaires et de maintenir l'homéostasie du muscle.

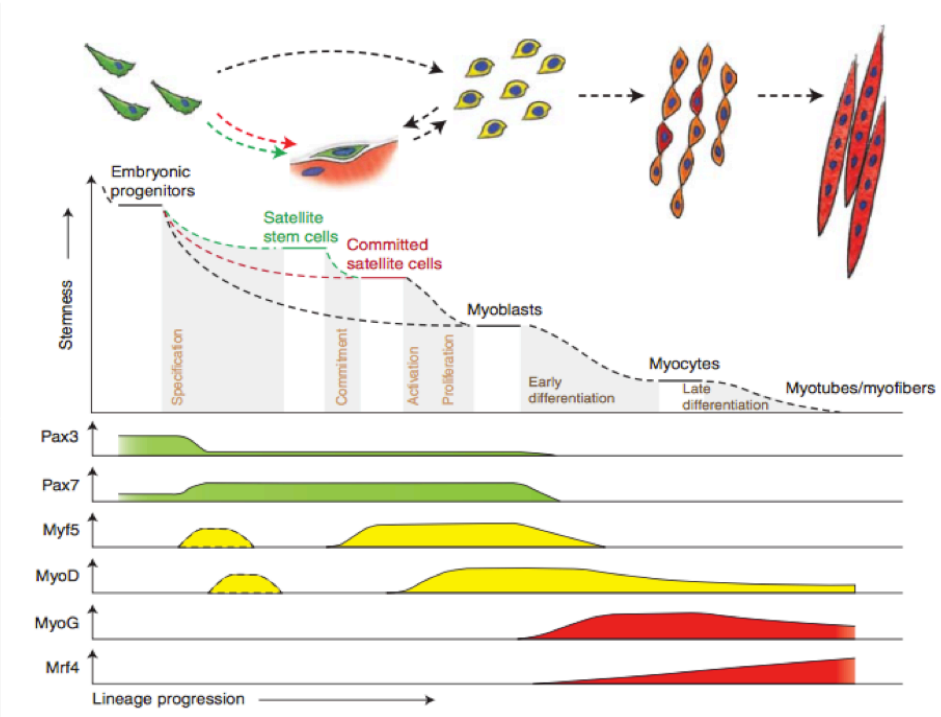


Figure 2 : La myogenèse. Représentation schématique de l'état des cellules au cours de la myogenèse, et de l'expression des facteurs de transcription régulant la myogenèse (d'après Bentzinger, 2012).

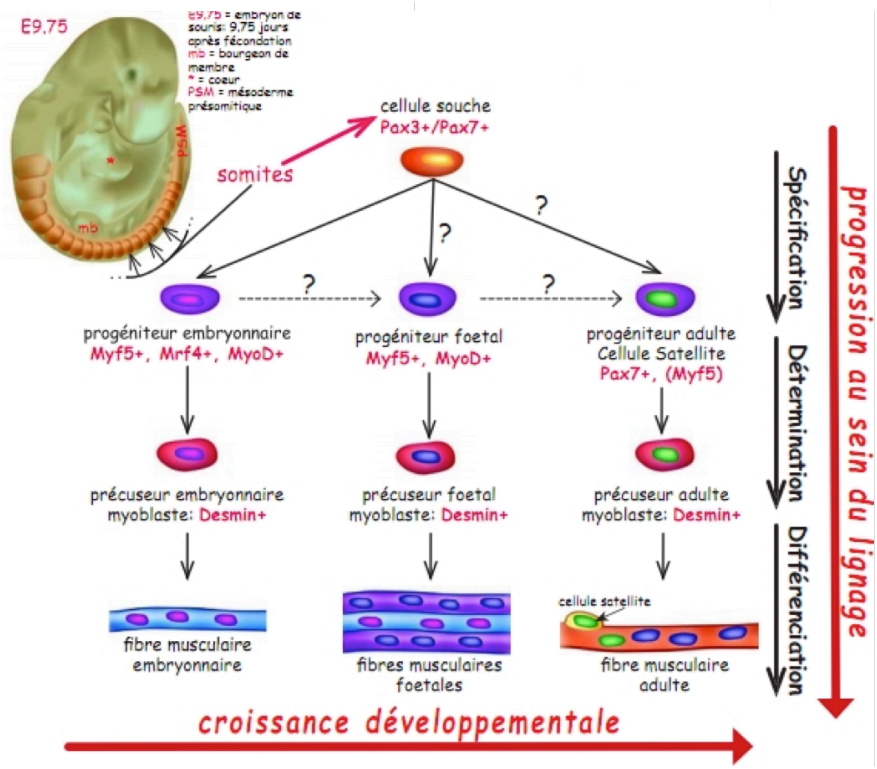


Figure 3 : L'origine embryonnaire des muscles squelettiques. Représentation schématique de la progression des cellules dans le lignage musculaire et expression des marqueurs cellulaires durant la myogenèse et au cours de la croissance développementale, post natale et adulte (d'après Ifremer, Joris et Coll, Biofutur, 2007, Elsavier).

b)-Les progéniteurs embryonnaires au cours du développement

Les progéniteurs proviennent des somites, organe temporaire durant le développement embryonnaire (figure 4). Cet organe se trouve le long du tube neural chez l'embryon, et donne naissance à 3 structures : le sclérotome, partie qui produit les vertèbres, les côtes et les cartilages axiaux, le dermatome à l'origine des tissus conjonctifs sous-jacent de la peau, et le myotome à l'origine des muscles striés squelettiques [5].

Durant le développement embryonnaire a lieu la première phase de myogenèse, appelée myogenèse primaire. Elle s'effectue au niveau des lèvres du dermomyotome et contribue au myotome primaire. Puis la seconde phase de myogenèse, ou encore appelée myogénèse secondaire ou foetale, se poursuit durant le développement embryonnaire et foetal. A ce stade, les fibres vont grossir par fusion et addition de noyaux, augmentant ainsi le volume musculaire des fibres. Les SC résidentes vont migrer à partir de la région centrale du dermomyotome dans le myotome [6].

La myogenèse est régi par la coordination spatio-temporelle de l'expression de voies de signalisation et de cascades transcriptionnelles (figure 2). Les cellules multipotentes mésodermales expriment des gènes spécifiques du muscle, coordonnés par les facteurs de transcriptions myogéniques (MRF), MYF5, MYOD, Myogénine, et MRF4 (aussi appelé MYF6) au cours de leur différenciation dans la lignée myogénique, pour devenir myoblastes, puis myocytes, et enfin myofibres [7] [8].

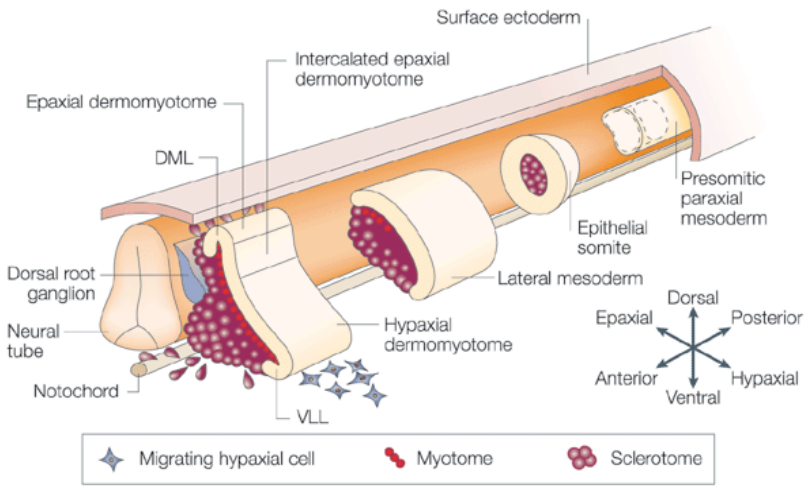


Figure 4 : L'origine embryonnaire des muscles squelettiques. Représentation schématique de la somitogenèse ayant lieu au sein du tube neural, donnant naissance à 3 structures : le sclérotome, le dermatome, et le myotome. DML signifie Dorso-Medial Lip, et VLL Ventro-Lateral Lip (d'après Parker et al., 2003).

1-3-Les cellules satellites

Les cellules satellites, qui sont des progéniteurs adultes, vont permettre le remodelage des myofibres durant la croissance post-natale, leur remodelage suite à une surcharge de travail et leur régénération suite à une blessure chez l'adulte (figure 5).

Chez l'adulte, les cellules satellites sont des petites cellules mononuclées multipotentes en quiescence se situant tout du long et à la périphérie des myofibres, entre la membrane des fibres musculaires, le sarcolemme, et la lame basale (figure 6) [9]. Ces cellules expriment PAX7, un marqueur spécifique des cellules satellites. A l'inverse des cellules souches hématopoiétiques, elles ne se divisent que très rarement, afin de limiter les erreurs de réplication fréquentes et ainsi les risques de mutations [10]. Cependant lors d'une blessure ou de myopathies, ces cellules entrent à nouveau dans le cycle cellulaire, s'activent (expression de *MyoD*) et prolifèrent, puis vont entrer en

différenciation myogénique (expression de la Myogénine) et fusionner. Elles vont, soit fusionner entre elles pour former de nouvelles fibres (régénération), soit fusionner avec les fibres déjà existantes afin de réparer les dommages des fibres musculaires, ou bien augmenter leur volume (hypertrophie).

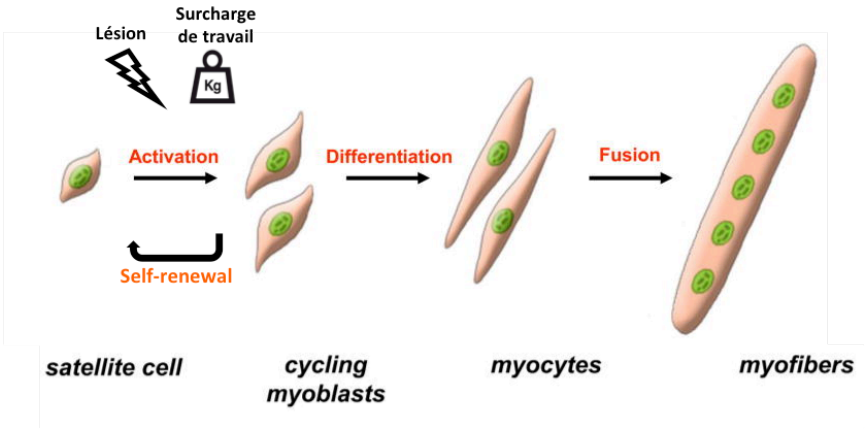


Figure 5 : La myogenèse adulte. Représentation schématique de l'état des cellules au cours de la myogenèse. Chez l'adulte, une lésion ou surcharge de travail induit l'activation des cellules satellites quiescentes. Les cellules actives (les myobastes) vont ensuite proliférer, se différencier en myocytes et fusionner entre eux pour former une nouvelle fibre ou fusionnner aux fibres en croissance. Une sous population de myoblastes retournent en quiescence afin de constituer un nouveau pool de cellules satellites quiescentes (adapté de Le Grand et Rudnicki, 2007 ; Wang et Rudnicki, 2012).

Certaines reforment le pool de cellules satellites de la niche, tout d'abord par leur maintien en activation par la répression épigénétique de l'inhibiteur du cycle cellulaire P21, PRMT5 [11], puis entrent à nouveau en état de quiescence en sortant du cycle cellulaire [10]. Leur état de quiescence est maintenue par l'expression de micros ARN (miRNAs) [12] et par l'activation de la voie Notch [13]. Leur état indifférencié est quant à lui, assuré par la méthylation de la chromatine réprimant l'expression de *MyoD*, par l'activité de l'enzyme Suv4-20H1 (enzyme de modification des histones) [14].

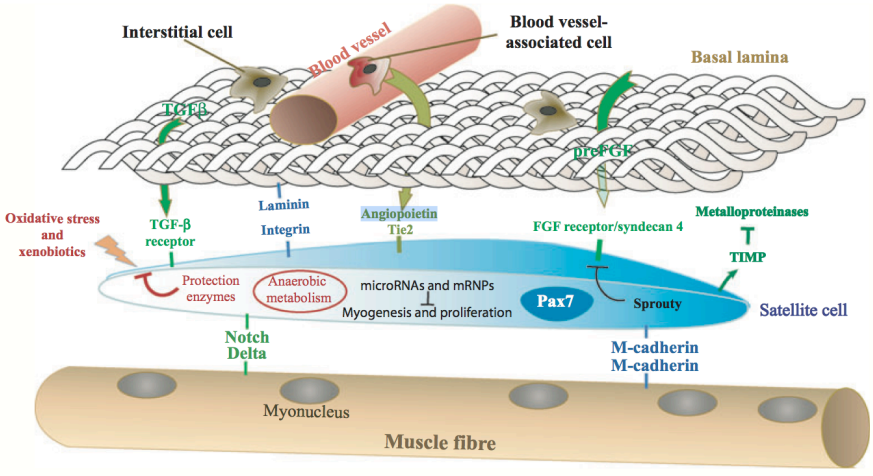


Figure 6 : Les cellules satellites en quiescence. Représentation schématique des cellules satellites en quiescence dans leur niche, située entre la membrane des fibres musculaires et la lame basale, représentant les facteurs exprimés et sécrétés dans les différents composants de la niche (d'après Montarras, L'honoré et Buckingham, 2013).

1-4-Les fibres musculaires

Ces cellules sont les plus grandes du corps humain après les neurones. Elles sont plurinucléées et perdent la capacité de se diviser. Elles possèdent le plus grand réservoir de protéines et acides aminés du corps [15].

1-4-1-Le système contractile des fibres musculaires

Un même muscle squelettique peut être sollicité pour le maintien de la posture (activité de faible intensité), la locomotion (répétition de contractions d'intensités relatives) ou encore la pratique du sport (contractions rapides et intenses). Les cellules qui le composent, les fibres musculaires, sont alors très hétérogènes, car elles vont être utilisées différemment. La consommation énergétique de cette sollicitation est importante ; les fibres sont capables de convertir l'énergie chimique en énergie mécanique et en chaleur.

Un muscle est composé de dizaines, voire de milliers de fibres musculaires. Elles sont attachées aux extrémités des os par les tendons, et mesurent plusieurs centimètres de long pour 25 à 150 um de large. Ces fibres sont elles-mêmes composées de myofibrilles constituées d'unités motrices, les unités contractiles appelées sarcomères. Ces unités initient la contraction du muscle par la compression des disc-Z des sarcomères, à la suite d'une stimulation nerveuse, par l'interaction des chaînes de Myosine et d'Actine qui les composent (figure 7). Les filaments fins d'Actine ont besoin des ions calcium afin de fonctionner.

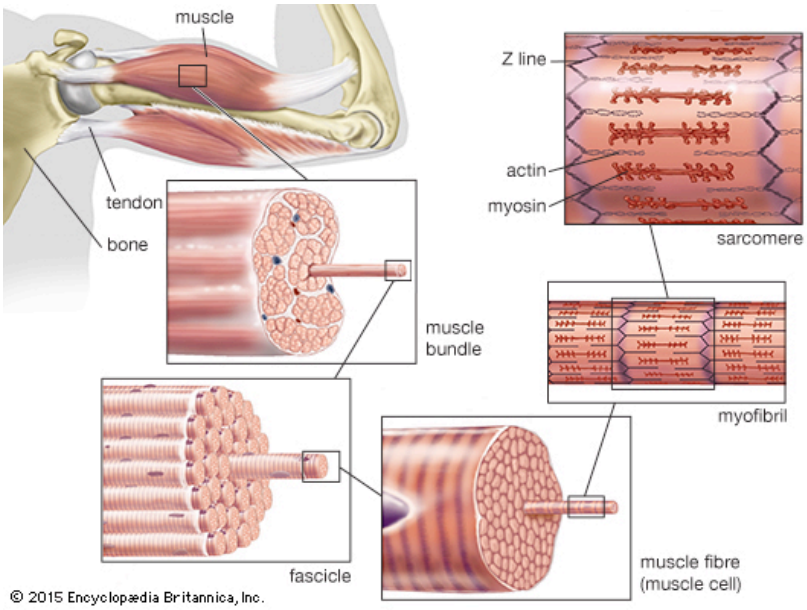


Figure 7 : La structure du muscle squelettique. Représentation schématique de la structure du muscle squelettique : l'organe, les fibres musculaires, les myofibrilles, les sarcomères (d'après Encyclopaedia Britannica, Inc., 2015).

En effet, les myofibrilles sont stimulées par les motoneurones. Le signal de demande de contraction arrive à la terminaison axonale, et par un jeu d'échange de sodium et de calcium à travers les canaux ioniques provoquant la libération de l'acétylcholine (ACh) est déversée à la jonction neuromusculaire. L'ACh est un neurotransmetteur du signal de contraction ; il se lie aux récepteurs nicotiniques à la surface de la membrane musculaire, appelée le sarcolemme, et provoque l'ouverture des canaux ioniques. L'entrée de sodium par ces canaux, induit la dépolymérisation de la membrane et provoque l'entrée de calcium dans le cytoplasme des myofibrilles par le potentiel d'action. Ce dernier se déplace ensuite le long du sarcolemme et passe dans les tubules transversaux (tubules-T). Le potentiel d'action au niveau des tubules-T modifie la conformation du récepteur dihydropyridine

(DHP). Un changement de voltage au niveau des canaux de ces tubules induit la sortie du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique, et le libère dans le cytoplasme au niveau des sarcomères (figure 8).

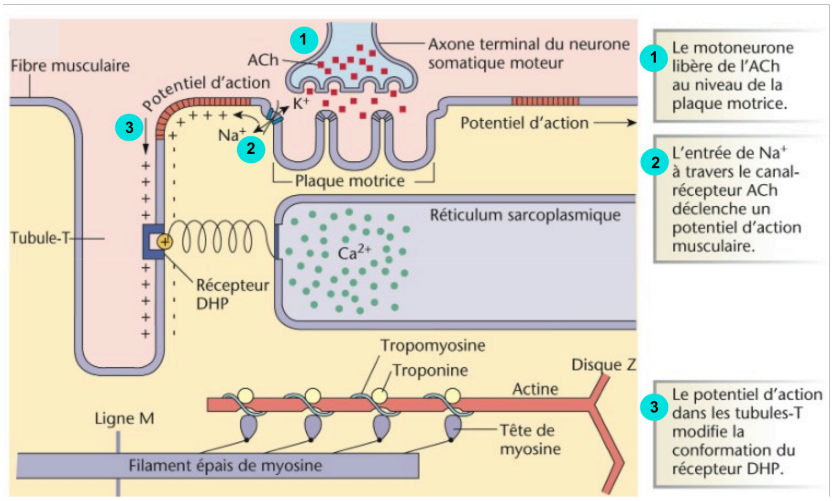


Figure 8 : La transmission neuromusculaire. Représentation schématique de la transmission neuromusculaire au niveau de la membrane des fibres musculaires, initié par la sécrétion d'Acétylcholine (Ach). Représentation du cheminement du potentiel d'action jusqu'au récepteur Dihydropyridine (DHP) et des échanges ioniques induisant la contraction musculaire. (d'après https://lesbenzodiazepinesdanslorganisme.wordpress.com/2015/02/01/les-mecanismes-de-la-contraction-musculaire/).

De façon minoritaire en comparaison à l'activité du réticulum sarcoplasmique, les mitochondries participent à l'absorption du calcium, permettant le relachement musculaire. La contraction musculaire est quant à elle induite par le relargage du calcium. Les mitochondries sont situées soit sous le sarcolemme, soit plus profondément dans les fibres, au niveau des pompes à calcium. Elles absorbent le calcium durant la contraction et le relarguent rapidement lors du relâchement musculaire (figure 9).

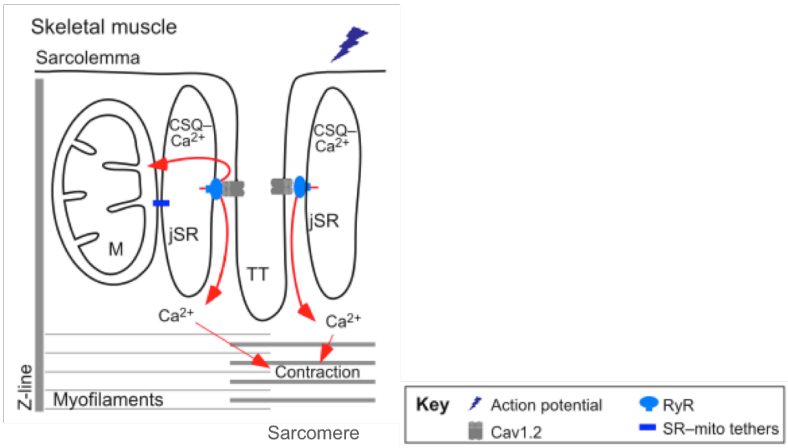


Figure 9 : L'organisation de la voie calcique de l'appareil contractile du muscle squelettique. Représentation schématique de l'appareil contractile du muscle squelettique. Les sarcomères sont interrompus par des invaginations du sarcolemme, appelées les tubules transversaux (TT), juxtaposés au réticulum sarco-endoplasmique (SR). Les canaux calciques dépendant du voltage sont concentrés dans les TT, alors que les récepteurs à la Ryanodine (RyRs) sont présents dans le SR. Le SR garde en réserve la majorité du calcium, lié aux calsequestrines (CSQ). Lors du passage du potentiel d'action le long du sarcolemme et du TT, le calcium est libéré dans le cytoplasme au niveau des chaînes d'Actine et de Myosine pour initier la contraction musculaire. Contrairement au cœur dont l'appareil contractile est organisé en diade, le muscle squelettique possède un appareil contractile en triade, comprenant deux SR pour un TT (d'après Eisner, Csordas & Hajnoczky, 2013).

A l'état relâché, les protéines Troponine se lient aux filaments fins d'Actine, empêchant ainsi les têtes de Myosine de s'y fixer et d'induire la contraction des sarcomères. Lorsque les ions calcium se lient à la Troponine, ils engendrent un changement de conformation des sites de liaison aux têtes de myosine des filaments d'Actine, autorisant ainsi l'interaction Actine-Myosine ce qui induit la contraction. L'ATP lié aux têtes de myosine provoque la relaxation des têtes de Myosine aux filaments d'Actine ; le relargage au cycle suivant de l'ADP+Pi déclenche quant à lui la contraction par liaison des têtes de Myosine aux filaments d'Actine (figure 10).

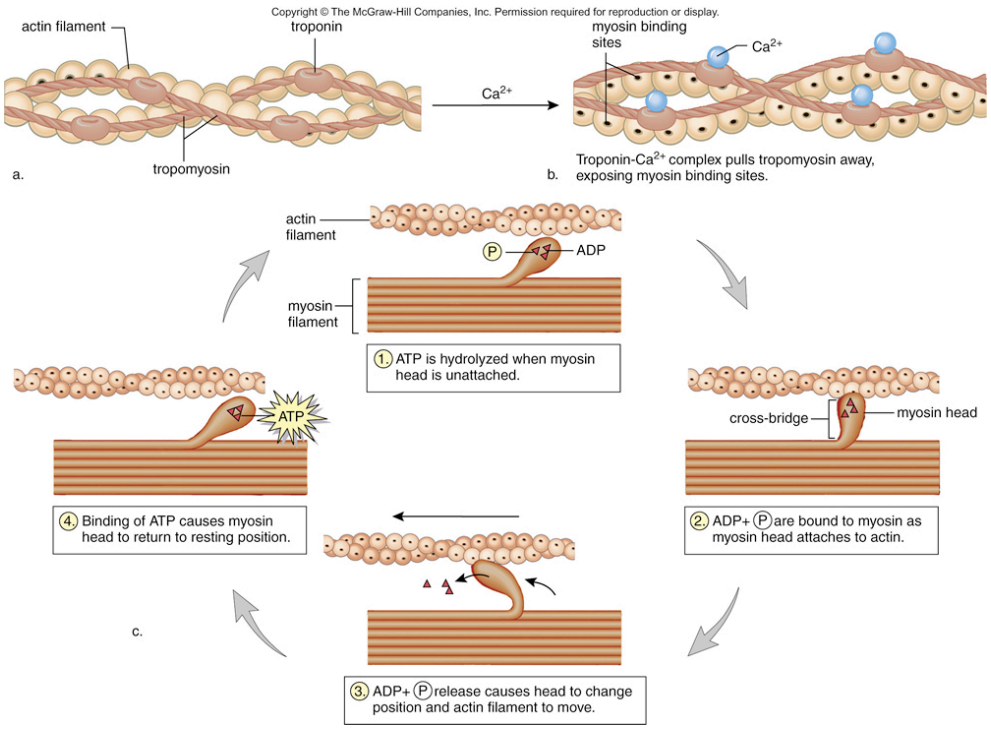


Figure 10 : Les étapes du cycle de contraction des fibres musculaires. Représentation schématique de la structure des filaments d'Actine. L'interaction des têtes de Myosine aux filaments d'Actine, induisant le mouvement contractile des fibres musculaires, est dépendante de l'hydrolyse de l'ATP en ADP (d'après The McGraw-Hill Companies, Inc.).

1-4-2-Le typage des fibres musculaires

Il existe dans la classification des muscles squelettiques, 2 types de fibres, les fibres dites lentes et les fibres dites rapides. Le tableau 1 (adapté de la revue [16] regroupe les caractéristiques de ces 2 types de fibres. Les fibres lentes, ont un métabolisme oxydatif, et les fibres rapides ont un métabolisme lent glycolytique à rapide. Le *Soleus* (SOL) est un muscle majoritairement constitué de fibres lentes ; le *Gastronemius* (GAS), le *Tibialis anterior* (TA) et le *Plantaris* (PL) sont quant à eux des muscles à fibres rapides. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires dans les muscles composés majoritairement de fibres rapides, le *Gastronemius*, le *Plantaris* et le *Tibialis anterior*.

La transmission neuromusculaire se fait à basse ou haute fréquence selon la demande d'activité et selon les types de fibres à stimuler.

Le typage des muscles squelettiques semble être corrélé à la vitesse de contraction, au développement du réticulum sarcoplasmique, à la résistance à la fatigue, au contenu en mitochondries, et à l'épaisseur des filaments d'Actine et de Myosine qui composent les sarcomères.

Fibres lentes	Fibres rapides

Chaîne lourde de Myosine de type I	Chaîne lourde de Myosine de type IIa	Chaîne lourde de Myosine de type IIb
Sarcomères : Filaments épais de Myosine	Sarcomères : Filaments fin d'Actine	Sarcomères : Filaments épais de Myosine
Métabolisme oxydatif	Métabolisme oxydatif-glycolytique	Métabolisme glycolytique
Muscle rouge	Muscle blanc	
Résistant à la fatigue-Activité sur la durée	Non résistant à la fatigue-Activité ponctuelle et intense	
Reticulum sarcoplasmique peu développé	Reticulum sarcoplasmique hautement développé	
Absorption du calcium lente	Absorption du calcium rapide	
Nombre de mitochondries élévé	Nombre de mitochondries faible	Nombre de mitochondries élevé
Lignes-Z épaisses	Lignes-Z fines	Lignes-Z épaisses
Succinate déhydrogenase élevée	Succinate déhydrogenase élevée	Succinate déhydrogenase faible
Soleus	*Tibialis anterior/Gastronemius/Plantaris*	

Tableau 1 : Le typage des fibres musculaires adultes et leur métabolisme. Classification des fibres musculaires squelettiques lentes et rapides. Description des 2 types de fibres selon leur composition en Myosine, leur métabolisme, leur activité énergétique, la structure des sarcomères et exemples de muscles associés (adapté de Schiaffino et Reggiani, 2011).

1-4-3-Le transfert énergétique

La réaction de la **Créatine Kinase** (CK) joue un rôle central dans le transfert énergétique cellulaire pour la contraction musculaire, via la Phosphocréatine (CrP) [17]. Le transfert d'énergie se fait par l'interconnexion des mitochondries et du cytoplasme des cellules via la respiration mitochondriale stimulée par la CK. Cette interconnexion est appelée « navette CrP/Cr », où la CrP est un transporteur d'énergie (figure 11) [18].

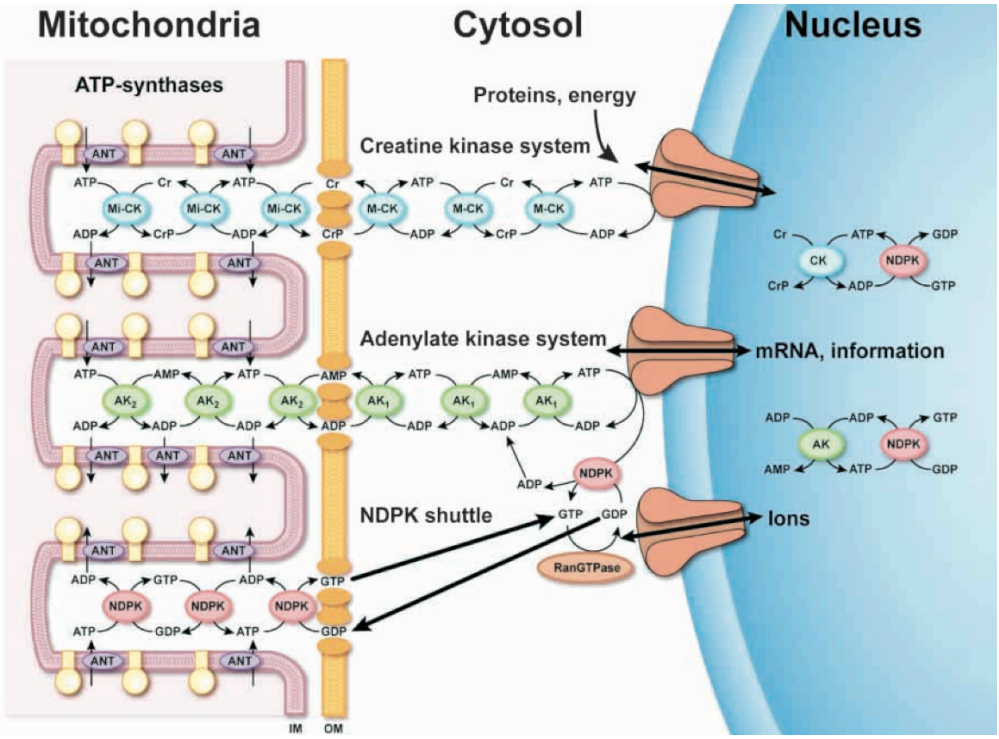


Figure 11 : Le transfert d'énergie. Représentation schématique du transfert d'énergie des mitochondries au cytoplasme, via des navettes catalysant l'ATP en ADP. Le transfert d'énergie fait intervenir les enzymes créatine kinase mitochondriale (Mi-CK) et musculaire (M-CK), et adénylate kinases mitochondriale (AK2) et musculaire (AK1). Dans le cas du transfert via la CK, le passage de la membrane externe mitochondriale se fait via la « navette CrP/Cr » (d'après Dzeja et Terzic, 2003).

Les CK sont des guanidino kinases qui catalysent le transfert réversible d'un résidu phosphate riche en énergie entre l'ATP et la créatine (Cr), et génèrent ainsi de l'ADP et un transporteur de liaison phosphate riche en énergie: la phosphocréatine. La réaction a été découverte par [19] : Cr^{+} $MgATP^{2-}$ = CrP^{2-} + $MgADP^{-}$ + H^{+}. Il existe une forme cytosolique de la CK (CKm) et une forme mitochondriale, localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial (CKmit) [20] [21].

Dans la mitochondrie, où la concentration d'ATP est toujours très importante, la CKmit par la « navette CrP/Cr », catalyse la conversion de la Cr en CrP, impliquant la conversion de l'ATP en adénosine diphosphate (ADP). Cette réaction est réversible et permet le déplacement et donc la diffusion de la CrP vers le cytoplasme à des sites spécifiques à forte demande en énergie, où l'ATP sera consommé [22] [23]. Dans le cytoplasme, l'isoforme CKm prend le relais de la CKmit. L'ATP formé est ensuite utilisé par les ATPases permettant l'excitation et la contraction musculaire, alors que la Cr retourne à la mitochondrie. Dans les myofibrilles, le couple myosin-ATPase permet la diffusion de l'énergie ; dans le cytoplasme, les ATPases sont en étroite relation avec les pompes à calcium [24] [25].

Il a été montré un remodelage au niveau fonctionnel, métabolique et structural des muscles squelettiques rapides chez des souris déficientes en isoformes cytosoliques et/ou mitochondriales de la CK [26]. Ces souris présentent une perte de masse musculaire importante.

La CrP, par l'intermédiaire de l'ATP, constitue ainsi un réservoir d'énergie rapidement utilisable pour les muscles et d'autres organes comme le cerveau (métabolisme anaérobie lactique). Cependant, la réserve de CrP permet seulement de maintenir un effort d'une très courte durée. Cette voie de production d'énergie laisse très vite place (au bout d'une dizaine de secondes) à d'autres voies de production d'énergie : la dégradation du glucose en acide lactique (métabolisme anaérobie lactique) puis à la respiration cellulaire (métabolisme aérobie) qui prend le relais au bout d'environ deux minutes jusqu'à la fin de l'exercice musculaire.

A l'image de la CK, l'adénylate kinase (AK), une enzyme en aval de la voie de signalisation AMP (adénosine monophosphate), permet de réguler l'apport énergétique par des réactions en chaîne de phosphotransfert [27] [28] [29]. Ak est décrit comme étant indispensable au contrôle énergétique des cellules. Des muscles de souris dont le gène *Ak1* est inhibé, consomment plus de molécules d'ATP par contraction, alors qu'ils présentent une même résistance à la fatigue et un même niveau de contraction [30].

Il a été montré une interaction entre l'activité CKm et AK dans le transfert et la régulation énergétique, dans des muscles du diaphragme de rats [31]. En cas de défaut de la phosphoryation oxidative par la CKm, l'ADP normalement phosphorylée par l'ATPase de la CrP devient le substrat de l'AK dans le métabolisme glycolitique anaérobic.

1-4-4-Le métabolisme énergétique

Les muscles ont besoin d'une grande quantité d'énergie pour se contracter et engendrer le mouvement. Ils puisent l'énergie nécessaire dans l'alimentation et l'oxygène inhalé (figure 12).

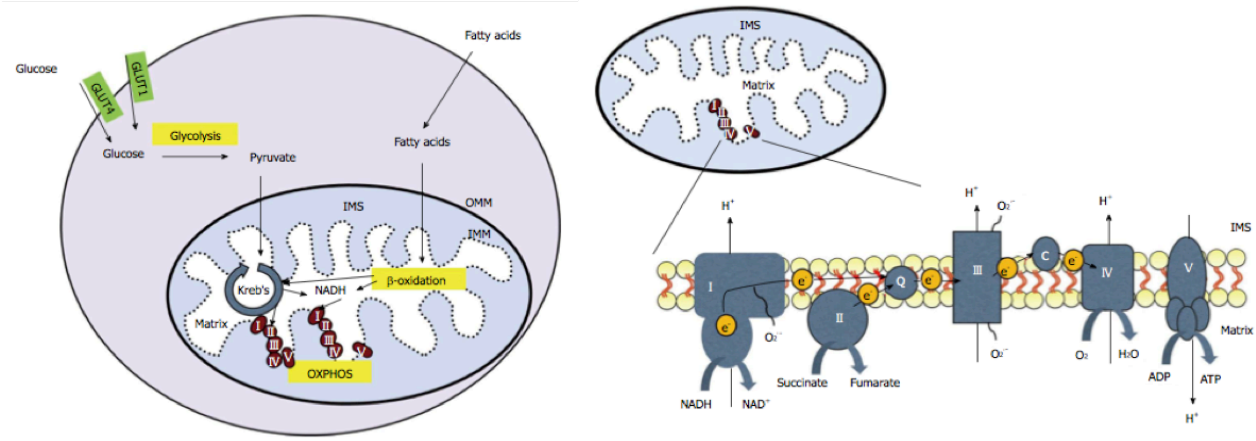


Figure 12 : La production d'énergie par la mitochondrie. Représentation schématique de la production d'énergie cellulaire par la mitochondrie, via le cycle de Krebs et la chaine respiratoire. La chaîne respiratoire est localisée à la membrane interne. Elle permet le transfert des électrons via le complexe I, le complexe II, le coenzyme Q10, le complexe III, le cytochrome c, le complexe IV afin de produire de l'ATP via le complexe V (d'après O'Brien et Gorgey, 2016).

a)-La glycolyse

La glycolyse est la voie métabolique majoritaire pour la production d'énergie des fibres lentes. Le glucose ingéré est transformé en pyruvate par la glycolyse en présence d'oxygène dans le cytoplasme des cellules. Une réaction de décarboxylation oxydative va transformer ce pyruvate en acetyl-coenzyme A (Acetyl-coA) au niveau de la matrice des mitochondries. Une molécule de glucose produit 2 molécules d'ATP et du CO2. Le pyruvate formé par enchaînement de réactions d'oxydoréduction, ne nécessitant pas d'oxygène, sera alors utilisé comme substrat dans le cycle de Krebs (dans le compartiment mitochondrial), ou en fermentation anaérobie (dans le cytoplasme). Les réactions d'oxydoréduction ont pour but de produire l'ATP et des coenzymes réduits qui devront être réoxydés afin d'assurer la pérennité du système.

b)-Le métabolisme mitochondrial

Les mitochondries sont des organelles des cellules de mammifères dont le rôle principal est la production d'énergie. Elles sont autonomes, elles ont leur propre biogenèse, et elles sont capables de procéder à leur remodelage et leur dégradation. Les organes les plus demandeur en énergie sont le cerveau, le coeur et les muscles squelettiques, ce qui explique pourquoi ces organes présentent généralement un dysfonctionnement de l'activité mitochondriale dans de nombreuses pathologies. Les fibres rapides sont constituées d'un nombre élevé de mitochondries, leur conférant un apport énergétique conséquent.

Le cycle de Krebs, encore appelé cycle des acides carboxyliques (acide citrique), est une voie métabolique dont la fonction est d'oxyder les groupes acétyle, issus de la dégradation des glucides, des graisses et des protéines, pour en récupérer l'énergie sous forme d'électrons. L'acetyl-coA va produire du NADH, H+ et du FADH2, et ainsi libérer des électrons ayant un gros pouvoir réducteur. Ces électrons vont ensuite circuler à travers la chaîne respiratoire pour permettre à leur tour la formation de molécules d'ATP supplémentaires par la phosphorylation oxydative. Cette conversion nécessite l'intervention de 8 enzymes localisées dans la matrice mitochondriale. La première est la citrate synthase (CS) dont le substrat est l'acetyl-coA. Ces protons, s'accumulent dans l'espace intermembranaire des mitochondries et vont être pris en charge par la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne de la mitochondrie.

C'est dans **la chaine respiratoire** qu'aura lieu le transfert d'énergie chimique d'oxydo-réduction grâce à une série de transporteurs d'électrons. Ces transporteurs sont des complexes protéiques dont les propriétés d'oxydo-réduction sont dues à leurs groupements prosthétiques. Trois d'entre eux sont des transporteurs de protons : les complexes I, III et IV.
Le complexe I, appelé aussi NADH déshydrogénase, a un site de liaison au NADH, H+ et peut prendre en charge 2 électrons. Il produit des protons, qui seront transloqués vers la matrice mitochondriale. **Le complexe II**, la succinate déshydrogénase, assure le transfert d'électron grâce au FADH2 produit via son coenzyme le FAD. **L'ubiquinone**, protéine mobile de la chaine respiratoire, reçoit les électrons des complexes I et II. Elle se réduit en ubiquinole et ainsi diffuse les électrons jusqu'au complexe III où elle s'oxyde à nouveau en ubiquinone. Elle agit comme navette d'électrons dans l'espace intermembranaire. **Le complexe III**, cytochrome bc-1, quant à lui transfère les électrons provenant de l'ubiquinone oxydée au cytochrome c en libérant des protons vers l'espace intermembranaire. Ce complexe relaie les électrons du cytochrome c à la cytochrome oxydase du **complexe IV**. Ce dernier réduit le dioxygène en eau et permet la translocation de protons à la matrice. Enfin, l'ATP synthase, **complexe V**, catalyse l'oxydation phosphorylante de l'ADP en ATP en dissipant le gradient de protons de l'espace intermembranaire à la matrice mitochondriale. L'ATP produit est converti en énergie mécanique, dans le cas du muscle.

1-5-La plasticité du muscle squelettique

Le muscle est en continuelle adaptation selon les demandes extérieures, qui vont du simple maintien de la posture à un effort intense comme la pratique du sport. On parle du muscle comme d'un organe plastique ; il peut s'atrophier en réponse à une diminution en apport de nutriments, à une immobilisation, ou à un défaut d'innervation. A l'inverse, il est capable de s'hypertrophier en réponse à une surcharge de travail. En cas de blessure, les fibres sont en mesure de régénérer les cellules lésées (figure 13). De plus, la plasticité musculaire peut être causée par une modification de la sollicitation des muscles avec un changement de typage des fibres. Il est capable de s'adapter selon les exercices de résistance, induisant l'augmentation de la masse musculaire ou bien selon les exercices d'endurance où les fibres perdent en volume cytoplasmique.

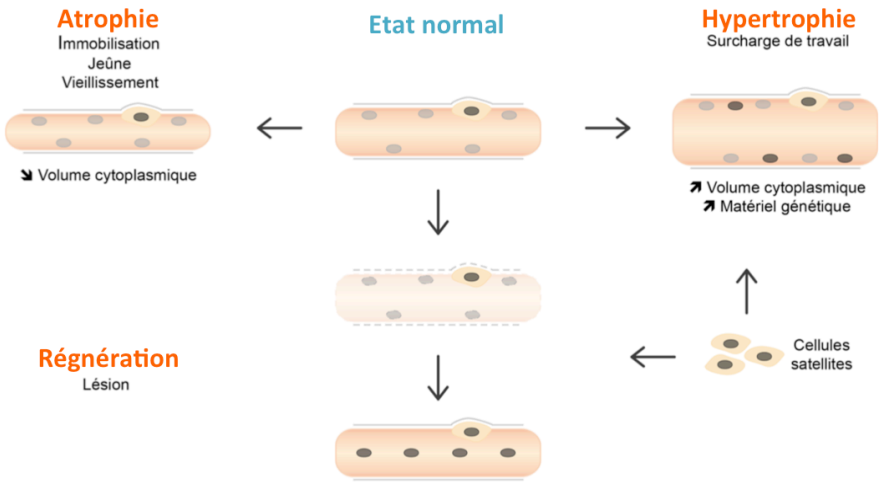


Figure 13 : La plasticité musculaire. Représentation schématique de la plasticité cellulaire : l'atrophie, l'hypertrophie et la régénération musculaire.

1-5-1-L'hypertrophie

L'hypertophie est définie par une augmentation de la taille des fibres. Cette augmentation de taille, peut être soit due à un surcroit de la synthèse protéique, soit à l'ajout de matériel génétique (nouveau noyaux) à la myofibre par la fusion de cellules satellites.

a)-Les voies de signalisation importantes pour la croissance des fibres

Le muscle squelettique est continuellement en remaniement, du point de vue de sa structure et de son environnement mécanique, régi par la balance entre synthèse et dégradation protéiques, ainsi que par la voie du calcium [32] [33] [34]. De nombreuses voies interviennent dans la croissance des fibres, illustrées par le schéma en figure 14.

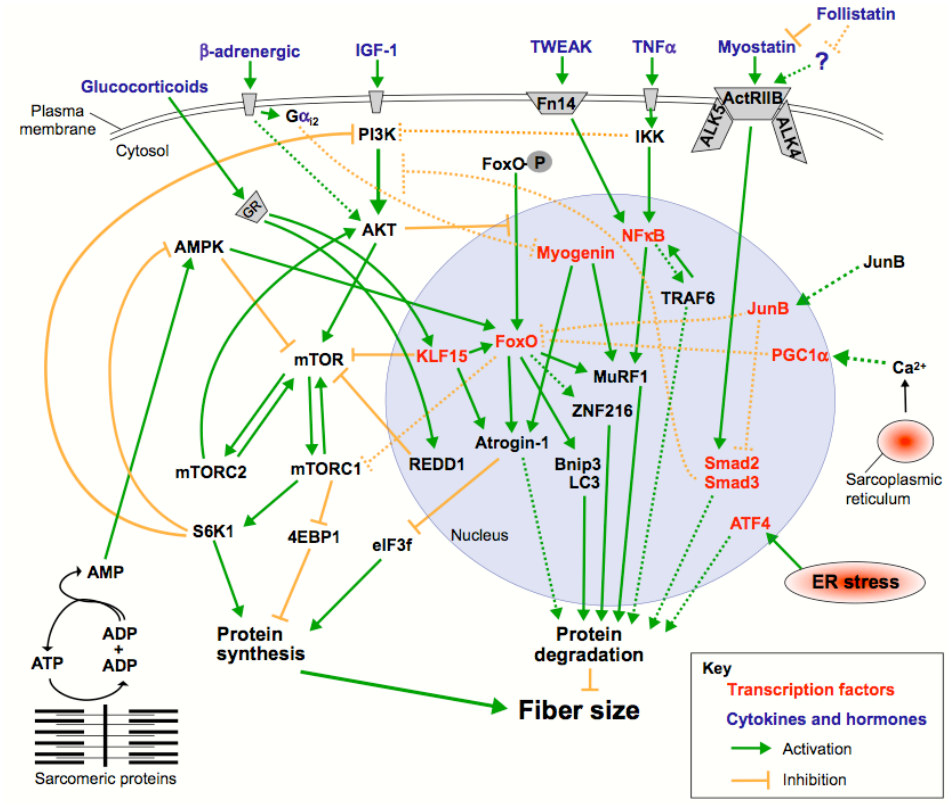


Figure 14 : Les voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire. Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire, faisant intervenir la voie PI3K/AKT via IGF1, la voie mTOR, la voie des E3 ubiquitine ligases (MAFbx/Atrogin-1 et MuRF1), la famille des MAPK via 4EBP1 et la voie du calcium (d'après Bonaldo et Sandri, 2013).

La masse musculaire peut être induite par l'activation de **la voie PI3K/AKT** via l'induction de l'Insulin-like Growth Factor 1 **(IGF1)** [35] [36] [37]. La voie PI3K/AKT contrôle à la fois la synthèse et la dégradation protéiques par la régulation de trois cibles d'AKT [38]. AKT active mTOR, qui stimule la synthèse protéique *via* la phospho-S6 kinase et EIF4EBP1 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1), ce dernier libérant le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E). De plus, le complexe eIF4F est un facteur clé à l'initiation de la traduction, en se liant aux molécules d'ARNm. La phosphorylation de 4E-BP1 via mTOR (the mammalian target of rapamycin) induit la formation du complexe eIF4F et conduit à la traduction et à la synthèse protéique [39].

Les E3 ubiquitine ligases MAFbx/Atrogin-1 et MuRF-1 sont des médiateurs importants de la protéolyse par le système ubiquitine-protéasome. Leur transcription est régulée négativement par les facteurs de transcription de la famille FOXO, via [40] [41]. Il a notamment été démontré que des souris chez lesquelles AKT est activé présentent une hypertrophie musculaire et une résistance à l'atrophie musculaire induite par dénervation [42] [43].

L'activation de **mTOR** engendre une augmentation de la synthèse en protéine [44], et l'activation de mTOR contribue à l'hypertrophie majoritairement des fibres de type 2 [45]. Lors d'inactivité ou de jeûne, AMPK inhibe la voie mTOR et conduit à l'activation de voies de dégradation via le facteur de transcription FOXO, qui sont l'autophagie et le système Ubiquitine-Protéasome (UPS). Ces systèmes induisent une atrophie du muscle squelettique [46] [47] [48]. L'isoforme PGC-1alpha4 (peroxisome proliferator-activated receptor c coactivator-1alpha) est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de gènes ; il induit le recrutement de IGF1 et la dérégulation de l'expression de la myostatine. De plus, la surexpression de PGC-1alpha4 conduit à l'augmentation de la taille des muscles [49].

La famille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) est impliquée dans l'hypertrophie musculaire en réponse à l'exercice. Les MAPK P38 permettent, d'une part, de promouvoir la synthèse protéique en activant le facteur d'initiation de la traduction EIF4E et, d'autre part, de favoriser la différenciation myogénique en phosphorylant MYOD et en activant P21 et la Myogénine [50] [51] [41].

La follistatine (soluble ligand-binding domain of ac- tivin receptor type IIB fused to the Fc domain IgG) est un inhibiteur physiologique de la myostatine [52] [53] [54]. **La myostatine** fait partie de la famille TGF-béta, qui est un régulateur négatif de la masse musculaire. En effet, une inhibition du gène de la myostatine induit une augmentation de la masse et de la force musculaire [55] [56]. L'hypertrophie observée est due à l'augmentation de la synthèse protéique des fibres musculaires, via l'activation de SMAD1/5 [57] et la voie IGF1R/Akt/mTOR [58] [59].

La régulation métabolique par l'AMPK régule la croissance des fibres musculaires. Chez les mammifères, les cellules doivent maintenir une balance énergétique stable afin d'assurer la fonction des organes. Tous les organismes ont donc développé des mécanismes pour adapter leur métabolisme aux contraintes externes variables. En effet, les cellules doivent être en mesure de palier un déficit en apport énergétique (glucose, acides aminés, O2), ou à une demande en énergie plus importante (croissance, régénération, effort sportif). Afin de garder une homéostasie énergétique à l'équilibre selon les contraintes externes, l'hypothalamus contrôle la prise alimentaire et la dépense énergétique. L'AMPK, a un rôle de senseur métabolique afin de réguler les modifications énergétiques (figure 15) [60].

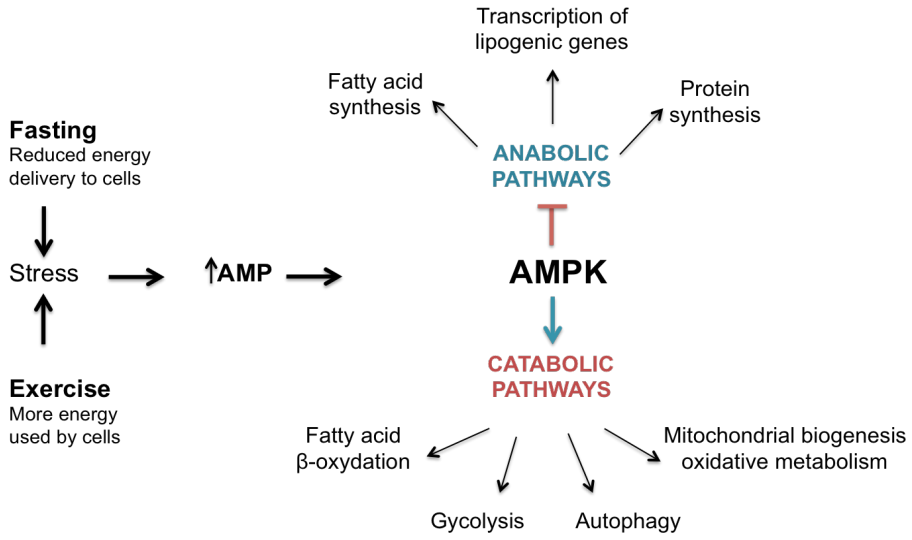


Figure 15 : L'AMPK. Représentation schématique de l'activité régulatrice du senseur métabolique AMPK, inhibant les voies anaboliques et activant les voies cataboliques, suite à un stress induit à la suite d'un jeûne ou un exercice musculaire (adapté de Spasic, Callaerts et Norga, 2009).

La voie du calcium participe à la croissance des fibres musculaires. Pendant un exercice, des expériences ont montré que le calcium était responsable d'hypertrophie [61] et que son augmentation engendrait la stimulation de l'activité de la calcineurine. La calcineurine, une phosphatase, comme cofacteur au facteur de transcription GATA2, intervient dans la régulation de l'expression de gènes [62]. De plus, il a été montré que la calcineurine et le facteur nucléaire des cellules T (NFAT) régulaient l'expression du facteur de transcription MYF5 dans les cellules satellites [63]. La déphosphorylation des NFAT par la calcineurine promeut la croissance des fibres par leur accumulation nucléaire. De plus, la calcineurine régulerait l'expression des facteurs de transcription MEF2, MYOD et Myogénine, et contrôlerait la différenciation précoce des cellules musculaires [64] [63] [65]. NFATc2 régulerait l'expression d'IL-4 [66].

b)-La contribution des cellules satellites

Il a récemment été publié que l'hypertrophie du PL en réponse à une surcharge de travail était dépendante des cellules satellites [67]. Ces travaux vont dans le sens opposé de travaux plus anciens qui avaient montré que les SC n'étaient pas indispensables à l'hypertrophie du PL, après ablation du GAS et SOL [68]. D'autres travaux, basés sur des modèles dont la myostatine est inhibée, montrent une hypertrophie par l'augmentation de la taille du domaine myonucléaire (MND), correspondant à une augmentation de la taille des fibres mais sans ajout de nouveaux noyaux [69] [70] [71] [72] [73]. Le domaine MND est le volume de cytoplasme dont la transcription et la traduction protéique sont régulées par un noyau. Cependant, les fibres hypertrophiées ne semblent pas être complètement fonctionnelles et n'ont pas récupéré leur force initiale (hypertrophie pathologique) [74] [75] [76], alors que l'étude d'Egner montre une amélioration de la force de contraction (hypertrophie physiologique).

c)-Les signaux paracrines

L'inflammation joue également un rôle dans la plasticité musculaire, via l'interleukine IL-6 au cours de la prolifération [77] [78] et IL-4 lors de la fusion [79]. Il-6 régule des voies de signalisation telles que MEK-ERK MAPK, par la voie de signalisation JAK/STAT [80] [81]. En réponse à un signal mécanique, SRF dans les myofibres, stimule la prolifération et la fusion des SC par l'expression d'IL-6 et d'IL-4 respectivement, et induit une hypertrophie par fusion des SC.

1-5-2-L'atrophie

L'atrophie est la conséquence de la vieillesse, du jeûne ou de la malnutrition, de l'immobilisation due à une fracture, d'un arrêt d'influx nerveux dû à des lésions de la moelle épinière, ou de maladies chroniques (cancer, SIDA, diabète de type II) [82] [83]. L'atrophie a pour conséquence la diminution des capacités fonctionnelles du muscle et de ce fait une diminution de la force musculaire. Elle se manifeste par la réduction du volume musculaire du à la réduction de l'aire de chaque fibre (CSA) [41], ainsi qu'une résistance à l'insuline. Chez des patients ayant des lésions de la moelle épinière, il a été montré une forte atrophie [84].

L'atrophie est la conséquence de l'inhibition de voies conduisant à la synthèse de protéines et à la fois à l'activation de voies induisant la protéolyse (figure 16) [85] [86] [87]. Les voies cataboliques conduisant à la dégradation des protéines peuvent être régulées par différents systèmes, l'autophagie le système Ubiquitine-protéasome (UPS) [88], les calpaines et les caspases [89].

Lors d'inactivité ou de jeûne, l'AMPK inhibe la voie mTOR et conduit à l'activation de voies de dégradation via le facteur de transcription FOXO, qui sont l'autophagie et le système Ubiquitine-protéasome. Ces systèmes induisent une atrophie du muscle squelettique [46] [48] [47].

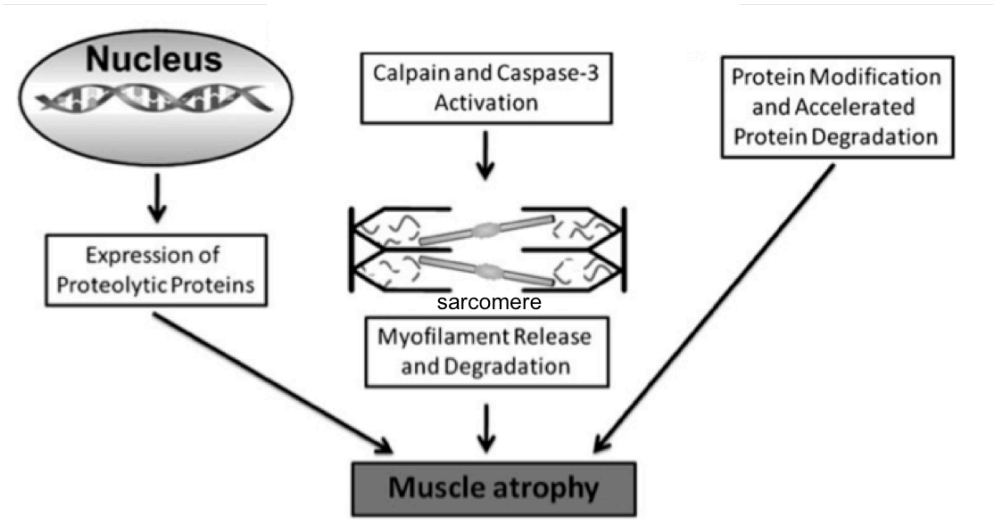


Figure 16 : Les principales origines de l'atrophie musculaire. Représentation schématique des origines de l'atrophie musculaire, pouvant provenir d'un défaut de synthèse protéique, d'un surcroit de dégradation protéique et de l'activité des calpaines et caspases conduisant à la dégradation des protéines du saromère (adapté de Powers, smuder et Criswell, 2011).

a)-L'autophagie

L'autophagie est un phénomène permettant l'élimination de protéines et organelles mal-formées ou non fonctionnelles. Trois mécanismes d'autophagie existent : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie réalisée par les chaperonnes [90]. Lors de la macro-autophagie, ou communément appelée autophagie, les protéines à dégrader sont séquestrées dans les phagosomes puis par fusion avec les lysosomes contenant des protéases vont être digérées dans une structure appelée autophagosome (figure 17). Tout au long de la formation des autophagosomes, des protéines issues de l'expression de gènes spécifiques de l'autophagie (*Atg)* vont intervenir. ATG7 et LC3 sont requis pour la formation finale des autophagsomes.

Les mitochondries sont éliminées par un processus similaire appelé mitophagie, et participe au remodelage mitochondrial [91].

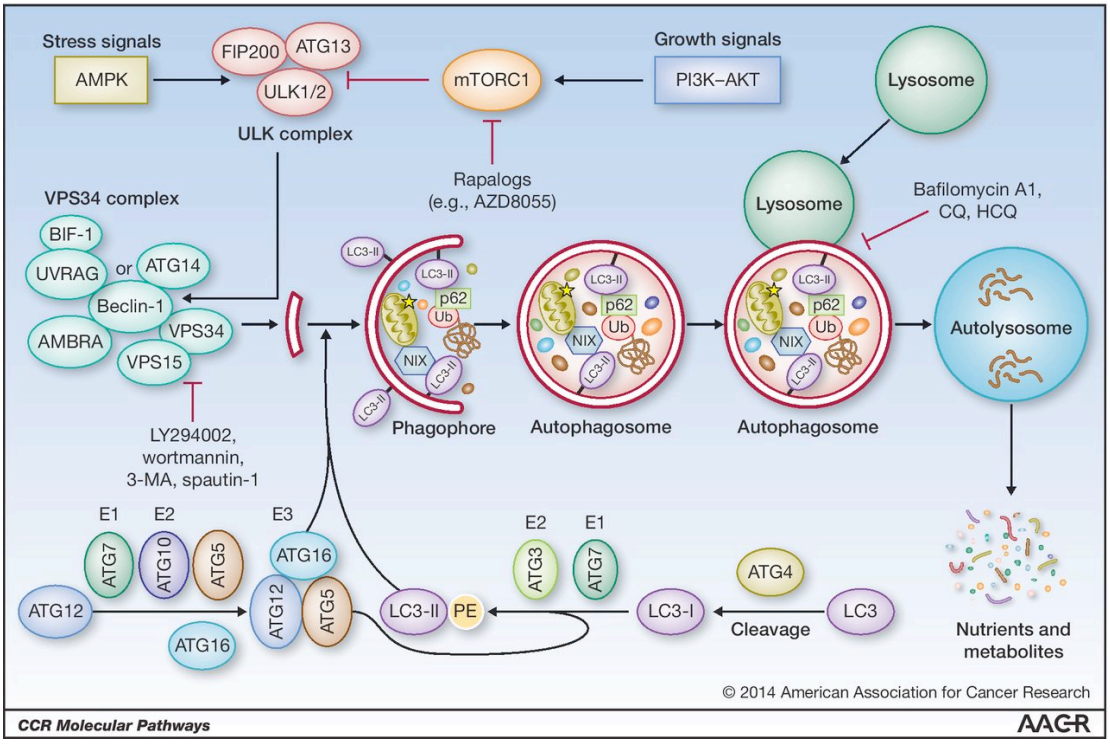


Figure 17 : Les étapes de la macro-autophagie. Représentation schématique des étapes de l'autophagie. L'activation de l'AMPK et/ou l'inhibition de mTOR induit l'activation de ULK (Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase) qui phosphoryle Beclin-1, induisant l'activation du complexe VPS34 et ainsi conduisant à la formation du phagophore. Les protéines d'autophagie (ATG), tels que ATG5 et ATG7, catalysent la formation du LC3-II (phosphatidylethanolamine (PE)-conjugated LC3) et permettent ainsi son incorporation dans la membrane du phagophore permettant aux protéines cargo de s'y amarrer. L'autophagosome formé pourra fusionner avec un lysosome afin de dégrader les protéines qu'il contient, et ainsi recycler les métabolites produits (d'après Cicchini, Karantza et Xia, 2015).

b)-Le système ubiquitine-protéasome (UPS)

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) intervient dans le phénomène d'atrophie. Comme l'autophagie, le rôle du système ubiquitine-ptotéasome est de dégrader des protéines non nécessaires à la cellule. Afin d'être reconnues par ce système, les protéines doivent avoir reçu une marque de destruction qui sont des polypeptides appelés ubiquitine, via les ubiquitines ligases E3 (figure 18). Ces protéines formant une chaine de polyubiquitination, sont reconnues par le protéasome 26S, lui-même composé d'un core particulaire 20S et de 2 sous unités 19S. Ce complexe a un rôle protéolytique conféré par la sous unité 20S, qui nécessite de l'énergie apportée par les sous unités 19S contenant des ATPases [92].

Les gènes exprimés en réponse à l'atrophie sont appelés des atrogènes. Les atrogènes codant pour les enzymes E3 ubiquitine-ligases, MuRF-1 (Muscle Ring Finger-1) et MAFbx/atrogin-1 (Muscle Atrophy F-box) sont surexprimées lors d'atrophie par dénervation, blessure par le froid, ou immobilisation [46] [34] [93] [94]. Les gènes FOXO (Forkhead Box (Fox) O family) en aval des voies de signalisation Akt conduisent la transcription d'atrogènes comme MAFbx [47]. La voie NFκβ (p50 and Bcl-3) semble également impliquée dans la régulation de l'expression de ces gènes [95].

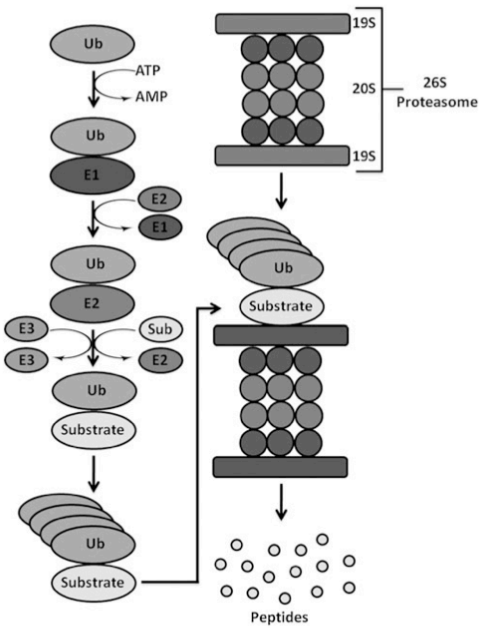


Figure 18 : Le protéasome 26S. Représentation schématique du système ubiquitine-protéasome. Etapes de l'ubiquitinylation des protéines à dégrader et prise en charge par le protéasome. Le protéasome 26S est composé d'une sous unité (20S) et de deux complexes de régulation (19S). La liaison aux molécules d'ubiquitine comprend 3 étapes faisant intervenir 3 enzymes, l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), les enzymes se conjugant aux ubiquitines (E2s) et les ligases (E3), reconnaissant spécifiquement le substrat à dégrader (d'après Powers, smuder et Criswell, 2011).

c)-Les calpaines & caspases

L'activation des calpaines et de la caspase-3 semblent promouvoir les processus protéolytiques des protéines musculaires [96] [97].

Les calpaines sont les acteurs de la protéolyse dépendante du calcium. Elles clivent les protéines du cytosquelette comme la titine, et libèrent ainsi des protéines sarcomériques [98]. Elles peuvent également dégrader des kinases et phosphatases ainsi que des protéines oxydées comme l'Actine et la Myosine [99] [100] [101].

Les caspases sont des protéases à cystéine. Elles sont présentes à l'état de pro-caspases et sont activées dans le cytoplasme. Elles participent à l'apoptose cellulaire mais interviennent également dans la protéolyse associée à l'atrophie cellulaire. L'isoforme Caspase-3 est activée par une cascade d'activation de différentes caspases et induit la dégradation des complexes Actine-Myosine des fibres musculaires [102] [103]. Les résidus des filaments d'actomyosine et protéines clivées par action des calpaines et caspases sont ensuite dégradés par le système ubiquitine-protéasome.

d)-Le phénomène Redox

Il régule le fonctionnement des voies de dégradation citées ci-dessus par l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation. En cas d'atrophie, ce système se trouve perturbé [97] [87]. Les protéines carbonylées sont augmentées [104], et il a été montré une régulation positive de l'expression d'anti-oxydants et anti-apoptotiques, en réponse au stress oxydatif causé par une atrophie par immobilisation [105]. Les ROS semblent réguler le facteur de croissance IGF1 (Insulin growth factor-1), conduisant à la synthèse protéique via 4EBP1 et mTOR [106]. Cependant, en état de stress oxydatif, le complexe EIF4F ne peut se former et engendre une diminution de la synthèse en protéines, provoquant une atrophie musculaire. En effet, chez l'Homme, l'atrophie a été montrée comme étant associée à la dégradation protéique lors d'immobilisation [107].

1-5-3-La régénération

Le muscle squelettique présente une incroyable capacité à régénérer grâce à la présence des cellules satellites (SC). La régénération musculaire a lieu dans le cas de lésions traumatiques des fibres, ou de maladies chroniques dégénératives. Les SC quiescentes, s'activent, puis migrent vers la lésion avant de proliférer et fusionner avec la fibre [108]. Les fibres régénérées présentent de noyaux centraux plutôt que périphériques, et expriment la MYHC (chaine lourde de Myosine embryonnaire) [109].

a)-Les voies de signalisation impliquées au cours de la régénération

La figure 19 regoupe les différentes voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la quiescence et de l'activation des cellules satellites lors de blessure.

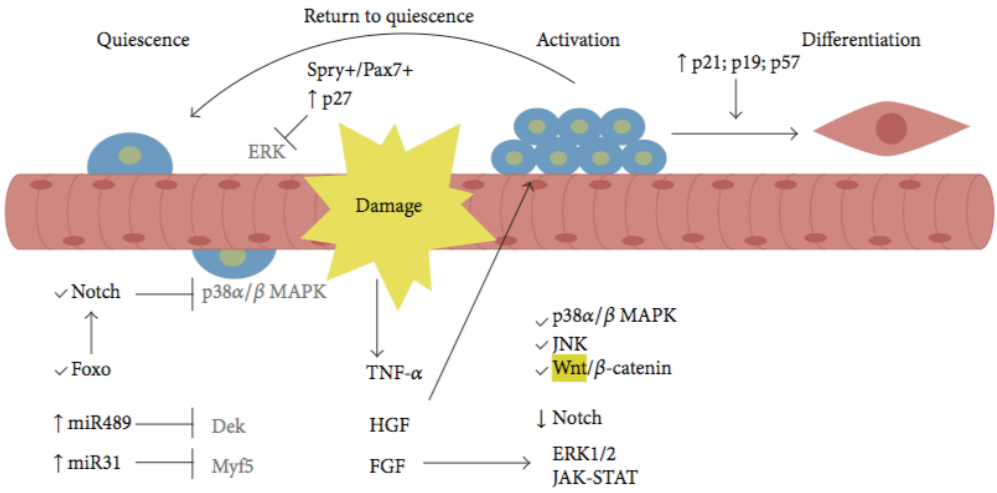


Figure 19 : Les voies de signalisation impliquées au cours la régénération. Représentation schématique des voies de signalisation impliquées pour le maintien de la quiescence et lors d'activation, faisant intervenir les voies Notch, P38/MAPK, Wnt/béta-caténine, JAK-STAT, et les micros ARN. La voie Notch contrôle la quiescence.Les facteurs de transcription FOXO régulent l'expression des récepteurs Notch. Les microARN régulent l'expression des gènes du cycle cellulaire et des récepteurs myogéniques. Lors de régénération cellulaire, les gènes du cycle cellulaire sont allumés et les cellules initialement quiescentes prolifèrent. Certaines retournent en quiescence, d'autres se différentient et fusionnent avec les fibres. (d'après Almeida, Fernandes, Ribeiro Junior, Okamoto, et Vainzof, 2016).

Il a été montré que la voie Wnt induisait la prolifération cellulaire pendant la régénération [110]. **La voie Wnt/béta-caténine** est activée lors de régénération. Cependant il semblerait, contrairement à de précédentes pubications, que l'activation de la voie Wnt/béta-caténine serait temporaire, et qu'ainsi une inhibition tardive contrôlerait la réponse régénérative [111].

La voie JAK-STAT est impliquée dans le processus de régénération. Par blessure à la cardiotoxine du TA et injection d'inhibiteurs de la voie JAK/STAT, Price et al. ont montré une augmentation du diamètre des fibres [112]. De plus, sur des cultures fraiches de cellules satellites triées après blessure, STAT3 s'avère phosphorylé. La déletion de STAT3 spécifiquemeent dans les SC engendre un défaut de régénération des fibres après blessure [113].

Lors de dommages musculaires, **la voie Notch** intervient dans la régénération cellulaire. L'activation de NOTCH1 dans les cellules satellites promeut la prolifération des SC et diminue leur différenciation [114]. A l'inverse, le récepteur NOTCH3 agit comme un inhibiteur de la prolifération et de l'autorenouvellement des SC, allant en faveur de leur différenciation et fusion [115]. Ainsi, lors de la régénération, les fonctions opposées de ces deux récepteurs permettent de maintenir l'homéostasie musculaire.

b)-Le système immunitaire

La régénération est contrôlée par des mécanismes environnementaux, faisant intervenir les macrophages, les lymphocytes éosinophiles et les cellules T régulatrices.

Il a été montré que l'absence de macrophages ou des mutations de gènes codant pour des cytokines recrutant les macrophages, entrainent un défaut de régénération [116] [117]. Une délétion des gènes IL-4 et IL-13, codant pour les cytokines sécrétées par les éosinophiles présente également une régénération altérée [118]. La population des cellules T régulatrices (Treg) joue aussi un rôle. Par blessure des muscles squelettiques de souris mdx (modèle murin de la dystrophie de Duchenne (DMD)), il a été montré une expansion des cellules Treg [119] [120]. La cytokine IL-33 a été montrée impliquée dans le contrôle des cellules Treg en réponse à un dommage des tissus [121] [122].

c)-Les micros ARN

De petits ARN non codants contrôlent également la régénération musculaire. En réponse à une blessure à la cardiotoxine (CTX), les ARN non codant tels que les miRNA et IncRNA régulent la régénération musculaire. Les miRNA spécifiques au muscle sont appelés myomiR. Des facteurs de transcription et des MRFs régulent de façon positive de myomiR durant la myogenèse [123] [124]. Le micro ARN miR-1 induit la différenciation myogénique en ciblant l'histone déacétylase 4 (HDAC4), un répresseur transcriptionnel, qui inhibe l'activité du facteur de transcription MEF2C (myocyte-specific enhancer factor 2C) [125] [126] [127].

2-Le facteur de transcription Serum Response Factor (SRF)

Le facteur de transcription Serum Response Factor (SRF) est exprimé de façon ubiquitaire mais particulièrement abondant dans les muscles lisse, cardiaque et squelettique. Il a été découvert grâce à son rôle dans l'activation de l'expression de gènes à expression précoce (« immediate early genes »), notamment *c-fos* et *erg-1*, en réponse à un traitement au sérum [128].

SRF fait partie de la famille des MADS box qui lie spécifiquement à la séquence d'ADN Serum Response Element (SRE) contenant la boîte CArG de séquence [CC (A/T)6 GG] [129] [130] ; ce motif MADS box a été conservé au cours de l'évolution (figure 20). SRF comprend un site de liaison à l'ADN et un site de dimérisation aux facteurs de transcription SRF-like. La partie N-terminale de la boîte MADS détermine la spécificité du site de liaison à l'ADN ; la partie C-terminale est la partie de transactivation nécessaire à la liaison aux cofacteurs [131]. SRF contrôle la transcription de nombreux «immediate early genes» [132] dont l'expression rapide et transitoire a lieu sans nécessité la synthèse de protéines de novo [133]. SRF contrôle également l'expression de gènes importants pour le remodelage du cytosquelette d'Actine [128], et aussi des gènes spécifiques du muscle dont *MyoD* [134] [135].

SRF a besoin de cofacteurs afin de réguler la transcription de gènes. L'association de SRF avec des cofacteurs aux sites positifs ou négatifs SRE/CArG, permet la régulation différentielle de l'expression de gènes. SRF transcrit des gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la migration, l'organisation du cytosquelette et la myogenèse.

2-1-La régulation de l'activité de SRF

Deux grandes familles de cofacteurs régulent l'activité de SRF : **la voie Rho-Actin** et **la voie des MAPK** (figure 21), ainsi que de **petits ARN non codant**.

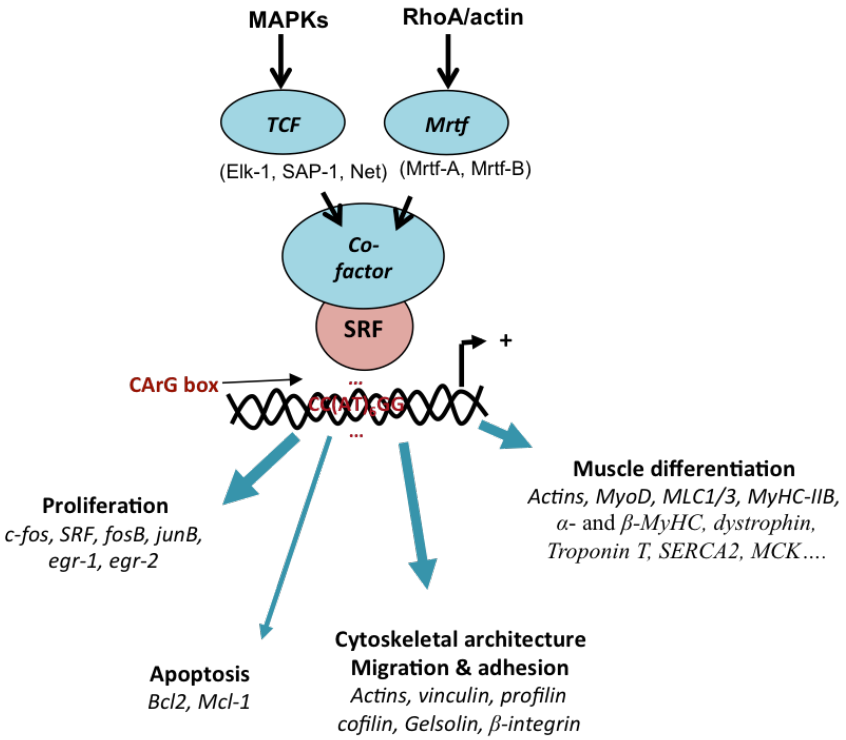


Figure 20 : Les différentes classes de gènes cibles de SRF. Représentation schématique des différentes classes de gènes régulés par SRF, via les voies MAPK et RhoA/Actine. La liaison de SRF, associé à ses cofacteurs (TCF pour Ternary Complex Factor ou Mrtf pour Myocardin-related transcription factor) à la séquence de la boîte CArG, permet l'activation de ses gènes cibles.

a)-La voie Rho-Actine

La voie Rho-Actin, qui comprend des facteurs de transcription associés à la myocardine (MRTF) myocardin-related transcription factors [136] [137]. Les GTPases de la famille des Rho régulent SRF et ses cofacteurs MRTF en induisant la polymérisation de l'Actine. La dynamique de l'Actine (forme monomérique-G ou fibrilaire-F) a été montrée contrôlant l'accumulation nucléaire de l'isoforme MRTFA et ainsi régulant l'activité de SRF. En effet, l'Actine-G se lie aux MRTF, les séquestrant dans le cytoplasme et les empêchant ainsi d'induire l'activité transcriptionnelle de SRF [136] [138]. De nombreux récepteurs impliqués dans les interactions cellule/matrice extracellulaire (adhésion focale) ou cellule/cellule (jonctions adhérentes), ont été montré affectant la dynamique de l'Actine et ainsi la régulation transcriptionnelle de SRF via ses cofacteurs MRTF [137].

b)-La voie MAPK/TCF

Les protéines à domaine Ets sont régulées par la voie RAS-ERK via RAS, RAF, MEK et ERK. L'activation des MAP kinases (MAPK) phosphoryle les protéines de la famille des TCF (three ternary complex factors) [130], leur permettant leur liaison au domaine Ets [139]. Les complexes protéiques du TCF, ELK-1, NET, SAP-1 (*Elk1*, *Elk3*, and *Elk4*) [140] [141], comprennent un domaine de liaison à l'ADN en position N-terminal, et un domaine d'activation par les MAPK en C-terminal [142]. Les protéines de la famille des Ets sont activées par la phosphorylation des MAPK et par les facteurs de transcriptions MRTFA et MRTFB. De plus, ElLK-1 a été montré comme controlant c-fos et ainsi contribuerait à la croissance cellulaire [143].

Plusieurs équipes ont montré que les facteurs TCF et MRTF sont en compétition quant à leur liaison avec SRF, et de ce fait modulent différemment son activité transcriptionnelle [136] [144].

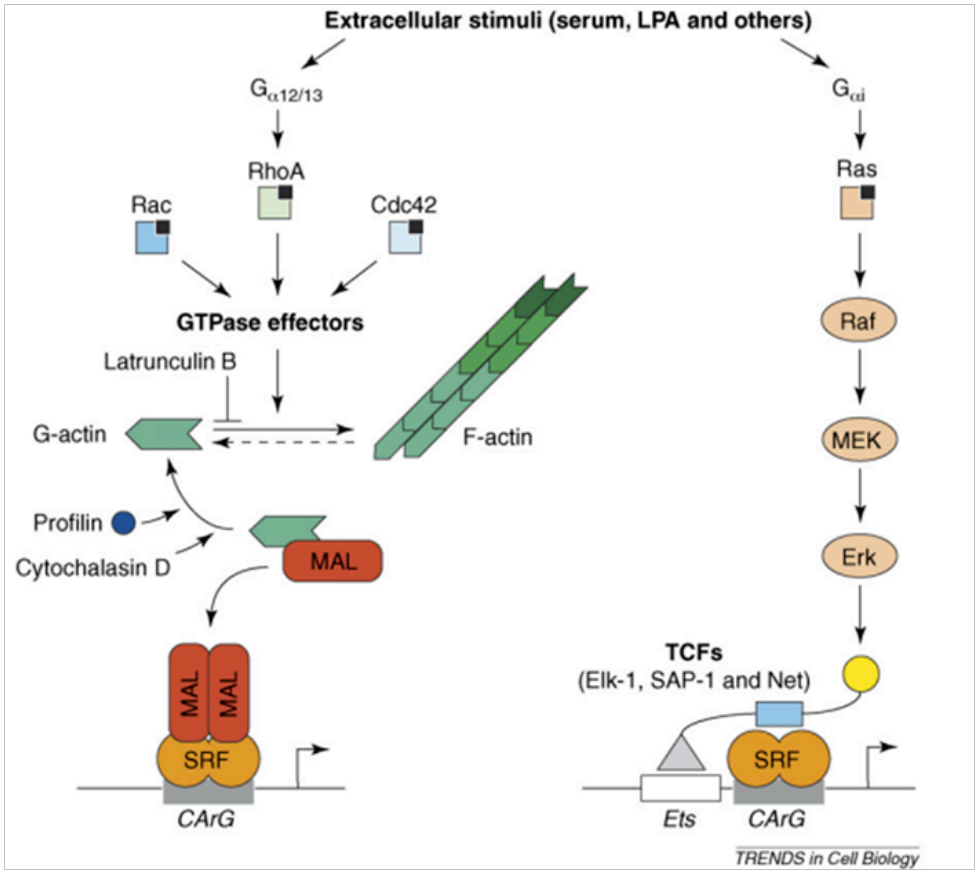


Figure 21 : Les deux principales voies régulatrices de SRF. Représentation schématique des deux voies principales régulant l'activité de SRF dans les cellules non musculaires : RhoA/Actine et MAPK/TCF. Par stimulation, les voies dépendantes de Rho et de RAS sont activées. L'activation de la voie des MAP kinases, via RAS, RAF, MEK et ERK, phosphoryle les TCF, lesquels se lient à leurs domaines de reconnaisance à l'ADN Ets, et ainsi pemet l'activation des gnes cibles de SRF. La voie de signalisation via la famille des GTPases Rho et la polymérisation (Actine-F)/dépolymérisation (Actine-G) permet la dissociation de MAL et de l'Actine, permettant à MAL aussi nommé Mrtf de se lier à SRF et d'activer ses gènes cibles (d'après Posern et Treisman, 2006).

2-2-Les gènes cibles de SRF

SRF, sous forme de dimère, ne peut pas induire seul l'initiation de la transcription de gènes, il a besoin de se lier à des cofacteurs afin de réguler l'expression de ses gènes cibles. De nombreux gènes ont déjà été identifiés comme cibles, directes ou indirectes de SRF.

Parmi les «immediate early genes», nous trouvons certains facteurs de croissance (IGF, EGF), des hormones, c-fos, EGR1. L'expression de certains de ces gènes, comme c-fos, deviennent régulateurs de l'expression de gènes responsables de l'engagement de la cellule dans le cycle de division cellulaire ou dans une voie de différenciation [145].

Une grande partie des gènes cibles de SRF codent pour des protéines du cytosquelette comme l'Actine [146], la profiline, la vinculine, des protéines du sarcomère comme la Myosine [147] [148], des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou la dystrophine [149], la créatine kinase musculaire, MYOD, la Myogénine, la Myosine, des interleukines. SRF a été montré impliqué dans la croissance et la régénération cellulaires via IL-4 et IGF1 [150]. Il a été montré que les muscles squelettiques étaient incapables de s'hypertrophier en absence de SRF [79].

2-3-SRF dans le muscle squelettique

Par des études *in vitro* en utilisant une lignée de cellules myogéniques (C2C12), SRF a été montré nécessaire à la différenciation musculaire par l'expression des facteurs de différenciation myogénique : Myogénine et Troponine [151] [152]. D'autres études ont montré le rôle crucial de SRF dans l'expression du facteur de régulation myogénique MYOD, et ainsi l'implication de SRF dans la prolifération et différenciation des myoblastes [153] [135].
Des études *in vivo* ont montré que la délétion totale de SRF induit un défaut de formation du mésoderme, conduisant à la mort des foetus [154].

Afin d'étudier le rôle de SRF dans le tissu musculaire *in vivo* et *in vito* sur des cultures de myoblastes primaires, des modèles d'invalidation conditionnelle et inductible de SRF ($Srf^{lox/lox}$) ont été développés dans l'équipe, par l'utilisation de souris exprimant la Cre recombinase sous différents promoteurs.

Ainsi, le laboratoire a utilisé un modèle exprimant la Cre recombinase sous le promoteur Human alpha-skeletal actin (HSA) afin d'étudier le rôle de SRF dans les fibres musculaires. Au cours du développement, l'absence de SRF provoque un sévère retard de croissance qui s'accompagne d'une mort prématurée, indiquant un rôle important de SRF dans la croissance musculaire post-natale [155].

Le rôle de SRF dans les fibres chez l'adulte a été étudié en utilisant un système conditionnel et indictible par le tamoxifène (HSA-CreERT2:$Srf^{flox/flox}$).

La perte de SRF dans les fibres adultes conduit à un vieillissement prématuré. Les fibres musculaires s'avèrent altérées par le développement d'une fibrose et d'une atrophie [156].

De plus SRF a été montré comme étant impliqué dans le maintien de la masse musculaire des fibres adultes. Une délétion de SRF dans les fibres musculaire conduit à un défaut de recrutement des SC dans un modèle d'hypertrophie compensatoire, du à un contrôle paracrine défaillant [79].

Collard et al. ont montré une diminution de l'expression de SRF lors d'atrophie par arrêt d'activité mécanique (dénervation et ténotomie). De plus, l'absence de SRF exacerbe le phénotype d'atrophie dans un modèle non innervé. En effet, la suppression d'influx nerveux induisant un arrêt d'activité mécanique du muscle, provoque l'accumulation d'Actine monomérique (Actine-G) dans le noyau (figure 22). Ceci induit la sortie du cofacteur de SRF, MRTFA, vers le cytoplasme conduisant à la diminution de la transcription de gènes cibles de SRF, et ainsi contribuant à l'atrophie. La surexpression de SRF restaure le phénotype, indiquant le rôle de SRF dans la prévention de l'atrophie [157].

Toutes ces données présentent SRF comme un bon candidat dans la régulation de la masse musculaire dans des conditions physiologiques et pathologiques. En effet, SRF régule la transcription de gènes via des signaux mécaniques traduits en programme transcriptionnel.

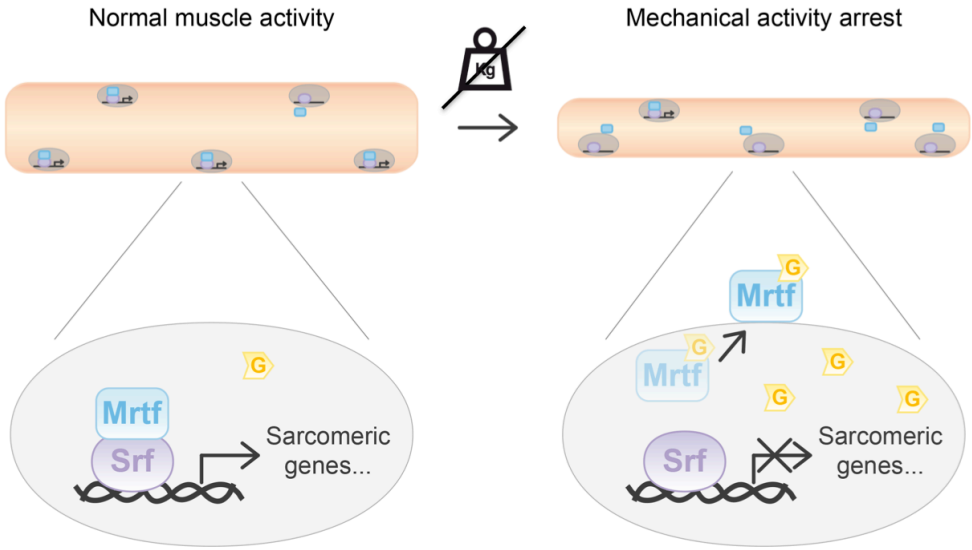


Figure 22 : La médiation de la mécano-transduction par SRF dans le muscle squelettique. Représentation schématique de la régulation de la mécano-transduction sous le contrôle du facteur de transcription SRF, dans un muscle sain et dans un modèle d'arrêt d'activité mécanique. La dynamique de l'Actine régule la localisation de MRTF et ainsi la transcription dépendante de SRF. Lors d'arrêt d'activité mécanique, l'Actine-F se dépolymérise en Actine-G monomérique, qui se lie à MRTF, l'empêchant de se lier à SRF et de jouer son rôle de cofacteur, ce qui conduit à une inhibition de l'expression des gènes cibes de SRF (d'après Collard et al, 2014).

3-Les objectifs du projet

a)-Le rôle de SRF dans l'atrophie du muscle squelettique induite par dénervation

La première partie de cette étude a eu pour but de comprendre le rôle de SRF dans l'atrophie induite par arrêt d'activité mécanique, et de déterminer des voies de signalisation/processus/molécules impliqués en aval de SRF (figure 22).

Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé un modèle murin dont la délétion de SRF est contrôlable dans le temps. Par délétion de SRF spécifiquement dans les fibres musculaires, une analyse transcriptionnelle réalisée au laboratoire a pu identifier un éventuel dysfonctionnement de fonctions biologiques, engendré par l'absence de SRF, tel que l'autophagie et le métabolisme énergétique. Nous avons ainsi étudié des voies métaboliques qui contrôlent l'atrophie du muscle adulte induit par dénervation.

b)-Le rôle de SRF dans les cellules satellites

La seconde partie de cette étude a porté sur la détermination du rôle de SRF dans les SC. Pour cela l'équipe a généré un modèle murin d'inactivation de *Srf*, conditionnel et inductible dans les cellules satellites (*Pax7*$^{CreERT2/+}$:*Srf*$^{lox/lox}$) par injection de Tamoxifène.

In vivo et *in vitro* Nous avons pu montrer quelles fonctions des SC étaient altérées par la perte de SRF, à savoir la migration et la fusion. Nous avons ensuite cherché à identifier les mécanismes sous jacents ; pour cela nous avons mené une étude transcriptomique afin d'identifier des gènes dont l'expression est contrôlée par SRF. Nous avons évalué la contribution de certains de ces gènes au phénotype cellulaire des SC dépourvues de SRF.

MATERIEL & METHODES

1-Le rôle du facteur de transcription SRF dans les cellules satellites adultes

1-1-Les modèles animaux

a)-Le modèle KO conditionnel et inductible de SRF

Le KO total de *Srf* chez la souris induit une létalité entre E10,5 et E13,5 de développement embryonnaire due à un défaut cardiaque et à un défaut de formation du mésoderme, montrant que SRF est un facteur de transcription crucial à la cardiomyogenèse [158]. Un KO conditionnel et inductible nous permet ainsi d'étudier le rôle de SRF à l'âge adulte.

Des souris KO conditionnelles inductibles du gène *Srf* ont été créées au laboratoire, permettant une délétion homozygote de l'exon 2 du gène *Srf* grâce aux sites loxP qui l'entourent : $Srf^{flox/flox}$ [158]. Les lignées $Pax7^{CreERT2/+}$ [159] et *Pax7-nGFP* transgenic mice [160] ont été décrites dans d'autres laboratoires. Afin d'induire une excision du gène *Srf* dans les cellules satellites uniquement grâce à l'expression de la CRE recombinase exprimée sous le promoteur paired box gene 7 (PAX7), la lignée suivante a été créée par croisement de ces différentes lignées : $Pax7^{CreERT2/+}$:$Srf^{flox/flox}$:*Pax7-nGFP.* La construction GFP sous le contrôle du promoteur de PAX7, permet de trier les cellules satellites par FACS (figure 1-A). L'expression du gène *Srf* est inactivée (Mut) par injection de tamoxifène (TMX) à des souris de 2 mois à raison de 4 injections en intrapéritonéale, soit 1mg/jour (MP Biomedicals). Les souris utilisées comme contrôle sont issues de ces mêmes croisements mais ne sont pas injectées par du TMX ou n'expriment pas la CRE recombinase mais ont reçu des injections de TMX (Ctl) (figure 1-B).

Afin d'étudier l'implication de l'Actine dans les différents processus de régénération musculaire, et plus précisément de déterminer quelles fonctions des cellules satellites seraient rétablies par la surexpression de l'Actine dans les cellules dépourvues du gène *Srf*, nous avons utilisé une lignée de souris doublement transgénique : *CMV-flx-CAT-flx-Actc1* (figure 6-A). La construction est constituée par le promoteur béta-Actine et d'un amplificateur issu d'un cytomegalovirus (CMV) assurant l'expression du transgène. L'ADN complémentaire de l'alpha-Actine cardiaque (Actc1) de rat est situé en aval du gène chloramphenicol acetyl transferase (CAT), lequel est entouré de sites loxP. La poly-adenylation des sites présents en aval du gène *CAT* empêche l'expression de l'alpha-Actine cardique. La déletion du gène CAT par une Cre recombinase permet la transcription du gène d'Actine en aval.

Par croisement avec des souris exprimant la CRE recombinase sous le promoteur PAX7 : P$ax7^{CreERT2/+}$:$Srf^{flox/flox}$:*Pax7-nGFP*, la construction *CMV-flx-CAT-flx-Actc1* nous donne des souris $Pax7^{CreERT2/+}$:$Srf^{flox/flox}$:*Pax7-nGFP:CMV-flx-CAT-flx-Actc1. Cette constuction nous permet d'*induire de façon conditionnelle la délétion de SRF, et la surexpression de ACTC1 par injection de TMX spécifiquement dans les cellules satellites (MutAct) (figure 1-B).

b)-Le modèle KO total d'EGR1

Pour l'étude du gène *Egr1*, nous avons obtenu des souris KO total EGR1 par le laboratoire de Delphine Duprez, dont le modèle est décrit dans la publication parue en 1998 par Topilko [161]. Afin d'étudier la fonction des cellules satellites, nous avons induit une lésion par injection d'un peptide appelé cardiotoxine (CTX) dans les muscles de ces souris, induisant une régénération des fibres musculaires. Après 8 jours, nous avons analysé l'aire des fibres (CSA) ainsi que le nombre de noyaux par fibre, dans le TA.

1-2-Les modèles cellulaires

a)-La séparation des cellules satellites

Les muscles des souris sont récupérés par dissection. Les tissus sont hachés finement puis digérés dans un milieu de digestion (DMEM F12, 0,1% collagénase D, 0,1% trypsine), pendant 20 min sous agitation. Les cellules sont ensuite passées sur filtre à 70um de diamètre, après 3 centrifugations de 20min à 2000rpm à 4°C. Elles sont ensuite resuspendues dans du PBS, 2%SVF afin d'être triées au

FACS grâce à l'expression de la GFP, à fluorescence verte (Becton Dickinson ARIA 3). Les cellules sont alors récoltées dans un tube enduit avec du sérum.

b)-La culture de cellules satellites

Les cellules quiescentes Pax7+ triées au FACS sont ensuite mises culture à 37°C sous 5% de CO2, amplifiées par prolifération à une concentration de 8 000/cm^2. Les boîtes en plastique TPP^R sont précédemment revêtues de gélatine permettant l'adhésion des cellules.

La composition du milieu de prolifération est la suivante : DMEM / F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium**:**Nutrient Mixture F-12, L-glutamine, HEPES, Phenol Red) contenant 20% de sérum de veau foetal non décomplémenté (Eurobio), 2% d'Ultroser G (PALL Life Sciences), 1% Anti-Antimycotique (Life Technologies), et 1% de L-glutamine (Life Technologies).

c)-La transfection des cellules satellites par siRNA

Afin de déréguler l'expression de certains gènes d'intérêt, j'ai effectué des transfections par Lipofectamine RNAiMAX (life Technologies) sur des cellules satellites en prolifération à 8000/cm^2. Le protocole est le suivant : le mélange de transfection est constitué d'un volume d'Opti-MEM (Life Technologies) contenant 30pmol de siRNA et un volume d'Opti-MEM contenant 6% de Lipofectamine. Ce mélange est laissé en contact pendant 5 min, puis 250uL sont ajoutés par puits de 9cm^2 contenant 1,5mL de milieu de culture. La transfection se fait sur la nuit (ON) en absence d'Anti-Antimycotique.

Les séquences utilisées sont les suivantes :
FHL2 (sens 5'-GCACAACGACUGCUUUAAC-TT-3' ; anti-sens 5'-GUUAAAGCAGUCGUUGUGC-CA-3')
HIC5 (sens 5'-CCUAUAGCUGGGCAAGUGG-TT-3' ; anti-sens 5'-CCACUUGCCCAGCUAUAGG-TT-3')
KRT18 (sens 5'-CACCAAGUCUGCCGAAAUC-TT-3' ; anti-sens 5'-GAUUUCGGCAGACUUGGUG-GT-3')

d)-La mise en différenciation des cellules satellites

Les cellules satellites sont mises à une concentration de 45 000/cm2 dans des boîtes en plastique TPP^R précédemment enduites de Matrigel, à 37°C sous 5% de CO2. Le Matrigel est une membrane basale soluble extraite de la tumeur Engelbreth-Holm-Swarm qui en se solidifiant forme une structure équivalente à une membrane basale de par sa composition, sa structure et ses propriétés physiques ; il est riche en protéines et en facteurs de croissance (Corning).

Le milieu utilisé pour induire la différenciation des cellules est appauvri en sérum. Sa composition est la suivante : DMEM / F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium**:**Nutrient Mixture F-12, L-glutamine, HEPES, Phenol Red) contenant 2% de sérum de cheval non décomplémenté (Eurobio), 1% Anti-Antimycotique (Life Technologies), et 1% de L-glutamine (Life Technologies).

2-Le rôle du facteur de transcription SRF dans l'atrophie du muscle squelettique adulte

2-1-Le modèle animal

Les mêmes souris KO conditionnelles inductibles de SRF, *Srf$^{flox/flox}$*, sont mises en croisement avec des souris exprimant la CRE recombinase sous le promoteur Human α-skeletal actin (HSA), permettant à la CRE de s'exprimer dans les fibres musculaires uniquement : *HSA-CreERT2:Srf$^{flox/flox}$* [156]. Par injection de TMX à des souris mâles âgées de 2 mois, l'expression du gène *Srf* est ainsi spécifiquement inactivé dans ces cellules possèdant la CRER recombinase (Mut) ; les souris n'exprimant pas l'enzyme sont des animaux contrôles (Ctl).

2-2-Les analyses cellulaires

a)-Les coupes de muscle au cryostat

Des coupes de 8um d'épaisseur ont été réalisées au cryostat (CM3050S, Leica), sur des muscles congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide.

b)-L'immunomarquage

Les cellules et les coupes de muscles sont fixées au paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant 8 min à température ambiante (TA) puis lavées 3 fois 5 min en tampon phosphate salin (PBS). Les échantillons de cellules sont saturés dans du PBS 1X contenant 0,2% de triton, 5% de sérum de cheval (HS) pendant 2h à TA. Puis les anticorps primaires sont dilués dans cette même solution de saturation et mis en incubation ON à 4°C. Les échantillons de muscle sont saturés dans une solution de blocage : PBS 1X, 0,5% triton, 4% BSA, 5% Sérum de chèvre (GS). Puis les anticorps primaires sont dilués dans PBS 1X, 0,2% triton, 4% BSA, 5% GS et incubés ON à 4°C. Les anticorps secondaires et la Phalloïdine sont respectivement dilués dans ces mêmes solutions, et incubés 1h à TA à l'abri de la lumière. Un marquage des noyaux au Hoechst pendant 5 min à TA est indispensable à la quantification des noyaux. Les échantillons sont ensuite lavés en PBS puis mis en milieu de montage Dako.

La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés et leurs dilutions est la suivante :
Dystrophine–NCL-DYS2 (Novocastra) (souris) 1/50 - Anti-mouse IgG1-Alexa488 1/1000 (Invitrogen)
MF20 souris 1/50 (DSHB) - Anti-mouse IgG2b-Alexa546 1/1000 (Life Technologies)
MYOD (c-20) lapin 1/100 (Santa Cruz) - Anti-mouse IgG (H+L)-Alexa546 1/1000 (Invitrogen)
Myogénine (F5D) souris 1/100 (Santa Cruz) - Anti-mouse IgG1-Alexa488 1/1000

Le marqueur spécifique des filaments d'Actine et sa dilution est le suivant :
Phalloïdine-488 1/500

L'agent intercalant utilisé et sa dilution est le suivant :
DAPI 1/1000

c)-La prolifération par incorporation d'EdU

Afin de détecter les cellules en phase S de prolifération, les cellules sont mises en culture après tri cellulaire par FACS et amplifiées. Elles sont mises en contact avec l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) à 10uM (Life Technology) durant 2h. L'EdU s'incorpore à l'ADN en réplication *in vivo*. Les cellules sont ensuite fixées 8min à la PFA 4%. La détection des cellules ayant incorporé l'EdU se fait grâce au kit Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 d'après les indications données par le fournisseur (Life Technologies).

d)-L'acquisition des images

L'acquisition des images a été réalisée à la plateforme d'imagerie de l'Institut Cochin par le logiciel d'acquisition Metamorph 7 (Molecular Devices).

Les images en temps réel (Time-Lapse) ont été acquises à l'aide d'un microscope inversé à épi-illumination Axio Observer.Z1 (Zeiss) à un grossissement 10X dans une chambre thermostatée à 37°C ayant une concentration constante en $C0_2$ de 5%.

Les images des différents marquages ont été acquises à l'aide d'un microscope inversé à épi-illumination Axiovert 200M (Zeiss) couplé à un système de refroidissement CoolSNAP HQ2 (Photometrics) à un grossissement 10X ou 40X à l'air.

Les acquisitions du cytosquelette d'Actine ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal inversé, couplé à un système de refroidissement CoolSNAP HQ2 (Photometrics), à un grossissement 100X en immersion à huile.

e)-Les analyses des images

Les analyses des différentes acquisitions sont réalisées grâce au logiciel ImageJ et ses pluggings « Cell

counter », « Cell tracking », et « MACRO» pour la Cross Section Area. Le bruit de fond est réduit en ajustant la luminosité et les contrastes.

2-3-Les analyses biochimiques

2-3-1-L'analyse des protéines par western blot

a)-La préparation et mesure des échantillons de protéines (technique BCA)

Les muscles sont congelés en azote liquide. Ils sont ensuite broyés 2 fois pendant 2 min à une fréquence de 30 Hz, par le broyeur Tissuelyser (Qiagen Retsch MM301 Mixer Mill Grinder) dans un tampon de lyse RIPA (50mM Tris HCL, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM Na3VO4, 50mM NaF, 5mM PPi, 1%NP40, 10% glycérol). Les protéines sont récupérées après élimination des débris cellulaires par centrifugation.

Le dosage des protéines par l'acide bicinchoninique (BCA) est fondé sur la réaction des ions métalliques cuivreux avec les liaisons peptidiques des protéines. Les ions Cu2+ réduits du Cu1+ lors d'une première réaction vont réagir avec l'acide bicinchoninique pour former un complexe stable de couleur violette. La couleur du complexe BCA/cuivre est mesurable par colorimétrie à une longueur d'onde de 562 nm. Son intensité est proportionnelle à la structure macromoléculaire des protéines, au nombre de liaisons peptidiques et à la présence de 4 aminoacides particuliers (cystéine, cystine, tryptophane and tyrosine).

Les échantillons (généralement dilués au 1/10, en tampon RIPA) sont mesurés grâce à une gamme étalon de BSA allant de 25 à 2000 ug/mL préparée en tampon RIPA. Les mesures sont effectuées en duplicata. Le blanc est réalisé sur le tampon de lyse.

La réaction colorimétrique se fait à 37°C durant 30 min en présence des réactifs BCA donnés dans le kit (Protein assay BCA, Pierce). L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 562 nm (FLUOstar OPTIMA Microplate Reader, BMG Labteh). La concentration en protéines des échantillons à mesurer est déterminée par comparaison avec la gamme de référence.
Tous les échantillons sont égalisés à une concentration de 1,5ug/uL de protéines dans une solution de Laemmli (200mM TRIS pH6,8, 6% SDS, 45% glycérol, 5,1% b-mercaptoéthanol, 0,03% bleu de bromophénol), afin de pouvoir être comparés entre eux.

b)-La séparation des fractions F & G d'Actine

Le ratio de l'Actine filamenteuse et globulaire a été déterminé par l'utilisation du kit G-Actin/F-Actin In Vivo Assay (Cytoskeleton, Inc.), selon les instructions données par le fournisseur. Les cellules ont été directement lysées dans les puits de culture, puis centrifugés 5 min à 350G à TA. Les supernageants obtenus ont été centrifugés 1h à 100 000G à 37°C, ce qui permet la séparation de l'Actine-G glomérulaire, qui se retrouve dans le surnageant, de l'Actine-F filamenteuse retrouvée dans le culot. Le culot est alors resuspendu dans un tampon de solubilisation de dépolymérisation de l'Actin-F dans un volume égal à celui du volume du supernageant contenant l'Actine-G. Un même volume des fractions d'Actine est analysé par Western-blot.

c)-La migration et transfert des protéines sur membrane

Les échantillons protéiques préparés en solution de Laemmli sont dénaturés à 95°C pendant 5 min.
Ils sont ensuite déposés dans un gel sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE) à 10% d'acrylamide ou en gel gradient en acrylamide 4-20%. Les échantillons sont soumis à un courant constant de 60mA leur permettant de se séparer selon leur taille, dans un tampon de migration (25mM Tris pH8, 0,1% SDS, 1,44% glycine).

L'électro-transfert liquide des protéines est réalisé sur membrane de nitrocellulose 0,2um, (BIORAD) à 80V durant 3h, à 4°C, dans un tampon de transfert (20mM Tris pH8, 0,08% SDS, 1,15% glycine, 20% éthanol).

La membrane de nitrocellulose est colorée au rouge ponceau pour vérifier la migration et le transfert, puis lavée en Tris- buffered saline, 0.1% Tween 20 (TBS-T).

d)-L'immunomarquage

La membrane est saturée dans une solution protéique (TBS 1X, 5% lait), puis incubée avec un anticorps primaire ON à 4°C dilué dans cette même solution de saturation. Nous n'avons pas utilisé de protéine de ménage afin de normaliser les dépôts protéiques, car les protéines comme l'Actine ou la GAPDH ont leur expression qui varie dans notre modèle.

Les anticorps secondaires couplés à la horseradish peroxidase (HRP) sont ensuite dilués dans cette même solution, et incubés 1h à TA.

Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont listés ci-dessous :
Anti-SRF rabbit 1/1000 (Santa Cruz) - Anti-rabbit HRP 1/10 000
Anti-pan-Actine rabbit 1/500 (Cytoskeleton, Inc) - Anti-rabbit HRP 1/1000
Anti-Tubuline 1/1000 (Millipore) – Anti-mouse HRP 1/10 000

e)-La révélation

Les protéines marquées sont révélées en utilisant un kit enhanced chemiluminescence (ECL) (WesternBright ECL HRP Substrate, Advansta). L'enzyme HRP catalyse le substrat contenu dans le kit ECL en un produit mesurable par chimioluminescence. L'activité de cette enzyme, proportionnelle à la quantité d'enzymes présentes sur la membrane, révèle la présence des protéines. La chimioluminescence est mesurée par la machine Image ImageQuant LAS 4000 Mini (GE Healthcare Life Sciences). Les bandes protéiques ont été analysées par le système Biorad Quantity One software, version 4.6.6. Le ratio d'Actine-F/G a été analysé par le logiciel FusionCapt Advance (Vilber Lourmat).

f)-L'analyse

Les bandes protéiques ont été analysées et quantifiées par le logiciel ImageJ.
Le ratio d'Actine-F/G a été quantifié par le logiciel FusionCapt Advance (Vilber Lourmat).

2-3-2-La mesure spectrophotométrique des activités de la chaîne respiratoire

Ces dosages sont réalisés sur 40ug d'homogénat cellulaire post-nucléaire issus de muscle. Les échantillons sont repris dans le tampon « MAN » (225mM mannitol, 75mM saccharose, 0,1mM EDTA, 10mM Tris HCl pH7,2) (concentration en protéines finale de 2mg/mL). Les muscles sont broyés mécaniquement par le système « Dounce », puis le broyat obtenu est centrifugé 10min à 1000G pour ne garder que le surnageant dit « post-nucléaire ». Les préparations sont ensuite maintenues entre 0-4°C (dans la glace).

Les différents complexes de la chaîne respiratoire ont été dosés à 37°C selon les protocoles spectrophotomètriques récemment standardisés dans les centres diagnostiques hospitaliers français [162].

2-3-2-1-Le dosage du complexe I

a)-Le principe

Le complexe I de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du NADH en NAD+ en transférant les électrons au coenzyme Q10 ou ubiquinone. Son activité sera donc évaluée par la disparition du NADH qui absorbe à 340 nm. L'activité spécifique du complexe I est la partie sensible à la roténone, inhibiteur spécifique du complexe I, de l'activité NADH ubiquinone oxydoréductase. Elle est mesurée par la différence entre l'activité totale et celle résistante à la roténone, activité non respiratoire d'oxydation du NADH due à l'activité d'autres NADH déshydrogénases, dont la cytochrome b_5 oxydo-réductase, qui sont toutes insensibles à la roténone.

La molécule d'ubiquinone, très hydrophobe, est remplacée dans l'essai par la décylubiquinone, beaucoup plus hydrophile.

b)-Le protocole

Quarante µg de protéines sont mis en présence du tampon de réaction (100 µM décylubiquinone, 50 mM K Phosphate pH 7,5, 3,75 mg/mLd'albumine bovine). La mesure de DO est prise à 340nm à 37°C puis 0,1 mM de NADH sont ajoutés afin d'initier la réaction. Les mesures sont effectuées toutes les 15 sec pendant 3min dans deux cuves en parallèle, l'une contant en plus 5 µM de roténone. L'activité spécifique est calculée par la différence entre activité totale et résistante à la roténone. Elle est rendue en nanomoles/min/mg de protéines.

2-3-2-2-Le dosage du complexe II

a)-Le principe

Le complexe II de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du succinate dont il transfère les électrons au coenzyme Q_{10} ou ubiquinone. L'activité de la succinate ubiquinone oxydoréductase est mesurée en suivant la réduction du 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP) par la baisse de l'absorbance à 600 nm du DCPIP oxydé. Cette activité est normalisée par mesure de la réaction spontanée de transfert d'électrons au DCPIP.

La molécule d'ubiquinone, très hydrophobe, est remplacée dans l'essai par la décylubiquinone, beaucoup plus hydrophile.

b)-Le protocole

Quarante µg de protéines sont mis en présence du tampon de réaction (25 mM K Phosphate pH 7.5, 20 mM succinate, 50 µM DCPIP, 1 mM KCN, 100 µM ATP , 2 mg/mL albumine bovine). Après lecture de la ligne de base, la réaction est démarrée par l'ajout de 100 µM décylubiquinone. La DO à 600 nM est mesurée toutes les 15 sec durant 3 min. L'activité spécifique est calculée après soustraction de l'activité de base et exprimée en nanomoles/min/mg de protéines.

2-3-2-3-Le dosage du complexe IV

a)-Le principe

Le complexe IV de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du cytochrome c, son activité sera donc évaluée par la disparition du cytochrome c réduit qui absorbe à 550 nm. L'accepteur naturel des électrons du complexe IV est l'oxygène.

b)-Le protocole

Quarante µg de protéines sont mis en présence du tampon de réaction (50 mM K phosphate pH 7,0, 100 µM cytochrome c réduit à 95%). C'est l'ajout des protéines qui démarre la réaction. Pour préparer ce cytochrome c réduit, deux mL sont pris de la solution 100 µM cytochrome c ; l'un sert à préparer une solution « 100% oxydée » par ajout de quelques grains de ferricyanure de potassium, l'autre une solution « 100% réduite » en ajoutant quelques grains de dithionite de sodium (bisulfite). La mesure de la DO est réalisée sur la « solution 100% réduite » dont la DO de la solution « 100% oxydée » est déduite (pour une réduction nulle). Puis petit à petit quelques gouttes de la solution « 100% réduite » sont ajoutées à la solution cytochrome, afin de la réduire progressivement jusqu'à 95%.

Les mesures d'activité sont prises toutes les 10 sec pendant 3 min. L'activité spécifique est calculée et rendue en nanomoles/min/mg de protéines.

2-3-2-4-Le dosage de la Citrate Synthase (CS)

a)-Le principe

La citrate synthase est une enzyme du cycle de Krebs qui forme du citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétylCoA. Le CoA réduit (CoA-SH) formé lors de la réaction réagit avec le 5,5' dithiobis 2 nitrobenzoic acid (DTNB) pour donner du TNB qui absorbe spécifiquement à 412 nm. L'activité de la citrate synthase est donc mesurée en suivant l'augmentation de l'absorbance à 412 nm.

b)-Le protocole

Quarante µg de protéines sont mis en présence du tampon de réaction (100 µM DTNB, 100 mM Tris HCl pH 8,1, 300 µM acétyl CoA, 0,1 % Triton X100). La réaction est déclenchée par ajout de 500 µM oxaloacétate. Les mesures sont effectuées toutes les 20 sec durant 4 min. L'activité spécifique est calculée après soustraction de l'activité de base en nanomoles/min/mg de protéines.

2-3-3-La mesure de la respiration par polarographie

a)-Le principe

Cette technique consiste à mesurer des vitesses de consommation d'oxygène dans un broyat cellulaire, conservant l'intégrité des mitochondries, obtenu par broyage mécanique (homogénéiseur de « Dounce »). Le broyat, contenu dans du milieu de culture est placé dans une chambre de mesure hermétique et thermostatée à 37°C disposant d'une agitation magnétique. Au cours du temps, des substrats de la chaîne respiratoire sont ajoutés aux échantillons et la mesure de l'oxygène présent est réalisée à l'aide d'un oxygraphe contenant une électrode de Clark (Oroboros Instruments, Austria). Cette électrode est composée d'une cathode en or et d'une anode en argent avec une différence de potentiel de -0,7 V, immergées dans une solution de KCl saturée. Ces deux pôles sont isolés de la chambre de mesure par une membrane semi-perméable laissant diffuser l'oxygène. Chaque molécule d'oxygène traversant la membrane va être réduite au niveau de la cathode ; au niveau de l'anode se produit une réaction d'oxydation. La variation de courant induite est proportionnelle à la concentration en oxygène. Ces variations de courant sont amplifiées et transmises sur un logiciel de calcul qui les transforme en picomoles d'oxygène par seconde.

L'électrode est calibrée en déterminant les concentrations minimale et maximale d'oxygène. Le milieu de respiration à l'air à 37°C donne le niveau maximal de l'échelle de concentration d'oxygène correspondant à 100% d'oxygène normalement dissout dans une solution aqueuse dans ces conditions. L'ajout de quelques grains de dithionite de sodium permet d'obtenir le niveau minimal de l'échelle de concentration d'oxygène correspondant à 0% oxygène puisque celui-ci est entièrement réduit en eau par le dithionite.
La vitesse de consommation d'oxygène est mesurée en plusieurs étapes, permettant d'évaluer différents aspects de la fonctionnalité de la chaîne respiratoire mitochondriale.

1. L'état basal est d'abord mesuré en tampon de respiration avec des substrats respiratoires, soit malate et glutamate (substrats dont les électrons entrent dans la chaîne au niveau du complexe I), soit succinate (dont les électrons entrent au niveau du complexe II).
2. La consommation d'oxygène en phase active produisant de l'ATP (« stade 3 ») est ensuite mesurée après ajout d'ADP
3. La consommation d'oxygène minimale en l'absence de production d'ATP (« stade 4 ») est ensuite mesurée après l'ajout d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthétase (complexe V) au niveau de sa sous-unité F0 (« tunnel » à protons).
4. La capacité maximale de respiration est ensuite mesurée par ajouts successifs du protonophore carbonyl cyanide m-chloro- phenyl hydrazone (cccp) jusqu'au niveau maximal. Le cccp est un agent découplant qui dissipe le gradient de protons et libère la chaîne respiratoire du frein que ce dernier impose.
5. La consommation d'oxygène non respiratoire (par les cellules ou l'électrode) est enfin mesurée après ajout de cyanure de potassium (KCN) qui est un inhibiteur du complexe IV.

b)-Le protocole

Les GAS des deux pattes, dénervée et contralatérale, sont broyés puis dilués à 10% (10 mg de muscle pour 100 µL) dans le tampon de respiration à pH 7,3 (300 mM sucrose, 5 mM Tris base, 1 mM EGTA), en présence de substrats respiratoires, malate+ glutamate ou succinate.

Les paramètres (exprimés en picomoles/seconde et million de cellules) pris en compte sont les suivants :

1. Respiration basale = (respiration à l'état basal – consommation non respiratoire d'oxygène sous KCN)
2. Respiration « stade 3 » = (respiration en présence d'ADP – consommation non respiratoire d'oxygène sous KCN)
3. Respiration « stade 4 » = (respiration en présence d'oligomycine – consommation non respiratoire d'oxygène sous KCN)
4. Respiration maximale = (niveau maximal obtenu sous cccp – consommation non respiratoire d'oxygène sous KCN)
5. Contrôle respiratoire = (respiration « stade 3 »/respiration « stade 4 »)
6. La réserve respiratoire = (respiration maximale – respiration basale)

Les valeurs obtenues sont rapportées pour 100 mg de muscle.

2-4-Les analyses moléculaires

2-4-1-Le génotypage des animaux par PCR

a)-L'extraction d'ADN

Les animaux sont génotypés à partir d'une biopsie de queue. L'ADN est extrait par dégradation des biopsies dans un tampon de lyse (100mM Tris pH8, 5mM EDTA pH8, 200mM NaCl, 0,2% SDS) et de la protéinase K à 48ug/mL (PK) , ON à 55°C. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation, 5 min à 18 000 G. Les acides nucléiques sont ensuite précipités en ajoutant 0,8 Vol d'isopropanol. La pelote d'ADN formée est récupérée en centrifugeant le mélange 5min à 18 000 G, puis resuspendue dans de l'eau.

b)-L'analyse par PCR

Les descendances de croisements de souris sont génotypés par PCR, en ciblant spécifiquement les gènes *GFP*, *CRE*, $Srf^{flox/flox}$ et *CAT*. Les oligos utilisés sont les suivants :

$SRF^{flox/flox}$ (sens : 5'-CTGTAAGGGATGGAAGCAGA-3' ; anti-sens : 5'-TAAGGACAGTGAGGTCCCTA -3')
CRE (sens : 5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3' ; anti-sens : 5'-CAGGGTGTTATAAGCAATCCC-3')
GFP (sens : 5'-CGACGTAAACGGCCACAAGTTC-3' ; anti-sens : 5'-GACGTTGTGGCTGTTGTAGTTG-3')
CAT (sens : 5'-CGAGGGACCTAATAACTTCG-3' ; anti-sens : 5'-GCCGGATAAAACTTGTGCTT-3')

2-4-2-La validation de l'expression des transcrits de gènes obtenus par séquençage

a)-L'extraction d'ARN à partir de cellules

Les cellules en prolifération ou en différenciation récoltées à partir d'un puits de plaque de 6 puits sont décollées de leur support par action de la trypsine pendant 1 min à 37°C. Après centrifugation, le culot cellulaire est lavé une fois en PBS. Les cellules sont congelées sous forme d'un culot sec avant que les ARN totaux ne soient extraits.

L'extraction des ARN est réalisée avec le kit d'extraction RNeasy Mini kit (Qiagen) selon les indications données par le fournisseur. Cette technologie combine les propriétés de liaison sélective d'une membrane à base de silice avec la technologie de MicroSpin. Les culots cellulaires sont lysés et homogénéisés en présence d'un tampon dénaturant (guanidine-thiocyanate), et réducteur (b-mercaptoéthanol), réduisant les ponts disulfures des ribonucléases, les inactivant afin de garder les ARN intacts. L'ajout d'éthanol permet à l'ARN de l'échantillon de se lier à la colonne de silice. La pureté des ARN est assurée en traitant l'échantillon biologique prisonnier dans la colonne par

27unités de DNase pendant 15 min (Qiagen). Les débris et contaminants sont élués par lavages successifs. Les ARN totaux sont ensuite élués dans de l'eau.

b)-L'extraction d'ARN à partir de muscle

Les muscles sont congelés en azote liquide. Ils sont ensuite broyés 2 fois pendant 2 min à une fréquence de 30 Hz, par Tissuelyser (Qiagen Retsch MM301 Mixer Mill Grinder) en présence de billes, dans du TRIzol (Sigma).

Les ARN totaux sont extraits par la technique guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform. Cette méthode repose sur la séparation de phases, à pH acide, par centrifugation d'un mélange d'échantillon, d'une solution contenant du phénol et du guanidine-isothiocyanate, et du chloroforme. Le guanidinium thiocyanate contenu dans le TRIzol, un agent chaotropique, permet la dénaturation des protéines. Après centrifugation 15 min à 12 000 G à 4°C, il en résulte une phase aqueuse contenant les acides nucléiques, et une phase organique contenant les protéines et l'ADN. Les ARN contenus dans la phase acqueuse sont précipités par ajout d'un volume d'isopropanol. Le culot obtenu après centrifugation 10 min à 12 000 G est lavé à l'éthanol 75% puis repris dans de l'eau. Un traitement par 2 unités/uL de DNase permet de s'assurer de la pureté des ARN, éliminant ainsi tout ADN génomique (Ambion, Life Technologies).

c)-La mesure des acides nucléiques

La concentration en acides nucléiques est mesurée par spectrophotométrie grâce au Nanodrop ND-100 ((NanoDrop Technologies, Delaware, USA). Les bases puriques et pyrimidiques qui composent les acides nucléiques sont détectables à 260 nm. Une mesure à 280nm par le spectrophotomètre permet de détecter la présence de protéines ou de phénol dans l'échantillon et ainsi de s'assurer de sa pureté. Leur pureté est évaluée par le rapport des densités optiques à 260 nm et 280 nm sachant que ce rapport doit être proche de 2.0 pour les ARN et proche de 1.8 pour les ADN.

d)-L'analyse par RT-qPCR (SYBr green)

Dans le but d'évaluer la quantité de transcrits de gènes présents dans nos échantillons, une transcription inverse (RT) des ARN en ADN complémentaire (ADNc) est nécessaire. Pour cela 1ug d'ARN (ou jusqu'à 350ng selon le matériel disponible) est rétro-transcrit par action de l'enzyme rétro-transcriptase (RTase) selon les indications données par le fournisseur (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific) La réaction se fait en présence de 5U/uL de RTase, 0,5X d'oligonucléotides, de 1X de dNTP et de 1U/uL d'inhibiteur de RNase.

Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés et mesurés par PCR quantitative en temps réel par la méthode du SYBR Green (LightCycler 480, Roche). Les ADNc sont amplifiés par une solution contenant l'ADN polymérase (0,5X Master mix SYBR Green), des nucléotides (1uM), les oligonucléotides spécifiques de la séquence du gène à étudier. À chaque cycle d'amplification, le SYBR Green s'intercale dans le double brin d'ADN nouvellement formé, et est détectable par fluorimétrie. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible. Les données de fluorescence sont exprimées en logarithme afin d'évaluer la quantité de cDNA initial par la linéarité de la phase exponentielle.

La quantité de transcrits pour chaque échantillon est déterminée par comparaison avec la gamme de référence. La valeur de l'expression des gènes cibles pour chaque échantillon est normalisée par l'expression d'un gène de référence (ici HMBS) dont l'expression ne varie pas dans notre modèle d'étude.

La séquence des différents oligonucléotides a été déterminée de façon à ce qu'ils soient efficaces à une température d'hybridation de 60°C. Leur séquence est ci-dessous :
Hmbs (sens : 5'-TGCACGATCCTGAAACTTCTG-3' ; anti-sens : 5'-TGCATGCTATCTGAGCCATC-3')

SRF (sens : 5'-CACCTACCAGGTGTCGGAAT-3' ; anti-sens : 5'-GCTGTGTGGATTGTGGAGGT-3')
MYOD (sens : 5'-GCAGATGCACCACCAGAGTC-3' ; anti-sens : 5'-TTCCTGGGTCCAGCCTCAAC-3')
Myogénine (sens : 5'-GCAATGCACTGGAGTTCG-3' ; anti-sens : 5'-ACGATGGACGTAAGGGAGTG-3')
ACTA1 (sens : 5'-CTGAGCGCAAGTACTCAGTGTGGA-3' ; anti-sens : 5'-TTCCAAAAACAGGCGCCGGCTGCA-3')
EGR1 (sens : 5'-ATGTGGGTGGTAAGGTGGTCACTA-3' ; anti-sens : 5'-AACCGGCCCAGCAAGACA-3')
HIC5 (sens : 5'-GCCTCTGTGGCTCCTGCAATAAAC -3'; anti-sens : 5'-CTTCTCGAAGAAGCTGCTGCCTC-3')
FHL2 (sens : 5'-ATGACTGAACGCTTTGACTGC-3' ; anti-sens : 5'-CGATGGGTGTTCCACACTCC-3')
KRT18 (sens : 5'-AACCGGCCCAGCAAGACA-3' ; anti-sens : 5'-CAGCCTTGTGATGTTGGTGT-3')

2-4-3-L'évaluation du nombre de copies d'ADN mitochondrial

a)-L'extraction d'ADN

L'ADN est extrait à partir du même broyat cellulaire que celui utilisé pour mesurer la respiration. Ce broyat est incubé toute la nuit à 37°C dans du tampon de lyse (10 mM Tris HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS, 20 ug/mL PK) afin de lyser les cellules. L'ADN est obtenu par précipitation en ajoutant 1 volume d'isporopanol et 0,1 volume de 5 M NaCl. Après centrifugation 10 min à 15 000 G à 4°C, le culot d'ADN est lavé dans 75% d'éthanol puis resuspendu dans du TE pH 8,0 contenant 3 µg/mL de RNase A. L'ADN de tous les échantillons est mesuré et leur concentration est ajustée à 50 ng/uL.

b)-Le dosage de l'ADN total par fluorescence

La quantité d'ADN est évaluée par référence à une gamme étalon de solution commerciale de phage lambda digéré par Hind3 (NEW ENGLAND BioLabs), allant de 1 ng à 1000 ng d'ADN dilué dans du PBS+0,1% TritonX100. Les échantillons sont également dilués dans du PBS+0,1% TritonX100. Une solution de SYBR Green au 1/1000 est ajoutée aux échantillons et à la gamme. Après 5 min d'incubation à l'abri de la lumière, à température ambiante, la fluorescence est mesurée sur un lecteur de microplaques (excitation 485 nm, émission 520 nm) (FLUOstar OPTIMA Microplate Reader, BMG Labteh).

c)-Le dosage de l'ADN mitochondrial par qPCR

Une PCR quantitative du gène *MT-CO2* (Cytochrome C Oxidase Subunit II) est effectuée sur 0,25 ng/uL d'ADN total précédemment extrait. Le nombre de copies du gène est déterminé par comparaison à une gamme étalon d'ADN de plasmide pGEMT-easy ayant comme insert le fragment du gène amplifié, allant de 10^8 copies à 10^1. Les résultats sont rendus en nombre de copie d'ADN mitochondrial par ng d'ADN total ou en nombre de copie d'ADN mitochondrial des pattes dénervées normalisé par les pattes contralatérales, exprimé arbitrairement en pourcentage.

3-Les analyses statistiques

Les résultats statistiques correspondent à des moyennes +/- SEM (Erreur Standard de la Moyenne) ou à des moyennes +/- SD (Standard Deviation).
En comparant 2 groupes, nous avons évalué la significativité par une analyse statistique en suivant un test d'hypothèse paramétrique, de populations de distribution normale : test de t-Student. Les moyennes sont considérées significatives lorsque $p<0.05$.
Les analyses de la respiration mitochondriale et de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été réalisées par une analyse statistique en utilisant le test non paramétrique de Mann & Whitney.

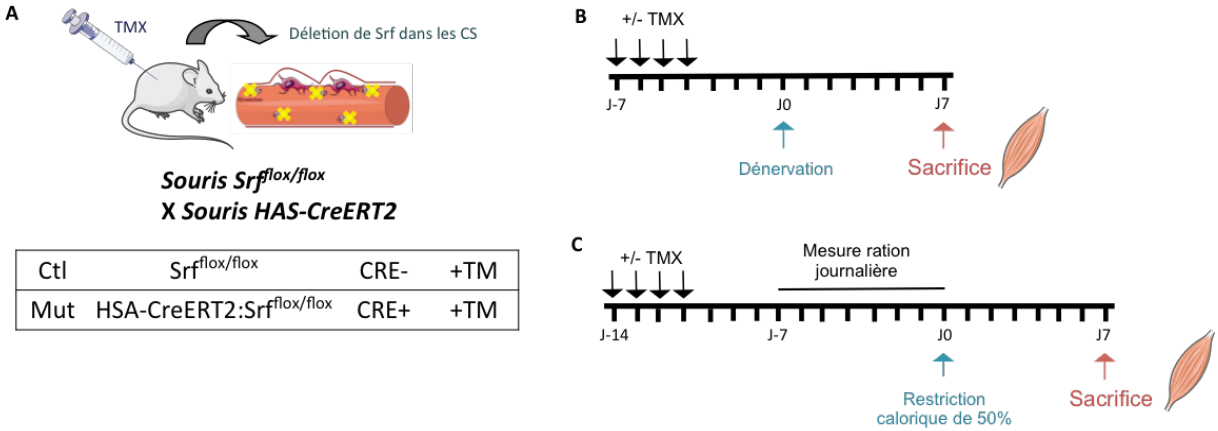
RESULTATS

Partie 1 - Le rôle du facteur de transcription SRF dans l'atrophie du muscle adulte

1-Le rôle de SRF dans l'atrophie par dénervation

1-1-Les données préliminaires de SRF dans l'atrophie par dénervation

L'équipe s'intéresse à l'implication de SRF dans la plasticité du muscle adulte. Je me suis plus particulièrement intéressée à l'atrophie du muscle par arrêt d'activité mécanique. Se basant sur un modèle de souris dont le gène *Srf* est inactivé de façon conditionnelle et inductible dans les fibres musculaires adultes uniquement : souris *HSA-CreERT2:SRF*$^{flox/flox}$ injectées avec du Tamoxifène (figure 23-A-B), Laura Collard une étudiante en thèse de l'équipe, a montré l'implication de SRF dans un modèle d'atrophie par dénervation chez la souris. Ces travaux que je signe en deuxième position, ont été publiés en 2014 dans Journal of Cell Science [157]. Par des approches perte de fonction (KO SRF) et gain de fonction (AAV SRFVP16), l'équipe a montré que la perte de SRF exacerbait le phénotype d'atrophie musculaire de 25% (Annexe 1-figure 2-A-B-C-D) et que le maintien de l'activité de SRF atténuait l'atrophie (Annexe 1-figure 2-E-F-G-H).



Ctl	$Srf^{flox/flox}$	CRE-	+TM
Mut	HSA-CreERT2:$Srf^{flox/flox}$	CRE+	+TM

Figure 23 : L'atrophie par dénervation et restriction calorique : modèle murin et expérimentations
(A) Représentation schématique du modèle murin contrôle *Srf*$^{flx/flx}$ et du modèle mutants *HSA-CreERT2:Srf*$^{flx/flx}$. Les souris Ctl et Mut sont injectées au TMX.
(B) Représentation schématique de l'expérimentation d'atrophie par dénervation. Les souris Mut sont injectées au TMX une semaine avant dénervation et sacrifiées 7 jours suivant l'acte chirurgical.
(C) Représentation schématique de l'expérimentation d'atrophie par restriction calorique. Les souris Mut sont injectées au TMX deux semaines avant mise en restriction calorique et sacrifiées 7 jours suivant l'acte chirurgical.

Nous savons qu'il existe différents phénomènes conduisant à un phénotype d'atrophie : le jeûne ou la restriction calorique, l'immobilisation, la ténotomie et la dénervation. Cependant l'atrophie qui en découle n'a pas la même origine, et ne fait pas intervenir les mêmes voies de signalisation. Dans le cas de la dénervation, le signal de contraction n'est plus induit dû à l'absence de fonction du nerf sciatique. Dans le cas de la ténotomie, le muscle est coupé au niveau d'un tendon à une extrémité, il reçoit alors le signal de se contracter, provenant des motoneurones, mais ne peut pas subir un étirement du fait qu'il n'est plus attaché au squelette. Quant à la restriction calorique, le muscle est en mesure de fonctionner mais son apport énergétique se retrouve amenuisé. Des remaniements au niveau cellulaire doivent ainsi avoir lieu afin de fournir au muscle l'énergie nécessaire pour sa survie.

De manière intéressante, SRF n'est pas impliqué dans le contrôle de l'atrophie induite par restriction calorique (annexe 2-figure 1-D-E), et est impliqué dans tous les modes d'atrophie mettant en jeu une diminution de l'activité/étirement (dénervation, ténotomie). Ces données indiquent que le rôle de SRF dans l'atrophie est spécifique de l'arrêt d'activité mécanique. Nous nous servirons du modèle d'atrophie induite par restriction calorique comme contrôle interne dans certaines expérimentations.

Nous avons cherché à identifier les fonctions altérées des muscles dépourvus de SRF au cours de la dénervation qui pourraient expliquer l'atrophie exacerbée observée. Je me suis focalisée à l'identification de voies en aval de l'activité du facteur de transcription SRF.

1-2-Les fonctions altérées des muscles dénervés chez les mutants SRF

D'après des analyses de puces Affimetrix réalisées dans l'équipe sur un modèle d'atrophie par dénervation (Dénervation-Den versus Innervation-In) et de restriction calorique (Rest cal), l'équipe a identifié des gènes dont l'expression était altérée par le perte de SRF dans des conditions de dénervation (1495 gènes) et de restriction calorique (1709 gènes) (figure 24-A). Nous avons porté notre attention sur les gènes dont l'expression est affectée par la perte de SRF uniquement dans le modèle de dénervation (soit 1178 gènes). Les gènes communs à ces 2 modèles (317 gènes) ont été exclus car nous nous intéressons uniquement aux conditions atrophiques dépendantes de l'activité de SRF, à savoir la dénervation (annexe 1-figure 1-B-D). L'analyse des fonctions (Ingenuity) altérées parmi ces 1178 gènes, a permis de mettre en évidence le dysfonctionnement éventuel de différentes fonctions biologiques: l'autophagie, le métabolisme énergétique, la contraction musculaire, le cycle cellulaire, l'organisation du cytosquelette (myofilaments, kératine), la mort cellulaire, l'apoptose, ou encore la biogenèse mitochondriale. L'autophagie est une des fonctions biologiques dont l'expression transcriptionnelle de nombreux gènes est affectée dans notre modèle (figure 24-A-B).

Nous nous sommes intéressés aux voies cataboliques (autophagie et système ubiquitine-protéasome) mais aussi au métabolisme énergétique en étudiant l'activité des mitochondries, le transfert énergétique, et l'activité de la protéine kinase 5' adenosine monophosphate (AMPK) activée par l'AMP.

1-3-L'étude de l'atrophie par dénervation des mutants SRF

1-3-1-Les voies cataboliques : autophagie & système Ubiquitine-Protéasome

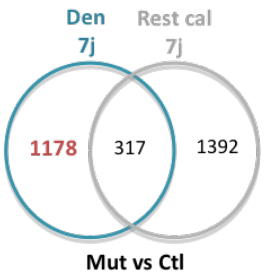
a)-L'autophagie

Selon les puces Affimetrix, le gène autophagy related 7 (*Atg7*) est augmenté significativement de 1,2 fois dans les muscles dénervés dépourvus de SRF chez les mutants dénervés par rapport aux contrôles. Ce gène codant pour la protéine de même nom, intervient dans la formation finale des autophagosomes. Par analyse transcriptionnelle par RT-PCR quantitative, nous avons confirmé cette augmentation. A l'état basal, nous observons une même expression entre les muscles contrôles et mutants. La dénervation engendre une augmentation de son expression, qui est plus importante en absence de SRF. L'analyse de la protéine ATG7 par Western blot présente le même profil que l'analyse transcriptomique, ce qui nous conforte dans l'intervention d'ATG7 dans notre modèle d'atrophie (figure 25-A-B-C).

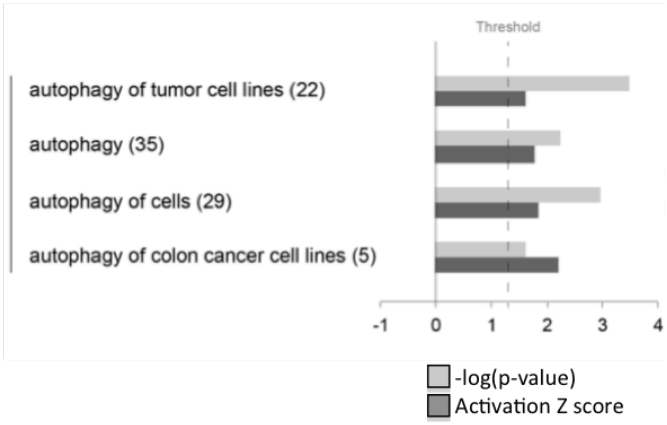
Afin d'évaluer le nombre d' autophagosome, nous avons quantifié les formes conjuguée LC3-II, et libre LC3-I par WB. Au cours du processus d'autophagie, la protéine LC3 est conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE) et ce complexe est incorporé à la membrane des pré-autophagosomes lors de la formation des autophagosomes. Dans notre modèle, la somme des formes LC3-II et LC3-I ne varie pas à l'état basal, en absence de SRF. Cependant, dans des conditions de dénervation les protéines LC3 totales augmentent, et tendent à augmenter d'avantage dans les muscles mutants SRF (figure 25-D-E).

Ces données suggèrent fortement une altération du processus d'autophagie en absence de SRF, dans des conditions d'atrophie par dénervation.

A



B



C

Gene	Full name
Ager	advanced glycosylation end product-specific receptor
Atg7	autophagy related 7
Bad	BCL2-associated agonist of cell death
Birc2	baculoviral IAP repeat-containing 2
Camp	cathelicidin antimicrobial peptide
Capn1	calpain 1
Chrnd	cholinergic receptor, nicotinic, delta polypeptide
Chuk	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
Fundc1	FUN14 domain containing 1
Ikbkg	inhibitor of kappaB kinase gamma
Krt18	keratin 18
Map1lc3a	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)
Map2k1	mitogen-activated protein kinase kinase 1
Map2k2	mitogen-activated protein kinase kinase 2
Mapk14	mitogen-activated protein kinase 14
Mapt	microtubule-associated protein tau
Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2
Megf10	multiple EGF-like-domains 10
Myc	myelocytomatosis oncogene
Myl3	myosin, light polypeptide 3
Nlrc4	NLR family, CARD domain containing 4
Prkaa1	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
Prkaa2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
Smyd3	SET and MYND domain containing 3
Tbc1d9b	TBC1 domain family, member 9B
Tlr5	toll-like receptor 5
Tsc2	tuberous sclerosis 2
Vti1b	vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1B

Figure 24 : Les fonctions altérées des muscles atrophiés par dénervation chez les mutants SRF
(A) Diagramme de Venn des ensembles de gènes variant significativement ($p<0.05$) entre les muscles *Gastrocnemius* et *Plantaris* (GP) contrôles et mutants lors de la dénervation (Den) et de la restriction calorique (Rest cal).
(B) Graphique représentant la valeur -log(p-value) et le score Z d'activation associés aux fonctions liées à l'autophagie par dénervation, significativement altérées (p-value<0.05 soit -log(p-value)<1.3) dans les GP dénervés, des mutants par rapport aux contrôles.
(C) Gènes faisant partie des fonctions liées à l'autophagie par dénervation, et dont l'expression varie significativement ($p<0.05$) entre les GP de souris contrôles et mutantes.

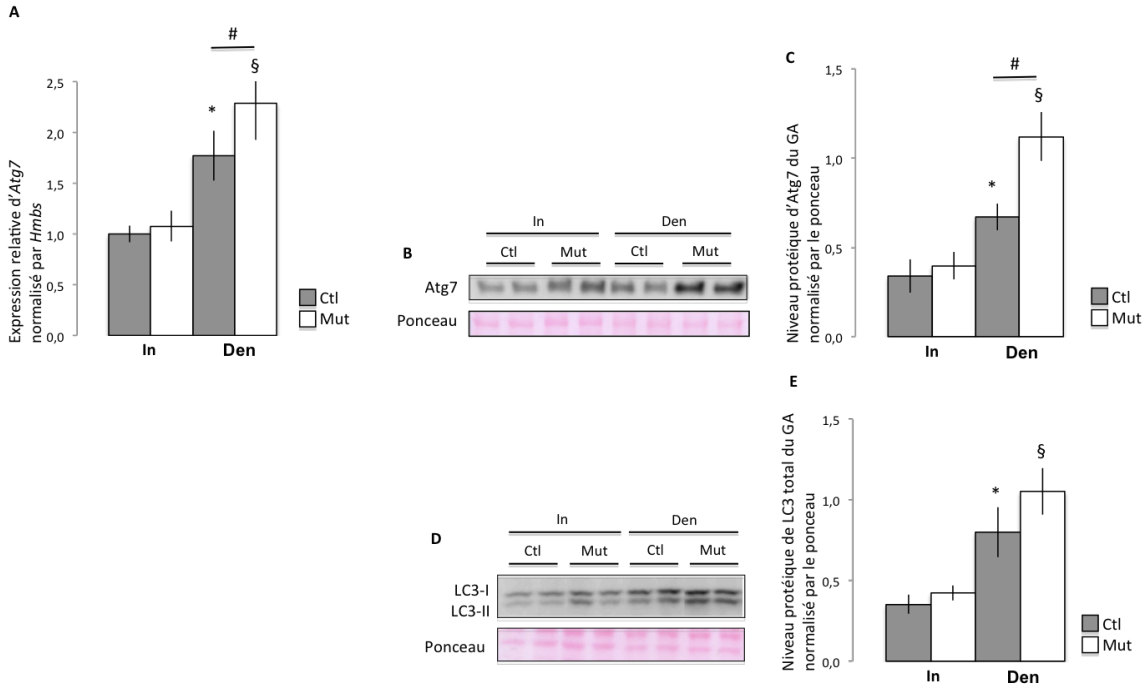


Figure 25 : L'autophagie

(A) Expression des ARNm d'*Atg7* par RT-qPCR du TA, normalisée par *Hmbs* chez les contrôles (Ctl), mutants SRF (Mut), en condition d'innervation (In) et de dénervation (Den) (Ctl n= 9 ; Mut n=5).
(B) Représentation d'un immunoblot montrant la protéine ATG7 du GP et le dépôt protéique (ponceau) (Ctl n= 3 ; Mut n=4).
(C) Quantification de la protéine ATG7, normalisée par le ponceau (Ctl n=3 ; Mut n=4).
(D) Représentation d'un immunoblot montrant les isoformes de la protéine LC3 du GP et le dépôt protéique (ponceau) (Ctl n= 3 ; Mut n=4).
(E) Quantification des protéines LC3 totales, normalisée par le ponceau (Ctl n=3 ; Mut n=4).
Les données sont les moyennes +/- s.e.m. *, p<0.05 *versus* Ctl In ; §, p<0.05 *versus* Mut In ; #, p<0.05.

b)-Le système Ubiquitine-Protéasome

Les atrogènes sont des gènes dont l'expression est affectée dans différents modèles d'atrophie musculaire. Ils régulent la masse musculaire. Il a été montré que l'absence des atrogènes E3 Ub ligases, MAFbx ou MuRF1, provoquait une résistance à l'atrophie par dénervation ou immobilisation, et que la surexpression de MAfbx induisait une atrophie [163].

Des analyses préalablement faites dans l 'équipe ont montré que l'expression des atrogènes *MAFbx*, *MuRF1* et *Fbxo30*, ne varie pas à l'état basal. En conditions de dénervation, leur expression augmente considérablement mais l'absence de SRF n'a pas d'impact sur leur expression (annexe 1-figure S2-B).

Les protéines ubiquitinylées sont des protéines marquées d'une chaîne de molécules d'ubiquitine, dont l'une des fonctions est d'initier la dégradation par le protéasome des protéines ainsi marquées. L'analyse de la multi-ubiquitinilation par WB ne montre pas de différence entre les muscles contrôles et mutants à l'état basal. Cependant, nous observons plus de protéines multi-ubiquitinylées en conditions de dénervation, qui tend à augmenter en absence de SRF. (figure 26-A-B).

D'après ces résultats, l'exacerbation du phénotype d'atrophie par dénervation des animaux mutants SRF pourrait être, en partie, corrélé au système ubiquitine-protéasome.

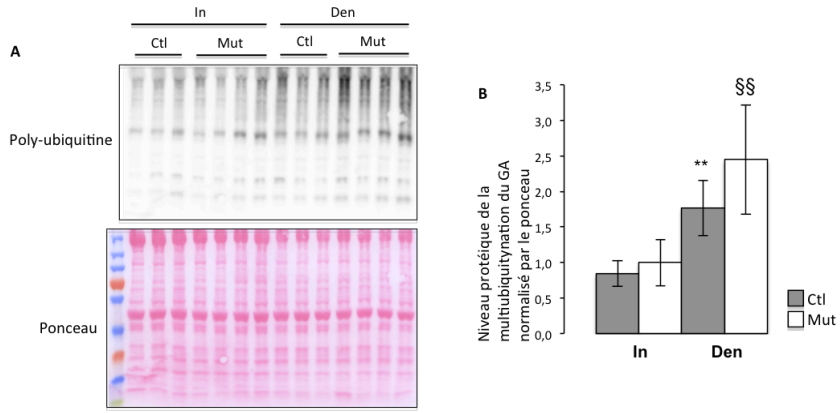


Figure 26 : Les système Ubiquitine-Protéasome
(A) Représentation d'un immunoblot montrant les protéines poly-ubiquitinylées du GP et le dépôt protéique (ponceau) des muscles contrôles (Ctl), mutants SRF (Mut), en condition d'innervation (In) et de dénervation (Den) (Ctl n= 3 ; Mut n=4).
(B) Quantification des protéines poly-ubiquitinylées du GP, normalisée par le ponceau (Ctl n=3 ; Mut n=4).
Les données sont les moyennes +/- s.e.m. **, p<0.01 *versus* Ctl In ; §§, p<0.01 *versus* Mut In.

1-3-2-Les fonctions mitochondriales & transfert et régulation énergétiques

1-3-2-1-Les fonctions mitochondriales

Des images prises au microscope électronique par Laura Collard montraient des mitochondries à l'aspect altéré dans les muscles des animaux mutants dont les muscles avaient été dénervés (figure 27-A). De plus, il a été montré que les mitochondries de neurones étaient morphologiquement abimées en absence de SRF [164]. De façon à vérifier si les fonctions des mitochondries étaient défaillantes en absence de SRF en condition d'atrophie par dénervation, nous avons collaboré avec Anne Lombès, faisant partie d'une équipe spécialiste des mitochondries au sein de l'Institut Cochin. Nous avons quantifié le nombre de mitochondries puis analysé leur activité ainsi que celle des différents complexes de la chaine respiratoire.

a)-La quantification des mitochondries

Afin de quantifier les mitochondries, nous avons déterminé la quantité d'ADN mitochondrial dans nos échantillons lors de cette collaboration. Pour cela nous avons analysé le nombre de copies du gène *MT-CO2* par qPCR, un gène spécifiquement mitochondrial, rapporté à la quantité d'ADN total de nos échantillons. En accord avec la littérature, le nombre de copies d'ADN du gène *MT-CO2* est diminué lors d'atrophie par dénervation. Toutefois il n'est pas significativement plus bas chez le mutant SRF (figure 27-B). Ce résultat indique qu'il y aurait moins de mitochondries en condition d'atrophie par dénervation, mais que ce nombre n'est pas affecté en absence de SRF. L'activité de la Citrate Synthase (CS), une enzyme du cycle de Krebs localisée à la mitochondrie, reflète aussi la quantité de mitochondries dans les tissus (voir figure 27-D). Nous observons la même tendance que le nombre de copies du gène *MT-CO2* par mesure de son activité enzymatique, ce qui appuie ce résultat.

b)-La respiration mitochondriale

La quantité de mitochondries ne semble pas être en cause dans le phénotype d'atrophie exacerbée par arrêt d'influx nerveux chez les mutants SRF. Nous nous sommes alors orientés sur l'étude de leur fonction (figure 27-C). Nous avons analysé l'activité de la chaîne respiratoire par mesure de la consommation d'oxygène grâce au polarographe Oroboros. Le « stade 3 » est mesuré par ajout d'ADP, il correspond à la consommation d'oxygène couplé à la synthèse d'ATP. Le "stade 3" est diminué dans les muscles des pattes dénervées contrôles et mutantes. Le « stade 4 », correspondant à la consommation d'oxygène en présence d'oligomycine, ou dit « fuite », est inchangé en condition

d'atrophie. Le ratio du « stade 3 »/« stade 4 » représente le contrôle respiratoire des mitochondries (respiratory control ratio-RCR). Plus le RCR est élevé, plus le couplage entre consommation d'O_2 et synthèse d'ATP est élevé, reflétant l'activité de la chaîne respiratoire. Dans notre modèle, le RCR tend à diminuer mais de façon non significative chez les mutants SRF, indiquant un maintien du flux d'ATP des mitochondries.

c)-L'activité des complexes isolés (Vmax) de la chaîne respiratoire

L'activité des différents complexes protéiques qui composent la chaine respiratoire est mesurable par spectrophotométrie. Ainsi, même si l'activité globale de la chaîne respiratoire ne semble pas altérée, nous avons étudié spécifiquement les activités des complexes I (NADH ubiquinone réductase), complexe II (succinate ubiquinone oxydoréductase) et le complexe IV (cytochrome c oxydase) (figure 27-D). L'activité de la CS, une enzyme du cycle de krebs a aussi été mesurée. Les activités des complexes I et II tendent à une diminution lors de la dénervation, en absence de SRF, avec une p-value respective de p=0.076 et p=0.057. Ces observations sont en faveur d'un défaut d'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire. Cependant l'activité de ces différents complexes pourrait être masquée dans un broyat total de muscle, avec la présence d'autres types cellulaires. Elle pourrait également s'expliquer par le fait que les mitochondries ne se trouvent plus dans une structure, ayant perdu leur environnement cellulaire.

D'après ces résultats nous ne pouvons affirmer la corrélation de l'exacerbation de l'atrophie par dénervation avec la fonction mitochondriale. Cependant ces résultats restent encourageant et nous invitent à approfondir l'analyse de la fonction mitochondriale dans un modèle où la structure cellulaire est conservée.

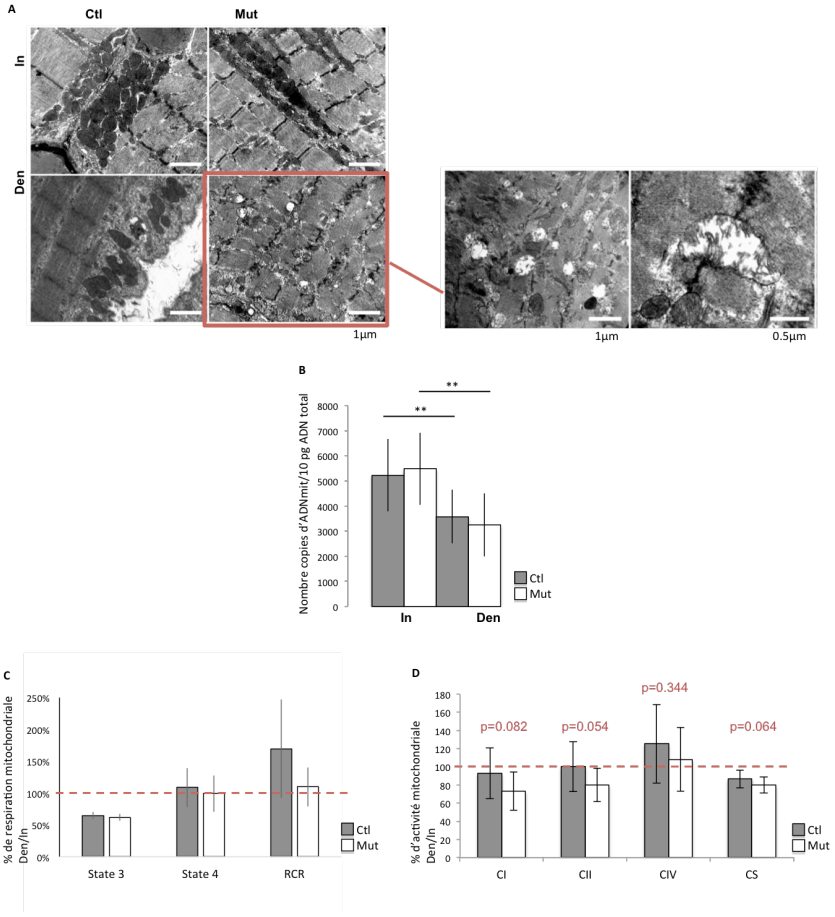


Figure 27 : Fonctions mitochondriales

Figure 27 : Fonctions mitochondriales
(A) Microscopie électronique de coupes de PL contrôles (Ctl), mutants SRF (Mut), en condition d'innervation (In) et de dénervation (Den), montrant l'aspect des mitochondries (échelle : 10μm/1μm/0.5μm).
(B) Dénombrement du nombre de copies d'ADN mitochondrial par qPCR (Ctl n= 10 ; Mut n= 9).
Les données sont les moyennes +/- s.d. **, p<0.01 *versus* Ctl In ; §§, p<0.01 *versus* Mut In.
(C) Pourcentage de respiration mitochondriale des pattes dénervées rapportées aux pattes contralatérales (In) (Ctl n=8 ; Mut n=7). Les données sont les moyennes +/- s.e.m.
(D) Pourcentage d'activité des complexes de la chaîne respiratoire des pattes dénervées rapportées aux pattes contralatérales (In) (Ctl n=10 ; Mut n=9). Les données sont les moyennes +/- s.d.

1-3-2-2-Le transfert & régulation énergétiques

a)-La Créatine Kinase

Nous nous sommes donc intéressés au transfert d'énergie des cellules, allant du site de production de l'ATP, la mitochondrie, au lieu de consommation d'énergie, les sarcomères. La créatine kinase (CK) est une enzyme qui catalyse la conversion de la créatine en phosphocréatine, par conversion de l'ATP en ADP. La molécule phosphocréatine est immédiatement transformée en ATP par la mitochondrie, ce qui déplace l'équilibre de la réaction, et forme une cascade de réactions ayant pour conséquence un transfert d'énergie aux sarcomères.

Les analyses transcriptionnelles de la CK musculaire (*Ckm*) et de la CK mitochondriale (*Ckmt2*) révèlent que l'expression de ces gènes est significativement diminuée en conditions d'atrophie, et qu'elle s'avère d'autant plus diminuée en absence de SRF, ce qui valide les résultats obtenus par les puces Affimetrix (figure 28-A-B). Cependant les analyses protéiques ne vont pas dans le sens des résultats transcriptionnels, dont le niveau protéique est constant quel que soit le génotype des muscles dénervés (données non montrées).

Ces résultats nous indiquent que l'acheminement de l'énergie de la mitochondrie aux unités de contraction des fibres musculaires ne serait pas altéré, en absence de SRF dans des conditions de dénervation.

b)-L'AMPK

L'AMPK est un senseur métabolique qui active les voies métaboliques produisant de l'ATP (glycolyse - β-oxydation des acides gras - synthèse des corps cétoniques) et inhibe les voies métaboliques consommant de l'ATP (synthèse du cholestérol et des triglycérides, lipolyse dans les adipocytes). Un défaut de l'énergie cellulaire induit l'activation de l'AMPK [165], qui régulerait positivement l'expression du gène *PGC-1-alpha* [166], un coactivateur transcriptionnel de gènes de la chaine de transport d'électrons, de la biogenèse mitochondriale et de la béta-oxidation des acides gras [167] [168]. Dans notre modèle, l'AMPK phosphorylée est augmentée chez les contrôles en conditions d'atrophie. Nous observons une tendance à avoir plus d'AMPK phosphorylée dans les muscles des mutants SRF dénervés (figure 28-C-D), ce qui reflèterait un état de stress énergétique supérieur chez les animaux KO en conditions de dénervation, ce qui irait en faveur du maintien de production d'énergie dans la cellule.

1-4-Conclusion - Rôle de SRF dans l'atrophie du muscle squelettique adulte

En conclusion de cette première partie, les voies de dégradation des protéines par autophagie semblent être perturbées en absence de SRF dans des conditions d'atrophie par dénervation. Cependant nous ne sommes pas en mesure de déterminer si la dégradation est directement augmentée, signe d'une activité accrue, ou si les protéines résultant du processus de dégradation s'accumulent mais ne sont pas dégradées. Pour exemple, la protéine LC3-II, forme associée aux phagosomes, est à la fois produite et dégradée au cours du phénomène d'autophagie. Afin de déterminer le flux de d'autophagie, l'usage d'agents lysomotropiques bloquant la dégradation de LC3-II serait intéressant [169].

D'autre part, nous pouvons dire que l'exacerbation du phénotype d'atrophie en condition de dénervation en absence de SRF serait justifiée par une altération métabolique du muscle. En effet, l'autophagie pourrait être un acteur de cette atrophie induite par l'arrêt mécanique du à l'absence de signaux d'excitabilité aux fibres. Le nombre de mitochondries ne semble pas être affecté dans notre modèle, ni le transfert énergétique. Cependant, l'activité des complexes I et II de la chaine respiratoire, semble être affectée. L'analyse de l'AMPK qui tend à augmenter indiquerait un maintien de la production énergétique, ce qui irait en faveur d'une survie cellulaire.

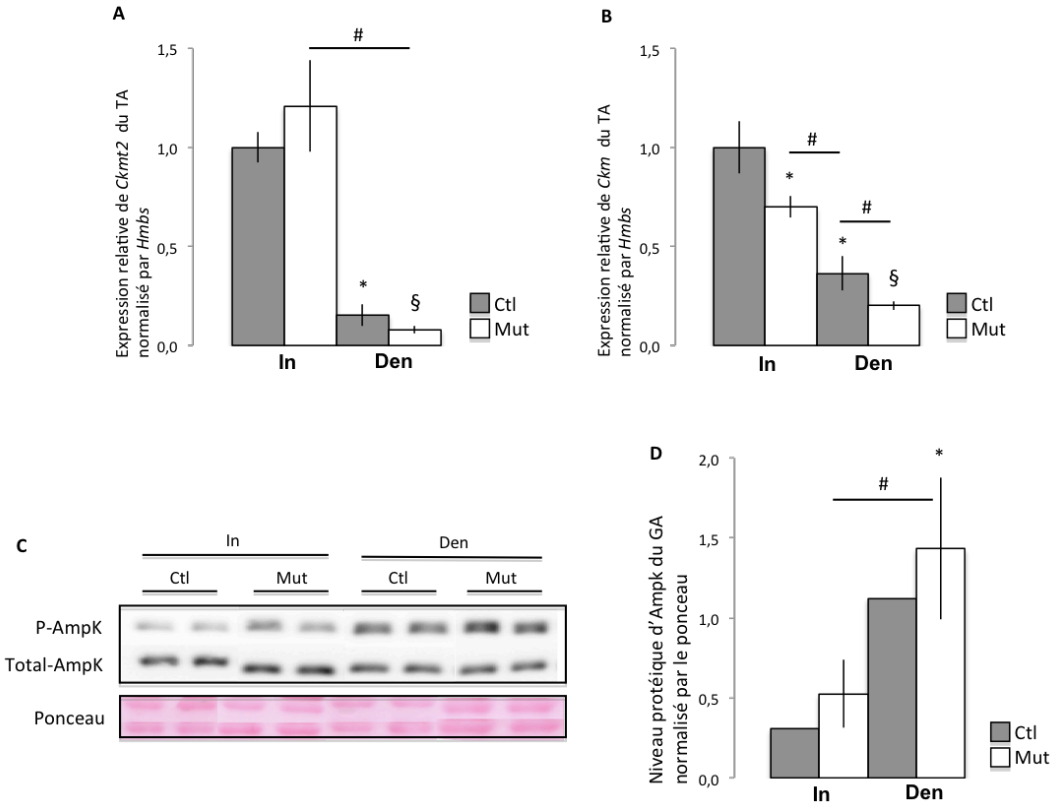


Figure 28 : Le transfert et régulation énergétiques

(A) Expression des ARNm de la créatine kinase mitochondriale *Ckmt2* par RT-qPCR du TA, normalisée par *Hmbs* des animaux contrôles (Ctl), mutants SRF (Mut), en condition d'innervation (In) et de dénervation (Den) (Ctl n= 9 ; Mut n=5).

(B) Expression des ARNm de la créatine kinase musculaire *Ckm* par RT-qPCR du TA, normalisée par *Hmbs* (Ctl n= 9 ; Mut n=5).

(C) Représentation d'un immunoblot montrant la protéine Ampk totale et sa forme phosphorylée du GP, et le dépôt protéique (ponceau) (Ctl n= 2 ; Mut n=5).

(D) Quantification de la protéine Ampk totale et de sa forme phosphorylée, normalisée par le ponceau (Ctl n=2 ; Mut n=5).

Les données sont les moyennes +/- s.e.m. *, p<0.05 *versus* Ctl In ; §, p<0.05 *versus* Mut In ; #, p<0.05.

Partie 2 - Le rôle du facteur de transcription SRF dans les cellules satellites adultes

2-Le rôle de SRF dans dans les cellules satellites adultes

2-1-Les fonctions altérées des cellules satellites mutantes SRF

Afin de déterminer le rôle de SRF dans les cellules satellites *in vivo*, nous avons créé un modèle de délétion conditionnelle et inductible de SRF dans les SC (*Pax7$^{CreERT2/+}$:Srf$^{flox/flox}$:Pax7-nGFP*). Les muscles de ces souris ont été soumis à une lésion à la CTX afin d'induire une régénération, et à une surcharge de travail (overload-OV), permettant d'évaluer le rôle des SC dans la fonctionnalité du muscle. La blessure par CTX abime la quasi-totalité des fibres musculaires et induit l'activation des cellules satellites, leur prolifération, différenciation et leur fusion entre des cellules satellites d'un même génotype (Mut) et aux fibres nouvellement formées, devenues mutantes elle-mêmes (fusion homotypique-entre deux cellules de même génotype). A l'inverse, le modèle d'hypertrophie compensatoire, dans lequel les tendons de 2 muscles (TA et GAS) ont été sectionnés, permet l'analyse de l'hypertrophie du PL où la fusion a lieu entre des cellules satellites mutantes (surexprimant ou non l'Actine) avec des fibres contrôles (fusion hétérotypique-entre deux cellules de génotype différent).

Des résultats obtenus par Aikaterini Papaefthymiou (annexe 2) sur un modèle *in vivo* de KO conditionnel et inductible de SRF dans les cellules satellites (figure 29-A-B) ont permis de montrer que la perte de SRF dans les SC perturbe les processus d'hypertrophie et de régénération, deux situations au cours desquelles les SC sont mobilisées. Cette étudiante a ainsi montré que les muscles, dont les cellules satellites sont dépourvues de SRF, s'hypertrophient moins bien que les SC contrôles (annexe 2-figure 1-D-E-F), et que la régénération est inefficace en absence de SRF (annexe 2-figure 7-A-B-C).

Ctl	Pax7$^{+/+}$:Srf$^{flox/flox}$:Pax7-nGFP	CRE-	+TM
Ctl	Pax7$^{CreERT2/+}$:Srf$^{flox/flox}$:Pax7-nGFP	CRE+	-TM
Mut	Pax7$^{CreERT2/+}$:Srfflx/flx:Pax7-nGFP	CRE+	+TM

Figure 29 : Le modèle murin et expérimentation
(A) Modèle murin et génotypes.
(B) Représentation schématique de l'expérimentation : Tri des SC par FACS 7 jours après injection au TMX (4 injections).

Afin d'identifier quelles fonctions (prolifération, différenciation, fusion, motilité) des SC sont altérés par la perte de SRF, nous avons mené des études sur ces mêmes SC en culture. Les SC en culture peuvent à la fois proliférer (myoblastes) ou de différencier en myotubes.

2-2-L'étude du phénotype des cellules satellites en absence de SRF

a)-La prolifération cellulaire

Le potentiel de prolifération des cellules satellites contrôles et mutantes après tri cellulaire par FACS et maintien en culture durant 5 jours, a été mesuré par l'incorporation d'EdU durant 2h. L'EdU est un analogue de la Thymidine et s'incorpore à l'ADN pendant sa synthèse, lors de la phase S du cycle cellulaire. Grace à un kit permettant la révélation de l'EdU incorporé par reconnaissance avec un azoture fluorescent, nous pouvons dénombrer les cellules en prolifération. Nous montrons que la proportion de cellules en proliferation (% de cellules EdU+ par rapport au nombre total de cellules) est identique entre les cellules mutantes et les cellules contrôles (Figure 30-A).

b)-La vélocité

L'étude de la vélocité, par suivi des cellules toutes les 360 secondes durant 6 heures par microscopie en temps réel, que les cellules n'expimant pas SRF bougeaient deux fois moins vite que les cellules contrôles. Ce résultat démontre que SRF est indispensable à la motilité des cellules musculaires (Figure 30-B).

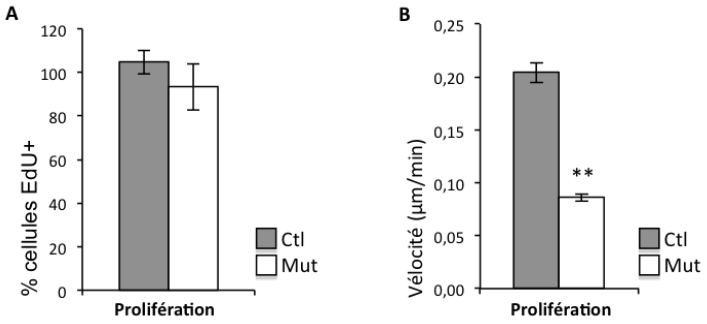


Figure 30 : La prolifération cellulaire et la motilité

(A) Pourcentage de myoblastes EdU+ (phase S du cycle cellulaire) triés par FACS et maintenus en culture 5 jours dans un milieu riche (n=6).

(B) Vélocité moyenne des myoblastes (µm/min) par microscopie en temps réel (au moins 100 cellules ont été analysées par génotype).

Les données sont les moyennes +/- s.d. **p<0,01 versus Ctl.

c)-le potentiel de différenciation myogénique

Nous nous sommes ensuite intéressés au potentiel de différenciation myogénique des cellules satellites dépourvues de SRF. Une étude *in vitro* sur des cellules C2C12 montre que l'activité de SRF est indispensable à l'expression de *MyoD*, un facteur de régulation myogénique, et à l'expression de la *Myogénine* [153].

Nous avons ainsi évalué l'expression de MYOD, un facteur de détermination myogénique, ainsi que la Myogénine, un facteur de différenciation musculaire, chez les myoblastes contrôles et mutants, après mise en différenciation dans un milieu pauvre en sérum (2%). Nous avons montré par analyse des transcrits de ces gènes (figure 31-A-C) et par mesure de l'expression protéique par immunomarquage (figure 31-B-D), que contrairement à ce qui avait été montré dans des lignées (C2C12), la perte de SRF dans des myoblastes primaires n'affecte pas d'expression de MYOD. De plus, l'expression de la Myogénine est inchangée chez les mutants, suggérant que l'entrée en différenciation myogénique n'est pas affectée en absence de SRF.

L'analyse de l'expression du marqueur de différenciation tardive MYHC (chaine lourde de Myosine-sarcomérique), par marquage immunologique contre la protéine MF20, a été réalisée sur les cellules contrôles et mutantes (figure 31-E). Aucune différence de proportion du nombre de noyaux dans les fibres MYHC+ n'a été constatée entre les contrôles et les mutants SRF (figure 31-F).

Ces résultats indiquent que SRF n'est pas nécessaire à l'engagement des cellules dans la lignée myogénique, ni à l'entrée en différenciation myogénique.

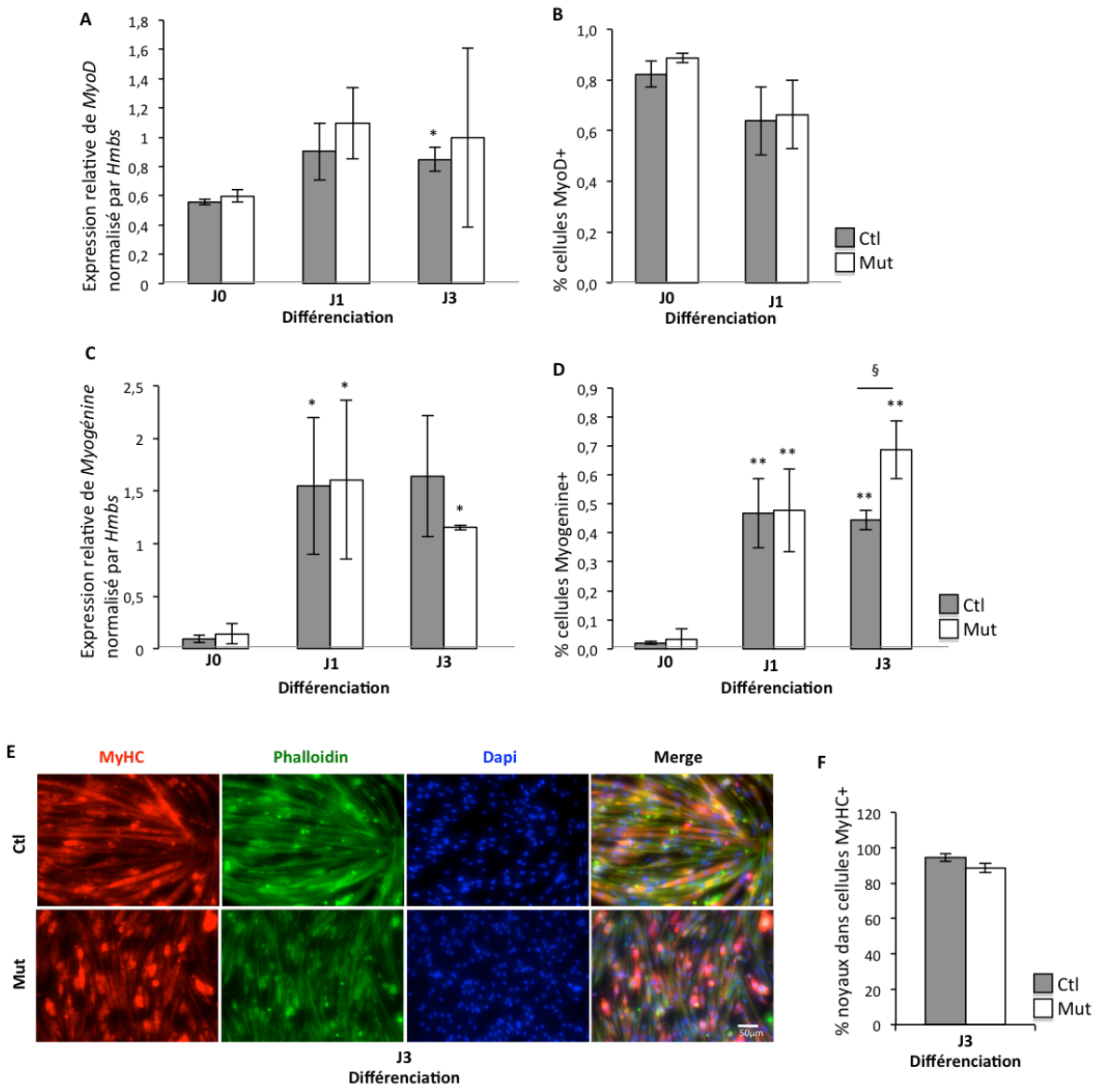


Figure 31 : L'entrée des cellules satellites dans le lignage musculaire et différenciation myogénique
(A) Expression des ARNm de *MyoD* par qRT-PCR de myoblastes triés par FACS et maintenus en culture (J0, myoblastes), ou un (J1) ou trois (J3) jours après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=3).
(B) Pourcentage de myoblastes MYOD+ triés par FACS et maintenus en culture J0, J1 ou J3 après différenciation (n=3).
(C) Expression des ARNm de la *Myogénine* par qRT-PCR de myoblastes triés par FACS et maintenus en culture J0, J1 ou J3 après différenciation, normalisée par *Hmbs*. (n=3).
(D) Pourcentage de myoblastes Myogénine+ triés par FACS et maintenus en culture J0, J1 ou J3 après différenciation (n=3).
(E) Immunomarqage de la Myosine (MYHC) (rouge), marquage de l'Actine filamenteuse par la phalloïdine (vert), et des noyaux au DAPI (bleu), de myoblastes maintenus en culture J3 après différenciation (échelle : 50µm).
(F) Pourcentage de myoblastes MYHC+ triés par FACS et maintenus en culture J3 après différenciation (n=3).
Les données sont les moyennes +/- s.d. *p<0.05 versus Ctl ou J0, **p< 0.01 versus Ctl ou J0, §p< 0.05.

d)-Le potentiel de fusion des cellules myogéniques

Afin de déterminer si la perte de SRF dans les cellules satellites impacte leur fusion, le nombre de noyaux par myocyte a été déterminé après 3 jours de mise en différenciation des cellules satellites. Les cellules mutantes SRF présentent un défaut de capacité à former des myotubes (figure 32-A). Cette observation a été quantifiée par comptage du nombre de noyaux (DAPI+) dans des cellules différenciées MYHC+, montrant une forte diminution du nombre moyen de noyaux par cellule MYHC+ chez les mutants par rapport aux contrôles (figure 32-B). Similairement, l'index de fusion, représentant la proportion de cellules ayant fusionné de la population cellulaire totale, est fortement diminué chez les mutants SRF (figure 32-C).

Ces données indiquent que SRF est nécessaire à la fusion des cellules satellites entre elles (fusion homotypique issue de cellules d'un même génotype) (figure 32-D). Afin de savoir si SRF est nécessaire dans les deux cellules en fusion, des expériences de fusion de myoblastes ont été réalisées dans l'équipe, issus des 2 fonds génétiques, contrôles et mutants. Nous avons montré que les myoblastes dépourvus de SRF ne fusionnent pas avec les myoblastes sauvages, indiquant que la présence de SRF est nécessaire dans les deux partenaires de fusion (fusion hétérotypique) (figure 32-E).

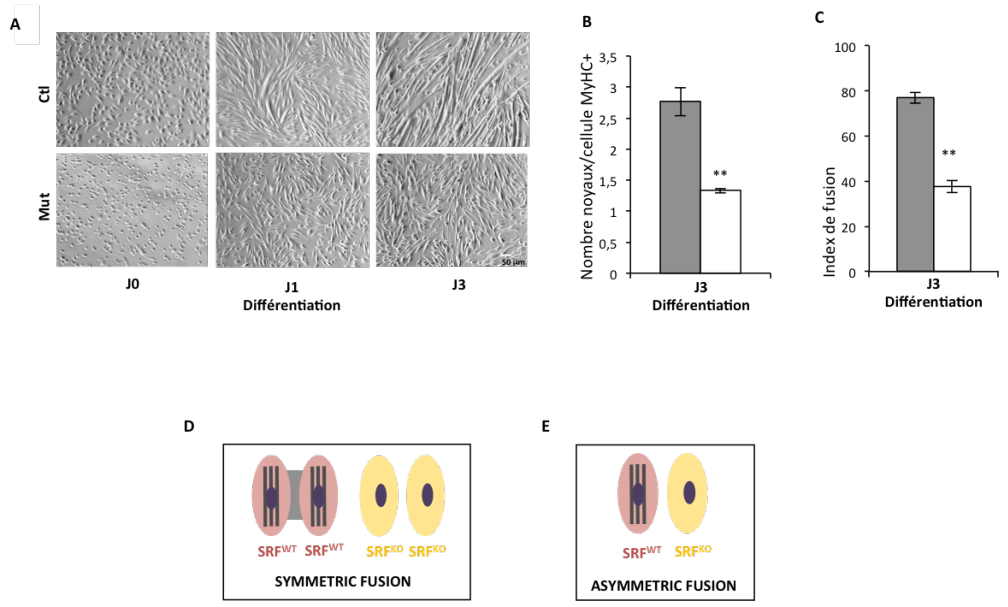


Figure 32 : La fusion des cellules satellites

(A) Photos en contraste de phase de myoblastes triés par FACS et maintenus en culture trois (J3) jours après différenciation (échelle : 50µm).

(B) Nombre moyen de noyaux DAPI+ par cellule MYHC+ de myoblastes triés par FACS et maintenus en culture J3 après différenciation (n=3).

(C) Index de fusion : proportion de noyaux DAPI+ de myoblastes triés par FACS et maintenus en culture J3 après différenciation (n=3).

Data are mean ± s.d. **p< 0,01 versus Ctl.

(D) Schéma représentant la fusion symétrique, ayant lieu entre myoblastes de même génotype, Ctl (SRF^{WT}) ou Mut (SRF^{KO}).

(E) Schéma représentant la fusion asymétrique, ayant lieu entre myoblastes Ctl (SRF^{WT}) et Mut (SRF^{KO}).

Les données sont les moyennes +/- s.d. **p<0.01 versus Ctl.

2-3-L'expression transcriptionnelle de gènes cibles de SRF

Afin de comprendre le phénotype des cellules mutantes SRF qui présentent un défaut de vélocité et de fusion, nous souhaitons identifier la nature des gènes cibles de SRF et leur implication fonctionnelle dans les phénotypes observés (fonctions biologiques par une approche transcriptionnelle). En s'appuyant sur des données d'analyse Affimetrix réalisées dans le laboratoire sur un modèle de cellules satellites $Srf^{flox/flox}$ transduites par des adénovirus exprimant la protéine GFP (AdGFP) ou la CRE recombinase (AdCRE), nous avons identifié des gènes dont l'expression est régulée par SRF (cibles transcriptionnelles directes ou indirectes) dans deux états : cellules en prolifération (J0 de différenciation), et cellules en différenciation (précoce à J1, et tardive à J3). Cette technologie mesurant l'expression des produits de transcription nous permet d'étudier les mécanismes moléculaires, et notamment les gènes en aval de SRF. Nous avons sélectionné une liste de 145 gènes différentiellement régulés aux trois temps de différenciation (J0, J1 et J3), entre les cellules contrôles AdGFP et les cellules mutantes AdCRE, dont la probabilité d'erreur est estimée à 5% ($p<=0.05$) (figure 33-A). Des fonctions telles que la mort et la survie cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, l'adhésion, le mouvement cellulaire, sont impactés en absence de SRF (figure 33-C). Parmi ces 145 gènes, certains ont une expression diminuée en absence de SRF, comme *Fhl2, Hic5 (Tgfb1i1), Actines, Cnn2, Wdr1, Flna, Fermt2 (Kind2), Pdlim7, Ptges3l, Ubald1 et Egr1* ; d'autres ont une expression augmentée en absence de SRF comme *Krt18* (figure 33-B).

Pour les gènes dont l'expression diminue en absence de SRF, nous souhaitons savoir si une perte de fonction de ces gènes (diminution de leur expression après transfection des cellules avec des siRNA) phénocopie la perte de SRF :

- La prolifération : est-elle normale ?
- L'engagement dans le lignage musculaire (MYOD) : est-il normal ?
- L'engagement dans la différenciation (Myogénine et Myosine) : est-il normal ?
- La vélocité : est-elle diminuée ?
- La fusion : est-elle altérée ?

Pour cela, j'ai mis au point des transfections de siRNA dans des myoblastes sauvages. Les cellules en prolifération ont été transfectées 2 fois avant l'étude de leur capacité à proliférer et à se déplacer ; celles destinées à l'étude de l'engagement dans la lignée musculaire, la différenciation et la fusion, ont subi une troisième transfection afin d'optimiser la diminution de l'expression de ces gènes.

Si nous observons une phénocopie du défaut de motilité et/ou de fusion, nous restaurerons alors l'expression des gènes dans un contexte de cellules KO SRF afin de voir si cela suffit au sauvetage du phénotype.

Pour les gènes dont l'expression augmente, nous nous demandons si une diminution de leur expression restaure le défaut de motilité et/ou de fusion des cellules KO SRF.

Parmi les gènes étudiés, *Wdr1* et *Fermt2*, ont été écartés de l'étude. En effet, les cellules dont l'expression de ces gènes a été diminuée, présentent un défaut d'entrée en différenciation (MYOD, Myogénine), ce qui ne copie pas le phénotype observé chez les KO SRF. D'autres gènes semblent être de bons candidats dans notre étude, car ils copient le phénotype observé chez les mutants SRF. Les cellules dont ces gènes ont été dérégulés présentent soit un problème de motilité (*Cnn2, Ptges3l*), soit un problème de fusion (*Hic5, Pdlim7*), soit un défaut de motilité et un défaut de fusion (*Fhl2, Ubald1*) (tableau 2).

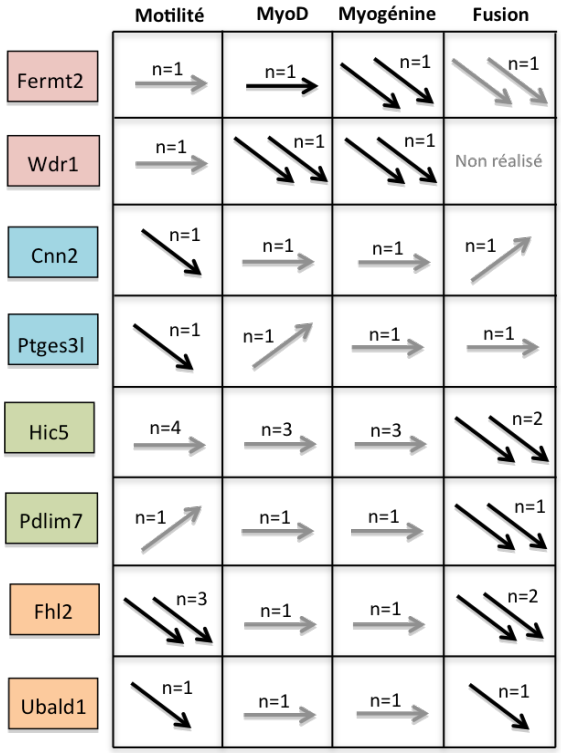
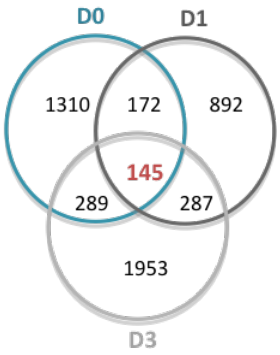


Tableau 2 : Le récapitulatif des gènes cibles de SRF dont les fonctions cellulaires copies le phénotype des mutants SRF. Les myoblastes sauvages ont été transfectés par des siRNA spécifiques des gènes *Fermt2, Wdr1, Cnn2, Pthes3l, Hic5, Pdlim7, Fhl2, Ubald1*. Les fonctions cellulaires analysées sont la motilité (par vidéo microscopie), la capacité des SC à entrer dans le lignage myogénique (par qPCR de *MyoD*), la capacité des SC à différencier (par qPCR de la *Myogénine*) et la capacité à fusionner (marquage à la phalloïdine du réseau filamenteux d'Actine). Le nombre d'expérimentations réalisé pour chaque gène a été indiqué en indice (n=x). En rose sont indiqués les gènes dont seul la capacité à différencier est diminuée. En bleu, sont indiqués les gènes dont la motilité seule est diminuée. En vert sont indiqués les gènes dont la fusion seule est diminuée. En orange sont indiqués les gènes dont la motilité et la capacité à fusionner sont diminuées.

Dans ce mémoire, je m'intéresserai aux gènes d'Actine, *Fhl2, Hic5 et Egr1* dont l'expression diminue, et au gène *Krt18* dont l'expression augmente.

Les données des puces Affimetrix de ces différents gènes ont été validées par analyses transcriptionnelles par RT-qPCR dans les différents modèles KO SRF listés ci-dessous :
-cellules $Srf^{flox/flox}$ infectées par des adénovirus contrôles (AdGFP) ou mutants (AdCRE)
-cellules $Pax7^{+/+}$:$Srf^{flox/flox}$:*Pax7-nGFP* contrôles (+TMX) ; et des cellules $Pax7^{CreERT2/+}$:$Srf^{flox/flox}$:*Pax7-nGFP* contrôles (-TMX) ou mutantes (+TMX) triées par FACS.
Les valeurs ont été normalisées par l'analyse de l'expression du gène *Hmbs* (figure 34-A-B-C-D-E).

A



C

Top 5 Canonical pathways (Ingenuity):

Name	P-value
ILK Signaling	2,79E-08
MSP-RON Signaling pathway	4,34E-04
Actin Cytoskeleton Signaling	4,56E-04
Endometrial Cancer Signaling	5,92E-04
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	7,45E-04

B

Molecule Name	Full Name
0610009L18Rik	RIKEN cDNA 0610009L18 gene
1700086L19Rik	RIKEN cDNA 1700086L19 gene
1700095B10Rik	RIKEN cDNA 1700095B10 gene
2810410L24Rik	RIKEN cDNA 2810410L24 gene
4833423E24Rik	RIKEN cDNA 4833423E24 gene
4933403O08Rik	RIKEN cDNA 4933403O08 gene
ABHD17C	abhydrolase domain containing 17C
ABRA	actin-binding Rho activating protein
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
ACTB	actin, beta
ACTR3	ARP3 actin-related protein 3
Adam4/Gm4787	a disintegrin and metallopeptidase domain 4
APOE	apolipoprotein E
ARHGAP29	Rho GTPase activating protein 29
ARL4A	ADP-ribosylation factor-like 4A
ASGR1	asialoglycoprotein receptor 1
ASPA	aspartoacylase
AZIN2	antizyme inhibitor 2
BLVRB	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))
C20orf24	chromosome 20 open reading frame 24
C82000SJ03Rik	RIKEN cDNA C82000SJ03 gene
C8orf4	chromosome 8 open reading frame 4
C9orf16	chromosome 9 open reading frame 16
CA3	carbonic anhydrase 3
CAMK2N1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
CD68	CD68 antigen
CNN2	calponin 2
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1
COPRS	coordinator of PRMT5, differentiation stimulator
CSRP1	cysteine and glycine-rich protein 1
CSTF2T	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA subunit 2, tau
CTNNA1	catenin (cadherin associated protein), alpha 1
DCXR	dicarbonyl L-xylulose reductase
DIO2	deiodinase, iodothyronine, type II
DIRAS2	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 2
DUSP2	dual specificity phosphatase 2
ECM1	extracellular matrix protein 1
EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
EGR1	early growth response 1
EMCN	endomucin
EME1	essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe)
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
F630040K05Rik	RIKEN cDNA F630040K05 gene
FAF1	Fas-associated factor 1
FAM167A	family with sequence similarity 167, member A
FAM171A2	family with sequence similarity 171, member A2
FAM53B	family with sequence similarity 53, member B
FBXO4	F-box protein 4
FERMT2	fermitin family homolog 2 (Drosophila)
FHL1	four and a half LIM domains 1
FHL2	four and a half LIM domains 2
FLNA	filamin, alpha
FRAS1	Fraser syndrome 1 homolog (human)
GADD45G	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma
GCHFR	GTP cyclohydrolase I feedback regulator
Gm6978	predicted gene 6978
Gm7056	predicted gene 7056
Gm20603	predicted gene 20603
GML	GPI anchored molecule like protein
GNA13	guanine nucleotide binding protein, alpha 13
GPNMB	glycoprotein (transmembrane) nmb
GSTM1	glutathione S-transferase, mu 1
Gucy2g	guanylate cyclase 2g
HPSE	heparanase
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3
IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7
IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma chain
ILK	integrin linked kinase
ITGB1BP2	integrin beta 1 binding protein 2
KCNAB2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2
KLF5	Kruppel-like factor 5
KLK3	Kallikrein related peptidase 3

Actines

Cnn2

Egr1

Fermt2 (Kind2)

Fhl2

Molecule Name	Full Name
KRT18	keratin 18
LARGE	like-glycosyltransferase
LAYN	layilin
LBH	limb-bud and heart
LDLR	low density lipoprotein receptor
LILRB3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3
LIMA1	LIM domain and actin binding 1
LSP1	lymphocyte specific 1
MAPKAPK2	MAP kinase-activated protein kinase 2
MARVELD1	MARVEL (membrane-associating) domain containing 1
MARVELD2	MARVEL (membrane-associating) domain containing 2
ME3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial
MED14	mediator complex subunit 14
MED12L	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog (yeast)-like
MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2
MPDU1	mannose-P-dolichol utilization defect 1
MRPS6	mitochondrial ribosomal protein S6
MS4A10	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 10
MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3
MYADM	myeloid-associated differentiation marker
MYL9	myosin, light polypeptide 9, regulatory
MYO18B	myosin XVIIIb
NAB2	Ngfi-A binding protein 2
Ngp	neutrophilic granule protein
NMB	neuromedin B
NUDT14	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 14
NXT2	nuclear transport factor 2-like export factor 2
OXCT1	3-oxoacid CoA transferase 1
PARP8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8
PCDH19	protocadherin 19
PDLIM7	PDZ and LIM domain 7
PFAS	phosphoribosylformylglycinamidine synthase (FGAR amidotransferase)
PIK3CB	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide
PLA2G10	phospholipase A2, group X
Plpp1	phospholipid phosphatase 1
PLTP	phospholipid transfer protein
PPP2R3A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B'', alpha
PRSS23	protease, serine, 23
PTGES3L	prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)-like
REEP6	receptor accessory protein 6
RFTN2	raftlin family member 2
RSU1	Ras suppressor protein 1
SASH1	SAM and SH3 domain containing 1
SBK3	SH3 domain binding kinase family member 3
SDHD	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein
SEMA3C	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C
Serpina1f	Serpina1f
SH3BP2	SH3-domain binding protein 2
SLC9A3R2	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 2
Snora41	small nucleolar RNA, H/ACA box 41
Sorbs2os	sorbin and SH3 domain containing 2, opposite strand
SRF	serum response factor
SVIL	supervillin
SYT13	synaptotagmin XIII
Tac4	tachykinin 4
TAGLN	transgelin
TBC1D1	TBC1 domain family, member 1
TGFB1I1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
TMEM109	transmembrane protein 109
TNC	tenascin C
Tpm1	tropomyosin 1
Tpm4	tropomyosin 4
TRAF3IP3	TRAF3 interacting protein 3
TSC22D1	TSC22 domain family, member 1
TSPO2	translocator protein 2
UBALD1	UBA-like domain containing 1
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase
Vmn1r214 (includes others)	vomeronasal 1 receptor 214
WDR1	WD Repeat Domain 1
ZBBX	Zinc Finger Protein B-Box Domain Containing
ZBTB41	Zinc Finger and BTB Domain Containing 41
ZNF365	Zinc Finger Protein
ZNF878	Zinc Finger Protein

Krt18

Pdlim7

Ptges3l

Tgfb1i1 (Hic5)

Ubald1

Wdr1

Figure 33 : L'expression transcriptionnelle de gènes cibles de SRF, et fonctions associées

Figure 33 : Expression transcriptionnelle de gènes cibles de SRF, et fonctions associées

(A) Diagramme de Vienn montrant l'intersection entre les gènes différentiellement régulés par SRF (p-value<0.05) maintenus en culture (J0, myoblastes), un (J1) et trois (J3) jours après différenciation, dans des myoblastes $Srf^{lx/lx}$ transduits par des adénovirus contrôles exprimant la GFP (AdGFP) ou mutants exprimant la CRE recombinase (AdCRE). En rouge est indiqué le nombre de gènes (145) qui sont régulés par SRF indépendemment du stade de différenciation.
(B) Liste de gènes obtenus par analyse transcriptionnelle de myoblastes $Srf^{lx/lx}$ transduits par des adénovirus contrôles AdGFP ou mutants AdCRE, et maintenus en culture J0, J1 et J3 après différenciation (p-value<0.05 versus AdGFP).
(C) Liste des cinq voies principales obtenue par "gene ontology" du logiciel Ingenuity, d'après les 145 gènes identifiés par analyse transcriptionnelle, correspondant aux gènes dont leur régulation est dépendante de SRF à J0, J1 et J3 après différenciation.

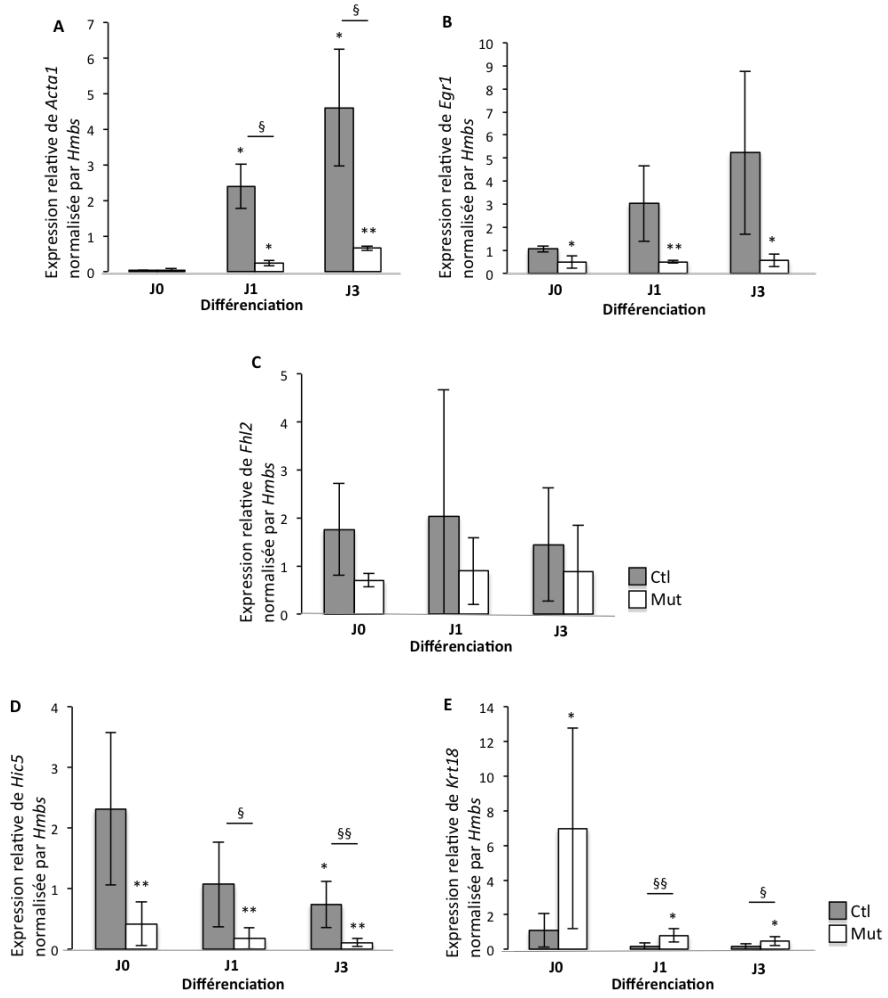


Figure 34 : La validation de l'expression transcriptionnelle de gènes cibles de SRF
(D) Expression des ARNm de *Acta1* par RT-qPCR de myoblastes contrôles et mutants triés par FACS et maintenus en culture, normalisée par *Hmbs*. (mean) (n=3).
(E) Expression des ARNm de *Egr1* par RT-qPCR de myoblastes contrôles et mutants triés par FACS et maintenus en culture, normalisée par *Hmbs*. (mean) (n=3).
(F) Expression des ARNm de *Fhl2* par RT-qPCR de myoblastes contrôles et mutants triés par FACS et maintenus en culture, normalisée par *Hmbs*. (mean) (n=5).
(G) Expression des ARNm de *Hic5* par RT-qPCR de myoblastes contrôles et mutants triés par FACS et maintenus en culture, normalisée par *Hmbs*. (mean) (n=7).
(H) Expression des ARNm de *Krt18* par RT-qPCR de myoblastes contrôles et mutants triés par FACS et maintenus en culture, normalisée par *Hmbs*. (mean) (n=7).
Les données sont les moyennes +/- s.d. *p<0.05 versus Ctl ou J0, **p<0.01 versus Ctl ou J0, §p<0.05 ; §§p< 0.01.

a)-La diminution de l'expression de l'Actine chez les mutants SRF et tentative de sauvetage du cytosquelette d'Actine

L'Actine est l'une des cibles majeures du facteur de transcription SRF, où il a été montrée comme facteur transactivateur pour la transcription du gène alpha-Actine squelettique (Acta1) dans les cellules cardiaques [170]. Une étude de 1986 suggère que des séquences CCArGG dans les gènes de l'Actine cardiaque auraient évolué pour interagir avec d'autres régulateurs de la transcription [146]. L'Actine joue un rôle crucial dans la mobilité cellulaire [171], dans la fusion des cellules musculaires [172] et le maintien structural et fonctionnel des fibres musculaires [150].

L'expression de l'Actine-alpha squelettique (Acta1) est diminuée chez les mutants SRF (figure 34-A). De plus, les analyses transcriptomiques nous indiquent que de nombreux gènes contrôlant le cytosquelette d'Actine sont perturbés en absence de SRF (figure 33-B-C). Ainsi, nous avons cherché à savoir si la surexpression d'Actine-alpha cardiaque (Actc1) chez les mutants SRF, pouvait sauver les phénotypes cellulaires observés, sachant que l'Actine cardiaque est fonctionnellement redondante par rapport à l'Actine-alpha squelettique. En effet, des travaux ont montré que le sauvetage de l'expression de Acta1 par la forme d'Actine-alpha cardiaque, permet la survie des souris *Acta1*$^{-/-}$ jusqu'à un âge avancé [173].

Pour cela nous avons croisé notre lignée de mutants SRF : *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* par la lignée *CMV-flx-CAT-flx-Actc1* (CAG-flCAT-SRF), obtenue au laboratoire par Jean-François Decaux, afin d'obtenir des souris double-mutantes : *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP:CMV-flx-CAT-flx-Actc1*. L'injection de TMX à l'âge adulte des souris permet à la fois la délétion de SRF et la surexpression d'Actc1 de rat (figure 35-A).

Au préalable, nous avons validé notre modèle par analyse des transcrits de gène de *Srf* des cellules contrôles (Ctl), mutantes SRF (Mut) et double transgéniques SRF/CAT (MutAct) (figure 35-B). La surexpression du transgène Actc1 de rat a été analysée en utilisant des séquences d'oligos ciblant spécifiquement l'ARNm, uniquement présents dans la construction exogène (figure 35-C).

Afin d'analyser l'organisation du cytosquelette d'Actine, le niveau de marquage à la phalloidine fluorescente, qui se lie spécifiquement à l'Actine-F, a été mesuré et nous avons montré que la quantité totale d'Actine-F par cellule est significativement diminué chez les muatants en comparaison aux cellules contrôles, et se trouve restauré chez les cellules double-mutantes (figure 35-D-E). Ces résultats indiquent que le réseau d'Actine est restauré dans les cellules mutantes surexprimant le transgène d'Actine.

Nous avons, grâce à un kit d'extraction des fractions d'Actine F et G, pu mesurer par la technique du Western blot, la quantité totale d'Actine de ces 2 fractions. Le ratio d'Actine-F/G chez les mutants est significativement diminué par rapport aux contrôles. (figure 35-F-G). Celui-ci se trouve augmenté chez les cellules mutantes surexprimant l'Actine en comparaison aux mutants SRF, indiquant un sauvetage de l'organisation du cytosquelette d'Actine dans ces cellules.

Ces résultats suggèrent que l'absence de SRF perturbe fortement le cytosquelette d'Actine, avec une diminution de l'expression des Actines et un ratio d'Actine-F/G qui diminue. La surexpression d'Actine-alpha semble être suffisante pour restaurer le réseau d'Actine.

L'étude de la vélocité par microscopie en temps réel, montre une mobilité significativement diminuée de moitié chez les mutants. Cependant il n'y a pas de différence de déplacement des cellules mutantes surexprimant ou non l'Actine (figure 35-H).

Le marqueur de détermination myogénique, MYOD, et le marqueur d'entrée en différenciation, Myogénine, ont été analysés par RT-qPCR. Les résultats ne montrent pas de diminution de

l'expression de ces gènes chez les cellules mutantes surexprimant l'Actine en comparaison aux contrôles, à tous les temps de différenciation (figure 35-I-J). De plus, un marquage fluorescent de la chaine lourde de Myosine, MYHC, marqueur plus tardif de la différenciation, par un anticorps anti-MF20 a été réalisé sur ces mêmes cellules (figure 35-K). La proportion de noyaux contenus dans les fibres MYHC+, est équivalente quel que soit le génotype des cellules (figure 35-L).

Ces résultats indiquent que les cellules mutantes, surexprimant l'actine, ne présentent pas de défaut d'engagement dans la lignée myogénique, ni dans la différenciation myogénique. Nous souhaitons poursuivre l'analyse du cytosquelette d'Actine par des analyses de microscopie électronique des réseaux d'Actine.

La fusion homotypique a été évaluée par le marquage MYHC, 3 jours après mise en différenciation des cellules. L'index de fusion, représentant la proportion de la population cellulaire totale ayant fusionnée, montre un défaut de fusion chez les cellules mutantes et mutantes surexprimant l'Actine (fusion symétrique) (figure 35-M). Cependant, des expériences *in vitro* de fusion hétérotypique de myoblastes réalisées dans l'équipe, ont montré une restauration du phénotype de fusion asymétrique (Annexe 2-figure 6-D). Ces résultats indiquent que la restauration du cytosquelette d'Actine dans les cellules mutantes est suffisante à elle seule pour l'amélioration de la fusion entre une cellule contrôle et une cellule dépourvue de SRF et surexprimant l'Actine.

Ces données appuient les résultats obtenus *in vivo* chez ces mêmes souris, par Aikaterini Papaefthymiou et Emilie Schol, une étudiante en M2. Dans un modèle de régénération, elles ont montré que la fusion homotypique n'était pas restaurée chez les mutants malgré la surexpression d'Actine (Annexe 2-figure 7-A-B-C). Cependant, lors d'hypertrophie compensatoire, la fusion hétérotypique est améliorée lorsque les SC surexpriment le transgène *Actc1* (Annexe 2-figure 7-D-E-F).

Ces données *in vitro* et *in vivo* indiquent que le phénotype de fusion est nettement amélioré dans un modèle hétérotypique, suggérant que l'Actine est suffisant à la restauration du phénotype (figure 36-A). Cependant, la restauration du cytosquelette d'Actine n'est pas suffisante à l'amélioration du phénotype de fusion observé chez les mutants SRF dans un modèle homotypique (figure 36-B). Ces données nous encouragent à identifier les autres acteurs moléculaires qui pourraient intervenir en aval de SRF et contrôler la fusion homotypique. Nous avons ainsi étudié différents gènes cibles de SRF (directs ou indirects) susceptibles d'avoir un rôle dans le phénotype observé en absence de SRF.

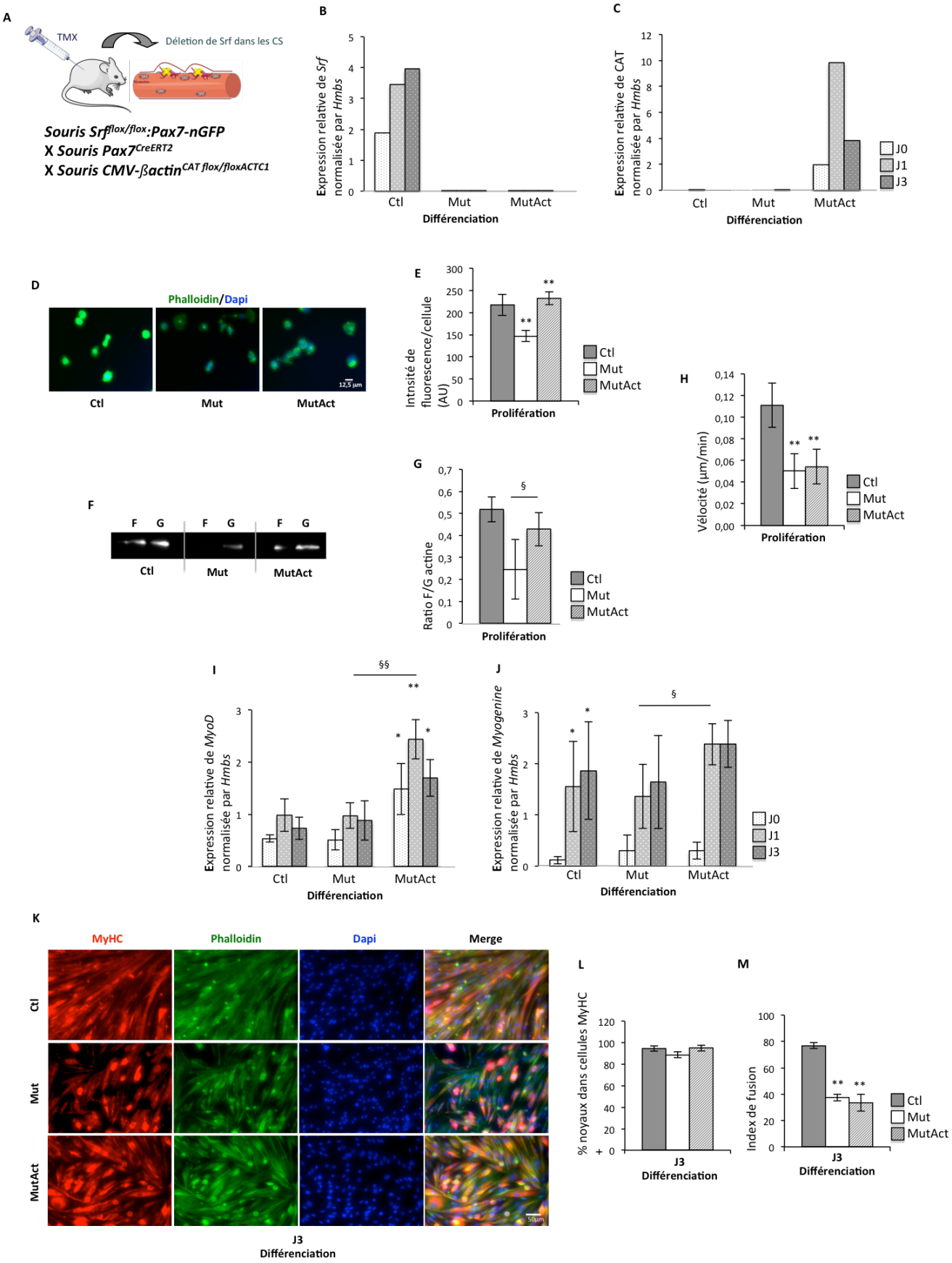


Figure 35 : La surexpression de l'Actine-alpha dans les myoblastes mutants SRF

Figure 35 : La surexpression de l'Actine-alpha dans les myoblastes mutants SRF
(A) Représentation schématique du modèle murin *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP:CMV-flx-CAT-flx-Actc1.* Les souris +TMX sont mutantes SRF (Mut) ou double mutantes (MutAct), celles -TMX sont contrôles (Ctl).
(B) Expression des ARNm de *Srf* par RT-qPCR de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture (J0, myoblastes), ou un (J1) ou trois (J3) jours après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=1).
(C) Expression des ARNm du transgène *CAT* par RT-qPCR de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture J0, J1 ou J3 après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=1).
(D) Marquage de la Actine-F par la Phalloidine (vert), des noyaux par le DAPI (bleu) de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture (échelle : 12.5µm).
(E) Intensité de fluorescence de la Phalloidine totale (Actine-F) de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en prolifération, en unité arbitraire (AU) (au moins 150 cellules ont été analysées par génotype).
(F) Représentation d'un immunoblot montrant la fraction d'Actine insoluble (F) et la fraction d'Actine soluble (G) de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture.
(G) Quantification du ratio F/G d'Actine de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture (n=4).
(H) Vélocité moyenne (µm/min) de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture, par microscopie en temps réel (au moins 100 cellules ont été analysées par génotype).
(I) Expression des ARNm de *MyoD* par RT-qPCR de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture J0, J1 ou J3 après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=3).
(J) Expression des ARNm de *Myogénine* par RT-qPCR de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture J0, J1 ou J3 après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=3).
(K) Immunomarquage de MYHC (rouge), de la Actine-F par la Phalloidine (vert), des noyaux par le DAPI (bleu) de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture J3 après différenciation (échelle : 50µm).
(L) Pourcentage de myoblastes MYHC+ Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture J3 après différenciation (n=3).
(M) Index de fusion : proportion de noyaux DAPI+ de myoblastes Ctl, Mut et MutAct, triés par FACS et maintenus en culture J3 après différenciation (n=3).
Les données sont les moyennes +/- s.d. *p<0.05 versus Ctl ou J0, **p<0.01 versus Ctl ou J0, §p<0.05 ; §§p< 0.01.

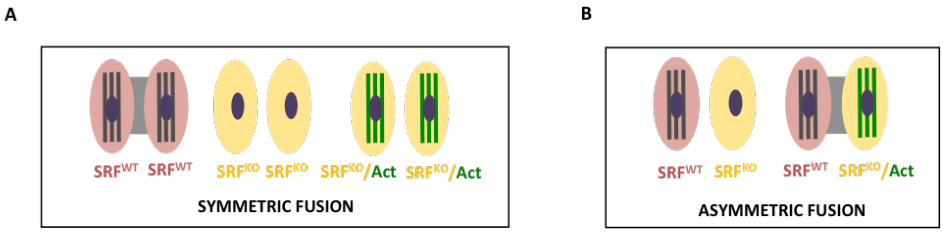


Figure 36 : La surexpression d'Actine : fusion symétrique versus asymétrique
(D) Schéma représentant la fusion symétrique, ayant lieu entre myoblastes de même génotype, Ctl (SRF^{WT}), Mut (SRF^{KO}) ou MutAct (SRF^{KO}/Act).
(E) Schéma représentant la fusion asymétrique, ayant lieu entre myoblastes Ctl (SRF^{WT}), Mut (SRF^{KO}) ou MutAct (SRF^{KO}/Act).

b)-La perte de fonction du gène *Egr1*

Egr1 est un gène précoce régulé par l'activté transcriptionnelle de SRF, avec c-Fos [174]. Une étude de 1993 a montré que SRF interagit avec la boite CArG située sur le promoteur d'*Egr1* [175]. Les protéines EGR1 sont nucléaires et ont un rôle de régulation transcriptionnelle. Cette protéine est connue dans la tumorigenèse [176] [177], et contrôle l'expression de gènes impliqués dans la plasticité synaptique, la cicatrisation, la fécondation (reproduction), la croissance et la différenciation cellulaires, l'apoptose et la progression tumorale [178].

Afin d'étudier l'implication du gène *Egr1* dont l'expression est diminuée chez les mutants SRF, nous avons utilisé un modèle murin KO total EGR1 (*Egr1*$^{-/-}$), fourni par par Delphine Duprez [161]. Afin d'identifier un potentiel défaut des fonctions des SC dépourvues d'EGR1, nous avons réalisé des expériences de régénération. Pour cela, nous avons lésé le muscle TA par une injection de CTX et avons sacrifié les souris 8 jours après la blessure (J8 +CTX) (figure 37-A-B).

Dans ce modèle, l'immunomarquage Laminin/DAPI ne montre pas de différence de la taille des fibres entre les contrôles et les mutants EGR1 dans le TA, par mesure de la CSA (CSA=surface régénérée/nombre de fibres régénérées), contrairement à ce qui est observé chez les KO SRF (figure 37-C-D). Ces résultats suggèrent que les cellules satellites des animaux mutants EGR1 ne présentent pas de défaut de fusion après 8 jours de régénération de la blessure induite par injection de CTX.

Le double marquage Pax7/Ki67, permettant de voir la prolifération de toutes les phases du cycle cellulaire, ne montre pas de différence du nombre de cellules satellites en prolifération (Pax7+/Ki67+) (figure 37-E). Ce résultat indique que les cellules satellites des animaux mutants EGR1 prolifèrent de la même manière que les cellules contrôles.

Ces données laissent penser qu'EGR1 n'est pas indispensable à la prolifération des cellules satellites ni à leur fusion, permettant une croissance normale des fibres musculaires. L'absence d'EGR1 seule n'est pas suffisante à perturber la myogenèse, et ne semble dont pas avoir un lien direct avec SRF. Nous ne poursuivons pas l'étude de ce gène, dont le phénotype de sa perte d'expression n'est pas similaire au phénotype des mutants SRF.

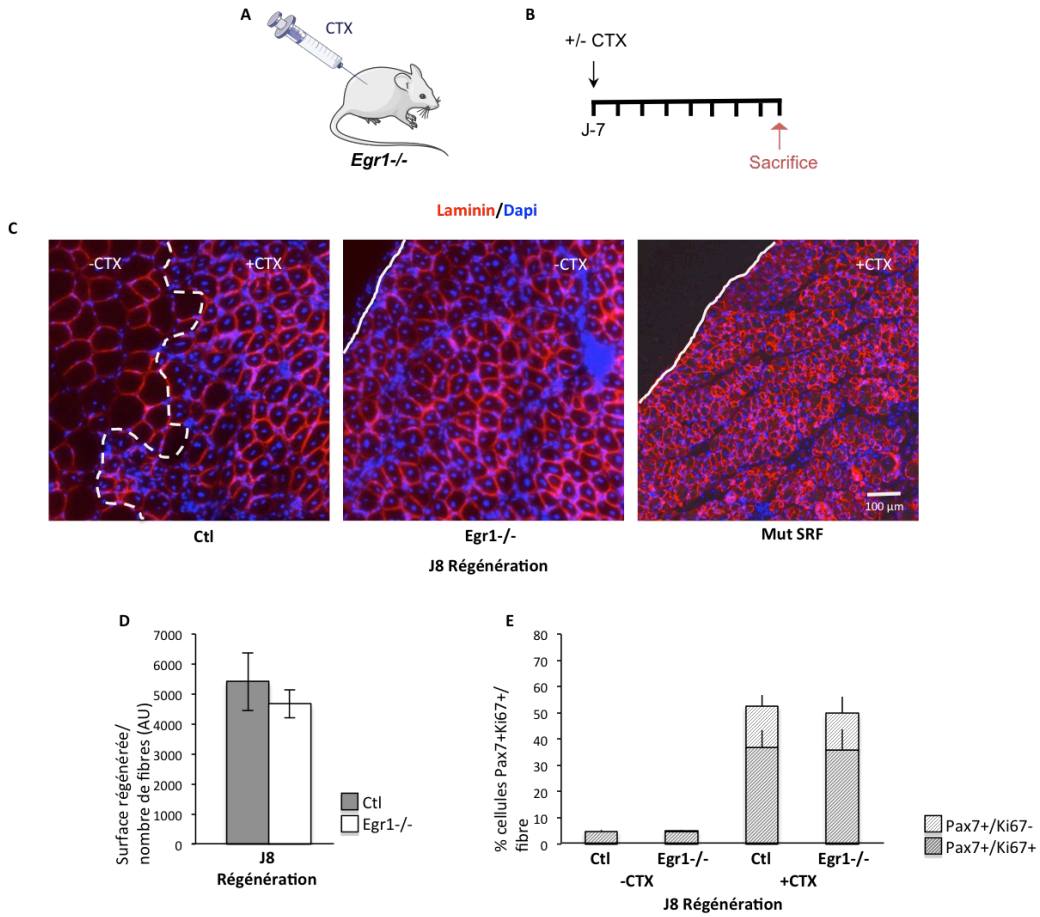


Figure 37 : La perte de fonction du gène *Egr1*

(A) Représentation schématique du modèle murin KO total EGR1 (*Egr1*$^{-/-}$).

(B) Représentation schématique de l'expérimentation de régénération. Les souris sont sacrifiées 8 jours après l'induction d'une blessure par injection à la cardiotoxine (CTX).

(C) Immunomarquage de la Laminine (rouge), et des noyaux au DAPI (bleu), de coupes transversales de TA, présentant une zone régénérée après blessure à la CTX (+CTX) ou non atteinte par la CTX (-CTX) (échelle : 100µm).

(D) Surface régénérée rapporté au nombre de fibres régénérées (AU) des muscles sauvages (Ctl) et mutants EGR1 (*Egr1*$^{-/-}$), 8 jours après injection de CTX (Ctl –CTX n=2 ; Ctl +CTX n=4 ; Mut –CTX n=3 ; Mut +CTX n=5).

(E) Pourcentage de cellules en prolifération PAX7+/Ki67+ rapporté au nombre de cellules PAX7+ totales, 8 jours après injection de CTX (Ctl –CTX n=2 ; Ctl +CTX n=4 ; Mut –CTX n=3 ; Mut +CTX n=5).

Les données sont les moyennes +/- s.d.

c)-La perte de fonction du gène *Fhl2* dans les cellules satellites

Il s'agit d'une protéine faisant partie de la famille de protéines LIM. Elle a un rôle dans l'assemblage des membranes extracellulaires. Une étude de 2004, montre pour la première fois la régulation du gène *Fhl2* via la fixation de SRF sur son promoteur, via la voie de signalisation RhoA. De même une régulation de l'expression des gènes cibles de SRF dans le muscle lisse (non IEG) est régulée par le cofacteur de transcription FHL2 qui se lie à SRF [179]. FHL2 régule la transcription de gènes dépendant de SRF et induit l'expression de MRTFA, un transactivateur de l'alpha-Actine, via la voie RhoA dans le muscle lisse [180].

Des analyses ont été réalisées sur le modèle de cellules contrôles *Pax7*$^{+/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* (+TMX) transfectées par un siRNA dirigé contre le gène *Fhl2*. L'efficacité de la transfection de 75% a été vérifiée par qPCR à J0 et J3 de différenciation (figure 38-A).

Afin d'évaluer la capacité des cellules à proliférer, j'ai mis en contact les myocytes en prolifération avec de l'EdU durant 2h. Une seule expérimentation a été réalisée pour laquelle nous n'observons pas de différence entre les cellules contrôles et transfectées par le siFhl2 (figure 38-B).

L'analyse de l'expression des gènes *MyoD* et *Myogénine* ne montrent pas de différence entre les cellules contrôles et les cellules transfectées par un siFhl2. (figure 38-C-D). Un marquage de la protéine MYHC, a été réalisé sur ces mêmes cellules transfectées (figure 38-E). La proportion de cellules exprimant MYHC, et la proportion de noyaux contenus dans les fibres MYHC+, sont équivalentes entre les cellules contrôles et les cellules siFhl2 (figure 38-F). Ces résultats indiquent que l'engagement des cellules dans la lignée myogénique, ainsi que l'entrée en différenciation des cellules ne sont pas affectés en absence de FHL2.

L'étude de la vélocité des cellules transfectées par le siRNA dirigé contre la séquence du gène *Fhl2*, en comparaison aux cellules transfectées par un siRNA contrôle montre une vélocité significativement diminuée de 32%. (figure 38-G).

La fusion a été évaluée par le marquage MYHC, 3 jours après mise en différenciation des cellules. Le nombre moyen de noyaux par cellule MYHC+ est diminué, indiquant un défaut de fusion chez les cellules transfectées par un siFhl2 (figure 38-E-H). Cette expérimentation, présentant une variabilité de résultats, a été réalisée 2 fois, il nécessiterait de la répéter une 3ème fois.

Ces résultats suggèrent que FHL2 n'est pas indispensable à la prolifération cellulaire, ni à l'entrée en différenciation myogénique. Cependant, FHL2 serait nécessaire à la motilité des SC. Le défaut de fusion observé serait soit du à la conséquence d'un défaut de motilité, soit serait du à l'absence de FHL2 lui-même. Le phénotype des cellules dont l'expression de FHL2 est diminuée, est similaire à celui observé chez les mutants SRF.

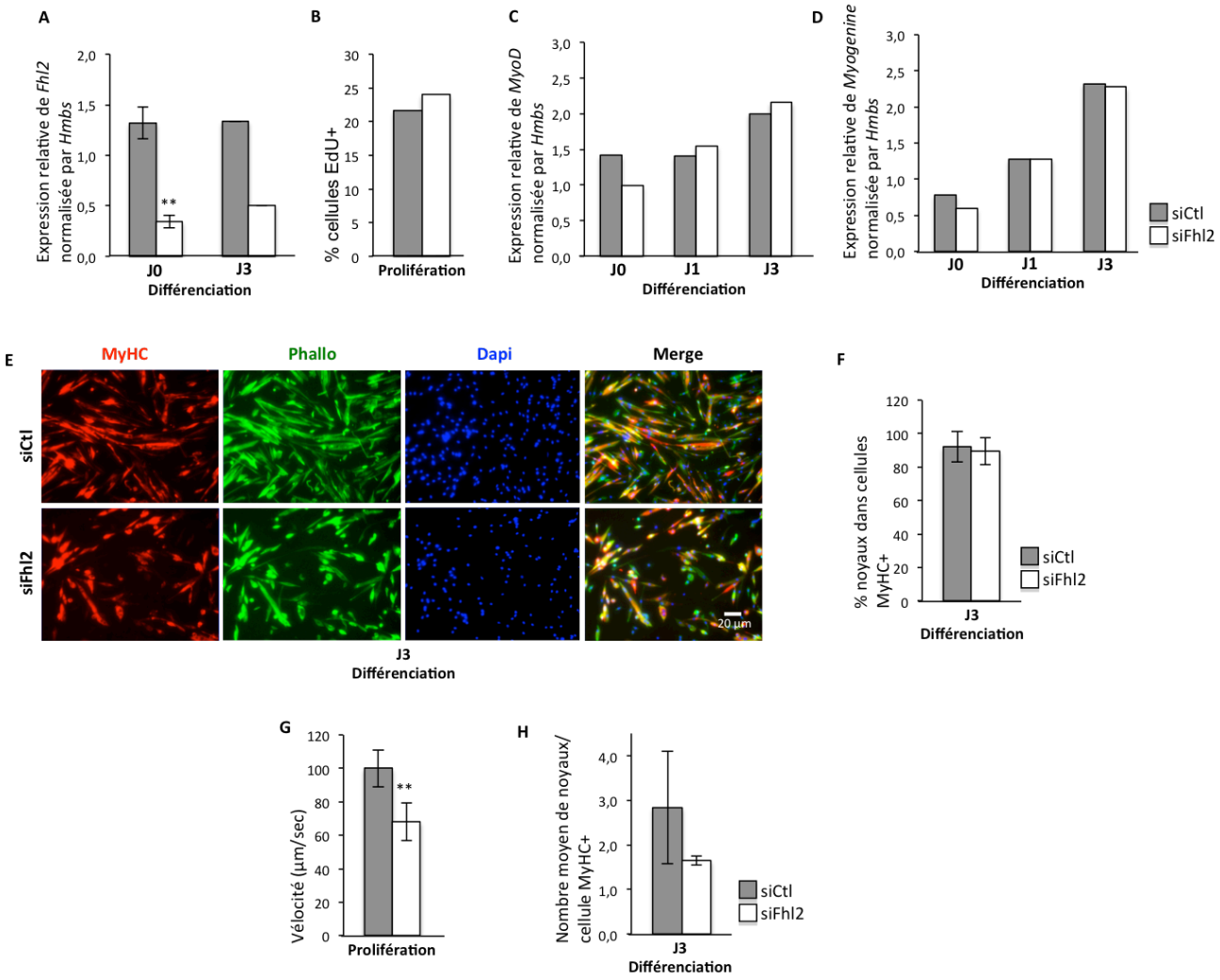


Figure 38 : La perte de fonction du gène *Fhl2* dans les cellules satellites

(A) Efficacité de la transfection évaluée par l'expression des ARNm de *Fhl2* par RT-qPCR de myoblastes sauvages (Ctl) transfectés par un siRNA contrôle (siCtl) ou siFHL2 et maintenus en culture (J0, myoblastes) ou trois (J3) jours après différenciation, normalisée par *Hmbs* (J0 n=4 ; J3 n=1).
(B) Pourcentage de myoblastes EdU+ (phase S du cycle cellulaire) transfectés par un siCtl ou siFHL2, maintenus en culture (n=1).
(C) Expression des ARNm de *MyoD* par RT-qPCR de myoblastes transfectés par un siCtl ou siFHL2 et maintenus en culture (J0, myoblastes), ou un (J1) ou trois (J3) jours après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=1).
(D) Expression des ARNm de la *Myogénine* par RT-qPCR de myoblastes transfectés par un siCtl ou siFHL2 et maintenus en culture J0, J1 ou J3 après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=1).
(E) Immunomarqage de la Myosine (MYHC) (rouge), marquage de l'Actine filamenteuse par la phalloïdine (vert), et des noyaux au DAPI (bleu), de myoblastes transfectés par un siCtl ou siFHL2 maintenus en culture J3 après différenciation échelle : 20µm).
(F) Pourcentage des myoblastes transfectés par un siCtl ou siFhl2 MYHC+, parmis les myoblastes marqués à la phalloidine (n=2).
(G) Vélocité moyenne (µm/min) des myoblastes transfectés par un siCtl ou siFHL2, par microscopie en temps réel (au moins 100 cellules ont été analysées par génotype). L'expérimentation a été répétée 3 fois.
(H) Nombre moyen de noyaux par cellules MYHC+, obtenus de myoblastes transfectés par un siCtl ou siFHL2, et maintenus en culture J3 après différenciation (n=2).
Data are mean ± s.d. **p<0.01 versus siCtl ou J0.

d)-La perte de fonction du gène *Hic5* dans les cellules satellites

HIC5 est une protéine de l'adhésion focale faisant partie de la famille des protéines à domaine LIM, ayant 2 domaines en doigt de zinc. Elle possède 72% d'homologie de séquence avec la protéine paxilin, protéine d'adhésion focale [181] [182], lui afférant un rôle d'échaffaudage à la cellule via les domaines LIM en interagissant avec d'autres protéines d'adhésion focale. HIC5 a été montré comme étant régulé par SRF/myocardin dans les muscles lisses via une boite CArG située sur son promoteur, et que la dérégulation de SRF dans les cellules de muscle lisse diminue son expression. Une dérégulation de HIC5 dans ces cellules induit leur prolifération et est ainsi nécessaire à la contraction musculaire [183] [8]. Durant des cycle d'étirement, HIC5 a aussi été montré se déplaçant des sites d'adhésion focale aux fibres de stress [184] [185] [186].

Une diminution de l'expression du gène *Hic5* a été réalisé par transfection d'un siRNA dans des cellules *Pax7*$^{+/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* (+TMX). L'efficacité de la transfection de 75% a été vérifiée par qPCR à J0 et J3 de différenciation (figure 39-A).

De la même façon que pour le gène *Fhl2*, nous souhaitons étudier différents paramètres fonctionnels des cellules dépourvues du gène *Hic5* afin de connaitre s'il a un lien direct avec SRF.

La capacité des cellules à proliférer, par incorporation d'EdU pendant 2h ne montre pas de différence entre les cellules transfectées par un siRNA contrôle et le siHIC5 (figure 39-B).

Par analyse des transcrits des gènes *MyoD* et *Myogénine* (figure 39-C-D) ainsi que par analyse immunohistologique de la Myosine, nous n'observons pas de différence entre les cellules contrôles et les cellules transfectées par un siHIC5 dans l'entrée en différenciation myogénique, précoce et tardive (figure 39-E-F).

Le déplacement des cellules a été analysé par microscopie en temps réel. Les cellules dont l'expression de HIC5 est diminuée, ne présentent pas de défaut de vélocité (figure 39-G).

Par un marquage MYHC/phalloidine/DAPI, j'ai évalué le nombre moyen de noyaux par cellule MYHC+ qui s'avère fortement diminué chez les cellules dont le gène *Hic5* a été downrégulé, indiquant un défaut de fusion (figure 39-E-H).

Ces données nous indiquent que la prolifération cellulaire n'est pas affectée, ni la motilité, ni l'entrée des cellules satellites dans le lignage musculaire. Cependant, la fusion des myoblastes transfectés par un siHIC5 est fortement affectée après 3 jours de différenciation.

Les gènes *Fhl2* et *Hic5* semblent être de bons candidats dans notre étude, d'autant qu'ils ont été montré comme étant des cibles de SRF [179] [183]. Il serait cependant nécessaire de reproduire certaines expérimentations.

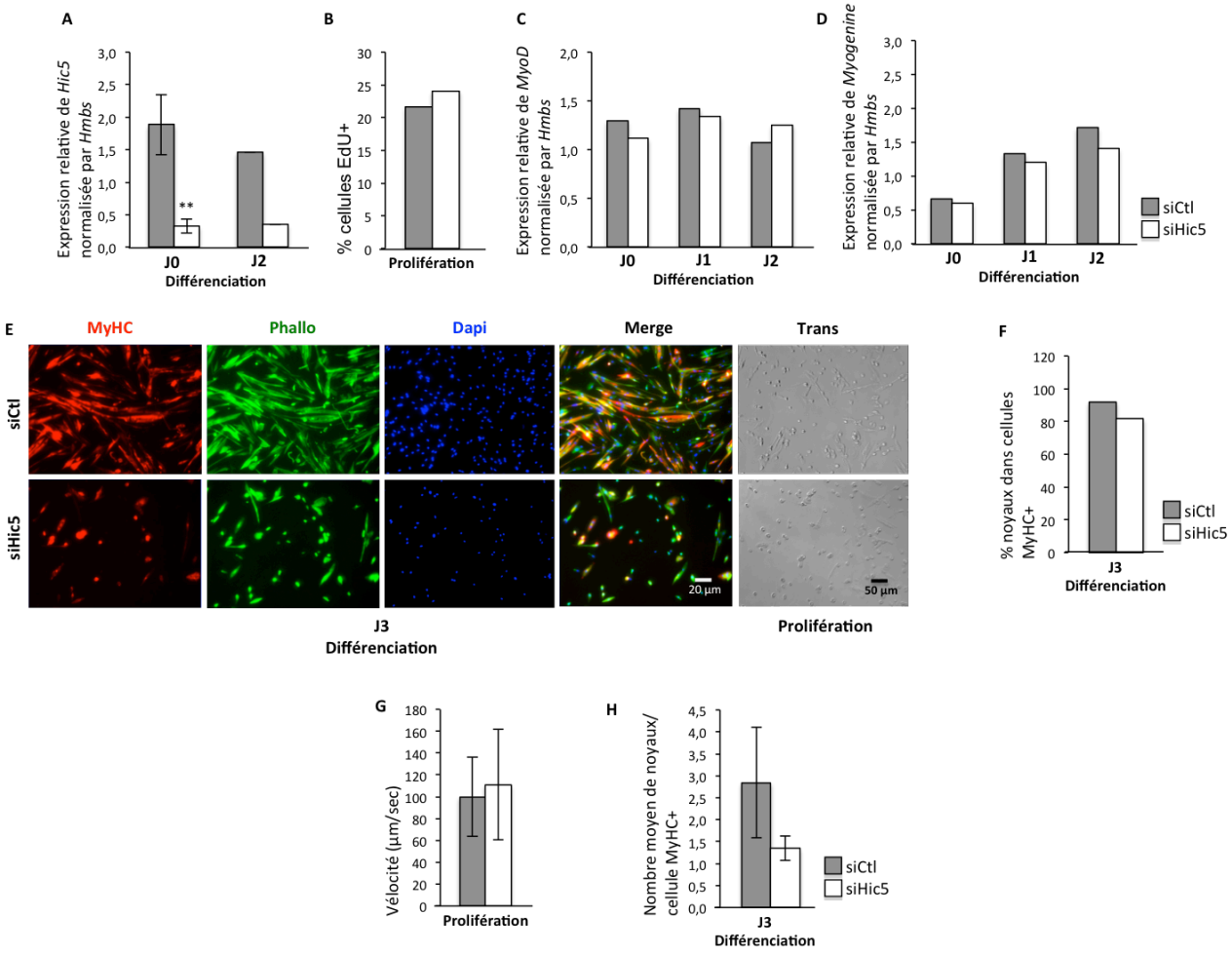


Figure 39 : La perte de fonction du gène *Hic5* dans les cellules satellites

(A) Efficacité de la transfection évaluée par l'expression des ARNm de *Hic5* par RT-qPCR de myoblastes sauvages (Ctl) transfectés par un siRNA contrôle (siCtl) ou siHIC5 et maintenus en culture (J0, myoblastes) ou deux (J2) jours après différenciation, normalisée par *Hmbs* (J0 n=4 ; J2 n=1).
(B) Pourcentage de myoblastes EdU+ (phase S du cycle cellulaire) transfectés par un siCtl ou siHIC5, maintenus en culture (n=1).
(C) Expression des ARNm de *MyoD* par RT-qPCR de myoblastes transfectés par un siCtl ou siHIC5 et maintenus en culture J0, J1 ou J2 après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=2).
(D) Expression des ARNm de la *Myogénine* par RT-qPCR de myoblastes transfectés par un siCtl ou siHIC5 et maintenus en culture J0, J1 ou J2 après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=2).
(E) Immunomarqage de la Myosine (MYHC) (rouge), marquage de l'Actine filamenteuse par la phalloïdine (vert), et des noyaux au DAPI (bleu), de myoblastes transfectés par un siCtl ou siHIC5 maintenus en culture J3 après différenciation (échelle : 20µm) ; et photos prises en contraste de phase (Trans) de myoblastes en prolifération (échelle : 50 µm).
(F) Pourcentage des myoblastes transfectés par un siCtl ou siHIC5 MYHC+, parmis les myoblastes marqués à la phalloidine (n=2).
(G) Vélocité moyenne (µm/min) des myoblastes transfectés par un siCtl ou siHIC5, par microscopie en temps réel (au moins 100 cellules ont été analysées par génotype) (n=5).
(H) Nombre moyen de noyaux par cellules MYHC+, obtenus de myoblastes transfectés par un siCtl ou siHIC5, et maintenus en culture J3 après différenciation (n=2).
Data are mean ± s.d. **p<0.01 versus siCtl ou J0.

e)-La restauration du niveau d'expression de *Krt18* chez les mutants SRF

Le gène *Krt18* code pour les filaments intermédiaires de type I de la kératine 18. Dans un modèle d'étude pathologique de cellules rénales primaires murines (renal tubular epithelial cells-RTECs), les cellules épithéliales se transforment en fibroblastes musculaires, conduisant à la surexpression de la vimentin, de la SMA et à la diminution de l'expression de KRT18, via la voie de signalisation TGF-béta1/Smad7 [187]. A l'inverse, une étude indique que l'augmentation de l'expression de KRT18 serait associé à une fibrose dans le tubules rénaux [188]. Cependant le gène *Krt18* n'a pas été décrit comme étant un gène cible directe de SRF.

Nous avons donc réalisé des transfections d'un siRNA ciblant le gène *Krt18* afin de réduire le niveau d'expression de ce gène au niveau basal de celui exprimé dans les cellules contrôles. Pour cela, les analyses ont été réalisées sur le modèle de cellules $Pax7^{CreERT2/+}$:$Srf^{flox/flox}$:*Pax7-nGFP*. Les cellules contrôles sont issues de souris qui n'ont pas été injectées avec du TMX ; les cellules mutantes sont elles issues de souris ayant été injectées avec du TMX.

Après transfection, nous obtenons une expression du gène *Krt18* dans les cellules mutantes (Mut siKRT18) réduite au même niveau d'expression que dans les cellules contrôles (Ctl siCtl) (figure 40-A). Cette expression est conservée après 3 jours de différenciation des cellules satellites (J3).

L'analyse de la prolifération cellulaire par incorporation d'EdU durant 2h, révèle que les cellules mutantes SRF ayant un niveau d'expression du gène *Krt18* similaire à celui des cellules contrôles SRF, prolifèrent 2 fois moins. Ce résultat suggère que la relation SRF-KRT18 est nécessaire au maintien d'une prolifération correcte des cellules satellites. Cette expérimentation a été réalisée une fois et nécessiterait d'être reproduite (figure 40-B).

L'analyse des transcrits des gènes *MyoD* et *Myogénine* (figure 40-C-D) ainsi que l'analyse immunohistologique de la Myosine (figure 40-E-F), nous indiquent que les cellules mutantes dont le niveau d'expression de *Krt18* a été abaissé ne présentent pas de défaut d'entrée en différenciation ni de défaut dans le maintien en différenciation. L'expression des gènes *MyoD* et *Myogénine* est même légèrement augmentée.

Les cellules mutantes SRF, qui expriment fortement KRT18, présentent un défaut de motilité en comparaison aux cellules contrôles (figure 40-G). Lorsque nous abaissons le niveau d'expression de KRT18 dans les cellules mutantes SRF au même niveau que son expression dans les cellules contrôles (par transfection par un siKRT18), nous n'observons pas d'amélioration de la motilité. Ce résultat semble indiquer que KRT18 n'est pas lié au phénotype observé chez les cellules satellites mutantes SRF.

Par un marquage MYHC/phalloidine/DAPI, j'ai évalué la capacité des cellules à fusioner 3 jours après mise en différenciation. Le nombre moyen de noyaux par cellule MYHC+ est fortement diminué chez les cellules mutantes SRF, mais nous n'observons pas de différence avec les cellules mutantes transfectées par le siKRT18 (figure 40-H).

Ces données nous indiquent que KRT18 n'est pas impliqué dans le processus d'entrée dans le lignage musculaire des cellules satellites, dans le processus de leur de déplacement, ni dans le processus de fusion entre cellules satellites ou entre cellule satellite-myofibre. Nous ne poursuivrons pas l'étude de ce gène.

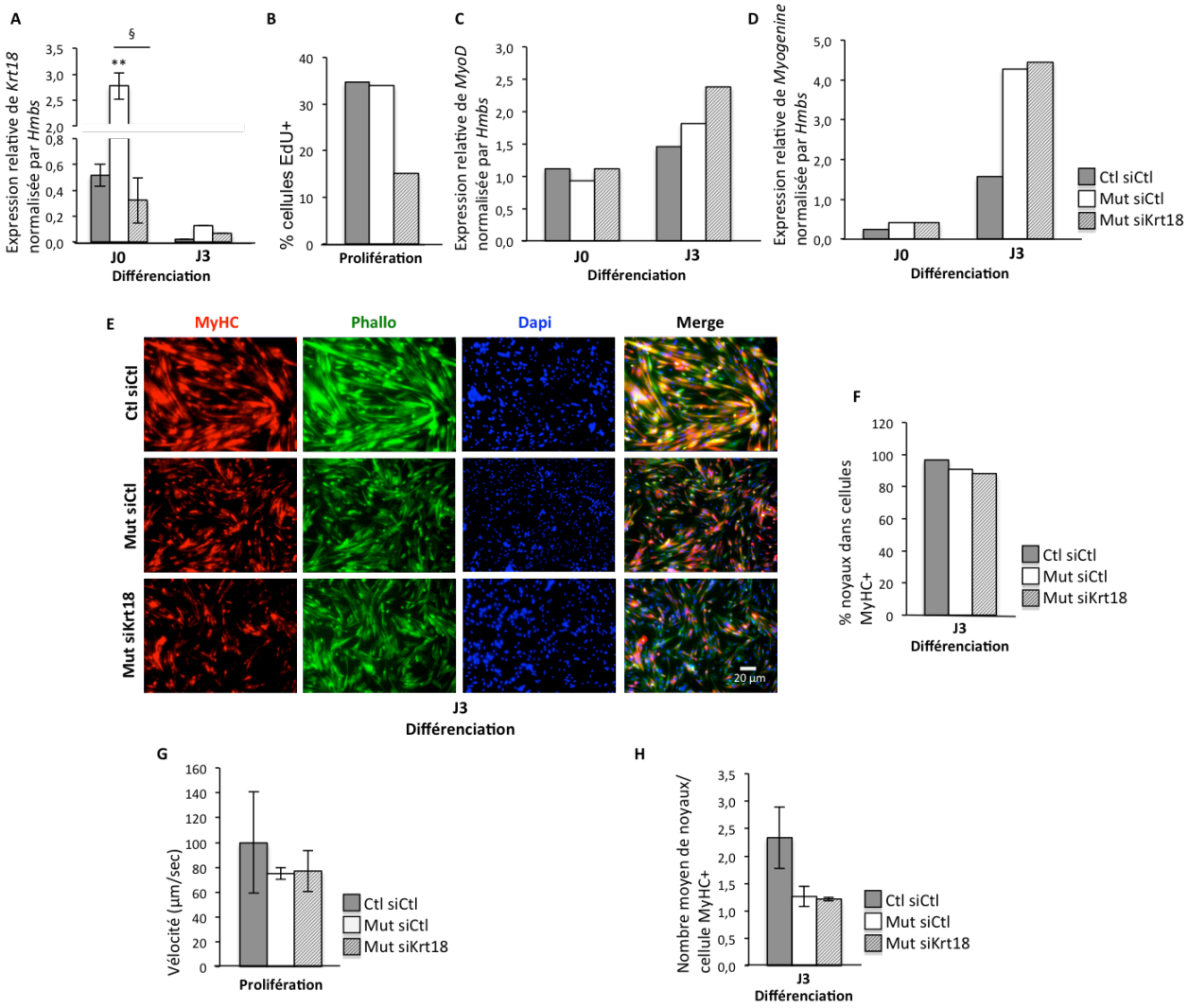


Figure 40 : La restauration de l'expression de *Krt18* chez les mutants SRF

(A) Efficacité de la transfection évaluée par l'expression des ARNm de *Krt18* par RT-qPCR de myoblastes sauvages (Ctl) ou mutants Srf (Mut) transfectés par un siRNA contrôle (siCtl) ou siKRT18 et maintenus en culture (J0, myoblastes) ou trois (J3) jours après différenciation, normalisée par *Hmbs* (J0 n=3 ; J3 n=1).

(B) Pourcentage de myoblastes EdU+ (phase S du cycle cellulaire) Ctl et Mut transfectés par un siCtl ou siKRT18, maintenus en culture (n=1).

(C) Expression des ARNm de *MyoD* par RT-qPCR de myoblastes Ctl et Mut transfectés par un siCtl ou siKRT18 et maintenus en culture J0 ou J3 après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=1).

(D) Expression des ARNm de la *Myogénine* par RT-qPCR de myoblastes Ctl et Mut transfectés par un siCtl ou siKRT18 et maintenus en culture J0 ou J2 après différenciation, normalisée par *Hmbs* (n=2).

(E) Immunomarqage de la Myosine (MYHC) (rouge), marquage de l'Actine filamenteuse par la phalloïdine (vert), et des noyaux au DAPI (bleu), de myoblastes Ctl et Mut transfectés par un siCtl ou siKRT18 maintenus en culture J3 après différenciation (échelle : 20µm).

(F) Pourcentage des myoblastes Ctl et Mut transfectés par un siCtl ou siKRT18, MYHC+, parmis les myoblastes marqués à la phalloidine (n=1).

(G) Vélocité moyenne (µm/min) des myoblastes Ctl et Mut transfectés par un siCtl ou siKRT18, par microscopie en temps réel (au moins 100 cellules ont été analysées par génotype) (n=2).

(H) Nombre moyen de noyaux par cellules MYHC+, obtenus de myoblastes Ctl et Mut transfectés par un siCtl ou siKRT18, et maintenus en culture J3 après différenciation (n=1).

Data are mean ± s.d. **p<0.01 versus Ctl siCtl ou J0 ; §p<0.05.

2-4- Conclusion - Rôle de SRF dans les cellules satellites adultes

En conclusion, ces résultats montrent que SRF n'est pas indispensable à la prolifération cellulaire mais que son expression est importante au déplacement des cellules. L'ensemble de ces données, couplé aux données de l'étude réalisée *in vivo* par Aikaterini Papaefthymiou (Annexe 2), nous indiquent que SRF n'est pas indispensable à l'engagement des cellules dans le lignage musculaire et dans la différenciation musculaire. Par contre, les analyses *in vivo* et *in vitro* nous indiquent que SRF est indispensable pour la fusion.

Toutes ces données, obtenues par des expériences *in vitro,* corrèlent avec les résultats obtenus par l'étudiante en thèse, sur des expériences de régénération et d'hypertrophie compensatoire réalisées *in vivo.* En effet, lorsque les SC sont dépourvues de SRF, les muscles présentent un important défaut de fusion au cours de la régénération (fusion homotypique, dite symétrique). Lors d'hypertrophie compensatoire, où la fusion a lieu entre cellules de génotypes différents (fusion hétérotypique, dite asymétrique), est elle aussi affectée. Ces travaux sont en cours de soumission.

Nous avons cherché à identifier les mécanismes sous jacents. Nous avons identifié 3 gènes potentiels qui pourraient être impliqués, avec SRF, au phénotype de fusion altérée : *alpha-Actine, Fhl2 et Hic5*. Nous excluons de notre étude les gènes *Egr1, Krt18, Fermt2 et Wdr1*, dont le phénotype ne copie pas le phénotype observé chez les mutants SRF (résultats présentés dans ce mémoire). Quant aux gènes *Cnn2, Ptges3l, Pdlim7 et Ubald1*, nous souhaitons confirmer les résultats préliminaires obtenus avant de pouvoir poursuivre leur étude (données non montrées). Les résultats obtenus des analyses cellulaires de ces gènes sont récapitulés dans le tableau 2.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Partie 1 - Le rôle du facteur de transcription SRF dans l'atrophie du muscle adulte

Le muscle squelettique adulte est un tissu capable de s'adapter à la demande fonctionnelle. Des travaux dans l'équipe ont préalablement montré un lien entre SRF et la plasticité musculaire. SRF a été montré impliqué dans l'hypertrophie induite par surcharge de travail (Guerci et al, 2012). De plus, Laura Collard a montré l'implication de SRF dans un modèle d'atrophie musculaire spécifique de l'arrêt de l'activité mécanique. Ces données suggèrent un rôle important de SRF dans la mécanotransduction dans le tissu musculaire.

Le projet qui m'a été confié, a été de poursuivre l'exploration de l'implication de SRF dans l'atrophie par suppression de l'influx nerveux. J'ai ainsi étudié des voies de signalisation et le métabolisme des fibres musculaires en aval de SRF, pouvant expliquer le phénotype d'atrophie exacerbée observé dans les muscles dépourvus de SRF.

Les résultats obtenus et présentés dans ce mémoire, proviennent d'expérimentations réalisées sur des souris élevées en animalerie conventionnelle. Suite au transfert de nos animaux, pour travaux, dans une animalerie au statut EOPS (par transfert d'embryons), nous n'avons pas pu reproduire le phénotype d'atrophie exacerbée en absence de SRF en condition de dénervation (figure 42-C-D). Cependant les analyses transcriptionnelles des gènes *Srf* et *Acta1* ont confirmé la diminution de leur expression comme observé précédemment chez les animaux élevés en condition conventionnelle (figure 42-A-B). Nous avons émis l'hypothèse que le statut sanitaire pourrait en partie être responsable de la différence de phénotype observée. En effet, la composition du microbiote et/ou l'environnement immunitaire, inflammatoire et fibrotique des muscles pourraient jouer un rôle dans le mécanisme d'atrophie [189]. Afin de poursuivre l'étude, nous avons récemment déplacé des animaux vers une animalerie au statut conventionnel. Après deux mois d'acclimatation nous procèderons à l'analyse de l'atrophie induite par dénervation des animaux contrôles et mutants.

Si une atrophie exacerbée est confirmée chez les mutants, nous pourrons alors poursuivre les études de respiration mitochondriale par mesure de la consommation d'oxygène sur fibres isolées et perméabilisées, maintenant les mitochondries dans leur environnement cellulaire. Ces expérimentations nous permettraient de conclure sur l'impact de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire. Egalement, nous pourrions poursuivre l'étude, et mesurer le potentiel d'action des mitochondries, ainsi que le ratio AMP/ATP obtenu par dosage de l'acide adénylique et de la phosphocreatine (CrP). Il serait intéressant d'approfondir la voie du métabolisme énergétique par l'analyse des isoformes isocitrate dehydrogenase (IDH), intervenant dans le cycle de Krebs, ainsi que l'acetyl-CoA acyltransferase 2 (Acaa2), impliqué dans la béta-oxydation des acides gras. De plus, nous pourrions affiner certains résultats sur le transfert d'énergie par l'analyse de l'adénylate kinase (AK). Nous pourrons étudier la biogenèse mitochondriale par l'analyse protéique de PGC1-alpha, PRC, NRF1 et GABPA.

Nous pourrons également affiner nos conclusions sur l'implication de l'autophagie, par traitement des muscles à la chloroquine, agent lysomotropique, et ainsi démontrer un blocage de la dégradation des protéines ou bien une activité accrue de cette dégradation. En effet, sous traitement à la chloroquine, une augmentation de LC3-II montrerait une augmentation du flux autophagique [169]. Nous envisageons d'analyser d'autres acteurs de l'autophagie par Western blot, tel que P62, qui intervient dans la formation des autophagosomes. De plus, des acquisitions par microscopie électronique pourraient nous conforter sur l'implication de l'autophagie, par dénombrement d'autophagosomes dans le cytoplasme des cellules [190].

Enfin, nous pourrons élargir notre étude par l'évaluation de la synthèse protéique, par traitement des muscles à la puromycine, antibiotique qui inhibe la synthèse protéique.

D'autres pistes pourraient être explorées comme le stress oxydatif (ROS, protéines carbonylées) et les voies du calcium.

Si l'exacerbation de l'atrophie par dénervation en absence de SRF n'est pas confirmée, alors l'environnement semble être en grande partie responsable du phénotype. Des analyses microscopiques par des marquages histologiques afin d'évaluer la réaction inflammatoire, pourrait être intéressant en comparant les animaux provenant des 2 animaleries.

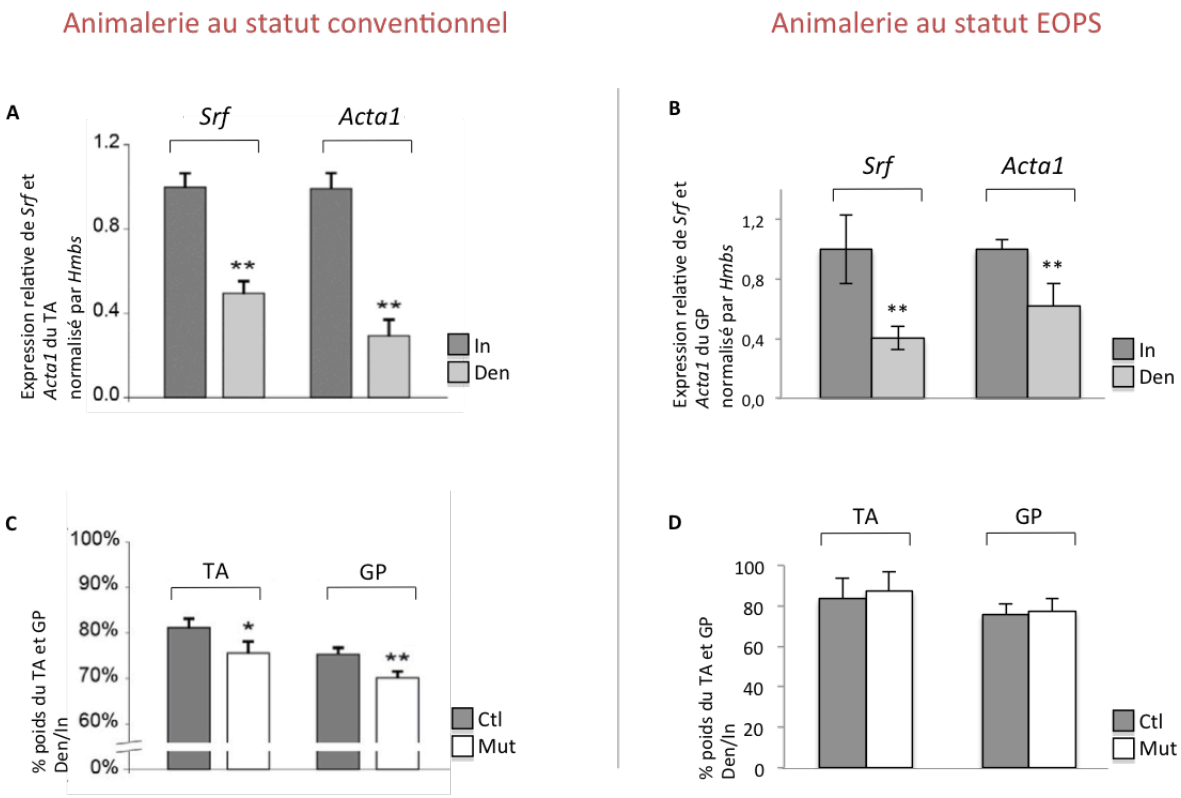


Figure 41 : Statut EOPS versus conventionnel
(A) Expression des ARNm de *Srf* et *Acta1* par RT-qPCR, des GP innervés et dénervés des animaux contrôles, normalisée par *Hmbs* en condition d'innervation (In) et de dénervation (Den) (Ctl n= 4 ; Mut n=4).
(B) Expression des ARNm de *Srf* et *Acta1* par RT-qPCR, des GP innervés et dénervés des animaux contrôles, normalisée par *Hmbs* (Ctl n=5 ; Mut n=3).
(C) Ratio des poids des muscles dénervés (Den) rapportés aux muscles innervés (In) des TA et GP, des animaux contrôles (Ctl) et mutants (Mut) (Ctl n=10 ; Mut n=10).
(D) Ratio des poids des muscles dénervés (Den) rapportés aux muscles innervés (In) des TA et GP, des animaux contrôles (Ctl) et mutants (Mut) (Ctl n=9 ; Mut n=7).
Les données sont les moyennes +/- s.e.m. *, p<0.05 *versus* Ctl In ; **, p<0.01 *versus* Ctl In.

Partie 2 - Le rôle du facteur de transcription SRF dans les cellules satellites adultes

Selon les demandes physiologiques, le muscle squelettique va être capable de s'adapter grâce à sa plasticité cellulaire. Outre des modifications métaboliques et protéiques, l'hypertrophie musculaire est régulée par les cellules satellites [191] (figure 13).

Dans le cadre du projet menant à la compréhension du rôle de SRF dans l'activité des cellules satellites, il m'a été confié l'étude de gènes cibles de SRF, préalablement sélectionnés d'après des puces Affimetrix réalisées dans l 'équipe, par une approche *in vivo*.

Les Actines sont des protéines très conservées au cours de l'évolution. Elles ont un rôle crucial dans la division cellulaire, la motilité cellulaire, dans le maintien du cytosquelette et lors de la contraction musculaire. Un défaut des structures du cytosquelette engendre un défaut d'adhésion des cellules satellites du aux fibres de stress et aux plaques d'adhésion focale [192].

L'Actine est dérégulée en absence de SRF dans les SC. L'équipe a ainsi créé un modèle d'étude par « gain de fonction », afin d'évaluer l'implication de l'Actine dans un contexte où l'activité transcriptionelle de SRF est nulle. Sa surexpression, dans des modèles $Srf^{-/-}$, *in vitro* et *in vivo,* améliore le phénotype de fusion lors d'hypertrophie, suggérant que l'Actine est suffisante à la restauration du phénotype de fusion hétéroptypique (figure 37-B).

Nous souhaitons comprendre pourquoi le maintien du cytosquelette d'Actine provoque une restauration de la fusion hétérotypique. Ainsi, nous avons entrepris d'étudier le cytosquelette d'Actine des SC en prolifération et pendant la fusion, et ses réarrangements. Pour cela nous avons entrepris d'analyser les structures d'Actine filamenteuse (filopodes, lamellipodes, fibres de stress) par microscopie confocale et électronique, en collaboration avec Stéphane Vassilopoulos de l'Institut de Myologie, nous permettant d'étudier la localisation subcellulaire de protéines importantes pour la fusion hétérotypique. En effet, il a été montré que les filopodes constitués d'Actine sont importants pour la fusion [193] [194]. De plus, nous envisageons d'étudier la tension/rigidité de ces cellules en collaboration avec Atef Asnacios, biophysicien.

Cependant, la restauration du cytosquelette d'Actine n'est pas suffisante à l'amélioration du phénotype de fusion observé chez les mutants SRF dans un modèle homotypique (correspondant à la régénération dans un modèle *in vivo*). Ces données nous encouragent à poursuivre l'étude sur l'impact de l'absence de SRF, l'Actine n'étant visiblement pas le seul acteur impliqué dans cette dynamique. Nous avons ainsi étudié différents gènes cibles de SRF (directs ou indirects) susceptibles d'avoir un rôle dans le phénotype observé en absence de SRF. Les gènes *Fhl2* et *Hic5* identifiés comme potentiellement impliqués dans le défaut de fusion des mutants SRF pourraient être concernés.

Les résultats sur la dérégulation du gène *Fhl2* dans des cellules sauvages, indiquent qu'il est un bon candidat et copie le phénotype des mutants SRF. Nous suggérons que FHL2 est nécessaire à la motilité des SC et à leur fusion. Cependant, le défaut de fusion observé serait soit du à la conséquence d'un défaut de motilité, soit serait du à l'absence de FHL2 lui-même. Une poursuite de l'étude de ce gène est envisagée par une approche « gain de fonction », en surexprimant FHL2 dans des cellules mutantes SRF [195].

Contrairement aux cellules ayant été transfectées par un siFHL2, le déplacement normal des cellules transfectées par un siRNA HIC5 nous permet de dire que le défaut de fusion observé après 3 jours de différenciation est directement lié à la fusion des myoblastes. Une surexpression de HIC5 dans les

cellules mutantes SRF permettrait d'évaluer le « gain de fonction » apporté par HIC5 sur le défaut de fusion de ces cellules [196].

Afin d'étudier le lien entre FHL2 ou HIC5 et l'Actine, nous envisageons des expériences de dérégulation de ces gènes dans un modèle cellulaire sauvage dont l'Actine est surexprimée. En effet, la dérégulation de ces gènes, induit un défaut de fusion similaire au KO SRF. Si le cytosquelette d'Actine des cellules transfectées par un siFHL2 ou siHIC5 s'avère désorganisé, alors nous pourrions étudier si l'Actine pourrait restaurer le phénotype dans ce contexte.

De plus, dans un modèle de fusion homotypique KO SRF, nous avons montré que la surexpression de l'Actine n'était pas suffisante à la restauration de la fusion altérée en absence de SRF. Ainsi, nous envisageons de tester *in vitro* une éventuelle restauration du phénotype de fusion par surexpression de FHL2 ou HIC5 dans des SC mutantes SRF et mutantes surexprimant l'Actine. Un sauvetage *in vivo* pourra également être envisagé en électroporant des muscles avec des constructions permettant la surexpression de FHL2 ou HIC5 au début du processus de régénération, afin de toucher majoritairement les myoblastes en prolifération. Ainsi, nous évaluerons si l'expression de HIC5 ou FHL2 améliore le processus de régénération dépendant de la fusion homotypique.

Il serait également intéressant de réaliser des marquages des protéines FHL2 et HIC5 *in vivo* et *in vitro*, afin de les localiser dans la cellule et d'identifier leur localisation par rapport au cytosquelette et aux protéines d'adhésion focale de la cellule.

ANNEXES

Annexe 1

Journal of Cell Science (2014) 127, 5157–5163 doi:10.1242/jcs.155911
SHORT REPORT

Nuclear actin and myocardin-related transcription factors control disuse muscle atrophy through regulation of Srf activity

Laura Collard[1,2,3], Gaëlle Herledan[1,2,3], Alessandra Pincini[1,2,3], Aline Guerci[1,2,3], Voahangy Randrianarison-Huetz[1,2,3] and Athanassia Sotiropoulos[1,2,3,*]

[1]Inserm U1016, Institut Cochin, F-75014 Paris, France. [2]CNRS UMR8104, F- 75014 Paris, France. [3]Universite´ Paris Descartes, F-75006 Paris, France.
*Author for correspondence (athanassia.sotiropoulos@inserm.fr)

Received 2 May 2014; Accepted 15 October 2014

ABSTRACT

Skeletal muscle atrophy is a debilitating process that is associated with a wide variety of conditions including inactivity, disease and aging. Here, we demonstrate that the actin, myocardin-related transcription factors and serum response factor (actin–Mrtf–Srf) pathway is specifically downregulated in the muscle atrophy that is induced through disuse in mice. We show in vivo that the abolition of mechanical signals leads to the rapid accumulation of G-actin in myonuclei and the export of the Srf coactivator Mrtf-A, resulting in a decrease of Mrtf–Srf-dependent transcription that contributes to atrophy. We demonstrate that inhibition of the actin–Mrtf–Srf axis through overexpression of nuclear non-polymerizable actin, through pharmacological inhibition of Mrtf–Srf and through muscle-specific Srf deletion worsens denervation-induced atrophy. Conversely, maintenance of high levels of activity of Srf or Mrtfs in denervated muscle, through overexpression of constitutively active derivatives, counteracts atrophy. Altogether, our data provide new mechanistic insights into the control of muscle mass upon disuse atrophy by the actin–Mrtf–Srf pathway, highlighting Srf as a key mediator of mechanotransduction in muscle.

KEY WORDS: Actin, Atrophy, Skeletal muscle, Transcription

INTRODUCTION

Skeletal muscle wasting represents a major health problem because it is the consequence of a wide variety of pathological conditions, including inactivity (bed rest or nerve injury), starvation, chronic diseases and neuromuscular disorders.

Muscle atrophy always entails loss of organelles and cytoplasm, and involves protein-breakdown pathways (Bonaldo and Sandri, 2013). In particular, the ubiquitin-proteasome system induces the degradation of sarcomeric proteins, such as a-actin, through the muscle E3 ubiquitin ligase MuRF1 (Polge et al., 2011). In addition, disuse atrophy is associated with a decrease in the expression of genes encoding contractile proteins (Giger et al., 2009). This suggests that the control of muscle mass also stems from transcriptional and pre-translational regulatory processes. To date, it is unknown whether specific signaling pathways are involved in disuse muscle atrophy.

Serum response factor (Srf) is a member of the MADS-box transcription factor family. One major class of Srf targets is muscle-specific and comprises several genes encoding sarcomeric proteins (a-actins, myosins) (Pipes et al., 2006). The ability of Srf to regulate downstream target genes depends on its association with coactivators – including Ets-domain proteins, which are activated by MAPK, and myocardin-related transcription factors (Mrtfs), the nuclear accumulation of which is controlled by Rho GTPases and actin dynamics (Posern and Treisman, 2006). Using a mouse model of adult myofiber Srf deletion, we have previously reported that Srf is crucial for adult skeletal muscle hypertrophy, whereas it is not needed for myofiber maintenance (Guerci et al., 2012).

Here, we investigate the role of the actin–Mrtf–Srf pathway in skeletal muscle atrophy of different origins. We show that Srf activity is specifically downregulated by the abolition of mechanical cues and is governed by a rapid G-actin accumulation in myonuclei, which results in a decrease in intranuclear Mrtfs. Moreover, we demonstrate in vivo that denervation-induced muscle atrophy is aggravated by inhibiting the actin–Mrtf–Srf pathway and is counteracted by maintaining a high level of activity of either Srf or Mrtfs. Altogether, our results reveal the actin–Mrtf–Srf axis as a key pathway controlling disuse atrophy because its alteration directly impacts the extent of atrophy.

RESULTS AND DISCUSSION

Srf activity decreases upon disuse atrophy

To examine the contribution of Srf to skeletal muscle atrophy, we electroporated a Srf luciferase reporter construct into the tibialis anterior muscle of control mice, which showed a significant decrease in Srf transcription activity following denervation (Fig. 1A). As a consequence, the expression of Srf target genes, such as a-skeletal actin (Acta1) and Srf, which is its own target, was reduced in denervated gastrocnemius and plantaris, and tibialis anterior muscles (Fig. 1B; supplementary material Fig. S1A). Tallying with the diminished expression of Srf transcripts, a decreased Srf protein content was detected (Fig.1C; supplementary material Fig. S1B). We then examined Srf subcellular localization within myofibers, as its extranuclear localization has been reported in atrophied rat muscles after 14 days of an 'intensive care unit model' (Ochala et al., 2011) and in beating-arrested neonatal rat cardiomyocytes (Lange et al., 2005); Srf extranuclear localization has also been associated with nuclear accumulation of MuRF2. However, up to 7 days post denervation, Srf protein was located inside myonuclei (supplementary material Fig. S1C), suggesting that, in this system and at this timing, the observed decrease in Srf activity is not a consequence of the relocalization of Srf protein through the activity of MuRF2.

We next asked whether Srf activity is modulated in muscle atrophy that has been triggered by different cues. Denervation- induced atrophy is due to sciatic nerve severing, leading to the suppression of nerve impulses, muscle contraction and stretching. Atrophy induced by gastrocnemius tenotomy entails the reduction of mechanical signals and the prevention of stretching whilst maintaining muscle innervation. In line with the results obtained upon denervation, the expression of Acta1 and Srf was reduced in tenotomized gastrocnemius muscle (supplementary material Fig. S1D), suggesting that in vivo Srf activity is controlled through muscle stretching rather than through a trophic contribution of the nerve and excitation–contraction coupling.

Calorie-restriction-induced atrophy relies on nutrient shortage and not on the lack of mechanical cues. In contrast to observations following denervation and tenotomy, the expression of Srf targets was not downregulated after calorie restriction (Fig. 1D). Srf expression was even upregulated, but did not lead to increased Srf protein (Fig. 1E). Taken together, these data indicate that disuse, but not calorie-restriction-induced, muscle atrophy specifically leads to a sustained decrease in the overall activity of Srf.

Srf activity level regulates denervation-induced atrophy

To determine whether reduced Srf activity plays a functional role in denervation-induced atrophy, the extent of atrophy in denervated muscles from tamoxifen-injected HSA-Cre- ER^{T2}:$Srf^{flox/flox}$ mutant mice that lacked Srf in myofibers was analyzed (Fig. 2A; supplementary material Fig. S2A) (Guerci et al., 2012). After denervation, muscle weight and myofiber cross-sectional area (CSA) measurements revealed that mutant mice displayed a significantly higher atrophy of tibialis anterior, and gastrocnemius and plantaris muscles than those of control mice (Fig. 2B-D). This was not associated with higher expression levels of the ubiquitin ligases MAFbx, MuRF1 and Fbxo30 in mutant muscles, suggesting that their greater atrophy is not due to differences in the activation of the ubiquitin-proteasome pathway (supplementary material Fig. S2B). When subjected to calorie restriction, mutant and control mice presented similar extents of muscle atrophy (supplementary material Fig. S3), confirming the specific implication of Srf in disuse atrophy.

We then hypothesized that disuse atrophy could be counteracted by maintaining Srf activity through injection of control tibialis anterior muscles with adeno-associated viruses (AAVs) driving the expression of a constitutively active Srf derivative (AAV-SRFVP16) (Fig. 2E). Following denervation, overexpression of SRFVP16 induced a significant resistance to atrophy (Fig. 2F-H) and led to the persistence of endogenous Srf and Acta1 transcript levels (supplementary material Fig. S2C). Collectively, these results demonstrate in vivo that the level of Srf activity modulates the extent of denervation-induced muscle atrophy. It is worth noting that, in non-denervated muscles, the activation or blunting of Srf activity does not change myofiber size (Fig. 2D,H), despite its effect on the expression of target genes such as Acta1. This suggests that, during denervation, a decrease in the activity of Srf leads to an amplification of the transcriptional atrophic program, acting in synergy with other pathways that are involved in protein catabolism.

Disuse leads to nuclear G-actin accumulation and subsequent exclusion of Mrtfs from myonuclei

We next asked which signaling pathway could result in a decrease of Srf activity upon disuse. Because biophysical stimuli can alter actin polymerization and because Srf activity can be regulated by actin dynamics, we hypothesized that disuse could lead to alterations in monomeric G-actin quantity and/or localization. Strikingly, staining of G-actin, revealed by using fluorescent DNase I, showed that denervation induced a rapid and sustained accumulation of monomeric actin in myonuclei (Fig. 3A). By contrast, there was no difference in staining of G-actin between calorie-restricted and control muscles (Fig. 3A). Because Srf has been shown to control the expression of genes regulating actin treadmilling (Olson and Nordheim, 2010), the accumulation of nuclear G-actin could stem from a decrease of Srf activity upon disuse. Non-denervated Srf-deleted and AAV-SRFVP16-injected muscles showed the same G-actin staining as that in control muscles (supplementary material Fig. S4A), indicating that nuclear G-actin accumulation following denervation is a consequence of disuse and not of a reduction in Srf activity. Moreover, our data establish a link between the increase in nuclear G-actin levels and a physiopathologically relevant condition, muscle disuse atrophy.

Actin dynamics control Srf activity by regulating the subcellular localization of Mrtfs – G-actin binds to Mrtfs, inhibiting their entry into (Pawlowski et al., 2010) and stimulating their export from nuclei (Vartiainen et al., 2007). To determine whether the increased levels of nuclear G-actin caused by denervation are correlated with the altered subcellular localization of Mrtfs, tibialis anterior muscles were electroporated with a plasmid encoding Mrtf-A tagged with green fluorescent protein (Mrtf-A–GFP), together with a Histone2B-mCherry plasmid to identify electroporated myofiber nuclei. Immunostaining for GFP revealed two different subcellular localizations of Mrtf-A – intranuclear, characterized by an exact colocalization of Mrtf-A–GFP with mCherry-tagged Histone 2B (H2B–

mCherry), and shifted, in which some Mrtf-A–GFP did not colocalize with chromatin (Fig. 3B; supplementary material S4B,C and illustrated by 3D reconstructions in supplementary material Fig. S4D). In addition, immunostaining for Emerin suggested that at least some Mrtf-A– GFP is perinuclear and located outside of the nuclear envelope (supplementary material Fig. S4E,F). Importantly, denervation led to a rapid decrease in intranuclear Mrtf-A–GFP (Fig. 3C). In line with this, immunostaining for endogenous Mrtf-A confirmed that denervation diminished Mrtf-A localization in myonuclei (Fig. 3D,E). By contrast, there was no difference in the distribution of Mrtf-A–GFP in muscle from mice that had been fed in a normal or restricted manner (Fig. 3C). Taken together, these data show that Mrtf-A nuclear exclusion is a specific response to changes in mechanical load.

As post-denervation kinetics of nuclear G-actin accumulation coincide with that of decreasing intranuclear Mrtf-A, we speculated that an increase in nuclear G-actin could induce Mrtf- A shuttling out of myonuclei. To test this hypothesis, we artificially elevated the amount of nuclear G-actin by electroporating tibialis anterior muscle with a R62D^{NLS}-actin plasmid, which encodes a constitutively nuclear non-polymerizable actin derivative (supplementary material Fig. S4G), together with the Mrtf-A– GFP plasmid. Overexpression of R62D^{NLS}-actin in non-denervated muscle was sufficient to exclude Mrtf-A–GFP from myonuclei to a similar extent to that observed post denervation (Fig. 3F). In fibroblasts, it has been shown that the interaction between G-actin and Mrtfs can occur in both the nucleus and cytoplasm (Vartiainen et al., 2007). Interestingly, overexpression of R62D-actin, leading to an accumulation of G-actin predominantly in the cytoplasm (supplementary material Fig. S4H), did not change Mrtf-A–GFP localization, suggesting that, in muscle tissue, shuttling of Mrtfs, and subsequent activation of Srf–Mrtf, is principally modulated by nuclear G-actin and does not involve the regulation of cytosolic actin pathways (Fig. 3G). As G-actin shuttles actively between cytoplasm and nuclei through specific transporters, G-actin transport could be affected by loss of mechanical cues, resulting in its nuclear accumulation. Furthermore, actin polymerization and depolymerization processes also take place in nuclei and could modulate nuclear G-actin content (Grosse and Vartiainen, 2013). In particular, the nuclear actin regulatory protein Mical-2 has been shown to lower the amount of nuclear G-actin (Lundquist et al., 2014), and denervated muscles exhibited a reduction of Mical-2 expression (supplementary material Fig. S4I). We can thus speculate that abolition of mechanical signals increases nuclear G-actin by disrupting nuclear actin dynamics through the deregulation of actin regulatory proteins, such as Mical-2.

The actin–Mrtf–Srf pathway controls disuse atrophy

We next sought to ascertain the role of the actin–Mrtf–Srf pathway in regulating disuse atrophy. Because denervation- induced atrophy is aggravated in muscles that lack Srf, we hypothesized that atrophy should also be worsened through reducing the activity of Srf–Mrtf by using R62D^{NLS}-actin. In line with the increased Mrtf-A–GFP nuclear exclusion that is induced through R62D^{NLS}-actin (Fig. 3F), R62D^{NLS}-actin-electroporated tibialis anterior muscle showed a higher denervation-induced atrophy than control muscles, mimicking the Srf-knockout phenotype (Fig. 4A). Mrtfs-dependent Srf activity can also be inhibited by using the compound CCG-1423 (Minami et al., 2012). Tibialis anterior, and gastrocnemius and plantaris muscles of CCG-1423-injected mice were more atrophied after denervation than the muscles of vehicle-injected mice, whereas calorie-restriction-induced atrophy was unaffected (Fig. 4B,C). These data show in vivo that specific downregulation of the activity of Mrtfs aggravates disuse muscle atrophy.

To determine whether muscle atrophy could be rescued by maintaining high activity levels of Mrtfs, we overexpressed in myofibers a constitutively active Mrtf-A derivative (Mrtf-A- XXX), which is defective for actin binding and is located inside myonuclei exclusively (supplementary material Fig. S4J). Fibers that expressed Mrtf-A-XXX became completely resistant to denervation-induced atrophy

(Fig. 4D), suggesting that, among Srf cofactors, Mrtfs are the main modulators of Srf activity in this system. Interestingly, Mrtf-A–GFP, which has wild-type actin- binding sites, did not rescue atrophy (Fig.4D), strongly supporting a crucial role for the binding of G-actin to Mrtfs in the muscle atrophic response to disuse.
Mrtfs have been shown to interact with other transcription regulators, such as Smads (Charbonney et al., 2011; Wang et al., 2012). In order to investigate whether the atrophy resistance induced by active Mrtf-A requires Srf, Mrtf-A-XXX was electroporated into muscles that lacked Srf. Denervated mutant muscles displayed the same level of atrophy, regardless of Mrtf- A-XXX overexpression (Fig. 4E), demonstrating that the resistance to denervation-induced atrophy conferred by Mrtf-A- XXX depends on Srf.

In conclusion, our study shows that the alteration of any components of the actin–Mrtf–Srf pathway is sufficient to affect the extent of disuse muscle atrophy and identifies nuclear G-actin and Mrtfs as the main upstream regulators that are involved. Our data provide novel genetic and mechanistic insights into how muscle mass is regulated through a lack of mechanical stimulation and unravels the actin–Mrtf–Srf axis as a key specific regulator of disuse atrophy, establishing a link with human pathophysiological atrophy due to inactivity, nerve injury or motor neuron diseases. Therapeutic targeting of the actin–Mrtf–Srf pathway might improve the condition and quality of life of an individual with disuse muscle atrophy because maintaining the activity of Mrtfs fully counteracts the phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Mouse protocols

$Srf^{flox/flox}$ and HSA-Cre-ER^{T2}:$Srf^{flox/flox}$ mice have been described previously (Lahoute et al., 2008). Two-month-old HSA-Cre- ER^{T2}:$Srf^{flox/flox}$ and $Srf^{flox/flox}$ males were given four tamoxifen injections (1 mg/day; Sigma) and are referred as mutant and control mice, respectively.

Denervation was performed by sectioning the sciatic nerve of one leg. The intact contralateral leg was used as an internal control. For calorie restriction, mice were placed in individual cages and fed with 50% of the daily food amount or fed ad libitum. Where indicated, mice were injected intraperitoneally and daily with CCG-1423 (0.15 mg/kg; Cayman Chemical) or vehicle. Treatment with CCG-1423 started 2 days prior to and then during the timeframe of the experiment.

Gene electrotransfer was performed as described previously (Guerci et al., 2012). Tibialis anterior muscles were injected with the indicated plasmids: 1 mg Mrtf-A–GFP+3 mg H2B–mCherry+5 mg empty vector; 10 mg Mrtf-A- XXX or R62D-actin or $R62D^{NLS}$-actin+3 mg H2B–mCherry; 5 mg 3DA-luciferase+2 mg TK-Renilla+5 mg empty vector. Mice were denervated or calorie restricted 7 days after electroporation. Reporter assays were performed using the Dual-Luciferase kit (Promega).

AAV-SRFVP16 particles were produced as described previously (Guerci et al., 2012). AAV transduction was performed by injecting tibialis anterior muscles with 1.87610^{10} viral genomes 14 days before denervation.
All experiments were conducted in accordance with the European guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the institutional ethic committee (number 00315.01).

Plasmids

The Srf-reporter construct (3DA-luciferase: 3 CArGs upstream Luciferase gene) has been described previously (Geneste et al., 2002). The TK-Renilla plasmid (Promega) was used as an electroporation efficiency control. Plasmid H2B–mCherry encodes the Histone-2B–mCherry fusion protein (Abgene). Plasmids encoding hemagglutinin (HA)-tagged-Mrtf-A-XXX, Mrtf-A–GFP, HA-tagged-R62D-actin and Flag-tagged-R62D^{NLS}-actin have been described previously (Guettler et al., 2008; Posern et al., 2002; Stern et al., 2009; Vartiainen et al., 2007).

RNA extraction and qRT-PCR

RNA extraction and quantitative real-time (qRT)-PCR analysis were performed as described previously (Guerci et al., 2012). Values were normalized using Hydroxymethylbilane synthase (Hmbs). The following primers were used: Acta1-F, 59-CTGAGCGCAAGTACTCAGTGTGGA- 39; Acta1-R, 59-TTCCAAAAACAGGCGCCGGCTGCA-39; Srf-F, 59- CACCTACCAGGTGTCGGAAT-39; Srf-R, 59-GCTGTGTGGATTGT- GGAGGT-39; Hmbs-F, 59-TGCACGATCCTGAAACTCTG-39; Hmbs- R, 59-TGCATGCTATCTGAGCCATC-39.

Immunostaining

Muscle cryosections (8 mm) were fixed in 4% paraformaldehyde for 8min, blocked in 5% goat serum, 4% BSA, 0.2% Triton X-100 in PBS, incubated overnight with primary antibodies, washed with PBS, incubated with appropriate secondary antibodies and counterstained with DAPI. Tibialis anterior muscles overexpressing Mrtf-A–GFP were prefixed in 4% paraformaldehyde for 2 h and incubated overnight in 40% sucrose before freezing. The primary antibodies used were against Srf and Mrtf-A (Santa Cruz), dystrophin (Novocastra), laminin-a2 and GFP (Abcam), HA (Roche), Flag (Sigma) and emerin (Novus Biologicals). For G-actin staining, Texas-Red-conjugated DNase-I was used following the manufacturer's protocol (Molecular Probes).

Image acquisition

Digital images were acquired using a Zeiss Axiovert 200M microscope with 106, 206 or 406 magnification, or using a Spinning Disk Leica confocal microscope with a 1006 oil-immersion objective, cooled CCD CoolSNAP-HQ^2 camera (Photometrics) and Metamorph 7.7.5 (Molecular Devices). Images were composed and edited in Adobe Photoshop and ImageJ. Background was reduced using brightness and contrast adjustments applied to the whole image. Three-dimensional reconstitutions from confocal microscopy images were performed using Imaris 7.2 (Bitplane).

Morphometric analyses

Myofiber CSA was analyzed by using immunostaining of dystrophin, marking myofiber sarcolemma, and then using Metamorph. Between 1000 and 1500 myofibers were analyzed per non-electroporated or AAV-injected muscle. For electroporated tibialis anterior muscle, 40–200 myofibers (positive for HA-Mrtf-A-XXX, Flag-R62D^{NLS}-actin or Mrtf-A–GFP) were analyzed.

Quantification of Mrtf-A–GFP subcellular distribution was performed on Mrtf-A–GFP-positive and H2B–mCherry-positive myonuclei (30–250 myonuclei/muscle). For endogenous Mrtf-A, 40–120 myonuclei/muscle were analyzed.

Western blotting analysis

Western blotting was performed as described previously (Lahoute et al., 2008). Immunoblots were hybridized with anti-Srf antibody and normalized by using Ponceau staining. Protein bands were quantified by using Bio-Rad Quantity One (version 4.6.6).

Statistical analysis

Statistics were performed by using SigmaPlot 12.5 (Systat). When two groups were compared, the significance of differences between the means was assessed with a Student's t-test after normality and equal variance tests were passed. For multiple comparison, a two-way ANOVA test was used after normality and equal variance tests were passed and was followed by using a Bonferroni t-test for pairwise multiple comparison. P-values of ,0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements

We thank Richard Treisman (Cancer Research UK, London, UK) and Guido Posern (Institute for Physiological Chemistry, Halle, Germany) for providing materials. We are grateful to Pascal Maire (Cochin Institute, Paris, France), Luisa Dandolo (Cochin Institute, Paris, France), Anne Lombès (Cochin Institute, Paris, France) and Dominique Daegelen (Cochin Institute, Paris, France) for critical reading of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author contributions

L.C. designed and carried out experiments, analyzed results and wrote the manuscript. G.H. and A.P. conducted experiments and analyzed results. V.R-H. and A.G. provided expertise in physiological analysis. A.S. designed and carried out experiments, analyzed results, wrote the manuscript and provided financial support.
This work was supported by The French Muscular Dystrophy Association (AFM); Agence Nationale de la Recherche (ANR) [grant JC08-327703; 13-BSV1-0005- 01]; and Labex WhoAmI.

Supplementary material

Supplementary material available online at
http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.155911/-/DC1

References

Bonaldo, P. and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle
atrophy. Dis. Model. Mech. 6, 25-39. Charbonney, E., Speight, P., Masszi, A., Nakano, H. and Kapus, A. (2011). b-
catenin and Smad3 regulate the activity and stability of myocardin-related transcription factor during epithelial-myofibroblast transition. Mol. Biol. Cell 22, 4472-4485.
Geneste, O., Copeland, J. W. and Treisman, R. (2002). LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. J. Cell Biol. 157, 831-838.
Giger, J. M., Bodell, P. W., Zeng, M., Baldwin, K. M. and Haddad, F. (2009). Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. J. Appl. Physiol. 107, 1204-1212.

Grosse, R. and Vartiainen, M. K. (2013). To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14, 693-697. Guerci, A., Lahoute, C., He´brard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Pre´ cigout, G., Garcia, L. et al. (2012). Srf- dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-
mediated skeletal muscle hypertrophy. Cell Metab. 15, 25-37. Guettler, S., Vartiainen, M. K., Miralles, F., Larijani, B. and Treisman, R. (2008). RPEL motifs link the serum response factor cofactor MAL but not myocardin to
Rho signaling via actin binding. Mol. Cell. Biol. 28, 732-742. Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D. and Daegelen, D. (2008). Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. PLoS ONE
3, e3910. Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E.,
Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B. et al. (2005). The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. Science 308, 1599-1603.
Lundquist, M. R., Storaska, A. J., Liu, T. C., Larsen, S. D., Evans, T., Neubig, R. R. and Jaffrey, S. R. (2014). Redox modification of nuclear actin by MICAL-2 regulates SRF signaling. Cell 156, 563-576.
Minami, T., Kuwahara, K., Nakagawa, Y., Takaoka, M., Kinoshita, H., Nakao, K., Kuwabara, Y., Yamada, Y., Yamada, C., Shibata, J. et al. (2012). Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodelling in mice. EMBO J. 31, 4428-4440.
Ochala, J., Gustafson, A. M., Diez, M. L., Renaud, G., Li, M., Aare, S., Qaisar, R., Banduseela, V. C., Hedstro¨m, Y., Tang, X. et al. (2011). Preferential skeletal muscle myosin loss in response to mechanical silencing in a novel rat intensive care unit model: underlying mechanisms. J. Physiol. 589, 2007-2026.
Olson, E. N. and Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 353- 365.
Pawłowski, R., Rajakyla¨, E. K., Vartiainen, M. K. and Treisman, R. (2010). An actin-regulated importin a/b-dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. EMBO J. 29, 3448-3458.
Pipes, G. C., Creemers, E. E. and Olson, E. N. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. Genes Dev. 20, 1545-1556.
Polge, C., Heng, A. E., Jarzaguet, M., Ventadour, S., Claustre, A., Combaret, L., Be´chet, D., Matondo, M., Uttenweiler-Joseph, S., Monsarrat, B. et al. (2011). Muscle actin is polyubiquitinylated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. FASEB J. 25, 3790- 3802.
Posern, G. and Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. Trends Cell Biol. 16, 588-596. Posern, G., Sotiropoulos, A. and Treisman, R. (2002). Mutant actins
demonstrate a role for unpolymerized actin in control of transcription by serum
response factor. Mol. Biol. Cell 13, 4167-4178. Stern, S., Debre, E., Stritt, C., Berger, J., Posern, G. and Kno¨ll, B. (2009). A
nuclear actin function regulates neuronal motility by serum response factor-
dependent gene transcription. J. Neurosci. 29, 4512-4518. Vartiainen, M. K., Guettler, S., Larijani, B. and Treisman, R. (2007). Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor
MAL. Science 316, 1749-1752. Wang, D., Prakash, J., Nguyen, P., Davis-Dusenbery, B. N., Hill, N. S., Layne,
M. D., Hata, A. and Lagna, G. (2012). Bone morphogenetic protein signaling in vascular disease: anti-inflammatory action through myocardin-related transcription factor A. J. Biol. Chem. 287, 28067-28077.

FIGURES

Figure 1

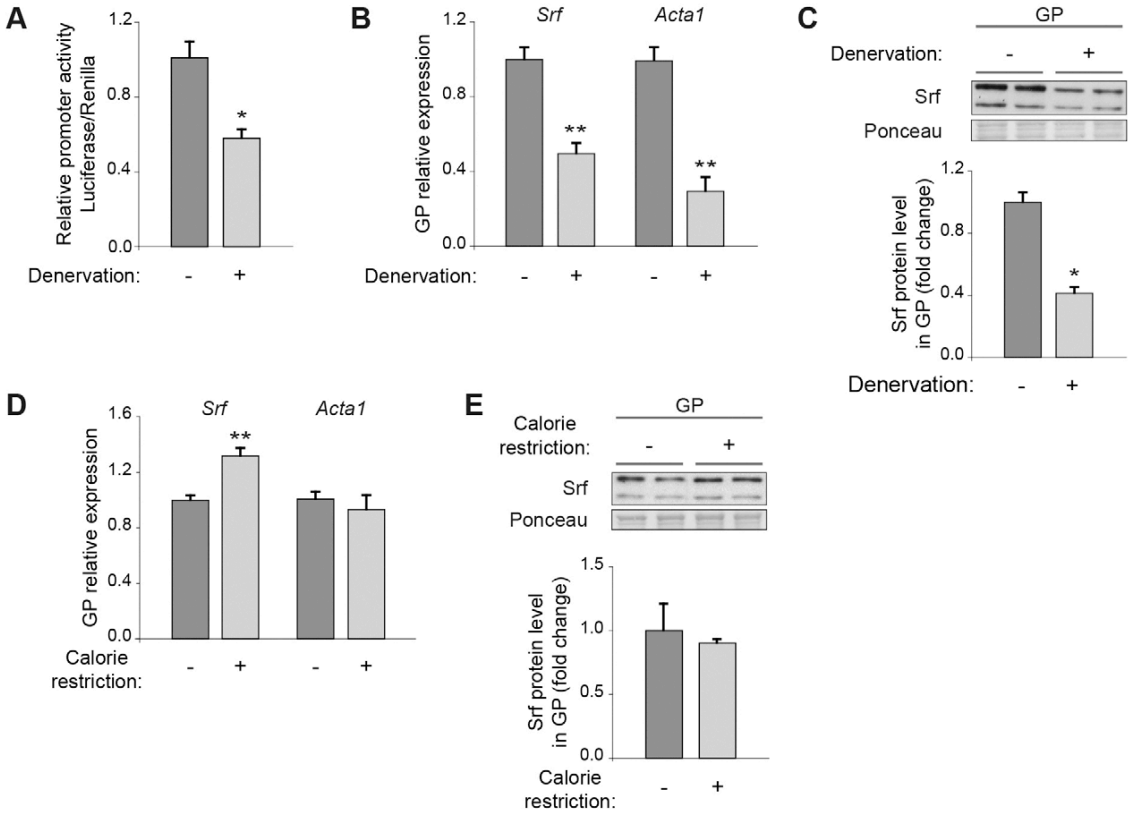


Fig. 1. Srf activity decreases upon disuse atrophy. (A) Responsiveness of an Srf reporter construct in tibialis anterior muscle from the contralateral leg or that of the denervated leg 7 days post denervation of control mice (n53). (B) Normalized expression of Srf and Acta1 in gastrocnemius and plantaris muscles from the contralateral leg or at 7 days post denervation (n54). (C) Representative western blot analysis for Srf with Ponceau staining. Normalized fold change in Srf protein level in gastrocnemius and plantaris muscles (GP) 7 days post denervation (n54). (D) Normalized expression of Srf and Acta1 in the gastrocnemius and plantaris muscles of mice submitted to 7 days of calorie restriction or ad libitum feeding (n54). (E) Representative western blot analyses for Srf with Ponceau staining. Normalized fold change in Srf protein level in gastrocnemius and plantaris muscles (GP) after 7 days of calorie restriction (n53). Quantitative data are means6s.e.m. *P,0.05, **P,0.001.

Figure S1

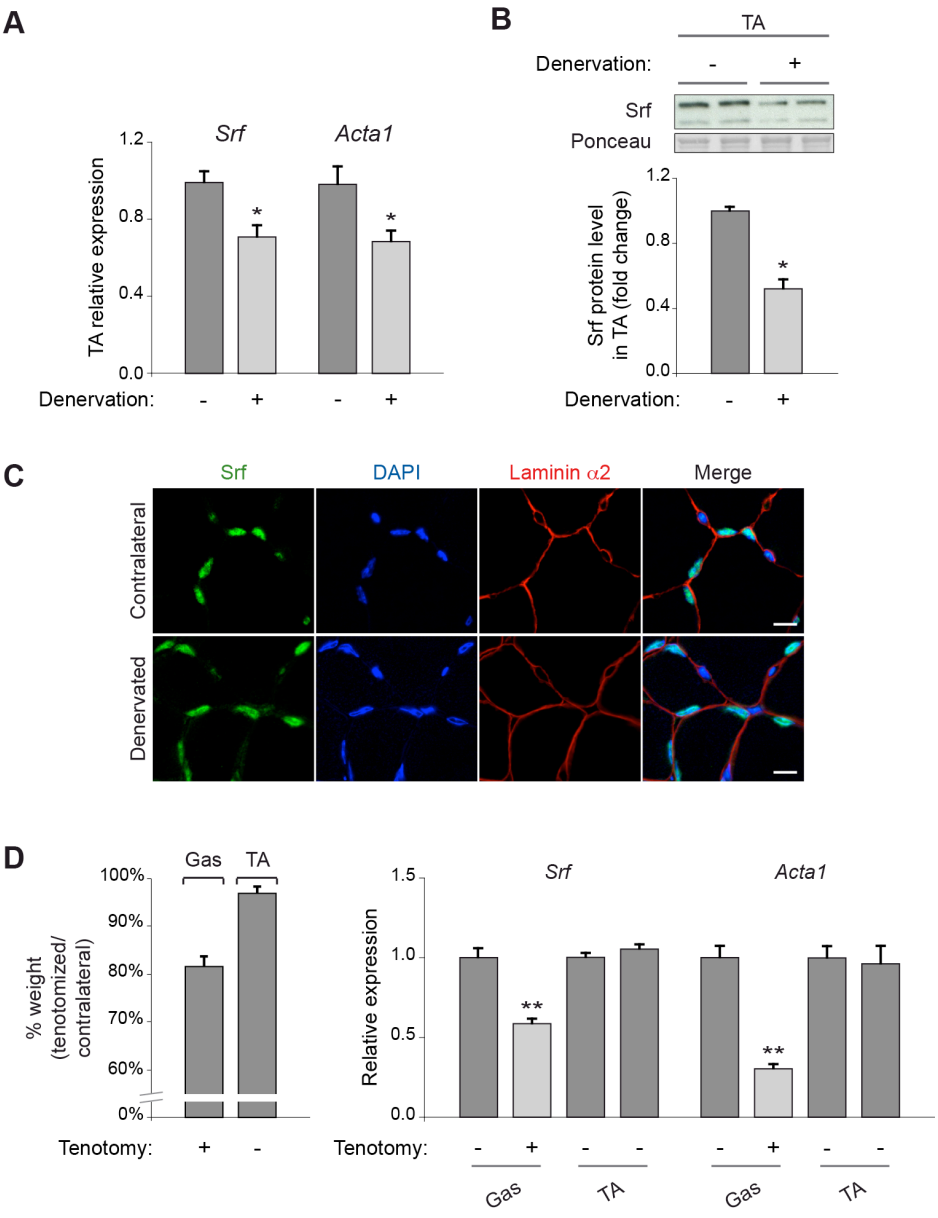


Figure S1

(A) Expression of *Srf* and *Acta1* in contralateral and 7D post-denervation TA (*n*=4). Data are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction. (B) Representative WB for Srf and Ponceau and fold change in Srf protein level in TA, 7D post-denervation (*n*=4). Quantification data are normalized by Ponceau and presented as fold-induction relative to contralateral muscles. (C) Srf (green) and Laminin alpha2 (red) immunostaining of contralateral and 7D post-denervation TA of control mice (Scale, 15 µm). (D) Ratio of 7D post- tenotomy muscle weight to contralateral muscle weight for Gas and non-tenotomized TA of control mice (*n*=5), and expression of *Srf* and *Acta1* in 7D post-tenotomy Gas and non-tenotomized TA (*n*=5). Tenotomy was performed by cutting the tendons of Gas and *Soleus* muscles of the left leg. TA from the same leg and Gas and TA from the intact leg were used as internal controls. Data are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to contralateral muscles. Quantitative data are means±SEM. *, p<0.05; **, p<0.001

Figure 2

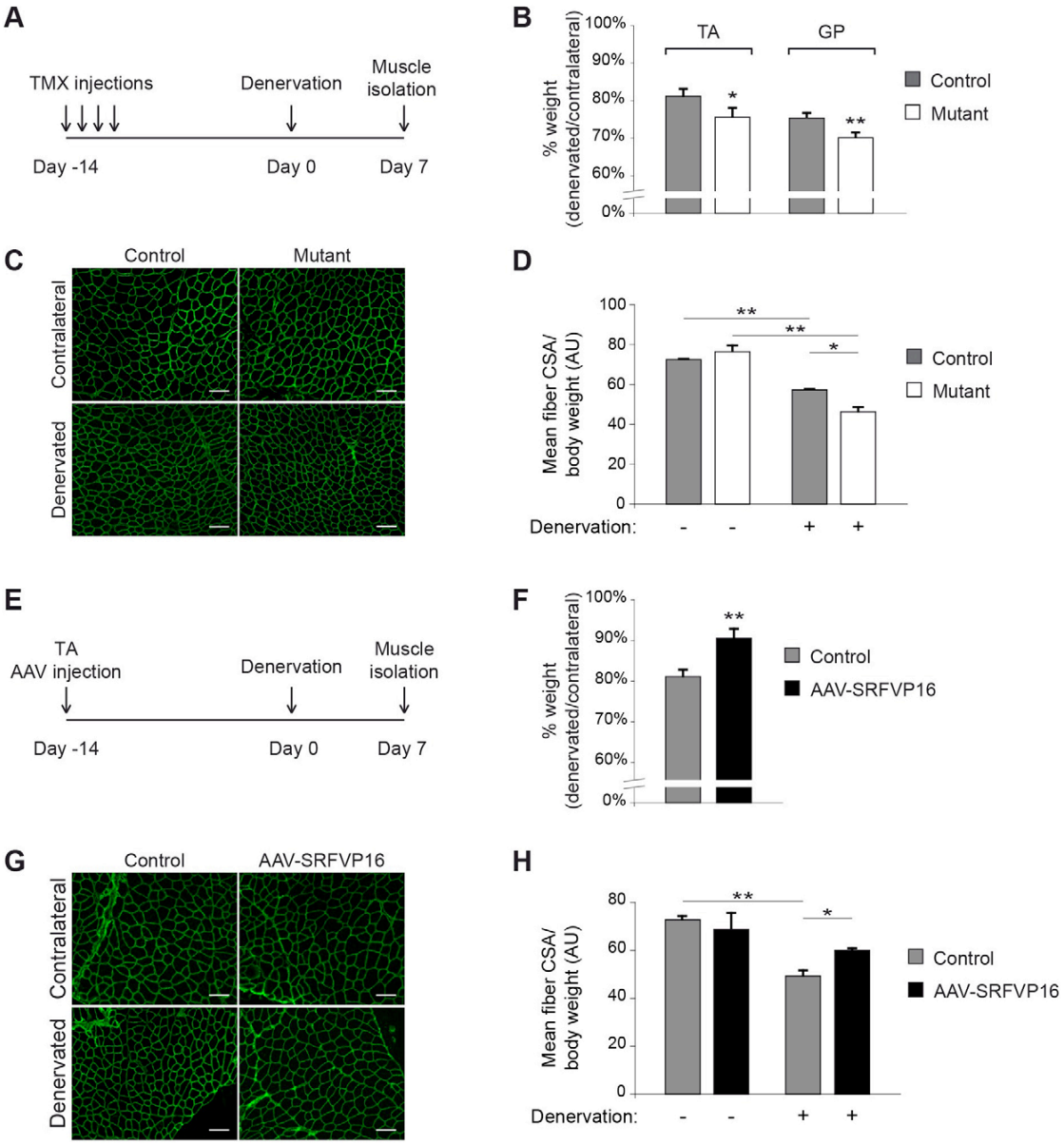


Fig. 2. The level of Srf activity regulates denervation-induced atrophy. (A) Control and Srf-mutant mice were injected with tamoxifen (TMX) 14 days before denervation. Muscles were isolated 7 days post denervation. (B) Ratio of the weight of the tibialis anterior (TA), and gastrocnemius and plantaris (GP) muscles 7 days post denervation to those of the contralateral leg of control and mutant mice (n510). (C) Immunostaining of dystrophin in the contralateral and denervated leg tibialis anterior muscle of control and mutant mice 7 days post denervation. (D) Myofiber CSA to body weight ratio for tibialis anterior muscle in the denervated and contralateral legs in control and mutant mice 7 days post denervation (n54). AU, arbitrary units. (E) Tibialis anterior muscles (TA) from control mice were injected (or not) with AAV-SRFVP16 14 days before denervation. Muscles were isolated 7 days post denervation. (F) Ratio of the weight of the tibialis anterior muscle 7 days post denervation to that of the contralateral leg of mice that had been injected (or not) with AAV-SRFVP16 (n56).

(G) Immunostaining of dystrophin in tibialis anterior muscle from the contralateral or denervated leg at 7 days post denervation that had been injected (or not) with AAV-SRFVP16. (H) Myofiber CSA to body weight ratio in tibialis anterior muscle from the contralateral or denervated leg at 7 days post denervation, which had been injected (or not) with AAV-SRFVP16 (n54). Quantitative data are means6s.e.m. *P,0.05, **P,0.001. Scale bars: 100 mm.

Figure S2

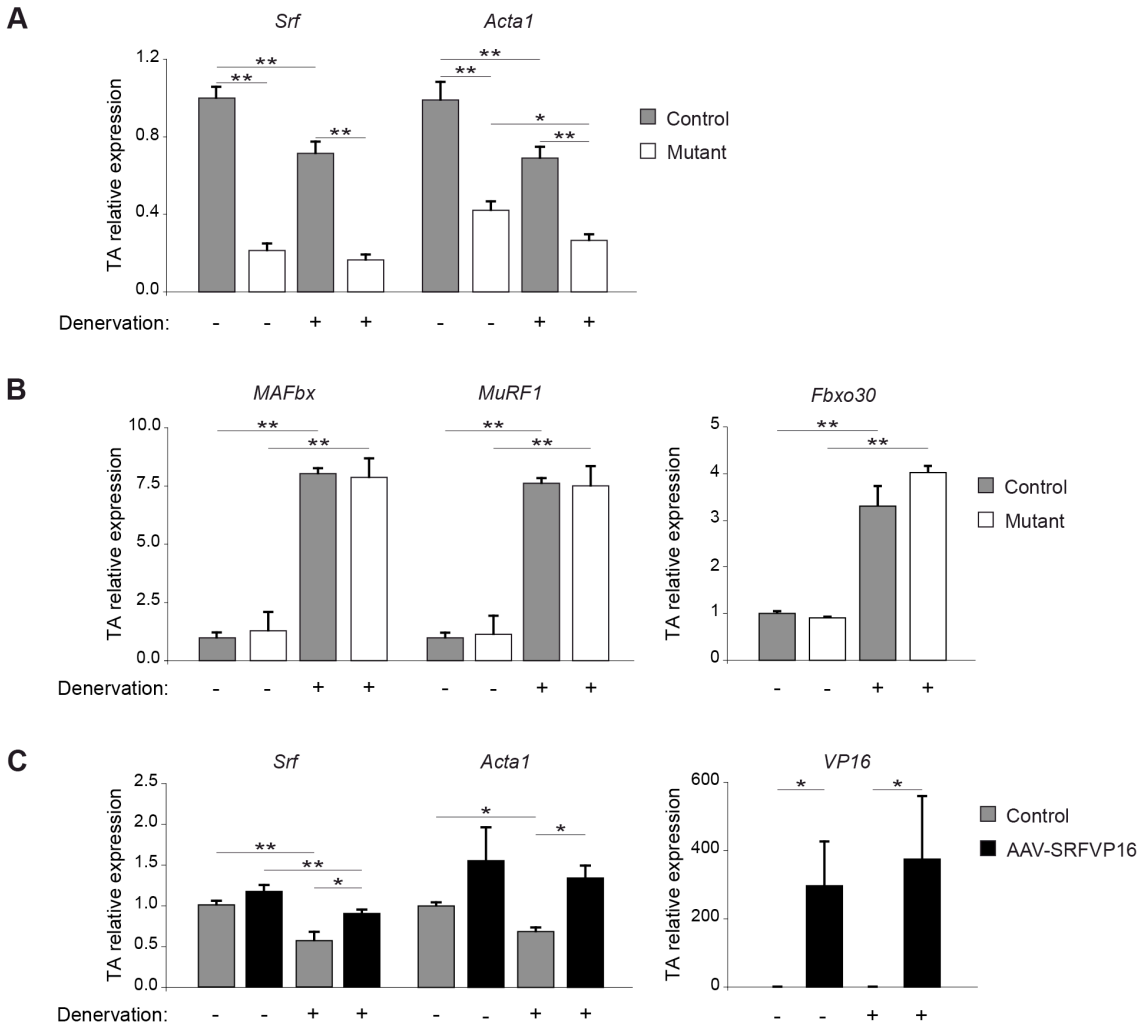


Figure S2

(A) Expression of *Srf* and *Acta1* in contralateral and 7D post-denervation TA of control and mutant mice (*n*=4-5). Data are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to contralateral TA from control mice. (B) Expression of *MAFbx*, *MuRF1* and *Fbxo30* in contralateral and 7D post-denervation TA of control and mutant mice (*n*=4-5). Data are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to contralateral muscles from control mice. The primers used are *Fbxo30*-F: 5'-TCGTGGAATGGTAATCTTGC-3'; *Fbxo30*-R: 5'- CCTCCCGTTTCTCTATCACG-3', *MAFbx*-F: 5'-TGTGGGTGTATCGGATGGAGA-3'; *MAFbx*- R: 5'-CTGCATGATGTTCAGTTGTAAGC-3', *MuRF1*-F: 5'-GAATAGCATCCAGATCAGCAG- 3'; *MuRF1*-R: 5'-GAGAATGTGGCAGTGTTTGCA-3'. (C) Expression of endogenous *Srf*, *Acta1* and *VP16* in contralateral and 7D post-denervation TA, injected or not with AAV-SRFVP16 (*n*=4). Data are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to non-injected contralateral TA. The primers used are *VP16*-F: 5'-TCGATCTGGACATGTTGGGGG-3'; *VP16*-R: 5'-GGTAAACATCTGCTCAAACTC-3'. Quantitative data are means±SEM. *, p<0.05; **, p<0.001

Figure 3

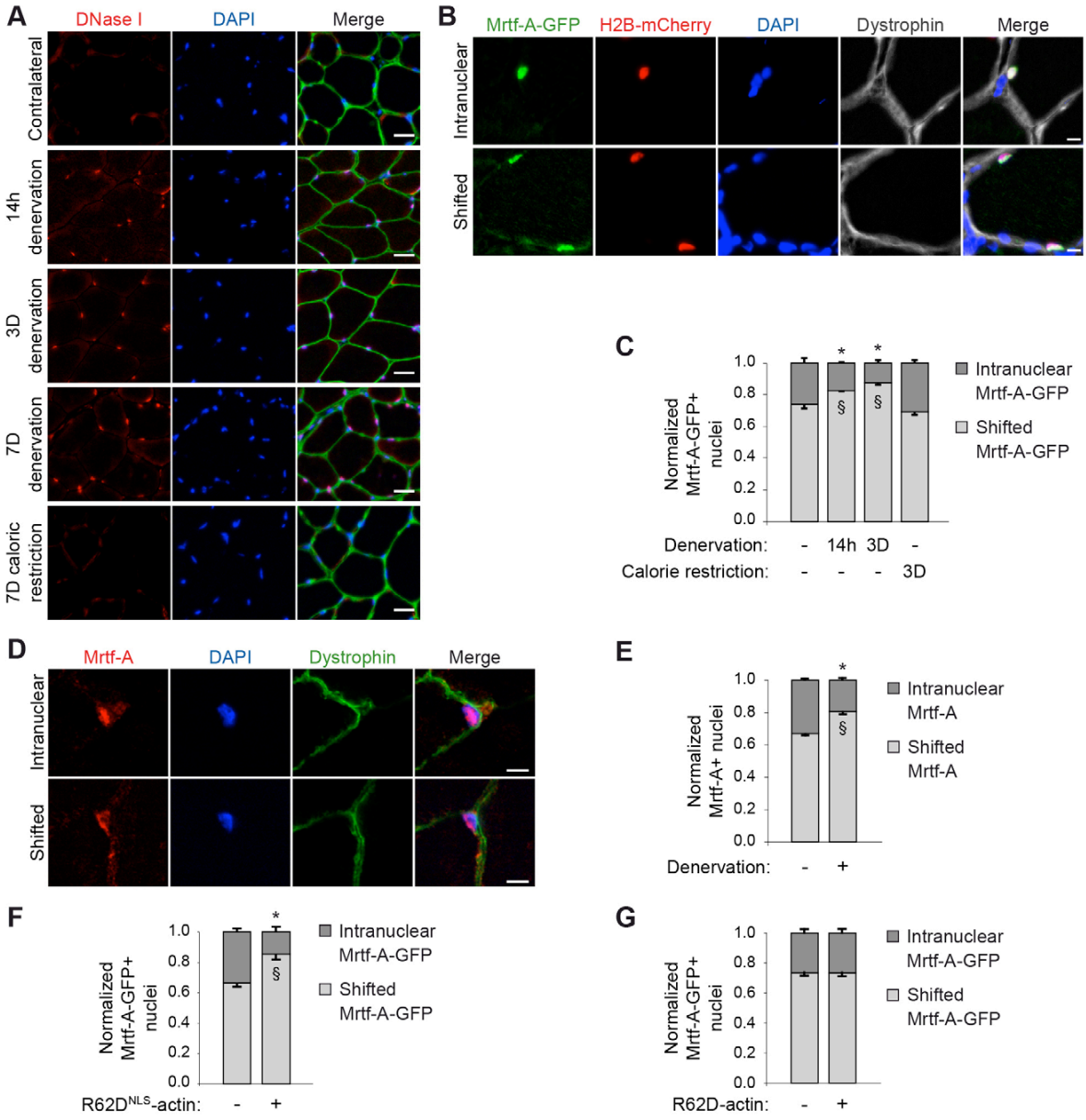


Fig. 3. Disuse leads to nuclear G-actin accumulation and subsequent exclusion of Mrtfs from myonuclei. (A) G-actin (DNase I), dystrophin (green) and DAPI staining in the tibialis anterior muscle of the contralateral leg, or that 14 h, 3 days (3D) or 7 days (7D) post denervation, or after 7 days of calorie restriction. (B) Intranuclear or shifted localization of overexpressed Mrtf-A–GFP in tibialis anterior muscle upon immunostaining of GFP. Nuclei are visualized through expression of H2B–mCherry and DAPI staining, and sarcolemma is identified through staining of dystrophin (gray). (C) Proportion of nuclei displaying intranuclear or shifted Mrtf-A–GFP localization in the tibialis anterior muscle of the contralateral leg, or at 14 h or 3 days (3D) post denervation, or after 3 days calorie restriction (n53–4). (D) Intranuclear or shifted localization of endogenous Mrtf-A (red), dystrophin (green) and DAPI in tibialis anterior muscle.

(E) Proportion of nuclei displaying intranuclear or shifted endogenous Mrtf-A localization in the contralateral or 3 days post denervation tibialis anterior muscle (n54). (F) Proportion of nuclei displaying intranuclear or shifted Mrtf-A–GFP localization in tibialis anterior muscle that had been electroporated (or not) with $R62D^{NLS}$-actin (n53). (G) Proportion of nuclei displaying intranuclear or shifted Mrtf-A–GFP localization in tibialis anterior muscle that had been electroporated (or not) with R62D-actin (n53). Quantitative data are means6s.e.m. *P,0.05 vs intranuclear Mrtf-A–GFP (–), §P,0.05 vs shifted Mrtf-A–GFP (–). Scale bars: 50 mm (A); 5 mm (B,D).

Figure S3

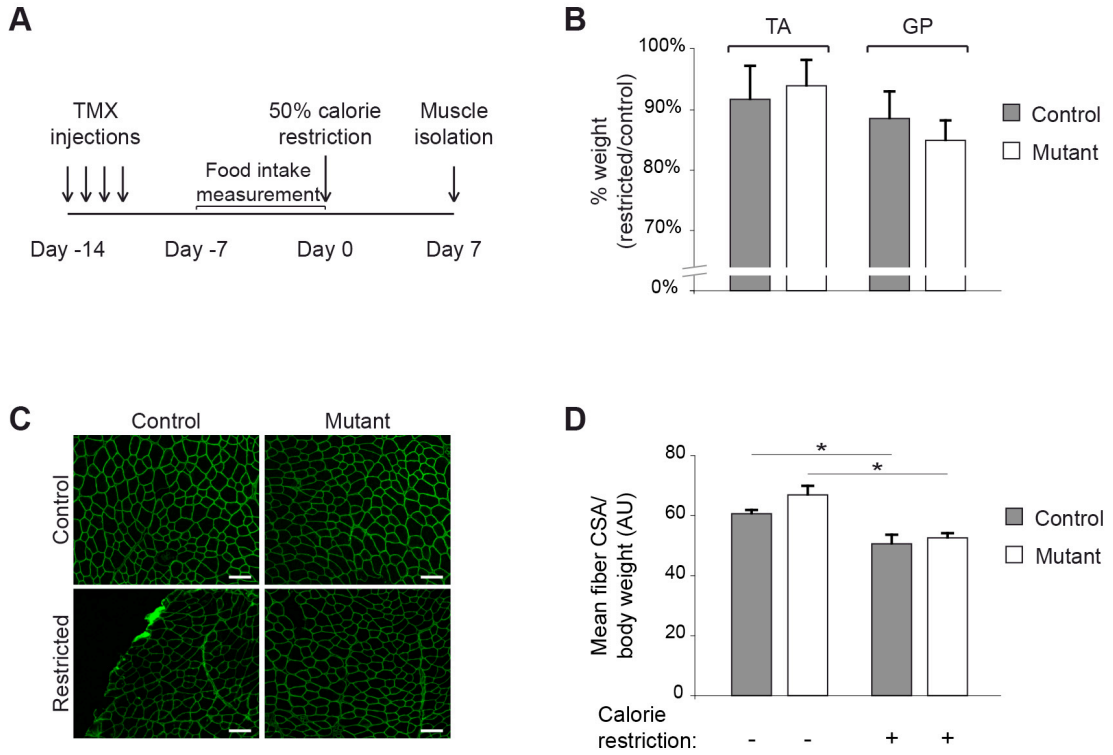


Figure S3

(A) Control and mutant mice were injected with tamoxifen 14D prior to calorie-restriction. Muscles were isolated after 7D of calorie-restriction. (B) Ratio of 7D restricted mice muscle weight to non- restricted mice muscle weight for TA and GP of control and mutant mice (*n*=6). (C) Dystrophin immunostaining of 7D restricted and non-restricted mice TA of control and mutant mice (Scale, 100 µm). (D) Mean CSA of 7D restricted and non-restricted mice TA fibers to body weight for control and mutant mice (*n*=3-4). Quantitative data are means±SEM. *, p<0.05

Figure 4

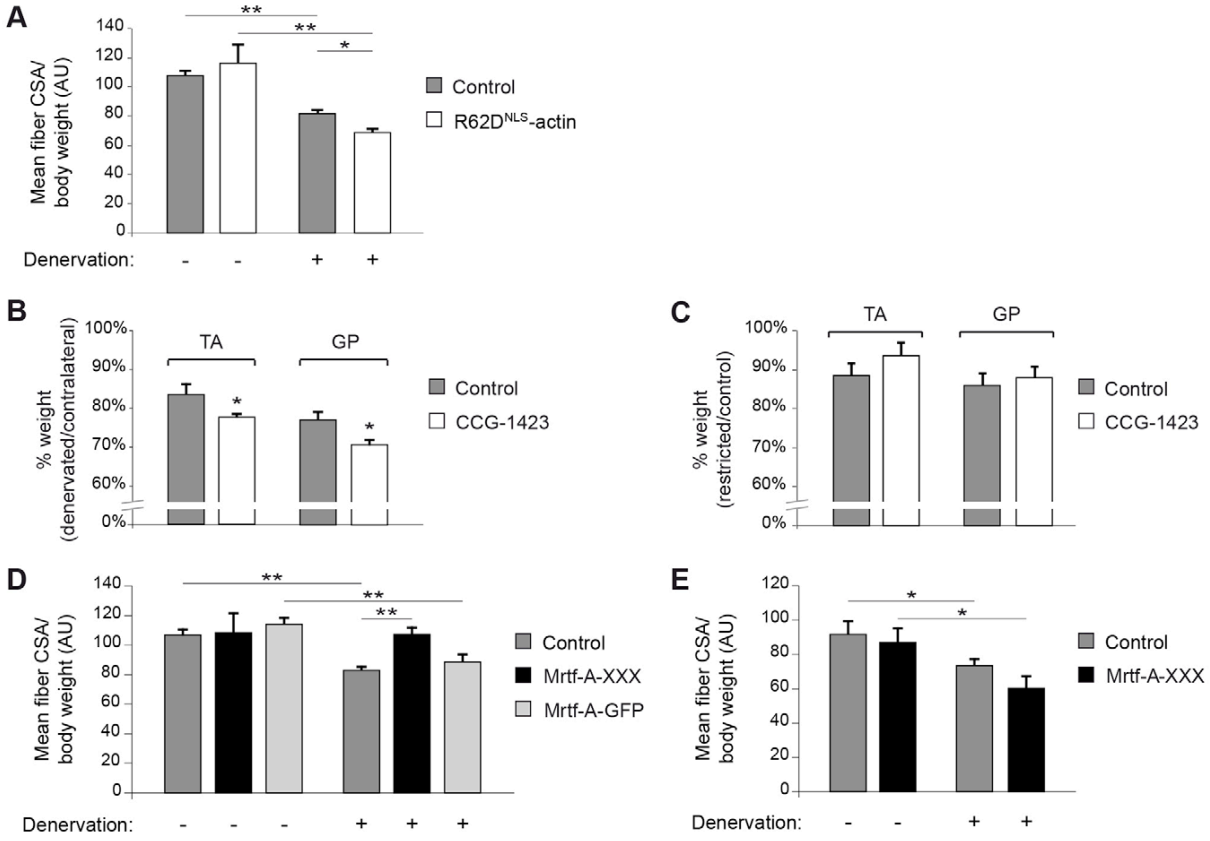


Fig. 4. The actin–Mrtfs–Srf pathway controls disuse atrophy. (A) Myofiber CSA to body weight ratio for tibialis anterior muscle from the contralateral leg or that 7 days post denervation, electroporated (or not) with R62D^{NLS}-actin (n53–17). (B) Ratio of the weight of the tibialis anterior (TA), and gastrocnemius and plantaris (GP) muscles 7 days post denervation to those of the contralateral leg of control mice that had been injected with CCG-1423 or vehicle, (n55). (C) Ratio of the weight of the tibialis anterior (TA), and gastrocnemius and plantaris (GP) muscles after 7 days of calorie restriction to those of control mice that had been injected with CCG-1423 or vehicle (n55). (D) Myofiber CSA to body weight ratio for tibialis anterior muscle 7 days post denervation or from the contralateral leg, electroporated (or not) with Mrtf-A-XXX or Mrtf-A–GFP (n54–17). (E) The ratio of the Srf-deleted myofiber CSA to body weight for tibialis anterior muscle 7 days post denervation or from the contralateral leg, electroporated (or not) with Mrtf-A-XXX (n53–4). Quantitative data are means6s.e.m. *P,0.05, **P,0.001. AU, arbitrary units.
to body weight for control and mutant mice (*n*=3-4). Quantitative data are means±SEM. *, p<0.05

Figure S4

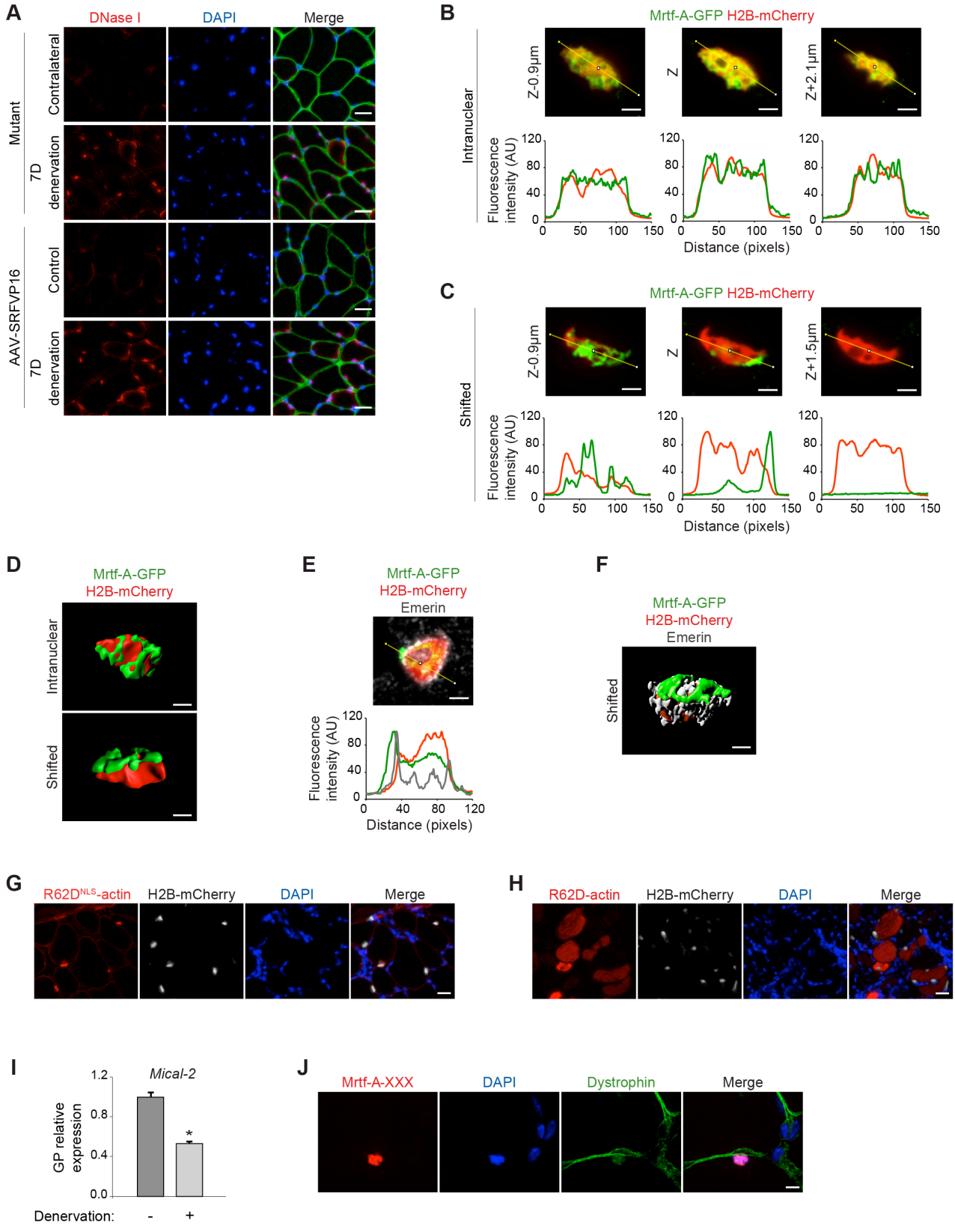


Figure S4

Figure S4

(A) G-actin (DNase I, Texas Red), dystrophin (green) and DAPI immunostaining on contralateral or 7D post-denervation TA of control or Srf knockout mice, or of control mice injected or not with AAV-SRFVP16 (Scale, 50 µm). (B) Intranuclear localization of overexpressed Mrtf-A-GFP in TA revealed by immunostaining for GFP and confocal imaging (x100). Nuclei are visualized by H2B- mCherry (Scale, 2 µm). Plot profiles corresponding to normalized fluorescence values (green for Mrtf-A-GFP and red for H2B-mCherry) along the yellow line are shown below each confocal image. (C) Shifted localization of overexpressed Mrtf-A-GFP in TA revealed by immunostaining for GFP and confocal imaging (x100). Nuclei are visualized by H2B-mCherry (Scale, 2 µm). Plot profiles corresponding to normalized fluorescence values (green for Mrtf-A-GFP and red for H2B- mCherry) along the yellow line are shown below each confocal image. (D) Three-dimensional reconstitutions from confocal images of intranuclear and shifted Mrtf-A-GFP localizations (Scale, 2 µm). (E) GFP and Emerin (gray) immunostaining of TA electroporated with Mrtf-A-GFP revealed by confocal imaging. Nucleus is visualized by H2B-mCherry (Scale, 2 µm). Plot profiles corresponding to normalized fluorescence values (green for Mrtf-A-GFP, red for H2B-mCherry and gray for Emerin) along the yellow line are shown below the confocal image. (F) Three-dimensional reconstitution from confocal images of shifted Mrtf-A-GFP together with Emerin (Scale, 2 µm). (G) Flag immunostaining of TA electroporated with Flag-tagged actin-R62D^{NLS}. Nuclei are visualized with H2B-mCherry and DAPI (Scale, 20 µm). (H) HA immunostaining of TA electroporated with HA-tagged actin-R62D. Nuclei are visualized with H2B-mCherry and DAPI (Scale, 20 µm). (I) Expression of *Mical-2* in contralateral and 7D post-denervation TA of control mice (*n*=4). Data are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to contralateral muscles from control mice. The primers used are *Mical-2*-F: 5'-GGCTCCCACAAGGAGTACAA-3'; *Mical-2*-R: 5'-ATGGAGCCAGCACAGAATTT-3'. (J) HA and dystrophin immunostaining of 7D post-denervation TA electroporated with HA-tagged Mrtf-A-XXX showing the 100% intranuclear localization of Mrtf-A-XXX (Scale, 5 µm). Quantitative data are means±SEM. *, $p<0.05$

Annexe 2

Srf controls satellite cell fusion during skeletal muscle hypertrophy through the maintenance of actin architecture

Aikaterini Papaefthymiou[1,2,3], Voahangy Randrianarison-Huetz[1,2,3], Gaëlle Herledan[1,2,3], Ulduz Faradova[1,2,3], Laura Collard[1,2,3], Chiara Noviello[1,2,3], Alessandra Pincini[1,2,3], Emilie Schol[1,2,3], Jean François Decaux[1,2,3], Pascal Maire[1,2,3], Athanassia Sotiropoulos[1,2,3*]

1. Inserm U1016, Institut Cochin, F-75014 Paris, France
2. CNRS UMR8104, F-75014 Paris, France
3. Université Paris Descartes, F-75006 Paris, France
* Corresponding author: Athanassia Sotiropoulos
24 rue du Faubourg Saint-Jacques, F-75014 Paris, France
Telephone number +33 1 44 41 24 32
Fax number +33 1 44 41 24 21
Email address athanassia.sotiropoulos@inserm.fr

ABSTRACT

Satellite cells (SCs) are muscle adult stem cells which are mobilized when muscle homeostasis is perturbed such as hypertrophy and muscle rergeneration. We investigated the role played by the transcription factor Srf in the control of SCs behaviours in vivo using a mouse model of conditional deletion of Srf in SCs. Deletion of Srf in SCs compromized hypertrophy in plantaris myofibers. Unexpectedly the loss of Srf in SCs is neither accompanied with altered MyoD expression, nor altered proliferation or differentiation but with a fusion defect. We show that SC-specific Srf deletion leads to downregulation of alpha- skeletal actin target gene and an impairment of actin cytoskeleton. By restoring the network of polymerized actin with the overexpression of an alpha-actin isoform in the SCs, fusion event is rescued showing thus the importance of the actin cytoskeleton maintenance in heterotypic myogenic fusion in vivo between a control myotube and a mutant myoblast. However the homotypic fusion between mutant myoblasts was not affected by actin architecture restoration suggesting the implication of additional Srf targets. We provide new genetic evidence that SC fusion to growing myofiber is required for an efficient hypertrophic myofiber growth and that myoblast fusion is the limiting step for the hypertrophic growth.

INTRODUCTION

Skeletal muscle is the most abundant tissue and the most flexible structure in the vertebrate body. Mature adult myofibers can adapt their size/muscle mass to physiological demands such as exercise or working overload [197]. Skeletal muscle is composed of the postmitotic myofibers and the resident muscle stem cells termed as satellite cells (SCs) situated adjacent to the myofiber and they are responsible for postnatal myofiber growth and repair following injury. During neonatal and juvenile development, satellite cell fusion to growing myofiber results in the increase of myofiber size as their number remains constant. In adult skeletal muscle, under normal conditions, satellite cells are quiescent and satellite cells fusion occurs sporadically to compensate for the muscle turnover caused by daily wear and tear. However, upon injury or mechanical load stimuli satellite cells undergo adult myogenesis [198].

In response to activation cues, SCs exit the quiescent state. Afterwards they proliferate and subsequently they differentiate and fuse either between them to form multinucleated myofibers or

to preexisting myofibers. The myogenic potential of satellite cells is tightly regulated by specific Paired-box and bHLH transcription factors [199]. Quiescent satellite cells are identified by the expression of Pax7 [109], a paired-homeobox transcription factor (TF). Once activated, they upregulate MyoD and Myf5 determination bHLH TFs and their engagement into the myogenic differentiation is marked by the expression of myogenin (MyoG) differentiation factor while their maturation and growth is regulated by the MRF4 TF expression [200]. In parallel with the myogenic progression a reserve population of Pax7-expressing satellite cells down-regulates MyoD and undergoes self-renewal division in order to replenish the satellite cell pool [201]. As it is widely assumed the requirement of satellite cells in muscle regeneration [202], [203], it is debated if the SCs mediate in the hypertrophic growth in resistance exercise, with the SC nuclear accretion to endow the myofiber with new nuclei [67], [68]. Even if many intrinsic and extrinsic factors governing satellite cell functions have been discovered, SC adaptations during regeneration and overload-induced hypertrophy are also coordinated by additional players and pathways not yet well explored.

The serum response factor (Srf) is a member of the MADS box family of transcription factors, binds the core sequence of CArG boxes in the promoter regions of its target genes [130] and it is a crucial factor for muscle-specific gene expression such as a-actin and myosin sarcomeric proteins [204], [205]. The Srf binding sites, the CArG box, were found in many muscle specific target genes such as MyoD [206] and sarcomeric proteins and in genes implicated in cell migration and adhesion [204]. Srf is expressed in adult skeletal myofibers and regulates the muscle mass adaptations to atrophic and hypertrophic conditions [79], [207]. However, Srf was identified as the TF which mediates the transcriptional activity in response to serum and mitogenic factors [128]. Previous in vitro studies in C2C12 muscle cell line have shown that Srf activity is required for myoblast proliferation and differentiation as in the absence of Srf, the fusion is blocked and subsequently the transition of myoblasts to myotubes is prevented [152], [135]. Moreover Srf knockdown and dominant negative constructs prevent the expression of the muscle-determining factor MyoD [134], however in vivo data are lacking in the description of Srf role in muscle stem cells.

The Srf activity is regulated by the ternary complex factor (TCF) family of Ets domain proteins activated by mitogen activated protein (MAP) kinase phosphorylation and a family of signal-regulated SRF cofactors, the myocardin-related transcription factors (MRTFs) controlled by Rho-family GTPases and monomeric actin signalling pathway [137]. Actin is also a component of muscle sarcomere and a known Srf target gene [155], [208]. A pair of actin genes is expressed in the striated muscles (skeletal muscle and heart) of vertebrates and shares high homology in the amino-acid sequence. One of these genes (a-skeletal) encodes the major actin species in adult skeletal muscle actin, and the other gene (a-cardiac) encodes the major actin species in the adult heart [209]. The cardiac actin gene has also been shown to be expressed at high levels in embryonic and fetal skeletal muscle. In adult skeletal muscle, however, there is only a low level of cardiac actin mRNA, showing that the cardiac actin gene is subject to developmental regulation [210]. Actin is implicated in many cell functions such as migration and fusion.

The fusion process is characterized by the alignment of myoblast and myotube membranes and rearrangements of actin cytoskeleton at contact sites followed by membrane fusion, which occurs in two stages. Initially, primary fusion between myoblast-myoblast results in the formation of nascent myotubes. In the secondary fusion, myoblasts fuse with nascent myotubes, which results in nuclear accretion and myotubes growth. In drosophila organisms, actin fusion focus [211] and actin-based filopodia [212] are the molecular structures mediating the myoblast fusion. In mammalian myoblasts Cdc42 and Rac1 are major activators of vinculin, F-actin, Vasp, and the Arp2/3 complex for the cytoskeletal remodeling that occurs before myoblast fusion [213].

In the present study we were interested in addressing the role of Srf in adult muscle stem cells (satellite cells) in the course of compensatory hypertrophy (CH) in plantaris muscle. We used a

mouse model of conditional and inducible deletion of Srf in the satellite cells leaving the myofiber intact. We show here that plantaris myofibers harboring Srf-depleted SCs do not display an optimal hypertrophic response when subjected to an experimental overload. SCs lacking Srf are able to proliferate and differentiate however they are not able to fuse with the preexisting myofiber indicating the requirement of satellite cell-mediated fusion to an efficient muscle hypertrophic growth. Transcriptomic analysis revealed the actin cytoskeleton and signalling implication in the Srf-control in myoblast fusion. Overexpression of an isoform of alpha-skeletal actin in Srf-mutant SCs rescue the actin pool of polymerized F-actin and partially restores the fusion event with the nascent myofibers showing thus the importance of the actin cytoskeleton maintenance in myogenic cell functions as myoblast fusion in vivo.

MATERIALS AND METHODS

Mouse protocols

Mice homozygous for Srf floxed alleles [158] (abbreviated to *Srf*$^{flox/flox}$), *Pax7*$^{CreERT2/+}$ mice [159] and *Pax7-nGFP* transgenic mice [160] have been described elsewhere.

To investigate the effect of satellite cell-specific *Srf*-deletion in adult muscle, the mouse strain following mice were generated: *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP.* In all experiments, 2-month-old *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* mice were given five intraperitoneal (IP) tamoxifen (TMX, 1 mg/day; MP Biomedicals) injections to induce Srf deletion and were referred as mutant mice (Mut). Both *Pax7*$^{+/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* mice injected with tamoxifen and non-injected *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* mice were initially used as control mice. However as all muscle phenotypes investigated were identical between these two controls, un-injected *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* mice were used as control mice (Ctl) in the presented experiments.

To assay if the overexpression of alpha-actin could rescue some of the outcomes of the *Srf*-loss, we used a transgenic mouse model (*CMV-flx-CAT-flx-Actc1)* allowing the inducible and conditional overexpression of exogenous rat *alpha-cardiac actin* (*Actc1*) when breeded with a Cre driver mouse line. The transgenic construction is composed of β-actin promoter and cytomegalovirus (CMV) enhancer ensuring the transgene expression. The cDNA of the rat alpha-cardiac actin (Acta1) is downstream the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene flanked by loxP sites. Poly-adenylation sites present downstream of the CAT gene preclude the expression of alpha-cardiac actin. *CMV-flx-CAT-flx-Actc1* mice were breeded with the *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP* mice in order to obtain *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP:CMV-flx-CAT-flx-Actc1* mice in which TMX injections permits both *Srf*-loss, the deletion of the CAT cassette and the concomitant over-expression of *Actc1* in satellite cells. TMX-injected *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$*:Pax7-nGFP:CMV-flx-CAT-flx-Actc1* were referred as double mutant mice (Mut/Act+).

Mice were genotyped by PCR using the following primers: GFP-R, 5'-GACGTTGTGGCTGTTGTAGTTG-3'; GFP-F, 5'-CGACGTAAACGGCCACAAGTTC-3'; CRE-R, 5'-CAGGGTGTTATAAGCAATCCC-3'; CRE-F, 5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3'; ACTtg-R, 5'-GCCGGATAAAACTTGTGCTT-3'; ACTtg-F, 5'-CGAGGGACCTAATAACTTCG-3'; SRFlox-R, 5'-CTGTAAGGGATGGAAGCAGA-3' ; SRFlox-F, 5'-TTCGGAACTGCCGGGCACTAAA-3'.
Compensatory hypertrophy (CH) of *plantaris* muscles of control, mutant and double mutant mice was induced in control, Srf mutant through the incapacitation of *soleus* and *gastrocnemius* muscles by sectioning their tendon. This procedure was achieved in both legs. During the process of CH, mice were injected with TMX at day 2 and 4 post CH. At the indicated time (1, 3 and 5 weeks post CH), *plantaris* muscles were dissected and subsequently processed for histological analyses.

Muscle tissue injury in control, mutant and double mutant mice was produced by a single intramuscular injection of 30 µl of Cardiotoxin (CTX) solution (6 µl; Latoxan) into *tibialis anterior* muscle. During the process of regeneration, mice were injected with TMX at day 2 and 4 post CTX. Mice were allowed to recover for 30 days and *tibialis anterior* muscles were harvested.

All animal experiments were conducted in accordance with the European guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the institutional ethic committee (number 00315.1).

Single-fiber culture

Individual fibers were isolated from *EDL* muscles of 2-month old control mice as described [214]. Myofibers and associated satellite cells were either fixed in 4% paraformaldehyde immediately after their isolation (quiescent satellite cells) or kept in culture for 24h in DMEM, 20% Fetal Calf Serum, 10% Horse Serum, 1% chicken embryo extract (activated satellite cells) before fixation in 4% PFA.

Primary muscle cell culture and infections

Primary cultures were derived from hindlimb muscles of control (Ctl), mutant (Mut) and double mutant (Mut/Act+) mice all harboring Pax7-nGFP transgene that allowed the prospective selection by flow cytometry (Fluorescence Activated Cell Sorting or FACS) of satellite cells.

Methods for muscle dissection, digestion and SC extraction were previously described [215]. Mononucleated muscle-derived cells were isolated from hind limb muscle of 6–8-wk-old mice. Muscles were mulched into a smooth pulp and digested in DMEM containing Collagenase D and Trypsine. Pax7/GFP positive satellite cells were isolated with BD FACSAria III cell sorter.
In standard conditions, myoblasts were grown in growth medium (DMEM/F12, 2% Ultroser G (PALL Life Sciences), 20% Fetal Calf Serum) on plastic dishes coated with 0,02% Gelatin. For differentiation, myoblasts were seeded in Matrigel-coated dishes and cultured in differentiation medium (DMEM/F12, 2% Horse Serum).

To induce in culture the excision of the floxed *Srf* allele, $Srf^{dx/lx}$ myoblasts were transduced twice with Ad-GFP or Ad-CreGFP (100 MOI). Two days after the first transduction, GFP-positive myoblasts were selected and collected by cell sorting with BD FACSAria III.

Proliferation assays

To detect S-phase entry, control and mutant satellite cells were plated immediately after sorting, cultured for 5 days in growth medium and pulsed with EdU (10 µM, Life Technology) for 2 h prior to fixation by 4% PFA and the subsequent EdU detection was performed using Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 kit, according to the manufacture's instructions (Life Technologies).
For cell cycle analysis, control and mutant myoblasts were collected, fixed in 70% cold ethanol, washed by PBS, and then resuspended in the staining buffer containing 50 µg/ml propodium iodide (PI) and 100 µg/ml RNase (Invitrogen). The cell cycle profiles were acquired using BD Accuri™ C6 cytometer (BD Biosciences) and processed with NovoExpress software (ACEA).

Cell migration assay

Migration of primary mouse muscle cells was quantified using time-lapse microscopy. Myoblasts were seeded in gelatin-coated in 8-wells Ibidi plates and maintained in rich medium. The next day, cells were filmed using a Zeiss inverted Axio Observer Z1 microscope with a LCI PlnN 10×/0.8 W DICII objective and an incubation chamber at 37 °C, 5% CO_2, 3% O_2. Live cells were monitored every 6 min for 6h with Bright field and Metamorph 7.7.5 software. Cell velocities were calculated in micrometers

per minute using ImageJ (NIH) software by tracking the paths of cells. At least 100 cells were tracked for each sample.

Cell mixing fusion assays

To analyze heterotypic fusion between myoblasts (MB), control (Ctl) or mutant (Mut) MB were loaded with 6 µM Green Cell Tracker (Molecular probes) for 30 min and were co-cultured with control (Ctl), mutant (Mut) or double mutant (Mut/Act+) MB loaded with 6 µM Orange Cell Tracker (Molecular probes) for 30 min in differentiation medium. For heterotypic fusion between control myotubes (MT Ctl) and myoblasts, control myotubes at day 2 of differentiation were loaded with Green Cell Tracker and then were co-cultured with control (Ctl), mutant (Mut) or double mutant (Mut/Act+) MB loaded with Orange Cell Tracker. Two days after cell mixing, fusion events were scored by counting the dual-labeled cells. The number of fusion events was normalized by the total number of nuclei for MB-MB fusion and the total number of cells for MT-MB fusion.

Microarray

Microarray analysis was performed on three independent Ad-GFP and Ad-CreGFP transductions. Total RNAs were obtained at the myoblast stage (D0), at the onset of differentiation (D1) and three days after the switching to differentiation medium (D3) using RNeasy Mini Kit (Qiagen) and treated by DNAse (Qiagen). RNA integrities were certified on bioanalyzer (Agilent). Hybridation to Mouse Gene 2_0-ST arrays (Affimetrix) and scans (GCS3000 7G expression Console software) were performed on the Genomi'c plateform (Institut Cochin, Paris). Probe data normalization and gene expression levels were processed using the Robust Multi-array Average (RMA) algorithm in expression Console software (Affimetrix). Gene ontology analysis was performed using Ingenuity (IPA) software.

RNA extraction and qRT-PCR

RNA extraction and quantitative real-time (qRT)-PCR analysis were performed as described previously (Guerci et al., 2012). Values were normalized using *Hydroxymethylbilane synthetase* (*Hbms*). The following primers were used : Acta1-F, 5'-CTGAGCGCAAGTACTCAGTGTGGA-3'; Acta1-R, 5'-TTCCAAAAACAGGCGCCGGCTGCA-3'; Srf-F, 5'-CACCTACCAGGTGTCGGAAT-3'; Srf-R, 5'-GCTGTGTGGATTGTGGAGGT-3'; MyoD-R, 5'- TTCCTGGGTCCAGCCTCAAC-3' ; MyoD-F, 5'-GCAGATGCACCACCAGAGTC-3'; Myogenin-R, 5'-ACGATGGACGTAAGGGAGTG-3'; Myogenin-F, 5'-GCAATGCACTGGAGTTCG-3'; Hmbs-F, 5'-TGCACGATCCTGAAACTCTG-3'; Hmbs-R, 5'-TGCATGCTATCTGAGCCATC-3'.

Western blotting analysis

Western blotting was performed as described previously [156]. Immunoblots were hybridized with antibodies against Srf (Santa Cruz) and Tubulin (Millipore).

Quantification of F/G-actin ratio

The ratio of filament tous (F-) to globular (G-) actin was determined using the G-actin/F-actin In Vivo Assay Kit (Cytoskeleton). Briefly, myoblasts were harvested and lysates were cleared by centrifugation at 500g for 5 min. Subsequently, supernatants were centifugated at 100,000 g for 1h at 37°C, which resulted in F-actin in the pellet and G-actin in the supernatant. The F-actin containing pellet was resuspended and solubilized in F-actin depolymerization buffer at a volume equal to the G-actin-containing supernatant volume. Equivalent volumes of supernatant and pellet were resolved by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis using an anti-pan-actin antibody (Cytoskeleton). The F/G-actin ratio was quantified by using FusionCapt Advance software (Vilber Lourmat).

Immunostaining

Plantaris and *tibialis anterior* muscles were collected and snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Eight µm-thick Muscle sections of were fixed in 4% paraformaldehyde for 8 min and immunostainings were performed as described [207]. The primary antibodies used were against dystrophin (Novocastra) dilution 1/50, Pax7 (Santa Cruz) dilution 1/50, Myogenin (Santa Cruz) dilution 1/100. Nuclei staining were performed using DAPI.

Muscle cells cultured in dishes were fixed for 8 min in 4% paraformaldehyde and then permeabilized and blocked in PBS with 0,1% Triton X-100, 5% Horse Serum for 1h at TA. Cells were the incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies against MyoD (Santa Cruz) dilution 1/100, Myogenin (Santa Cruz) dilution 1/100, MHC embryonic (MF20, Alexis biochemicals) 1/50 diluted in the same buffer. After incubation 1h at RT with fluorescent secondary antibody (Invitrogen), with DAPI to stain nuclei and/or with Phalloïdin Alexa 488 (Thermofisher) to stain F-actin, cells were mounted in Fluorescent Mounting Medium (Dako).

Image acquisition

Digital images were acquired using a Zeiss Axiovert 200M microscope with 10x, 20x or 40x magnification, cooled CCD CoolSNAP-HQ2 camera (Photometrics) and Metamorph 7.7.5 (Molecular Devices). Images were composed and edited in ImageJ. Background was reduced using brightness and contrast adjustments applied to the whole image.

Morphometric analysis and Phallodin quantification

Myofiber CSA was analyzed by using immunostaining of dystrophin, marking myofiber sarcolemma, and then using Metamorph 7.7.5. Between 600 and 800 myofibers were analyzed.
Phallodin signal intensity per cell was quantified using ImageJ. At least 150 cells were analyzed.

Statistical analysis

The significance of differences between means was assessed with a Student's t-test. P values of < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Srf in SCs is required for overload-induced hypertrophy

We first examined Srf expression in quiescent and activated adult muscle stem cells, the satellite cells (SCs). Single-fibers and their associated SCs were isolated from EDL muscles at the steady state and were fixed immediately to evaluate the expression of Srf in quiescent SCs expressing Pax7, a reliable biomarker for SCs. Srf was barely expressed in quiescent SCs (Figure 1A and 1B). In contrast, when single-fibers were maintained 24 hours in culture to allow the activation of the associated SCs, Srf expression was detected in all activated SCs (Figure 1B).

To investigate the role played by Srf in satellite cells, compensatory hypertrophy (CH) of the plantaris muscle was performed in *Pax7$^{CreERT2/+}$:Srf$^{flox/flox}$:Pax7-nGFP* mutant mice previously injected with tamoxifen to induce SC-specific Srf loss (Figure 1C). Non injected *Pax7$^{CreERT2/+}$:Srf$^{flox/flox}$:Pax7-nGFP* mice were used as controls. Compensatory hypertrophy presents the advantage to mobilize SCs without any destruction of the myofibers, allowing the study of mutant SC behaviors in a wild-type environment. Following tamoxifen treatment, efficient loss of Srf was achieved at the transcript and at protein levels in FACS-sorted SCs from control and mutant muscles (Figure S1). At the steady state, no differences in muscle weight and in myofiber cross-section area (CSA) were observed between control and mutant plantaris muscles (Figure 1D, 1E, F). Following hypertrophy, a significant increase in plantaris muscle mass and in CSA 3 and 5 weeks post overload were scored in control overloaded muscles as compared to unloaded muscles (C) (Figure 1D, 1E, 1F). However in muscles lacking Srf in their SCs, the extend of this hypertrophic growth was strongly reduced, displaying only a 12% increase in mass/CSA versus 30% in control 3 weeks post CH (Figure 1E, 1F). These changes were not accompanied with modifications of the myofiber number (Figure 1G), indicating that the increase in muscle mass in this muscle growth model was mainly due to myofiber hypertrophy.

These data show that even though some limited growth can occur in mutant muscles, Srf in SCs is necessary for optimal overload-induced myofiber hypertrophy to take place.

***Srf* inactivation in SCs does not affect their expansion**

Srf has been shown to control the proliferation of several cell types including C2C12 muscle cell line (Soulez et al., 1996b). To investigate whether SCs functions were altered by Srf loss upon CH, the number of SCs expressing Pax7 was first quantified. Before overload, no difference in SC number was observed between control and mutant plantaris muscles (Figure 2B) precluding a role for Srf in the maintenance of the quiescent SC pool, which is consistent with the poor expression of Srf in quiescent SCs (Figure 1B). A significant 2.5 fold increase in the number of Pax7+ cells was observed 1 week post CH in both control and mutant plantaris muscles that returned to its original level 5 weeks post CH (Figure 2A, AB). Importantly, following overload induced hypertrophy, there was no difference in SC number between control and mutant muscles suggesting that Srf loss did not hamper the growth response of SCs to mechanical cues.

The proliferation potential of Srf-deleted SCs was further assessed in vitro by determining the EdU incorporation rate (which specifically marks the S-phase of cycling cells) of control and mutant FACS-sorted primary myoblasts. In agreement with our observations in vivo, the proliferation rates of control and of mutant myoblasts were similar (Figure 2C). We further showed that the distributions of control and Srf-deleted myoblasts in the different cell cycle phases analyzed by FACS-quantification of DNA content did not differ (Figure 2D). Additional experiments were conducted in which Srf loss was achieved in vitro by transducing primary *Srf$^{flox/flox}$* myoblasts with adenovirus expressing Cre recombinase (Ad-Cre) or GFP (Ad-GFP) (Figure S2A). Again no difference in the proliferation capacities of Ad-GFP and Ad-Cre transduced myoblasts was observed in BrdU

incorporation experiments (Figure S2B). Altogether these data show that Srf in myogenic precursor cells is dispensable for their proliferation in a cell autonomous manner.

Srf controls SCs motility but it does not influence their myogenic differentiation potential

We then hypothesized that other SC functions (such as motility, differentiation, fusion) could be modified by Srf loss and could account for the impaired hypertrophic growth of mutant muscle. After activation signals, SCs become extremely motile and move from beneath the lamina to the surface of the myofiber as it was monitored by intravital imaging in the muscle regeneration model [108]. Nevertheless such a study has not been performed in the hypertrophy model. Since Srf is a central regulator of genes involved in cell migration [148], the motile functions of Srf-deleted SCs were monitored in vitro using time-lapse video-microscopy. The motility of mutant myoblasts was strongly decreased as compared to control (Figure 2E). Accordingly Ad-Cre tranduced Srflx/lx myoblasts displayed also a diminished motility by more than 2 fold (Figure S2C). These results demonstrate that Srf is needed for satellite cell motility.

We next investigated whether Srf deletion in SCs could affect their myogenic differentiation potential. Indeed, previous in vitro studies in C2C12 muscle cell line indicated that Srf activity was required for the expression of MyoD, a MRF required for myogenic cell determination, and of Myogenin [152], [134]. We first assessed the number of Myogenin-expressing cells in vivo during overload-induced hypertrophy procedure. After one week of CH, the number of Myogenin-positive cells was increased in a similar way in both control and mutant plantaris muscles (Figure 3A). These data do not support a role for Srf in SCs differentiation engagement. We then thought to determine in primary cultured muscle cells (cell sorted from control or mutant muscles) whether Srf deletion could affect MyoD and Myogenin expressions. In contrast to what was shown in C2C12, the expression of MyoD and of Myogenin at the protein and transcript levels did not differ between control and mutant primary myoblasts under proliferation conditions or after induction of differentiation (Figure 3B, 3C, S3A, S3B). We even observed an increased proportion of nuclei expressing Myogenin in mutant cells 3 days after the induction of differentiation (Figure 3C). Similar MyoD and Myogenin expressions were also observed when Srf loss was achieved in vitro by Ad-Cre transduction of Srflx/lx myoblasts (Figure S3C, S3D). The expression of a later differentiation marker (the sarcomeric myosin heavy chain, MyHC) was monitored in control and mutant cells upon differentiation using MF20 antibody (Figure 3D). Three days post differentiation the proportion of nuclei in MyHC+ cells was identical between control and mutant cells (Figure 3E). Taken together, these data show that the loss of Srf in the SCs does not impair their engagement in the myogenic differentiation.

Srf is needed for SC's fusion capacities

To determine whether the lack of Srf in SCs might impact cell fusion, myonuclei numbers inside the sarcolemma were counted in control and mutant plantaris muscles at various time post CH by performing Dystrophin/DAPI staining (Figure 1D). Significant increases in myonuclei numbers were observed in control muscles at 1, 3 and 5 weeks post-CH. Whereas the myonuclei numbers was similar before overload between control and mutant, following overload, the myonuclei number did not vary in mutant muscles and was significantly decreased as compared to control (Figure 4A). The blunted fusion capacity of SCs lacking Srf show that Srf within SCs is needed for their efficient recruitment to the growing myofiber.

Fusion is unrolled in two and overlapped phases: the primary fusion that occurs between myoblasts resulting in the formation of nascent myotubes and the secondary fusion between a myoblast and a nascent myotube. To discern whether these fusions are defected by Srf loss, we set up various in vitro assays to specifically assess fusion between myoblasts and fusion between myoblasts and

myotubes. This later setting models what occurs *in vivo* during overload-induced hypertrophy. Fusion was first monitored during the course of differentiation. Mutant cells presented an altered capacity to form multinucleated myotubes 3 days after differentiation induction (Figure 4B). Their fusion index, which represents the proportion of the total cell population that has fused, was strongly decreased as compared to control cells, showing a reduced efficiency of the first fusion phase (Figure 4C). Accordingly, the mean number of nuclei in differentiated MyHC+ cells was strongly reduced in mutant cells (Figure 4D). We then evaluated whether heterotypic myoblast fusion, between control and mutant myoblasts, was also affected by performing mixing experiments of cells labeled with different dyes. We could confirm that mutant myoblasts were unable to fuse in a homotypic manner as we observed a 60% decrease in fusion events (dual labeling) between mutant myoblasts as compared to control myoblasts (Figure 4E). Furthermore mutant myoblasts exhibited an altered heterotypic fusion with control cells (Figure 4E) indicating that efficient fusion occurs only when Srf is expressed in both fusing myoblasts.

The secondary and asymmetric fusion was specifically studied by mixing differently labeled control or mutant myoblasts with control myotubes. The lack of Srf in myoblasts was accompanied with a sharp decrease in the proportion of dual labeled cells (Figure 4F) showing that Srf within myoblasts is required for their fusion to control myotubes, a process that leads to nuclei accretion of new nuclei into myofibers upon overload-induced hypertrophy.

Altogether these results show that Srf within myoblasts is needed for both primary and secondary fusion phases. In addition our results suggest that the decreased ability of SCs lacking Srf to fuse with the growing fibers could account for the defective hypertrophic growth of mutant muscles.

The impaired actin cytoskeleton organization in Srf-deleted myoblasts is partially rescued by the compensatory expression of an alpha actin isoform

To identify Srf target genes and Srf-dependent pathways/biological functions that could control SC motility and fusion, we performed a microarray analysis of gene expression using proliferating myoblasts (D0) and differentiating cells (early phase D1 and later phase D3) expressing (Ad-GFP) or not Srf (Ad-Cre). We identified the set of 145 genes whose expression was altered by Srf loss in both myoblasts and in differentiating cells (Figure 5A, Table S1). Analysis of the potential biological roles of such genes by an ontology program (Ingenuity) pointed out an over-representation of genes involved in the regulation of actin cytoskeleton rearrangements (Figure 5B) pointing out a putative implication of actin cytoskeleton integrity in the perturbed functions of SCs lacking Srf. In agreement with our in silico analysis, several genes encoding sarcomeric proteins (α-actins, myosin light chain) and genes involved in actin cytoskeleton treadmilling have been identified among Srf targets genes [204]. Moreover, analysis of Srf knock-out models in skeletal and cardiac muscles have highlighted actin genes as major hits of Srf [155], [208]. In the present transcriptomic study, we observed that the expression of several actin genes in proliferating and differentiating cells was altered by Srf deletion. In particular alpha skeletal-actin (Acta1) expression was strongly diminished in Srf-deleted muscle cells (Figure 5C). Cytoskeletal scaffold structures of actin microfilaments undergo dynamic changes in polymerization of monomeric globular actin (G-actin) into a filamentous actin (F-actin). Hence, we quantified the total amount of F-actin in control and in mutant myoblasts by a phalloidin staining (Figure 5D) and showed a significant decrease of total F-actin in mutant cells (Figure 5E). Furthermore, we quantified soluble G-actin and insoluble F-actin fractions in muscle cells. In agreement with phalloidin staining data, the F/G-actin ratio was decreased 2.5 fold in myoblasts lacking Srf (Figure 5F, 5G). Together these results show that Srf controls the maintenance of actin cytoskeleton in cultured muscle cells.

Alpha cardiac (Actc1) and alpha skeletal (Acta1) actins have redundant roles in cardiac and skeletal muscles. For instance Actc1 overexpression can functionally replace Acta1 in Acta1 knock out mice (Nowak et al, 2009) highlighting their similar role in maintenance of adequate muscle functions. Thus, we hypothesized that the perturbed organization of actin cytoskeleton in Srf-deleted muscle cells could be counteracted by alpha cardiac actin (Actc1) overexpression using sorted SCs from tamoxifen-treated Pax7CreERT2/+:Srfflox/flox:Pax7-nGFP:CMV-flx-CAT-flx-Actc1 mice (MutAct) (Figure S4A). We first validated, in FACS-sorted SCs isolated from double mutant mice injected with Tamoxifen, the efficient loss of endogenous Srf expression and the concomitant overexpression of exogenous Actc1 transcripts (Figure S4B). Strikingly, the overexpression of Actc1 in Srf-deleted myoblasts was sufficient to restore to control levels both the total amount of F-actin (Figure 5C, 5D) and F/G-actin ratio (Figure 5E, 5F) and therefore to preserve actin cytoskeleton organization in muscle cells lacking Srf.

Alpha actin overexpression rescues the heterotypic fusion defect caused by the *Srf*-loss in myoblasts

We next asked whether the reestablishment of actin cytoskeleton in Srf mutant SCs by alpha actin overexpression could rescue impaired SC's functions such as motility and fusion. Cell tracking experiments showed a similar decrease of motility in double mutant and mutant myoblasts (Figure S4C) precluding the implication of alpha actin-mediated F-actin stabilization in the impaired motile functions of SCs lacking Srf.

We then assessed the fusion capacity of double mutant cells during the course of differentiation. As observed for Srf mutant cells, double mutant cells displayed an unaltered engagement in differentiation evidenced by their MyoD, Myogenin and Myosin Heavy Chain expressions that were similar or even higher than control cells (Figure S4D, S4E, S4F, S4G). In addition, upon differentiation, the fusion index and the mean number of nuclei per myosin expressing cell were reduced to a similar extend in double mutant and in Srf mutant cells suggesting that actin overexpression did not alleviate the homotypic fusion defect of cells lacking Srf (Figure 6A, 6B, 6C). Most interestingly, the impaired heterotypic fusion between control and Srf mutant myoblasts was fully rescued by alpha-actin overexpression, as assessed by counting the fusion event in cell mixing experiments 3 days post differentiation (Figure 6D). Finally, actin overexpression was sufficient to restore the fusion defect of Srf mutant myoblasts with control myotubes (Figure 6E). Overall, these data suggest that the maintenance of F-actin network in Srf mutant myoblasts by alpha actin over-expression is sufficient to rescue their heterotypic fusion with control myoblasts/myotube while being insufficient to permit homotypic fusion.

Alpha actin overexpression restores overload-induced muscle hypertrophic growth of Srf mutant muscles

To gain in vivo insights into the possible rescue of Srf-deleted myoblast fusion by alpha actin overexpression, overload-induced hypertrophy and muscle regeneration procedures, recapitulating heterotypic and homotypic fusion events respectively, were conducted on control, mutant and double mutant mice. In our genetic models, Srf deletion, and/or concomitant actin overexpression, occurs only in Pax7-expressing SCs of mutant/double mutant muscles but never in their myofibers. Hence, the nuclear accretion that occurs in vivo during overload-induced hypertrophy, a situation in which myofibers remain intact, corresponds to the heterotypic fusion between mutant/double or mutant myoblasts and control myotubes. On another hand the in vivo procedure that models homotypic fusion is the regeneration. Upon Cardiotoxin (CTX)-induced injury, SCs are activated, proliferate, differentiate and fuse between them to form new myofibers, though fusion occurs exclusively among cells harboring the same genotype (control, mutant or double mutant).

Control, mutant and double mutant tibialis anterior (TA) muscles were subjected to CTX-induced regeneration. Thirty days post-regeneration, Dystrophin/Dapi staining of regenerated muscle sections revealed that the overall structure of Srf mutant muscles was severely affected as compared to control muscles (Figure 7A). Indeed mutant muscles presented newly formed fibers that are 10 times smaller (Figure 7B) and 3 times more numerous than control muscles (Figure S5A). Moreover mutant regenerated muscles displayed a strong decrease of their myonuclei number (Figure 7C). Of note, the number of SCs was not affected by Srf loss 30 days post injury (Figure S5B) implying that Srf expression does not have an impact on the number of SCs. Together these data suggest a strong deficiency of Srf-deleted SCs in their ability to fuse that could account for the small sized and the increased number of newly formed regenerated fibers present in mutant muscles.

We next assessed whether alpha actin overexpression could counteract the altered regeneration and defective homotypic fusion of regenerated Srf mutant muscles. Thirty days post injury, when double mutant, mutant and control muscles were compared, only a very modest improvement of fusion was scored in double mutant as compared to Srf mutant muscles that was not accompanied with a significant change in the mean CSA (Figure 7B, 7C). These data are in agreement with the absence of amelioration of the homotypic fusion defect that was observed in vitro in double mutant myoblasts when compared to Srf mutant cells.

As heterotypic fusion between mutant/double mutant myoblasts and control myotubes models the nuclear accretion that occurs in vivo during overload-induced hypertrophy, we determined the impact of alpha actin overexpression on the defective hypertrophy of Srf mutant muscles. Three and 5 weeks post-CH, actin overexpression rescued to control levels the overall growth of Srf mutant muscles. Indeed, double mutant plantaris muscle mass and mean CSA were significantly higher than those of Srf mutant muscles and were comparable to those of control muscles (Figure 7D, 7E). Furthermore myonuclei number was significantly increased in double mutant as compared to Srf mutant and reached 60% of the control level 5 weeks post CH (Figure 7F).

Taken together these data show that while maintenance of F-actin scaffold within SCs lacking Srf did not ameliorate homotypic fusion, it was sufficient to efficiently drive heterotypic fusion in vitro and in vivo and to restore the impaired hypertrophic growth of Srf mutant muscles.

DISCUSSION

Our study aims to understand the plasticity of skeletal muscle tissue in the hypertrophic context based on SCs and we focus on Srf transcription factor in the control of SC functions. We used the genetic mouse model *Pax7*$^{CreERT2/+}$*:Srf*$^{flox/flox}$ permitting the analysis of the Srf role in SCs. We show that Srf is required for SC fusion to the growing myofibers under CH to achieve an efficient hypertrophic growth. Srf deletion in SCs abrogates the fusion capacity of mouse myoblasts. Moreover Srf-loss in SCs leads to downregulation of a-skeletal actin target gene and an impairment of actin cytoskeleton. Overexpression of an alpha-actin isoform in the SCs restores the network of polymerized actin and rescues the SC-mediated hypertrophic myofiber growth while it fail to do so under muscle regeneration showing that Srf regulates unknown target genes effectors of myoblast fusion that act in coordination with the actin cytoarchitecture maintenance.

Srf is expressed in adult skeletal myofibers and its expression varies accordingly to mechanical stimuli, such as it is increased in the CH and decreases in the atrophy, rendering thus Srf a mechanical sensor [207], [216]. Moreover Srf mediates the transcriptional activation of immediate early genes (IEGs) upon serum stimulation and muscle-specific genes during muscle differentiation [130] highlighting Srf as a good candidate for the transcriptional control of signal-induced SC recruitment.

In several contexts, Srf affects cell proliferation either by enhancing it [217] or compromising it [218], [219]. The myocardin related transcription factors (Mrtfs) are Srf coactivators involved in cell proliferation and myogenesis of cardiac, smooth and skeletal muscle [137]. Skeletal muscle-specific deletion of Mrtf-A and Mrtf-B (dKO) during skeletal muscle development demonstrate a decrease in the proliferation of dKO embryonic myoblasts, an increase in apoptosis and differentiation defects leading to skeletal muscle hypoplasia and perinatal lethality [220]. In contrast to these previous data, our results show that SCs lacking Srf respond to mechanical cues by expanding their number similarly to control SCs. Moreover Srf does prevent the myoblast proliferation contrary to previous observations in myogenic lines [151] where SRF is indispensable for myoblast proliferation.

It has been previously shown that Srf leads to MyoD expression shutdown in proliferating and differentiating myoblasts [134] blocking. thus the myogenic progression [152]. SC-specific deletion of both MASTR (a member of Mrtf family) and Mrtf-A lead to aberrant differentiation and excessive proliferation of SCs due to down-regulation MyoD expression [221]. **In contrast to** what is has been shown SC-specific deletion of Srf does not lead to MyoD expression shutdown in proliferating myoblasts and it does not affect the onset of myogenesis. Therefore, Srf seems to differentially affect the cell proliferation and growth depending on the cell context [222] possibly through a Srf-independent regulation of cell cycle in the adult skeletal myogenesis. Indeed, it has been demonstrated that a member of the MADS box family, the MEF2 muscle-enriched transcription factor and its associated MASTR cofactor cooperate with Mrtf-A (Srf cofactor) to control the transcriptional regulation of MyoD expression [221], [223], [224]. In contrast with the previous observations in C2C12 cell line where Srf knockdown and dominant negative lead to a shutdown of MyoD expression, in our in vivo SC-specific genetic deletion of Srf (Srf KO) and in primary cell culture models, Srf does not control the myoblast proliferation and MyoD expression.

Since Srf-binding sites have identified in muscle-specific promoters and Srf is required for differentiation and growth of skeletal, cardiac and smooth muscles [158], [225], [226], therefore it is expecting a Srf-directed regulation in the myoblasts differentiation. Previous *in vitro* studies showed that Srf is required for the myoblast-myotube transition and that Srf loss prevented the expression of both myogenin and MyoD as also the expression of muscle-specific marker troponin T [152], [134]. In our system, cultured primary myoblasts under differentiation conditions do not demonstrate a downregulation neither in MyoD nor MyoG expression indicating that the engagement of myoblasts into the differentiation program is not affected by the Srf loss. In addition, MyHC is expressed in the absence of Srf likewise to controls. These results reveal that Srf does not abolish the differentiation myogenic program. However the fusion which is the end up step of terminal differentiation is highly compromised with only small myotubes containing limited nuclei are formed. Our results are in accordance with the Mrtf dKO in skeletal muscles, where fusion of myoblasts into myotubes was not completely blocked by the loss of Srf cofactors Mrtf-A and Mrtf-B [220].

Srf-mutant myoblasts present a major fusion defect. Primary homotypic fusion (between myoblasts) as well as secondary (between myoblasts and nascent myotubes) homotypic fusion is both affected in Srf-mutant myoblasts. In addition, heterotypic fusion is not improved as shown in heterotypic mixture of mutant and control myoblasts/myotubes demonstrating therefore that the symmetric expression of Srf is required in a pair of fusing cells.

Actin is a structural sarcomeric protein and part of RhoA-actin-Mrtf-Srf signalling cascade [227]. Actin exchanges between monomeric G-actin and polymerized F-actin in order to maintain the functional actin network, mediating thus cellular processes such as migration, adhesion and fusion [211], [212]. Srf-mutant myoblasts present an altered actin network with paucity of F-actin which contribute to decreased fusion [173].

Transcriptomic analyses revealed an over-representation of genes implicated in actin cytoskeleton rearrangement and signalling. Acta1 gene expression is highly decreased, comparing to controls. From many aspects adult myogenesis recapitulates molecular pathways activated in embryonic myogenesis [198]. In vertebrate embryos, the alpha-cardiac actin gene encodes a major sarcomeric component in both skeletal and cardiac muscle [210], [228]. Indeed the Actc gene is the predominant sarcomeric isoform in early fetal skeletal muscle development [229] showing that the cardiac actin gene is subject to developmental regulation [209]. Based on these assumptions, we used an available transgenic mouse model of Actc overexpression. Overexpression of alpha-cardiac (Actc) isoform in Srf-depleted SCs, restores the F-actin pool and rescues the heterotypic fusion. The underlying possible mechanism for the rescue of heterotypic/asymmetric fusion could be the restoration of the mechanical invading force which helps to overcome energy barriers for membrane apposition and drives cell membrane fusion [230] or the appropriate cellular distribution of signalling molecules and/or contractile proteins molecules to mediate the fusion [231]. Compensatory alpha-actin expression in Srf-depleted SCs is not however sufficient for the homotypic/symmetric fusion suggesting other alpha-actin-independent mechanisms downstream Srf-targets.

However overexpression of the alpha-actin isoform does not rescue the motile functions of SCs suggesting thus a non alpha-actin dependent control of cell motility. The non-muscle isoforms of beta- and gamma-actin or myosin, all being Srf-target genes [204], [205] could be involved in the process of cell movement [232]. Pharmacological inhibition of F-actin depolymerization in an attempt to maintain the F-actin network in wild-type myoblasts could confirm the obsereved phenotype from the genetic model of Actc overexpression.

The *in vivo* model of homotypic or symmetric fusion study is the muscle regeneration where activated SCs and their descendant myoblasts either fuse between them or to nascent myotubes/pre-existing myofibers to reconstitute the under lesion muscle. Clearly the regeneration process is impaired in TA muscles harboring Srf-mutant SCs as the fusion process did not take place. The double mutant SCs seem to slightly ameliorate the fusion capacity with no impact in the size of new-formed myofibers. However in the *in vivo* model of asymmetric fusion, CH, double mutant SCs being able to fuse to the growing myofiber results in the increase in the myofiber size as in controls. Our study shows that the actin network maintenance is important but not sufficient for the fusion process in mammalian myoblasts, and other Srf-target genes are implicated and needed for SC functions. Such targets could be involved in a number of cellular processes, including lipid metabolism such as caveolins and cavins, the structural proteins of caveolae, cause alterations in cell membrane composition (lipodystrophy) and they are characterized by the presence of CArG boxes in their promoter [233]. Lipid modifications correlate with a reduction in plasma membrane rigidity resulting in fusion impairment [234].

Satellite cells are the major donors of new nuclei, being myogenic precursor cells, important for muscle development, for muscle regeneration and possibly also for muscle hypertrophy in response to exercise, training and hormonal stimulation [197], [235]. The role of satellite cells in muscle hypertrophy has long been a debated issue [67]. Studies with a transgenic Pax7-DTA mouse model, where the Pax7+ SC depletion is achieved with TMX treatment, showed that satellite cells are not required for muscle growth over a short period [68] but they are required to overcome/negatively regulate the excessive ECM accumulation over a prolonged period resulting in attenuated hypertrophy [236]. *Egner et al.* repeated these experiments analyzing the muscles by immunohistochemistry and *in vivo* and *ex vivo* imaging and they found that overload hypertrophy was prevented in the satellite cell-deficient mice, in both the plantaris and the extensor digitorum longus muscles. In consequence they claim that there is currently no model in which functional, sustainable hypertrophy has been unequivocally demonstrated in the absence of satellite cells.

We provide new genetic evidence showing that when SCs are not able to fuse, hypertrophy is impaired. Srf-mutant mice show no signs of fusion and the moderated increased CSA could be attributed to an increase in the protein synthesis in Srf-expressing myofibers. *In vivo* overexpression of alpha-actin rescues the fusion in the CH model. We conclude that SC myonuclear accretion is required however for an optimal hypertrophic growth and it indicates the necessity of SC fusion to the growing myofiber.

Taken together these data show that while maintenance of F-actin scaffold within SCs lacking Srf did not ameliorate homotypic fusion, it was sufficient to efficiently drive heterotypic fusion *in vitro* and *in vivo* and to restore the impaired hypertrophic growth of Srf mutant muscles. More generally these data strongly support the need of SC-mediated fusion in the hypertrophy of myofiber.

References

Almada, A.E., and Wagers, A.J. (2016). Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 17, 267–279.

Blaauw, B., and Reggiani, C. (2014). The role of satellite cells in muscle hypertrophy. J. Muscle Res. Cell Motil. 35, 3–10.

Blondelle, J., Ohno, Y., Gache, V., Guyot, S., Storck, S., Blanchard-Gutton, N., Barthélémy, I., Walmsley, G., Rahier, A., Gadin, S., et al. (2015). HACD1 , a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. J. Mol. Cell Biol. mjv049.

Callan-Jones, A.C., and Voituriez, R. (2016). Actin flows in cell migration: from locomotion and polarity to trajectories. Curr. Opin. Cell Biol. 38, 12–17.

Cenik, B.K., Liu, N., Chen, B., Bezprozvannaya, S., Olson, E.N., and Bassel-Duby, R. (2016). Myocardin-related transcription factors are required for skeletal muscle development. Development 143, 2853–2861.

Charvet, C., Houbron, C., Parlakian, A., Giordani, J., Lahoute, C., Bertrand, A., Sotiropoulos, A., Renou, L., Schmitt, A., Melki, J., et al. (2006). New Role for Serum Response Factor in Postnatal Skeletal Muscle Growth and Regeneration via the Interleukin 4 and Insulin-Like Growth Factor 1 Pathways. Mol. Cell. Biol. 26, 6664–6674.

Collard, L., Herledan, G., Pincini, A., Guerci, A., Randrianarison-Huetz, V., and Sotiropoulos, A. (2014). Nuclear actin and myocardin-related transcription factors control disuse muscle atrophy through regulation of Srf activity. J. Cell Sci. 127, 5157–5163.

Creemers, E.E., Sutherland, L.B., Oh, J., Barbosa, A.C., and Olson, E.N. (2006). Coactivation of MEF2 by the SAP domain proteins myocardin and MASTR. Mol. Cell 23, 83–96.

Dumont, N.A., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2015). Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. Development 142, 1572–1581.

Egner, I.M., Bruusgaard, J.C., and Gundersen, K. (2016). Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. Development 143, 2898–2906.

Esnault, C., Stewart, A., Gualdrini, F., East, P., Horswell, S., Matthews, N., and Treisman, R. (2014). Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts. Genes Dev. 28, 943–958.

Fry, C.S., Lee, J.D., Jackson, J.R., Kirby, T.J., Stasko, S.A., Liu, H., Dupont-Versteegden, E.E., McCarthy, J.J., and Peterson, C.A. (2014). Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy. FASEB J. 28, 1654–1665.

Gauthier-Rouviere, C., Vandromme, M., Tuil, D., Lautredou, N., Morris, M., Soulez, M., Kahn, A., Fernandez, A., and Lamb, N. (1996). Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscle-determining factor MyoD in both dividing and differentiating mouse C2C12 myoblasts. Mol. Biol. Cell 7, 719–729.

Gordon, S.E., Flück, M., and Booth, F.W. (2001). Selected Contribution: Skeletal muscle focal adhesion kinase, paxillin, and serum response factor are loading dependent. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 90, 1174–1183; discussion 1165.
Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Précigout, G., Garcia, L., et al. (2012). Srf-Dependent Paracrine Signals Produced by Myofibers Control Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. Cell Metab. 15, 25–37.
Gunning, P., Ponte, P., Blau, H., and Kedes, L. (1983a). alpha-skeletal and alpha-cardiac actin genes are coexpressed in adult human skeletal muscle and heart. Mol. Cell. Biol. 3, 1985–1995.
Gunning, P., Ponte, P., Blau, H., and Kedes, L. (1983b). alpha-skeletal and alpha-cardiac actin genes are coexpressed in adult human skeletal muscle and heart. Mol. Cell. Biol. 3, 1985–1995.
Ilkovski, B., Clement, S., Sewry, C., North, K.N., and Cooper, S.T. (2005). Defining alpha-skeletal and alpha-cardiac actin expression in human heart and skeletal muscle explains the absence of cardiac involvement in ACTA1 nemaline myopathy. Neuromuscul. Disord. NMD 15, 829–835.
Kim, J.H., Ren, Y., Ng, W.P., Li, S., Son, S., Kee, Y.-S., Zhang, S., Zhang, G., Fletcher, D.A., Robinson, D.N., et al. (2015). Mechanical tension drives cell membrane fusion. Dev. Cell 32, 561–573.
Koegel, H., von Tobel, L., Schäfer, M., Alberti, S., Kremmer, E., Mauch, C., Hohl, D., Wang, X.-J., Beer, H.-D., Bloch, W., et al. (2009). Loss of serum response factor in keratinocytes results in hyperproliferative skin disease in mice. J. Clin. Invest. 119, 899–910.
Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D., and Daegelen, D. (2008). Premature Aging in Skeletal Muscle Lacking Serum Response Factor. PLoS ONE 3, e3910.
Latinkić, B.V., Cooper, B., Towers, N., Sparrow, D., Kotecha, S., and Mohun, T.J. (2002). Distinct enhancers regulate skeletal and cardiac muscle-specific expression programs of the cardiac alpha-actin gene in Xenopus embryos. Dev. Biol. 245, 57–70.
Le Grand, F., Grifone, R., Mourikis, P., Houbron, C., Gigaud, C., Pujol, J., Maillet, M., Pagès, G., Rudnicki, M., Tajbakhsh, S., et al. (2012). Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration. J. Cell Biol. 198, 815–832.
Lepper, C., Conway, S.J., and Fan, C.-M. (2009). Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. Nature 460, 627–631.
Lepper, C., Partridge, T.A., and Fan, C.-M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. Development 138, 3639–3646.
L'honore, A., Rana, V., Arsic, N., Franckhauser, C., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (2007). Identification of a new hybrid serum response factor and myocyte enhancer factor 2-binding element in MyoD enhancer required for MyoD expression during myogenesis. Mol. Biol. Cell 18, 1992–2001.
Li, S., Czubryt, M.P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Wiebel, F.F., Nordheim, A., and Olson, E.N. (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 1082–1087.
Martin, S.G. (2016). Role and organization of the actin cytoskeleton during cell-cell fusion. Semin. Cell Dev. Biol.
McCarthy, J.J., Mula, J., Miyazaki, M., Erfani, R., Garrison, K., Farooqui, A.B., Srikuea, R., Lawson, B.A., Grimes, B., Keller, C., et al. (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. Development 138, 3657–3666.
Meadows, S.M., Warkman, A.S., Salanga, M.C., Small, E.M., and Krieg, P.A. (2008). The myocardin-related transcription factor, MASTR, cooperates with MyoD to activate skeletal muscle gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 1545–1550.
Miano, J.M., Ramanan, N., Georger, M.A., de Mesy Bentley, K.L., Emerson, R.L., Balza, R.O., Xiao, Q., Weiler, H., Ginty, D.D., and Misra, R.P. (2004). Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 17132–17137.
Miano, J.M., Long, X., and Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 292, C70-81.

Mokalled, M.H., Johnson, A.N., Creemers, E.E., and Olson, E.N. (2012). MASTR directs MyoD-dependent satellite cell differentiation during skeletal muscle regeneration. Genes Dev. 26, 190–202.
Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T., and Buckingham, M. (2005). Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. Science 309, 2064–2067.
Montarras, D., L'honoré, A., and Buckingham, M. (2013). Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. FEBS J. 280, 4036–4050.
Moretti, I., Ciciliot, S., Dyar, K.A., Abraham, R., Murgia, M., Agatea, L., Akimoto, T., Bicciato, S., Forcato, M., Pierre, P., et al. (2016). MRF4 negatively regulates adult skeletal muscle growth by repressing MEF2 activity. Nat. Commun. 7, 12397.
Nordheim, A. (2014). SRF regulation — actin branches out. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15, 368–368.
Nowak, K.J., Ravenscroft, G., Jackaman, C., Filipovska, A., Davies, S.M., Lim, E.M., Squire, S.E., Potter, A.C., Baker, E., Clément, S., et al. (2009a). Rescue of skeletal muscle alpha-actin-null mice by cardiac (fetal) alpha-actin. J. Cell Biol. 185, 903–915.
Nowak, S.J., Nahirney, P.C., Hadjantonakis, A.-K., and Baylies, M.K. (2009b). Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. J. Cell Sci. 122, 3282–3293.
Olson, E.N., and Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 353–365.
Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J.-P., Paulin, D., Li, Z., and Daegelen, D. (2004). Targeted Inactivation of Serum Response Factor in the Developing Heart Results in Myocardial Defects and Embryonic Lethality. Mol. Cell. Biol. 24, 5281–5289.
Parlakian, A., Charvet, C., Escoubet, B., Mericskay, M., Molkentin, J.D., Gary-Bobo, G., De Windt, L.J., Ludosky, M.-A., Paulin, D., Daegelen, D., et al. (2005). Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. Circulation 112, 2930–2939.
Paterson, B.M., and Eldridge, J.D. (1984). alpha-Cardiac actin is the major sarcomeric isoform expressed in embryonic avian skeletal muscle. Science 224, 1436–1438.
Pipes, G.C.T., Creemers, E.E., and Olson, E.N. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. Genes Dev. 20, 1545–1556.
Posern, G., and Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. Trends Cell Biol. 16, 588–596.
Sambasivan, R., Gayraud-Morel, B., Dumas, G., Cimper, C., Paisant, S., Kelly, R.G., and Tajbakhsh, S. (2009). Distinct Regulatory Cascades Govern Extraocular and Pharyngeal Arch Muscle Progenitor Cell Fates. Dev. Cell 16, 810–821.
Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpfennig, A., Van Wittenberghe, L., Paldi, A., Gayraud-Morel, B., Guenou, H., Malissen, B., Tajbakhsh, S., and Galy, A. (2011). Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. Development 138, 4333–4333.
Schratt, G., Weinhold, B., Lundberg, A.S., Schuck, S., Berger, J., Schwarz, H., Weinberg, R.A., Rüther, U., and Nordheim, A. (2001). Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. Mol. Cell. Biol. 21, 2933–2943.
Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. Cell 102, 777–786.
Segal, D., Dhanyasi, N., Schejter, E.D., and Shilo, B.-Z. (2016). Adhesion and Fusion of Muscle Cells Are Promoted by Filopodia. Dev. Cell 38, 291–304.
Soulez, M., Tuil, D., Kahn, A., and Gilgenkrantz, H. (1996a). The serum response factor (SRF) is needed for muscle-specific activation of CArG boxes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 219, 418–422.
Soulez, M., Rouviere, C.G., Chafey, P., Hentzen, D., Vandromme, M., Lautredou, N., Lamb, N., Kahn, A., and Tuil, D. (1996b). Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. Mol. Cell. Biol. 16, 6065–6074.
Sun, K., Battle, M.A., Misra, R.P., and Duncan, S.A. (2009). Hepatocyte expression of serum response factor is essential for liver function, hepatocyte proliferation and survival, and postnatal body growth in mice. Hepatol. Baltim. Md 49, 1645–1654.

Swärd, K., Stenkula, K.G., Rippe, C., Alajbegovic, A., Gomez, M.F., and Albinsson, S. (2016). Emerging roles of the myocardin family of proteins in lipid and glucose metabolism. J. Physiol.
Tran, T.H., Shi, X., Zaia, J., and Ai, X. (2012). Heparan Sulfate 6-O-endosulfatases (Sulfs) Coordinate the Wnt Signaling Pathways to Regulate Myoblast Fusion during Skeletal Muscle Regeneration. J. Biol. Chem. 287, 32651–32664.
Treisman, R. (1987). Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. EMBO J. 6, 2711.
Vandromme, M., Gauthier-Rouvière, C., Carnac, G., Lamb, N., and Fernandez, A. (1992). Serum response factor p67SRF is expressed and required during myogenic differentiation of both mouse C2 and rat L6 muscle cell lines. J. Cell Biol. 118, 1489–1500.
Vasyutina, E., Martarelli, B., Brakebusch, C., Wende, H., and Birchmeier, C. (2009). The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 8935–8940.
Webster, M.T., Manor, U., Lippincott-Schwartz, J., and Fan, C.-M. (2016). Intravital Imaging Reveals Ghost Fibers as Architectural Units Guiding Myogenic Progenitors during Regeneration. Cell Stem Cell 18, 243–252.
Werth, D., Grassi, G., Konjer, N., Dapas, B., Farra, R., Giansante, C., Kandolf, R., Guarnieri, G., Nordheim, A., and Heidenreich, O. (2010). Proliferation of human primary vascular smooth muscle cells depends on serum response factor. Eur. J. Cell Biol. 89, 216–224.
Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. Physiol. Rev. 93, 23–67.

FIGURES

Figure 1

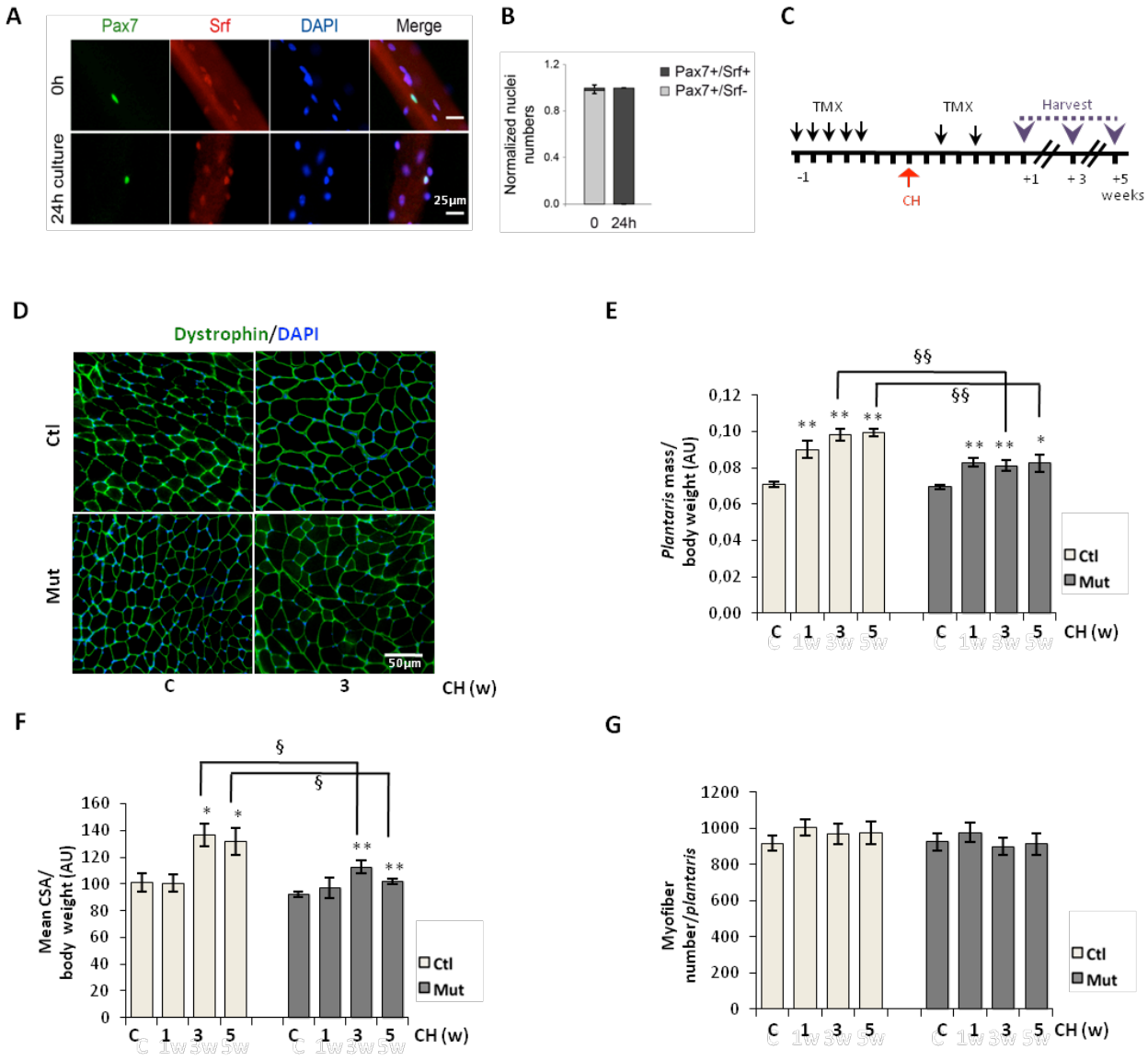


Figure 1: *Srf* loss in SCs results in compensatory hypertrophy deficiency in *plantaris* muscle

(A) Immunostaining for Pax7 (green) and Srf (red) to illustrate Srf expressing satellite cells (Pax7+Srf+) on single fibers fixed immediately after isolation (0h – quiescent SCs) or maintained in culture for 24h (activated SCs).

(B) Proportion of satellite cell displaying or not Srf expression (Pax7+/Srf+ and Pax7+/Srf- respectively).

(C) Srf mutant mice were injected with tamoxifen (TMX) one week before compensatory hypertrophy (CH) procedure and after CH. Plantaris muscles were isolated 1, 3 and 5 weeks post surgery.

(D) Plantaris muscle sections immunostained for Dystrophin (green) and nuclear staining with DAPI for control (Ctl) and Srf mutant (Mut) mice before (c) and after 3 weeks of CH.

(E) Ratio of plantaris mass to body weight before (c) and after 1, 3 and 5 weeks of CH in control and mutant mice (n=5 to 14).

(F) Ratio of CSA to body weight before (c) and after 1, 3 and 5 weeks of CH in control and mutant mice (n=5 to 14).

(G) Mean myofiber number before (c) and after 1, 3 and 5 weeks of CH in control and mutant mice (n=5 to 14).

Data are mean ± s.d. *p< 0.05 versus c, **p< 0.01 versus c, §p< 0.05, §§p< 0.01. AU, arbitrary units.

Figure S1

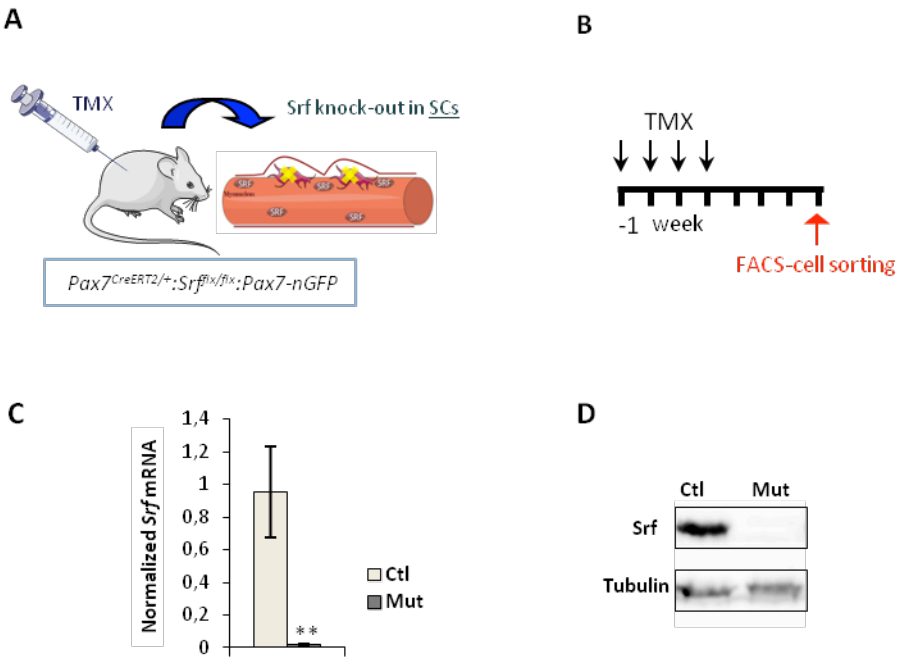


Figure S1: Validation of Srf deletion in satellite cells

(A) Schematic representation of the mouse model used. *Pax7$^{CreERT2/+}$:Srf$^{flx/flx}$:Pax7-nGFP* injected with tamoxifen (TMX) were refered as Mutants and mice untreated with TMX were used as Controls.

(B) Srf mutant mice were injected with tamoxifen (TMX) one week before FACS cell sorting of nGFP expressing satellite cells. Sorted SCs when the maintained in culture in complete medium.

(C) *Srf* mRNA expression was analysed by qRT-PCR in control and mutant cell-sorted satellite cells maintained in culture. Data (mean ± s.d.) were normalized by *Hmbs* expression. **p< 0.01 versus Ctl.

(D) Srf protein was analyzed by western blotting in control and mutant cell sorted satellites cells maintained in culture. Tubulin was used as a loading control.

Figure 2

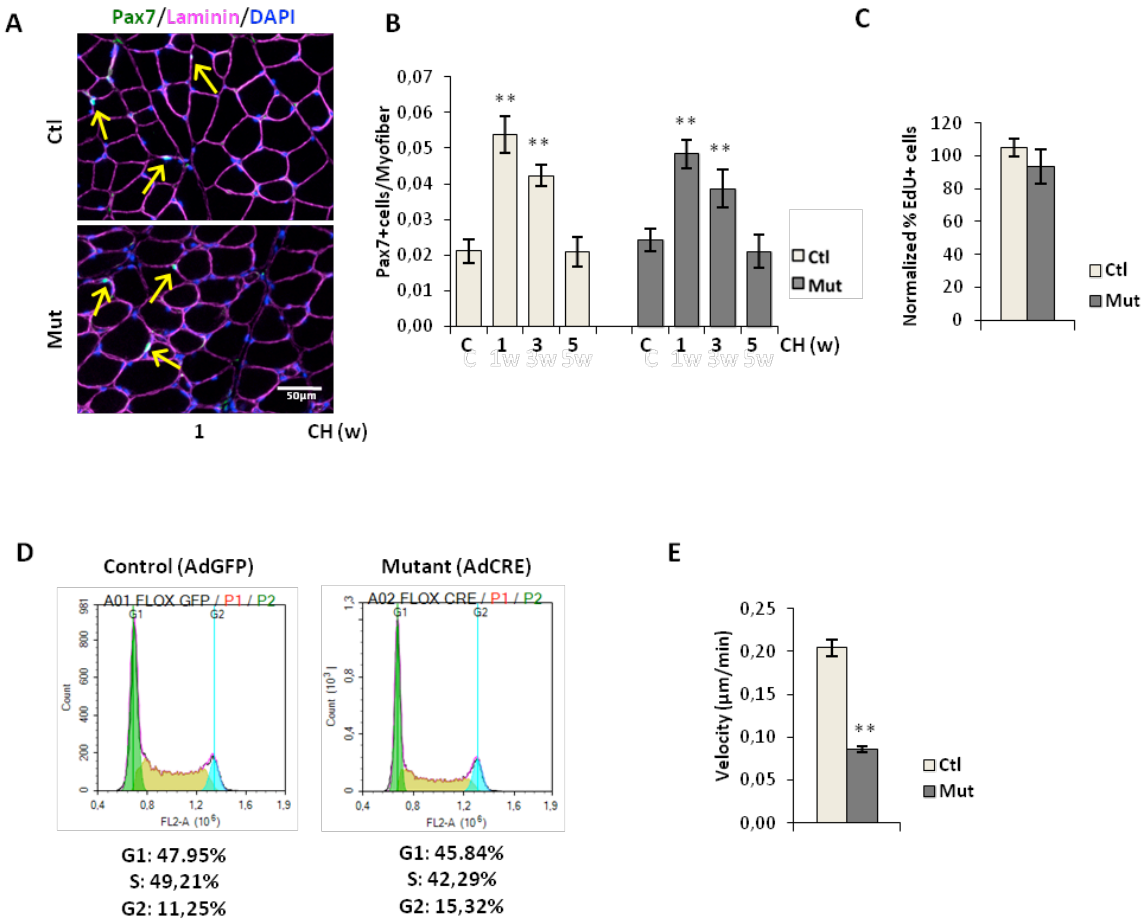


Figure 2: *Srf* loss within satellite cells does not impact their proliferation but impairs their motility

(A) Plantaris muscle section immunostained for Pax7 (green) and laminin (magenta) and nuclear staining with DAPI (blue) from control and mutant mice one week post CH.

(B) Number of Pax7+ cells per myofiber were quantified in control and mutant plantaris muscle sections before (c) and after 1, 3 and 5 weeks of CH (n=5 to 13).

(C) Normalized percentage of EdU+ cells in control and mutant FACS cell-sorted satellite cells cultured in rich medium for 5 days (n=6).

(D) Cell-cycle distribution of control (AdGFP) and mutant (AdCRE) myoblasts grown in rich medium, were analyzed by flow cytometry after propidium iodide staining. Percentages of cells in G1-phase, in S-phase, and in G2M-phase from one representative experiment are presented and have been processed with NovoExpress software (ACEA).

(E) Mean velocity (µm/min) of control and mutant myoblasts determined by time-laps video-microscopy (at least 100 cells analyzed per genotype).

Data are means ± s.d. **p< 0.01 versus c or versus Ctl.

Figure S2

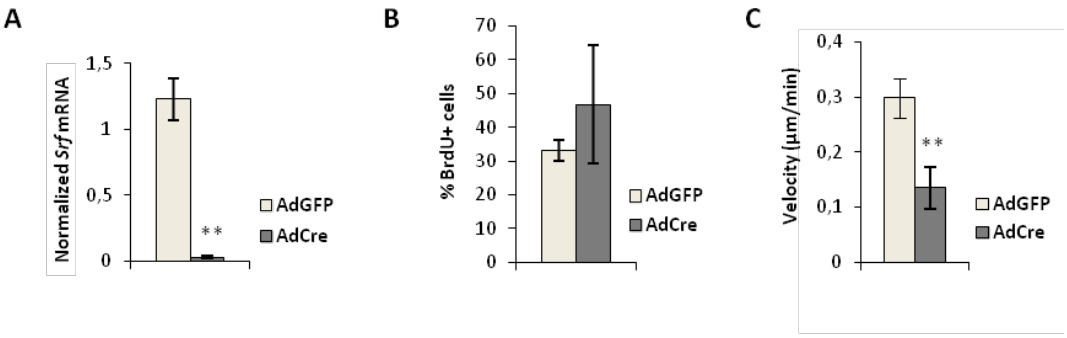


Figure S2: Ex vivo *Srf* loss does not impact myoblasts proliferation but impairs their motility

(A) *Srf* mRNA expression was analysed by qRT-PCR in $Srf^{lx/lx}$ myoblasts transduced with Ad-GFP or Ad-Cre to induce *Srf* loss. Data (mean ± s.d.) were normalized by *Hmbs* expression.

(B) Normalized percentage of BrdU+ cells in $Srf^{lx/lx}$ myoblasts transduced with Ad-GFP or Ad-Cre (n=3).

(C) Mean velocity (µm/min) of $Srf^{lx/lx}$ myoblasts transduced with Ad-GFP or Ad-Cre determined by time-laps video-microscopy (at least 100 cells analyzed per genotype).

Data are mean ± s.d. **p< 0.01 versus AdGFP.

Figure 3

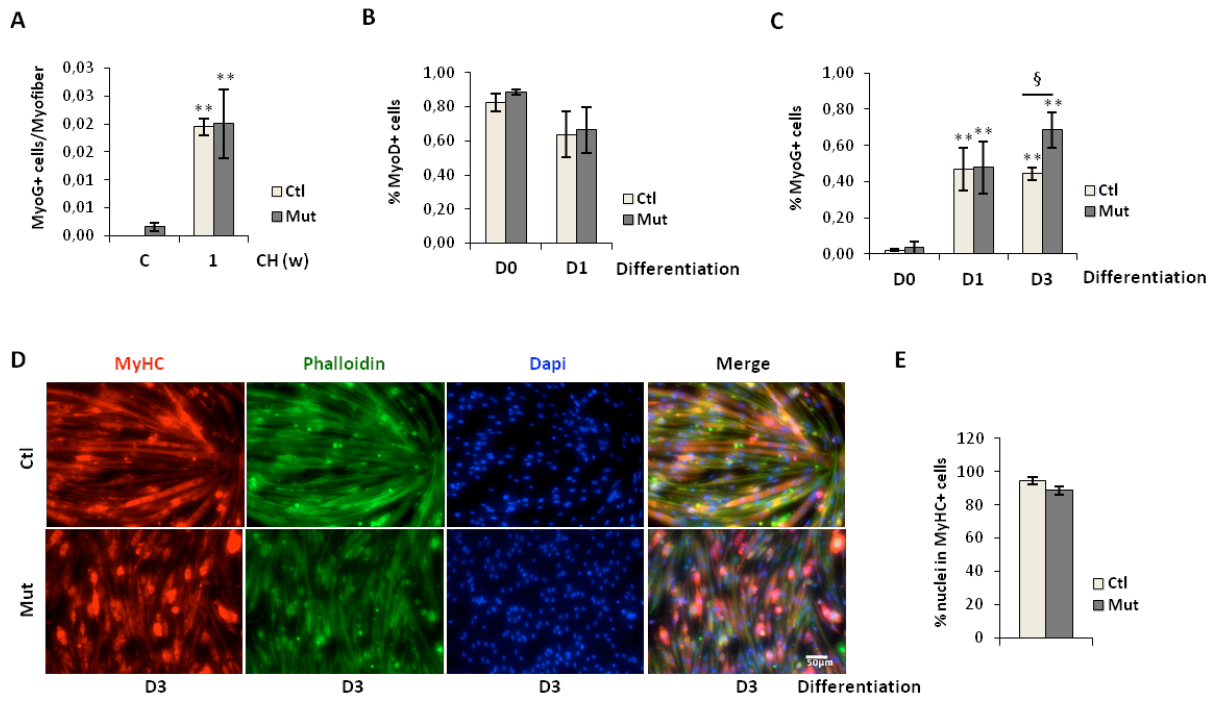


Figure 3: *Srf* loss does not affect myogenic differentiation of satellite cells

(A) Number of Myogenin+ (MyoG+) cells per myofiber were quantified in control and mutant plantaris muscle sections before (c) and after 1 week of CH (n=4 to 5).

(B) Percentage of MyoD+ cells in control and mutant FACS cell-sorted satellite cells cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after one day (D1) following differentiation induction (n=3).

(C) Percentage of Myogenin+ cells (MyoG+) in control and mutant FACS cell-sorted satellite cells cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after one (D1) and three (D3) days following differentiation induction (n=3).

(D) Immunostaining for Myosin Heavy Chain (MyHC) (red), nuclear staining with DAPI (blue) and F-actin staining with Phalloïdin (green) on control and mutant cells at day 3 post-differentiation induction.

(E) Percentage of nuclei in MyHC+ cells in control and mutant cells three days following differentiation induction (n=3).

Data are mean ± s.d. **p< 0.01 versus c or D0, §p< 0.05.

Figure S3

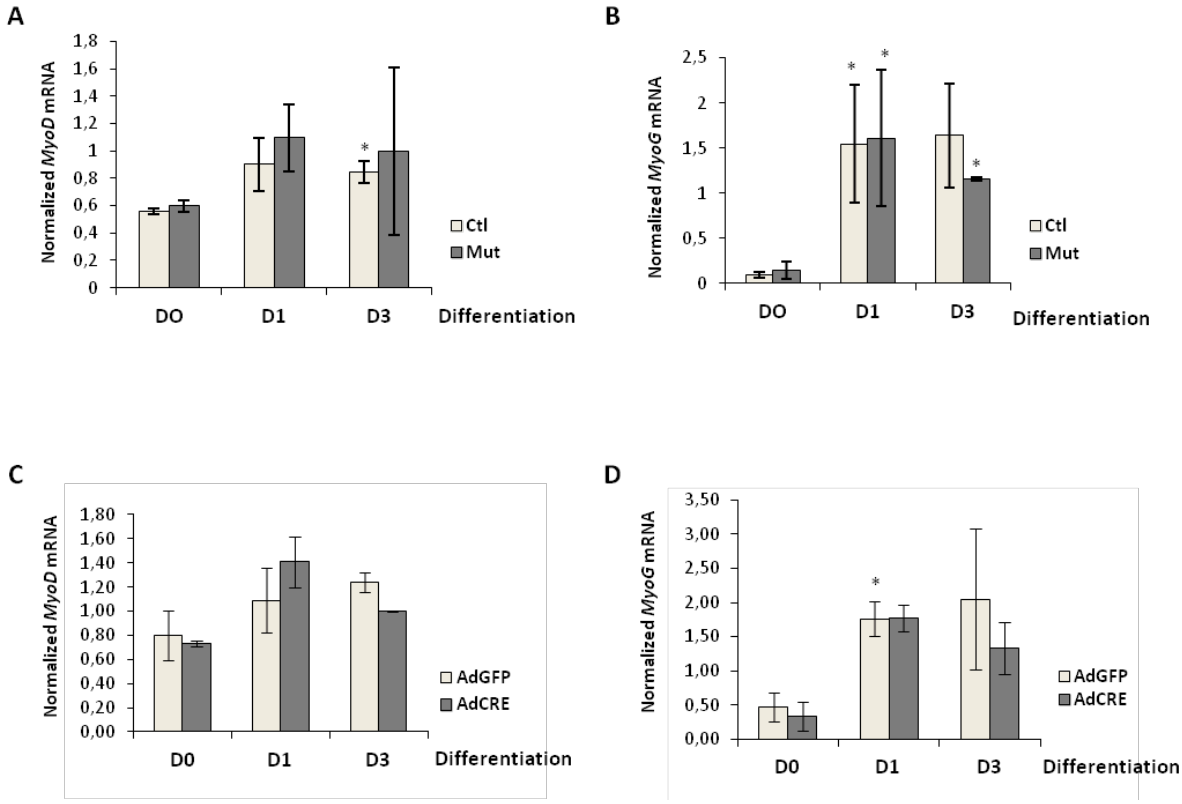


Figure S3: *Srf* loss does not impact *MyoD* and *Myogenin* expressions

(A) *MyoD* mRNA expression was analysed by qRT-PCR in FACS cell-sorted control and mutant satellite cells cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after one (D1) and three (D3) days following differentiation induction. Data (mean ± s.d.) were normalized by *Hmbs* expression (n=3).

(B) *Myogenin* mRNA (*MyoG*) expression was analysed by qRT-PCR in FACS cell-sorted control and mutant satellite cells cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after one (D1) and three (D3) days following differentiation induction. Data (mean ± s.d.) were normalized by *Hmbs* expression (n=3).

(C) *MyoD* mRNA expression was analysed by qRT-PCR in $Srf^{lx/lx}$ myoblasts transduced with Ad-GFP or Ad-Cre to induce *Srf* loss and cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after one (D1) and three (D3) days following differentiation induction . Data (mean ± s.d.) were normalized by *Hmbs* expression (n=3).

(D) *Myogenin* mRNA (*MyoG*) expression was analysed by qRT-PCR in $Srf^{lx/lx}$ myoblasts transduced with Ad-GFP or Ad-Cre to induce *Srf* loss and cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after one (D1) and three (D3) days following differentiation induction. Data (mean ± s.d.) were normalized by *Hmbs* expression (n=3).

Data are mean ± s.d. *p< 0.05 versus D0.

Figure 4

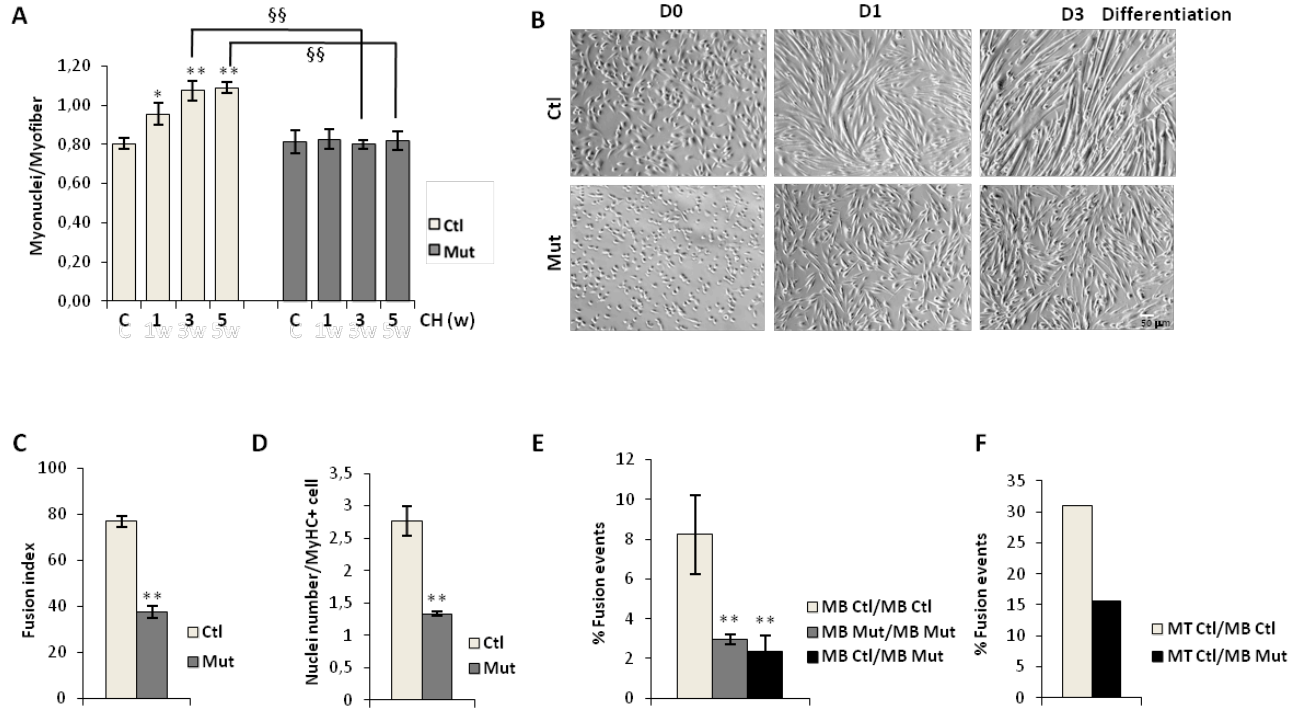


Figure 4: Srf controls satellite cell fusion

(A) Number of DAPI-stained nuclei within the dystrophin-positive sarcolemma was counted before (c) and after 1, 3 and 5 weeks of CH in control and mutant plantaris muscles and are expressed per myofiber (n=5 to 9). Data are mean ± s.d. *p< 0.05 versus c, **p< 0.01 versus c §§p< 0.01.

(B) Phase contrast representative pictures of FACS cell-sorted control and mutant satellite cells cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after one (D1) and three (D3) days following differentiation induction.

(C) Control and Srf mutant myoblasts were induced to differentiate for 3 days. After staining of nuclei with DAPI, the proportion of nuclei within multinucleated cells (fusion index) was calculated (n=3).

(D) The mean number of nuclei per MyHC+ cells was counted in control and mutant cells that were induced to differenciate for 3 days (n=3).

(E) Control or mutant myoblasts (MB Ctl or MB Mut) were labeled in green (green cell tracker) and mixed to control or mutant myoblasts labeled in red (orange cell tracker). After 48h of co-culture in differentiation media, myotubes were analyzed for dual labeling. The percentage of dual labeled cells per total number of nuclei (DAPI+) was scored (n=3).

(F) Control myotubes (MT Ctl) were labeled in green (green cell tracker) and mixed with control or mutant myoblasts (MB Ctl or MB Mut) labeled in red (orange cell traker). After 48h of co-culture, myotubes were analyzed for dual labeling. The percentage of dual labeled cells per total number of cells was scored.

For C, D, E, F data are mean ± s.d. **p< 0.01 versus Ctl.

Figure S4

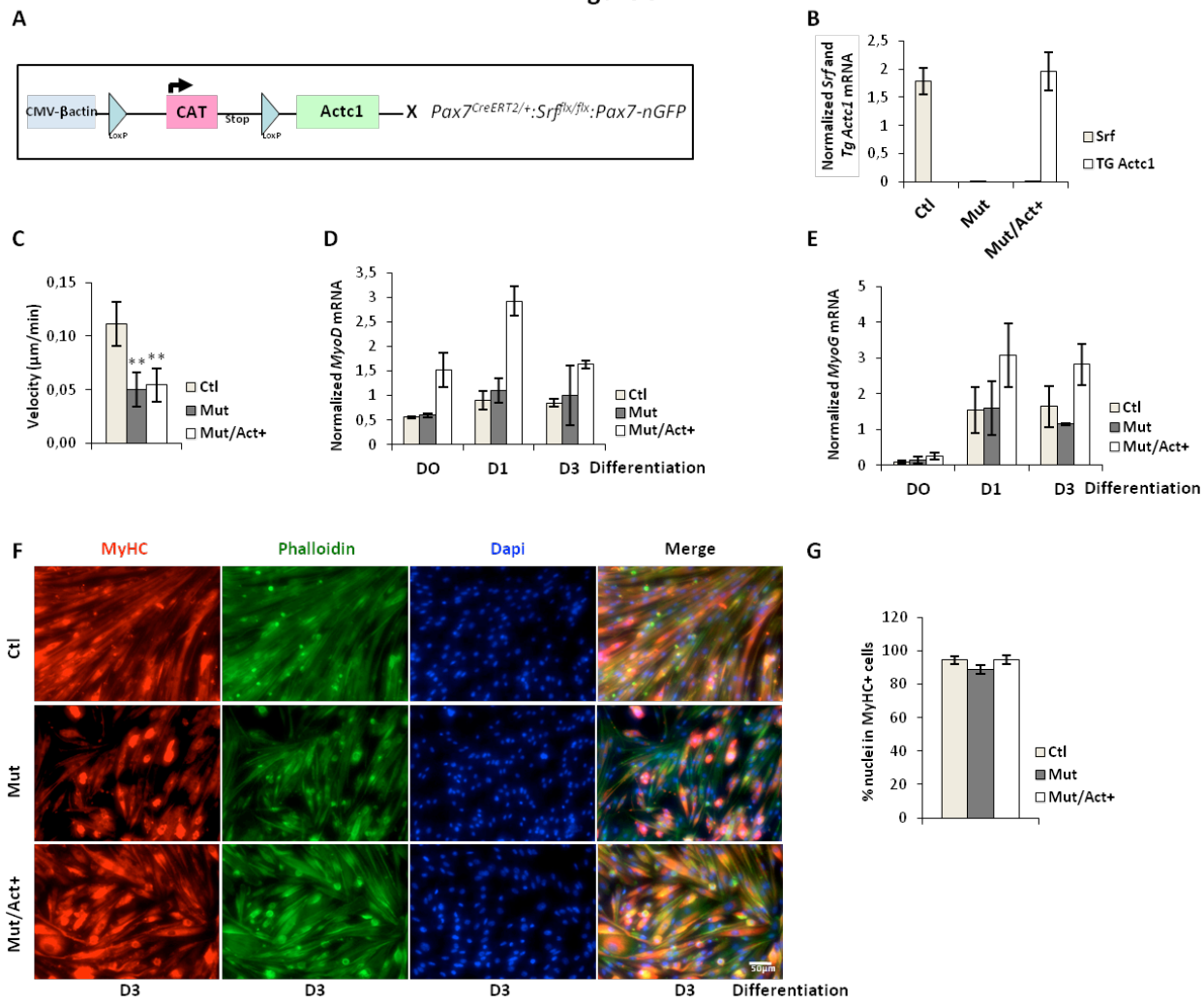


Figure S4: Alpha actin over-expression does not restore the reduced motility of Srf mutant cell and does not affect myogenic differentiation

(A) Schematic description of the genetic model allowing the concomitant invalidation of Srf and Acta1 overexpression in satellite cells upon tamoxifen injection (*Pax7$^{CreERT2/+}$:Srf$^{flox/flox}$:Pax7-nGFP:CMV-flx-CAT-flx-Actc1* mice*).*

(B) *Srf* mRNA and exogenous rat *Actc1* expressions were analysed by qRT-PCR in control (Ctl), Srf mutant (Mut) and double mutant (Mut/Act+) cell-sorted satellite cells maintained in culture. Data (mean ± s.d.) were normalized by *Hmbs* expression.

(C) Mean velocity (µm/min) of control, Srf mutant and double mutant myoblasts determined by time-laps video-microscopy (more that 100 cells analyzed per genotype). Data are means ± s.d. **p< 0.01 versus c or versus Ctl.

(D) *MyoD* mRNA expression was analysed by qRT-PCR in FACS cell-sorted control, mutant and double mutant satellite cells cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after one (D1) and three (D3) days following differentiation induction. Data (mean ± s.d.) were normalized by *Hmbs* expression (n=3).

(E) *Myogenin* mRNA (*MyoG*) expression was analysed by qRT-PCR in FACS cell-sorted control, mutant and double mutant satellite cells cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after one (D1) and three (D3) days following differentiation induction. Data (mean ± s.d.) were normalized by *Hmbs* expression (n=3).

(F) Immunostaining for Myosin Heavy Chain (MyHC) (red), nuclear staining with DAPI (blue) and F-actin staining with Phalloïdin (green) on control, mutant and double mutant cells at day 3 post-differentiation induction.

(G) Percentage of nuclei in MyHC+ cells in control, mutant and double mutant cells three days following differentiation induction (n=2).

Figure 5

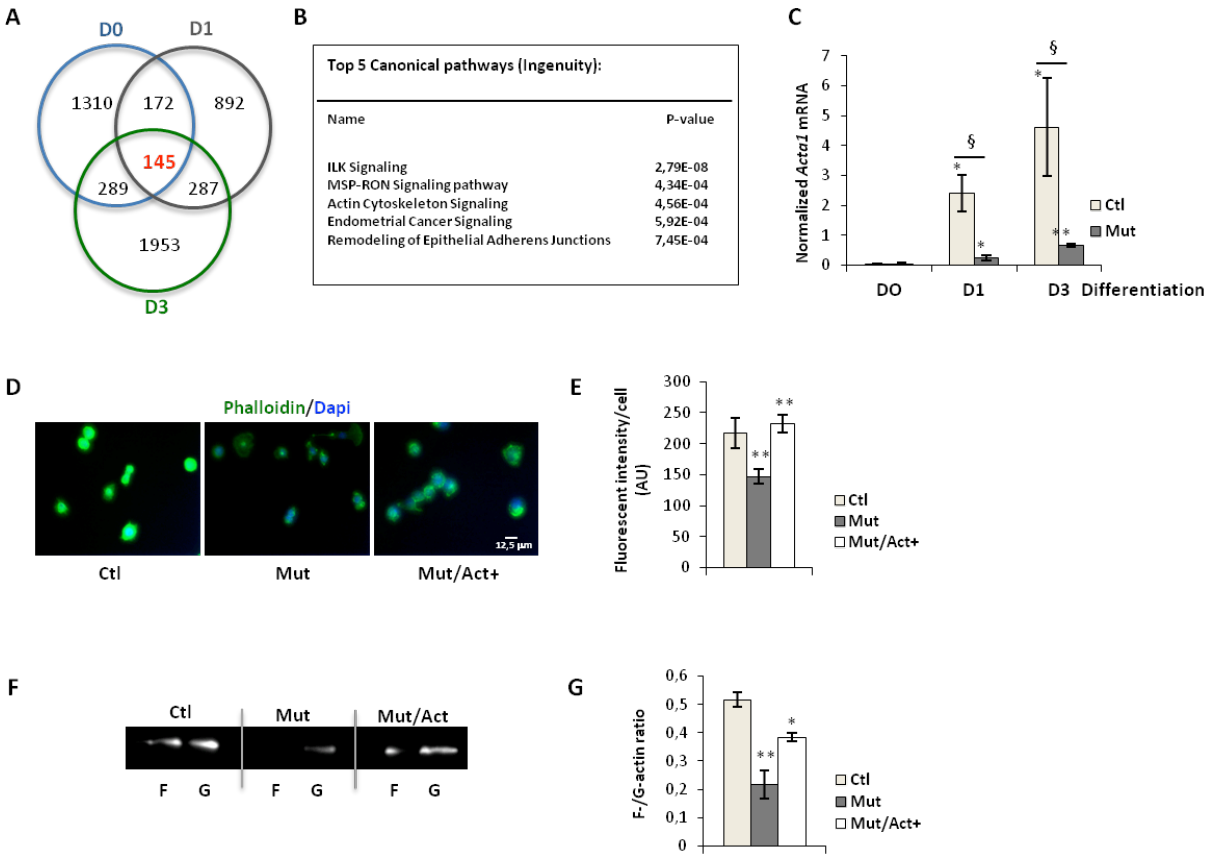


Figure 5: Alpha actin overexpression restores the impaired actin cytoskeleton organization of *Srf*-deleted myoblasts

(A) Venn diagram showing the intersection between of genes differentially regulated by Srf (p value< 0,05) in myoblasts (D0), in myocytes et the onset of differentiation (D1) and in differentiated cells (D3) expressing or not Srf ($Srf^{lx/lx}$ myoblasts transduced with AdGFP or AdCre). In red is indicated the number of genes (145) than are modulated by Srf independently of the differentiation state of muscle cells.

(B) Top five canonical pathways identified by gene ontology analysis using Ingenuity of the 145 common genes whose expressions are Srf-dependent.

(C) *Alpha skeletal actin* mRNA (*Acta1*) expression was analysed by qRT-PCR in FACS cell-sorted control and mutant satellite cells cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after one (D1) and three (D3) days following differentiation induction. Data (mean ± s.d.) were normalized by *Hmbs* expression (n=3).

(D) Staining for F-actin (Phalloidin, green) and for nuclei (DAPI, blue) on control (Ctl), *Srf*-deleted (Mut) myoblasts and *Srf*-deleted myoblasts overexpressing alpha actin (Mut/Act+).

(E) Quantification of F-actin by measuring the total phalloidin fluorescence intensity per cell (Image J) in control (Ctl), *Srf*-deleted (Mut) myoblasts and Srf-deleted myoblasts overexpressing alpha actin (Mut/Act+) (at least 150 cells analyzed per genotype).

(F) Representative immunoblot showing actin in the insoluble (F) versus soluble (G) fractions in control (Ctl), *Srf*-deleted (Mut) myoblasts and *Srf*-deleted myoblasts overexpressing alpha actin (Mut/Act+).

(G) Quantification of the F-/G-actin ratio from immunoblots (n=4).

Data are mean ± s.d. *p< 0.05 versus Ctl or D0, **p< 0.01 versus Ctl or D0, §p< 0.05.

Figure S5

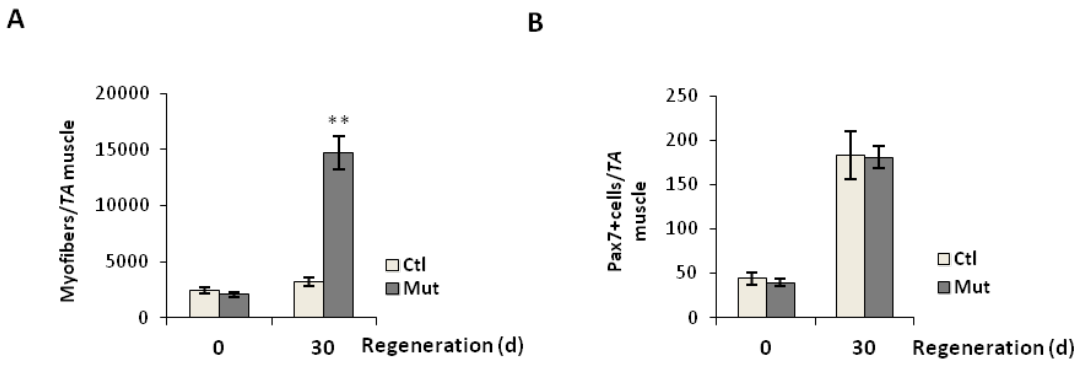


Figure S5: Regeneration of control and Srf mutant muscle

(A) Mean myofiber number of control (Ctl) and Srf mutant (Mut) *tibialis anterior* muscles before and 30 days post CTX-induced injury (n=5 to 6).

(B) Number of Pax7+ cells per myofiber were quantified in control (Ctl) and Srf mutant (Mut) *tibialis anterior* muscles before and 30 days post CTX-induced injury (n=5 to 6).

Figure 6

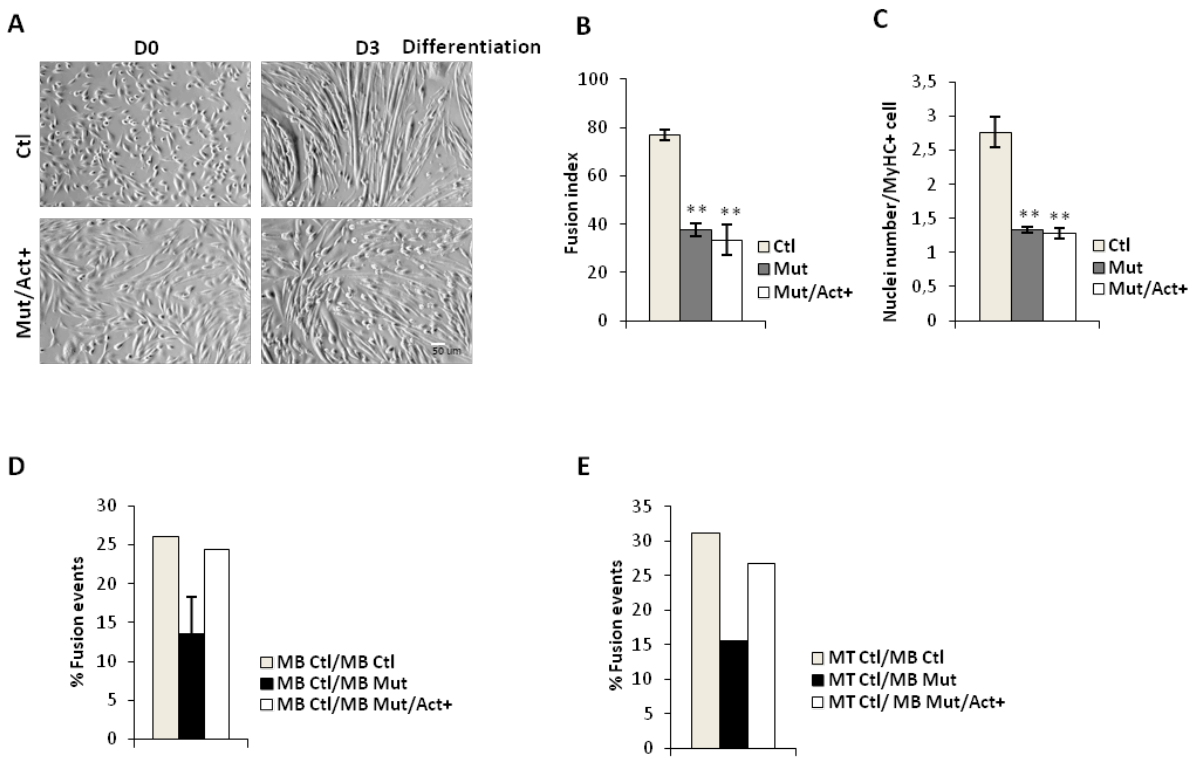


Figure 6: Alpha actin overexpression in myoblasts lacking Srf restores asymmetric fusion

(A) Phase contrast representative pictures of FACS cell-sorted control (Ctl) and double mutant (Mut/Act+) satellite cells cultured in rich medium (D0, myoblasts) or after three (D3) days following differentiation induction.

(B) Control, Srf mutant (Mut) and double mutant (Mut/Act+) myoblasts were induced to differentiate for 3 days. After staining of nuclei with DAPI, the proportion of nuclei within multinucleated cells (fusion index) was calculated (n=3).

(C) The mean number of nuclei per MyHC+ cells was counted in control, Srf mutant (Mut) and double mutant (Mut/Act+) cells that were induced to differenciate for 3 days (n=3).

(D) Control, mutant or double mutant myoblasts (MB Ctl, MB Mut or MB Mut/Act+) were labeled in green (green cell tracker) and mixed to control myoblasts labeled in red (orange cell tracker). After 48h of co-culture in differentiation media, myotubes were analyzed for dual labeling. The percentage of dual labeled cells per total number of nuclei was scored.

(E) Control myotubes (MT Ctl) were labeled in green (green cell tracker) and mixed with control, mutant or double mutant myoblasts (MB Ctl, MB Mut or MB Mut/Act+) labeled in red (orange cell traker). After 48h of co-culture, myotubes were analyzed for dual labeling. The percentage of dual labeled cells per total number of cells was scored.

Data are mean ± s.d. **p< 0.01 versus Ctl.

Figure 7

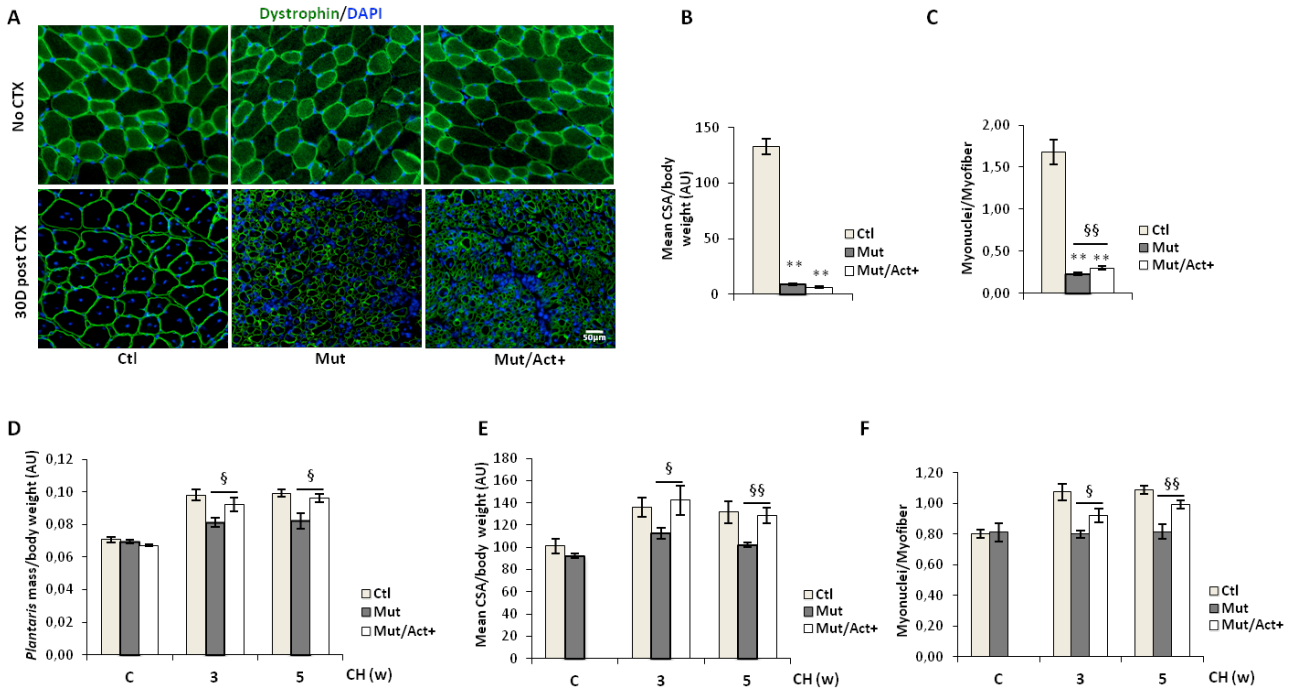


Figure 7: Alpha actin overexpression in Srf-deleted satellite cells rescues fusion and hypertrophic growth upon overload

(A) Tibialis anterior muscle sections immunostained for Dystrophin (green) and nuclear staining with DAPI for control (Ctl), Srf mutant (Mut) and double mutant (Mut/Act+) mice untreated (NO CTX) and 30 days following cardiotoxin-induced muscle injury (30D post-CTX).

(B) Ratio of CSA to body weight of regenerated tibialis anterior muscles 30 days post CTX-induced injury in control (Ctl), Srf mutant (Mut) and double mutant (Mut/Act+) mice (n=4 to 7).

(C) Number of DAPI-stained nuclei within the dystrophin-positive sarcolemma was counted in regenerated tibialis anterior muscles 30 days post CTX-induced injury of control (Ctl), Srf mutant (Mut) and double mutant (Mut/Act+) mice are expressed per myofiber (n=5 to 11).

(D) Ratio of plantaris mass to body weight before (c) and after 3 and 5 weeks of CH in control (Ctl), Srf mutant (Mut) and double mutant (Mut/Act+) mice (n=5 to 12).

(E) Ratio of CSA to body weight before (c) and after 3 and 5 weeks of CH in control (Ctl), Srf mutant (Mut) and double mutant (Mut/Act+) mice (n=5 to 12).

(F) Number of DAPI-stained nuclei within the dystrophin-positive sarcolemma was counted before (c) and after 3 and 5 weeks of CH in in control (Ctl), Srf mutant

(Mut) and double mutant (Mut/Act+) mice plantaris muscles and are expressed per myofiber (n=5 to 9).

Data are mean ± s.d., **p< 0.01 versus Ctl, §p< 0.05, §§p< 0.01. AU, arbitrary units.

Table S1

Molecule Name	Full Name	Entrez Gene ID for Mouse
0610009L18Rik	RIKEN cDNA 0610009L18 gene	66838
1700086L19Rik	RIKEN cDNA 1700086L19 gene	74284
1700095B10Rik	RIKEN cDNA 1700095B10 gene	67360
2810410L24Rik	RIKEN cDNA 2810410L24 gene	100042332
4833423E24Rik	RIKEN cDNA 4833423E24 gene	228151
4933403O08Rik	RIKEN cDNA 4933403O08 gene	71030
ABHD17C	abhydrolase domain containing 17C	70178
ABRA	actin-binding Rho activating protein	223513
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	11475
ACTB	actin, beta	11461
ACTR3	ARP3 actin-related protein 3	74117
Adam4/Gm4787	a disintegrin and metallopeptidase domain 4	214321|11498
APOE	apolipoprotein E	11816
ARHGAP29	Rho GTPase activating protein 29	214137
ARL4A	ADP-ribosylation factor-like 4A	11861
ASGR1	asialoglycoprotein receptor 1	11889
ASPA	aspartoacylase	11484
AZIN2	antizym inhibitor 2	242669
BLVRB	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	233016
C20orf24	chromosome 20 open reading frame 24	67388
C820005J03Rik	RIKEN cDNA C820005J03 gene	319979
C8orf4	chromosome 8 open reading frame 4	69068
C9orf16	chromosome 9 open reading frame 16	73737
CA3	carbonic anhydrase 3	12350
CAMK2N1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	66259
CD68	CD68 antigen	12514
CNN2	calponin 2	12798
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	12826
COPRS	coordinator of PRMT5, differentiation stimulator	66423
CSRP1	cysteine and glycine-rich protein 1	13007
CSTF2T	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA subunit 2, tau	83410
CTNNA1	catenin (cadherin associated protein), alpha 1	12385
DCXR	dicarbonyl L-xylulose reductase	67880
DIO2	deiodinase, iodothyronine, type II	13371
DIRAS2	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 2	68203
DUSP2	dual specificity phosphatase 2	13537
ECM1	extracellular matrix protein 1	13601
EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	13628
EGR1	early growth response 1	13653
EMCN	endomucin	59308
EME1	essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe)	268465
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	13866
F630040K05Rik	RIKEN cDNA F630040K05 gene	433111
FAF1	Fas-associated factor 1	14084
FAM167A	family with sequence similarity 167, member A	219148
FAM171A2	family with sequence similarity 171, member A2	217219
FAM53B	family with sequence similarity 53, member B	77938
FBXO4	F-box protein 4	106052
FERMT2	fermitin family homolog 2 (Drosophila)	218952
FHL1	four and a half LIM domains 1	14199
FHL2	four and a half LIM domains 2	14200
FLNA	filamin, alpha	192176
FRAS1	Fraser syndrome 1 homolog (human)	231470
GADD45G	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	23882
GCHFR	GTP cyclohydrolase I feedback regulator	320415
Gm6978	predicted gene 6978	629480
Gm7056	predicted gene 7056	631105
Gm20603	predicted gene 20603	100503553
GML	GPI anchored molecule like protein	15202|625599
GNA13	guanine nucleotide binding protein, alpha 13	14674
GPNMB	glycoprotein (transmembrane) nmb	93695
GSTM1	glutathione S-transferase, mu 1	14863
Gucy2g	guanylate cyclase 2g	73707
HPSE	heparanase	15442
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	66141
IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7	29817
IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma chain	16186
ILK	integrin linked kinase	16202
ITGB1BP2	integrin beta 1 binding protein 2	26549
KCNAB2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	16498
KLF5	Kruppel-like factor 5	12224
KLK3	Kallikrein related peptidase 3	18048|16622|16612|16616|16619|13646|18050|16624|16623|16613|16615|16617|16618|13648

Molecule Name	Full Name	Entrez Gene ID for Mouse
KRT18	keratin 18	16668
LARGE	like-glycosyltransferase	16795
LAYN	layilin	244864
LBH	limb-bud and heart	77889
LDLR	low density lipoprotein receptor	16835
LILRB3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	18733|18726|18729|18725|18722|100038909|100041146
LIMA1	LIM domain and actin binding 1	65970
LSP1	lymphocyte specific 1	16985
MAPKAPK2	MAP kinase-activated protein kinase 2	17164
MARVELD1	MARVEL (membrane-associating) domain containing 1	277010
MARVELD2	MARVEL (membrane-associating) domain containing 2	218518
ME3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	109264
MED14	mediator complex subunit 14	26896
MED12L	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog (yeast)-like	329650
MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	211666
MPDU1	mannose-P-dolichol utilization defect 1	24070
MRPS6	mitochondrial ribosomal protein S6	121022
MS4A10	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 10	69826
MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3	320183
MYADM	myeloid-associated differentiation marker	50918
MYL9	myosin, light polypeptide 9, regulatory	98932
MYO18B	myosin XVIIIb	74376
NAB2	Ngfi-A binding protein 2	17937
Ngp	neutrophilic granule protein	18054
NMB	neuromedin B	68039
NUDT14	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 14	66174
NXT2	nuclear transport factor 2-like export factor 2	237082
OXCT1	3-oxoacid CoA transferase 1	67041
PARP8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	52552
PCDH19	protocadherin 19	279653
PDLIM7	PDZ and LIM domain 7	67399
PFAS	phosphoribosylformylglycinamidine synthase (FGAR amidotransferase)	237823
PIK3CB	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide	74769
PLA2G10	phospholipase A2, group X	26565
Plpp1	phospholipid phosphatase 1	19012
PLTP	phospholipid transfer protein	18830
PPP2R3A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B'', alpha	235542
PRSS23	protease, serine, 23	76453
PTGES3L	prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)-like	73635
REEP6	receptor accessory protein 6	70335
RFTN2	raftlin family member 2	74013
RSU1	Ras suppressor protein 1	20163
SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	70097
SBK3	SH3 domain binding kinase family member 3	381835
SDHD	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	66925
SEMA3C	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	20348
Serpina1f	Serpina1f	68348
SH3BP2	SH3-domain binding protein 2	24055
SLC9A3R2	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 2	65962
Snora41	small nucleolar RNA, H/ACA box41	100217464
Sorbs2os	sorbin and SH3 domain containing 2, opposite strand	319940
SRF	serum response factor	20807
SVIL	supervillin	225115
SYT13	synaptotagmin XIII	80976
Tac4	tachykinin 4	93670
TAGLN	transgelin	21345
TBC1D1	TBC1 domain family, member 1	57915
TGFB1I1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	21804
TMEM109	transmembrane protein 109	68539
TNC	tenascin C	21923
Tpm1	tropomyosin 1	22003
Tpm4	tropomyosin 4	326618
TRAF3IP3	TRAF3 interacting protein 3	215243
TSC22D1	TSC22 domain family, member 1	21807
TSPO2	translocator protein 2	70026
UBALD1	UBA-like domain containing 1	207740
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	22235
Vmn1r214 (includes others)	vomeronasal 1 receptor 214	171273|100312485
WDR1	WD Repeat Domain 1	22388
ZBBX	Zinc Finger Protein B-Box Domain Containing	213234
ZBTB41	Zinc Finger and BTB Domain Containing 41	226470
ZNF365	Zinc Finger Protein	216049
ZNF878	Zinc Finger Protein	170938

Table S1: List of the genes whose expressions in muscle cells depend on Srf

Transcriptomic analysis of genes regulated by Srf in myoblasts ($Srf^{lx/lx}$) transduced with AdGFP or AdCre adenoviruses (D0) and during the course of differentiation (D1 and D3). This list represents the 145 genes that are regulation by Srf in myoblasts (D0) and in differentiating cells (D1 and D3) with a p value < 0.05 versus AdGFP.

Annexe 3

Novembre 2016 : Poster et présentation orale “poster flash” aux 14èmes Journées de la Société Française de Myologie, Bordeaux

REFERENCES

[1] H. Sasaki, F. Kasagi, M. Yamada, and S. Fujita, “Grip Strength Predicts Cause-Specific Mortality in Middle-Aged and Elderly Persons,” *Am. J. Med.*, vol. 120, pp. 37–342, 2007.
[2] K. Garg and M. D. Boppart, “Influence of exercise and aging on extracellular matrix composition in the skeletal muscle stem cell niche,” *J Appl Physiol*, vol. 121, pp. 1053–1058, 2016.
[3] F. Relaix and P. S. Zammit, “Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage,” *Development*, vol. 139, no. 16, pp. 2845–56, 2012.
[4] C. F. Bentzinger, Y. X. Wang, M. A. Rudnicki, C. F. Bentzinger, Y. X. Wang, and M. A. Rudnicki, “Building Muscle : Molecular Regulation of Myogenesis Building Muscle : Molecular Regulation of Myogenesis,” pp. 1–16, 2012.
[5] J. Gros, M. Manceau, V. Thomé, and C. Marcelle, “A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells.,” *Nature*, vol. 435, no. 7044, pp. 954–958, 2005.
[6] R. Ben-Yair and C. Kalcheim, “Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates,” *Development*, vol. 132, no. 4, pp. 689–701, 2005.
[7] M. H. Parker, P. Seale, and M. A. Rudnicki, “Looking back to the embryo : defining transcriptional networks in adult myogenesis,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 4, pp. 495–505, 2003.
[8] N. A. Dumont, Y. X. Wang, and M. A. Rudnicki, “Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function.,” *Development*, vol. 142, no. 9, pp. 1572–1581, 2015.
[9] A. Mauro, “Satellite Cell of Skeletal Muscle Fibers,” *J. Biophys Biochem Cytol*, vol. 9, pp. 493–498, 1961.
[10] H. Clevers, “STEM CELLS. What is an adult stem cell?,” *Science*, vol. 350, no. 6266, pp. 1319–20, 2015.
[11] T. Zhang, S. Günther, M. Looso, C. Künne, M. Krüger, J. Kim, Y. Zhou, and T. Braun, “Prmt5 is a regulator of muscle stem cell expansion in adult mice.,” *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 7140, 2015.
[12] T. H. Cheung, N. L. Quach, G. W. Charville, L. Liu, L. Park, A. Edalati, B. Yoo, P. Hoang, and T. A. Rando, “Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489.,” *Nature*, vol. 482, no. 7386, pp. 524–8, 2012.
[13] K. Kuroda, S. Tani, S. Minoguchi, T. Honjo, J. B. Chem, K. Tamura, and H. Kurooka, “Delta-induced Notch Signaling Mediated by RBP-J Inhibits MyoD Expression and Myogenesis Delta-induced Notch Signaling Mediated by RBP-J Inhibits MyoD Expression and Myogenesis *,” *J Biol Chem*, vol. 274, no. 11, pp. 7238–7244, 1999.
[14] L. Machado and F. Relaix, “Heterochromatin compaction is regulated by Suv4-20h1 to maintains skeletal muscle stem cells quiescence,” pp. 4–6, 2016.
[15] P. Bonaldo and M. Sandri, “Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy.,” *Dis. Model. Mech.*, vol. 6, no. 1, pp. 25–39, 2013.
[16] S. Schiaffino and C. Reggiani, “Fiber types in mammalian skeletal muscles.,” *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 4, pp. 1447–531, 2011.
[17] S. Gudbjarnason, P. Mathes, and G. Ravens, “Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, pp. 325–339, 1970.
[18] Bessman SP, “Hexokinase acceptor theory of insulin action. New evidence.,” *Isr J Med Sci.*, vol. 8(3):344-5, 1972.
[19] Lohmann K, “Über die enzymatische aufspaltung der kreatinphosphorsäure;Zugleich ein beitrag zum chemismus der muskelkontrakion,” *Biochem*, vol. 271, pp. 264–277, 1934.
[20] Scholte H.R, “The separation and enzymatic characterization of inner and outer membranes of rat-heart mitochondria,” *Biochim Biophys*, p. 330(3):283-93, 1973.
[21] Wyss M., Smeitink J, Wevers RA, and Wallimann T, “Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism,” *Biochim Biophys*, p. 1102:119-66, 1992.
[22] Ventura-Clapier R, Kaasik A, and Veksler V, “Structural and functional adaptations of striated muscles to CK deficiency.,” *Mol Cell Biochem*, pp. 256-257–41, 2004.
[23] Saks VA, Kuznetsov AV, Vendelin M, Guerrero K, Kay L, and Seppet EK, “Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism.,” *Mol Cell Biochem*,

pp. 256-257–99, 2004.
[24] Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, Eder M, Hornemann T, Kraft T, and Stolz M, “Creatine kinase: an enzyme with a central role in cellular energy metabolism.,” *magma*, p. 6:116-9, 1998.
[25] L. Guimarães-Ferreira, “Role of the phosphocreatine system on energetic homeostasis in skeletal and cardiac muscles Papel do sistema da fosfocreatina na homeostase energética das musculaturas esquelética e cardíaca,” vol. 12, no. 1, pp. 126–31, 2014.
[26] I. Momken, P. Lechêne, N. Koulmann, D. Fortin, P. Mateo, B. T. Doan, J. Hoerter, X. Bigard, V. Veksler, and R. Ventura-Clapier, “Impaired voluntary running capacity of creatine kinase-deficient mice.,” *J. Physiol.*, vol. 565, no. 2005, pp. 951–964, 2005.
[27] P. Dzeja and A. Terzic, “Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing,” *International Journal of Molecular Sciences*. pp. 1729–1772, 2009.
[28] Dzeja P, Kalvenas A, Toleikis A, and Praskevicius A, “The effect of adenylate kinase activity on the rate and efficiency of energy transport from mitochondria to hexokinase.,” *Biochem Int.*, p. 10(2):259-65, 1985.
[29] Dzeja PP, Zeleznikar RJ, and Goldberg ND, “Suppression of Creatine Kinase-catalyzed Phosphotransfer Results in Increased Phosphoryl Transfer by Adenylate Kinase in Intact Skeletal Muscle,” *J. Biol. Chem.*, pp. 12847–12851, 1996.
[30] E. Janssen, P. P. Dzeja, F. Oerlemans, a W. Simonetti, a Heerschap, a de Haan, P. S. Rush, R. R. Terjung, B. Wieringa, and a Terzic, “Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement.,” *EMBO J.*, vol. 19, no. 23, pp. 6371–6381, 2000.
[31] R. Zeleznikar, P. Dzeja, and N. Goldberg, “Adenylate Kinase-catalyzed Phosphoryl Transfer Couples ATP Utilization with Its Generation by Glycolysis in Intact Muscle,” *J. Biol. Chem.*, p. 270(13):7311-9, 1995.
[32] R. Thomas Jagoe and A. L. Goldberg, “What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy?,” *Opin Clin Nutr Metab Care*, p. 4(3):183-90, 2001.
[33] C. Rommel, S. Bodine, and B. Clarke, “Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. November, p. 1009, 2001.
[34] S. C. Bodine, T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, a Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass, and G. D. Yancopoulos, “Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 11, pp. 1014–1019, 2001.
[35] Coleman ME, DeMayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C, and Schwartz RJ, “Myogenic vector expression of Insulin-like Growth Factor I stimulates mucle cell differentiation and myofiber hypertrophy transgenic mice.,” *J Biol Chem*, p. 19, 12109–12116., 1995.
[36] Lipina C, Kendall H, McPherron AC, Taylor PM, and Hundal HS, “Mechanisms involved in the Enhancement of Mammalian Target of Rapamycin Signalling and Hypertrophy in Skeletal Muscle of Myostatin-deficient Mice,” *NIH*, p. 584(11): 2403–2408, 2010.
[37] C. Barbé, S. Kalista, A. Loumaye, O. Ritvos, P. Lause, B. Ferracin, and J.-P. Thissen, “Role of IGF-I in follistatin-induced skeletal muscle hypertrophy,” *Am J Physiol Endocrinol Metab*, p. 309(6):E557-67, 1995.
[38] D. J. Glass, “Signaling pathways perturbing muscle mass.,” *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 13, no. 3, pp. 225–229, 2010.
[39] D. C. Fingar, S. Salama, C. Tsou, E. Harlow, and J. Blenis, “Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1 / eIF4E,” pp. 1472–1487, 2002.
[40] M. Sandri, “Signaling in muscle atrophy and hypertrophy.,” *Physiology (Bethesda).*, vol. 23, no. 3, pp. 160–70, 2008.
[41] L. R. Smith, G. Meyer, and R. L. Lieber, “Systems analysis of biological networks in skeletal

muscle function," *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 5, no. 1, pp. 55–71, 2013.
[42] K. V Lai, M. Gonzalez, W. T. Poueymirou, W. O. Kline, E. Na, E. Zlotchenko, N. Trevor, A. N. Economides, G. D. Yancopoulos, D. J. Glass, and T. N. Stitt, "Conditional Activation of Akt in Adult Skeletal Muscle Induces Rapid Hypertrophy Conditional Activation of Akt in Adult Skeletal Muscle Induces Rapid Hypertrophy," vol. 24, no. 21, pp. 9295–9304, 2004.
[43] S. Schiaffino, K. A. Dyar, S. Ciciliot, B. Blaauw, and M. Sandri, "Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy," *FEBS J.*, vol. 280, no. 17, pp. 4294–4314, 2013.
[44] B. F. Miller, J. L. Olesen, M. Hansen, S. Døssing, R. M. Crameri, R. J. Welling, H. Langberg, A. Flyvbjerg, M. Kjaer, J. A. Babraj, K. Smith, and M. J. Rennie, "Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise," *J Physiol*, vol. 5673, pp. 1021–1033, 2005.
[45] J. W. Frey, B. L. Jacobs, C. A. Goodman, and T. A. Hornberger, "A role for Raptor phosphorylation in the mechanical activation of mTOR signaling," *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 2, pp. 313–322, 2014.
[46] G. Milan, V. Romanello, F. Pescatore, A. Armani, J.-H. Paik, L. Frasson, A. Seydel, J. Zhao, R. Abraham, A. L. Goldberg, B. Blaauw, R. A. DePinho, and M. Sandri, "Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy.," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 6670, 2015.
[47] M. Sandri, C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, and E. Calabria, "Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy- Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy," *Cell*, vol. 117, pp. 1–2, 2004.
[48] T. N. Stitt, D. Drujan, B. A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyva, W. O. Kline, M. Gonzalez, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass, "The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors," *Mol. Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 395–403, 2004.
[49] J. L. Ruas, J. P. White, R. R. Rao, S. Kleiner, K. T. Brannan, B. C. Harrison, N. P. Greene, J. Wu, J. L. Estall, B. A. Irving, I. R. Lanza, K. A. Rasbach, M. Okutsu, K. S. Nair, Z. Yan, L. A. Leinwand, and B. M. Spiegelman, "A PGC-1alpha isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy," *Cell*, p. 151(6):1319-3, 2012.
[50] A. M. Bennett and N. K. Tonks, "Regulation of Distinct Stages of Skeletal Muscle Differentiation by Mitogen Activated Protein Kinases," *Science (80-.).*, vol. 278, no. 5341, pp. 1288–1291, 1997.
[51] F. Lluís, E. Ballestar, M. Suelves, M. Esteller, and P. Muñoz-Cánoves, "E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription.," *EMBO J.*, vol. 24, no. 5, pp. 974–84, 2005.
[52] H. Amthor, G. Nicholas, I. McKinnell, C. F. Kemp, M. Sharma, R. Kambadur, and K. Patel, "Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis," *Dev. Biol.*, vol. 270, no. 1, pp. 19–30, 2004.
[53] W. M. H. Hoogaars, E. Mouisel, A. Pasternack, J. J. Hulmi, K. Relizani, M. Schuelke, E. Schirwis, L. Garcia, O. Ritvos, A. Ferry, P. a 't Hoen, and H. Amthor, "Combined effect of AAV-U7-induced dystrophin exon skipping and soluble activin Type IIB receptor in mdx mice.," *Hum. Gene Ther.*, vol. 23, no. 12, pp. 1269–79, 2012.
[54] S. J. Lee and a C. McPherron, "Regulation of myostatin activity and muscle growth.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 16, pp. 9306–11, 2001.
[55] L. Grobet, D. Pirottin, F. Farnir, D. Poncelet, L. J. Royo, B. Brouwers, E. Christians, D. Desmecht, F. Coignoul, R. Kahn, and M. Georges, "Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene," *Genesis*, vol. 35, no. 4, pp. 227–238, 2003.
[56] McPherron AC, Lawler AM, and Lee SJ, "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.," *Nature*, p. 387(6628):83-90, 1997.
[57] C. E. Winbanks, J. L. Chen, H. Qian, Y. Liu, B. C. Bernardo, C. Beyer, K. I. Watt, R. E. Thomson, T. Connor, B. J. Turner, J. R. McMullen, L. Larsson, S. L. McGee, C. A. Harrison, and P. Gregorevic, "The bone morphogenetic protein axis is a positive regulator of skeletal muscle mass.," *J. Cell*

Biol., vol. 203, no. 2, pp. 345–57, 2013.
[58] S. Kalista, O. Schakman, H. Gilson, P. Lause, B. Demeulder, L. Bertrand, M. Pende, and J. P. Thissen, "The type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) pathway is mandatory for the follistatin-induced skeletal muscle hypertrophy," *Endocrinology*, vol. 153, no. 1, pp. 241–253, 2012.
[59] C. E. Winbanks, K. L. Weeks, R. E. Thomson, P. V. Sepulveda, C. Beyer, H. Qian, J. L. Chen, A. M. Allen, G. I. Lancaster, M. A. Febbraio, C. A. Harrison, J. R. McMullen, J. S. Chamberlain, and P. Gregorevic, "Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin," *J. Cell Biol.*, vol. 197, no. 7, pp. 997–1008, 2012.
[60] U. Andersson, K. Filipsson, C. R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S. R. Bloom, D. Carling, and C. J. Small, "Accelerated Publication AMP-activated Protein Kinase Plays a Role in the Control of Food Intake *," pp. 12005–12009, 2004.
[61] C. Semsarian, M.-J. Wu, Y.-K. Ju, T. Marciniec, T. Yeoh, D. G. Allen, R. P. Harvey, and R. M. Graham, "Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca2+-dependent calcineurin signalling pathway," *Nature*, vol. 400, no. 6744, pp. 576–581, 1999.
[62] K. Sakuma, J. Nishikawa, R. Nakao, K. Watanabe, T. Totsuka, H. Nakano, M. Sano, and M. Yasuhara, "Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2.," *Acta Neuropathol.*, vol. 105, no. 3, pp. 271–280, 2003.
[63] B. B. Friday, P. O. Mitchell, K. M. Kegley, and G. K. Pavlath, "Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD," *Differentiation*, vol. 71, no. 3, pp. 217–227, 2003.
[64] Friday BB, Horsley V, and Pavlath GK, "Calcineurin Activity Is Required for the Initiation of Skeletal Muscle Differentiation," vol. 149, no. 3, pp. 657–665, 2000.
[65] Friday BB and Pavlath GK, "A calcineurin- and NFAT-dependent pathway regulates Myf5 gene expression in skeletal muscle reserve cells.," *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. Pt 2, pp. 303–10, 2001.
[66] M. D. Mavalli, D. J. Digirolamo, Y. Fan, R. C. Riddle, K. S. Campbell, T. Van Groen, S. J. Frank, M. A. Sperling, K. A. Esser, M. M. Bamman, and T. L. Clemens, "Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice," vol. 120, no. 11, pp. 4007–4020, 2010.
[67] I. M. Egner, J. C. Bruusgaard, and K. Gundersen, "Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle," *Development*, vol. 143, no. 16, pp. 2898–2906, 2016.
[68] J. J. McCarthy, J. Mula, M. Miyazaki, R. Erfani, K. Garrison, A. B. Farooqui, R. Srikuea, B. A. Lawson, B. Grimes, C. Keller, G. Van Zant, K. S. Campbell, K. A. Esser, E. E. Dupont-Versteegden, and C. A. Peterson, "Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle," *Development*, vol. 138, no. 17, pp. 3657–3666, Sep. 2011.
[69] H. Amthor, A. Otto, A. Vulin, A. Rochat, J. Dumonceaux, L. Garcia, E. Mouisel, C. Hourdé, R. Macharia, M. Friedrichs, F. Relaix, P. S. Zammit, A. Matsakas, K. Patel, and T. Partridge, "Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 18, pp. 7479–7484, 2009.
[70] R. Qaisar, G. Renaud, K. Morine, E. R. Barton, H. L. Sweeney, and L. Larsson, "Is functional hypertrophy and specific force coupled with the addition of myonuclei at the single muscle fiber level?," *FASEB J.*, vol. 26, no. 3, pp. 1077–1085, 2012.
[71] A. Raffaello, G. Milan, E. Masiero, S. Carnio, D. Lee, G. Lanfranchi, A. L. Goldberg, and M. Sandri, "JunB transcription factor maintains skeletal muscle mass and promotes hypertrophy," *J. Cell Biol.*, vol. 191, no. 1, pp. 101–113, 2010.
[72] J. C. Bruusgaard, A. S. Brack, S. M. Hughes, and K. Gundersen, "Muscle hypertrophy induced by the Ski protein: Cyto-architecture and ultrastructure," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 185, no. 2, pp. 141–149, 2005.
[73] Qaisar R and Larsson L, "What determines myonuclear domain size?," *Indian J Physiol Pharmacol*, p. 58(1):1-12, 2014.
[74] S. B. P. Chargé, A. S. Brack, and S. M. Hughes, "Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*,

vol. 283, pp. C1228–C1241, 2002.
[75] C. L. Mendias, E. Kayupov, J. R. Bradley, S. V Brooks, and D. R. Claflin, “Decreased specific force and power production of muscle fibers from myostatin-deficient mice are associated with a suppression of protein degradation.,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 111, no. 1985, pp. 185–191, 2011.
[76] H. Amthor, R. Macharia, R. Navarrete, M. Schuelke, S. C. Brown, A. Otto, T. Voit, F. Muntoni, G. Vrbóva, T. Partridge, P. Zammit, L. Bunger, and K. Patel, “Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 6, pp. 1835–40, 2007.
[77] T. A. Washington, J. P. White, J. M. Davis, L. B. Wilson, L. L. Lowe, S. Sato, and J. A. Carson, “Skeletal muscle mass recovery from atrophy in IL-6 knockout mice,” *Acta Physiol.*, vol. 202, no. 4, pp. 657–669, 2011.
[78] M. J. Puppa, J. P. White, K. T. Velázquez, K. A. Baltgalvis, S. Sato, J. W. Baynes, and J. A. Carson, “The effect of exercise on IL-6-induced cachexia in the ApcMin/+ mouse,” *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle*, vol. 3, no. 2, pp. 117–137, 2012.
[79] A. Guerci, C. Lahoute, S. Hebrard, L. Collard, D. Graindorge, M. Favier, N. Cagnard, S. Batonnet-Pichon, G. Precigout, L. Garcia, D. Tuil, D. Daegelen, and A. Sotiropoulos, “Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy,” *Cell Metab.*, vol. 15, no. 1, pp. 25–37, 2012.
[80] B. K. Pedersen and M. A. Febbraio, “Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6.,” *Physiol. Rev.*, vol. 88, no. 4, pp. 1379–406, 2008.
[81] Y. Aida, K. Honda, S. Tanigawa, G. Nakayama, H. Matsumura, N. Suzuki, O. Shimizu, O. Takeichi, M. Makimura, and M. Maeno, “IL-6 and soluble IL-6 receptor stimulate the production of MMPs and their inhibitors via JAK–STAT and ERK–MAPK signalling in human chondrocytes,” *Cell Biol. Int.*, vol. 36, no. 4, pp. 367–376, 2012.
[82] W. J. Evans, “Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity.,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 91, no. 4, p. 1123S–1127S, 2010.
[83] N. A. Stephens, I. J. Gallagher, O. Rooyackers, R. J. Skipworth, B. H. Tan, T. Marstrand, J. A. Ross, D. C. Guttridge, L. Lundell, K. C. Fearon, and J. A. Timmons, “Using transcriptomics to identify and validate novel biomarkers of human skeletal muscle cancer cachexia,” *Genome Med.*, vol. 2, no. 1, p. 1, 2010.
[84] L. C. O’Brien and A. S. Gorgey, “Skeletal muscle mitochondrial health and spinal cord injury.,” *World J. Orthop.*, vol. 7, no. 10, pp. 628–637, 2016.
[85] M. A. Pellegrino, J.-F. Desaphy, L. Brocca, S. Pierno, D. C. Camerino, and R. Bottinelli, “Redox homeostasis, oxidative stress and disuse muscle atrophy.,” *J. Physiol.*, vol. 589, no. Pt 9, pp. 2147–60, 2011.
[86] S. K. Powers, E. E. Talbert, and P. J. Adhihetty, “Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle.,” *J. Physiol.*, vol. 589, no. Pt 9, pp. 2129–2138, 2011.
[87] L. Zuo and B. K. Pannell, “Redox characterization of functioning skeletal muscle,” *Front. Physiol.*, vol. 6, no. NOV, pp. 1–9, 2015.
[88] S. H. Lecker, A. L. Goldberg, and W. E. Mitch, “Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 7, pp. 1807–1819, 2006.
[89] Glover EI, Yasuda N, Tarnopolsky MA, Abadi A, and Phillips SM, “Little change in markers of protein breakdown and oxidative stress in humans in immobilization-induced skeletal muscle atrophy,” *Appl. Physiol. Nutr. Metab*, p. 35(2):125-33, 2010.
[90] N. Mizushima, B. Levine, A. M. Cuervo, and D. J. Klionsky, “Autophagy fights disease through cellular self-digestion.,” *Nature*, vol. 451, no. 7182, pp. 1069–75, 2008.
[91] Sandri M, “Protein breakdown in muscle wasting : Role of autophagy-lysosome,” *Biol. Cell*, vol. 45, pp. 2121–2129, 2013.
[92] D. Voges, P. Zwickl, and W. Baumeister, “The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis.,” *Annu. Rev. Biochem*, p. 68:1015-68, 1999.

[93] S. C. Bodine, E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, and B. A. Clarke, “Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy,” vol. 294, no. November, p. 294(5547):1704-8, 2001.
[94] S. W. Jones, R. J. Hill, P. a Krasney, B. O. Conner, N. Peirce, and P. L. Greenhaff, “The Regulation of Skeletal Muscle Mass,” vol. 27, no. 4, pp. 1–27, 2004.
[95] C. L. Wu, S. C. Kandarian, and R. W. Jackman, “Identification of genes that elicit disuse muscle atrophy via the transcription factors p50 and Bcl-3,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, 2011.
[96] S. K. Powers, A. J. Smuder, and D. S. Criswell, “Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy.,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 15, no. 9, pp. 2519–28, 2011.
[97] S. K. Powers, A. Smuder, and A. Judge, “Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence?,” *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, p. 15(3):240-5, 2012.
[98] M. Taveau, N. Bourg, G. Sillon, C. Roudaut, M. Bartoli, and I. Richard, “Calpain 3 Is Activated through Autolysis within the Active Site and Lyses Sarcomeric and Sarcolemmal Components,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 24, pp. 9127–9135, 2003.
[99] D. E. Goll, V. F. Thompson, H. Li, W. Wei, and J. Cong, “The Calpain System,” *Physiol. Rev.*, vol. 83, no. 3, pp. 731–801, 2003.
[100] I. Hajimohammadreza, K. J. Raser, R. Nath, R. Nadimpalli, M. Scott, and K. K. W. Wang, “Neuronal Nitric Oxide Synthase and Calmodulin-Dependent Protein Kinase ha Undergo Neurotoxin-Induced Proteolysis,” pp. 1006–1013, 1997.
[101] Tallant EA, Brumley LM, and Wallace RW, “Activation of a calmodulin-dependent phosphatase by a Ca2+-dependent protease,” *Biochemistry*, p. 27(6):2205-11, 1988.
[102] J. Du, X. Wang, C. Miereles, J. L. Bailey, R. Debigare, B. Zheng, S. R. Price, and W. E. Mitch, “Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions,” *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 1, pp. 115–123, 2004.
[103] J. M. McClung, A. N. Kavazis, K. C. DeRuisseau, D. J. Falk, M. A. Deering, Y. Lee, T. Sugiura, and S. K. Powers, “Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 175, no. 2, pp. 150–159, 2007.
[104] L. Dalla Libera, B. Ravara, V. Gobbo, E. Tarricone, M. Vitadello, G. Biolo, G. Vescovo, and L. Gorza, “A transient antioxidant stress response accompanies the onset of disuse atrophy in human skeletal muscle.,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 107, no. 2, pp. 549–57, 2009.
[105] K. a Reich, Y.-W. Chen, P. D. Thompson, E. P. Hoffman, and P. M. Clarkson, “Forty-eight hours of unloading and 24 h of reloading lead to changes in global gene expression patterns related to ubiquitination and oxidative stress in humans.,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 109, pp. 1404–1415, 2010.
[106] Papaconstantinou J, “Insulin/IGF-1 and ROS signaling pathway cross-talk in aging and longevity determination,” *Mol Cell Endocrinol*, p. 299(1):89-100, 2009.
[107] P. A. Tesch, F. Von Walden, T. Gustafsson, R. M. Linnehan, and T. A. Trappe, “Skeletal muscle proteolysis in response to short-term unloading in humans,” *J Appl Physiol*, vol. 105, pp. 902–906, 2008.
[108] M. T. Webster, U. Manor, J. Lippincott-Schwartz, and C. M. Fan, “Intravital Imaging Reveals Ghost Fibers as Architectural Units Guiding Myogenic Progenitors during Regeneration,” *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 2, pp. 243–252, 2016.
[109] P. Seale, L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M. A. Rudnicki, “Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells,” *Cell*, vol. 102, no. 6, pp. 777–786, Sep. 2000.
[110] A. Otto, C. Schmidt, G. Luke, S. Allen, P. Valasek, F. Muntoni, D. Lawrence-Watt, and K. Patel, “Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration.,” *J. Cell Sci.*, vol. 121, pp. 2939–2950, 2008.
[111] Murphy MM, Keefe AC, Lawson JA, Flygare SD, Yandell M, and Kardon G, “Transiently active Wnt/β-catenin signaling is not required but must be silenced for stem cell function during muscle regeneration.,” *Stem Cell Reports*, p. 3(3):475-88, 2014.
[112] F. D. Price, J. von Maltzahn, C. F. Bentzinger, N. A. Dumont, H. Yin, N. C. Chang, D. H. Wilson, J.

Frenette, and M. A. Rudnicki, “Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function.,” *Nat. Med.*, vol. 20, no. 10, pp. 1174–81, 2014.
[113] M. T. Tierney, T. Aydogdu, D. Sala, B. Malecova, S. Gatto, P. L. Puri, L. Latella, and A. Sacco, “STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair.,” *Nat. Med.*, vol. 20, no. 10, pp. 1182–6, 2014.
[114] I. M. Conboy and T. A. Rando, “The Regulation of Notch Signaling Controls Satellite Cell Activation and Cell Fate Determination in Postnatal Myogenesis,” *Dev. Cell*, vol. 10, no. 2, pp. 1–13, 2002.
[115] T. Kitamoto and K. Hanaoka, “Notch3 null mutation in mice causes muscle hyperplasia by repetitive muscle regeneration,” *Stem Cells*, vol. 28, no. 12, pp. 2205–2216, 2010.
[116] L. Arnold, A. Henry, F. Poron, Y. Baba-amer, N. Van Rooijen, A. Plonquet, R. K. Gherardi, and B. Chazaud, “Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiin fl ammatory macrophages to support myogenesis,” *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 5, pp. 1057–1069, 2007.
[117] J. G. Tidball, “Inflammation in Skeletal Muscle Regeneration,” *Skelet. Muscle Repair Regen.*, vol. Advances i, no. Skeletal Muscle Repair and Regeneration, pp. 243–268, 2008.
[118] J. E. Heredia, L. Mukundan, F. M. Chen, A. A. Mueller, R. C. Deo, R. M. Locksley, T. A. Rando, and A. Chawla, “Type 2 Innate Signals Stimulate Fibro / Adipogenic Progenitors to Facilitate Muscle Regeneration,” *Cell*, vol. 153, pp. 376–388, 2013.
[119] D. Burzyn, W. Kuswanto, D. Kolodin, J. L. Shadrach, M. Cerletti, Y. Jang, E. Sefik, T. G. Tan, A. J. Wagers, C. Benoist, and D. Mathis, “A Special Population of Regulatory T Cells Potentiates Muscle Repair,” *Cell*, vol. 155, pp. 1282–1295, 2013.
[120] S. A. Villalta, W. Rosenthal, L. Martinez, A. Kaur, J. G. Tidball, M. Margeta, M. J. Spencer, and J. A. Bluestone, “Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy,” *Sci Transl Med.*, vol. 6, no. 258, pp. 1–22, 2016.
[121] S. P. Gadani, J. T. Walsh, J. Zheng, J. Kipnis, S. P. Gadani, J. T. Walsh, I. Smirnov, J. Zheng, and J. Kipnis, “The Glia-Derived Alarmin IL-33 Orchestrates the Immune Response and Promotes Recovery following CNS Injury,” *Cell Press Neuron*, vol. 85, pp. 703–709, 2015.
[122] D. Kolodin, N. Van Panhuys, C. Li, A. M. Magnuson, D. Cipolletta, C. M. Miller, A. Wagers, R. N. Germain, C. Benoist, and D. Mathis, “Antigen- and Cytokine-Driven Accumulation of Regulatory T Cells in Visceral Adipose Tissue of Lean Accumulation of Lean Mice,” *Cell Metab.*, vol. 21, pp. 543–557, 2015.
[123] K. K. Hak, S. L. Yong, U. Sivaprasad, A. Malhotra, and A. Dutta, “Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation,” *J. Cell Biol.*, vol. 174, no. 5, pp. 677–687, 2006.
[124] M. Cesana, D. Cacchiarelli, I. Legnini, T. Santini, O. Sthandier, M. Chinappi, A. Tramontano, and I. Bozzoni, “A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA,” *Cell*, vol. 147, no. 2, pp. 358–369, 2011.
[125] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, and Wang DZ, “The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation,” *Nat Genet*, p. 38(2):228-33, 2006.
[126] J. Lu, T. A. McKinsey, C.-L. Zhang, and E. N. Olson, “Regulation of Skeletal Myogenesis by Association of the MEF2 Transcription Factor with Class II Histone Deacetylases,” *Mol. Cell*, vol. 6, no. 2, pp. 233–244, 2000.
[127] T. a McKinsey, C. L. Zhang, J. Lu, and E. N. Olson, “Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation.,” *Nature*, vol. 408, no. 6808, pp. 106–111, 2000.
[128] R. Treisman, “Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element.,” *EMBO J.*, vol. 6, no. 9, p. 2711, 1987.
[129] R. Treisman and A. Klug, “Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element,” *EMBO J.*, vol. 6, no. 9, pp. 2711–2717, 1987.
[130] G. Posern and R. Treisman, “Actin’ together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction,” *Trends Cell Biol.*, vol. 16, no. 11, pp. 588–596, Nov. 2006.

[131] Treisman R, "Inside the MADS box," *Nature*, p. 376(6540):468-9, 1995.
[132] G. Schratt, B. Weinhold, A. S. Lundberg, S. Schuck, J. R. Berger, H. Schwarz, R. A. Weinberg, U. R. Ther, and A. Nordheim, "Serum Response Factor Is Required for Immediate-Early Gene Activation yet Is Dispensable for Proliferation of Embryonic Stem Cells," vol. 21, no. 8, pp. 2933–2943, 2001.
[133] S. Bahrami and F. Drablos, "Gene regulation in the immediate-early response process," *Advances in Biological Regulation*. p. 62:37-49, 2016.
[134] C. Gauthier-Rouviere, M. Vandromme, D. Tuil, N. Lautredou, M. Morris, M. Soulez, A. Kahn, A. Fernandez, and N. Lamb, "Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscle-determining factor MyoD in both dividing and differentiating mouse C2C12 myoblasts.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 7, no. 5, pp. 719–729, 1996.
[135] M. Soulez, D. Tuil, A. Kahn, and H. Gilgenkrantz, "The serum response factor (SRF) is needed for muscle-specific activation of CArG boxes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 219, no. 2, pp. 418–422, 1996.
[136] F. Miralles, G. Posern, A. I. Zaromytidou, and R. Treisman, "Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL," *Cell*, vol. 113, no. 3, pp. 329–342, 2003.
[137] E. N. Olson and A. Nordheim, "Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 5, pp. 353–365, May 2010.
[138] A. Sotiropoulos, D. Gineitis, J. Copeland, and R. Treisman, "Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics," *Cell*, vol. 98, no. 2, pp. 159–169, 1999.
[139] S. Yang, P. Shore, N. Willingham, J. H. Lakey, and A. D. Sharrocks, "The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1," *Embo J*, vol. 18, no. 20, pp. 5666–5674, 1999.
[140] G. Buchwalter, C. Gross, and B. Wasylyk, "Ets ternary complex transcription factors," *Gene*, vol. 324, no. 1–2, pp. 1–14, 2004.
[141] P. E. Shaw, H. Schröter, and A. Nordheim, "The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter," *Cell*, vol. 56, no. 4, pp. 563–572, 1989.
[142] M. A. Price, A. E. Rogers, and R. Treisman, "Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-i, SAP-la and SAP-2 (ERP/NET)," *Embo J*, vol. 14, no. 11, pp. 2589–2601, 1995.
[143] Hipskind RA, Roa VN, Muller CGF, Raddy ESP, and Nordheim A, "Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF," *Nature*, p. 354(6354):531-4, 1991.
[144] A.-I. Zaromytidou, F. Miralles, and R. Treisman, "MAL and ternary complex factor use different mechanisms to contact a common surface on the serum response factor DNA-binding domain.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 11, pp. 4134–48, 2006.
[145] Treisman R, "The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator.," *Semin Cancer Biol.*, p. 1(1):47-58, 1990.
[146] A. Minty and L. Kedes, "Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 6, no. 6, pp. 2125–2136, 1986.
[147] H. Ernst, K. Walsh, C. a Harrison, and N. Rosenthal, "The myosin light chain enhancer and the skeletal actin promoter share a binding site for factors involved in muscle-specific gene expression.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 11, no. 7, pp. 3735–44, 1991.
[148] G. C. T. Pipes, E. E. Creemers, and E. N. Olson, "The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis," *Genes Dev.*, vol. 20, no. 12, pp. 1545–1556, Jun. 2006.
[149] H. J. Klamut, S. B. Gangopadhyay, R. G. Worton, and P. N. Ray, "Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 193–205, 1990.
[150] C. Charvet, C. Houbron, A. Parlakian, J. Giordani, C. Lahoute, A. Bertrand, A. Sotiropoulos, L. Renou, A. Schmitt, J. Melki, Z. Li, D. Daegelen, and D. Tuil, "New Role for Serum Response

Factor in Postnatal Skeletal Muscle Growth and Regeneration via the Interleukin 4 and Insulin-Like Growth Factor 1 Pathways," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 17, pp. 6664–6674, 2006.
[151] M. Soulez, C. G. Rouviere, P. Chafey, D. Hentzen, M. Vandromme, N. Lautredou, N. Lamb, A. Kahn, and D. Tuil, "Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 11, pp. 6065–6074, Nov. 1996.
[152] M. Vandromme, C. Gauthier-Rouvière, G. Carnac, N. Lamb, and A. Fernandez, "Serum response factor p67SRF is expressed and required during myogenic differentiation of both mouse C2 and rat L6 muscle cell lines.," *J. Cell Biol.*, vol. 118, no. 6, pp. 1489–1500, 1992.
[153] C. Gauthier-Rouviere, M. Vandromme, D. Tuil, N. Lautredou, M. Morris, M. Soulez, A. Kahn, A. Fernandez, N. Lamb, and K. R. Yamamoto, "Expression and Activity of Serum Response Factor Is Required for Expression of the Muscle-determining Factor MyoD in Both Dividing and Differentiating Mouse C2C12 Myoblasts," *Mol. Biol. Cell*, vol. 7, pp. 719–729, 1996.
[154] S. Arsenian, B. Weinhold, M. Oelgeschläger, U. Rüther, and a Nordheim, "Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis.," *EMBO J.*, vol. 17, no. 21, pp. 6289–6299, 1998.
[155] C. Charvet, C. Houbron, A. Parlakian, J. Giordani, C. Lahoute, A. Bertrand, A. Sotiropoulos, L. Renou, A. Schmitt, J. Melki, Z. Li, D. Daegelen, and D. Tuil, "New Role for Serum Response Factor in Postnatal Skeletal Muscle Growth and Regeneration via the Interleukin 4 and Insulin-Like Growth Factor 1 Pathways," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 17, pp. 6664–6674, Sep. 2006.
[156] C. Lahoute, A. Sotiropoulos, M. Favier, I. Guillet-Deniau, C. Charvet, A. Ferry, G. Butler-Browne, D. Metzger, D. Tuil, and D. Daegelen, "Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor," *PLoS One*, vol. 3, no. 12, p. e3910, 2008.
[157] L. Collard, G. Herledan, A. Pincini, A. Guerci, V. Randrianarison-Huetz, and A. Sotiropoulos, "Nuclear actin and myocardin-related transcription factors control disuse muscle atrophy through regulation of Srf activity," *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. October, pp. 5157–5163, 2014.
[158] A. Parlakian, D. Tuil, G. Hamard, G. Tavernier, D. Hentzen, J.-P. Concordet, D. Paulin, Z. Li, and D. Daegelen, "Targeted Inactivation of Serum Response Factor in the Developing Heart Results in Myocardial Defects and Embryonic Lethality," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 12, pp. 5281–5289, 2004.
[159] C. Lepper, S. J. Conway, and C.-M. Fan, "Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements," *Nature*, vol. 460, no. 7255, pp. 627–631, Jul. 2009.
[160] R. Sambasivan, B. Gayraud-Morel, G. Dumas, C. Cimper, S. Paisant, R. G. Kelly, and S. Tajbakhsh, "Distinct Regulatory Cascades Govern Extraocular and Pharyngeal Arch Muscle Progenitor Cell Fates," *Dev. Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 810–821, Jun. 2009.
[161] P. Topilko, S. Schneider-Maunoury, G. Levi, a Trembleau, D. Gourdji, M. a Driancourt, C. V Rao, and P. Charnay, "Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 12, no. 1, pp. 107–122, 1998.
[162] F. Medja, S. Allouche, P. Frachon, C. Jardel, M. Malgat, B. M. de Camaret, A. Slama, J. Lunardi, J. P. Mazat, and A. Lombès, "Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis," *Mitochondrion*, vol. 9, no. 5, pp. 331–339, 2009.
[163] S. C. Bodine, V. K. Lai, L. Nunez, and B. A. Clarke, "Skeletal Muscle Atrophy Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy," *Science (80-.).*, vol. 1704, no. 2001, pp. 1704–1708, 2001.
[164] H. Beck, K. Flynn, K. S. Lindenberg, H. Schwarz, F. Bradke, S. Di Giovanni, and B. Knöll, "Serum Response Factor (SRF)-cofilin-actin signaling axis modulates mitochondrial dynamics.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 38, pp. E2523-32, 2012.
[165] D. G. Hardie, "AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis," *Curr Opin Cell Biol*, vol. 33c, pp. 1–7, 2014.
[166] W. J. Lee, M. Kim, H. S. Park, H. S. Kim, M. J. Jeon, K. S. Oh, E. H. Koh, J. C. Won, M. S. Kim, G. T. Oh, M. Yoon, K. U. Lee, and J. Y. Park, "AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol.

340, no. 1, pp. 291–295, 2006.
[167] Z. Wu, P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla, and B. M. Spiegelman, “Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1,” *Cell*, vol. 98, no. 1, pp. 115–124, 1999.
[168] B. G. Teodoro, I. H. Sampaio, L. H. M. Bomfim, A. L. Queiroz, L. R. Silveira, A. O. Souza, A. M. A. P. Fernandes, M. N. Eberlin, T. Huang, D. Zheng, P. D. Neufer, R. N. Cortright, and L. C. Alberici, “Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 6 regulates lipid synthesis and mitochondrial oxidative capacity in human and rat skeletal muscle,” *J. Physiol.*, vol. 0, no. June, pp. 1–27, 2016.
[169] J. S. Ju, A. S. Varadhachary, S. E. Miller, and C. C. Weihl, “Quantitation of ‘autophagic flux’ in mature skeletal muscle,” *Autophagy*, vol. 6, no. 7, pp. 929–935, 2010.
[170] Schneider MD, McLellan WR, Black FM, and Parker TG, “Growth factors, growth factor response elements, and the cardiac phenotype.,” *Basic Res Cardiol.*, p. 87 Suppl 2:33-48, 1992.
[171] B. Knöll, “Actin-mediated gene expression in neurons: The MRTF-SRF connection,” *Biol. Chem.*, vol. 391, no. 6, pp. 591–597, 2010.
[172] S. M. Hindi, M. M. Tajrishi, and A. Kumar, “Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion.,” *Sci. Signal.*, vol. 6, no. 272, p. re2, 2013.
[173] S. J. Nowak, P. C. Nahirney, A.-K. Hadjantonakis, and M. K. Baylies, “Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion,” *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. Pt 18, pp. 3282–3293, Sep. 2009.
[174] B. Knöll and A. Nordheim, “Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm,” *Trends in Neurosciences*. p. 32(8):432-42, 2009.
[175] Kharbanda S, Saleem A, Rubin E, Sukhatme V, Blenis J, and Kufe D, “Activation of the early growth response 1 gene and nuclear pp90rsk in human myeloid leukemia cells by 1-(beta-D-arabinofuranosyl)cytosine.,” *Biochemistry*, p. 32(35):9137-42, 1993.
[176] MacKinnon RN, Kannourakis G, Wall M, and Campbell LJ, “A cryptic deletion in 5q31.2 provides further evidence for a minimally deleted region in myelodysplastic syndromes.,” *Cancer Genet*, p. 204(4):187-94, 2011.
[177] J. M. Brown, K. Nemeth, N. M. Kushnir-Sukhov, D. D. Metcalfe, and E. Mezey, “Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism,” *Clin. Exp. Allergy*, vol. 41, no. 4, pp. 526–534, 2011.
[178] J. Li, J. Zhou, D. Zhang, Y. Song, J. She, and C. Bai, “Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance autophagy via PI3K/AKT signalling to reduce the severity of ischaemia/reperfusion-induced lung injury,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 19, no. 10, pp. 2341–2351, 2015.
[179] U. Philippar, G. Schratt, C. Dieterich, J. M. Müller, P. Galgóczy, F. B. Engel, M. T. Keating, F. Gertler, R. Schüle, M. Vingron, and A. Nordheim, “The SRF target gene Fhl2 antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF,” *Mol. Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 867–880, 2004.
[180] J. S. Hinson, M. D. Medlin, J. M. Taylor, and C. P. Mack, “Regulation of myocardin factor protein stability by the LIM-only protein FHL2.,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 295, no. 3, pp. H1067–H1075, 2008.
[181] M. Shibanuma, J. Mashimo, T. Kuroki, and K. Nose, “Characterization of the TGF beta 1-inducible hic-5 gene that encodes a putative novel zinc finger protein and its possible involvement in cellular senescence.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 43, pp. 26767–26774, 1994.
[182] S. M. Thomas, M. Hagel, and C. E. Turner, “Characterization of a focal adhesion protein, Hic-5, that shares extensive homology with paxillin.,” *J. Cell Sci.*, vol. 112 (Pt 2, pp. 181–190, 1999.
[183] X. Wang, G. Hu, C. Betts, E. Y. Harmon, R. S. Keller, L. Van De Water, and J. Zhou, “Transforming growth factor-béta1-induced transcript 1 protein, a novel marker for smooth muscle contractile phenotype, is regulated by serum response factor/myocardin protein,” *J. Biol. Chem.*, p. 286(48):41589-99, 2011.
[184] J. Kim-Kaneyama, W. Suzuki, K. Ichikawa, T. Ohki, Y. Kohno, M. Sata, K. Nose, and M. Shibanuma, “Uni-axial stretching regulates intracellular localization of Hic-5 expressed in

smooth-muscle cells in vivo.," *J. Cell Sci.*, vol. 118, pp. 937–949, 2005.
[185] N. Nishiya, Y. Iwabuchi, M. Shibanuma, J. F. Côté, M. L. Tremblay, and K. Nose, "Hic-5, a paxillin homologue, binds to the protein-tyrosine phosphatase PEST (PTP-PEST) through its LIM 3 domain," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 14, pp. 9847–9853, 1999.
[186] Yund E, Hill JA, and Keller RS, "Hic-5 is required for fetal gene expression and cytoskeletal organization of neonatal cardiac myocytes.," *J Mol Cell Cardiol*, p. 47(4):520-7, 2009.
[187] Y. Wang, Z. Zhang, H. Shen, Y. Lu, H. Li, X. Ren, and G. Wu, "TGF-β1/Smad7 Signaling Stimulates Renal Tubulointerstitial Fibrosis Induced by AAI," *J. Recept. Signal Transduct.*, vol. 28, no. 4, pp. 413–428, 2008.
[188] X. Yuan, L. Liu, Q. Fu, and C. Wang, "Effects of Ligustrazine on Ureteral Obstruction- induced Renal Tubulointerstitial Fibrosis," *Phytother. Res*, vol. 703, no. July 2011, pp. 697–703, 2012.
[189] L. B. Bindels and N. M. Delzenne, "Muscle wasting: The gut microbiota as a new therapeutic target?," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, no. 10, pp. 2186–2190, 2013.
[190] N. Mizushima and T. Yoshimori, "How to interpret LC3 immunoblotting," *Autophagy*, vol. 3, no. 6, pp. 542–545, 2007.
[191] K. Sakuma and A. Yamaguchi, "Serum Response Factor (SRF)-Dependent Signaling in Regenerating, Hypertrophied, and Pahological Skeletal Muscle," *Front. Pathol. Genet.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–8, 2013.
[192] G. Schratt, U. Philippar, J. Berger, H. Schwarz, O. Heidenreich, and A. Nordheim, "Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells," *J. Cell Biol.*, vol. 156, no. 4, pp. 737–750, Feb. 2002.
[193] P. K. Mattila and P. Lappalainen, "Filopodia: molecular architecture and cellular functions," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. June, pp. 446–454, 2008.
[194] Chen EH, "Invasive Podosomes and Myoblast Fusion," *Elsevier Inc*, p. 68:235-58, 2011.
[195] S. H. I. Xiaozhong, K. M. Bowlin, and D. J. Garry, "Fhl2 interacts with foxk1 and corepresses foxo4 activity in myogenic progenitors," *Stem Cells*, vol. 28, no. 3, pp. 462–469, 2010.
[196] Z. L. Gao, R. Deblis, H. Glenn, and L. M. Schwartz, "Differential roles of HIC-5 isoforms in the regulation of cell death and myotube formation during myogenesis," *Exp. Cell Res.*, vol. 313, no. 19, pp. 4000–4014, 2007.
[197] B. Blaauw and C. Reggiani, "The role of satellite cells in muscle hypertrophy," *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 35, no. 1, pp. 3–10, Feb. 2014.
[198] H. Yin, F. Price, and M. A. Rudnicki, "Satellite cells and the muscle stem cell niche," *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 1, pp. 23–67, Jan. 2013.
[199] N. A. Dumont, Y. X. Wang, and M. A. Rudnicki, "Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function," *Development*, vol. 142, no. 9, pp. 1572–1581, May 2015.
[200] I. Moretti, S. Ciciliot, K. A. Dyar, R. Abraham, M. Murgia, L. Agatea, T. Akimoto, S. Bicciato, M. Forcato, P. Pierre, N. H. Uhlenhaut, P. W. J. Rigby, J. J. Carvajal, B. Blaauw, E. Calabria, and S. Schiaffino, "MRF4 negatively regulates adult skeletal muscle growth by repressing MEF2 activity," *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 12397, 2016.
[201] A. E. Almada and A. J. Wagers, "Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing and disease," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, no. 5, pp. 267–279, Mar. 2016.
[202] C. Lepper, T. A. Partridge, and C.-M. Fan, "An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration," *Development*, vol. 138, no. 17, pp. 3639–3646, Sep. 2011.
[203] R. Sambasivan, R. Yao, A. Kissenpfennig, L. Van Wittenberghe, A. Paldi, B. Gayraud-Morel, H. Guenou, B. Malissen, S. Tajbakhsh, and A. Galy, "Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration," *Development*, vol. 138, no. 19, pp. 4333–4333, Oct. 2011.
[204] C. Esnault, A. Stewart, F. Gualdrini, P. East, S. Horswell, N. Matthews, and R. Treisman, "Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts," *Genes Dev.*, vol. 28, no. 9, pp. 943–958, May 2014.

[205] J. M. Miano, X. Long, and K. Fujiwara, “Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 292, no. 1, pp. C70-81, Jan. 2007.
[206] A. L’honore, V. Rana, N. Arsic, C. Franckhauser, N. J. Lamb, and A. Fernandez, “Identification of a new hybrid serum response factor and myocyte enhancer factor 2-binding element in MyoD enhancer required for MyoD expression during myogenesis,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, no. 6, pp. 1992–2001, 2007.
[207] L. Collard, G. Herledan, A. Pincini, A. Guerci, V. Randrianarison-Huetz, and A. Sotiropoulos, “Nuclear actin and myocardin-related transcription factors control disuse muscle atrophy through regulation of Srf activity,” *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. 24, pp. 5157–5163, Dec. 2014.
[208] A. Parlakian, C. Charvet, B. Escoubet, M. Mericskay, J. D. Molkentin, G. Gary-Bobo, L. J. De Windt, M.-A. Ludosky, D. Paulin, D. Daegelen, D. Tuil, and Z. Li, “Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart,” *Circulation*, vol. 112, no. 19, pp. 2930–2939, Nov. 2005.
[209] P. Gunning, P. Ponte, H. Blau, and L. Kedes, “alpha-skeletal and alpha-cardiac actin genes are coexpressed in adult human skeletal muscle and heart,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 3, no. 11, pp. 1985–1995, Nov. 1983.
[210] B. M. Paterson and J. D. Eldridge, “alpha-Cardiac actin is the major sarcomeric isoform expressed in embryonic avian skeletal muscle,” *Science*, vol. 224, no. 4656, pp. 1436–1438, Jun. 1984.
[211] S. G. Martin, “Role and organization of the actin cytoskeleton during cell-cell fusion,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, Jul. 2016.
[212] D. Segal, N. Dhanyasi, E. D. Schejter, and B.-Z. Shilo, “Adhesion and Fusion of Muscle Cells Are Promoted by Filopodia,” *Dev. Cell*, vol. 38, no. 3, pp. 291–304, Aug. 2016.
[213] E. Vasyutina, B. Martarelli, C. Brakebusch, H. Wende, and C. Birchmeier, “The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 22, pp. 8935–8940, Jun. 2009.
[214] F. Le Grand, R. Grifone, P. Mourikis, C. Houbron, C. Gigaud, J. Pujol, M. Maillet, G. Pagès, M. Rudnicki, S. Tajbakhsh, and P. Maire, “Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration,” *J. Cell Biol.*, vol. 198, no. 5, pp. 815–832, Sep. 2012.
[215] D. Montarras, J. Morgan, C. Collins, F. Relaix, S. Zaffran, A. Cumano, T. Partridge, and M. Buckingham, “Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration,” *Science*, vol. 309, no. 5743, pp. 2064–2067, Sep. 2005.
[216] S. E. Gordon, M. Flück, and F. W. Booth, “Selected Contribution: Skeletal muscle focal adhesion kinase, paxillin, and serum response factor are loading dependent,” *J. Appl. Physiol. (Bethesda, Md. 1985)*, vol. 90, no. 3, p. 1174–1183; discussion 1165, Mar. 2001.
[217] H. Koegel, L. von Tobel, M. Schäfer, S. Alberti, E. Kremmer, C. Mauch, D. Hohl, X.-J. Wang, H.-D. Beer, W. Bloch, A. Nordheim, and S. Werner, “Loss of serum response factor in keratinocytes results in hyperproliferative skin disease in mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 4, pp. 899–910, Apr. 2009.
[218] K. Sun, M. A. Battle, R. P. Misra, and S. A. Duncan, “Hepatocyte expression of serum response factor is essential for liver function, hepatocyte proliferation and survival, and postnatal body growth in mice,” *Hepatology*, vol. 49, no. 5, pp. 1645–1654, May 2009.
[219] D. Werth, G. Grassi, N. Konjer, B. Dapas, R. Farra, C. Giansante, R. Kandolf, G. Guarnieri, A. Nordheim, and O. Heidenreich, “Proliferation of human primary vascular smooth muscle cells depends on serum response factor,” *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 89, no. 2–3, pp. 216–224, Mar. 2010.
[220] B. K. Cenik, N. Liu, B. Chen, S. Bezprozvannaya, E. N. Olson, and R. Bassel-Duby, “Myocardin-related transcription factors are required for skeletal muscle development,” *Development*, vol. 143, no. 15, pp. 2853–2861, Aug. 2016.
[221] M. H. Mokalled, A. N. Johnson, E. E. Creemers, and E. N. Olson, “MASTR directs MyoD-dependent satellite cell differentiation during skeletal muscle regeneration,” *Genes Dev.*, vol.

26, no. 2, pp. 190–202, Jan. 2012.
[222] G. Schratt, B. Weinhold, A. S. Lundberg, S. Schuck, J. Berger, H. Schwarz, R. A. Weinberg, U. Rüther, and A. Nordheim, "Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, no. 8, pp. 2933–2943, Apr. 2001.
[223] E. E. Creemers, L. B. Sutherland, J. Oh, A. C. Barbosa, and E. N. Olson, "Coactivation of MEF2 by the SAP domain proteins myocardin and MASTR," *Mol. Cell*, vol. 23, no. 1, pp. 83–96, Jul. 2006.
[224] S. M. Meadows, A. S. Warkman, M. C. Salanga, E. M. Small, and P. A. Krieg, "The myocardin-related transcription factor, MASTR, cooperates with MyoD to activate skeletal muscle gene expression," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 5, pp. 1545–1550, 2008.
[225] S. Li, M. P. Czubryt, J. McAnally, R. Bassel-Duby, J. A. Richardson, F. F. Wiebel, A. Nordheim, and E. N. Olson, "Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 4, pp. 1082–1087, Jan. 2005.
[226] J. M. Miano, N. Ramanan, M. A. Georger, K. L. de Mesy Bentley, R. L. Emerson, R. O. Balza, Q. Xiao, H. Weiler, D. D. Ginty, and R. P. Misra, "Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 49, pp. 17132–17137, Dec. 2004.
[227] A. Nordheim, "SRF regulation — actin branches out," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 368–368, Jun. 2014.
[228] B. V. Latinkić, B. Cooper, N. Towers, D. Sparrow, S. Kotecha, and T. J. Mohun, "Distinct enhancers regulate skeletal and cardiac muscle-specific expression programs of the cardiac alpha-actin gene in Xenopus embryos," *Dev. Biol.*, vol. 245, no. 1, pp. 57–70, May 2002.
[229] B. Ilkovski, S. Clement, C. Sewry, K. N. North, and S. T. Cooper, "Defining alpha-skeletal and alpha-cardiac actin expression in human heart and skeletal muscle explains the absence of cardiac involvement in ACTA1 nemaline myopathy," *Neuromuscul. Disord. NMD*, vol. 15, no. 12, pp. 829–835, Dec. 2005.
[230] J. H. Kim, Y. Ren, W. P. Ng, S. Li, S. Son, Y.-S. Kee, S. Zhang, G. Zhang, D. A. Fletcher, D. N. Robinson, and E. H. Chen, "Mechanical tension drives cell membrane fusion," *Dev. Cell*, vol. 32, no. 5, pp. 561–573, Mar. 2015.
[231] T. H. Tran, X. Shi, J. Zaia, and X. Ai, "Heparan Sulfate 6-O-endosulfatases (Sulfs) Coordinate the Wnt Signaling Pathways to Regulate Myoblast Fusion during Skeletal Muscle Regeneration," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 39, pp. 32651–32664, Sep. 2012.
[232] A. C. Callan-Jones and R. Voituriez, "Actin flows in cell migration: from locomotion and polarity to trajectories," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 38, pp. 12–17, Feb. 2016.
[233] K. Swärd, K. G. Stenkula, C. Rippe, A. Alajbegovic, M. F. Gomez, and S. Albinsson, "Emerging roles of the myocardin family of proteins in lipid and glucose metabolism," *J. Physiol.*, Apr. 2016.
[234] J. Blondelle, Y. Ohno, V. Gache, S. Guyot, S. Storck, N. Blanchard-Gutton, I. Barthélémy, G. Walmsley, A. Rahier, S. Gadin, M. Maurer, L. Guillaud, A. Prola, A. Ferry, G. Aubin-Houzelstein, J. Demarquoy, F. Relaix, R. J. Piercy, S. Blot, A. Kihara, L. Tiret, and F. Pilot-Storck, "HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth," *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 429–440, 2015.
[235] D. Montarras, A. L'honoré, and M. Buckingham, "Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell," *FEBS J.*, vol. 280, no. 17, pp. 4036–4050, Sep. 2013.
[236] C. S. Fry, J. D. Lee, J. R. Jackson, T. J. Kirby, S. A. Stasko, H. Liu, E. E. Dupont-Versteegden, J. J. McCarthy, and C. A. Peterson, "Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy," *FASEB J.*, vol. 28, no. 4, pp. 1654–1665, Apr. 2014.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Le rôle de SRF au cours de l'atrophie du muscle squelettique adulte & dans les cellules satellites

Gaëlle HERLEDAN

23 mars 2017

RÉSUMÉ

Le muscle squelettique est un tissu plastique ayant la capacité d'adapter sa taille suivant les demandes fonctionnelles extérieures. Il peut s'atrophier (perte de volume musculaire), ou s'hypertrophier (gain de volume musculaire) par une augmentation de la synthèse protéique ou par l'intervention des cellules satellites (SC). Les mécanismes moléculaires de réarrangement de la taille des fibres musculaires demeurent encore peu connus.

Les cellules souches du muscle adulte, appelées les cellules satellites, sont quiescentes et sont localisées le long des fibres musculaires. Elles sont amenées à s'activer lors d'une lésion, d'une surcharge de travail ou d'une pathologie. Les SC activées (myoblastes), prolifèrent puis se différencient et fusionnent entre elles ou avec les myofibres préexistantes. Ce processus est appelé la myogenèse adulte.

D'une part, nous avons étudié l'implication du facteur de transcription SRF dans l'atrophie du muscle squelettique par arrêt d'activité mécanique induite par dénervation. Se basant sur un modèle murin d'inactivation conditionnelle et inductible de SRF dans les fibres musculaires, nous montrons le rôle de SRF dans la régulation de voies cataboliques comme l'autophagie. De plus, nos données suggèrent l'intervention de SRF dans la régulation énergétique mitochondriale via l'activité des complexes de la chaîne respiratoire.

D'autre part, un modèle conditionnel et inductible d'inactivation de SRF dans les SC, nous a permis d'évaluer le rôle de SRF dans les SC. Des travaux réalisés dans l'équipe ont montré que la perte de SRF perturbe fortement les processus de régénération musculaire et d'hypertrophie par surcharge de travail, deux situations au cours desquelles les SC sont mobilisées. Au niveau cellulaire nous avons montré que la perte de SRF dans les SC n'altère ni la prolifération, ni l'entrée en différenciation des myoblastes ; cependant elle entraîne un défaut de motilité et de fusion. Se basant sur une analyse transcriptionnelle, l'équipe a identifié plusieurs gènes cibles de SRF susceptibles d'être responsables du défaut de motilité et/ou de fusion, dont l'alpha-Actine. Par une approche de diminution de l'expression de gènes par transfection de siRNA dans les myoblastes, nous avons identifié quelques gènes dont la diminution d'expression phénocopie le défaut de motilité et/ou de fusion des SC. Dans cette étude, nous avons retenu les gènes codant pour FHL2 et HIC5. Une approche « gain de fonction », par surexpression d'Actine dans les SC dépourvues de SRF, nous permet d'améliorer le phénotype de fusion hétérotypique/asymétrique, suggérant que la restauration seule du cytosquelette d'Actine est suffisante pour rétablir ce type de fusion et l'hypertrophie du muscle. Cependant la fusion homotypique/symétrique et la régénération ne sont pas restaurées ; ainsi nous émettons l'hypothèse de l'intervention d'autres acteurs, tels que FHL2 ou HIC5.

MOTS-CLÉS : *muscle squelettique, serum response factor, atrophie musculaire, hypertrophie musculaire, cellules satellites, cytosquelette d'Actine.*