

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DES RÔLES DE DEPP1 DANS LA PHYSIOLOGIE MUSCULAIRE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN SCIENCES DE L'ACTIVITÉ PHYSIQUE

PAR

MARIE-BELLE AYOUB

MAI 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes parents, Nada Derwiche et Antoine Ayoub, pour leur support tout au long de mes études. Un merci tout particulier à mon fiancé José De Maria Elguera Huaman, à nos nuits blanches d'études et nos aventures farfelues pour nous remonter le moral : je t'aime.

Je tiens également à remercier mon Directeur de recherche, Dr Gilles Gousspillou, qui a su cultiver et encourager ma curiosité en science me permettant de persévérer dans mon cheminement académique. Merci à tous les membres du laboratoire (Maude Dulac, Olivier Reynaud, Marina Cefis, Manon Dargegen, Vincent Marcangeli) pour leur soutien et leur patience envers moi tout au long de ma maîtrise. Je tiens aussi à remercier particulièrement Jean-Philippe Leduc-Gaudet, à l'époque doctorant au sein du laboratoire, qui m'a mentoré durant la première moitié de la maîtrise. Sans lui, ce projet ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé dans mon cheminement personnel et professionnel à observer, réfléchir, évoluer, comprendre et accepter.

Je souhaite également remercier les membres de mon jury, Dr Antony Karelis et Dr Kessen Patten pour le temps qu'ils acceptent de dédier me permettant de terminer ma maîtrise.

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à ma famille, particulièrement mes parents ainsi qu'à mon fiancé.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	viii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xi
RÉSUMÉ.....	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Généralités sur les muscles striés squelettiques	3
1.1.1 Architecture des muscles squelettiques.....	3
1.1.2 Composition des muscles squelettiques.....	5
1.2 Généralités sur les mitochondries	7
1.2.1 Structure mitochondriale.....	8
1.2.2 Phosphorylation oxydative	9
1.3 Mécanismes impliqués dans la régulation de la masse musculaire	10
1.3.1 Régulation de la synthèse des protéines	10
1.3.1.1 Voie insuline/IGF1-AKT-mTOR	11
1.3.1.2 Voie TGFβ/myostatine/activine/BMP	12
1.3.2 Régulation de la dégradation des protéines.....	14
1.3.2.1 Voie de l'ubiquitine-protéasome.....	15
1.3.2.2 Voie de l'autophagie	16
1.3.3 Implication de FoxO et des ROS dans la régulation de la masse musculaire.....	19
1.4 DEPP1, un nouveau régulateur de l'autophagie	20
CHAPITRE 2 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	24
2.1 Objectif de recherche.....	24
2.1.1 Sous-objectifs de recherche et hypothèses.....	24
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE.....	26

3.1	Modèle animal	26
3.2	Modèle expérimental et injections de virus adéno-associés.....	26
3.3	Groupe et taille de l'échantillon	27
3.4	Contractilité musculaire	27
3.5	Sacrifice et récolte des tissus	27
3.6	Manipulation des muscles squelettiques.....	28
3.6.1	Coupes musculaires pour analyses histologiques.....	28
3.6.1.1	Détermination de la taille des fibres	28
3.6.1.2	Détermination de l'activité succinate déshydrogénase	29
3.6.1.3	Détermination des fibres nécrotiques	29
3.6.1.4	Détermination du stress oxydatif par marquage au dihydroéthidium.....	29
3.6.2	Immunobuvardage.....	30
3.6.3	PCR quantitative en temps réel pour quantifier l'expression de DEPP1	31
3.7	Flux autophagique.....	32
3.8	Quantification et analyses statistiques	32
CHAPITRE 4 RÉSULTATS		33
4.1	Vérification de la déplétion de DEPP1 dans les muscles injectés	33
4.2	Effets d'une déplétion de DEPP1 sur la masse et la force musculaire	34
4.3	Effets d'une déplétion de DEPP1 sur l'autophagie	36
4.4	Effets d'une déplétion de DEPP1 sur l'intégrité du muscle squelettique	38
4.5	Effets d'une déplétion de DEPP1 sur les activités enzymatiques ainsi que le contenu mitochondrial	40
4.6	Effets d'une déplétion de DEPP1 sur des marqueurs de stress oxydatif	42
CHAPITRE 5 DISCUSSION.....		44
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		49
RÉFÉRENCES.....		52

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Architecture du muscle strié squelettique	4
Figure 1.2 Cycle de la contraction musculaire.....	5
Figure 1.3 Caractéristique de la mitochondrie.....	8
Figure 1.4 Phosphorylation oxydative.....	10
Figure 1.5 Voie insuline/IGF1-AKT-mTOR.....	12
Figure 1.6 Voie TGF β /myostatine/activine/BMP	14
Figure 1.7 Voie de l'ubiquitine-protéasome	16
Figure 1.8 Voie de l'autophagie.....	19
Figure 1.9 Voie impliquant FoxO et les ROS dans la régulation de la masse musculaire.....	20
Figure 1.10 DEPP1, un nouveau régulateur de la régulation de la masse musculaire.....	23
Figure 4.1 Déplétion de DEPP1 réussi dans les muscles squelettiques.....	34
Figure 4.2 La déplétion de DEPP1 induit une hypertrophie et altère la contractilité musculaire	36
Figure 4.3 La déplétion de DEPP1 altère l'autophagie basale.....	38
Figure 4.4 La déplétion de DEPP1 altère l'intégrité du muscle squelettique.....	39
Figure 4.5 La déplétion de DEPP1 réduit les activités enzymatiques mitochondriales sans altérer des marqueurs de contenu mitochondrial	41
Figure 4.6 La déplétion de DEPP1 augmente les marqueurs de stress oxydatif.....	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Caractéristiques biochimiques, contractiles et morphologique des types de fibres squelettiques chez les humains et les rongeurs.....	7
Tableau 3.1 Liste des anticorps utilisés pour l'immunobuvardage.....	31
Tableau 3.2 Liste des amorces pour les qPCR.....	32

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

4E-BP1 : Protéine de liaison de facteur d'initiation à la traduction eucaryote 4E

$\Delta\mu\text{H}^+$: Gradient électrochimique de protons

ΔpH : Gradient pH

$\Delta\Psi$: Potentiel de membrane

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ALK : *activin receptor-like kinase*

ARN : Acide ribonucléique

Atgs : Gènes liés à l'autophagies

Atrogin-1 : *Muscle Atrophy F-box*

BMP : *Bone Morphogenetic Proteins*

CI : Complexe I

CII : Complexe II

CIII : Complexe III

CIV : Complexe IV

CLM : Chaîne lourde de myosine

CoQ : Coenzyme Q

Cyt.C : Cytochrome C

Depp1 : *Decidual Protein Induced By Progesterone*

DHE : Dihydroéthidium

E1 : Enzymes d'activation

E2 : Enzyme de conjugaison

E3 : Enzyme de ligase

eEF2 : Facteur d'élongation de la traduction dans les cellules eucaryotes 2

eIF4E : Facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E

FIG : *Fasting-induced gene protein*

GDF : *Growth and differentiation factors*

H⁺: Protons

H&E : Hématoxyline et Éosine

IGF1 : *Insulin-like growth factor-1*

IMM : Jambe immobilisée avec du velcro

IR-CUSM : Centre universitaire de santé McGill

LAMPs : Protéines membranaires associées aux lysosomes

LC3 : *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*

LEO : Long extenseur des orteils

LPS : Injection de lipopolysaccharide

MAFbx : *Muscle Atrophy F-box*

mTOR : *Mechanistic target or rapamycin*

mTORC1 : mTOR complexe 1

MuRF1 : *Muscle RING-finger protein 1*

MyHC : Chaîne lourde de myosine

OXPPOS : Phosphorylation oxydative

Pi : Phosphate inorganique

ROS : *Reactive oxygen species*

S6K1 : p70 S6 kinase 1

TA : Tabial antérieur

TBS-T : Tampon Tris contenant 0.1% de Tween 20

TGFβ : Facteurs de croissance transformants Beta

ULK1 : *Unc-51 Like Autophagy Kinase 1*

VAA : Virus adéno-associé

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

> : Plus grand que

μm : Micromètre

RÉSUMÉ

Rationnel : Les muscles squelettiques jouent un rôle clé dans le mouvement, la posture, la thermogénèse et le métabolisme du corps entier. Le maintien d'une masse et d'une fonction musculaire optimales est donc essentiel pour la santé générale. L'autophagie est apparue au cours des dernières décennies comme un processus essentiel dans la régulation de la masse et de la fonction musculaire squelettique. Cependant, notre compréhension de la machinerie de l'autophagie et de sa régulation reste incomplète. Récemment, nous avons recueilli des données indiquant que DEPP1, une protéine principalement localisée dans les mitochondries, et dont il a été démontré qu'elle module l'autophagie dans les cellules en culture, est induite dans diverses conditions cataboliques conduisant à l'atrophie musculaire. Cependant, à ce jour, le rôle joué par Depp1 dans les muscles squelettiques reste inconnu.

Objectif : Étudier l'impact de la déplétion de DEPP1 sur la physiologie musculaire.

Méthodologie : DEPP1 a été réduit pendant 3, 6 et 12 semaines dans le muscle du tibial antérieur (TA) de souris âgées de 11 semaines à l'aide d'injections intramusculaires de virus adéno-associés (VAA). Les impacts de d'une déplétion de DEPP1 sur la masse musculaire et la contractilité ont été évalués. Des immunoblots ont été utilisés pour quantifier les marqueurs du contenu mitochondrial (sous-unités OXPHOS, VDAC1, Citrate Synthase et TOMM20), de l'autophagie (P62 et LC3) et du stress oxydatif (4-HNE). Des approches immunohistochimiques ont été utilisées pour évaluer l'intégrité des myofibres, les activités enzymatiques mitochondriales, le stress oxydatif, la taille des fibres et l'infiltration des macrophages. Le flux autophagique a également été quantifié à l'aide d'un traitement à la colchicine.

Résultats : Une déplétion de DEPP1 a été confirmée par qPCR. Une déplétion de DEPP1 a augmenté la masse musculaire et la taille des fibres, mais a altéré la contractilité musculaire. Réduire l'expression de DEPP1 a diminué le flux autophagique et a entraîné une accumulation marquée de marqueurs d'autophagie. La teneur en 4-HNE a augmenté 12 semaines après une déplétion de DEPP1. Une déplétion de DEPP1 a conduit à l'apparition de fibres nécrotiques et de fibres à noyaux centraux et a provoqué une infiltration de macrophages. Bien qu'une déplétion de DEPP1 n'ait pas eu d'impact sur les marqueurs physiques du contenu mitochondrial, cela a entraîné une diminution des activités enzymatiques mitochondriales.

Conclusion : Nos résultats placent DEPP1 comme un important régulateur de l'autophagie et de l'intégrité musculaire.

Mots clés : Autophagie, DEPP1, muscle squelettique, mitochondries, contractilité, inflammation, dégénérescence, régénération.

ABSTRACT

Rational: Skeletal muscles play key roles in movement, posture, thermogenesis, and whole-body metabolism. Maintaining optimal muscle mass and function is therefore essential for general health. Autophagy has emerged in the last decades as an essential process in the regulation of skeletal muscle mass and function. However, our understanding of the autophagy machinery and its regulation remain incomplete. Recently, we gathered data indicating that DEPP1, a protein mainly localized to mitochondria, and which was shown to modulate autophagy in cultured cells, is induced in various catabolic conditions leading to muscle atrophy. However, to date, the role played by DEPP1 in skeletal muscles remains unknown.

Objective: To investigate the impact of DEPP1 knockdown (DEPP1-KD) on muscle physiology.

Methods: DEPP1 was knocked-down for 3, 6 and 12 weeks in the tibialis anterior (TA) muscle of 10-week-old mice using intramuscular injections of adeno-associated viruses (AAV). The impacts of DEPP1-KD on muscle mass and contractility were assessed. Immunoblots were used to quantify markers of mitochondrial content (OXPHOS subunits, VDAC1, Citrate Synthase and TOMM20), autophagy (P62 and LC3) and oxidative stress (4-HNE). Immunohistochemical approaches were used to assess myofiber integrity, mitochondrial enzyme activities, oxidative stress, fiber size and macrophage infiltration. The autophagy flux was also quantified using colchicine treatment.

Results: DEPP1-KD was confirmed by qPCR. DEPP1-KD increased muscle mass and fiber size but impaired muscle contractility. DEPP1-KD decreased the autophagic flux and resulted in a marked accumulation of autophagy markers. 4-HNE content increased 12-weeks post DEPP1-KD. DEPP1-KD led to the apparition of necrotic fibers and fibers with central nuclei and caused an infiltration of macrophages. Although DEPP1-KD did not impact physical markers of mitochondrial content, it resulted in a decrease in mitochondrial enzyme activities.

Conclusion: Our results place DEPP1 as an important regulator of muscle autophagy and integrity.

Keywords : Autophagy, DEPP1, skeletal muscle, mitochondria, contractility, inflammation, degeneration and regeneration.

INTRODUCTION

Les muscles squelettiques forment le tissu le plus abondant du corps humain, représentant environ 40% du poids corporel. Les muscles sont essentiels non seulement pour assurer les mouvements, mais aussi pour la posture, la respiration et la thermogénèse. Ils représentent, en outre, la plus grande réserve en acides aminés de l'organisme. À ce titre, ils peuvent devenir une source essentielle d'acides aminés pouvant être utilisés par d'autres organes pour leurs besoins énergétiques, et ce, particulièrement lors de périodes cataboliques (jeûne prolongé, septicémie, etc.) (Bonaldo et Sandri, 2013). D'ailleurs, les muscles striés squelettiques sont des structures dynamiques qui peuvent s'adapter rapidement à différents stress.

L'atrophie musculaire peut survenir dans différentes situations, telles que des conditions physiopathologiques (ex. septicémie) ou simplement lors du vieillissement, un processus physiologique normal. L'atrophie des muscles squelettiques peut engendrer des problèmes de santé majeurs et est souvent associée à des troubles de la fonction physique et à la mortalité (Boutin *et al.*, 2017; Nakanishi *et al.*, 2020). En effet, une faible masse musculaire est un facteur de risque de mortalité lorsque les patients sont en soins intensifs, et ce, indépendamment du sexe (Weijs *et al.*, 2014). De plus, l'atrophie musculaire est généralement associée au dysfonctionnement musculaire qui s'accompagne d'une perte de performance contractile, telle qu'une diminution de force et de vitesse de contraction. De plus, une perte de masse musculaire engendre inévitablement une détérioration fonctionnelle, et ce, que ce soit une atrophie due à une décharge mécanique (ex. immobilisation, alitement, etc.) (Appell, 1990), une pathologie (ex. atrophie musculaire spinale, septicémie, etc.) (Kaufmann *et al.*, 2011; Prescott et Angus, 2018) ou au vieillissement (Thompson, 2009). Il est important de noter qu'un cercle vicieux s'installe généralement dans lequel une atrophie entraîne un déconditionnement et une faiblesse musculaire, augmentant ainsi le risque de chute et de blessures (Benichou et Lord, 2016). En suit une réduction d'activité, qui est d'ailleurs souvent aggravée par la peur de tomber, ce qui augmente le déconditionnement et l'atrophie et ainsi de suite (Benichou et Lord, 2016). Maintenir la masse et les fonctions musculaires est donc essentiel pour préserver une bonne qualité de vie de nos populations. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes moléculaires qui régulent la masse et les fonctions musculaires, afin de développer des approches permettant d'améliorer la qualité de vie des individus et de réduire les coûts de santé associée aux dysfonctions musculaires.

Comme nous le verrons par la suite, la masse musculaire est le résultat de la synthèse et de la dégradation des protéines. Dans le cadre de ce projet, nous nous intéresserons davantage à la régulation de la dégradation protéique. Bien que notre compréhension des mécanismes régulant la masse musculaire ait beaucoup progressé au cours des 20 dernières années, il est clair que cette compréhension n'est encore que partielle et de nombreux régulateurs de la masse musculaire restent à être identifiés. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous nous intéresserons particulièrement à l'étude d'une nouvelle protéine nommée *Decidual Protein Induced By Progesterone* (DEPP1) – aussi connue sous le nom *Fasting-induced gene protein* (FIG) – qui a initialement été caractérisée comme étant une protéine induite par la progestérone dans les cellules stromales de l'endomètre (Watanabe *et al.*, 2005). Comme nous le verrons par la suite, DEPP1 a récemment été identifiée comme un régulateur potentiel de l'autophagie (Salcher *et al.*, 2017), un processus essentiel au maintien de la masse musculaire. Des études récentes menées sur des modèles de culture cellulaire ont également suggéré que DEPP1 pourrait être localisée au niveau des mitochondries et pourrait réguler et être régulée par la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS – de l'anglais *reactive oxygen species*) (Li *et al.*, 2018; Salcher *et al.*, 2014; Salcher *et al.*, 2017). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a caractérisé le rôle joué par Depp1 dans les muscles striés squelettiques.

Le chapitre suivant, intitulé État des connaissances (chapitre 1), présentera des généralités sur les muscles striés squelettiques, des généralités sur les mitochondries, décrira les principaux mécanismes impliqués dans la régulation de la masse musculaire et présentera les données actuellement disponibles sur la biologie de DEPP1. Ensuite, les objectifs et hypothèses de recherche seront détaillés dans le chapitre 2. La méthodologie de recherche du projet sera décrite dans le chapitre 3, puis les résultats dans le chapitre 4. La discussion sera enfin détaillée dans le chapitre 5, suivi de la conclusion et des perspectives de recherche.

CHAPITRE 1

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Généralités sur les muscles striés squelettiques

Les muscles squelettiques contiennent différents types de fibres musculaires qui sont adaptées à différentes tâches, telles que la stabilisation articulaire posturale, les activités répétitives de longue durée et les actions plus rapides et puissantes (Schiaffino et Reggiani, 2011). Les capacités musculosquelettiques dépendent de plusieurs caractéristiques et dans cette section l'architecture musculaire ainsi que leur composition seront présentées.

1.1.1 Architecture des muscles squelettiques

Les muscles squelettiques sont composés de tissu conjonctif et de cellules contractiles plurinucléées qui jouent un rôle important dans la posture, la stabilisation des articulations ainsi que les mouvements. Le tissu conjonctif musculaire est organisé par couches, où i) l'épimysium enveloppe l'ensemble du muscle strié squelettique, ii) le pérимыsium entoure des faisceaux de fibres musculaires et iii) l'endomysium entoure chaque fibre musculaire. Ces tissus conjonctifs ont des fonctions cruciales pour les muscles : ils agissent comme support mécanique pour les cellules musculaires, les vaisseaux sanguins et les nerfs. Ils jouent également un rôle important dans la transmission des forces générées par la contraction musculaire. La machinerie contractile des muscles est organisée en structures supramoléculaires très ordonnées, soit les sarcomères (Schiaffino et Reggiani, 2011). Le sarcomère est la plus petite unité contractile dans le muscle et représente la portion comprise entre deux disques Z. Les sarcomères sont organisés en série, formant ainsi une myofibrille ; une fibre musculaire contient de multiples myofibrilles. La composition moléculaire du sarcomère est complexe et fait intervenir de nombreuses protéines. Les sarcomères sont des réseaux de filaments protéiques composés entre autres de filaments fins et épais ainsi que de disques Z aux extrémités, du disque M au milieu ainsi que des filaments élastiques longitudinaux accrochés du disque Z au disque M (Figure 1.1). Tous ces composants sont reliés par de multiples liens protéiques. Chaque sarcomère est composé de rangées superposées de filaments épais (assemblage de multiples myosines) et de filaments fins (composé d'actine, de troponines et de tropomyosine). La myosine est constituée de deux chaînes lourdes (formant la tige de la myosine, la région charnière et la tête bilobée de la myosine) et quatre chaînes légères (situées sur la tête bilobée de myosine). Les sites de liaison de

l'ATP et de l'actine sont situés dans les têtes de myosine qui sont capable d'hydrolyser l'ATP générant ainsi un glissement des filaments (Schiaffino et Reggiani, 2011).

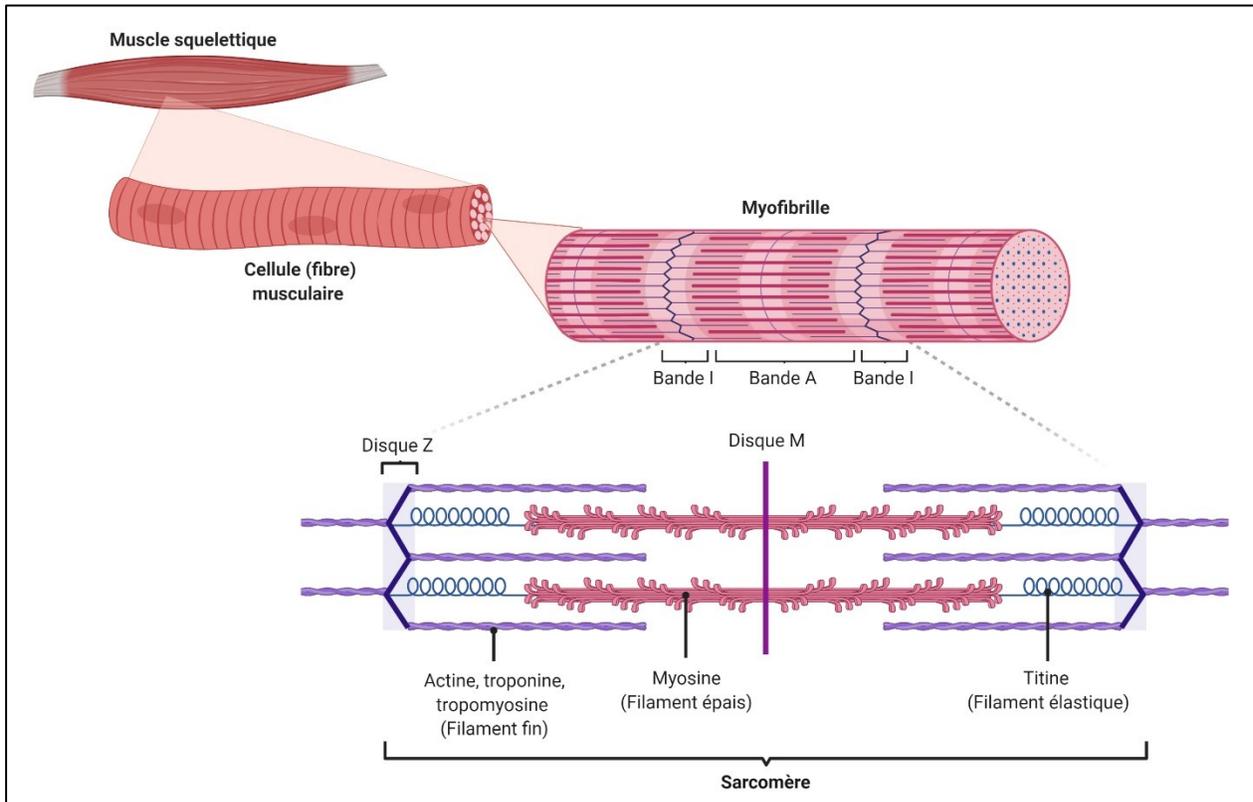


Figure 1.1. Architecture du muscle strié squelettique

Figure 1.1 | Cette figure illustre de manière simplifiée la composition du muscle squelettique allant du muscle entier à la plus petite unité contractile, le sarcomère. Image adaptée de «*Myofibril Structure*», par BioRender.com (2021). Extrait de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Les propriétés mécaniques actives et passives (élastiques) des myofibrilles sont médiées par l'interaction des filaments fins et épais. Ces filaments, eux, dépendent de l'interaction du calcium avec le complexe troponines-tropomyosine (Schiaffino et Reggiani, 2011). En effet, le calcium permet, au travers de son interaction avec la troponine C, de libérer le site sur l'actine où la tête bilobée de la myosine peut s'accrocher. Plus précisément, le cycle du mécanisme moléculaire de la contraction se déroule comme suit : i) l'ATP se lie au site catalytique de la myosine; ii) la tête de myosine se détache de l'actine, car l'ATP réduit l'affinité entre la tête de myosine et l'actine; iii) l'ATP est hydrolysé par le site catalytique permettant ainsi de stocker l'énergie dans la tête de myosine; iv) le calcium se lie à la troponine C, entraînant un basculement du complexe troponines-tropomyosine, ce qui dégage le site de fixation de la myosine sur l'actine; v) la libération des produits d'hydrolyse de l'ATP (ADP, Pi et H⁺) entraîne un basculement de la tête de myosine; i) le cycle recommence : la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP

permet le détachement de la myosine (Figure 1.2). Ainsi, lors de contraction concentrique musculaire, il y a un glissement des myofilaments, ce qui génère un raccourcissement de la longueur du sarcomère.

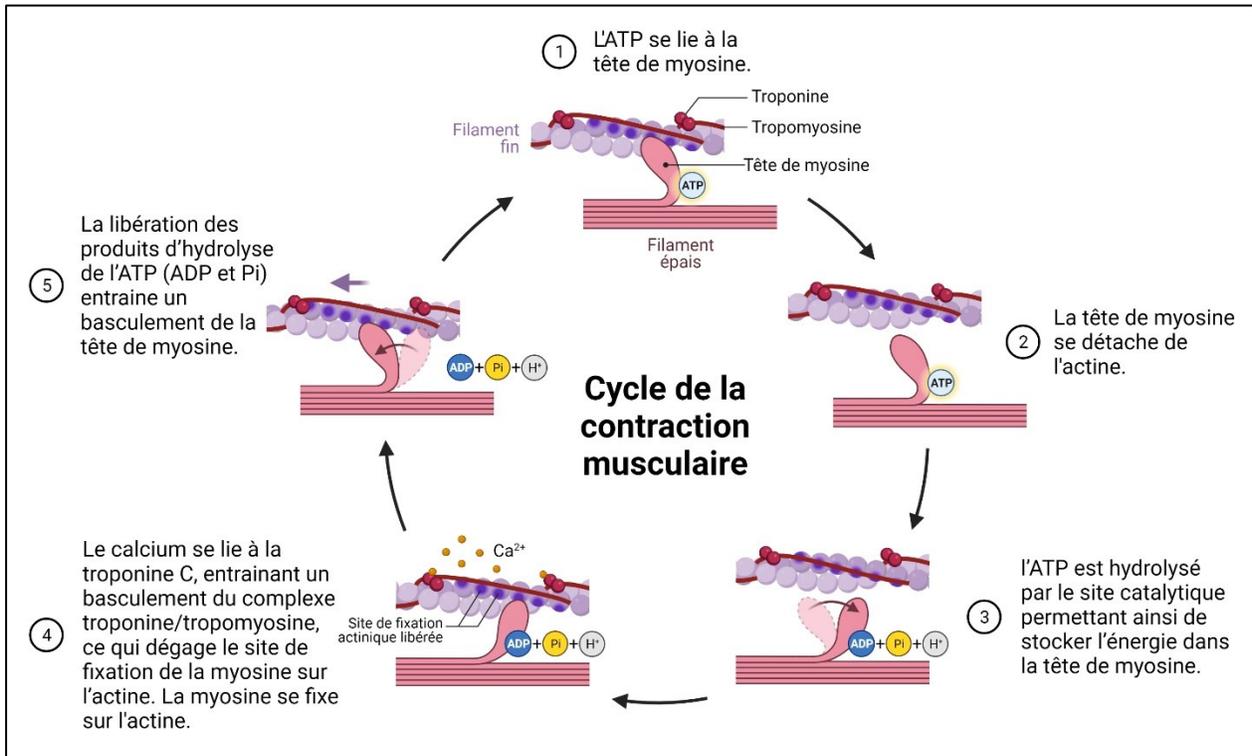


Figure 1.2 Cycle de la contraction musculaire

Figure 1.2 | Cette figure décrit le cycle de la contraction musculaire en cinq étapes. Image adapté de «Cross-Bridge Cycle», par BioRender.com (2021). Extrait de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.1.2 Composition des muscles squelettiques

Les muscles squelettiques sont composés de fibres hétérogènes permettant au muscle d'être utilisé pour diverses tâches de différents intervalles d'intensité et de durée (voir revue Schiaffino et Reggiani, 2011). La plasticité musculaire est grandement influencée par les hormones et l'activité neuronale. D'ailleurs, l'activité neuronale est un déterminant majeur du profil du type de fibre musculaire (Schiaffino et Reggiani, 2011). L'unité motrice est un transducteur neuromécanique composé d'un motoneurone et de fibres musculaires innervées par ce même motoneurone (Heckman et Enoka, 2012). Les unités motrices sont fondamentales pour générer les mouvements et chacune apporte sa propre contribution spécifique permettant au muscle de répondre au mieux aux sollicitations fonctionnelles (Schiaffino et Reggiani, 2011). Dans un muscle, les fibres musculaires innervées par un motoneurone sont majoritairement dispersées dans le muscle (Edström et Kugelberg, 1968). De plus, les caractéristiques de décharge des motoneurones sont étroitement liées aux caractéristiques biochimiques des fibres qu'ils innervent (Edström et Kugelberg,

1968). Il est possible d'identifier une distribution d'isoformes de chaîne lourde de myosine (MyHC) spécifique au type de fibre dans les muscles squelettiques (DeNardi *et al.*, 1993). Chez les rongeurs, quatre grands types de fibre sont connus contenant différents MyHC – type 1, type 2A, type 2X et type 2B – et ont chacune des caractéristiques différentes telles que l'activité ATPasique de la myosine, la vitesse de raccourcissement et certaines caractéristiques métaboliques (DeNardi *et al.*, 1993). Grâce aux analyses immunohistochimiques, d'hybridation, biochimiques et physiologiques, il est possible d'affirmer qu'il existe aussi d'autres fibres, appelées hybrides, en plus de celles à composition MyHC pure. Au final, les différents types de fibres suivants peuvent être identifiés : 1 ↔ 1/2A ↔ 2A ↔ 2A/2X ↔ 2X ↔ 2X/2B ↔ 2B (Schiaffino et Reggiani, 2011). Chez les mammifères, la proportion des types de fibre peut varier selon l'espèce et le site anatomique (Schiaffino et Reggiani, 2011). La diversité des fibres musculaires implique entre autres la composition de la myosine et le profil métabolique, qui sont d'ailleurs les deux méthodes traditionnelles de marqueurs utilisés pour le typage des fibres (Schiaffino et Reggiani, 2011). Les fibres de type 1 sont oxydative et à contraction lente, celles de types 2A sont à métabolisme oxydatif développé et à contraction rapide, celles de type 2X sont glycolytiques chez les humains, à métabolisme oxydatif développé chez les rongeurs et à contraction très rapide, puis finalement celles de type 2B sont absentes chez les humains, glycolytiques et à contraction extrêmement rapide chez les rongeurs (DeNardi *et al.*, 1993; Smerdu *et al.*, 1994). Plus précisément, les fibres de type 1, oxydatives et lentes, sont résistantes à la fatigue, car elles contiennent une densité élevée de mitochondries et de myoglobine. Les fibres de type 2B chez les rongeurs et 2X chez les humains, glycolytiques et rapides, ont peu de résistance à la fatigue étant donné qu'elles ont peu de myoglobines et de mitochondries, ont une capillarisation sanguine faible et utilisent majoritairement la glycolyse comme voie énergétique pour produire de l'ATP. Toutefois, elles peuvent générer beaucoup de puissance étant donné leur capacité de raccourcissement très rapide. Les fibres de type 2A chez l'humain et de type 2A et 2X chez les rongeurs utilisent les métabolismes oxydatif et glycolytique, les classant ainsi plus résistantes à la fatigue que les fibres glycolytiques, mais avec une vitesse de raccourcissement plus lente (Shen *et al.*, 2016).

Tableau 1.1 Caractéristiques biochimiques, contractiles et morphologique des types de fibres squelettiques chez les humains et les rongeurs

HUMAINS				
	Type 1	Type 2A	Type 2X	
Gène codant pour les chaînes lourde de myosine	MYH-7	MYH-2	MYH-1	
Activité ATPasique de la myosine	Faible	Modérée	Très élevée	
Capacité oxydative	Élevée	Modérée à élevée	Faible	
Capacité glycolytique	Faible	Modérée à élevée	Élevée	
Apparence/contenu en myoglobine	Rouge / Élevée	Rouge / Intermédiaire	Blanc / faible	
Capacité d'endurance	Élevée	Modérée à élevée	Faible	
Vitesse raccourcissement	Lente	Rapide	Très rapide	
Temps relaxation	Lent	Élevé	Très élevé	
Densité mitochondriale	Élevée	Modérée à élevée	Faible	
Taille des motoneurones	Petite	Grande	Très grande	
Capillarité	Élevée	Élevée	Faible	
RONGEURS				
	Type 1	Type 2A	Type 2B	Type 2X
Gène codant pour les chaînes lourde de myosine	MYH-7	MYH-2	MYH-4	MYH-1
Activité ATPasique de la myosine	Faible	Modérée	Très Élevée	Élevée
Capacité oxydative	Modérée à élevée	Très élevée	Faible	Modérée à élevée
Capacité glycolytique	Faible	Modérée	Élevée	Élevée
Apparence / contenu en myoglobine	Rouge / Élevée	Rouge / Élevée	Blanc / Faible	Blanc / Modérée
Capacité d'endurance	Élevée	Élevée	Faible	Modérée
Vitesse raccourcissement	Lente	Modérée	Très rapide	Rapide
Temps relaxation	Lent	Modérée	Très Rapide	Rapide
Puissance	Faible	Modérée	Très élevée	Élevée
Densité mitochondriale	Modérée à élevée	Élevée	Faible	Modérée à élevée
Taille des motoneurones	Petite	Grande	Très grande	Très grande
Capillarité	Très Élevée	Élevée	Faible	Modérée

Tableau 1.1 | Ce tableau représente un résumé des caractéristiques biochimiques, contractiles et morphologiques des types de fibres musculosquelettiques chez l'humain et chez les rongeurs (tableau pris de la thèse de Maude Dulac, en processus de publication).

1.2 Généralités sur les mitochondries

Les mitochondries sont des organites dynamiques et complexes qui se situent dans le cytoplasme de pratiquement toutes les cellules eucaryotes et représentent 3 à 8% de la densité volumique des cellules musculaires striées squelettiques (Hoppeler *et al.*, 1987). Elles jouent des rôles critiques dans la vie, la

mort et la différenciation cellulaires (Pagliarini *et al.*, 2008). En effet, elles sont responsables de multiples processus métaboliques qui sont essentiels au fonctionnement cellulaire (Rai *et al.*, 2015) et varient en nombres, en forme et en taille. Bien que les mitochondries soient surtout connues pour leur rôle essentiel dans la production d'ATP, elles régulent une multitude d'autres voies biochimiques et sont des centres d'apoptose et d'homéostasie ionique (Pagliarini *et al.*, 2008). Dans la section suivante, la structure mitochondriale ainsi que la phosphorylation oxydative seront détaillées.

1.2.1 Structure mitochondriale

Une mitochondrie est composée de deux membranes, soit une membrane externe et une membrane interne où plusieurs enzymes s'y retrouvent (Figure 1.3). Une mitochondrie comprend ainsi un espace intermembranaire entre ces deux membranes. La membrane interne est repliée, formant ainsi les crêtes mitochondriales. La matrice est la région la plus interne de la mitochondrie et on y retrouve entre autres l'ADN mitochondrial (ADNmt). L'ADNmt contient 37 gènes essentiels aux fonctions mitochondriales dont 13 codent pour des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, soit des sous-unités des complexes I, III, IV de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que l'ATP synthase. Il est important de noter que les mitochondries dans les cellules musculaires peuvent arborer une morphologie très complexe et peuvent entourer plusieurs myofibrilles (Ogata et Yamasaki, 1997).

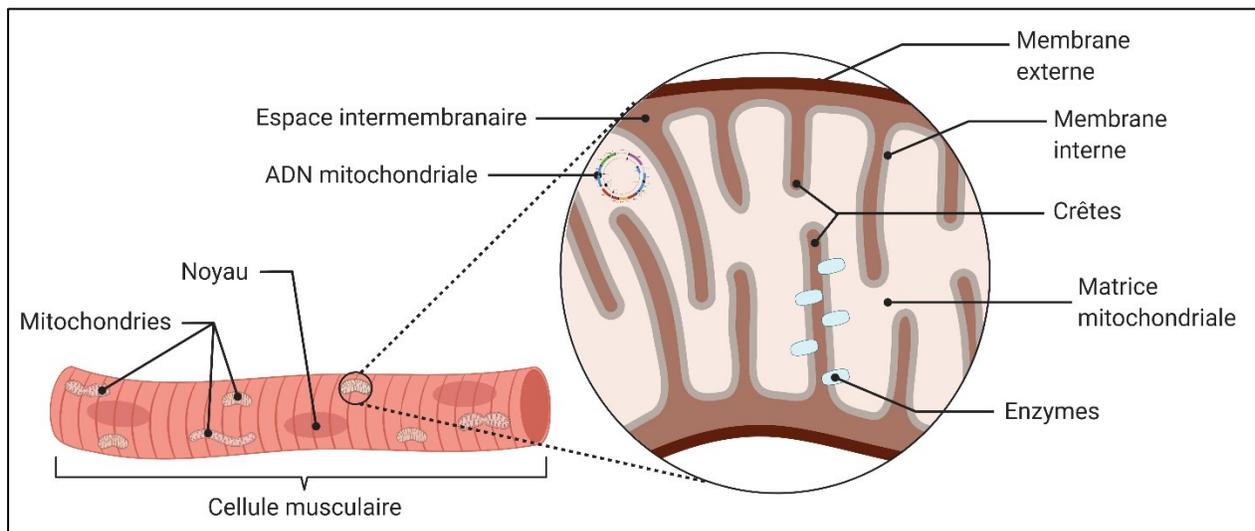


Figure 1.3 Caractéristique de la mitochondrie

Figure 1.3 | Cette figure illustre la structure mitochondriale dans le muscle squelettique. Image adaptée de «*Mitochondria Structure Animal Cell*», par BioRender.com (2021). Extrait de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.2.2 Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative (OXPHOS) est la principale source de production d'ATP de la cellule et utilise entre autres l'oxygène dans son processus de resynthèse de l'ATP (Figure 1.4). Plus précisément, le système OXPHOS est composé du système de transfert des électrons ainsi que de l'ATP synthase, l'ANT et le transporteur de phosphate. Le système de transfert des électrons (aussi appelé chaîne respiratoire mitochondriale) est un système permettant d'accumuler des protons (H^+) dans l'espace intermembranaire pour générer un gradient électrochimique de protons ($\Delta\mu H^+$). Le $\Delta\mu H^+$ comprend deux composantes, soit i) la composante électrique : le potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) et ii) la composante chimique : le gradient pH (ΔpH). Le système de transfert des électrons contient quatre complexes protéiques et deux accepteurs d'électrons mobiles : le coenzyme Q (CoQ), localisé dans la membrane interne, et le cytochrome C (Cyt.C), situé dans l'espace intermembranaire. Le complexe I (CI), aussi appelé NADH-Ubiquinone oxydoréductase, s'occupe du transfert des électrons porté par le $NADH+H^+$ par oxydoréduction au CoQ et l'énergie générée par ce transfert permet au CI de pomper 4 H^+ de la matrice à l'espace intermembranaire. Le complexe II (CII), aussi appelé Succinate Deshydrogénase, transfère les électrons portés par le $FADH_2$ au CoQ. Le complexe III (CIII), aussi appelé Ubiquinone-Cytochrome C oxydoréductase, transfère les électrons portés par le CoQ au Cyt. C et l'énergie générée par ce transfert permet au CIII de pomper 4 H^+ . Le complexe IV (CIV), aussi appelé Cytochrome C oxydase, transfère les électrons portés par le Cyt. C à l'oxygène et l'énergie générée par ce transfert permet au CIV de pomper 2 H^+ . L'oxygène est l'accepteur final d'électrons et est réduit en eau par le CIV. L'ATP synthase utilise l'énergie contenue dans le $\Delta\mu H^+$ pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP, de phosphate inorganique (P_i) et de H^+ (Kanabus *et al.*, 2014). L'ANT, un échangeur ATP/ADP, dont l'activité est facilitée par le $\Delta\Psi$, permet un approvisionnement matriciel en ADP et la sortie de l'ATP tandis que le transporteur de phosphate permet un approvisionnement matriciel en P_i , facilité par le ΔpH .

Dans son fonctionnement normal, la chaîne respiratoire produit des ROS (de l'anglais *Reactive Oxygen Species*). Les mitochondries produisent en effet continuellement des anions superoxyde hautement réactifs comme sous-produit du transport d'électrons pendant la phosphorylation oxydative et ses ROS, si produits en excès, peuvent endommager les protéines, les lipides et l'ADN (Youle et van der Bliek, 2012). Chez les mammifères, les mitochondries sont d'ailleurs le site le plus important de ROS ($O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2) (Cadenas et Davies, 2000). En effet, il y a sept sites de production de ROS dans les mitochondries, dont les principaux sont le CI et le CIII du système de transfert des électrons (Brand, 2010). Toutefois, lorsque les

ROS sont produits en excès, ils peuvent, en plus d'endommager les composantes mitochondriales, déclencher des processus cataboliques (Cadenas et Davies, 2000).

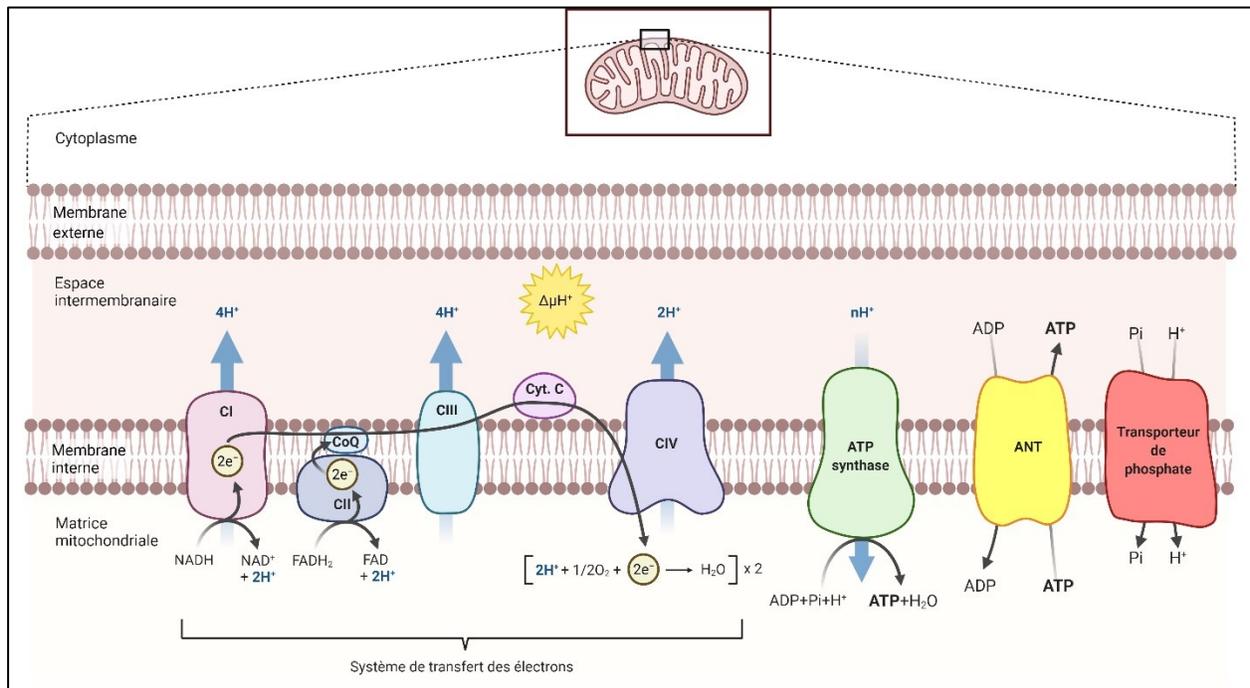


Figure 1.4 Phosphorylation oxydative

Figure 1.4 | Cette figure illustre le fonctionnement de la phosphorylation oxydative. Elle inclut le système de transfert des électrons, aussi appelé chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi que l'ATP synthase, l'ANT et le transporteur de phosphate. Le système de transfert des électrons est un système permettant d'accumuler des protons (H⁺) dans l'espace intermembranaire pour établir un gradient électrochimique de protons (ΔμH⁺). Le système de transfert des électrons comprend quatre complexes protéiques (CI, CII, CIII et CIV) et deux accepteurs d'électrons mobiles (CoQ et Cyt.C). L'ATP synthase utilise l'énergie contenue dans le ΔμH⁺ pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP, de phosphate inorganique (Pi) et de H⁺. L'ANT, un échangeur ATP/ADP facilité par le ΔΨ, permet un approvisionnement matriciel en ADP et la sortie de l'ATP tandis que le transporteur de phosphate permet un approvisionnement matriciel en Pi, facilité par le ΔpH. Image adaptée de «*Electron Transport Chain*», par BioRender.com (2021). Extrait de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.3 Mécanismes impliqués dans la régulation de la masse musculaire

1.3.1 Régulation de la synthèse des protéines

La masse musculaire est le résultat d'un équilibre entre la synthèse et la dégradation protéiques. Ces processus sont régulés par un ensemble de stimuli anabolisant et catabolisant complexes (Kimball et Jefferson, 2010). Quatre voies distinctes sont impliquées dans la synthèse des protéines, soit la voie insuline/IGF1-AKT-mTOR, la voie TGFβ/myostatine/activine/BMP, la voie β-adrenergic et une nouvelle voie des ions FGF/desmosomes/Zinc (voir revue de Sartori, 2021). Dans les sections suivantes, deux régulateurs majeurs, soit la voie insuline/IGF1-AKT-mTOR et la voie TGFβ/myostatine/activine/BMP seront mis de l'avant, car elles font l'objet du présent avant-projet.

1.3.1.1 Voie insuline/IGF1-AKT-mTOR

Une des voies majeures qui régule la synthèse des protéines et la prolifération cellulaire est la voie insuline/IGF1-AKT-mTOR (Figure 1.5). IGF1, de l'anglais *insulin-like growth factor-1*, est une hormone principalement synthétisée dans le foie et qui a une variété d'effets anabolisants autant dans les cultures tissulaires ou cellulaires (Florini, 1987) que dans les cellules musculaires squelettiques *in vivo* (Ascenzi *et al.*, 2019). D'ailleurs, la surexpression d'IGF1 a un effet protecteur contre la perte de masse musculaire et favorise la régénération musculaire lors de sénescence (Musarò *et al.*, 2001). Parmi différentes isoformes d'IGF1 – qui diffèrent par le peptide signal N-terminal de classe 1 ou 2 et par le peptide d'extension C-terminal (E peptide Ea ou Eb) – l'IGF-1Ea a un effet hypertrophique et d'augmentation de force musculaire le plus prononcé, et ce, autant chez les souris jeunes que les souris âgées (Ascenzi *et al.*, 2019). En ce qui concerne l'insuline, elle est produite par le pancréas et active aussi la synthèse protéique des cellules musculaires (Garlick, 2005). Ensemble, l'insuline et l'IGF1 soutiennent la croissance de l'organisme et des muscles en se liant à leur récepteur spécifique. En découle une cascade d'événements de phosphorylation, dont l'activation d'AKT (Blaauw *et al.*, 2009), qui régule la synthèse et la dégradation protéiques par une modulation positive ou négative de protéines, d'enzymes et de facteurs de transcription (Sartori *et al.*, 2021). L'insuline et l'IGF1 activent entre autres la voie PI3K-AKT-mTOR, une voie cruciale dans la régulation de la masse musculaire. En effet, il a été montré que l'activation d'AKT entraîne une hypertrophie des fibres musculaires ainsi qu'une augmentation de la force (Blaauw *et al.*, 2009). Lorsqu'activée, AKT active à son tour mTOR (de l'anglais *mechanistic target of rapamycin*), une sérine/thréonine protéine kinase essentielle dans la régulation de la masse musculaire (Sartori *et al.*, 2021). Chez les mammifères, mTOR peut former deux complexes distincts, soit mTOR complexe 1 (mTORC1) et mTOR complexe 2 (mTORC2), qui se distinguent par leurs protéines accessoires, leur sensibilité à la rapamycine, leurs substrats et leurs fonctions (Liu et Sabatini, 2020). Dans les tissus musculaires, la synthèse protéique est majoritairement régulée par mTORC1 alors que mTORC2 serait majoritairement lié à l'homéostasie glucidique (Liu et Sabatini, 2020). En effet, mTORC1 régule plusieurs processus anabolisants, dont la synthèse protéique ainsi que la biogenèse des ribosomes et des mitochondries (Sartori *et al.*, 2021). mTORC1 augmente la synthèse des protéines en inhibant par phosphorylation d'une protéine de liaison de facteur d'initiation à la traduction eucaryote 4E (4E-BP1) et en activant p70 S6 kinase 1 (S6K1) (Liu et Sabatini, 2020). En effet, lorsque 4E-BP1 est phosphorylée, elle relâche le facteur d'initiation à la traduction eucaryote 4E (eIF4E), un facteur activant l'initiation de la traduction des protéines (Liu et Sabatini, 2020). L'activation de S6K1 va aboutir à l'activation du facteur d'élongation de la traduction dans les cellules eucaryotes 2 (eEF2), régulant ainsi positivement l'étape d'élongation dans la traduction des protéines (Ma et Blenis, 2009).

mTORC1 et S6K1 sont donc des régulateurs positifs de la transcription de l'ARN ribosomique. Parallèlement, mTOR inhibe aussi la dégradation des protéines en bloquant l'autophagie – une des voies de dégradation lysosomale des protéines – via notamment une inhibition de ULK1 (*Unc-51 Like Autophagy Kinase 1*) (Sartori *et al.*, 2021). mTOR est donc un puissant régulateur des mécanismes de synthèse et de dégradation des protéines (Zoncu *et al.*, 2011). Cependant, bien que la voie insuline/IGF1-AKT-mTOR soit très importante dans la régulation de la masse musculaire, il existe d'autres voies permettant de réguler la synthèse et la dégradation des protéines (Sartori *et al.*, 2021).

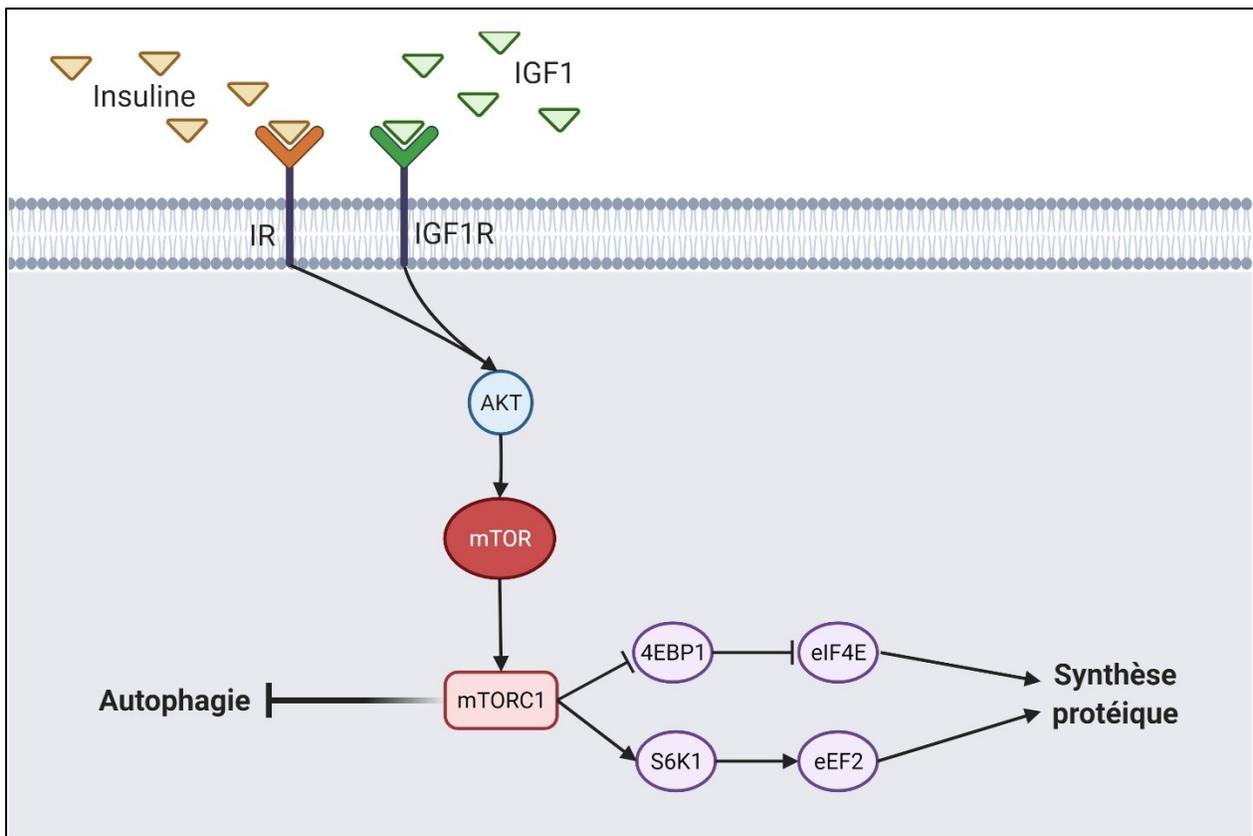


Figure 1.5 Voie insuline/IGF1-AKT-mTOR

Figure 1.5 | Cette figure illustre, de manière simplifiée, la voie insuline/IGF1-AKT-mTOR de la synthèse protéique dans le muscle strié squelettique. Image créée avec BioRender.com.

1.3.1.2 Voie TGFβ/myostatine/activine/BMP

Une autre voie majeure régulant la synthèse protéique dans les tissus musculaires est la voie TGFβ/myostatine/activine/BMP (Figure 1.6). La myostatine est un facteur de croissance spécifique au muscle appartenant à la superfamille des facteurs de croissance transformants bêta (TGFβ) (Sartori *et al.*, 2021). La myostatine est un facteur de croissance limitant la croissance des tissus musculaires qui est hautement conservée à travers les espèces et qui est presque exclusivement exprimée dans le muscle

squelettique (McPherron *et al.*, 1997). Il a été montré que l'inactivation du gène codant pour la myostatine chez les souris entraîne une hypertrophie musculaire très importante, les souris mutées ayant des muscles ayant triplés en masse par rapport aux souris contrôles (McPherron *et al.*, 1997). Le groupe activine/myostatine/TGF β se lie aux récepteurs d'activines et aux récepteurs de TGF β et, au travers du recrutement et de l'activation des ALKs (*activin receptor-like kinase*), déclenchent l'activation par phosphorylation de Smad2/3, un facteur de transcription qui active un programme d'atrophie (Sartori *et al.*, 2009), ce qui favorise la formation d'un complexe hétérotrimérique avec Smad4 (Sartori *et al.*, 2021). De plus, lorsque Smad2/3 est activé, il inhibe la phosphorylation de la signalisation AKT et mTOR (Winbanks *et al.*, 2012). Ainsi l'inhibition de la voie myostatine/TGF β est suffisante pour favoriser la croissance musculaire via la suppression de la phosphorylation de Smad2/3, ce qui conduit à une augmentation de la synthèse protéique et à une diminution de la dégradation protéique (Sartori *et al.*, 2009; Winbanks *et al.*, 2012). De plus, une déplétion de mTOR annule l'effet hypertrophique du blocage de la myostatine (Winbanks *et al.*, 2012) suggérant ainsi des liens étroits entre les voies insuline/IGF1-AKT-mTOR et TGF β /myostatine/activine/BMP. D'ailleurs, lorsqu'AKT est activée, elle surmonte la plupart des effets de la signalisation TGF β sur la masse musculaire (Sartori *et al.*, 2009). Une autre voie qui converge sur Smad4 est la signalisation BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*) et qui est d'ailleurs indispensable pour la régulation de la masse musculaire adulte, et ce, autant dans les situations normales que pathologiques (Sartori *et al.*, 2013). Les BMP/GDF (*Bone morphogenetic proteins / growth and differentiation factors*) se lient à des récepteurs favorisant, par une cascade d'évènements, la phosphorylation et l'hétérotrimérisation de Smad1/5/8 avec Smad4 pour affecter la régulation transcriptionnelle (Sartori *et al.*, 2021). En outre, une inhibition de BMP freine l'hypertrophie générée par l'inhibition de la myostatine suggérant fortement qu'il existe une interaction entre les voies activine/myostatine et BMP pour la régulation de la masse musculaire (Sartori *et al.*, 2021).

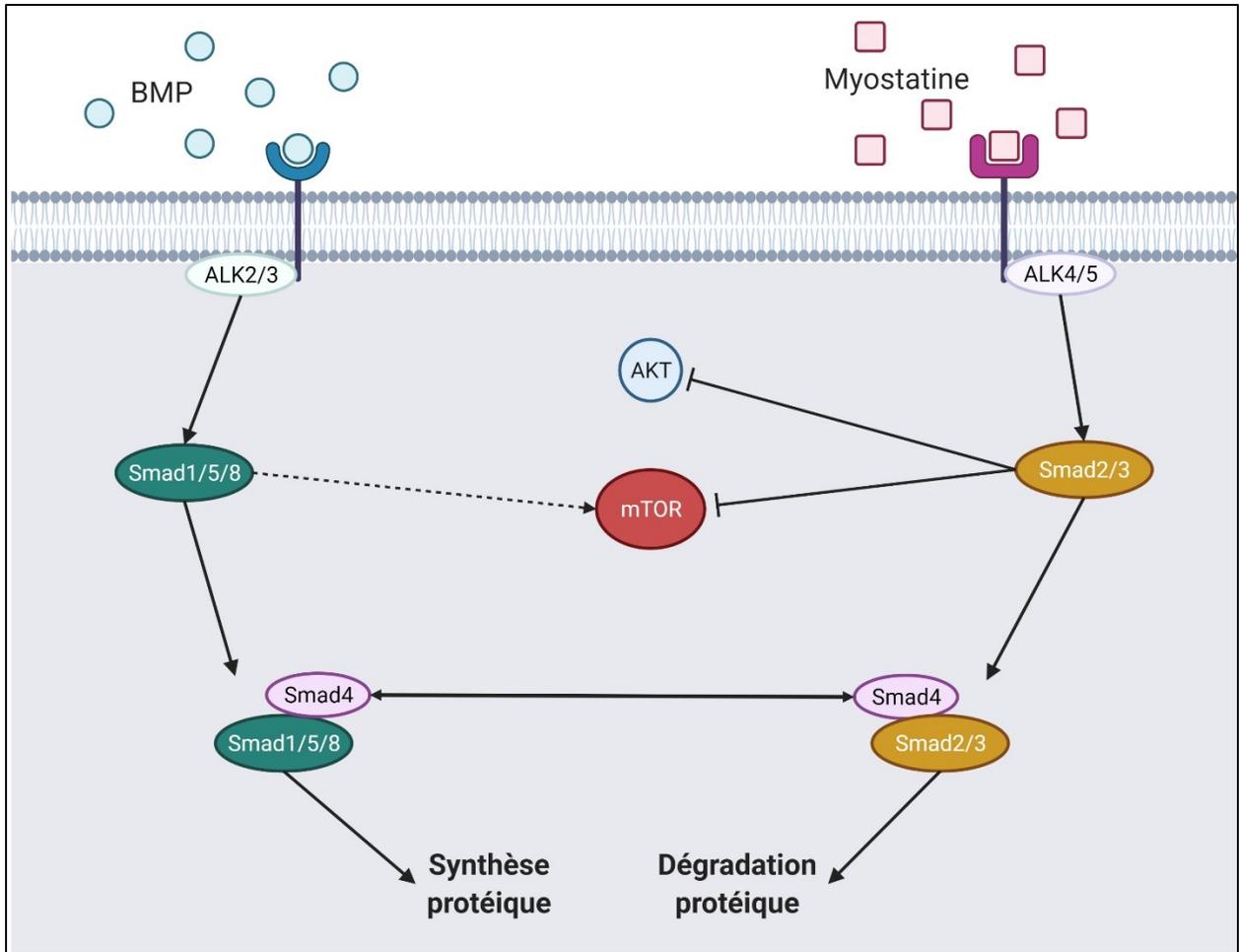


Figure 1.6 Voie TGFβ/myostatine/activine/BMP

Figure 1.6 | Cette figure illustre, de manière simplifiée, la voie TGFβ/myostatine/activine/BMP dans les muscles striés squelettiques. Image créée avec BioRender.com.

1.3.2 Régulation de la dégradation des protéines

La dégradation des protéines est importante pour l'homéostasie cellulaire, autant au cours du développement qu'en réponse à des stimuli externes (Baumeister *et al.*, 1998). Un des rôles essentiels de ce processus est d'éliminer les protéines défectueuses afin d'éviter de potentielles agrégations (Baumeister *et al.*, 1998). Toutefois, la capacité de dégradation des cellules musculaires nécessite une régulation stricte des voies impliquées pour empêcher la destruction de composants essentiels (Klionsky et Emr, 2000). Quatre voies distinctes ont été impliquées dans la dégradation des protéines, soit le système calpaïne, l'apoptose, le système autophagique et la voie ubiquitine-protéasome (Gomez-Cabrera *et al.*, 2020). Dans les sections suivantes, deux régulateurs majeurs, soit la voie ubiquitine-protéasome et le système autophagique seront mis de l'avant, car elles font l'objet du présent avant-projet.

1.3.2.1 Voie de l'ubiquitine-protéasome

La voie ubiquitine-protéasome (Figure 1.7) est une des voies majeures impliquée dans la dégradation des protéines et jouant un rôle important dans l'atrophie musculaire (Zhang, P. *et al.*, 2007). D'ailleurs, lorsque les protéasomes contiennent des signaux de localisation appropriés, ils peuvent être déployés à différents endroits cellulaires dans le cytosol ou dans le noyau (Baumeister *et al.*, 1998). Cette voie est fonctionnelle en condition basale dans le muscle squelettique (Gomez-Cabrera *et al.*, 2020). Les protéasomes sont constitués d'une architecture commune dans laquelle les sous-unités protéolytiques s'auto-assemblent pour former des complexes en forme de tonneau (Baumeister *et al.*, 1998). Ces complexes renferment des cavités internes de plusieurs nanomètres de diamètre et abritent les sites actifs (Baumeister *et al.*, 1998). Puisque leur action nécessite l'hydrolyse de l'ATP, la dégradation des protéines nécessite un apport énergétique (Baumeister *et al.*, 1998). La forme de protéasome la plus commune est le 26S constitué d'une structure d'environ 45nm de longueur qui est composée d'un complexe central 20S (partie catalytique) délimité aux deux extrémités par les complexes 19S (parties régulatrices) (Baumeister *et al.*, 1998). Les complexes 19S sont essentiels, car ils permettent de reconnaître les protéines polyubiquitylées et à les convertir pour la dégradation en petits polypeptides par le complexe 20S (Baumeister *et al.*, 1998). Les sous-unités du complexe 20S sont disposées en quatre anneaux, soit deux anneaux externes de type alpha (α) et deux anneaux internes de type Beta (β) (Baumeister *et al.*, 1998).

La voie ubiquitine-protéasome implique la liaison de l'ubiquitine aux résidus lysine des protéines à dégrader (Gomez-Cabrera *et al.*, 2020). La conjugaison de l'ubiquitine implique les actions séquentielles des enzymes d'activation (E1), de conjugaison (E2) et de ligase (E3) (Pickart, 2001), car le protéasome reconnaît les protéines polyubiquitylées. Les E3 jouent un rôle important dans la détermination des protéines ciblées pour la dégradation par le protéasome (Zhang, P. *et al.*, 2007). D'ailleurs, les deux ubiquitines ligases E3 les plus importantes dans le muscle sont: *Muscle RING-finger protein 1* (MuRF1) et *Muscle Atrophy F-box* (MAFbx / Atrogin-1). En effet, les protéines induites le plus dramatiquement lors de l'atrophie est l'ubiquitine ligase spécifique au muscle, l'atrogine-1 (MAFbx) et MuRF1 (Gomes *et al.*, 2001; Sandri *et al.*, 2004), et ce dans de multiples modèles d'atrophie musculaire (Bodine *et al.*, 2001). Lors de différents stress induisant une atrophie, tels que le jeûne, le diabète, le cancer et l'insuffisance rénale, il est possible de voir une forte induction de l'expression d'atrogine-1 avant que la perte de masse musculaire ne soit détectable et cette expression se maintient lorsque la protéolyse globale est accélérée (Gomes *et al.*, 2001). Cela suggère donc qu'atrogine-1 a un rôle important à la fois dans l'initiation et dans le maintien de la protéolyse (Gomes *et al.*, 2001).

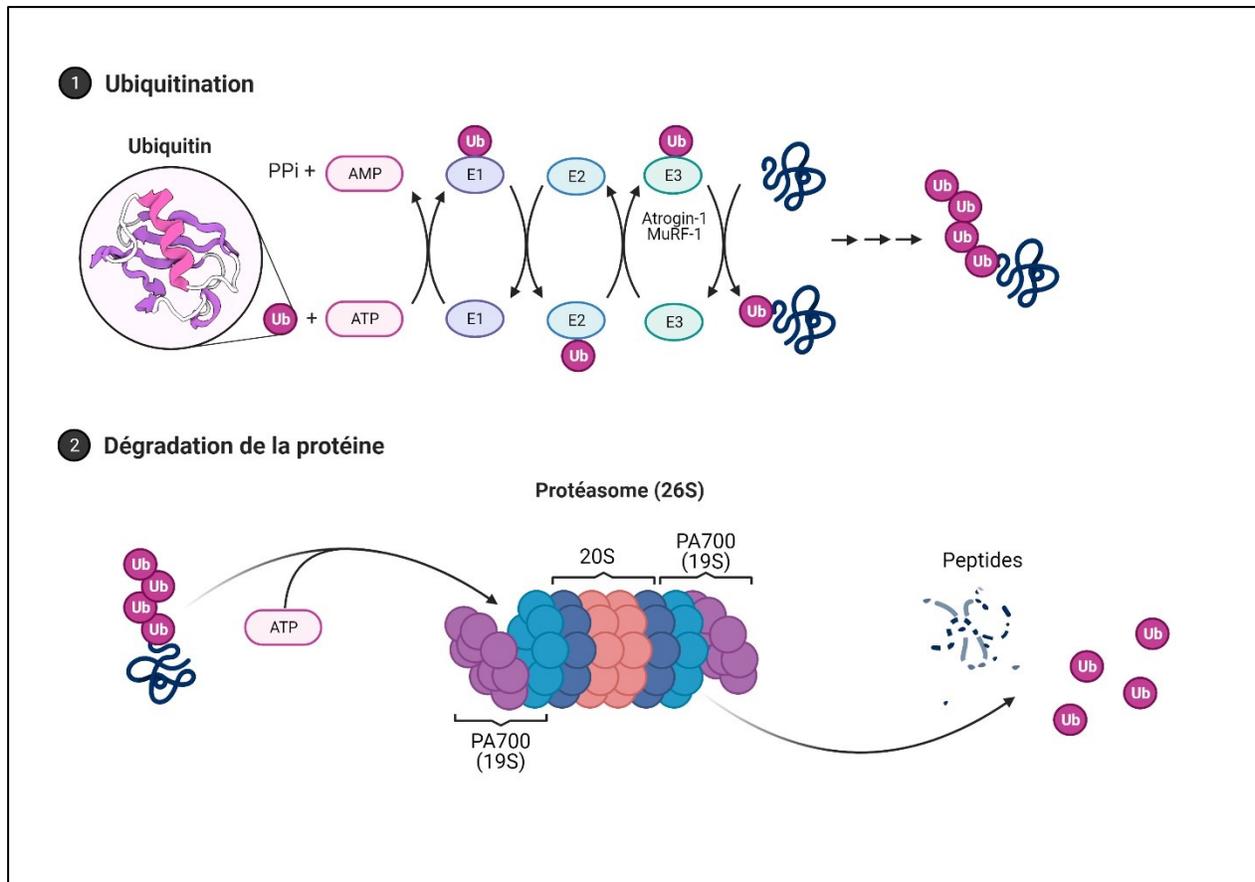


Figure 1.7 Voie de l'ubiquitine-protéasome

Figure 1.7 | Cette figure décrit le processus de dégradation ubiquitine protéasome. 1) Ubiquitination : Processus de liaison de l'ubiquitine sur les protéines à dégrader. Les actions séquentielles des enzymes d'activation (E1), de conjugaison (E2) et de ligase (E3) sont impliqués dans la conjugaison de l'ubiquitine. 2) Dégradation de la protéine : Processus dans lequel les protéines poly-ubiquitinilés sont dégradés en peptides par le protéasome. Image adaptée de «*Ubiquitin Proteasome System*», par BioRender.com (2021). Extrait de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.3.2.2 Voie de l'autophagie

Un des régulateurs majeurs de la masse musculaire est l'autophagie. Ce processus fait référence à toute voie de dégradation cellulaire qui implique la livraison de cargaison cytoplasmique au lysosome (Levine et Kroemer, 2008). C'est un processus qui dégrade et recycle des composantes cytoplasmiques, incluant des protéines, de manière basale et qui est augmenté en situation de stress (Joubert *et al.*, 2011). Une hyperactivation de l'autophagie a été impliquée dans l'atrophie musculaire causée par de multiples conditions, telle que le jeûne, la cachexie causée par le cancer, la dénervation et l'inactivité (Sartori *et al.*, 2021). Dans un contexte physiologique, les cellules utilisent l'autophagie pour se débarrasser des composantes dysfonctionnelles et superflues afin de maintenir une homéostasie cellulaire et de s'adapter aux différentes demandes physiologiques (Kim *et al.*, 2007). Ce processus est particulièrement flexible étant donné qu'il peut dégrader des cibles spécifiques, des organites entiers et de grandes portions

cytoplasmiques (Bloemberg et Quadri, 2019). On distingue d'ailleurs trois types d'autophagie : i) la macro-autophagie (communément appelé autophagie), ii) la micro-autophagie et iii) l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (Joubert *et al.*, 2011; Levine et Kroemer, 2008). Ces trois formes diffèrent en ce qui concerne leurs fonctions physiologiques et leur mode de livraison de la cargaison au lysosome (Levine et Kroemer, 2008). En effet, la micro- et la macro-autophagie ont la capacité d'engloutir de grandes structures par des mécanismes sélectifs et non-sélectifs (Mizushima *et al.*, 2008). L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes ne dégrade que les protéines solubles de manière sélective (Mizushima *et al.*, 2008).

Dans le cadre de cet avant-projet, nous nous limiterons à la macro-autophagie (appelée par la suite autophagie). Elle est le principal mécanisme catabolique que les cellules eucaryotes utilisent pour dégrader les protéines et les organites et implique la livraison de cargaison cytoplasmique séquestrée à l'intérieur de vésicules à double membrane (autophagosome) au lysosome (Levine et Kroemer, 2008). L'autophagie se produit en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la maturation. Lors de l'étape d'initiation, un croissant membranaire appelé phagophore se forme (Joubert *et al.*, 2011). S'en suit l'étape d'élongation où le phagophore s'allonge en une structure en forme de coupe et commence à engloutir la matière cellulaire pour finalement se refermer sur elle-même formant ainsi l'autophagosome (Hurley et Young, 2017). La phase de maturation se produit ensuite lorsque la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec le lysosome pour ainsi former la structure d'autolysosome où la membrane interne de l'autophagosome ainsi que tout son contenu sont dégradés en acide aminé (Hurley et Young, 2017).

Plus précisément, le complexe ULK1-ATG13-FIP200 joue un rôle essentiel dans l'étape d'initiation autophagique (Gomez-Cabrera *et al.*, 2020), soit la formation du phagophore. De plus, la formation de l'autophagosome implique l'action de divers gènes liés à l'autophagie (Atgs), telle que LC3, essentiel pour l'élongation et la formation d'un autophagosome mature (Gomez-Cabrera *et al.*, 2020). En effet, LC3-I est activé par Atg7 et transféré à Atg3 qui ensuite clive 22 acides aminés pour former LC3-II (Kim *et al.*, 2007). D'ailleurs, LC3-II est un marqueur utile pouvant refléter l'induction d'autophagie étant donné qu'il se localise sélectivement dans les autophagosomes en formation et nouvellement formés (Kim *et al.*, 2007; Klionsky *et al.*, 2016). Ensuite, p62 (SQSTM1) se lie à LC3-II, dirigeant ainsi les protéines ubiquitinées vers l'autophagosome pour la dégradation autophagique (Ichimura *et al.*, 2008). Autrement dit, la protéine p62 sert de lien entre LC3 et les protéines ubiquitinées (Klionsky *et al.*, 2016). Sa fonction est donc très

importante pour l'élimination des protéines accumulées, et par conséquent p62 et LC3-II sont souvent utilisées comme indicateur de flux autophagique (Bloemberg et Quadriatero, 2019). Une fois que l'autophagosome est complété, ils fusionnent aux lysosomes à l'aide de protéines membranaires associées aux lysosomes (LAMPs) (Bloemberg et Quadriatero, 2019). Autrement dit, l'autophagie est un processus complexe capturant de grosses portions du cytoplasme dans l'autophagosome pour ensuite se diriger vers le lysosome où ils fusionnent et lorsque les protéines entrent dans le lysosome, elles sont dégradées en acide aminé (Joubert *et al.*, 2011). Les lysosomes sont capables de digérer les substrats, dont les composants peuvent soit être recyclés pour créer de nouvelles structures cellulaires ou organites, soit être traités davantage et utilisés comme source d'énergie (D'Arcy, 2019). Cette capacité à s'auto-digérer permet non seulement de débarrasser la cellule d'organites ou molécules superflues ou endommagées et d'éliminer certains pathogènes, mais elle permet également de fournir des nutriments à la cellule pour maintenir les fonctions cellulaires vitales (Levine et Kroemer, 2008).

Il est important de mentionner qu'il existe différentes formes d'autophagie. En effet, la mitophagie est une forme spécifique d'autophagie qui dégrade sélectivement les mitochondries endommagées (Tang *et al.*, 2019). En fait, les mitochondries produisent continuellement des anions superoxyde hautement réactifs comme sous-produit du transport d'électrons pendant la phosphorylation oxydative et ses ROS, si produits en excès, endommagent les protéines, les lipides et l'ADN (Youle et van der Bliek, 2012). Ainsi, la mitophagie peut jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle et génétique mitochondriale, car elle permet d'éliminer les mitochondries âgées et dysfonctionnelles protégeant ainsi les cellules de ses méfaits, tel que la production excessive de ROS (Kim *et al.*, 2007). Les principales protéines impliquées dans la mitophagie sont Parkin, Pink1 (Vives-Bauza *et al.*, 2010), Bnip3 et NIX (Zhang, J. et Ney, 2009).

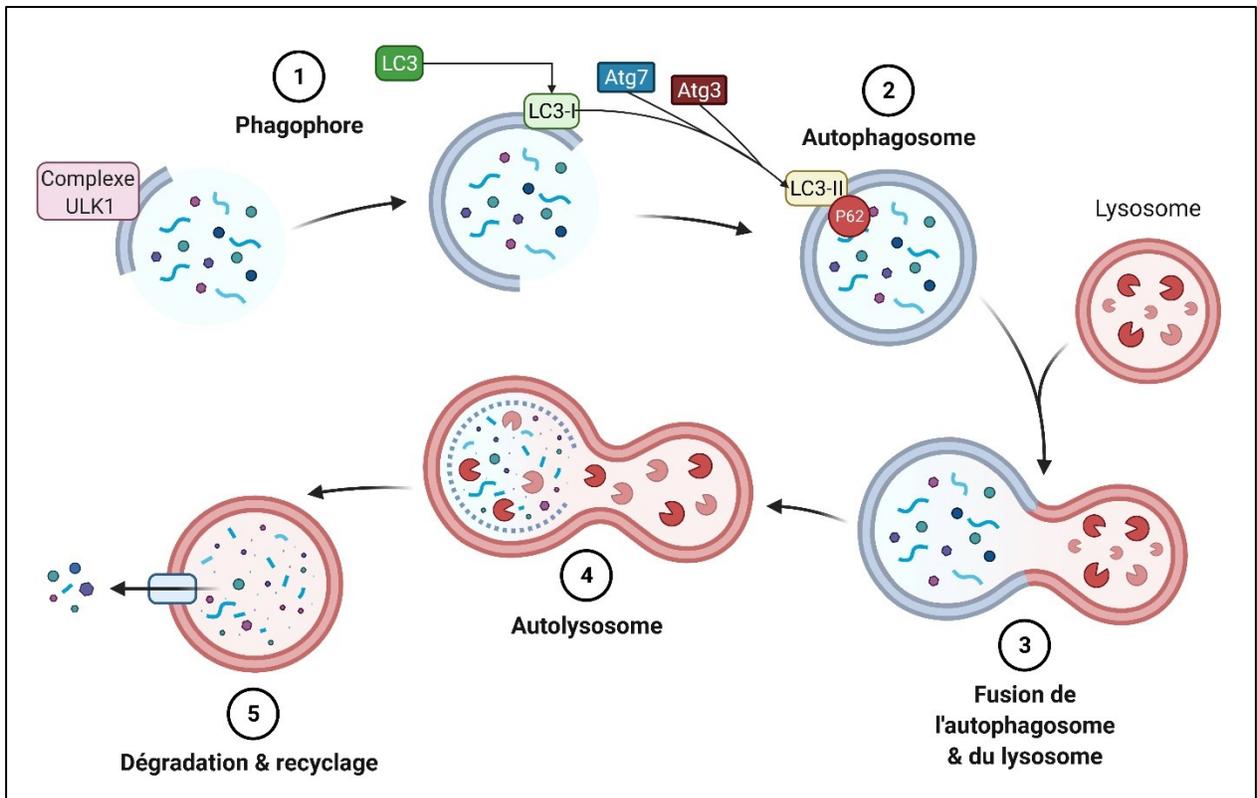


Figure 1.8 Voie de l'autophagie

Figure 1.8 | Cette figure illustre, de manière simplifiée, le processus de dégradation de la macro-autophagie, communément appelé autophagie en cinq étapes. La première étape est l'initiation autophagique où le complexe ULK1 joue un rôle essentiel dans la formation du phagophore. Ensuite, lors de l'élongation du phagophore, LC3-I joue un rôle important, et lorsqu'on ajoute Atg3 et Atg 7, LC3-II permet la formation d'un autophagosome mature. La fusion de l'autophagosome mature avec le lysosome est l'étape suivante, formant ainsi l'autolysosome et permettant de dégrader et de recycler tout le contenu du cargo. Image adapté de «Autophagy Process», par BioRender.com (2021). Extrait de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

1.3.3 Implication de FoxO et des ROS dans la régulation de la masse musculaire

Tel que mentionné dans les sections précédentes, il existe deux voies majeures qui régulent la dégradation protéique musculaire : l'autophagie et la voie ubiquitine-protéasome. Un régulateur commun de ces voies est FoxO, un facteur de transcription (Figure 1.9). En effet, l'activation par déphosphorylation de FoxO peut, à elle seule, provoquer une cascade d'évènements ayant comme finalité une atrophie des fibres musculaires (Sandri *et al.*, 2004). Il existe différents variants de FoxO et il semblerait que FoxO1, FoxO3 et FoxO4 soient régulés de manière coordonnée et que l'activation de FoxO3 est à la fois nécessaire et suffisante pour causer une atrophie rapide (Sandri *et al.*, 2004). De plus, la voie impliquant AKT a non seulement la capacité de stimuler la synthèse protéique, mais elle a aussi la capacité de réduire la dégradation protéique grâce à l'inhibition des facteurs de transcription FoxO (Sandri *et al.*, 2004). La phosphorylation de FoxO1, FoxO3a et FoxO4 médiée par AKT inhibe donc les processus de transcription dépendants de FoxO, incluant la transcription de protéines clés de l'autophagie et de la voie ubiquitine-

protéasome (Sandri *et al.*, 2004). L'inactivation ou l'activité réduite d'AKT conduit à une diminution du niveau de FoxO phosphorylé dans le cytoplasme et une augmentation de sa translocation dans le noyau, ce qui augmente l'expression d'atrogine-1, de MuRF1 (voie de l'ubiquitine-protéasome), de LC3 et de Bnip3 (voie de l'autophagie) (Schiaffino *et al.*, 2013). Il est important ici de souligner que des études récentes ont montré que les ROS peuvent réguler à la fois la dégradation et la synthèse protéique (voir Gomez-Cabrera *et al.*, 2020 pour une revue détaillée) en inhibant AKT et en activant FOXO. Par ces mécanismes, les ROS peuvent ainsi diminuer la synthèse des protéines et augmenter la dégradation des protéines (Gomez-Cabrera *et al.*, 2020).

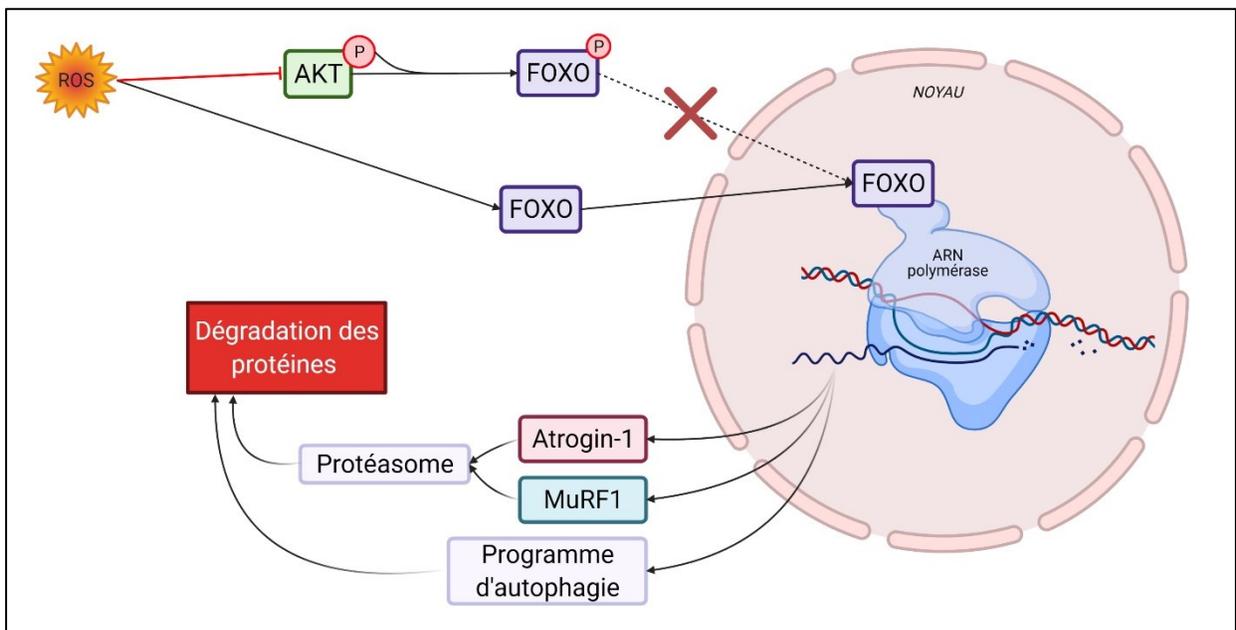


Figure 1.9 Voie impliquant FoxO et les ROS dans la régulation de la masse musculaire

Figure 1.9 | Cette figure illustre la voie impliquant FoxO et les ROS dans la régulation de la masse musculaire. Les ROS inhibent AKT levant ainsi l'inhibition exercée sur FoxO dans le cytoplasme, ce qui augmente sa translocation dans le noyau. Cela permet entre autres d'activer la voie ubiquitine-protéasome et la voie de l'autophagie, ce qui augmente la dégradation protéique. Image créée avec BioRender.com.

1.4 DEPP1, un nouveau régulateur de l'autophagie

Initialement, DEPP1 a été étudiée pour identifier les molécules impliquées dans la décidualisation dans les cellules humaines stromales endométriales (Watanabe *et al.*, 2005). Cette protéine a donc originellement été caractérisée comme étant une protéine induite par la progestérone dans les cellules stromales de l'endomètre (Watanabe *et al.*, 2005). L'expression de DEPP1 dans différents tissus humains varie selon les études. En effet, Watanabe et ses associés (2005) l'ont détecté dans différents tissus humains tels que les testicules, le placenta, l'ovaire et le rein ; Kuroda et ses associés (2010) ont détecté DEPP1 dans des tissus

humains, tel que le poumon, le rein et le gras adipeux blanc. En outre, chez les souris, un transcrit de DEPP1 a été détecté dans le cœur, le cerveau, les poumons, les muscles squelettiques et le gras adipeux blanc (Kuroda *et al.*, 2010). Des marquages en immunofluorescence ont montré que DEPP1 serait localisée dans le noyau et le cytoplasme dans les cellules embryonnaires humaines du rein HEK293 (Watanabe *et al.*, 2005). Salcher et ses collaborateurs ont également rapporté que DEPP1 serait principalement localisée dans le cytoplasme des neuroblastomes et presque exclusivement dans les mitochondries et les peroxyosomes (Salcher *et al.*, 2014)

Il est important de noter qu'à ce jour, très peu d'études sont disponibles sur DEPP1. Toutefois, il semblerait qu'elle soit augmentée suite à différents stress. En effet, lors d'hypoxie par exemple, une augmentation significative de l'expression de DEPP1 – la plus élevée de la liste des gènes – a été détectée par puce à ADN (*microarray*) dans une lignée cellulaire de glioblastome humain U-251 (Ragel *et al.*, 2007). De plus, une augmentation d'ARNm et de contenu en protéine de DEPP1 a été détectée lorsqu'une lignée cellulaire de la veine ombilicale humaine EA.hy926 a été soumise à une hypoxie (Chen *et al.*, 2011). Une augmentation de l'expression de DEPP1 est aussi détectable lorsqu'on soumet une lignée cellulaire de lymphoblastoïde humaine à un traitement de rayons ultraviolets ou de rayons ionisants (Rieger et Chu, 2004). Par ailleurs, lors de privation d'énergie via une diète chez des femmes obèses âgées de 21 à 49 ans, l'expression de DEPP1 augmente légèrement dans le tissu adipeux (Dahlman *et al.*, 2005). Lorsque l'on soumet des souris C57BL/6J à un jeûne, l'expression de DEPP1 augmente significativement dans les muscles squelettiques, le foie et le tissu adipeux blanc (Kuroda *et al.*, 2010). Le jeûne régule donc à la hausse l'ARNm de DEPP1 dans plusieurs organes sensibles à l'insuline, incluant les muscles squelettiques et, inversement, la réalimentation, qui augmente les taux plasmatiques de glucose et d'insuline, réduit les taux d'ARNm de DEPP1 (Kuroda *et al.*, 2010). À l'inverse, une diète riche en gras chez des souris C57BL/6J réduit significativement l'expression de DEPP1 dans l'hypothalamus (Zhou *et al.*, 2019).

Plusieurs données expérimentales suggèrent que l'expression de DEPP1 est contrôlée par FoxO. En effet, Oyabu *et al.*, (2022) ont comparé les profils d'expression génique de souris FoxO1-Tg (modèle de gain de fonction) avec un modèle de souris de perte de fonction FoxO1,3a,4^{-/-} à jeun *in vivo* et ont pu identifier DEPP1 comme étant un des nouveaux gènes cibles de FoxO1. DEPP1 serait donc un des gènes cibles de FoxO1 étant donné qu'une surexpression de FoxO1 est suffisante pour l'induction de DEPP1 (Oyabu *et al.*, 2022). De plus, l'augmentation de DEPP1 lors d'hypoxie serait régulée au niveau de la transcription par FoxO (Chen *et al.*, 2011). Étant donné que la phosphorylation de FoxO – dépendante de l'insuline et d'AKT

– entraîne l'inactivation de FoxO, cela pourrait expliquer la réduction de l'expression de DEPP1 (Chen *et al.*, 2011). D'ailleurs, l'expression de DEPP1 est élevée dans le foie et les tissus adipeux des souris diabétiques souffrant d'hypoinsulinémie (Kuroda *et al.*, 2010). À l'inverse, l'expression de DEPP1 serait régulée à la baisse par l'insuline de manière dose-dépendante et temporelle dans les adipocytes 3Y3-L1 de souris ainsi que les cellules d'hématome H4IIE de rats et HepG2 humaines (Kuroda *et al.*, 2010). De plus, il est connu que l'activation de FoxO entraîne la production de différents ARNm essentiels pour l'autophagie et la voie ubiquitine-protéasome, soit les voies de dégradation protéique. Or, des études ont associé DEPP1 à l'autophagie (Salcher *et al.*, 2017; Stepp *et al.*, 2014). En effet, une surexpression de DEPP1 dans des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293) serait associée à une augmentation de l'autophagie, alors qu'une diminution de l'expression de DEPP1 serait associée à une diminution de l'autophagie dans les cellules épithéliales de rein (Vero) mais pas les cellules dans les HEK293 (Stepp *et al.*, 2014). Cette augmentation de l'autophagie induite par DEPP1 est aussi observée dans les cellules de neuroblastome (SH-EP) (Salcher *et al.*, 2017). Salcher et ses associés proposent que le stress oxydatif induirait l'expression de DEPP1 via FoxO3, ce qui provoquerait ainsi la formation d'autophagosomes (Salcher *et al.*, 2017). Ils ont également rapporté que DEPP1 régule les niveaux cellulaires de ROS (Li *et al.*, 2018; Salcher *et al.*, 2014; Salcher *et al.*, 2017).

DEPP1 semble donc être augmentée dans diverses conditions d'atrophies et pourrait ainsi être un régulateur négatif de la masse musculaire. Cependant, à ce jour, aucune étude mécanistique n'a investigué les rôles joués par DEPP1 dans les muscles striés squelettiques. Nos données préliminaires (Figure 1.10) vont d'ailleurs dans le même sens que les publications présentées précédemment. En effet, les données préliminaires établissent que l'expression de Depp1 dépendant de FoxO et est régulée positivement dans des conditions cataboliques. En utilisant le GO dataset (#GDS5656), nous avons pu en effet mettre en évidence que DEPP1 augmente lors du jeûne, et que cette augmentation est abolie dans les souris *triple knock-out* pour FoxO 1, 2 et 3 (Figure 1.10.A). Cette augmentation de l'expression de DEPP1 en réponse à un jeûne a été confirmée dans le cadre d'un projet pilote réalisé au laboratoire (Figure 1.10.B). En cherchant dans la base de données sarcoatlas (<https://sarcoatlas.scicore.unibas.ch/>), nous avons constaté que l'atrophie musculaire causée par le vieillissement est associée à une augmentation de l'expression de DEPP1 (Figure 1.10.C). De plus, dans le cadre d'un projet pilote, nous avons obtenu des données indiquant que l'atrophie induite par l'immobilisation de la jambe (IMM) est aussi associée à une augmentation de l'expression de DEPP1 (Figure 1.10.D-E). Aussi, lors de l'atrophie causée par un sepsis induit par injection de lipopolysaccharide (LPS), l'expression de DEPP1 augmente massivement (Figure 1.10.F). Ces données

constituent une base solide justifiant la nécessité d'étudier les rôles joués par DEPP1 dans la physiologie musculaire.

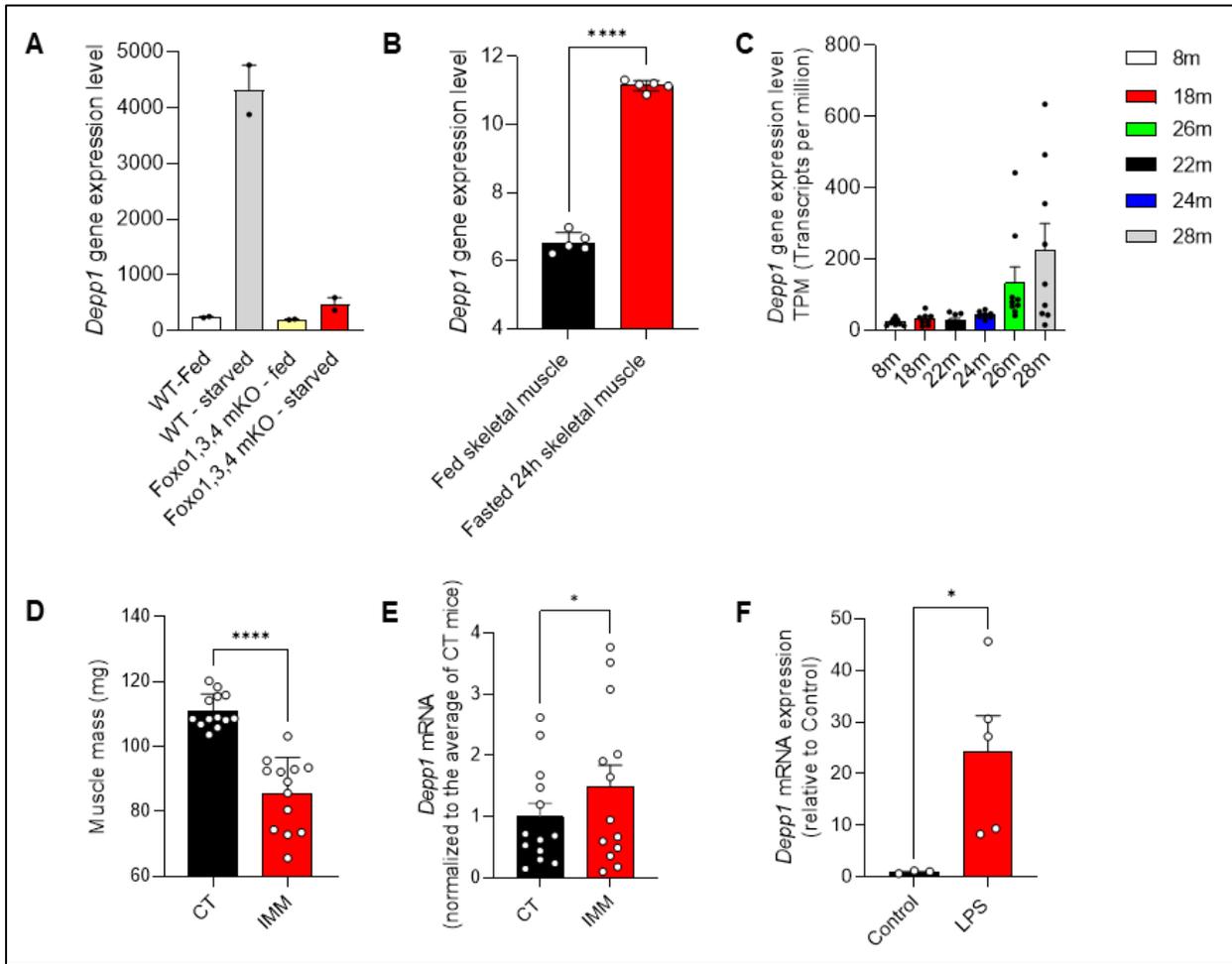


Figure 1.10 DEPP1, un nouveau régulateur de la régulation de la masse musculaire

Figure 1.10 | Cette figure met de l'avant les données préliminaires sur *Depp1*. A) Effet du jeûne et du *triple knock-out* de FoxO 1, 2 et 3 sur l'expression de *Depp1* (GO dataset #GDS5656). B) Effet de l'atrophie induite par le vieillissement sur l'expression de *Depp1* dans le gastrocnemius de souris (Sarcoatlas - <https://sarcoatlas.scicore.unibas.ch/>). C-D) Effet de l'atrophie induite par immobilisation de la jambe de souris (IMM) sur l'expression de *Depp1* comparativement à la jambe témoin controlatérale (CT) (étude pilote non publiée). E) Effet de l'atrophie suite au sepsis induit par injection de lipopolysaccharide (LPS) sur l'expression de *Depp1*. F) Effet d'un jeûne de 24h sur l'expression de *Depp1* dans le muscle squelettique.

CHAPITRE 2

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

À ce jour, très peu d'études ont été menées pour caractériser les fonctions cellulaires de DEPP1. De plus, la plupart de ces études ont été menées sur des modèles de cultures cellulaires et ont rapporté des résultats divergents. Il est également important de souligner qu'aucune étude n'a investigué les rôles joués par DEPP1 dans les muscles squelettiques. Étant donné le rôle potentiel de DEPP1 dans la régulation de l'autophagie et de la masse musculaire, il nous apparaît essentiel d'étudier les rôles joués par cette protéine dans la physiologie musculaire. Dans ce chapitre, les objectifs et hypothèses du projet de recherche seront exposés.

2.1 Objectif de recherche

L'objectif de cette étude est de caractériser les rôles joués par DEPP1 dans les muscles squelettiques. Pour ce faire, nous avons réprimé l'expression de Depp1 dans les muscles tibiaux antérieurs à l'aide d'injections intramusculaires de Virus Adéno-Associés (VAA).

2.1.1 Sous-objectifs de recherche et hypothèses

Pour caractériser les rôles de Depp dans les muscles squelettiques, nous voulons :

- Déterminer si une déplétion de DEPP1 a un effet sur l'autophagie dans les muscles. Pour ce faire, nous quantifierons des marqueurs tels que LC3-I, LC3-II et p62, puis en analysant le flux autophagique déterminé à l'aide de traitement à la colchicine. Étant donné les rôles potentiels de DEPP1 dans la régulation de l'autophagie, notre hypothèse est que réprimer l'expression de DEPP1 devrait inhiber l'autophagie et ainsi diminuer la dégradation protéique.
- Étudier les effets d'une déplétion de DEPP1 sur la masse musculaire et l'intégrité musculaire en regardant la masse musculaire, la taille des fibres (marquage de Laminine), la force du muscle (contractilité), les noyaux centraux (marquage de Laminine-Dapi), les signes de nécroses (marquage d'hématoxyline et d'éosine (H&E)) et des signes d'inflammation (marquage F4-80). Nos hypothèses sont que réprimer l'expression de DEPP1 devrait générer une hypertrophie musculaire étant donné son rôle potentiel dans la régulation de la dégradation protéique. Il devrait générer une augmentation de la force musculaire tout en gardant une intégrité musculaire optimale, car nous supposons que l'hypertrophie générée sera fonctionnelle.

- Vérifier l'impact d'une déplétion de DEPP1 sur le contenu en mitochondries (contenus en VDAC1, TOMM20, OXPHOS et Citrate synthase) et l'activité enzymatique mitochondriale (marquage de la Succinate déshydrogénase (SDH) et de la Cytochrome c oxydase (COX)). Sur les bases des données suggérant que DEPP1 est localisé au niveau mitochondrial et pourrait augmenter la production de ROS (Salcher *et al.*, 2014), nos hypothèses sont que réprimer l'expression de DEPP1 ne devrait pas affecter le contenu mitochondrial, mais pourrait améliorer l'activité des enzymes mitochondriales.
- Vérifier si une déplétion de DEPP1 aurait un effet sur des marqueurs de stress oxydatif des muscles. Étant donné les rôles potentiels de DEPP1 dans la régulation des ROS (Salcher *et al.*, 2014), la provenance mitochondriale potentielle de ces ROS et la localisation mitochondriale de DEPP1, notre hypothèse est que réprimer l'expression de DEPP1 devrait diminuer des marqueurs de stress oxydant.

CHAPITRE 3

MÉTHODOLOGIE

Ce projet de recherche vise à étudier les impacts d'une déplétion en DEPP1 de 3, 6 et 12 semaines dans les muscles squelettiques de souris. La déplétion de DEPP1 a été obtenue à l'aide d'injections intramusculaires de VAA contenant un court ARN en épingle (short hairpin RNA) ciblant l'ARN messager de DEPP1.

3.1 Modèle animal

Les souris ont été hébergées dans l'animalerie de l'Institut de recherche du Centre universitaire de santé McGill (IR-CUSM) tout au long de l'expérimentation. L'IR-CUSM se situe au 2155, rue Guy à Montréal. À noter que toutes les procédures qui ont été réalisées sur les souris ont été approuvées par le comité d'éthique (*Animal Use Protocol #7549*). Toutes les expérimentations ont été effectuées sur des souris mâles C57Bl/6 achetés chez Charles River Laboratories. Les souris ont été hébergées sous un photocycle lumière/obscurité de 12:12 h à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ et 50-60% d'humidité relative avec accès à un régime alimentaire standard et à de l'eau disponible *ad libitum*. Trois souris ont été hébergées par cage pour éviter le stress que les souris peuvent subir lorsqu'elle demeure seule dans une cage (Valzelli, 1973).

3.2 Modèle expérimental et injections de virus adéno-associés

Après 7 jours d'acclimatation, les injections ont débuté. L'expression de DEPP1 a été diminuée spécifiquement dans le muscle squelettique à l'aide d'une injection intramusculaire de VAA. Tous les VAA étaient de sérotype 1, un sérotype avec un tropisme prouvé pour les cellules musculaires squelettiques (Leduc-Gaudet *et al.*, 2019). Toutes les constructions de VAA contenaient un promoteur (U6) ainsi qu'une séquence codant pour la protéine rapporteur luciférase (fLuc). Pour diminuer l'expression de DEPP1, le VAA contenait la séquence codant pour un shARN ciblant le produit du gène *Depp1* (AAV1-fLuc-U6-mDEPP1-shRNA). Ce VAA sera appelé ci-après VAA-shDEPP1. Un VAA témoin contenant la séquence fLuc et un shRNA scramble (séquence aléatoire ne ciblant aucun ARN messager) sous le contrôle du promoteur U6 a été injecté dans la jambe controlatérale (AAV1-fLuc-U6-Scrambl-shRNA). Ce VAA sera appelé ci-après VAA-Scrambl. Tous les VAA ont été achetés chez Vector Biolabs (Malvern, PA, USA) et ont été injectés (25 μL par site; $1,5 \times 10^{11}$ copies de génome) dans le Tibial antérieur (TA) et le Long extenseur des orteils (LEO). Les injections ont été réalisées sous anesthésie générale avec 2% d'isoflurane. Les injections ont été

effectué lorsque les souris avaient environ 11 semaines, puis les sacrifices ont été effectués lorsque ces mêmes souris avaient 15, 18 ou 24 semaines, soit à la 3^e, 6^e et 12^e semaine suivant l'injection de VAAs.

3.3 Groupe et taille de l'échantillon

Il y a trois cohortes d'animaux qui ont eu un temps de transduction différent, soit 3 semaines (n=6), 6 semaines (n=18) et 12 semaines (n=9) pour ainsi voir l'effet d'une diminution de l'expression de DEPP1 à différents temps. Dans chaque groupe, chaque souris était son propre contrôle, car une jambe a été injectée avec le VAA-shDEPP1 et la jambe controlatérale de la même souris a été injectée avec un VAA-Scrambl. Ceci permet d'abolir la variabilité interindividuelle.

3.4 Contractilité musculaire

La fonction contractile des muscles TA a été analysée 12 semaines après les injections de VAAs. Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritoneale du cocktail suivant : kétamine (100 mg mL⁻¹), xylazine (20 mg mL⁻¹) et acépromazine (10 mg mL⁻¹). Si nécessaire, l'anesthésie a été maintenue avec des doses supplémentaires de 0.05 ml du cocktail anesthésiant. Le logiciel *Dynamic Muscle Control and Analysis (DMC/DMA)* a été utilisée pour la collecte des données (*Aurora Scientific, Aurora, ON*). Le tendon distal du muscle TA a été isolé et attaché avec une soie chirurgicale 4.0 au bras de levier d'un système à un transducteur de force 305C-LR, en suivant un protocole décrit précédemment avec quelques modifications mineures (Gospillou *et al.*, 2018; Mofarrahi *et al.*, 2015). La section exposée du muscle a été maintenue humide avec des gouttes saline isotonique (37°C) et a directement été stimulée avec une électrode placée sur le ventre du muscle. Des stimuli supramaximaux, d'une durée d'impulsion de 0.2 ms, ont été délivrés à l'aide d'un stimulateur électrique contrôlé par un ordinateur. Les relations force-fréquence ont été déterminées à la longueur optimale du muscle par des stimulations supramaximales séquentielles pendant 300 ms à 10, 30, 50, 100 et 120 Hz avec des intervalles d'une minute entre chaque train de stimulations pour éviter la fatigue. À la fin de ce protocole, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Le TA et l'EDL ont ensuite été prélevés soigneusement, leur masse a été déterminée puis ces muscles ont été congelés dans de l'azote. La force musculaire *in situ* a été normalisée par masse (g) du TA.

3.5 Sacrifice et récolte des tissus

Les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane puis sacrifiées par dislocation cervicale à l'exception des souris qui ont été utilisées pour l'analyse de contractilité (voir section 3.4 pour plus de

détails). Les muscles collectés ont été pesés. La moitié du TA a été congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour des expériences d'immunobuvardage et de qPCR. L'autre moitié du TA a été monté avec les fibres musculaires en orientation transversale dans de la gomme adragante sur des blocs de plastique spécialement conçus pour l'histologie (Gouspillou *et al.*, 2014). Ils ont ensuite été congelés dans de l'isopentane liquide refroidi dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3.6 Manipulation des muscles squelettiques

3.6.1 Coupes musculaires pour analyses histologiques

Des coupes en série de dix microns d'épaisseur ont été découpées dans un cryostat à -20°C et montées sur des lames recouvertes de lysine (*Superfrost*) pour déterminer entre autres i) la taille des fibres avec des marquages dystrophine, laminine et dapi, ii) le type de fibre avec un marquage de composition en chaînes lourdes de myosine des fibres (MHC), iii) la teneur en mitochondrie avec un marquage pour succinate déshydrogénase (SDH), et iv) les fibres nécrotiques avec un marquage à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). Les analyses des marquages ont été effectuées à l'aide d'ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, États-Unis, <https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.6.1.1 Détermination de la taille des fibres

Les coupes transversales musculaires ont été laissées à température ambiante et réhydratées avec du PBS puis bloquées avec du sérum de chèvre (10% dans du PBS) pendant 1 heure. Les coupes ont ensuite été incubées pour une durée de 1 heure avec un IgG polyclonale anti-laminine de lapin (Sigma L9393, 1:750). Les coupes ont ensuite été lavées 3 fois 5 minutes avec du PBS pour ensuite être incubées 1 heure avec l'anticorps secondaire suivant : Alexa Fluor 488 IgG anticorps de chèvre anti-lapin (A-11008, 1:500). Les coupes ont ensuite été lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS et recouvertes d'une lamelle en utilisant du *Prolong Diamond* (P36961; ThermoFisher) comme milieu de montage. Les lames ont été imagées avec un microscope à fluorescence *Zeiss Axio Imager 2* (Zeiss, Dorval, QC, Canada). Le diamètre minimum de Feret (*minimum Feret's diameter*), un marqueur fiable de la taille des fibres (Briguet *et al.*, 2004), et l'aire de chaque fibre a été déterminé pour chaque échantillon musculaire en utilisant toutes les fibres de la coupe musculaire. Pour évaluer la taille des fibres musculaires, les myofibres ont été tracées à l'aide d'une macro (Reyes-Fernandez *et al.*, 2019) et d'une vérification manuelle du traçage à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ.

3.6.1.2 Détermination de l'activité succinate déshydrogénase

Les coupes transversales musculaires ont été colorées pour l'activité de la SDH (complexe II du système de transfert d'électron). Lorsque les coupes étaient à température ambiante, elles ont été incubées dans une solution contenant du nitrobleu de tétrazolium (1.5 mM), du succinate de sodium (130 mM), du méthosulfate de phénazine (0.2 mM) et de l'azoture de sodium (0.1 mM) pendant environ 10 minutes. Les coupes ont ensuite été lavées 3 fois 5 minutes dans de l'eau distillée et recouvertes d'une lamelle à l'aide d'un milieu de montage aqueux (Vector Labs, VectaMount AQ Medium, H-5501). Elles ont été imagées à l'aide d'un microscope Olympus IX83 Ultra Sonic (Olympus, Japon). L'intensité du marquage SDH a été quantifiée manuellement à l'aide du logiciel ImageJ.

3.6.1.3 Détermination des fibres nécrotiques

Les coupes transversales musculaires ont été laissées à température ambiante. Ensuite, l'hématoxyline a été appliquée sur les coupes pour recouvrir complètement la section du tissu et elles ont été incubées durant 5 minutes. Les lames ont ensuite été rincées 2 fois 5 minutes avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de tache. Le réactif de bleuissement a été appliqué sur les coupes et elles ont été incubées durant 10 à 15 secondes puis rincées 2 fois 5 minutes avec de l'eau distillée. Les lames ont été ensuite trempées dans de l'alcool absolu et épongées. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 2 à 3 minutes dans une solution adéquate d'éosine Y puis rincées avec de l'alcool absolu 3 fois. Les lames ont finalement été recouvertes d'une lamelle à l'aide d'un milieu de montage et imagées à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus IX83 Ultra Sonic (Olympus, Japon). Les portions des fibres avec une distribution H&E anormale ont été quantifiées manuellement à l'aide du logiciel ImageJ.

3.6.1.4 Détermination du stress oxydatif par marquage au dihydroéthidium

Pour détecter la présence d'espèces réactives de l'oxygène dans les muscles squelettiques, l'anion superoxyde plus spécifiquement, un protocole préétabli utilisant un marquage au dihydroéthidium (DHE) a été utilisé (Pottecher *et al.*, 2013). Brièvement, nous avons pris des coupes de 10 µm d'épaisseur préalablement congelées. Elles ont été séchées à l'air et ensuite incubées pendant 30 minutes à 37 °C avec 2.5 µM de DHE dans une solution saline tamponnée au phosphate. Lorsqu'oxydé en bromure d'éthidium par l'anion superoxyde, le DHE produit une fluorescence rouge (Pottecher *et al.*, 2013). Les sections ont ensuite été montées dans du *Prolong Diamond* (P36961; ThermoFisher) et recouvertes d'une lamelle. Les coupes ont été examinées sous un microscope à épifluorescence Olympus IX83 Ultra Sonic (Olympus, Japon). L'intensité du signal a été quantifiée manuellement à l'aide du logiciel ImageJ.

3.6.2 Immunobuvardage

Environ 15 à 30 mg de chaque muscle ont été homogénéisés dans 10 volumes d'un tampon d'extraction composé de base Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, Sodium désoxycolate 0.5%, SDS 0.1% et 10 µl/ml d'un cocktail d'inhibiteur de protéases et de phosphatases. L'homogénat a été centrifugé à 15 000 g pendant 15 min à 4°C et la teneur en protéine du surnageant a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Ensuite, des aliquots de surnageant ont été mélangés avec du tampon de Laemmli et ont été bouillis à 95°C pendant 5 minutes.

Selon le contenu en protéines à quantifier, différentes quantités de protéines des TA ont été chargées sur des gels gradients (4-15%) et *stain-free*TM (Mini PROTEAN® TGX Stain-FreeTM Gels, Biorad), électrophorés par SDS-PAGE puis transférés sur des membranes en fluorure de polyvinylidène (PVDF, Biorad). Une image *stain free*TM des membranes a ensuite été prise à l'aide du système d'imagerie ChemiDocTM pour quantifier le contenu en protéines totales dans chaque ligne d'échantillon. Cette technologie *stain-free*TM permet une normalisation fiable des quantifications en protéines d'intérêt. Les membranes ont été incubées durant 1h à température ambiante dans un tampon de blocage composé de 5% de BSA dans une solution saline tamponnée au Tris contenant 0.1% de Tween 20 (TBS-T), puis incubées pendant 1 à 3 heures à température ambiante avec un anticorps primaire spécifique dilué dans du tampon de blocage (Tableau 3.1). Les membranes ont été lavées trois fois pendant 5 minutes dans du TBS-T et ensuite incubées avec des anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris conjugués à une peroxydase de radis (HRP) et dilués dans du tampon de blocage pendant une heure à température ambiante avant un nouveau lavage dans du TBS-T (3 fois 5 minutes). Les contenus en protéines ont été détectés en utilisant un substrat de chimiluminescence amélioré (Biorad, substrat Clarity ECL, 170-5060) en utilisant le système d'imagerie ChemiDocTM. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel Image Lab (Biorad). Pour chaque échantillon, le signal ECL de la protéine d'intérêt sera normalisé à l'intensité de l'image *stain-free*TM de l'échantillon correspondant (la technologie *stain-free*TM sera utilisée comme contrôle de chargement).

Tableau 3.1 Liste des anticorps utilisés pour l'immunobuvardage

Anticorps	Espèces	Source / n° du produit	Dilution
Anti-LC3A/B	Lapin	Abcam #ab128025	1/1000
Anti-P62/SQSTM1	Souris	Abcam #ab56416	1/3000
Anti-4-HNE	Souris	R&D Systems #MAB3249	1µg/mL
Anti-OXPPOS	Souris	Abcam #ab110413	1/500
Anti-VDAC1	Souris	Abcam #ab14734	1/1000
Anti-TOMM20	Lapin	Abcam #ab186735	1/1000
Anti-Citrate synthase	Lapin	Abcam #ab96600	1/1000
Anti-souris IgG	Chèvre	Abcam #ab6728	1/10000
Anti-lapin IgG	Chèvre	Abcam #ab6721	1/10000

Tableau 3.1 | Ce tableau représente la liste des anticorps qui ont été utilisés pour l'immunobuvardage.

3.6.3 PCR quantitative en temps réel pour quantifier l'expression de DEPP1

L'ARN total a été extrait des échantillons de muscles congelés à l'aide d'un mini-kit PureLink RNA (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada). L'ARN total (2µg) a été rétrotranscrit à l'aide d'un kit de transcription inverse : *Superscript II Reverse Transcriptase Kit* (Invitrogen Canada). Les réactions ont été effectuées à 42°C pendant 50 minutes et à 90°C pendant 5 minutes. La détection en temps réel de l'expression de l'ARNm a été réalisée en utilisant un système de détection de séquence Prism 7000 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, É-U*). Des expériences de PCR en temps réel ont été réalisées en triplicata pour détecter l'expression de DEPP1. Les quantifications d'ARNm des gènes ont été déterminées en normalisant les données aux moyennes géométriques de 3 gènes de ménage (Cyclophiline, Gapdh, 18s). Les séquences d'amorces pour tous les gènes se trouvent dans le tableau 3.2. Chaque amorce (3.5 µl) a été combinée avec le réactif de transcriptase inverse (1 µl) et le SYBR® *Green master mix* (25 µl) (Qiagen, Valencia, CA, É-U). Le profil thermique a été comme suit : 95°C pendant 10 minutes ; 40 cycles de 95°C chacun pendant 15 secondes ; 57°C pendant 30 secondes ; et 72°C pendant 33 secondes. Pour chaque gène cible, des valeurs de seuil de cycle ont été obtenues. Les quantifications relatives du niveau d'ARNm des gènes cibles ont été déterminées en utilisant la méthode du cycle de seuil ($\Delta\Delta CT$).

Tableau 3.2 Liste des amorces pour les qPCR

	Amorces sens (5'-3')	Amorces anti-sens (3'-5')
<i>18S</i>	GAGGCCATGATTAAGAGGGATG	AAACTCCGACTTTCGTTCTTGG
<i>Bactin</i>	AACCGTGAAAAGATGACCCAG	CACAGCCTGGATGGCTACGTA
<i>Cyclophylin</i>	GCGTCTCCTTCGAGCTGTTT	CTGGCACATGAATCCTGGAA
<i>Gapdh</i>	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCG	ACCAGGAAATGAGCTTGACAA
<i>DEPP1</i>	CAACGATTCGGGAAATGTCA	CCTTGCCAGCACTGAGGTG

Tableau 3.2 | Ce tableau représente la liste des amorces pour les qPCR qui ont été effectuées pour ce projet.

3.7 Flux autophagique

Afin de mesurer le flux autophagique dans les muscles squelettiques des souris, nous avons injecté les souris avec solution saline tamponnée au phosphate (PBS stérile) (groupe témoin) ou avec de la colchicine en intrapéritonéale (groupe colchicine : 0.4mg/kg/jour), un agent qui dépolymérise les microtubules (Ju *et al.*, 2010), bloquant ainsi l'étape de fusion autophagosome-lysosome. Le traitement a été administré deux fois, soit à 48 heures et à 24 heures avant le jour du sacrifice où les muscles ont été prélevés. La colchicine a été achetée chez Bioshop Canada (CLC406.100 Bioshop). Nous avons ainsi pu voir s'il y avait une augmentation du niveau de protéine LC3II dans le muscle des souris injectées avec de la colchicine comparativement à celles injectées avec du PBS stérile. Les muscles du TA et de l'EDL ont été excisés et des échantillons de tissu ont été préparés pour les immunoblots afin de détecter LC3 (ab128025; Abcam). Étant donné que LC3-II se lie étroitement aux membranes autophagosomiques et est une protéine de marqueur autophagique, la différence des niveaux de LC3-II en présence ou en absence de colchicine, soit l'augmentation de la teneur en LC3-II, représente le flux autophagique (Gouspillou *et al.*, 2018).

3.8 Quantification et analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9. Lorsqu'une seule variable a été comparée entre les muscles injectés par le VAA-shDepp1 et le VAA-Scrambl, les différences ont été testées à l'aide de tests de *student* bilatéraux appariés. Lorsque plusieurs variables ont été comparées, les différences ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance à mesures répétées (2-way ANOVA) et de tests posthocs Šidák pour corriger pour les comparaisons multiples. Les valeurs $p < 0.05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS

Dans ce chapitre, les résultats de mon projet de maîtrise portant sur la caractérisation des rôles joués par DEPP1 dans les muscles squelettiques seront présentés.

4.1 Vérification de la déplétion de DEPP1 dans les muscles injectés

L'expression de DEPP1 a été diminuée via une injection intramusculaire de VAA (Figure 4.1) dans le TA de chaque groupe (voir chapitre 3 pour plus de détails). Brièvement, les souris ont été injectées lorsqu'elles avaient environ 11 semaines, puis elles ont été sacrifiées à 3, 6 ou 12 semaines post-injection (Figure 4.1.A). À noter qu'il y a deux cohortes à 6 semaines de shDEPP1, car l'une d'entre elles a été utilisée pour analyser le flux autophagique. La déplétion de DEPP1 a été confirmée via qPCR pour chaque groupe. Nos résultats montrent une expression largement inférieure de DEPP1 dans les muscles injectés avec le VAA-shDEPP1 comparativement aux muscles injectés avec le VAA-Scrmbl pour chaque groupe, soit une baisse de 24.62%, 56.79%, 41.02% et 67.58% après 3, 6 et 12 semaines, respectivement (Figure 4.1.B). À noter que seules les souris ayant une déplétion effective de DEPP1 ont été conservées pour les expérimentations. Plus précisément, dans le groupe destiné à avoir une déplétion de DEPP1 de 3 semaines, nous avons injecté 6 souris au total. Sur ces 6 souris, une des souris est malheureusement décédée lors de l'anesthésie et nous n'avons pas pu confirmer la déplétion en DEPP1 pour une autre souris. Ce groupe était donc composé de 4 souris. Pour la cohorte-1 du groupe à 6 semaines de déplétion, nous avons injecté 6 souris, mais nous n'avons pas pu confirmer la déplétion en DEPP1 pour une d'entre elles. Cette cohorte de 6 semaines était donc composée de 5 souris. Pour la cohorte-2 du groupe à 6 semaines, nous avons injecté 12 souris avec les VAA, dont 6 souris avec du PBS puis 6 souris avec de la colchicine. Nous n'avons pas pu confirmer la déplétion en DEPP1 pour une des souris ayant reçu l'injection de PBS et une des souris ayant reçu la colchicine n'a pas eu de déplétion de DEPP1 à la suite de l'injection de VAA. De plus, dû au traitement à la colchicine, deux souris sont décédées. Ainsi, la cohorte-2 du groupe de 6 semaines est composée de 8 souris au total. Finalement, 9 souris ont été injectées pour le groupe de 12 semaines, mais nous n'avons pas pu confirmer la déplétion en DEPP1 pour une d'entre elles. Ce groupe était donc composé de 8 souris.

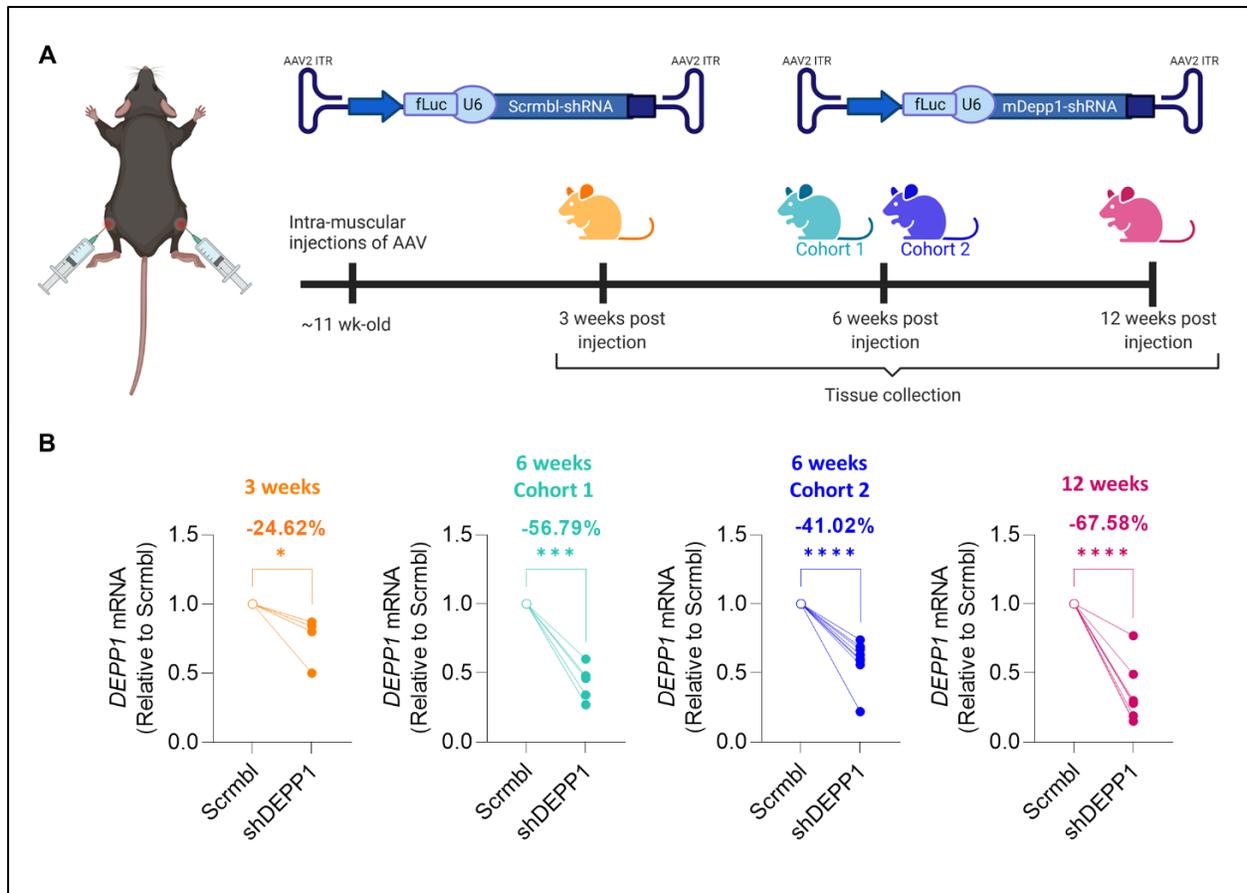


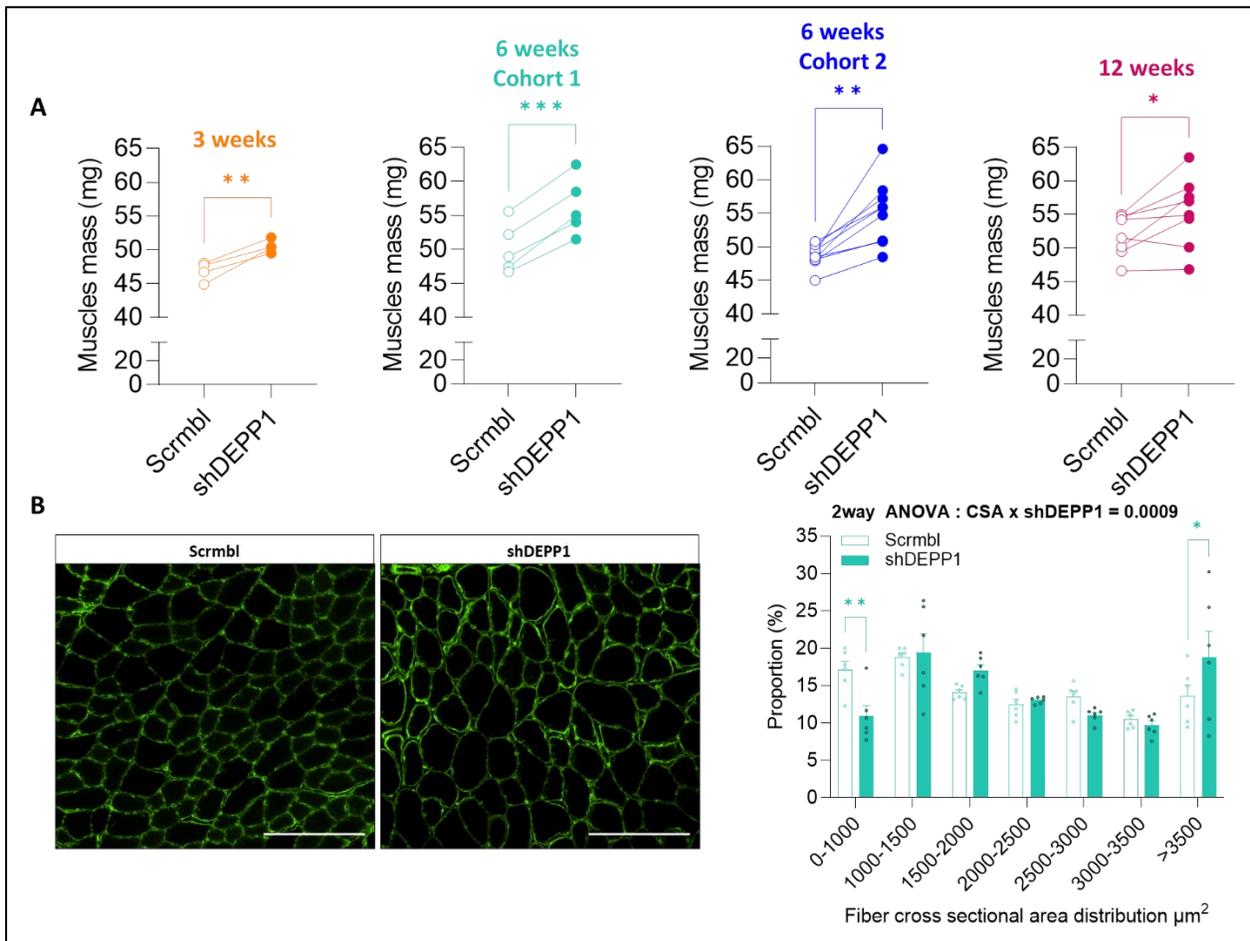
Figure 4.1 Déplétion de DEPP1 réussie dans les muscles squelettiques

Figure 4.1 | Cette figure met de l'avant A) le modèle expérimental utilisé avec une ligne du temps des différents groupes soit 3 semaines (n=4), 6 semaines cohorte 1 (n=5), 6 semaines cohorte 2 (n=8) et 12 semaines (n=8) post-injections. B) La déplétion de DEPP1 a été confirmée par qPCR dans le TA de ces groupes. Seules les souris ayant eu une déplétion de DEPP1 et ayant survécu jusqu'au jour de l'euthanasie ont été utilisées pour le reste des expérimentations (3 semaines n=4 ; 6 semaines, cohorte 1 n=5 ; 6 semaines, cohorte 2 n=8 ; 12 semaines n=8). Les analyses statistiques ont été effectuées par test-t unilatéral apparié. * : p<0.05, *** : p<0.001, **** : p<0.0001.

4.2 Effets d'une déplétion de DEPP1 sur la masse et la force musculaire

La déplétion de DEPP1 a causé une augmentation de la masse du TA, et ce, à 3, 6 et 12 semaines post-injection (Figure 4.2.A). Pour déterminer si cette augmentation de la masse du TA est causée par une hypertrophie des fibres musculaires, nous avons quantifié la surface de section des fibres à l'aide d'un marquage à la laminine réalisé sur coupes histologiques. Il est possible de voir un changement de la distribution de la taille des fibres à 6 et 12 semaines. Plus précisément, à 6 semaines de déplétion de DEPP1, nous avons observé une diminution du nombre de fibres de petite taille (0-1000 μm^2) et une augmentation de la proportion de fibres ayant une taille au-dessus de 3500 μm^2 (Figure 4.2.B). En revanche, à partir de 12 semaines de déplétion de DEPP1, il y a toujours une augmentation de la proportion de fibres ayant une taille au-dessus de 3500 μm^2 , mais il y a aussi des changements plus complexes pour les petites fibres. En

effet, nous avons également observé une augmentation de la proportion des fibres dans la catégorie 0-1000 μm^2 , mais une diminution dans la catégorie 1000-1500 μm^2 (Figure 4.2.C). Afin de déterminer si l'hypertrophie musculaire observée était fonctionnelle, nous avons étudié les propriétés contractiles des TA après 12 semaines de déplétion en DEPP1. Comme nous pouvons le voir dans la Figure 4.2.D, aucune différence de force absolue n'a été observée entre les TA contrôle et ceux présentant une déplétion en DEPP1. Cependant, nous avons observé qu'une déplétion en DEPP1 cause une diminution significative de la force spécifique (Figure 4.2.E), indiquant clairement que l'hypertrophie que nous avons observée n'est pas fonctionnelle.



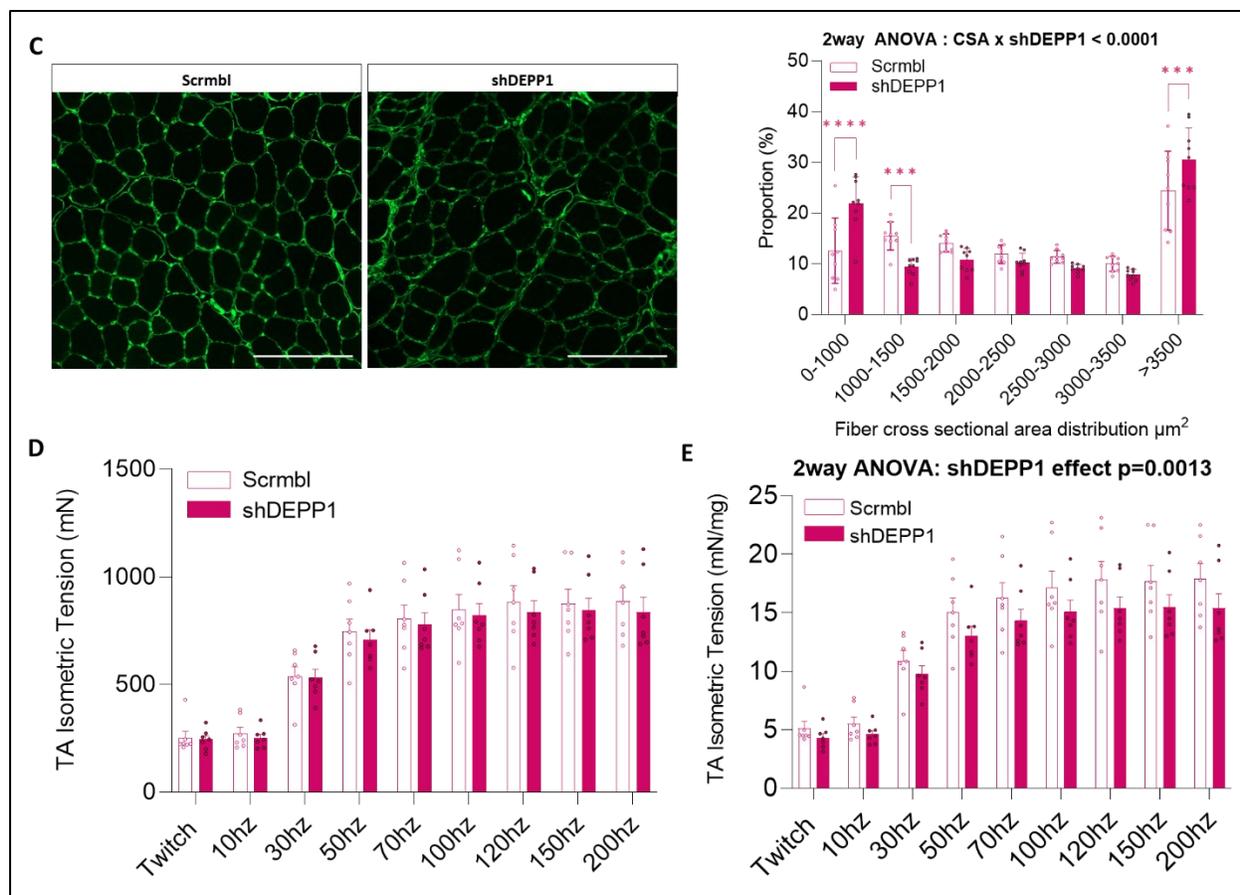


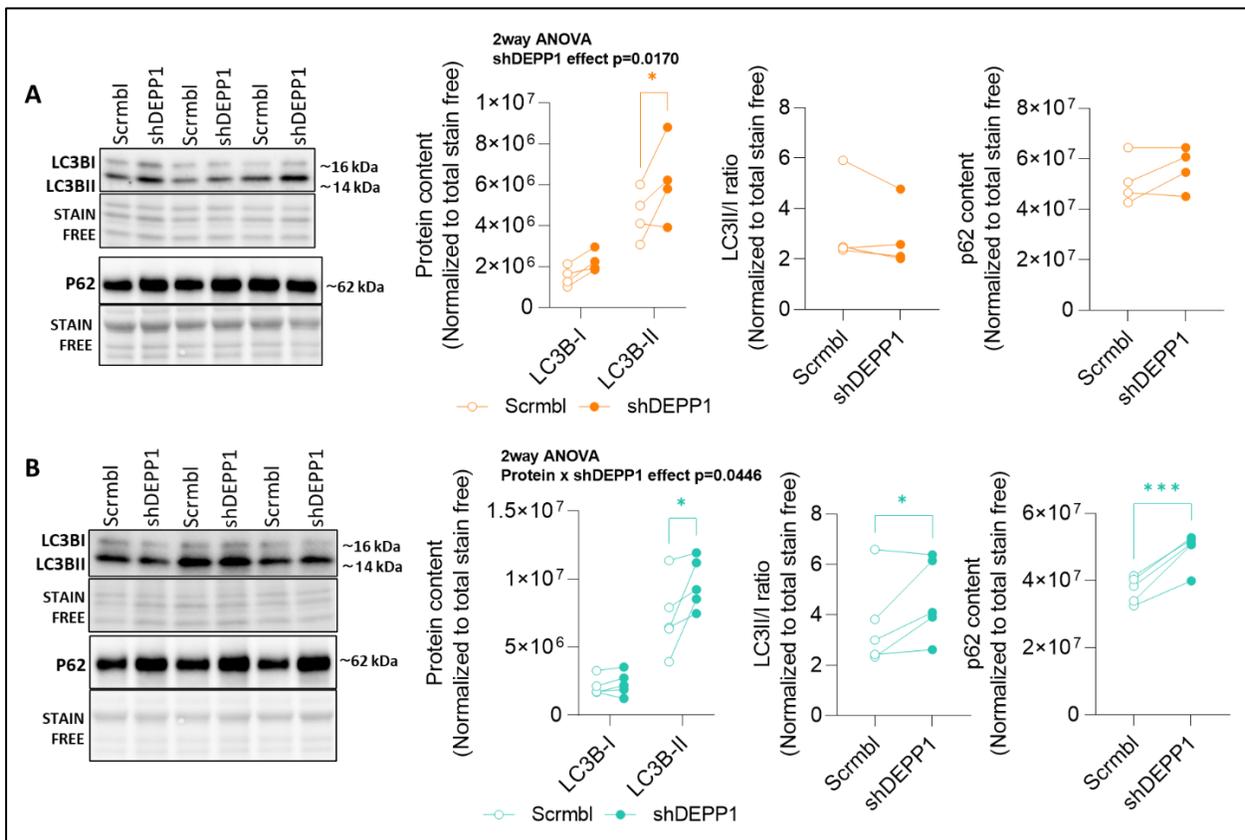
Figure 4.2 La déplétion de DEPP1 induit une hypertrophie et altère la contractilité musculaire

Figure 4.2 | A) Masse des muscles TA : la déplétion de DEPP1 induit une augmentation de la masse du TA, et ce, dans chaque groupe (3 semaines n=4 ; 6 semaines, cohorte 1 n=5 ; 6 semaines, cohorte 2 n=8 ; 12 semaines n=8). Les analyses statistiques ont été effectuées par test-t bilatéral païré. * : p<0,05, ** : p<0.01, *** : p<0.001. B et C) Quantification de la taille des fibres du TA en fonction de la surface des coupes transversales comparant la jambe Scrambl versus shDEPP1 à 6 semaines post-injections (n=5) et C) 12 semaines post-injections (n=8). L'échelle des images est à 200 μm . Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par analyse de la variance à deux facteurs (2way ANOVA) suivie du test post-hoc Šidák. * : p<0,05, ** : p<0.01, *** : p<0.001, **** : p<0.0001. D et E) Analyse de la contractilité du TA du groupe de 12 semaines post-injection (n=8) mesurée *in situ* sur une gamme de fréquences de stimulation. D) La force absolue et E) la force spécifique sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées par analyse de la variance à deux facteurs (2way ANOVA) suivie du test post-hoc Šidák.

4.3 Effets d'une déplétion de DEPP1 sur l'autophagie

Tel que discuté dans la section Introduction, des données suggèrent que DEPP1 pourrait être impliquée dans la régulation de l'autophagie (Salcher *et al.*, 2017; Stepp *et al.*, 2014). En effet, une surexpression de DEPP1 serait associée à une augmentation de l'autophagie et une diminution de l'expression de DEPP1 serait associée à une diminution de l'autophagie dans des cellules rénales en culture (Stepp *et al.*, 2014). Cependant, aucune donnée n'existe *in vivo*. Nous sommes donc allés investiguer l'effet d'une déplétion de DEPP1 dans les muscles squelettiques sur des marqueurs d'autophagie tels que LC3B-I, LC3B-II et p62. Nos résultats indiquent que dès 3 semaines de déplétion de DEPP1 il y a une accumulation significative du

contenu en LC3B-II, mais que le ratio LC3-II/-I et que le contenu protéique de LC3B-I et p62 restent inchangé à ce stade (Figure 4.3.A). À 6 et 12 semaines de déplétion de DEPP1, nous avons observé une augmentation du contenu protéique de LC3B-II, mais aussi du ratio LC3B-II/-I ainsi que de p62 (Figure 4.3.B et C). LC3-I reste toutefois inchangée à 6 et 12 semaines post-injection (Figure 4.3.B et C). Nos résultats suggèrent que l'autophagie est altérée en réponse à une déplétion de DEPP1. Cependant, l'autophagie étant un processus dynamique, ces résultats obtenus par immunobuvardage sont difficiles à interpréter. Pour obtenir un aperçu plus dynamique de l'effet d'une déplétion de DEPP1 sur l'autophagie, une deuxième cohorte à 6 semaines de déplétion de DEPP1 a été traitée avec de la colchicine permettant de bloquer la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Nous avons ainsi pu quantifier l'accumulation du niveau protéique de LC3-II de la jambe shDEPP1 versus Scrambl en réponse au traitement à la colchicine. Comme le montre la Figure 4.3.D, la quantification de l'accumulation du contenu en LC3B-II entre la jambe injectée avec le shDEPP1 versus le Scrambl montre qu'une déplétion de DEPP1 diminue le flux autophagique.



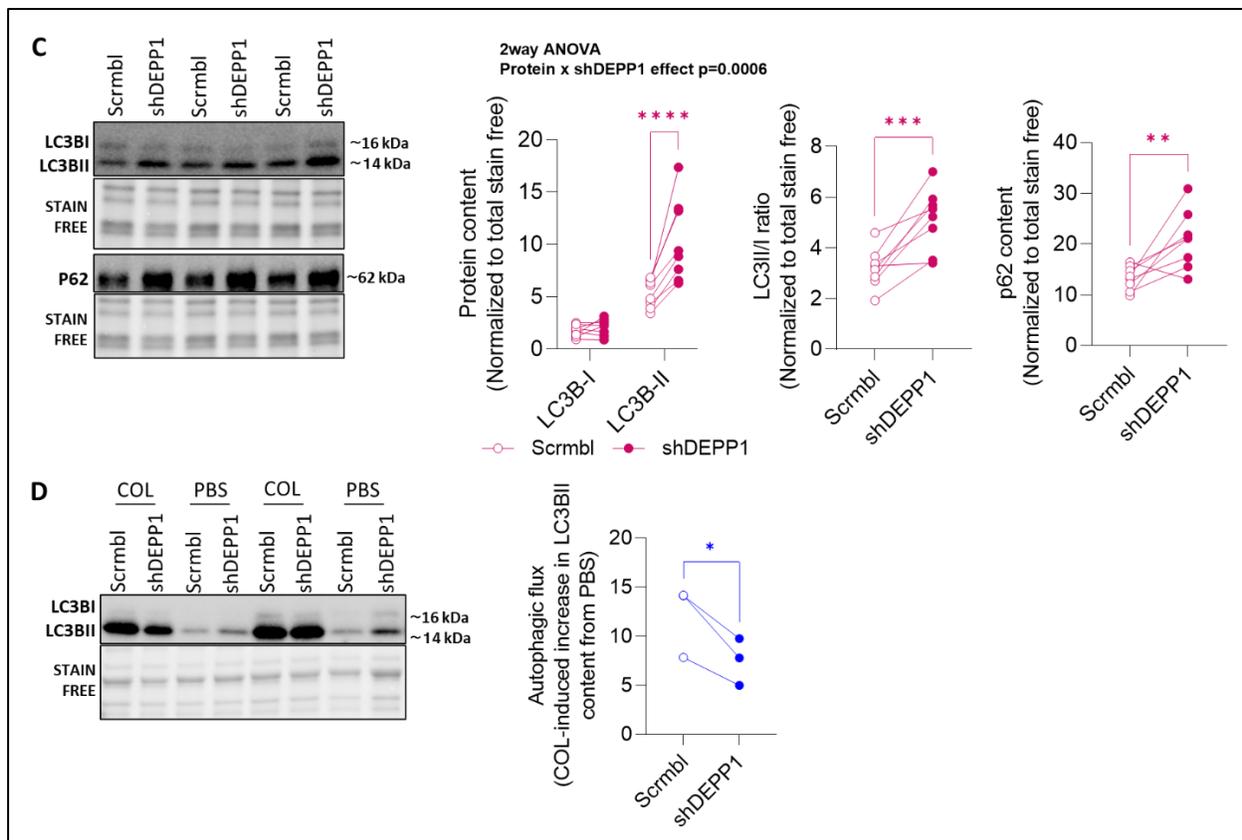


Figure 4.3 La déplétion de DEPP1 altère l'autophagie basale

Figure 4.3 | A-C) Quantification de différents marqueurs en contenu protéique en lien avec l'autophagie dans le TA, soit LC3B-I, LC3B-II, le ratio LC3B-II/I et p62 selon les différents groupes : A) 3 semaines post-injections (n=4), B) 6 semaines post-injections (n=5) et C) 12 semaines post-injections (n=8). Lorsqu'il y a deux groupes et une variable, un test-t païré unilatéral est effectué. Lorsqu'il y a deux groupes et plus d'une variable, une analyse de la variance à deux facteurs (2way ANOVA) suivie du test post-hoc Šidák est effectuée. * : $p<0,05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$, **** : $p<0.0001$. D) Quantification de l'accumulation protéique de LC3B-II à la suite d'un traitement à la colchicine (flux autophagique) de la cohorte 2 du groupe de 6 semaines post-injections (n=8). La différence des niveaux de LC3B-II en présence ou en absence de colchicine, soit l'augmentation de la teneur en LC3B-II, représente le flux autophagique. L'analyse statistique effectuée est le test-t unilatéral païré. * : $p<0,05$.

4.4 Effets d'une déplétion de DEPP1 sur l'intégrité du muscle squelettique

Tel que présenté précédemment, une déplétion en DEPP1 cause une augmentation de la masse musculaire associée à une altération de la force spécifique et bloque l'autophagie dans les muscles squelettiques. Cette déplétion semble donc être nocive pour les muscles. Afin de déterminer si une déplétion en DEPP1 nuit à l'intégrité musculaire, nous avons réalisé différents marquages sur coupes histologiques. Tel que présenté dans la Figure 4.4.A, une déplétion en DEPP1 cause l'apparition de marqueurs d'inflammation et de nécrose, et ce, particulièrement à la suite de 12 semaines de déplétion. En effet, les muscles ayant une déplétion en DEPP1 présentent une accumulation anormale de noyaux entre les fibres, signe d'inflammation (Figure 4.4.A). Ces mêmes muscles présentent une proportion très élevée (environ 25%) de fibres avec des noyaux centraux (Figure 4.4.A et B), un signe de dégénérescence / régénérescence

musculaire. De manière intéressante, nous avons observé sur un immunomarquage pour la dystrophine, un marquage censé marquer uniquement les membres des fibres musculaires, que certaines fibres présenter également un marquage cytosolique (Figure 4.4.C). Ce phénomène peut apparaître si des anticorps produits par les souris se retrouvent à l'intérieur de ces fibres et est généralement interprété comme un signe d'inflammation sévère observé dans certaines myopathies. Forts de cette observation, combinée à la présence d'accumulation de noyaux entre les fibres musculaires, nous avons souhaité confirmer la présence d'inflammation en réponse à une déplétion en DEPP1 en réalisant un immunomarquage pour F4-80, un marqueur spécifique de macrophages (Figure 4.4.D). Tel que présenté dans la Figure 4.4.D, une déplétion de DEPP1 de 12 semaines résulte en une augmentation significative de cellules positives pour F4-80, confirmant ainsi la présence d'une réponse inflammatoire. Pris dans leur ensemble, nos résultats indiquent que réduire l'expression de DEPP1 altère très sévèrement l'intégrité musculaire.

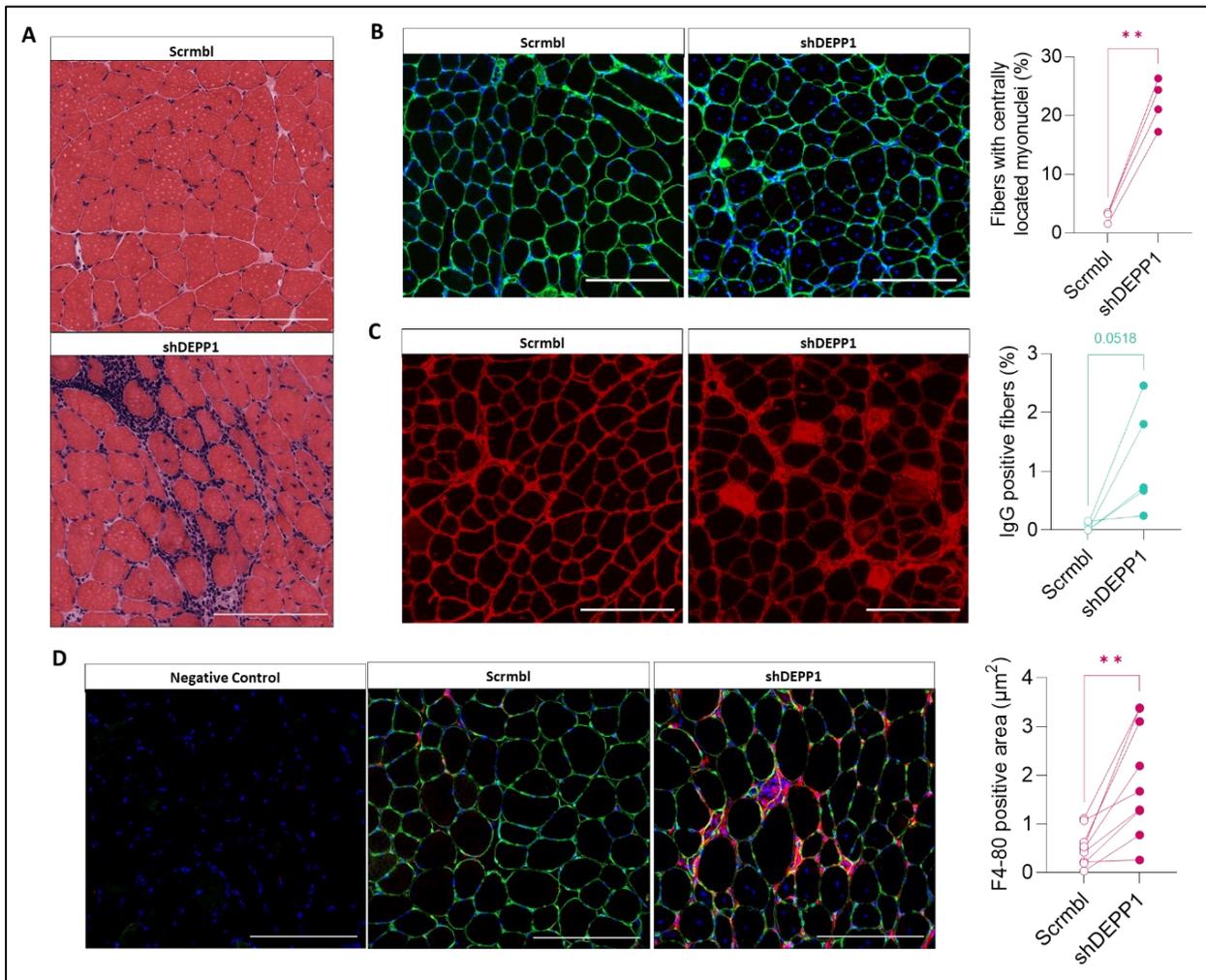


Figure 4.4 La déplétion de DEPP1 altère l'intégrité du muscle squelettique

Figure 4.4 | A) Image représentative d'un marquage H&E réalisé après 12 semaines de déplétion de DEPP1. L'échelle des images est à 200µm. B) Quantification des noyaux centraux après 12 semaines de déplétion de DEPP1 (n=8) à la suite d'un marquage de Laminine et Dapi. L'échelle des images est à 200µm. L'analyse statistique effectuée est le test-t bilatéral pairé. **: p<0.01. C) Quantification de fibre IgG positive à la suite d'un marquage de dystrophine à la suite de 6 semaines de déplétion de DEPP1 (n=5). L'échelle des images est à 200µm. L'analyse statistique effectuée est le test-t unilatéral pairé. D) Quantification de l'air qui est positif pour le marqueur de macrophage F4-80 à la suite de 12 semaines de déplétion de DEPP1 (n=8). L'analyse statistique effectuée est le test-t bilatéral pairé. L'échelle des images est à 200µm. **: p<0.01.

4.5 Effets d'une déplétion de DEPP1 sur les activités enzymatiques ainsi que le contenu mitochondrial

Salcher et ses associées (2014) ont rapporté dans leur étude que DEPP1 serait localisée entre autres dans les mitochondries. Il est donc possible que DEPP1 puisse jouer des rôles importants dans la biologie mitochondriale. Dans le but de caractériser si une déplétion en DEPP1 avait un impact sur les mitochondries musculaires, nous avons déterminé sur coupes histologiques l'impact d'une déplétion en DEPP1 sur l'activité de la SDH, le complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale, et de la COX, le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Nous avons également quantifié des marqueurs protéiques de contenu en mitochondries par immunobuvardage tels que citrate synthase, VDAC1, TOMM20 ainsi que de multiples sous unités des complexes de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) pour déterminer si le volume mitochondrial était affecté par une déplétion en DEPP1. Tel que présenté dans la Figure 4.5.B, 3 semaines de déplétion n'a eu aucun effet sur l'activité enzymatique de la SDH. Cependant, après 6 et 12 semaines de déplétion en DEPP1, nous avons observé une réduction significative de l'activité enzymatique de la SDH (Figure 4.5.C et D). De manière comparable, l'activité enzymatique de la COX était aussi réduite après 12 semaines de déplétion en DEPP1 (Figure 4.5.F). Nous avons également observé des anomalies dans la distribution des mitochondries dans les muscles ayant subi une déplétion de DEPP1 pendant 12 semaines (Figure 4.5.G). En outre, malgré la réduction de l'activité des enzymes SDH et COX, aucun marqueur de contenu protéique en mitochondries n'a été affecté après 3, 6 et 12 semaines de déplétion en DEPP1 (Figure 4.5.H-J), suggérant que le volume mitochondrial n'a pas été affecté par la déplétion en DEPP1.

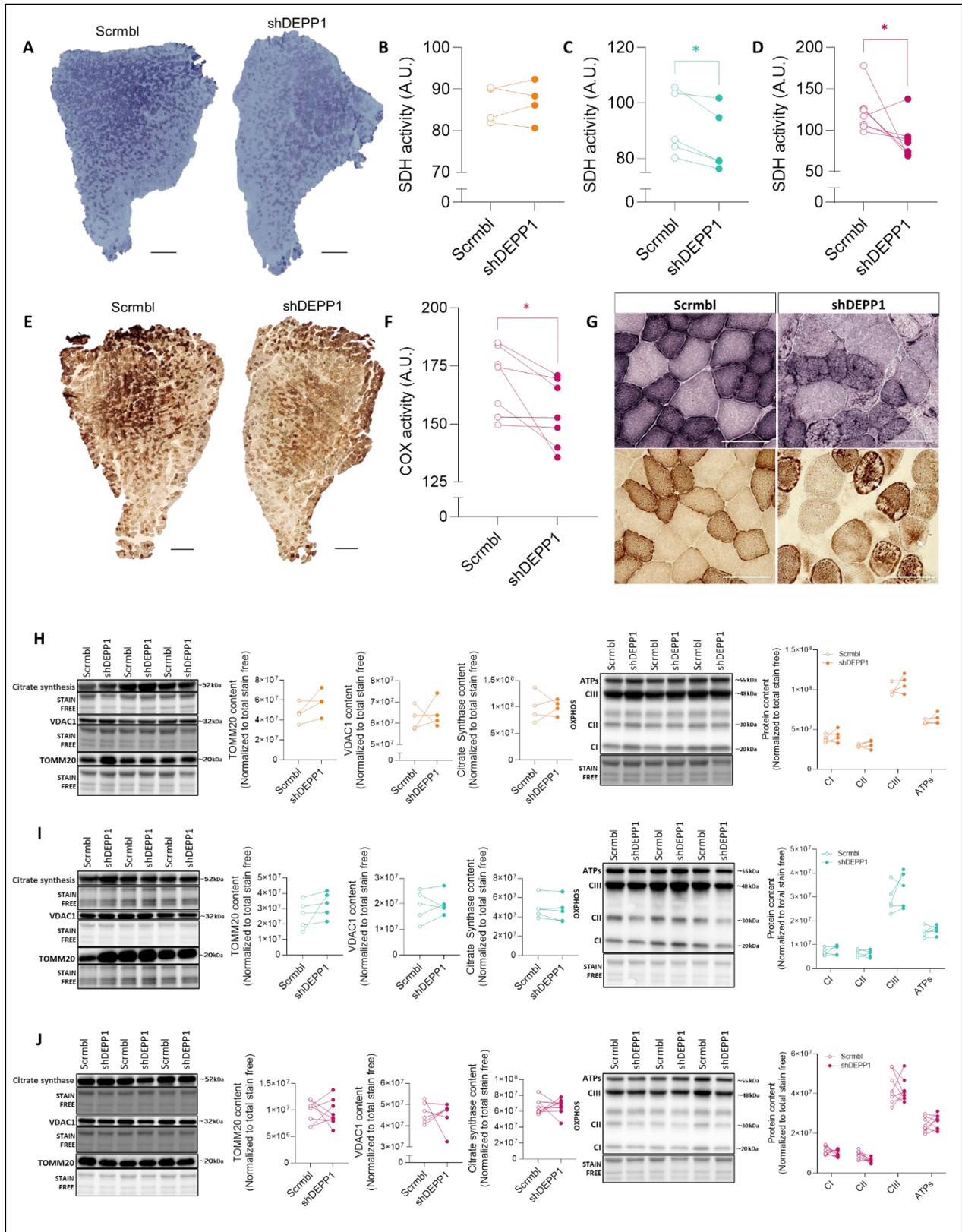


Figure 4.5 La déplétion de DEPP1 réduit les activités enzymatiques mitochondriales sans altérer des marqueurs de contenu mitochondrial

Figure 4.5 | A) Images représentatives de l'activité enzymatique du complexe II de la chaîne de transport des électrons via un marquage SDH. L'échelle des images est à 500µm. B-D) Quantification de l'activité enzymatique du complexe II de la chaîne de transport des électrons via un marquage SDH à B) 3 semaines post-injection (n=4), C) 6 semaines post-injection (n=5) et D) 12 semaines post-injection (n=8). L'analyse statistique effectuée est le test-t bilatéral pairé. * : p<0,05. E) Images représentatives de l'activité enzymatique du complexe IV de la chaîne de transport des électrons via un marquage COX. L'échelle des images est à 500µm. F) Quantification de l'activité enzymatique de COX à 12 semaines post-injection (n=8). L'analyse statistique effectuée est le test-t bilatéral pairé. * : p<0,05. G) Images représentatives de l'activité enzymatique de SDH (bleu) et de COX (brun) pouvant mettre en évidence les agrégats dans les fibres qui ont une déplétion en DEPP1. L'échelle des images est à 100µm. H-J) Quantification de différents marqueurs en contenu protéique de mitochondrie dans le TA, soit Citrate synthase, VDAC1, TOMM20 et OXPHOS selon les différents groupes : H) 3 semaines post-injection (n=4), I) 6 semaines post-injection (n=5) et J) 12 semaines post-injection (n=8). Lorsqu'il y a deux groupes et une variable, un test-t pairé unilatéral est effectué. Lorsqu'il y a deux groupes et plus d'une variable, une analyse de la variance à deux facteurs (2way ANOVA) suivie du test post-hoc Šidák est effectuée.

4.6 Effets d'une déplétion de DEPP1 sur des marqueurs de stress oxydatif

Tel que discuté dans la section Introduction, des données suggèrent que DEPP1 pourrait réguler positivement la production de ROS et jouer et ainsi réguler le stress oxydatif (Li *et al.*, 2018; Salcher *et al.*, 2014; Salcher *et al.*, 2017). Nous avons donc quantifié des marqueurs de stress oxydatif pour voir si une déplétion de DEPP1 *in vivo* dans le muscle squelettique allait affecter ces marqueurs. Un des marqueurs qui a été quantifié est le contenu en 4-hydroxynonanal (4-HNE), un composé chimique produit par peroxydation lipidique des protéines dans les cellules. Aucune différence de contenu en 4-HNE n'a été observée après 3 et 6 semaines de déplétion de DEPP1 (Figure 4.6.A et B). Cependant, nous avons une augmentation robuste du contenu en 4-HNE après 12 semaines de déplétion de DEPP1 (Figure 4.6.C). Nous avons également effectué un marquage au DHE sur des coupes transversales après 12 semaines de déplétion en DEPP1. Tel que présenté dans la Figure 4.6.D, l'intensité du marquage au DHE était augmentée dans les muscles déplétés en DEPP1 pendant 12. Nos résultats suggèrent donc qu'une déplétion de DEPP1 cause une augmentation du stress oxydatif dans les muscles squelettiques.

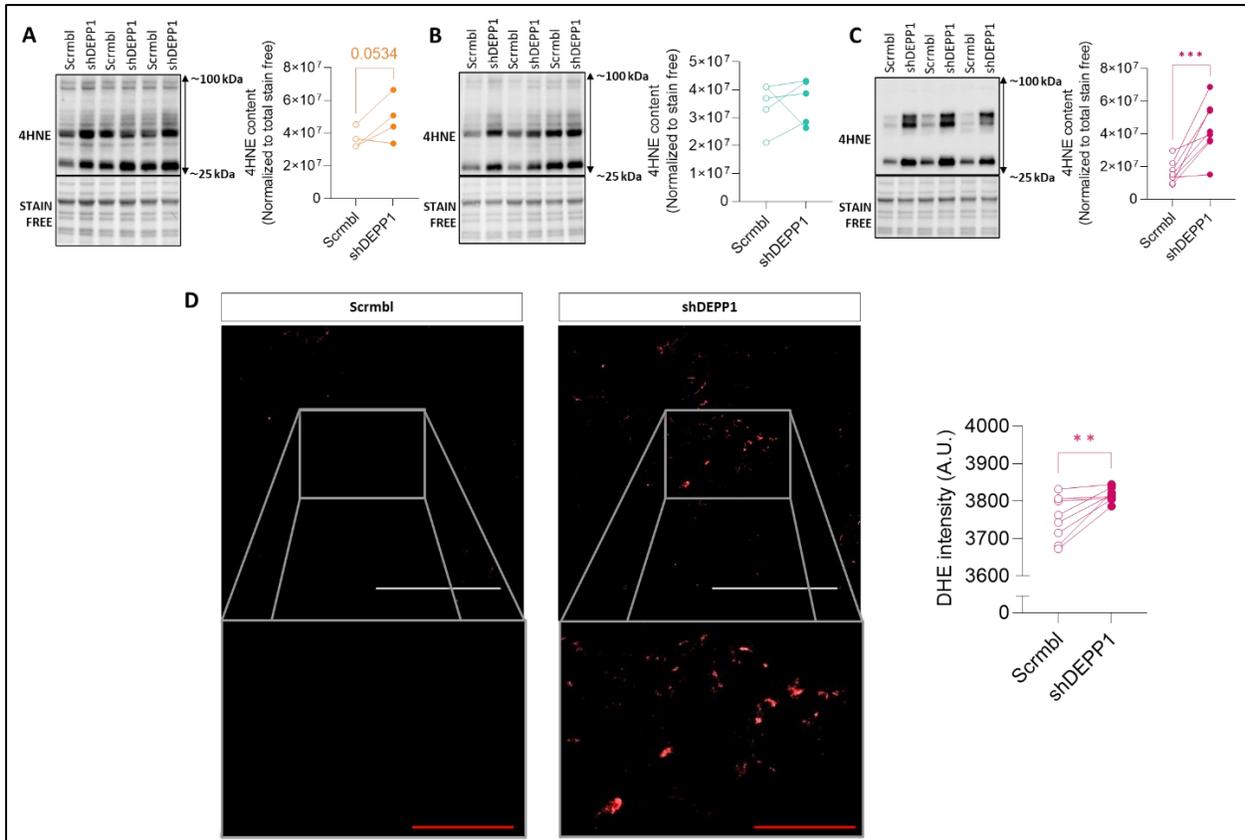


Figure 4.6 La déplétion de DEPP1 augmente les marqueurs de stress oxydatif

Figure 4.6 | A-C) Quantification du contenu protéique de 4-HNE à la suite d'une déplétion de DEPP1 de A) 3 semaines (n=4), B) 6 semaines (n=5) et C) 12 semaines (n=8). L'analyse statistique effectuée est le test-t bilatéral pairé. *** : $p < 0.001$. D) Image représentative de l'immunomarquage DHE, où les échelles blanches sont à $150\mu\text{m}$ et les échelles rouges sont à $50\mu\text{m}$, et la quantification de l'intensité du marquage sur les tissus. L'analyse statistique effectuée est le test-t bilatéral pairé. ** : $p < 0.01$.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

Les muscles squelettiques sont essentiels pour assurer les mouvements, la posture, la respiration et la thermogénèse. De plus, ils ont la capacité de s'adapter rapidement à différents stress. Par exemple, lors de périodes cataboliques telles que la décharge mécanique ou le jeûne prolongé, l'atrophie musculaire est inévitable (Bonaldo et Sandri, 2013). Or, une atrophie musculaire peut engendrer des problèmes de santé majeurs pouvant aller de troubles de la fonction physique jusqu'à la mort (Boutin *et al.*, 2017; Nakanishi *et al.*, 2020). Il est donc essentiel de maintenir la masse et les fonctions musculaires pour préserver une qualité de vie optimale pour la population. Comprendre les mécanismes moléculaires qui régulent la masse et les fonctions musculaires est donc primordial afin d'identifier des cibles thérapeutiques visant à contrer les dysfonctions musculaires causées par diverses maladies ou qui apparaissent lors du vieillissement. Il est cependant important de rappeler que notre compréhension de ces mécanismes n'est encore que partielle.

Au cours des deux dernières décennies, l'autophagie, un système protéolytique notamment activé lors de conditions cataboliques, a émergé comme un processus essentiel dans la régulation de la masse et des fonctions musculaires (Sartori *et al.*, 2021). Cependant, notre compréhension des mécanismes qui régulent l'autophagie reste incomplète. Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une protéine récemment découverte jouant un rôle potentiel dans la régulation de la dégradation protéique : DEPP1. Les données recueillies dans le laboratoire indiquaient que DEPP1 est induite dans diverses conditions cataboliques conduisant à l'atrophie musculaire. Toutefois, avant ce projet de maîtrise, le rôle joué par DEPP1 dans les muscles squelettiques était inconnu. L'objectif de ce projet de maîtrise était donc de caractériser les rôles joués par DEPP1 dans les muscles squelettiques de souris adultes en condition basale. Les résultats obtenus au cours du présent projet de maîtrise démontrent qu'une déplétion en DEPP1 cause un phénotype myopathique majeur, caractérisé par une hypertrophie non-fonctionnelle (hypertrophie associée à une diminution de la force spécifique), un blocage de l'autophagie, l'apparition de marqueurs de nécrose et d'inflammation ainsi que des signes d'atteintes mitochondriales sévères. Ces résultats positionnent ainsi DEPP1 comme un régulateur important de l'autophagie et de l'intégrité musculaire.

Il est maintenant bien établi que l'autophagie joue un rôle essentiel dans le contrôle de la qualité intracellulaire en contribuant entre autres à la dégradation d'organites endommagés ou indésirables. Afin de déterminer si DEPP1 jouait un rôle dans la régulation de l'autophagie *in vivo*, nous avons étudié l'impact d'une déplétion de DEPP1 sur des marqueurs d'autophagie reconnus tels que p62 et LC3. Nous avons observé qu'une déplétion de DEPP1 cause une augmentation du contenu en LC3B-II à tous les moments étudiés (i.e. 3, 6 et 12 semaines). À partir de 6 semaines de déplétion, nous avons également observé une augmentation du contenu protéique de p62. Ces données vont à l'encontre des résultats obtenus par Stepp *et al.* (2014) qui démontrent qu'une diminution de l'expression de DEPP1 engendrait une diminution de contenu en LC3B-II dans les cellules épithéliales de rein (Vero) et aucun effet sur les cellules HEK293. Il est cependant important de souligner ici que l'interprétation de ces résultats est difficile, car l'augmentation de ces marqueurs peut soit refléter une induction de l'autophagie soit une réduction de la dégradation des autophagosomes (Ju *et al.*, 2010; Klionsky *et al.*, 2016; Mammucari *et al.*, 2007). Étant donné le fait que l'autophagie est un processus dynamique, nous avons étudié le flux autophagique *in vivo* afin de mieux caractériser l'impact d'une déplétion en DEPP1. Nos résultats démontrent que le flux autophagique est réduit en réponse à une déplétion en DEPP1. Ces résultats confirment ainsi notre hypothèse initiale et démontrent pour la première fois que DEPP1 est un régulateur de l'autophagie *in vivo*.

Plusieurs études antérieures ont rapporté qu'une inhibition de l'autophagie dans les muscles squelettiques peut engendrer une atrophie musculaire (Grumati et Bonaldo, 2012). Par exemple, Maseiro *et al.* (2009) ont montré que la délétion d'Atg7 (un régulateur essentiel de l'autophagie) résulte en une atrophie musculaire associée à une diminution de la force. Ces résultats contrastent avec notre modèle dans lequel la déplétion en DEPP1 a clairement causé une inhibition de l'autophagie, mais a également augmenté la masse musculaire. Les mécanismes responsables de cette augmentation de masse musculaire en réponse à une déplétion de DEPP1 ne sont pas clairs. Il a été rapporté que la délétion d'Atg7 s'accompagne d'une augmentation compensatoire de l'expression de gènes critiques liés à l'atrophie, mais indépendant de l'autophagie (Masiero *et al.*, 2009). Il est possible qu'une déplétion de DEPP1 ait également réduit l'activité du système ubiquitine-protéasome, une hypothèse qu'il serait intéressant de tester dans une étude future. L'augmentation de la masse des muscles déplétés en DEPP1 pendant 6 semaines semble, au moins en partie, être expliquée par une augmentation significative de la proportion de fibres de grande taille (>3500 μm) et une diminution de la proportion de fibres de petites taille (0-1000 μm). Toutefois, à 12 semaines post-injection, l'interprétation de l'augmentation de la masse musculaire est plus complexe, car on

observe une augmentation de plus de petites fibres (0-1000 μm) et davantage de grandes fibres (>3500 μm). Les changements de distribution de la taille des fibres à 12 semaines post-injection sont probablement causés par une dégénérescence des fibres nécrotiques et d'une régénération de nouvelles fibres. De plus, à 12 semaines de déplétion de DEPP1, l'augmentation de la masse pourrait impliquer une contribution de l'inflammation causant des œdèmes et résultant en une augmentation du volume de liquide interstitiel dans le muscle. Il se pourrait aussi qu'il y ait de la fibrose qui se crée suite à la nécrose de certaines fibres musculaires. Il serait intéressant de déterminer si une déplétion en DEPP1 cause une augmentation de marqueurs de fibroses, car l'accumulation de tissu fibrotique non contractile pourrait potentiellement expliquer la diminution de force spécifique que nous avons observée. De manière intéressante, cette diminution de force spécifique causée par la déplétion en DEPP1 est semblable à celle d'une délétion d'Atg7 (Masiero *et al.*, 2009). Dans leur étude, Masiero *et al.*, (2009) ont détecté chez les souris déficientes en Atg7 des changements dans l'alignement des disques Z, une accumulation de mitochondries anormales et une distension du réticulum sarcoplasmique. Il serait intéressant d'aller vérifier en microscopie électronique si des changements structuraux des sarcomères sont également présents dans les muscles déplétés en DEPP1, car de tels changements pourraient contribuer à la perte de force spécifique que nous avons observée. Il a également été rapporté que la délétion d'Atg7 entraîne des dysfonctions mitochondriales et que le stress oxydatif qui en résulte cause une oxydation des protéines contractiles, affectant ainsi directement l'interaction actine-myosine et la génération de force (Carnio *et al.*, 2014). Ainsi, dans notre modèle de déplétion de DEPP1, la réduction de force spécifique pourrait être due à une oxydation des protéines contractiles causée par l'augmentation de stress oxydatif et des dysfonctions mitochondriales. Il serait donc intéressant de déterminer si une réduction de l'expression de DEPP1 affecte l'oxydation des protéines contractiles.

Une des découvertes majeures découlant du présent projet de recherche est la démonstration qu'une déplétion en DEPP1 cause un phénotype myopathique sévère. Il est fort probable que ce phénotype myopathique soit, au moins en partie, causé par l'inhibition marquée du flux autophagique causé par la déplétion de DEPP1. En effet, une réduction de l'autophagie s'accompagne aussi d'altérations morphologiques pointant vers la dégénération telles que des fibres vacuolisées et des noyaux centraux ainsi que des mitochondries dysfonctionnelles (Grumati et Bonaldo, 2012). De manière comparable, les muscles déplétés en DEPP1 ont des signes de nécrose, de régénération et d'inflammation. Il est important de souligner ici qu'une réduction du flux autophagique est retrouvée dans de multiples myopathies (Dowling *et al.*, 2015), incluant par exemple la Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (De Palma *et*

al., 2014; Pal *et al.*, 2014) ou encore la Dystrophie musculaire congénitale de Ullrich (Grumati *et al.*, 2010). Les résultats de ce mémoire renforcent donc la littérature qui montre qu'un blocage de l'autophagie engendre des effets très délétères pour la santé musculaire. Il est cependant important de souligner ici que les effets d'une déplétion en DEPP1 durant 12 semaines ont des effets délétères beaucoup plus prononcés qu'une délétion d'Atg7. En effet, à 5 mois de blocage de l'autophagie, il y a une augmentation de seulement 3% du nombre de noyaux centraux (Masiero *et al.*, 2009), tandis qu'à 12 semaines de déplétion en DEPP1, nous avons une augmentation moyenne beaucoup plus massive, avoisinant les 25%. Il est donc possible que le phénotype que nous observons à la suite d'une déplétion de DEPP1 ne soit pas uniquement causé par une inhibition du flux autophagique. Il est donc possible que DEPP1 ait des fonctions encore non caractérisées.

La localisation mitochondriale de DEPP1 précédemment rapportée (Salcher *et al.*, 2014) suggérait un rôle potentiel de DEPP1 dans la régulation des fonctions ou de la biologie mitochondriale. Nous avons donc étudié les effets de sa déplétion sur l'activité d'enzymes mitochondriales ainsi que sur le contenu en mitochondries. Nos résultats montrent clairement que la déplétion de DEPP1 durant 6 et 12 semaines diminue l'activité des enzymes SDH et COX. Toutefois, aucun changement des marqueurs physiques de contenu en mitochondries n'a été observé suite à la déplétion en DEPP1, ce qui nous permet de conclure que la baisse d'activité mitochondriale est probablement due à une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles. Cette interprétation est renforcée par l'apparence anormale des mitochondries sur les marquages SDH et COX. Il serait intéressant d'aller déterminer si la morphologie des mitochondries est affectée via des images de microscopie électronique à transmission. Le flux autophagique étant réduit en réponse à une déplétion en DEPP1, il est fort probable que la mitophagie soit elle aussi altérée, empêchant ainsi le recyclage des mitochondries dysfonctionnelles et expliquant ainsi leur accumulation. Renforçant cet argument, il a été démontré que lorsqu'on bloque l'autophagie en condition basale dans des hépatocytes (Komatsu *et al.*, 2005), des cellules bêta de souris (Jung *et al.*, 2008) et des muscles squelettiques de souris (Masiero *et al.*, 2009), les mitochondries deviennent anormales. Nos résultats positionnent ainsi DEPP1 comme un nouveau régulateur potentiel de la santé mitochondriale.

Il est aussi possible que l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles joue un rôle dans le stress oxydatif. En effet, Masiero *et al.* (2009) soulève qu'une altération de la morphologie mitochondriale serait associée au stress oxydatif lors d'une délétion d'Atg7. De manière intéressante, nos résultats suggèrent aussi qu'une déplétion de DEPP1 entraîne une augmentation de marqueurs de stress oxydatif. L'inhibition

du flux autophagique et les anomalies mitochondriales que nous rapportons dans les muscles déplétés en DEPP1 pourraient, au moins en partie, expliquer l'augmentation de marqueurs de stress oxydatif observée dans les muscles déplétés en DEPP1. Une atteinte à l'intégrité lysosomale chez des patients atteints de la maladie de Parkinson (Dehay *et al.*, 2010) et les souris *mdx* (Pal *et al.*, 2014) s'accompagne par exemple d'un stress oxydatif. Il est également possible, tel que discuté précédemment, que la diminution de la force spécifique observée après 12 semaines de déplétion en DEPP1 puisse être, au moins en partie, causée par une augmentation du stress oxydatif. Nous émettons ainsi l'hypothèse que le phénotype myopathique causé par la déplétion en DEPP1 implique initialement un blocage de l'autophagie, résultant en une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles. Ces dernières seraient à l'origine d'un stress oxydant, altérant la force spécifique et déclenchant ultimement des cycles de dégénération et régénération musculaires ainsi qu'une inflammation musculaire. Bien qu'il soit possible que DEPP1 ait d'autres fonctions cellulaires, ce mécanisme hypothétique permet de fournir un cadre conceptuel qui devrait permettre de faciliter l'étude de fonctions cellulaires de DEPP1.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats issus de ce projet de maîtrise montrent pour la première fois que réduire l'expression de DEPP1 dans les muscles squelettiques provoque des conséquences délétères importantes telles qu'un blocage de l'autophagie, une atteinte sévère au niveau mitochondrial, un stress oxydatif, une hypertrophie musculaire non fonctionnelle, une réponse inflammatoire et une augmentation de signes de nécrose et régénération. Nos résultats placent donc DEPP1 comme un nouveau régulateur important de l'autophagie, de la santé mitochondriale et de l'intégrité musculaire.

De ces travaux de recherche effectuée dans ce mémoire découlent de multiples perspectives qui pourraient permettre de mieux caractériser les rôles de DEPP1 dans les muscles squelettiques. Il serait pertinent de voir si les dommages induits par la déplétion en DEPP1 sont dus au fait que l'autophagie est défectueuse ou si le phénotype persisterait malgré une augmentation de l'autophagie. Pour ce faire, nous pourrions traiter des souris avec de la rapamycine (un activateur connu du flux autophagique (Sabers *et al.*, 1995; Shigemitsu *et al.*, 1999)) pour déterminer si la stimulation de l'autophagie permet d'atténuer, voir abolir, les effets délétères d'une déplétion en DEPP1. Comme discuté dans la section Discussion, lorsqu'on bloque l'autophagie via la délétion d'Atg7, une régulation positive compensatoire se produit au niveau du système ubiquitine-protéasome (Masiero *et al.*, 2009). Il serait donc pertinent de déterminer si la déplétion en DEPP1 affecte l'activité du système ubiquitine-protéasome à l'aide de kits commerciaux déjà disponibles. Il serait également intéressant de déterminer si un traitement avec des inhibiteurs du protéasome permet de bloquer l'hypertrophie causée par une déplétion en DEPP1. Ces expérimentations permettraient de définir si DEPP1 est aussi un régulateur du système ubiquitine-protéasome.

Il serait également important d'étudier plus en détail l'importance du stress oxydatif déclenché par la déplétion en DEPP1. Il faudrait dans un premier temps confirmer que DEPP1 cause bel et bien un stress oxydatif en utilisant une gamme plus large de marqueurs. Les marqueurs que nous avons utilisés dans le présent projet, bien que très utilisés dans la littérature, souffrent de plusieurs limitations (voir Murphy *et al.*, 2022 pour plus de détails). Des études futures pourraient utiliser de multiples tests et kits commerciaux pour détecter les ROS afin de confirmer l'impact de la déplétion en DEPP1 sur le stress oxydant (Murphy *et al.*, 2022). Pour définir si les ROS sont vraiment impliqués dans le phénotype que nous retrouvons à la suite d'une inhibition de DEPP1, il serait intéressant de traiter des souris avec des antioxydants non spécifiques aux mitochondries tel que n-acétylcystéine (Aldini *et al.*, 2018). De plus, pour déterminer plus

spécifiquement si les mitochondries sont impliquées dans l'augmentation des marqueurs de stress oxydatif, des études futures pourraient traiter des souris avec des antioxydants qui ciblent spécifiquement les mitochondries telles que MitoQ (Adlam *et al.*, 2005; Thoma *et al.*, 2020) ou SS-31 (Thoma *et al.*, 2020) par exemple. Nous pourrions ainsi confirmer que l'inhibition de DEPP1 entraîne un stress oxydatif et définir le rôle joué par ce stress oxydatif dans le phénotype myopathique causé par la déplétion en DEPP1. En lien avec notre hypothèse énoncée à la fin de la discussion, nous anticipons qu'un traitement avec des antioxydants, notamment ceux spécifiques aux mitochondries, devrait atténuer le phénotype délétère causé par la diminution de l'expression de DEPP1.

DEPP1 joue clairement un rôle important dans la santé musculosquelettique. D'ailleurs, DEPP1 est non seulement exprimé dans le muscle squelettique, mais il est aussi exprimé dans différents tissus tels que les testicules, le placenta, les ovaires, le rein (Watanabe *et al.*, 2005), le poumon, les gras adipeux blancs, le cœur et le cerveau (Kuroda *et al.*, 2010). Étant donné le fait que l'autophagie joue un rôle important dans tous ces tissus, il est fort probable que DEPP1 joue aussi des rôles essentiels dans d'autres types cellulaires. Pour explorer les rôles joués par DEPP1 dans d'autres tissus et organes, nous pourrions envisager de travailler avec la plateforme de transgénèse de l'UQÀM pour développer des souris ayant une délétion de DEPP1 (*knockout*) pour étudier ce que cette délétion engendre sur le développement, le taux de mortalité ou encore les adaptations compensatoires. Nous pourrions également envisager de générer une souris floxées pour DEPP1 afin de générer des modèles d'ablation de DEPP1 inductibles et tissus-spécifiques.

Finalement, une des forces de ce projet provient du fait que nous avons étudié l'impact d'une déplétion en DEPP1 dans le muscle à plusieurs points dans le temps afin d'avoir des informations sur les effets précoces d'une déplétion en DEPP1 sur la physiologie musculaire. Cependant, nous ne savons pas les effets de cette déplétion à plus long terme sur le muscle. Il serait donc intéressant de voir l'effet d'une déplétion en DEPP1 de plus de 12 semaines dans le muscle squelettique. Par ailleurs, ce projet a seulement été effectué sur des souris mâles. Or, DEPP1 est entre autres induit par la progestérone, une hormone jouant un rôle essentiel dans le fonctionnement du système reproducteur féminin, d'où son nom (i.e. *Decidual protein induced by progesterone*). Il serait donc important de déterminer les effets d'une déplétion en DEPP1 dans les muscles de souris femelles pour déterminer si un dimorphisme sexuel existe. De plus, une étude sur la surexpression de DEPP1 dans le muscle serait tout aussi pertinente pour voir les effets sur le muscle et les comparer au phénotype de la déplétion en DEPP1. Il est également important de soulever

que bien que nos résultats établissent clairement qu'une déplétion de DEPP1 dans les muscles murins est très délétère, nous ne savons pas à quel point ces données sont transférables à l'être humain. Enfin, les mécanismes exacts par lesquels une déplétion en DEPP1 induit un phénotype myopathique restent encore à être élucidés.

RÉFÉRENCES

- Adlam, V. J., Harrison, J. C., Porteous, C. M., James, A. M., Smith, R. A., Murphy, M. P. et Sammut, I. A. (2005, Jul). Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *Faseb j*, 19(9), 1088-1095. doi: 10.1096/fj.05-3718com
- Aldini, G., Altomare, A., Baron, G., Vistoli, G., Carini, M., Borsani, L. et Sergio, F. (2018, Jul). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic Res*, 52(7), 751-762. doi: 10.1080/10715762.2018.1468564
- Appell, H. J. (1990, Jul). Muscular atrophy following immobilisation. A review. *Sports Med*, 10(1), 42-58. doi: 10.2165/00007256-199010010-00005
- Ascenzi, F., Barberi, L., Dobrowolny, G., Villa Nova Bacurau, A., Nicoletti, C., Rizzuto, E., . . . Musarò, A. (2019, Jun). Effects of IGF-1 isoforms on muscle growth and sarcopenia. *Aging Cell*, 18(3), e12954. doi: 10.1111/accel.12954
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. et Seemüller, E. (1998, Feb 6). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92(3), 367-380. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80929-0
- Benichou, O. et Lord, S. R. (2016, Jun). Rationale for Strengthening Muscle to Prevent Falls and Fractures: A Review of the Evidence. *Calcif Tissue Int*, 98(6), 531-545. doi: 10.1007/s00223-016-0107-9
- Blaauw, B., Canato, M., Agatea, L., Toniolo, L., Mammucari, C., Masiero, E., . . . Reggiani, C. (2009, Nov). Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *Faseb j*, 23(11), 3896-3905. doi: 10.1096/fj.09-131870
- Bloemberg, D. et Quadriatero, J. (2019, Jul 1). Autophagy, apoptosis, and mitochondria: molecular integration and physiological relevance in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 317(1), C111-c130. doi: 10.1152/ajpcell.00261.2018
- Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., . . . Glass, D. J. (2001, Nov 23). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 294(5547), 1704-1708. doi: 10.1126/science.1065874

- Bonaldo, P. et Sandri, M. (2013, Jan). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*, 6(1), 25-39. doi: 10.1242/dmm.010389
- Boutin, R. D., Bamrungchart, S., Bateni, C. P., Beavers, D. P., Beavers, K. M., Meehan, J. P. et Lenchik, L. (2017, Jun). CT of Patients With Hip Fracture: Muscle Size and Attenuation Help Predict Mortality. *AJR Am J Roentgenol*, 208(6), W208-w215. doi: 10.2214/ajr.16.17226
- Bradford, M. M. (1976, May 7). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
- Brand, M. D. (2010, Aug). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*, 45(7-8), 466-472. doi: 10.1016/j.exger.2010.01.003
- Briguet, A., Courdier-Fruh, I., Foster, M., Meier, T. et Magyar, J. P. (2004, Oct). Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul Disord*, 14(10), 675-682. doi: 10.1016/j.nmd.2004.06.008
- Cadenas, E. et Davies, K. J. (2000, Aug). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29(3-4), 222-230. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00317-8
- Carnio, S., LoVerso, F., Baraibar, M. A., Longa, E., Khan, M. M., Maffei, M., . . . Sandri, M. (2014, Sep 11). Autophagy impairment in muscle induces neuromuscular junction degeneration and precocious aging. *Cell Rep*, 8(5), 1509-1521. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.061
- Chen, S., Gai, J., Wang, Y. et Li, H. (2011). FoxO regulates expression of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in human endothelial cells. *FEBS Letters*, 585(12), 1796-1800. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.024
- D'Arcy, M. S. (2019, Jun). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 43(6), 582-592. doi: 10.1002/cbin.11137
- Dahlman, I., Linder, K., Arvidsson Nordström, E., Andersson, I., Lidén, J., Verdich, C., . . . Arner, P. (2005, Jun). Changes in adipose tissue gene expression with energy-restricted diets in obese women. *Am J Clin Nutr*, 81(6), 1275-1285. doi: 10.1093/ajcn/81.6.1275

- De Palma, C., Morisi, F., Cheli, S., Pambianco, S., Cappello, V., Vezzoli, M., . . . Clementi, E. (2014, Aug 7). Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis*, 5(8), e1363. doi: 10.1038/cddis.2014.312
- Dehay, B., Bové, J., Rodríguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P. et Vila, M. (2010, Sep 15). Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci*, 30(37), 12535-12544. doi: 10.1523/jneurosci.1920-10.2010
- DeNardi, C., Ausoni, S., Moretti, P., Gorza, L., Velleca, M., Buckingham, M. et Schiaffino, S. (1993, Nov). Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J Cell Biol*, 123(4), 823-835. doi: 10.1083/jcb.123.4.823
- Dowling, J. J., Moore, S. A., Kalimo, H. et Minassian, B. A. (2015, Mar). X-linked myopathy with excessive autophagy: a failure of self-eating. *Acta Neuropathol*, 129(3), 383-390. doi: 10.1007/s00401-015-1393-4
- Edström, L. et Kugelberg, E. (1968, Oct). Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 31(5), 424-433. doi: 10.1136/jnnp.31.5.424
- Florini, J. R. (1987, Sep). Hormonal control of muscle growth. *Muscle Nerve*, 10(7), 577-598. doi: 10.1002/mus.880100702
- Garlick, P. J. (2005, Jun). The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *J Nutr*, 135(6 Suppl), 1553s-1556s. doi: 10.1093/jn/135.6.1553S
- Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A. et Goldberg, A. L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), 14440. doi: 10.1073/pnas.251541198
- Gomez-Cabrera, M. C., Arc-Chagnaud, C., Salvador-Pascual, A., Brioché, T., Chopard, A., Ollaso-Gonzalez, G. et Viña, J. (2020, Aug). Redox modulation of muscle mass and function. *Redox Biol*, 35, 101531. doi: 10.1016/j.redox.2020.101531

- Gospillou, G., Godin, R., Piquereau, J., Picard, M., Mofarrahi, M., Mathew, J., . . . Hussain, S. N. A. (2018, Jul). Protective role of Parkin in skeletal muscle contractile and mitochondrial function. *J Physiol*, 596(13), 2565-2579. doi: 10.1113/jp275604
- Gospillou, G., Sgarioto, N., Norris, B., Barbat-Artigas, S., Aubertin-Leheudre, M., Morais, J. A., . . . Hepple, R. T. (2014). The relationship between muscle fiber type-specific PGC-1 α content and mitochondrial content varies between rodent models and humans. *PLoS One*, 9(8), e103044. doi: 10.1371/journal.pone.0103044
- Grumati, P. et Bonaldo, P. (2012, Jul 26). Autophagy in skeletal muscle homeostasis and in muscular dystrophies. *Cells*, 1(3), 325-345. doi: 10.3390/cells1030325
- Grumati, P., Coletto, L., Sabatelli, P., Cescon, M., Angelin, A., Bertaglia, E., . . . Bonaldo, P. (2010, Nov). Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat Med*, 16(11), 1313-1320. doi: 10.1038/nm.2247
- Heckman, C. J. et Enoka, R. M. (2012, Oct). Motor unit. *Compr Physiol*, 2(4), 2629-2682. doi: 10.1002/cphy.c100087
- Hoppeler, H., Hudlicka, O. et Uhlmann, E. (1987, Apr). Relationship between mitochondria and oxygen consumption in isolated cat muscles. *J Physiol*, 385, 661-675. doi: 10.1113/jphysiol.1987.sp016513
- Hurley, J. H. et Young, L. N. (2017). Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annual review of biochemistry*, 86, 225-244. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044820
- Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y. S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., . . . Komatsu, M. (2008, Aug 15). Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem*, 283(33), 22847-22857. doi: 10.1074/jbc.M802182200
- Joubert, P. E., Pombo Grégoire, I., Meiffren, G., Rabourdin-Combe, C. et Faure, M. (2011, Jan). [Autophagy and pathogens: «Bon appétit Messieurs!»]. *Med Sci (Paris)*, 27(1), 41-47. doi: 10.1051/medsci/201127141
- Ju, J. S., Varadhachary, A. S., Miller, S. E. et Wehl, C. C. (2010, Oct). Quantitation of "autophagic flux" in mature skeletal muscle. *Autophagy*, 6(7), 929-935. doi: 10.4161/auto.6.7.12785

- Jung, H. S., Chung, K. W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., . . . Lee, M. S. (2008, Oct). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab*, 8(4), 318-324. doi: 10.1016/j.cmet.2008.08.013
- Kanabus, M., Heales, S. J. et Rahman, S. (2014, Apr). Development of pharmacological strategies for mitochondrial disorders. *Br J Pharmacol*, 171(8), 1798-1817. doi: 10.1111/bph.12456
- Kaufmann, P., McDermott, M. P., Darras, B. T., Finkel, R., Kang, P., Oskoui, M., . . . De Vivo, D. C. (2011, Jun). Observational study of spinal muscular atrophy type 2 and 3: functional outcomes over 1 year. *Arch Neurol*, 68(6), 779-786. doi: 10.1001/archneurol.2010.373
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. et Lemasters, J. J. (2007, Jun 15). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys*, 462(2), 245-253. doi: 10.1016/j.abb.2007.03.034
- Kimball, S. R. et Jefferson, L. S. (2010, Sep 17). Control of translation initiation through integration of signals generated by hormones, nutrients, and exercise. *J Biol Chem*, 285(38), 29027-29032. doi: 10.1074/jbc.R110.137208
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., . . . Zughair, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12(1), 1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356
- Klionsky, D. J. et Emr, S. D. (2000, Dec 1). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497), 1717-1721. doi: 10.1126/science.290.5497.1717
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., . . . Chiba, T. (2005, May 9). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*, 169(3), 425-434. doi: 10.1083/jcb.200412022
- Kuroda, Y., Kuriyama, H., Kihara, S., Kishida, K., Maeda, N., Hibuse, T., . . . Shimomura, I. (2010, Mar). Insulin-mediated regulation of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in adipose tissue and liver. *Horm Metab Res*, 42(3), 173-177. doi: 10.1055/s-0029-1241841

- Leduc-Gaudet, J. P., Reynaud, O., Hussain, S. N. et Gousspillou, G. (2019, Apr). Parkin overexpression protects from ageing-related loss of muscle mass and strength. *J Physiol*, 597(7), 1975-1991. doi: 10.1113/jp277157
- Levine, B. et Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 132(1), 27-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- Li, W., Ji, M., Lin, Y., Miao, Y., Chen, S. et Li, H. (2018, Oct). DEPP/DEPP1/C10ORF10 regulates hepatic glucose and fat metabolism partly via ROS-induced FGF21. *Faseb j*, 32(10), 5459-5469. doi: 10.1096/fj.201800357R
- Liu, G. Y. et Sabatini, D. M. (2020, Apr). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(4), 183-203. doi: 10.1038/s41580-019-0199-y
- Ma, X. M. et Blenis, J. (2009, May). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5), 307-318. doi: 10.1038/nrm2672
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., . . . Sandri, M. (2007, Dec). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*, 6(6), 458-471. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.001
- Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., . . . Sandri, M. (2009, Dec). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab*, 10(6), 507-515. doi: 10.1016/j.cmet.2009.10.008
- McPherron, A. C., Lawler, A. M. et Lee, S. J. (1997, May 1). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387(6628), 83-90. doi: 10.1038/387083a0
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. et Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075. doi: 10.1038/nature06639
- Mofarrahi, M., McClung, J. M., Kontos, C. D., Davis, E. C., Tappuni, B., Moroz, N., . . . Hussain, S. N. (2015, Apr 1). Angiopoietin-1 enhances skeletal muscle regeneration in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308(7), R576-589. doi: 10.1152/ajpregu.00267.2014

- Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., . . . Halliwell, B. (2022, Jun). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab*, 4(6), 651-662. doi: 10.1038/s42255-022-00591-z
- Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., . . . Rosenthal, N. (2001, Feb). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*, 27(2), 195-200. doi: 10.1038/84839
- Nakanishi, N., Oto, J., Tsutsumi, R., Akimoto, Y., Nakano, Y. et Nishimura, M. (2020, Nov 23). Upper limb muscle atrophy associated with in-hospital mortality and physical function impairments in mechanically ventilated critically ill adults: a two-center prospective observational study. *J Intensive Care*, 8(1), 87. doi: 10.1186/s40560-020-00507-7
- Ogata, T. et Yamasaki, Y. (1997, Jun). Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *Anat Rec*, 248(2), 214-223. doi: 10.1002/(sici)1097-0185(199706)248:2<214::Aid-ar8>3.0.Co;2-s
- Oyabu, M., Takigawa, K., Mizutani, S., Hatazawa, Y., Fujita, M., Ohira, Y., . . . Kamei, Y. (2022, Feb). FOXO1 cooperates with C/EBP δ and ATF4 to regulate skeletal muscle atrophy transcriptional program during fasting. *Faseb j*, 36(2), e22152. doi: 10.1096/fj.202101385RR
- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., . . . Mootha, V. K. (2008, Jul 11). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134(1), 112-123. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.016
- Pal, R., Palmieri, M., Loehr, J. A., Li, S., Abo-Zahrah, R., Monroe, T. O., . . . Rodney, G. G. (2014, Jul 16). Src-dependent impairment of autophagy by oxidative stress in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*, 5, 4425. doi: 10.1038/ncomms5425
- Pickart, C. M. (2001). Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell*, 8(3), 499-504. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00347-1
- Pottecher, J., Guillot, M., Belaidi, E., Charles, A. L., Lejay, A., Gharib, A., . . . Geny, B. (2013, Apr). Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg*, 57(4), 1100-1108.e1102. doi: 10.1016/j.jvs.2012.09.020

- Prescott, H. C. et Angus, D. C. (2018, Jan 2). Enhancing Recovery From Sepsis: A Review. *Jama*, 319(1), 62-75. doi: 10.1001/jama.2017.17687
- Ragel, B. T., Couldwell, W. T., Gillespie, D. L. et Jensen, R. L. (2007, Jul). Identification of hypoxia-induced genes in a malignant glioma cell line (U-251) by cDNA microarray analysis. *Neurosurg Rev*, 30(3), 181-187; discussion 187. doi: 10.1007/s10143-007-0070-z
- Rai, P. K., Russell, O. M., Lightowers, R. N. et Turnbull, D. M. (2015). Potential compounds for the treatment of mitochondrial disease. *Br Med Bull*, 116, 5-18. doi: 10.1093/bmb/ldv046
- Reyes-Fernandez, P. C., Periou, B., Decrouy, X., Relaix, F. et Authier, F. J. (2019, May 27). Automated image-analysis method for the quantification of fiber morphometry and fiber type population in human skeletal muscle. *Skelet Muscle*, 9(1), 15. doi: 10.1186/s13395-019-0200-7
- Rieger, K. E. et Chu, G. (2004). Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells. *Nucleic Acids Res*, 32(16), 4786-4803. doi: 10.1093/nar/gkh783
- Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G. et Abraham, R. T. (1995, Jan 13). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem*, 270(2), 815-822. doi: 10.1074/jbc.270.2.815
- Salcher, S., Hagenbuchner, J., Geiger, K., Seiter, M. A., Rainer, J., Kofler, R., . . . Obexer, P. (2014, Sep 28). C10ORF10/DEPP, a transcriptional target of FOXO3, regulates ROS-sensitivity in human neuroblastoma. *Mol Cancer*, 13, 224. doi: 10.1186/1476-4598-13-224
- Salcher, S., Hermann, M., Kiechl-Kohlendorfer, U., Ausserlechner, M. J. et Obexer, P. (2017, May 25). C10ORF10/DEPP-mediated ROS accumulation is a critical modulator of FOXO3-induced autophagy. *Mol Cancer*, 16(1), 95. doi: 10.1186/s12943-017-0661-4
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., . . . Goldberg, A. L. (2004, 2004/04/30/). Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell*, 117(3), 399-412. doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00400-3)

- Sartori, R., Milan, G., Patron, M., Mammucari, C., Blaauw, B., Abraham, R. et Sandri, M. (2009, Jun). Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(6), C1248-1257. doi: 10.1152/ajpcell.00104.2009
- Sartori, R., Romanello, V. et Sandri, M. (2021, Jan 12). Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nat Commun*, 12(1), 330. doi: 10.1038/s41467-020-20123-1
- Sartori, R., Schirwis, E., Blaauw, B., Bortolanza, S., Zhao, J., Enzo, E., . . . Sandri, M. (2013, Nov). BMP signaling controls muscle mass. *Nat Genet*, 45(11), 1309-1318. doi: 10.1038/ng.2772
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B. et Sandri, M. (2013, Sep). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *Febs j*, 280(17), 4294-4314. doi: 10.1111/febs.12253
- Schiaffino, S. et Reggiani, C. (2011, Oct). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91(4), 1447-1531. doi: 10.1152/physrev.00031.2010
- Shen, L., Du, J., Xia, Y., Tan, Z., Fu, Y., Yang, Q., . . . Zhu, L. (2016, Aug 26). Genome-wide landscape of DNA methylomes and their relationship with mRNA and miRNA transcriptomes in oxidative and glycolytic skeletal muscles. *Sci Rep*, 6, 32186. doi: 10.1038/srep32186
- Shigemitsu, K., Tsujishita, Y., Hara, K., Nanahoshi, M., Avruch, J. et Yonezawa, K. (1999, Jan 8). Regulation of translational effectors by amino acid and mammalian target of rapamycin signaling pathways. Possible involvement of autophagy in cultured hepatoma cells. *J Biol Chem*, 274(2), 1058-1065. doi: 10.1074/jbc.274.2.1058
- Smerdu, V., Karsch-Mizrachi, I., Campione, M., Leinwand, L. et Schiaffino, S. (1994, Dec). Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol*, 267(6 Pt 1), C1723-1728. doi: 10.1152/ajpcell.1994.267.6.C1723
- Stepp, M. W., Folz, R. J., Yu, J. et Zelko, I. N. (2014, Jun). The c10orf10 gene product is a new link between oxidative stress and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1843(6), 1076-1088. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.02.003
- Tang, C., Han, H., Liu, Z., Liu, Y., Yin, L., Cai, J., . . . Dong, Z. (2019, Sep 12). Activation of BNIP3-mediated mitophagy protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Dis*, 10(9), 677. doi: 10.1038/s41419-019-1899-0

- Thoma, A., Akter-Miah, T., Reade, R. L. et Lightfoot, A. P. (2020, Aug). Targeting reactive oxygen species (ROS) to combat the age-related loss of muscle mass and function. *Biogerontology*, *21*(4), 475-484. doi: 10.1007/s10522-020-09883-x
- Thompson, L. V. (2009, Jan-Feb). Age-related muscle dysfunction. *Exp Gerontol*, *44*(1-2), 106-111. doi: 10.1016/j.exger.2008.05.003
- Valzelli, L. (1973, Aug 3). The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia*, *31*(4), 305-320. doi: 10.1007/bf00421275
- Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R. L., Kim, J., . . . Przedborski, S. (2010, Jan 5). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(1), 378-383. doi: 10.1073/pnas.0911187107
- Watanabe, H., Nonoguchi, K., Sakurai, T., Masuda, T., Itoh, K. et Fujita, J. (2005). A novel protein Depp, which is induced by progesterone in human endometrial stromal cells activates Elk-1 transcription factor. *Molecular human reproduction*, *11*(7), 471-476.
- Weijs, P. J., Looijaard, W. G., Dekker, I. M., Stapel, S. N., Girbes, A. R., Oudemans-van Straaten, H. M. et Beishuizen, A. (2014, Jan 13). Low skeletal muscle area is a risk factor for mortality in mechanically ventilated critically ill patients. *Crit Care*, *18*(2), R12. doi: 10.1186/cc13189
- Winbanks, C. E., Weeks, K. L., Thomson, R. E., Sepulveda, P. V., Beyer, C., Qian, H., . . . Gregorevic, P. (2012, Jun 25). Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin. *J Cell Biol*, *197*(7), 997-1008. doi: 10.1083/jcb.201109091
- Youle, R. J. et van der Blik, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6098), 1062-1065. doi: 10.1126/science.1219855
- Zhang, J. et Ney, P. A. (2009, Jul). Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ*, *16*(7), 939-946. doi: 10.1038/cdd.2009.16
- Zhang, P., Chen, X. et Fan, M. (2007). Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses*, *69*(2), 310-321. doi: 10.1016/j.mehy.2006.11.043

Zhou, L., Xiao, X., Zhang, Q., Zheng, J., Li, M. et Deng, M. (2019). A Possible Mechanism: Genistein Improves Metabolism and Induces White Fat Browning Through Modulating Hypothalamic Expression of Ucn3, Depp, and Stc1. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 478. doi: 10.3389/fendo.2019.00478

Zoncu, R., Efeyan, A. et Sabatini, D. M. (2011, Jan). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1), 21-35. doi: 10.1038/nrm3025