Thèse de doctorat

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 524 BIOLOGIE, SANTE

Unité de Génétique Moléculaire Animale
UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par
Luce PERIE

Le 16 décembre 2015

LA MYOSTATINE ET SES PARTENAIRES GASP-1 ET GASP-2 : IMPLICATIONS DANS LE DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE ET LE METABOLISME DU GLUCOSE

Thèse dirigée par le Professeur **Véronique BLANQUET**

JURY

Président du jury	**Fabrice LALLOUE**, Professeur des Universités, Limoges
Rapporteurs	**Isabelle CASSAR-MALEK**, Directrice de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand **François CASAS**, Directeur de Recherche, INRA, Montpellier
Examinateurs	**Ahmed Amine KHAMLICHI**, Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse **Ahmad OULMOUDEN**, Professeur des Universités, Limoges **Véronique BLANQUET**, Professeur des Universités, Limoges

Université de Limoges

Thèse de doctorat

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 524 BIOLOGIE, SANTE

Unité de Génétique Moléculaire Animale
UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par
Luce PERIE

Le 16 décembre 2015

LA MYOSTATINE ET SES PARTENAIRES GASP-1 ET GASP-2 : IMPLICATIONS DANS LE DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE ET LE METABOLISME DU GLUCOSE

Thèse dirigée par le Professeur **Véronique BLANQUET**

JURY

Président du jury	**Fabrice LALLOUE**, Professeur des Universités, Limoges
Rapporteurs	**Isabelle CASSAR-MALEK**, Directrice de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand **François CASAS**, Directeur de Recherche, INRA, Montpellier
Examinateurs	**Ahmed Amine KHAMLICHI**, Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse **Ahmad OULMOUDEN**, Professeur des Universités, Limoges **Véronique BLANQUET**, Professeur des Universités, Limoges

Université de Limoges

N'oublie jamais d'où tu viens et par où tu es passé.

(cc) BY-NC-ND

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie chaleureusement le Dr François Casas et le Dr Isabelle Cassar-Malek de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également le Dr. Ahmed Amine Khamlichi d'avoir accepté d'examiner mon travail

J'adresse un grand merci au Pr Fabrice Lalloué d'avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse. J'ai apprécié nos échanges scientifiques toujours très enrichissants et d'avoir pu travailler dans votre laboratoire même pour une courte période.

Ahmad, je suis particulièrement touchée par ta présence dans ce jury. Ta gentillesse, ta bonne humeur et ton enthousiasme constant ont fait que ces trois années sont passées très vite. Nos discussions à n'importe quelle heure de la journée (oui même celles à 7 heures du matin le dimanche…) vont beaucoup me manquer.

Je tiens à remercier le Pr Véronique Blanquet, ma directrice de thèse, de m'avoir acceptée dans son équipe. Je me souviens encore de vos propos il y a trois ans de cela à la fin de mon M2 : « Oui, la thèse avec moi ça sera dur, mais tu vas y arriver ». Et bien devinez quoi, on dirait bien que oui !!! Et quand je vois le parcours que j'ai accompli durant ces trois années, je n'ai qu'un mot à dire c'est Merci. J'ai pu acquérir à vos côtés une autonomie et une (petite) confiance en moi que je n'aurais jamais cru possible. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir soutenu mes idées (aussi farfelues soient-elles).

Ces trois années ont été riches en découvertes, en émotions et surtout riches en rencontres. La thèse c'est avant tout un vrai travail d'équipe et je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont entourée et aidée dans cette aventure.

Caro, cette thèse n'aurait pas été la même sans toi. Tu m'as accueilli et tu m'as appris tout ce que tu savais tel un maître Jedi enseigne la Force à son padawan (référence Star Wars placée !!!!). Et plus que tout, tu es devenue une véritable amie avec qui j'ai vécu des trucs énormes. J'ai adoré ces 3 années avec toi. J'ai aimé bosser avec toi, nos discussions scientifiques, nos journées de folie au labo, nos petites soirées chez toi, notre voyage en Suisse italienne à la poursuite de M… et j'en oublie. Tu m'as fait aimer la science et j'espère un jour pouvoir retravailler avec toi.

(cc) BY-NC-ND

Katy, tu m'as vraiment tout montré de tes talents à la paillasse (et oh mon dieu ça faisait beaucoup). Au laboratoire comme à l'extérieur tu as toujours su être là et rendre les choses super faciles. J'ai adoré nos séances ciné et nos activités limougeaudes (qui aurait cru qu'on pouvait faire autant de choses dans une si petite ville). Nos petites sorties me manquent, j'espère qu'on se reverra bientôt.

Vincent, un grand merci à toi. Partenaire de paillasse, de cinéma, de belote, de pétanque, tu as su rendre ces trois années inoubliables. Je n'ai qu'une chose à dire : « à la revoyure et surtout au plaisir ». Je fais aussi un gros bisouxxx à Delphine et à Eva, my little miss sunshine de St Gence.

Fabienne, ma petite « maman » du labo. Merci pour ton aide précieuse en immunohisto et ton soutien dans toutes mes petites crises de panique. J'ai adoré nos sessions pauses thé. Et aujourd'hui tu peux être fière de moi car grâce à toi il y a bien longtemps que je n'ai plus accroché lundi avec mardi.

Lionel, Patrick, nos petites séances sportives du midi vont beaucoup me manquer (promis je m'y remets bientôt !!!). Merci pour ces petits moments de détente sportive. Et soyez en certains, je n'oublierai jamais cette « côte de l'Inutilité » que j'associerai pour TOUJOURS à vous deux. Pour toutes mes douleurs musculaires, un grand merci.

Laure, Didier et Romain, un grand merci à vous trois. Merci pour tous vos conseils et votre soutien pendant ces trois ans. J'ai adoré nos petites soirées spéciales CORN, COBE, CORN2.0. Y'a pas à dire, le Poney club c'est la classe.

Karine, Emilie ; grâce à vous la protéo 2D et la spectro de masse n'ont (presque) plus de secrets pour moi. Et je ne sais pas si la protéo va de paire avec un humour décapant mais Karine pour toujours tu resteras la big boss des blagues qui tuent (avec Lionel, juste derrière toi). Un grand merci également à Nathalie, Débora et Odile.

Sébastien, merci pour ton aide précieuse et pour tes conseils techniques et scientifiques tout au long de ces trois années. J'ai adoré toutes nos petites discussions nocturnes au laboratoire, et je n'écoute plus la chanson Zombie de la même façon depuis tes interprétations multiples et très personnelles.

(cc) BY-NC-ND

Laetitia, merci de m'avoir fait découvrir ce merveilleux monde de la souris. Je remercie également Khaled pour sa gentillesse et sa bonne humeur, ainsi qu'Agnès et Daniel qui ont su rendre intéressant comme personne les bootstrap et l'évolution.

Carole, c'est bientôt ton tour. Merci pour ta patience et pour ta gentillesse. On a commencé et on va finir ensemble. Bon courage et plein de belles choses pour la suite. Je remercie également Bilal, Stéphane et Rayan. Bon courage à vous, le bout du chemin n'est plus très loin.

J'adresse également un grand merci à Martine notre super hôtesse de la fac qui est devenue une véritable amie. Merci aussi à Micka de m'avoir fait découvrir le monde magique du CSP. Je n'ai pas encore assimilé toutes les règles du basket, mais j'ai adoré nos soirées au stade. Un grand merci à vous deux.

La dernière année de thèse fut assez folle et n'aurait pas été la même sans vous tous. Mélanie, ma deuxième coloc' préférée ! J'ai adoré ces derniers mois passés avec toi. Nous nous sommes découvertes toutes les deux un peu tardivement mais ça en valait la peine. Tu as toujours été de bons conseils, vraiment merci pour tout. Bisouxxx à Yannick et à Nelly ma muse de ces derniers mois et ma coloc' préférée.

Un grand merci au trio de choc : Caroline, Mélanie et Jessica. Caroline notre petite Bree Van De Kamp à nous ! Tu es la fille la plus chou que je connaisse. Merci pour ta gentillesse, tes petits mots réconfortants dans les moments de stress et ton envie de tout tester (« Pour la culture !»). Mélanie, merci pour ta folie et ta capacité de faire des trucs magnifiques avec rien. Tu es une très belle personne, ne change rien. Jess, nos petites soirées apéro dinatoires font parti des meilleures soirées que j'ai passées sur Limoges. Tu es une fille super et je peux le dire ici, j'adore, tu as trop le rythme dans la peau !! Un grand merci à toi.

Alexis, je serais sûrement encore le vieil ours mal léché du 108 si je ne t'avais pas rencontré. Merci pour ta bonne humeur, ton enthousiasme, ta spontanéité et ton amitié sans faille. Et même si ce fut court, j'ai adoré bosser avec toi, vivement qu'on remette ça. Merci pour ton soutien ces derniers mois et pour ton regard critique sur mon travail et sur ma thèse. Merci pour tout.

Benoît, tellement de choses à dire. Merci d'avoir été toujours là pour moi ces derniers mois. Je ne sais pas comment, mais tu as toujours su trouver les mots justes pour me rassurer. Merci pour tes conseils avisés sur ma thèse et sur l'article qui n'aurait pas la même tronche si tu n'étais pas passé par

(cc) BY-NC-ND

là. Tu es brillant, tu as un esprit critique et une grande capacité de déduction. Alors s'il te plaît, reviens vite travailler dans le monde de la recherche.

Je remercie aussi tous mes amis qui ont été d'une grande compréhension ces trois dernières années. Un grand merci à Alexis, mon compère dans cette folie qu'est la thèse. Merci pour nos séances Quick du midi à refaire le monde. Ma petite Emma, je t'aime fort fort fort, merci pour ta patience, et pour avoir toujours été présente quoi qu'il arrive. Un gros bisouxxx à Nico et je vous souhaite tout le bonheur du monde à tous les deux. Elodie/Mélodie le duo inséparable qui me supporte depuis la L1. Vous êtes une de mes plus belles rencontres sur Limoges, un grand merci à vous deux. Merci également à Rémy pour toutes nos soirées parisiennes.

Je tiens à remercier particulièrement Gaël, mon meilleur ami depuis le lycée. Tu as vraiment été d'un soutien sans faille durant ces trois ans. J'attendais chaque année nos petites vacances d'été avec impatience. Allez, on est des fous, on se tente les States ?

Enfin ces dernières lignes sont pour tous les membres de ma famille qui m'ont soutenu dans cette aventure. Bernard, Dominique, merci pour ces petits week-ends gourdonnais et nos balades en forêt.

Merci à ma petite sœur Sarah mon rayon de soleil. Aussi fou que cela puisse paraître, tu as été une grande sœur pour moi pendant ces trois ans. Merci à mon petit frère Guilhem qui, quoi qu'il arrive, aura toujours ce petit sourire aux lèvres qui rend heureux ceux qui l'entourent.

Papa, Maman, merci d'avoir cru en moi depuis le début, merci pour votre soutien inébranlable, pour vos paroles toujours réconfortantes. Vous avez fait de moi ce que je suis. Je n'y serai jamais arrivée sans vous et j'espère aujourd'hui que je vous ai rendu fiers.

Un grand merci à tous !

Luce.

(cc) BY-NC-ND

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France » disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*

BY-NC-ND

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Perié L., Brun C., Baraige F., Magnol L. & Blanquet V *Alteration of adiposity and glucose homeostasis in adult overexpressing Gasp-1 mice.* Soumis dans Open Biology.

Perié L., Parenté A., Brun C., Magnol L., Pélissier P. & Blanquet V. *Gasp-2 enhances proliferation and differentiation of myoblasts by inhibiting myostatin and thus independently of its glycosylation.* Soumis dans BB Reports.

Brun C., **Perié L.**, Baraige F., Vernus B., Bonnieu A. & Blanquet V. *Absence of hyperplasia in Gasp-1 overexpressing mice is dependent on myostatin up-regulation.* Cell Physiol Biochem, 2014

COMMUNICATIONS

Communications orales

2015 **Perié L.,** Brun C., Baraige F., Vuillier- Devillers K., Forestier L. & Blanquet V. *Gasp-1 overexpression leads to a deregulation of adiposity and glucose homeostasis in adult mice* 2éme Journée GEIST, Limoges, France, 2015

2014 **Perié L.,** Brun C., Baraige F., Vuillier- Devillers K., Forestier L. & Blanquet V. *Alteration of glucose and fat homeostasis in mice overexpressing Gasp-1.* 17ème Séminaire des thésards du département de Génétique Animale-INRA, Jouy-en Josas, France, 2014

2014 **Perié L.,** Brun C., Baraige F., Vuillier- Devillers K., Forestier L. & Blanquet V. *Gasp-1 overexpression leads to a deregulation of adiposity and glucose homeostasis in adult mice.* JSFM, Paris, France, 2014

Communications écrites

Conférences internationales

2014 **Perié L.**, Brun C., Baraige F., Vuillier-Devillers K., Forestier L., & Blanquet V. *Gasp-1 overexpression leads to a deregulation of adiposity and glucose homeostasis in adult mice.* European Muscle Conference, Salzbourg, Autriche, 2014

(cc) BY-NC-ND

Conférences nationales

2014 **Perie L.**, Brun C., Baraige F., Vuillier-Devillers K., Forestier L., & Blanquet V. *Gasp-1 overexpression leads to a deregulation of adiposity and glucose homeostasis in adult mice.* JSFM 2014, Paris, France

2014 Gondran Tellier V., **Perié L.,** Blanquet V and Magnol L. *Molecular mechanisms involved in the control of muscle mass: roles of the GASP/WFIKKN proteins.* 17ème Séminaire des thésards du département de Génétique Animale-INRA, Jouy-en Josas, France, 2014

2013 **Perié L.**, Brun C., Magnol L., Passet B. & Blanquet V. *Molecular mechanisms modulating skeletal muscular mass : Role(s) of the GASP-2 protein.* 16ème Séminaire des thésards du département de Génétique Animale-INRA, Amboise, France, 2013

(cc) BY-NC-ND

ABREVIATIONS

A/P : Antéro-Postérieur

ActRIIa/IIb : Activin Receptor type-IIa/IIb

Acvr2b : Activin Receptor type IIb

AdipoR : Récepteur de l'Adiponectine

AKT : Protein kinase B

Alk : Activin-like kinase

AMH : Hormone Anti-Müllerienne

AMPK : AMP-activated Protein Kinase

ARE : Androgen Response Element

ATP : Adénosine Triphosphate

BAT : Brown Adipose Tissue

bHLH : basic Helix-Loop-Helix

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BMPR : BMP Receptor

C/EBP : CCAAT/Enhancer-Binding Protein

CAP : c-Cbl Associated Protein

CCL12 : Chemokine (C-C motif) Ligand 12

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

Co-SMAD : Common-mediator SMAD

CRE : cAMP Response Element

CXCL : C-X-C motif chemokine Ligand

D/V : Dorso-Ventral

DAG : Diacylglycérol

Dpc : Days post-coïtum

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

Fas : Fatty acid synthase

FFA : Free Fatty Acids

FoxO : Forkhead box protein

FSH : Hormone Folliculaire Stimulante

FST/FS : Follistatine

FSTL3/FLRG : Follistatin-Like 3/Follistatin Related-Gene

G6pc : Glucose-6-phosphatase

GASP : GDF-Associated Serum protein

GDF : Growth and Differentiation Factor

GH : Growth Hormone

GLP-1 : Glucagon-Like Peptide-1

GLUT : Glucose Transporter

GRB : Growth factor Receptor-Bound protein

GRE : Glucocorticoïd Response Element

Grp : Glucose-related protein

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

HFD : High Fat Diet

hSGT : human Small Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat containing-protein

IgC2 : Immunoglobulin Complement 2

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1

IGFR : IGF Receptor

IKK : Inhibitor of Kappa B Kinase

IL-6 : Interleukin-6

IMCL : Intramyocellular Lipids

IRE1α : Inositol-Requiring Enzyme 1α

IRS : Insulin Receptor Substrate

I-SMAD : Inhibitory-SMAD

JAK : Janus Kinase

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

KO : Knock-Out

LAP : Latency Associated Peptide

LDL : Lipoprotéines de basse densité

Lep : Leptine

LLC : Large Latent Complex

Ln : Lean

LTBP : Latent TGFβ Binding Protein

MAFbx : Muscle Atrophy F-box

(cc) BY-NC-ND

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MEC : Matrice Extracellulaire

MEF2 : Myocyte Enhancer Factor-2

MEK : Mitogen Extracellular signal-regulated Kinase

miR/miRNA : microARN

MIS : Mullerian-Inhibiting Substance

MLC : Myosin Light heavy Chain

MRF : Muscle Regulatory Factor

Mstn : Myostatine

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

MuRF1 : Muscle RING-Finger protein 1

Myf : Myogenic factor

Myh ; Myosine

MyHC ; Myosin Heavy Chain

Myo1C : Myosin IC

MyoD : Myoblast Determination protein 1

MyoG : Myogénine

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NFAT : Nuclear Factor of Activated T

NF-κB : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

OLETF : Otsuka Long Evans Tokushima Fat

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAX : Paired box protein

Pck : Phosphoenolpyruvate carboxylase

Pdx1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1

PGC-1α : PPAR gamma coactivator-1α

PI3K : Phospholnositide 3-Kinase

PISCES : Pancreatic Islet Cell Enhancer Sequence

PKC : Protein Kinase C

PMDS : Syndrome de Persistance des Canaux de Müller

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PS : Peptide Signal

RBP4 : Retinol-Binding Protein 4

RI : Récepteur à l'Insuline

R-SMAD : Receptor-regulated SMAD

SHC1 : SHC-transforming protein 1

SLC : Small Latent Complex

SMAD : Sma Mothers Against Decapentaplegic homolog

SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

SOCS3 : Suppressor Of Cytokine Signalling 3

SOS : Son Of Sevenless homolog

Sox9 : Sex determining region Y-box 9

SREBP-1 : Sterol Response Element-Binding Protein

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TAK1-MKK6 : TGF-b-Activated Kinase 1-Mitogen-activated protein Kinase Kinase

Taqman : TaqMan Low Density Array

Tg : Transgénique

TGF : Transforming Growth Factor

TIMP-1 : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1

TLDA : TaqMan Low Density Array

TNFα : Tumor Necrosis Factor α

TRE : Thyroïd hormon Response Element

TβR : TGFβ Receptor

UCP-1 : Uncoupling Protein-1

UPR : Ubiquitin Protein Response

VAMP2 : Vesicule-Associated Membrane Protein 2

(cc) BY-NC-ND

WAP : Whey Acidic Protein

WAT : White Adipose Tissue

WFIKKN : WAP, Follistatin, Kazal, Immunoglobulin, Kunitz, Kunitz, Netrin

XBP1 : X-box Binding Protein 1

Xnr1 : Xenopus nodal-related 1

ZDF : Diabetic Zucker Fatty

(cc) BY-NC-ND

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE 1

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE 4

1. LA SUPERFAMILLE DES TGFβs 4

1.1. Généralités 4

1.2. Biosynthèse des TGFβs 4

1.3. Voies de signalisation des TGFβs 6

1.4. Rôle des TGFβs dans le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire 9

2. LA MYOSTATINE 11

2.1. Généralités 11

2.2. Régulations transcriptionnelles et extracellulaires de la myostatine 14

2.3. La myostatine dans un contexte musculaire 16

2.3.1. Structure du muscle squelettique 18

2.3.2. Les différents types de fibres musculaires 20

2.3.3. Développement embryonnaire des muscles 22

2.3.4. La croissance musculaire post-natale 25

2.4. La myostatine et Gdf-11 : Redondance de fonctions 33

2.5. La myostatine dans un contexte métabolique 35

2.5.1. L'insuline 35

2.5.2. Implication de l'insuline dans le métabolisme 38

2.5.3. L'insulino-résistance 40

3. LES PROTEINES GASPs 52

(cc) BY-NC-ND

3.1. Rôle dans le muscle strié squelettique 55

3.2. Autres rôles connus 59

OBJECTIFS DE THESE 61

RESULTATS 62

CHAPITRE 1. ETUDE DU ROLE DE GASP-1 AU COURS DU DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE 62

CHAPITRE 2. ROLE DE GASP-1 DANS LA PATHOGENESE DU SYNDROME METABOLIQUE 64

CHAPITRE 3. ETUDE DU ROLE DE GASP-2 SUR LE DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE 68

DISCUSSION GENERALE 70

REFERENCES 79

ANNEXES 96

(cc) BY-NC-ND

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Maturation des TGFβs 6

Figure 2. Voies de signalisation canoniques des TGFβs et des BMPs. 8

Figure 3. Importance du rôle des TGFβs au cours du développement embryonnaire. 10

Figure 4. Gène, transcrit et protéine de la myostatine. 12

Figure 5. Voies de signalisation de la myostatine. 13

Figure 6. Animaux présentant un phénotype hypermusclé suite à l'inactivation du gène de la myostatine. 17

Figure 7. Anatomie du muscle squelettique. 19

Figure 8. Schéma des différentes voies métaboliques empruntées par les fibres lentes et les fibres rapides. 21

Figure 9. Induction des processus myogéniques. 23

Figure 10. Différentes phases de la myogenèse. 24

Figure 11. Differents acteurs de la croissance musulaire post-natale. 27

Figure 12. Phénotypes musculaires obtenus par injection d'inhibiteurs de la myostatine par adénovirus. 31

Figure 13. La myostatine, régulateur négatif majeur du développement musculaire. 32

Figure 14. Malformations squelettetiques des souris *Mstn*$^{-/-}$*;Gdf-11*$^{-/-}$. 34

Figure 15. Voies de signalisation de l'insuline au niveau du muscle squelettique. 37

Figure 16. Représentation schématique du métabolisme des glucides et des lipides. 39

Figure 17. Insulino-resistance et dérégulation de l'homéostasie du glucose. 41

Figure 18. Effets des adipokines sur le métatoblisme. 45

Figure 19. Structure des gènes et des proteines GASPs chez la souris. 53

(cc) BY-NC-ND

Figure 20. Niveau d'expression tissulaire des gènes *Gasps* chez l'homme..... 54

Figure 21. Fonctions biologiques des protéines GASPs comme antagonistes de la myostatine. 56

Figure 22. Phénotype hypermusclé des sours *Tg(Gasp-1)*..... 57

Figure 23. Phénotype des souris *Gasp1*$^{-/-}$ ET *Gasp2*$^{-/-}$. 59

Figure 24. Défauts métaboliques observés chez les souris *Tg(Gasp-1)*. 66

Figure 25. Expression de GRP78 dans les souris surexprimant *Gasp-1*. 67

Figure 26. Protéome musculaire des souris *Tg(Gasp-1)* à 3 mois..... 74

Figure 27. Protéome musculaire des souris *Tg(Gasp-1)* à 16 mois..... 75

(cc) BY-NC-ND

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Les membres de la superfamille des TGFβs. 5

Tableau 2. Les inhibiteurs de la myostatine. 16

Tableau 3. Les différents types de fibres musculaires. 20

Tableau 4. Phénotypes musculaires obtenus par utilisation d'inhibiteurs de la myostatine. 29

Tableau 5. Actions métaboliques des adipokines.. 44

Tableau 6. Phénotypes métaboliques obtenus lors de l'invalidation de la myostatine. 51

(cc) BY-NC-ND

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le muscle squelettique constitue plus de 40% du corps humain et joue un rôle indispensable dans la locomotion des êtres vivants. Mais c'est également un organe endocrine qui sécrète de nombreuses cytokines. Ces dernières jouent le rôle de médiateur entre le muscle et différents organes, comme le foie, le pancréas ou encore le tissu adipeux, impliqués dans la régulation du métabolisme. L'homéostasie du glucose repose sur une communication inter-organes finement régulée. Des dysfonctionnements dans ce « crosstalk » entre les organes sont à l'origine de pathologies graves comme le diabète de type II ou l'obésité. Par conséquent, mieux appréhender le fonctionnement de ce « crosstalk » permettrait d'explorer plus en détail le rôle du muscle squelettique dans l'homéostasie du glucose et fournirait de nouvelles opportunités pour le traitement de syndromes métaboliques.

La myostatine, membre de la superfamille des TGFβs, est une cytokine musculaire et un des inhibiteurs majeurs de la myogenèse. Son invalidation chez la souris (le modèle murin *Mstn*$^{-/-}$) entraîne une augmentation importante de la masse musculaire qui résulte d'une hyperplasie et d'une hypertrophie des myofibres ainsi que d'une augmentation du nombre de fibres glycolytiques dites rapides (McPherron *et al.* 1997). Cependant le rôle biologique de la myostatine ne se limite pas au tissu musculaire. Des études récentes ont démontré que les souris *Mstn*$^{-/-}$ présentent une diminution de leur masse adipeuse, ainsi qu'une sensibilité à l'insuline et une tolérance au glucose accrues. Ces souris sont également protégées contre la prise de poids liée à l'âge, le diabète de type II et l'obésité (McPherron & Lee 2002; Zhao *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2011a, b; Jackson *et al.* 2012). En effet, lorsque les souris *Mstn*$^{-/-}$ sont croisées avec des modèles murins étudiés pour l'obésité, les conditions pathologiques de ces souris (poids, insulino-résistance, hyperglycémie,…) sont nettement améliorées. La myostatine se présente alors comme une cible thérapeutique de choix, à la fois dans un contexte musculaire et métabolique.

Dès lors, de nombreuses études sont mises en place pour inhiber l'action de la myostatine, que ce soit par l'utilisation d'anticorps neutralisants, par ciblage direct du gène, ou encore par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Parmi ces derniers, les inhibiteurs les plus connus de la myostatine sont la follistatine, FSTL3 et les protéines GASP-1 et GASP-2. Les protéines GASPs sont des protéines sécrétées et sont composées de plusieurs domaines inhibiteurs de protéases (Trexler *et al.* 2001, 2002; Hill *et al.* 2003). Dans un premier temps, la plupart des études réalisées sur GASP-1 et sur GASP-2 ont porté sur leur action inhibitrice de protéases (Nagy *et al.* 2003; Liepinsh *et al.* 2006).

(cc) BY-NC-ND

Cependant, il a été montré que GASP-1 était capable *in vivo* d'accroître la masse et la force musculaire (Haidet *et al.* 2008). Des études *in vitro* confirment également qu'une surexpression de *Gasp-1* favorise la prolifération et la différenciation des cellules musculaires (Bonala *et al.* 2012). Néanmoins, les mécanismes moléculaires et les conséquences fonctionnelles de l'inhibition de la myostatine par GASP-1 ou GASP-2 sont encore peu étudiés. De même, le rôle des protéines GASPs dans l'homéostasie du glucose est à ce jour très peu connu.

C'est dans ce contexte, que s'inscrivent les travaux du professeur Véronique Blanquet au sein du laboratoire de Génétique Moléculaire Animale à Limoges. Son équipe s'intéresse particulièrement à la myostatine et à ses inhibiteurs GASP-1 et GASP-2. L'analyse fonctionnelle de ces protéines est réalisée à la fois *in vitro* sur des cellules musculaires, mais également *in vivo* à l'aide de modèles murins qui surexpriment *Gasp-1* ou *Gasp-2* de façon ubiquitaire.

Au commencement de ma thèse, le modèle murin surexprimant *Gasp-1* (appelé *surGasp-1-20* ou *Tg(Gasp-1)*) venait d'être phénotypé (Monestier *et al.* 2012a). Ces souris présentent une augmentation de la masse musculaire associée à une hypertrophie mais sans hyperplasie des fibres (Monestier et al. 2012a). Des études *in vitro* ont démontré que cette augmentation de la masse musculaire était bien due à l'inhibition de la voie canonique de la myostatine, la voie SMAD2/3, et à l'activation de la voie AKT (Brun *et al.* 2012, 2014). Cependant, le modèle *Tg(Gasp-1)* présente quelques singularités par rapport aux souris *Mstn*$^{-/-}$ ou celles qui surexpriment la *follistatine* ou *Fstl3*. La première particularité est l'absence d'hyperplasie dans les souris qui surexpriment *Gasp-1* et la seconde, l'absence de diminution de la masse adipeuse. Afin de mieux appréhender les mécanismes moléculaires à la base du phénotype des souris *Tg(Gasp-1)*, des analyses moléculaires et phénotypiques plus poussées ont donc été entreprises au sein du laboratoire.

Dans une première partie de ma thèse, j'ai participé aux analyses moléculaires des cellules musculaires dérivées de cellules satellites de souris *Tg(Gasp-1)* afin de comprendre le phénotype musculaire de cette lignée. Cette étude a révélé une augmentation de l'expression de la *myostatine* dès le stade embryonnaire pouvant expliquer l'absence d'hyperplasie des fibres musculaires des souris *Tg(Gasp-1)*. Nous avons également montré que l'hypertrophie musculaire dans ce modèle s'expliquait par une augmentation de la synthèse protéique post-natale et non par une augmentation du nombre de cellules satellites (Brun *et al.* 2014).

Par la suite, je me suis intéressée au rôle de *Gasp-1* sur l'homéostasie du glucose sachant qu'aucune donnée quant à l'effet de GASP-1 sur le métabolisme n'était connue. Nous avons aussi

(cc) BY-NC-ND

initié cette étude afin de comprendre l'absence de variation de masse graisseuse chez les souris surexprimant *Gasp-1* (Monestier *et al.* 2012a). A l'inverse des souris *Tg(Gasp-1)*, les souris *Mstn*$^{-/-}$ et les souris qui surexpriment la *follistatine* ou *Fstl3* présentent une diminution du pourcentage de masse graisseuse (McPherron & Lee 2002; Gangopadhyay 2013; Brandt *et al.* 2015). Pour expliquer le phénotype de notre modèle murin, nous avons travaillé sur des souris sauvages et *Tg(Gasp-1)* jeunes et âgées afin d'appréhender l'effet de la surexpression de *Gasp-1* sur les différents processus impliqués dans le métabolisme des glucides et notamment ceux associés au vieillissement. Cette étude a révélé une dérégulation globale de l'homéostasie du glucose chez les souris *Tg(Gasp-1)* âgées avec des défauts métaboliques similaires à ceux retrouvés chez les modèles animaux étudiés pour l'obésité et le diabète de type II.

Enfin dans une dernière partie, je me suis intéressée à une étude structure fonction de la protéine GASP-2. De nombreuses études ont été réalisées sur la protéine GASP-1 dans un contexte musculaire, mais très peu sur son paralogue. Des résultats précédemment obtenus dans le laboratoire ont montré le rôle de GASP-1 sur les cellules musculaires et l'impact de sa glycosylation sur son action sur la myostatine (Brun *et al.* 2012). Afin de mieux appréhender le rôle de GASP-2 et l'importance de sa glycosylation au cours de la myogenèse, j'ai traité des cellules musculaires C2C12 soit avec une protéine glycosylée soit avec une protéine produite en bactérie, donc sans glycanes. Mes données montrent que GASP-2, comme son paralogue GASP-1, inhibe bien la voie canonique de la myostatine indépendamment de sa glycosylation. Les études *in vivo* réalisées actuellement dans notre équipe devraient apporter des réponses plus précises sur le rôle de GASP-2 sur le développement musculaire et sur l'homéostasie glucidique.

L'ensemble de ses résultats sera détaillé dans mon manuscrit sous la forme de trois articles commentés après l'exposé bibliographique. Enfin, la dernière partie de mon manuscrit de thèse sera consacrée à une discussion sur l'implication de GASP-1, GASP-2 et de la myostatine dans les contextes musculaire et métabolique.

(cc) BY-NC-ND

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LA SUPERFAMILLE DES TGFβs

1.1. GENERALITES

La superfamille des TGFβs (Transforming Growth Factor β) contient plus de 30 membres, incluant les TGFβs, les BMPs (Bone Morphogenetic Protein) les GDFs (Growth and Differentiation Factor) ainsi que l'activine et nodal, impliqués dans le développement et l'homéostasie de tous les métazoaires (Piek *et al.* 1999). Toutes les protéines retrouvées dans leurs voies de signalisation sont extrêmement bien conservées au cours de l'évolution et régulent diverses fonctions cellulaires comme l'adhésion, la prolifération, la migration, l'apoptose et la différenciation (Piek *et al.* 1999). Les membres de cette superfamille peuvent être divisés en deux groupes sur la base des récepteurs et des protéines qu'ils activent. La sous-famille contenant la plupart des TGFβ-like (TFGβ-1, 2, 3) ainsi que les GDF (GDF-8, 9, 11), BMP-3, l'activine et nodal se fixent aux récepteurs activant la voie des SMAD2/3 (Sma Mothers Against Decapentaplegic homolog 2/3). Les protéines faisant partie des BMP (tous les BMP excepté BMP-3) et certains GDFs (GDF-1, 3, 5, 6, 7) se lient quant à eux aux récepteurs couplés aux SMAD1/5/8 (Hinck 2012) **(Tableau 1)**.

1.2. BIOSYNTHÈSE DES TGFβs

Le profil d'expression et le rôle des différents TGFβs varient au cours du développement. Par exemple, les TGFβ-1, 2 et 3 inhibent la prolifération des cellules d'origine épithéliale mais stimulent la croissance des cellules mésenchymateuses. Les BMPs sont des inducteurs puissants de la formation des os et du cartilage et jouent un rôle important au cours du développement pour la mise en place du mésoderme ventral, la différenciation du tissu neural, et l'organogenèse (Wu & Hill 2009).

(cc) BY-NC-ND

TABLEAU 1. LES MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE DES TGFβs.

Protéines	Récepteur de type I	Récepteur de type II	SMADs
TGF-βs	TβR-I (Alk5)	TβR-II	SMAD2, 3
Activin	ActRI-b (Alk4) TβR-I (Alk5)	ActR-II ActR-IIb	SMAD2, 3
GDF-8 (Myostatine)	ActR-Ib (Alk4) TβR-I (Alk5)	ActR-II ActR-IIb	SMAD2, 3
Nodal	ActR-Ib (Alk4) Alk7	ActR-II ActR-IIb	SMAD2, 3
BMPs GDFs	Alk1 Act-RI(Alk2) BMPR-Ia (Alk3) BMPR-Ib (Alk6)	ActR-II ActR-Iib BMPR-II	SMAD1, 5, 8
MIS	BMPR-Ia (Alk3) BMPR-Ib (Alk6)	MISR-II	SMAD1, 5, 8

ActR, Activin Receptor ; Alk, Activin-like kinase ; BMP, Bone Morphognic Protein ; BMPR, Bone Morphogenetic Protein Receptor ; GDF, Growth and Differentiation Factor ; MIS, Mullerian Inhibiting Substance ; SMAD, Sma Mothers Against Decapentaplegic homolog ; TβR, TGFβ Receptor ; TGFβ; Transforming Growth Factor B. (Hinck 2012).

Tous les membres de la famille des TGFβs suivent le même processus de maturation. Ils sont sécrétés sous la forme d'un précurseur constitué d'une séquence peptide signal d'un prodomaine et d'un peptide C-terminal qui constitue la forme mature et active du TGFβ (Kingsley 1994) **(Figure 1)**. Ce précurseur est dimérisé de façon stable grâce à un pont disulfure au niveau de la partie C-terminale. Une fois le peptide signal de sécrétion éliminé, la furine, une protéase à sérine, clive le précurseur au niveau de la séquence RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg) et libère deux fragments : le peptide C-terminal mature et le prodomaine **(Figure 1)**. Le prodomaine ou LAP (Latency Associated Peptide) reste lié au peptide mature du TGFβ de façon non covalente et maintient le dimère actif sous forme de complexe latent, ce qui l'empêche de se fixer à son récepteur **(Figure 1)** (Piek *et al.* 1999; Thies *et al.* 2001). Le complexe latent du TGFβ est largement plus stable que le dimère actif et il est retrouvé de façon majoritaire dans la circulation sanguine. Deux types de complexe latent sont décrits dans la littérature : le LAP ou SLC (Small Latent Complex) précédemment décrit et le LLC (Large Latent Complex) qui interagit avec la matrice extracellulaire. Au niveau du Golgi, le LAP associé au TGFβ non clivé par la furine peut interagir avec des glycoprotéines de la famille des LTBPs (Latent TGFβ-Binding Protein) de façon non covalente pour former le LLC (Piek *et al.* 1999). Les LTBPs permettent le ciblage du complexe latent à la matrice extracellulaire (Piek *et al.* 1999). L'activation du dimère actif du TGF-

(cc) BY-NC-ND

β s'effectue grâce au clivage protéolytique induit par les membres de la famille des métalloprotéases BMP-1/Tolloid libérant ainsi la forme mature et active du TGFβ **(Figure 1)** (Wolfman *et al.* 2003).

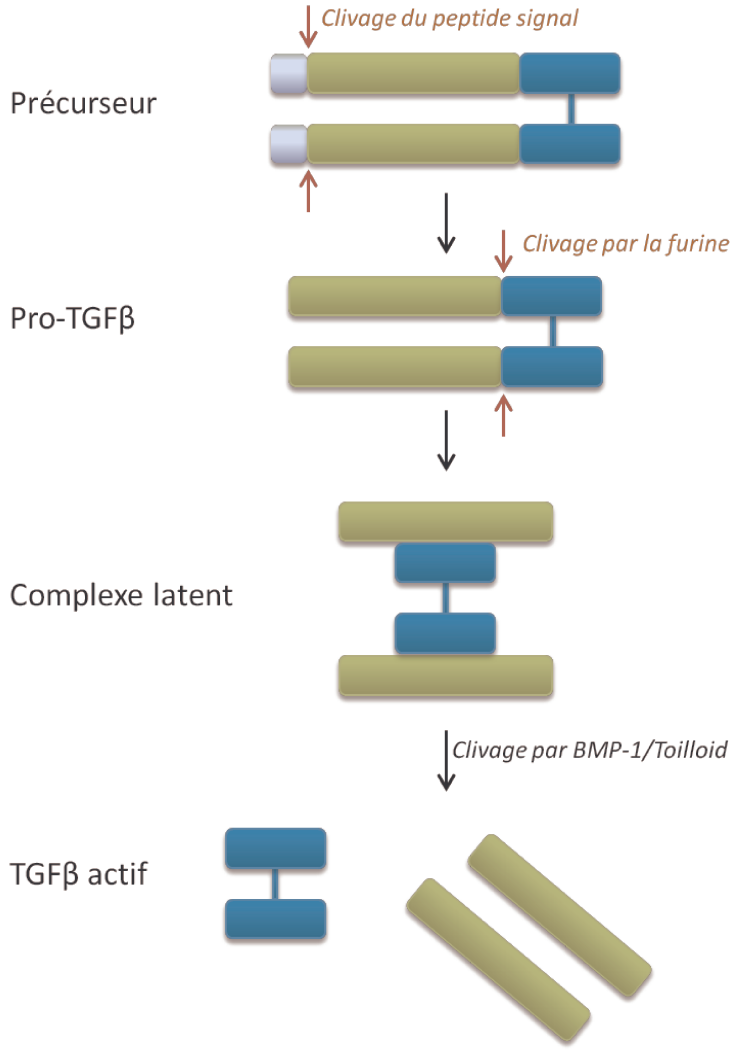

FIGURE 1. MATURATION DES TGFβs. Les membres de la superfamille des TGF-βs sont synthétisés sous la forme d'un précurseur qui va subir deux clivages protéolytiques successifs. Le premier entraîne la perte du peptide signal (gris) et donne le pro-TGFβ. Le second clivage sépare le prodomaine (vert) du dimère actif du TGFβ (bleu). Le prodomaine reste lié de façon non covalente au dimère actif formant ainsi le complexe latent. Un dernier clivage réalisé par les membres de la famille des BMP-1/Tolloid permet la libération de la forme active du TGFβ. BMP-1, *Bone Morphogenetic Protein-1 ; TGFβ, Transforming Growth Factor B.* (D'après Lee 2004)

1.3. Voies de signalisation des TGFβs

Une fois activés, les TGFβs se fixent à leurs récepteurs **(Tableau 1)**. Ils requièrent deux sortes de récepteurs à sérine/thréonine kinases : le type I et le type II. Il existe sept récepteurs de type I (de Alk (Activin-like kinase) 1 à 7) et 5 récepteurs de type II dans le génome humain (Schmierer & Hill 2007). Une fois le TGFβ fixé à son récepteur, il y a la formation d'un complexe hétérotétramérique au

(cc) BY-NC-ND

niveau duquel les récepteurs de type II vont phosphoryler et activer les récepteurs de type I **(Figure 2)**. Ce complexe une fois formé va permettre la phosphorylation des R-SMADS (Receptor-regulated SMAD) : les SMAD 1/5/8 pour les BMPs et les GDFs et les SMAD2/3 pour les TGF-βs. **(Tableau 1) (Figure 2)** (Massagué 1998; Hinck 2012).

Les SMAD1/5/8 et les SMAD2/3 se fixent ensuite au co-SMAD (common mediator-SMAD), SMAD4 pour permettre leur translocation au noyau et activer ou inhiber l'expression de leurs gènes cibles respectifs **(Figure 2)** (Heldin *et al.* 1997; Derynck & Zhang 2003). Ainsi, les membres de la superfamille des TGFβs agissent selon deux axes de signalisation : l'axe des SMAD1/5/8 et l'axe des SMAD2/3 dans lesquels SMAD4 jouent un rôle central (Sartori *et al.* 2013). Ces deux axes sont respectivement régulés négativement par les I-SMADs (Inhibitory-SMAD) SMAD6 et SMAD7 qui empêchent la phosphorylation des R-SMADs par les récepteurs des TGFβs **(Figure 2)** (Massagué 1998).

(cc) BY-NC-ND

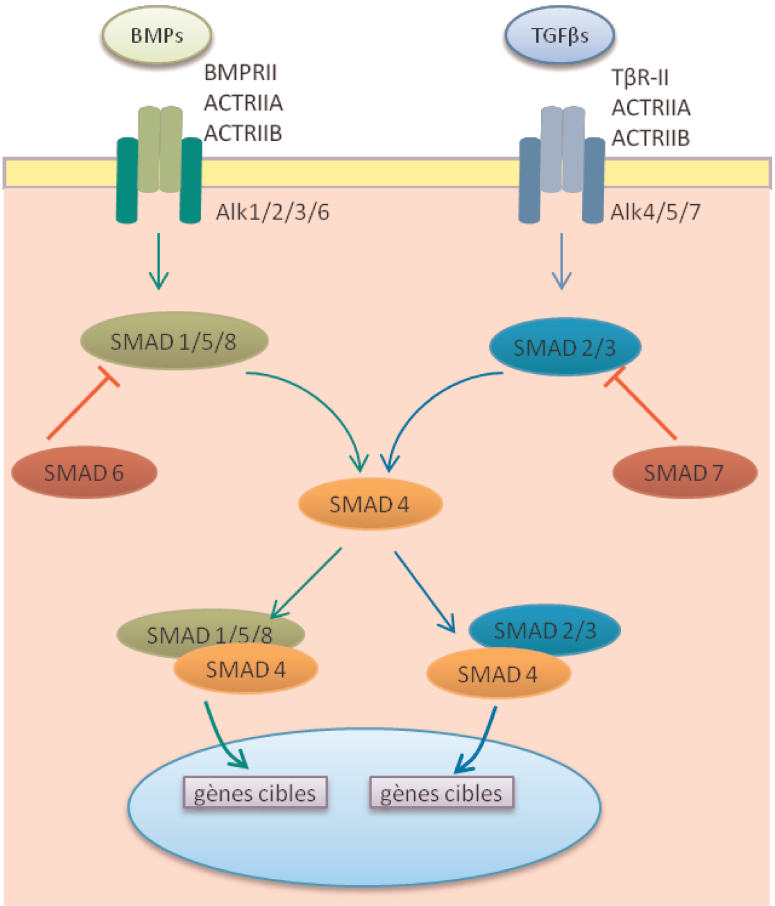

FIGURE 2. VOIES DE SIGNALISATION CANONIQUES DES TGFβs ET DES BMPs. Les membres de la superfamille des TGF-βs sont divisés en deux groupes selon la voie de signalisation qu'ils activent. La sous-famille des TGFβs se fixent aux récepteurs de type Alk4/5/7 et activent la voie des SMAD2/3. Le groupe des BMPs se fixent aux récepteurs de type Alk1/2/3/6 et activent la voie des SMAD1/5/8. Le co-smad, SMAD4 peut être recruté par les deux voies de signalisation, jouant un rôle central entre l'activation de la voie des BMPs et des TGF-βs. Une fois SMAD4 recruté, chaque voie de signalisation peut activer ou inhiber ses gènes cibles. *ACTR, Activin Receptor ; Alk, Activin-like kinases ; BMPR, Bone Morphologic Protein Receptor ; SMAD, Sma Mothers Against Decapentaplegic homolog ; TβR, TGF-β Receptor ; TGFβ, Transgenic Growth Factor β.* (D'après Hink 2012).

Les TGFβs peuvent également activer la voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) via Alk5 en phosphorylant la protéine SHC1 (SHC-transforming protein 1) désormais capable de recruter GRB (Growth factor Receptor-Bound protein) et SOS (Son of Sevenless Homolog) qui vont ensuite activer la protéine RAS et en aval les MAPKs comme les p38 MAPK et les JNKs (c-Jun N-terminal kinase) (Lee 2007a; Sorrentino *et al.* 2008; Yamashita *et al.* 2008).. De nombreux gènes sont activés ou réprimés par les TGFβs ce qui explique l'importance de ces protéines dans les processus de développement et d'homéostasie tissulaires.

(cc) BY-NC-ND

1.4. Role des TGFβs dans le developpement embryonnaire et l'homeostasie tissulaire

L'expression des TGFβs est modulée dans le temps et dans l'espace durant l'embryogénèse et permet ainsi la mise en place des axes A/P (Antéro-Postérieur) et D/V (Dorso-Ventral). Une dérégulation de leur expression peut entraîner des troubles du développement. Par exemple, la surexpression de l'homologue de nodal chez le xénope, *Xnr1* (Xenopus nodal-related 1), induit la mise en place d'un second axe D/V et entraine des défauts de l'axe droite/gauche qui se traduisant par un cœur renversé et un intestin en forme de boucle **(Figure 3A et 3D)** (Wu & Hill 2009). D'autre part, l'inhibition de la signalisation de nodal chez le poisson zèbre entraine une perte progressive de tissu endodermique et mésodermique, une cyclopie et la perte des types cellulaires présents en antéro-dorsal **(Figure 3C)**. Le gradient ventro-dorsal des BMPs permet la formation de tissus embryonnaires comme l'épiderme et le tube neural (Sauka-Spengler & Bronner-Fraser 2008). Des poissons zèbres mutés pour *Bmp2b* sont entièrement dorsalisés. Une surexpression de *Bmp4* améliore ce phénotype mais *Bmp4,* apporté en excès, ventralise progressivement l'embryon **(Figure 3B)** (Wu & Hill 2009).

Les TGFβs sont également impliqués dans les stades tardifs de l'embryogénèse et jouent un rôle dans la morphogenèse de la plupart des organes. Nous pouvons prendre l'exemple des BMP-2, 4, et 7, ainsi que GDF-5 et 6 qui sont impliqués dans le développement des membres (Settle *et al.* 2003; Bandyopadhyay *et al.* 2006). En effet, une surexpression des antagonistes de BMP, *Sog* et *Stg* dans une aile de drosophile inhibe la signalisation de BMP et entraîne de fait une diminution de la formation des ailes et une réduction de la formation des veines **(Figure 3E)**. Chez la souris, la perte de *Bmp2* et *Bmp4* affecte le développement des doigts postérieurs **(Figure 3F)** (Wu & Hill 2009).

(cc) BY-NC-ND

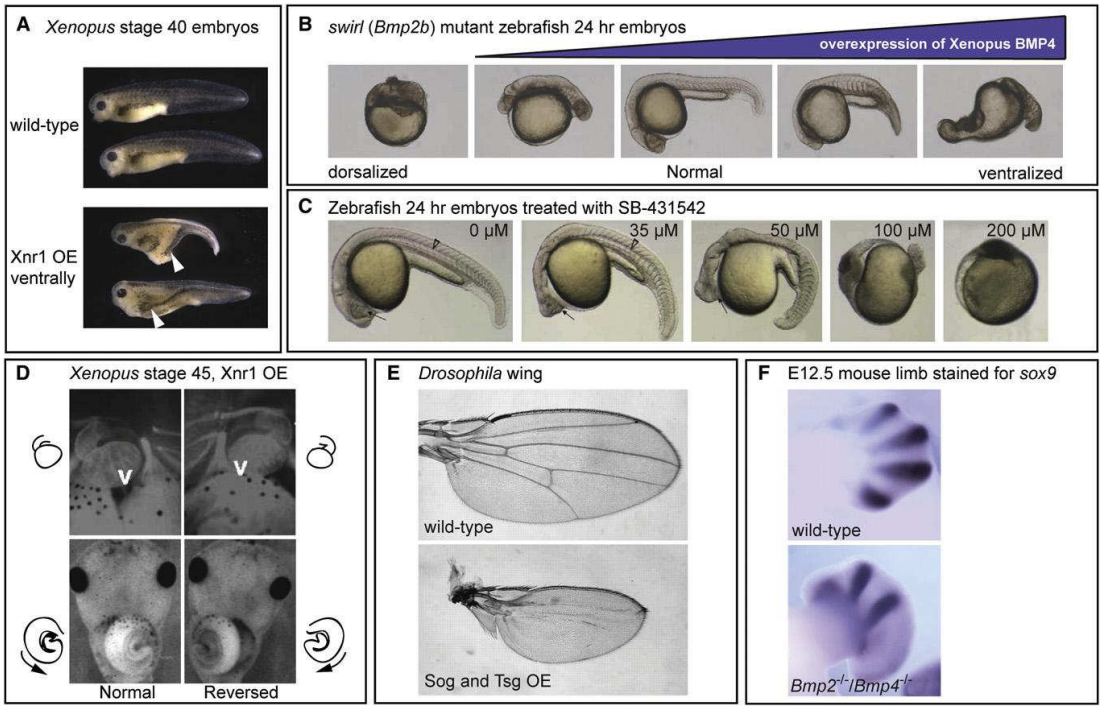

FIGURE 3. IMPORTANCE DU ROLE DES TGFβs AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE. (A) La surexpression du ligand de Nodal, *Xnr1* (OE), induit la formation d'un second axe indiqué par les flèches blanches. (B) Des poissons zèbres mutés pour *Bmp2b* sont complètement dorsalisés. *Bmp4* apporté en excès ventralise progressivement l'embryon. (C) L'inhibition de la signalisation de Nodal chez le poisson zèbre par Sb-431542, un inhibiteur spécifique des récepteurs de type I, entraine une perte progressive de tissu endodermique et mésodermique. La flèche et la tête de flèche indiquent les yeux et la notochorde, respectivement. (D) La surexpression de *Xnr1* dans les embryons de xénope entrainent des défauts de l'axe droite/gauche qui se traduit par un cœur renversé et un intestin en forme de boucle (v, ventricule). (E) La surexpression des antagonistes de BMP, Sog et Stg dans une aile de drosophile entraine une diminution de la formation des ailes et une réduction de la formation des veines. (F) La perte de *Bmp2* et *Bmp4* chez la souris affecte le développement des doigts postérieurs (observable par la coloration chondrogénique de Sox 9). *BMP, Bone Morphogenenic Protein ; Sox9, Sex determining region Y-box 9 ; Xnr1, Xenopus nodal-related 1.* (Wu & Hill 2009).

Les TGFβs continuent également à jouer un rôle dans un organisme entièrement développé et participent à l'homéostasie des différents tissus où ils sont exprimés. Des défauts dans la signalisation de ces protéines sont souvent associés à des pathologies ou certains cancers. Par exemple, une mutation du gène du récepteur *Alk1* est associée à la maladie de Rendu Osler (ten Dijke & Arthur 2007). Ces patients sont souvent atteints de saignements de nez et gastro-intestinaux ainsi que de malformations artério-veineuses (ten Dijke & Arthur 2007). Dans certains cas, les individus atteints de cette pathologie souffrent de polypose juvénile. Des mutations au niveau du gène *Smad4* ou du récepteur ALK3 sont également associées à cette pathologie (Gallione *et al.* 2004). Des défauts dans la signalisation des TGFβs peuvent entraîner des défauts de type fibrose qui

(cc) BY-NC-ND

conduisent à une cicatrisation excessive due à une augmentation de la MEC (Matrice Extracellulaire) (Wu & Hill 2009).

Les TGFβs présentent alors un intérêt comme cible thérapeutique. Cependant, selon le type de pathologies ou de cancers il convient de déterminer si les TGFβs doivent être utilisés comme immunosuppresseurs ou au contraire être bloqués à l'aide d'inhibiteurs spécifiques.

2. LA MYOSTATINE

2.1. GENERALITES

La myostatine également appelée GDF-8 est découverte en 1997 lors de la recherche de nouveaux membres des TGFβs (McPherron *et al.* 1997). C'est un des rares membres de cette famille dont l'invalidation n'est pas létale et qui est surtout un des plus puissants régulateurs négatifs du développement musculaire (McPherron *et al.* 1997). Dès lors, les travaux sur cette protéine se sont essentiellement centrés sur son effet sur le muscle squelettique. En effet son invalidation chez la souris entraîne une augmentation drastique de la masse musculaire (McPherron *et al.* 1997).

Ce gène composé de trois exons est retrouvé sur le chromosome 2 chez l'homme et sur le chromosome 1 chez la souris **(Figure 4)**. Son expression est détectée pour la première fois dans l'embryon murin au stade 9,5 dpc (days post-coïtum) dans les somites au niveau du myotome. Chez l'adulte, elle s'exprime essentiellement dans les muscles squelettiques, dans le cœur, mais également à faible dose dans le tissu adipeux, les glandes mammaires l'épiderme et les cellules neuronales du cortex olfactif (McPherron *et al.* 1997; Ji *et al.* 1998; Sharma *et al.* 1999; Iwasaki *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2012)

(cc) BY-NC-ND

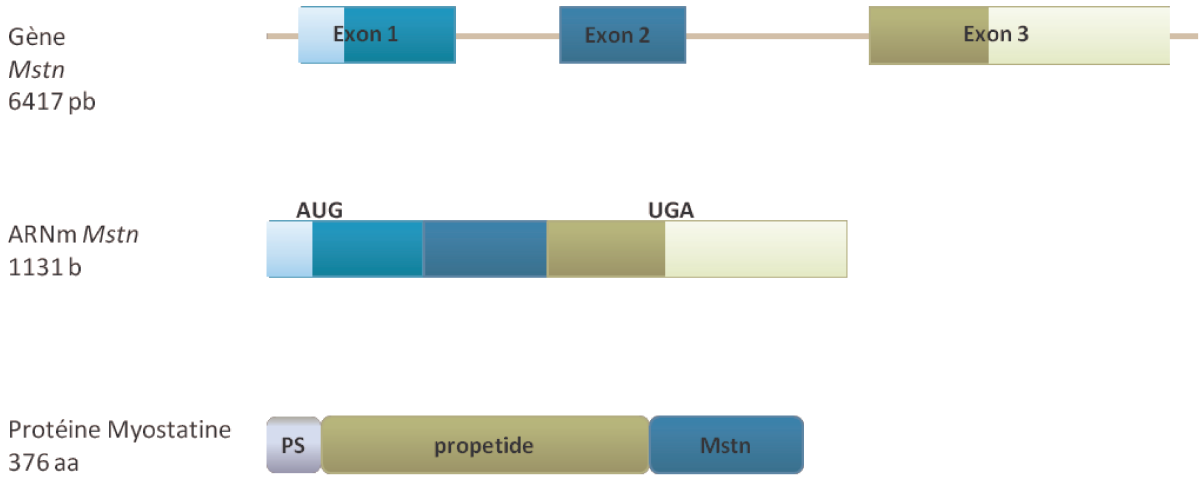

FIGURE 4. GENE, TRANSCRIT ET PROTEINE DE LA MYOSTATINE. Le gène de la myostatine est constitué de trois exons. Le transcrit *Mstn* code pour une protéine de 376 acides aminés chez la souris qui est composée d'un peptide signal, du propeptide et de la forme mature de la myostatine. Les parties représentés en bleu et vert clairs sur le gène et le transcrit de *Mstn* correspondent aux régions non codantes. *Mstn, myostatin ; PS, peptide signal.*

Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur, comme les autres membres des TGFβs avant d'être clivée pour donner la forme mature et active de la myostatine qui correspond à la partie C-terminale de la protéine **(Figure 4)** (Lee & McPherron 2001). La forme active de la myostatine est identique chez l'homme, la souris, le rat, le poulet, le chien, le porc et la dinde ce qui témoigne de son importance physiologique (Lee 2004, 2007b). Dans la circulation, elle est majoritairement retrouvée sous la forme du complexe latent et dans le muscle squelettique sous sa forme pro-myostatine liée à LTBP-3 (Anderson *et al.* 2008).

Une fois sous sa forme mature, elle active sa voie de signalisation canonique, la voie des SMADs **(Figure 5)**. Elle se lie à ActRIIA (Activin Receptor type IIA) et ActRIIB, les récepteurs à sérine/thréonine kinase de type II de l'activine, avec une meilleure affinité pour ActRIIB. Ces récepteurs sont également ciblés par d'autres TGFβs comme GDF-11 (McPherron *et al.* 1999; Thies *et al.* 2001; Rebbapragada *et al.* 2003). Les récepteurs de type I Alk4 et Alk5 sont ensuite recrutés et conduisent à l'activation des SMAD2/3 qui une fois phosphorylés par le récepteur vont se fixer à SMAD4. Ces complexes seront ensuite transloqués dans le noyau où ils pourront jouer leur rôle de facteurs de transcription (McPherron *et al.* 1999; Thies *et al.* 2001; Langley *et al.* 2002; Rebbapragada *et al.* 2003). C'est ainsi que la myostatine inhibe par exemple la prolifération des cellules myoblastiques en régulant l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Thomas *et al.* 2000).

(cc) BY-NC-ND

La myostatine peut toutefois agir sur d'autres voies de signalisation. En effet, elle est capable d'activer la voie de MAPs kinases **(Figure 5)** telles que ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2) ou JNK ce qui induit à l'inhibition de la prolifération et de la différenciation des cellules musculaires (Yang 2006; Huang *et al.* 2007). Par ailleurs, l'activation de la voie ERK1/2 est impliquée dans le renouvellement des cellules satellites (McFarlane *et al.* 2008). La myostatine inhibe également la voie PI3K (Phospholnositide 3-kinase)/AKT (Protein kinase B), ce qui favorise l'activation de la voie FoxO (Forkhead protein O), cette dernière étant responsable de l'activation de l'expression des atrogènes *MuRF1* (Muscle RING-Finger protein 1) et *MAFbx* (Muscle Atrophy F-box) impliqués dans la dégradation protéique (Morissette *et al.* 2009a; Trendelenburg *et al.* 2009; Goodman *et al.* 2013) **(Figure 5)**.

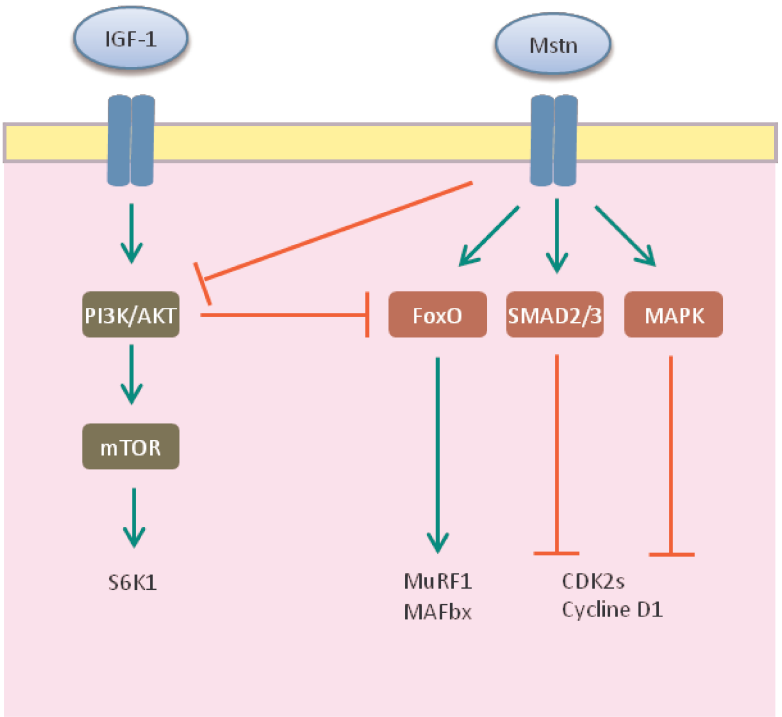

FIGURE 5. VOIES DE SIGNALISATION DE LA MYOSTATINE. La myostatine active plusieurs voies de signalisation. Elle active sa voie canonique SMAD2/3 capable d'inhiber l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire comme Cdk2 et la cycline D1. La myostatine active également la voie des MAPs kinases et inhibe la voie AKT activé par IGF-1. Cette voie régule négativement la voie FoxO qui en activant MuRF1 et MAFbx participe au processus de dégradation protéique. *AKT, Protein kinase B ; Cdk2, Cyclin dependent kinase 2 ; FoxO, Forkhead box protein O ; IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1 ; MAFbx, Muscle Atrophy F-box ; MAPK, Mitogen-activated protein kinase ; Mstn, Myostatine ; mTOR, mammalian Target Of Rapamycin ; MuRF1, Muscle RING-Finger protein 1 ; S6K1, ribosomal protein S6 kinase 1 ; SMAD2/3, Sma mothers against decapentaplegic homolog 2/3.* (D'après Braun & Gautel 2011).

(cc) BY-NC-ND

2.2. Regulations transcriptionnelles et extracellulaires de la myostatine

La régulation de la *myostatine* est complexe. Sa région régulatrice est très conservée chez les mammifères et possède un grand nombre de motifs de liaison à des facteurs de transcription (Ma *et al.* 2001, 2003). Elle comprend des sites de liaisons aux SMADs démontrant que la myostatine est capable de s'autoréguler (Allen & Unterman 2006). En effet, une augmentation de l'expression de SMAD2 et SMAD4 est accompagnée d'une activation du promoteur de la *myostatine* (Allen & Unterman 2006). De plus, les SMADs en inhibant la voie AKT permettent l'activation de FoxO1. Or, il a été montré qu'une augmentation de FoxO1 dans des cellules musculaires entraîne l'activation du promoteur de la *myostatine*. Ceci témoigne d'un rétrocontrôle positif de ce gène (Allen & Unterman 2006). Dans le même temps, les souris *Smad3*$^{-/-}$ présentent une augmentation de l'expression de la *myostatine* ce qui suggère un rétrocontrôle négatif de l'expression de la *myostatine* par cette voie canonique (Ge *et al.* 2012). En effet, SMAD7 une fois activé par SMAD2/3, va inhiber l'activation du promoteur de la *myostatine* (Allen & Unterman 2006). La région régulatrice de la *myostatine* comprend également 10 Ebox. Le facteur myogénique MyoD (Myoblast Determination 1) active la transcription de la *myostatine* au niveau de l'Ebox 6 et également au niveau de l'Ebox 5 permettant ainsi une activation spécifique de la *myostatine* au niveau des fibres musculaires (Spiller *et al.* 2002; Salerno *et al.* 2004). Des sites de liaison à MEF2 (Myocyte Enhancer Factor-2), NFκB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) sont également retrouvés sur cette région régulatrice. Récemment, il a été mis en évidence que l'expression de la *myostatine* était également dépendante du régime alimentaire. En effet, son expression est en partie régulée par des miRNA, comme miR-208a, miR-208b et miR-499 (Callis *et al.* 2009; Bell *et al.* 2010; Allen & Loh 2011) qui sont surexprimés lorsque l'organisme absorbe des acides aminés essentiels (Drummond *et al.* 2009a). De la même façon, certaines hormones vont se fixer sur les éléments ARE (Androgen Response Element), GRE (Glucocorticoïd Response Element), TRE (Thyroïd Response Element) pour activer le promoteur de la *myostatine* (Ma *et al.* 2001; Carneiro *et al.* 2008; Trendelenburg *et al.* 2009).

La myostatine est également régulée de façon post-traductionnelle. En plus du propeptide, d'autres protéines sont capables de se lier et de réguler la myostatine **(Tableau 2)**. La follistatine ou Fst a été initialement découverte pour sa capacité à bloquer la sécrétion de l'hormone FSH (Hormone Folliculaire Stimulante) des cellules pituitaires en inhibant l'activine (Ueno *et al.* 1987; Nakamura *et al.* 1990). D'autres études ont révélé qu'elle était également capable de réguler négativement d'autres membres de la superfamille des TGFβs comme la myostatine ou encore GDF-11 **(Tableau 2)** (Lee & McPherron 2001; Zimmers 2002). Un test d'interaction myostatine/follistatine démontre que

(cc) BY-NC-ND

deux molécules de follistatine entourent le dimère actif de la myostatine et bloquent tous les sites putatifs d'interaction entre le TGFβ et son récepteur (Cash *et al.* 2009). Cet inhibiteur est composé de 3 domaines FS (Follistatine) qui correspondent à une répétition de 10 cystéines (Schneyer *et al.* 1994; Sidis *et al.* 2001). Les protéines à domaine FS sont classées en deux sous-familles selon leur similarité de séquence et leur capacité à lier l'activine (Schneyer *et al.* 2001). La première sous-famille contient les protéines capables d'inhiber l'activine et la seconde les protéines dont l'association avec l'activine n'a pas été démontrée. Comme la follistatine, FSTL3 (Follistatin-Like 3) également appelé FLRG (Follistatin-Related Gene) font partie de la première catégorie et contient deux domaines FS, capables d'inhiber à la fois l'activine et la myostatine. FSTL3 fut une des premières protéines à être retrouvée associée à la myostatine dans les sérums humains et murins **(Tableau 2)** (Hill 2002; Lee 2007a). Dans la deuxième sous-famille, les protéines GASP-1 et GASP-2 (GDF-Associated Serum Protein) contiennent chacune un domaine follistatine et sont connues pour être des antagonistes de la myostatine et de GDF-11 mais elles n'inhibent pas l'activine **(Tableau 2)** (Hill *et al.* 2003; Kondas *et al.* 2008; Szláma *et al.* 2010). En plus des protéines à domaines FS, des protéines de la matrice extracellulaire, la décorine et la laminine sont également capables d'inhiber la forme mature de la myostatine et sa fixation sur son récepteur **(Tableau 2)** (Miura *et al.* 2006; Yasaka *et al.* 2013). Enfin au niveau cellulaire, hSGT (human Small Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat containing-protein) empêche la sécrétion et la maturation de la myostatine et la téléthonine inhibe sa sécrétion et la formation du complexe latent **(Tableau 2)** (Nicholas *et al.* 2002; Wang *et al.* 2003).

(cc) BY-NC-ND

TABLEAU 2. LES INHIBITEURS DE LA MYOSTATINE.

Localisation	Inhibiteur	Effet de l'inhibition	Références
Sérique	Propeptide	Inhibe la forme mature de Mstn et empêche sa fixation sur son récepteur	(Thies *et al.* 2001)
	Follistatine	Inhibe la forme mature de Mstn et empêche sa fixation sur son récepteur	(Lee & McPherron 2001)
	FSTL3	Inhibe la forme mature de Mstn et empêche sa fixation sur son récepteur	(Hill 2002)
	GASP-1	Inhibition de la maturation de Mstn et empêche sa fixation à son récepteur	(Hill *et al.* 2003; Kondas *et al.* 2008)
	GASP-2	Inhibition de la maturation de la myostatine et empêche sa fixation à son récepteur	(Kondas *et al.* 2008)
Cellulaire	hSGT	Inhibition de la sécrétion et de la maturation de Mstn	(Wang *et al.* 2003)
	Téléthonine	Inhibition de la sécrétion et de la formation du complexe latent	(Nicholas *et al.* 2002)
MEC	Décorine	Inhibe la forme mature de Mstn et empêche sa fixation sur son récepteur	(Miura *et al.* 2006)
	LTPB-3	Inhibition du clivage de la promyostatine sur la furine	(Anderson *et al.* 2008)
	Laminine	Inhibe la forme mature de Mstn et empêche sa fixation sur son récepteur	(Yasaka *et al.* 2013)

FSTL3, Follistatin-like 3 ; GASP, Growth and Differentiation Factor-Associated Serum Protein ; hSGT, human Small, Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat containing-protein ; LTBP-3, latent TGFβ Binding Protein ; MEC, Matrice Extracellulaire ; Mstn, Myostatine

Depuis sa découverte en 1997, de nombreuses études ont démontré le rôle essentiel que la myostatine joue durant le développement musculaire. Elle présente un intérêt à la fois agronomique pour la sélection des animaux de rente vis-à-vis de la qualité et la quantité de viande, mais également thérapeutique pour mettre en place des traitements efficaces contre des pathologies musculaires.

2.3. La myostatine dans un contexte musculaire

Les souris déficientes en *myostatine* possèdent une masse corporelle deux fois plus importante que les souris sauvages suite à l'augmentation de leur masse musculaire **(Figure 6A)**.

(cc) BY-NC-ND

Cette augmentation s'explique par une hyperplasie et par une hypertrophie des fibres musculaires (McPherron *et al.* 1997; Mendias 2006; Amthor *et al.* 2007; Elashry *et al.* 2009). Les études ont démontré que la plupart des animaux de rente présentant un phénotype hypermusclé portaient une mutation au niveau du gène de la *myostatine*. La race bovine Bleu Blanc Belge en est un des exemple les plus connu qui présente une augmentation de plus de 25% de sa masse musculaire **(Figure 6B)** (Grobet *et al.* 1997; Kambadur *et al.* 1997; McPherron & Lee 1997; Chelh *et al.* 2011).

Une mutation au niveau de la région 3'UTR de la *myostatine* crée un site illégitime pour les miRNAs (microRNAs) miR-1 and miR206 causant le phénotype hypermusclé chez le mouton Texel **(Figure 6C)** (Clop *et al.* 2006). La *myostatine* est également mutée chez le lévrier Whippet **(Figure 6D)** et chez l'homme, où un seul cas a été répertorié. Dans ces deux cas, la mutation conduit également au phénotype hypermusclé (Schuelke *et al.* 2004; Shelton & Engvall 2007). Toutes ces données de la littérature suggèrent que la myostatine a une place importante dans la formation du muscle squelettique.

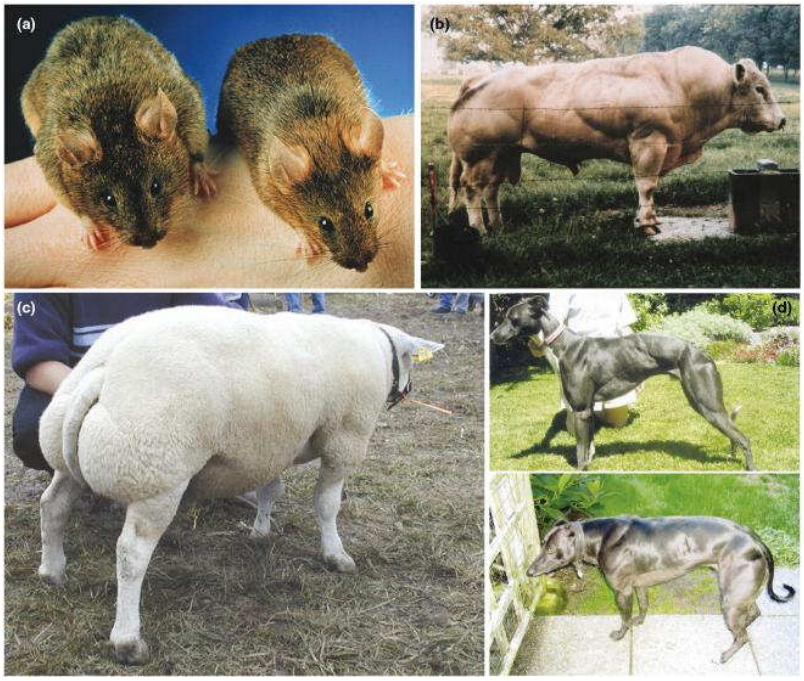

FIGURE 6. ANIMAUX PRESENTANT UN PHENOTYPE HYPERMUSCLE SUITE A L'INACTIVATION DU GENE DE LA MYOSTATINE. (A) Souris *Mstn*$^{-/-}$ à gauche et souris sauvage à droite. (B) Taureau Bleu Blanc Belge. (C) Mouton Texel. (D) Lévrier whippet hétérozygote pour une mutation de la *myostatine* (en haut) et un lévrier homozygote pour cette mutation (en bas). *Mstn, Myostatine.* (Lee 2007b).

(cc) BY-NC-ND

2.3.1. Structure du muscle squelettique

Le tissu musculaire squelettique est un système complexe. Il est formé d'un nombre important de faisceaux musculaires encerclés par une épaisse gaine de collagène appelée épimysium. Chaque faisceau musculaire, enveloppé dans du perimisium, est composé de 20 à 80 fibres. Ces myofibres sont les plus petites unités contractiles du muscle et ont la forme d'un cylindre d'une dizaine de millimètres de long et d'une cinquantaine de micromètres de diamètre. Ce sont des cellules allongées et polynucléées issues de la fusion de plusieurs centaines de cellules précurseurs, les myoblastes. Les myofibres sont entourées d'une fine couche de tissu appelée endomysium. Elles sont constituées des myofibrilles qui possèdent une apparence striée due à l'alternance de bandes I claires, A sombres et de lignes Z très foncées séparant en deux les bandes I. L'unité structurale de la myofibrille est appelée sarcomère, elle est comprise entre deux bandes Z **(Figure 7)** (Sanger *et al.* 2010). Les sarcomères sont composés de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine. Ces deux types de filaments sont capables de glisser les uns sur les autres permettant ainsi de changer la conformation du sarcomère : relâchée ou contractée.

(cc) BY-NC-ND

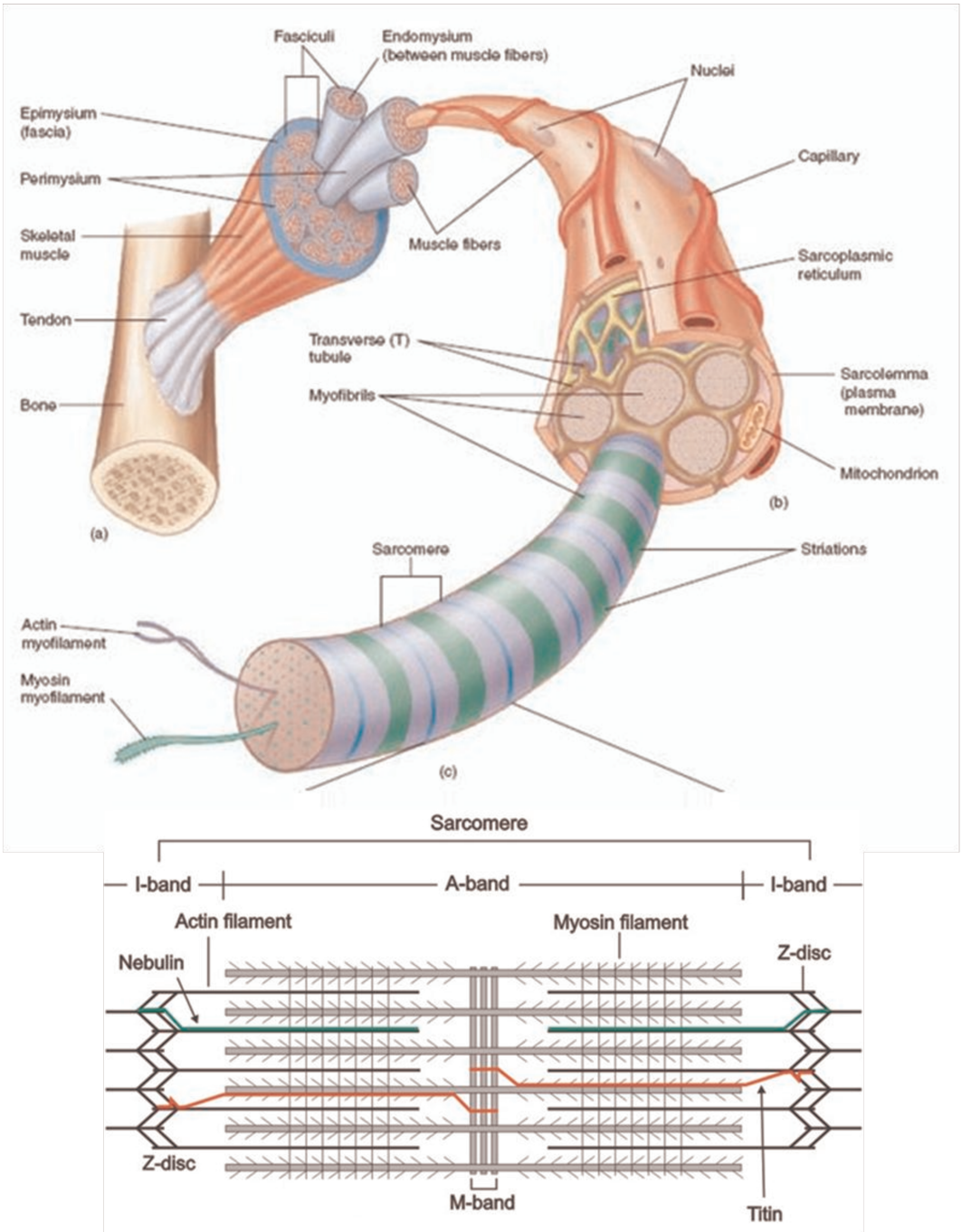

FIGURE 7. ANATOMIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE. (A) Le muscle squelettique contient un grand nombre de myofibres organisées en faisceaux musculaires et encerclées par une épaisse gaine de collagène appelée l'épimysium . Ce sont des cellules allongées et multinucléées entourées d'une fine couche de tissu appelé endomysium. (B) Ces myofibrilles contiennent un ensemble de filaments fins et épais qui constituent le sarcomère. (C) Représentation schématique d'un sarcomère. Le sarcomère comprend des filaments d'actine, de myosine et une protéine filamenteuse, la titine. Les filaments d'actine sont ancrés au niveau de la ligne Z. Les filaments de myosine sont situés au centre du sarcomère La ligne M est une bande sombre correspondant aux régions centrales des filaments épais de myosine.

(cc) BY-NC-ND

Les filaments épais de myosine sont capables d'interagir avec les filaments d'actine. Ces derniers sont ancrés au disque Z et s'étendent jusqu'au centre du sarcomère **(Figure 7)**. Ils sont composés de monomères d'actine qui polymérisent pour former des chaînes linéaires d'actine F s'enroulant par paires en double hélice. Les filaments sont également composés de deux protéines modulatrices, la tropomyosine et la troponine. La tropomyosine forme des filaments au niveau du sillon de l'actine, elle masque les domaines de fixation à la myosine **(Figure 7)**. La troponine est composée de trois sous-unités : une qui se lie à l'actine, une autre à la tropomyosine et une dernière qui fixe le calcium nécessaire pour la contraction musculaire. Il existe au sein des myofibrilles de nombreuses autres protéines nécessaires au maintien de la structure fibrillaire et de la fonction contractile. La titine qui assure l'élasticité du muscle ou encore la nébuline qui stabilise les filaments d'actine. Le tissu musculaire est également parcouru par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses **(Figure 7)** (Sanger *et al.* 2010).

2.3.2. Les differents types de fibres musculaires

Les fibres musculaires des mammifères sont classées en quatre groupes, les types I, IIa, IIx et IIb, d'après les isoformes de MyHC (Myosin Heavy Chain) qui les composent et leur capacités glycolytiques et oxydatives **(Tableau 3)**.

TABLEAU 3. LES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES MUSCULAIRES.

	Types de fibres			
Caractéristiques	**Type I**	**Type IIa**	**Type IIx**	**Type IIb**
Myosine majoritaire	*Myh7*	*Myh2*	*Myh1*	*Myh4*
Isoforme de Myosine (MyHC)	MyHC I	MyHC IIa	MyHC IIx	MyHC IIb
Métabolisme	Oxydatif	Oxydatif/Glycolytique	Glycolytique	Glycolytique
Vitesse de contraction	Lente	Intermédiaire	Rapide	Rapide
Fatigabilité	Résistante	Intermédiaire	Rapide	Rapide

Les fibres du muscle squelettique sont classées selon leurs structures, leurs métabolismes et selon leurs fonctions. *Myh, Myosine ; MyHC, Myosin Heavy Chain.*

Les fibres de type I sont composées majoritairement de myosines Myh7, également retrouvée au niveau du muscle cardiaque. Ces fibres utilisent la phosphorylation oxydative comme source d'énergie et possèdent beaucoup de mitochondries **(Figure 8)** (Schiaffino & Reggiani 2011; Blaauw et al. 2013). Elles ont une résistance élevée à la fatigue avec des contractions lentes et continues. Ces fibres composent par exemple les muscles de la posture. Les fibres de type IIa expriment de façon majoritaire Myh2 et utilisent à la fois un métabolisme oxydatif comme les fibres

(cc) BY-NC-ND

de type I et glycolytique dans une moindre mesure **(Figure 8)**. Elles possèdent une vitesse de contraction et une fatigabilité intermédiaire. A l'opposé, on retrouve les fibres de type IIx et IIb dans les muscles nécessitant force et rapidité comme les muscles des bras. Ces fibres utilisent un métabolisme glycolytique pour générer de l'ATP **(Figure 8)**. Comparées aux fibres de type I, elles ont beaucoup moins de mitochondries et un diamètre plus important. Les fibres de type IIx expriment *Myh1* alors que les fibres IIb expriment *Myh4* (Schiaffino & Reggiani 2011).

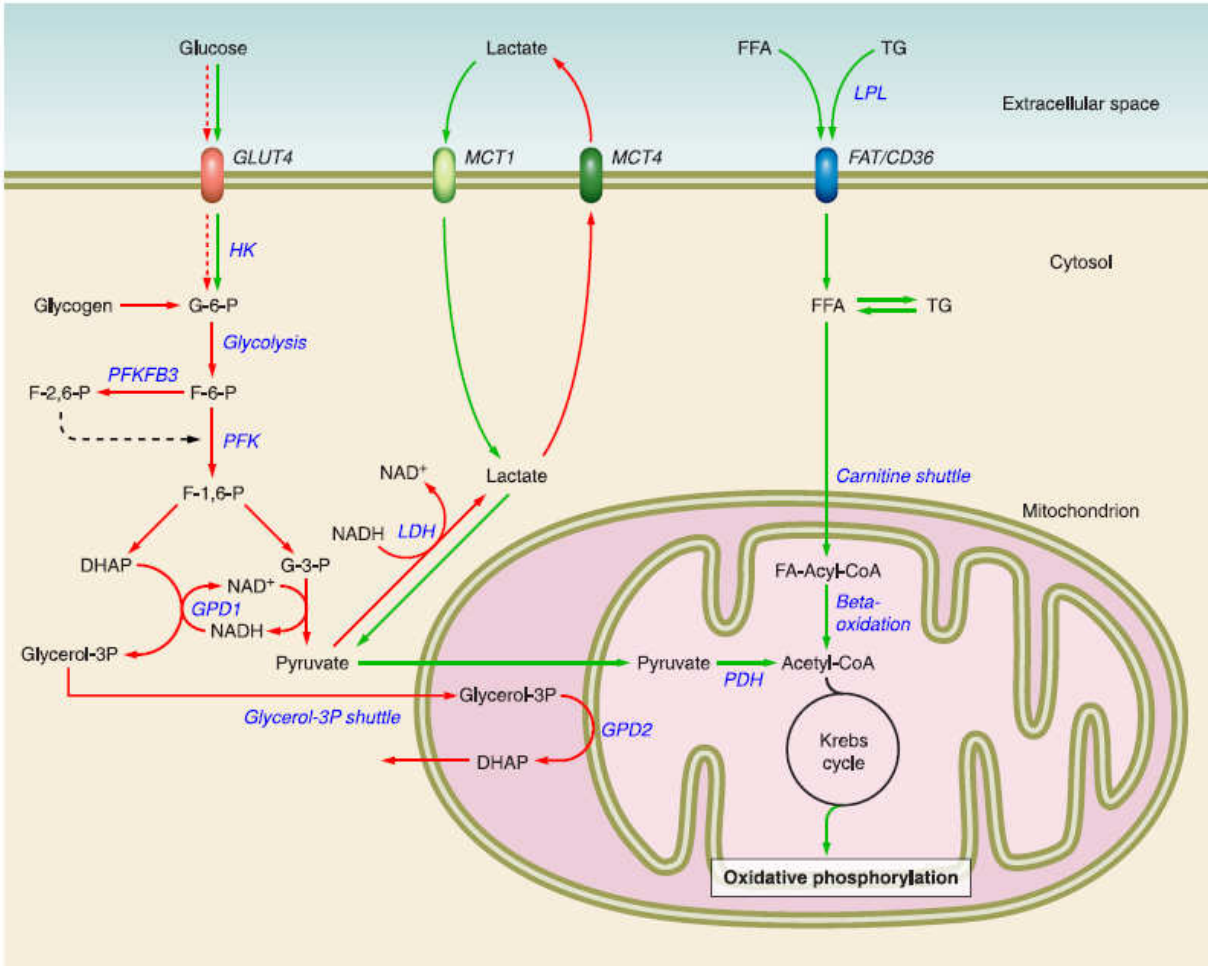

FIGURE 8. SCHEMA DES DIFFERENTES VOIES METABOLIQUES EMPRUNTEES PAR LES FIBRES LENTES ET LES FIBRES RAPIDES. Les voies majoritairement employées sont représentées en rouge pour les fibres rapides et en vert pour les fibres lentes. *Dhap, dihydroxyacetone phosphate ; Fat/Cd36, Fatty acid translocase ; FFA, Free Fatty Acids ; F-1,6-P, Fructose-1,6-bisphosphate ; F-6-P, fructose-6-phosphate ; F-2,6-p, Fructose-2,6-bisphosphate ; GLUT-4, Glucose Transporter type 4 ; G-3-P, Glyceraldehyde-3-Phosphate ; G-6-P, Glucose-6-phosphate ; Gpd1, Glycerolphosphate dehydrogenase 1 ; Gpd2, Glycerolphosphate dehydrogenase 2 ; Hk, Hexokinase ; Ldh, Lactate dehydrogenase ; MCT1, Monocarboxilic acid transporter 1 ; MCT4, Monocarboxilic acid transporter 4 ; PDH, Pyruvate Dehydrogenase ; PFK, Phosphofructokinase ; PFK3B3, Phosphofructokinase fructose Bisphosphatase 3 ; TG, triglycerides.* (Schiaffino & Reggiani 2011).

(cc) BY-NC-ND

L'identité de ces fibres musculaires est déterminée dès le stade embryonnaire par des processus myogéniques intrinsèques puis modulée au stade adulte par des facteurs hormonaux et neuronaux et par l'activité physique. La proportion relative des types de fibres qui composent le muscle varie donc entre les espèces et également au sein d'un même individu.

Selon l'intensité de l'effort physique le typage de fibres peut changer (Pette & Staron 2000). En effet, le système oxydatif est utilisé pour des efforts de longue durée d'intensité faible ou modérée. Au contraire, le système anaérobique est utilisé pour des efforts courts d'intensité haute ou modérée.

La conversion des fibres suit généralement un ordre séquentiel :

I ↔ I/IIa ↔ IIa ↔ IIa/IIx ↔ IIx/IIb ↔ IIb

2.3.3. Developpement embryonnaire des muscles

La myogenèse s'effectue en plusieurs étapes (Biressi *et al.* 2007). Elle commence durant la somitogenèse et se poursuit après la naissance (Bryson-Richardson & Currie 2008).

La mise en place du système musculaire débute chez la souris au stade embryonnaire entre le neuvième et le douzième jour après fécondation. Le muscle squelettique est principalement dérivé des somites, structures d'origine mésodermique, situés de part et d'autre du tube neural et de la notochorde. Ces derniers se différencient au cours de l'embryogénèse pour former les premières ébauches du squelette axial et des différents muscles (Buckingham *et al.* 2003). A ce stade, il y a apparition de cellules précurseurs du muscle **(Figure 9)**.

(cc) BY-NC-ND

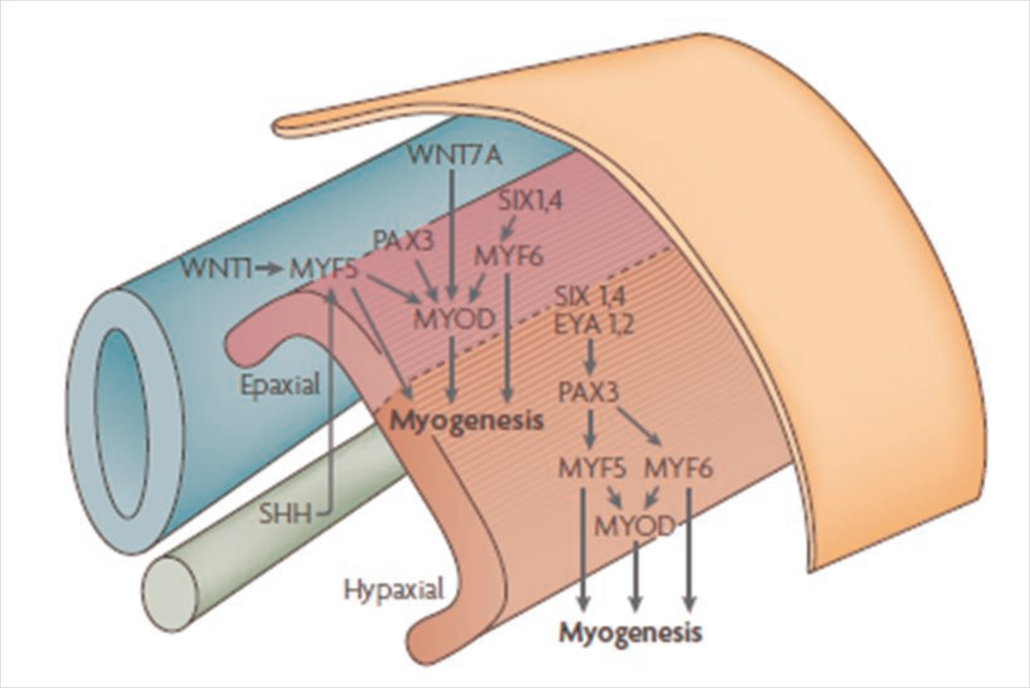

FIGURE 9. INDUCTION DES PROCESSUS MYOGENIQUES. Au niveau du muscle épaxial (représenté en rose), les gènes *Pax3*, *Myf5*, *Myf6* induisent l'expression de *MyoD*. Au niveau du dermomyotome hypaxial (représenté en rouge), *Pax3* induit l'expression de *Myf5* qui a son tour active l'expression de *MyoD*. SHH, sécrété par la notochorde (en vert clair), régule également la myogenèse en maintenant l'expression de *Myf5*. WNT1 sécrété par le tube neural (structure représentée en vert foncé) favorise l'expression de Myf5. Les protéines SIX1 et SIX4 régulent *Myf6* dans le dermomyotome épaxial et agissent avec EYA1 et EYA2 pour activer Pax3 dans le dermomyotome hypaxial. *EYA, Eyes Absent homolog protein ; Myf, Myogenic factor ; MyoD, Myoblast determination 1 ; Pax3, Paired box gene 3 ; SHH, Sonic Hedgehog ; SIX, Sin oculis-related homeobox ;.WNT, Wingless-type MMTV integration site family member.* (Bryson-Richardson & Curie, 2008).

Au cours de cette étape, les cellules précurseurs commencent à exprimer des facteurs, PAX3 et PAX7 (Paired box protein) et les MRFs (Muscle Regulatory Factors) : MyoD, Myf5 (Myogenic factor 5), myogénine et MRF4 (ou Myf6). Ce sont les acteurs principaux de la myogenèse (Rudnicki *et al.* 1993; Buckingham *et al.* 2003; Buckingham & Relaix 2015). Les MRFs contiennent tous un domaine de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix) qui leur permettent de former un hétérodimère avec d'autres protéines comme MEF2. Ce complexe peut alors agir sur les domaines Ebox présents sur les promoteurs de gènes participant au développement musculaire comme les chaînes lourdes de myosine ou la MCK (Créatinine Kinase Musculaire). Sous l'influence de MyoD et de Myf5, les cellules précurseurs du muscle, les myoblastes prolifèrent de manière accrue **(Figure 10)**. Par la suite, ces cellules arrêtent de se diviser. Elles expriment alors la myogénine et MRF4, fusionnent et se différencient pour former des structures multinuclées, les myotubes, à l'origine des myofibrilles qui composent les fibres musculaires **(Figure 10)** (Braun *et al.* 1989; Montarras *et al.* 1991; Rudnicki *et al.* 1993).

(cc) BY-NC-ND

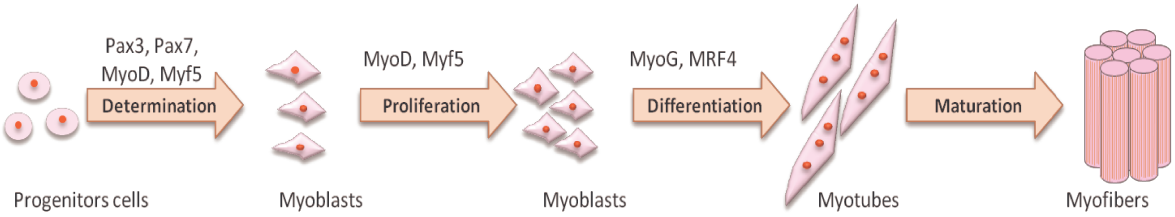

FIGURE 10. DIFFERENTES PHASES DE LA MYOGENESE. Les cellules progéniteurs du muscle sous l'action de *Pax3*, *Pax7*, *MyoD* et *Myf5* vont se déterminer pour donner les myoblastes. Ces myoblastes vont ensuite proliférer de manière accrue puis se différencier et fusionner pour former les myotubes sous l'action d'autres facteurs myogéniques *MyoG* et *Mrf4*. Ces myotubes sont à la base des fibres musculaires qui forment le muscle squelettique après maturation. *Mrf4, Muscle regulatory factor 4 ; Myf5, Myogenic factor 5 ; MyoD, Myoblast determination 1 ; MyoG, Myogénine ; Pax, Paired box gene.*

La myostatine intervient sur ces premières étapes de la myogenèse. En effet, elle active durant les processus de prolifération l'expression de p21, un inhibiteur des CDKs, et inhibe celle de CDK2 (Thomas *et al.* 2000; Ríos *et al.* 2001; Taylor *et al.* 2001; Joulia *et al.* 2003). La myostatine régule aussi négativement la différentiation myoblastique en diminuant l'expression de p21 et empêchant ainsi la sortie du cycle cellulaire nécessaire à la formation des myotubes (Langley *et al.* 2002). Enfin, elle est capable d'inhiber l'expression des MRFs comme MyoD, Myf5 et la myogénine (Ríos *et al.* 2001; Langley *et al.* 2002; Joulia *et al.* 2003).

Au stade embryonnaire tardif et au niveau des muscles fœtaux a lieu une seconde vague de prolifération de cellules précurseurs. Ces cellules participent à l'enrichissement en fibres musculaires et constituent la seconde phase myogénique.

Les différents types de fibres musculaires sont déterminés au cours de ces deux étapes. En effet, la première vague de myoblastes (dits myoblastes primaires) vont former les fibres primaires. Ces fibres correspondent aux fibres de type I. Elles expriment fortement la *myogénine* et *Mef2* qui activent l'expression de myosines à contraction lente, *Myh7* et *Myh2* (Wu *et al.* 2000). En effet, MEF2 va se lier à la région promotrice du gène *Pgc-1α* (PPAR gamma coactivator-1α), activant son expression. PGC-1α est un co-activateur qui interagit avec des facteurs de transcriptions, comme les PPARs, impliqués dans un grand nombre de processus biologiques comme le développement du muscle cardiaque, le métabolisme des glucides et des lipides et la biogénèse mitochondriale (Liang & Ward 2006). PGC-1α une fois activé se lie à MEF2 pour activer la transcription des gènes impliqués dans la détermination des types de fibres à contraction lente et le métabolisme oxydatif mitochondrial (Liang & Ward 2006). MEF2 contrôlerait également la formation des fibres de type I en agissant sur la voie calcineurine/NFAT (Nuclear Factor of Activated T) (McCullagh *et al.* 2004). Les fibres primaires ne sont qu'une minorité du nombre définitif de la fibre musculaire, mais jouent un

(cc) BY-NC-ND

rôle essentiel dans la production des fibres secondaires formées plus tard lors de la seconde vague de prolifération myoblastique. Ces dernières correspondent aux fibres de type II dites rapides (Stockdale 1997). Elles présentent une forte accumulation de MyoD, permettant l'expression des myosines à contraction rapide (Hughes *et al.* 1993).

La myostatine participe au déterminisme du type de fibres. En effet, les souris *Mstn*$^{-/-}$ et certains animaux de rente mutés pour ce gène présentent une diminution des fibres oxydatives et une augmentation du nombre de fibres glycolytiques (McPherron *et al.* 1997). L'inactivation de la *myostatine* entraîne la perte de contrôle du cycle cellulaire pouvant conduire à une prolifération accrue des myoblastes secondaires et à l'augmentation du nombre de fibres rapides (Thomas *et al.* 2000). En outre, en utilisant des anticorps anti-MyHC, il a été montré que les fœtus issus de la race bovine Blanc Bleu Belge qui exprime l'allèle muté de la *myostatine*, présentent une augmentation de la prolifération des myoblastes secondaires conduisant à une augmentation de l'accumulation de fibres de type II (Deveaux *et al.* 2001). La myostatine définirait également le type de fibre musculaire durant la croissance post-natale. L'inhibition de la *myostatine* dans les souris *Mstn*$^{-/-}$ entraîne une diminution de l'expression de *Mef2* et une surexpression de *MyoD*, ce qui conduit à l'augmentation de MyHC IIb et des fibres glycolytiques (Hennebry *et al.* 2009).

2.3.4. La croissance musculaire post-natale

Les dernières étapes de la myogenèse ont lieu après la naissance et reposent sur l'action des cellules satellites et des acteurs impliqués dans la balance entre synthèse et dégradation protéique.

Le muscle squelettique est composé de cellules souches nommées cellules satellites à cause de leur localisation adjacente à la myofibre sous la lame basale (Mauro 1961). Ces cellules expriment des marqueurs spécifiques comme Pax7, Pax3, Myf5, MyoD qui permettent de les détecter par des techniques d'immunomarquage (Cornelison & Wold 1997). Après la naissance et durant les trois premières semaines de vie, les cellules satellites participent à la croissance musculaire en fusionnant avec les fibres, favorisant ainsi le processus d'hypertrophie (White *et al.* 2010). Les cellules qui ne fusionnent pas avec les myofibres vont alors entrer en quiescence. Elles pourront être de nouveau activées en cas de blessure, puis proliférer, se différencier et fusionner avec les myofibres existantes ou fusionner entre elles pour former de nouvelles fibres (Shadrach & Wagers 2011). Au cours de ce processus, les cellules satellites activées et quiescentes peuvent se distinguer selon le marqueur qu'elles expriment. En effet, les cellules satellites quiescentes expriment Pax7, mais n'expriment pas le facteur myogénique MyoD alors que les cellules satellites activées expriment Pax7 et MyoD. Le

(cc) BY-NC-ND

rôle de la myostatine sur les cellules satellites a longtemps été très controversé. En effet, des études réalisées en 2003 montraient que les souris *Mstn*$^{-/-}$ présentaient une augmentation du nombre de cellules satellites par rapport aux souris sauvages (McCroskery *et al.* 2003). Mais ces résultats ont été réfutés en 2009 par d'autres analyses qui démontraient que les souris *Mstn*$^{-/-}$ présentaient au contraire, un nombre de cellules satellites légèrement réduit, et qu'il n'y avait aucune variation dans la prolifération de ces cellules par rapport aux souris sauvages (Amthor *et al.* 2009). Les travaux de McPherron ont finalement démontré que le nombre de cellules satellites n'était pas augmenté chez les souris *Mstn*$^{-/-}$ et que l'hypertrophie observée suite à l'invalidation post-natale de la *myostatine* était due à son effet sur le « turnover protéique » et non sur les cellules satellites (Wang & McPherron 2012).

C'est sur ce « turnover » que repose la dernière étape de la croissance du muscle **(Figure 11)**. En effet, une balance entre synthèse et dégradation protéique se met en place au niveau du muscle squelettique favorisant respectivement l'hypertrophie et l'atrophie (Braun & Gautel 2011). Ces deux processus sont associés à des changements dans la composition en protéines sarcomériques, en enzymes métaboliques et sur le phénotype contractile. En effet, les protéines myofibrillaires représentant plus de 80% du volume d'une fibre musculaire, toute situation modifiant l'équilibre entre la synthèse et la dégradation protéique va entraîner un gain ou une perte de masse musculaire (Hoppeler 1986; Sandri 2008). Durant la croissance post-natale, l'équilibre penche plus vers la synthèse protéique, favorisant ainsi la croissance musculaire **(Figure 11)**.

(cc) BY-NC-ND

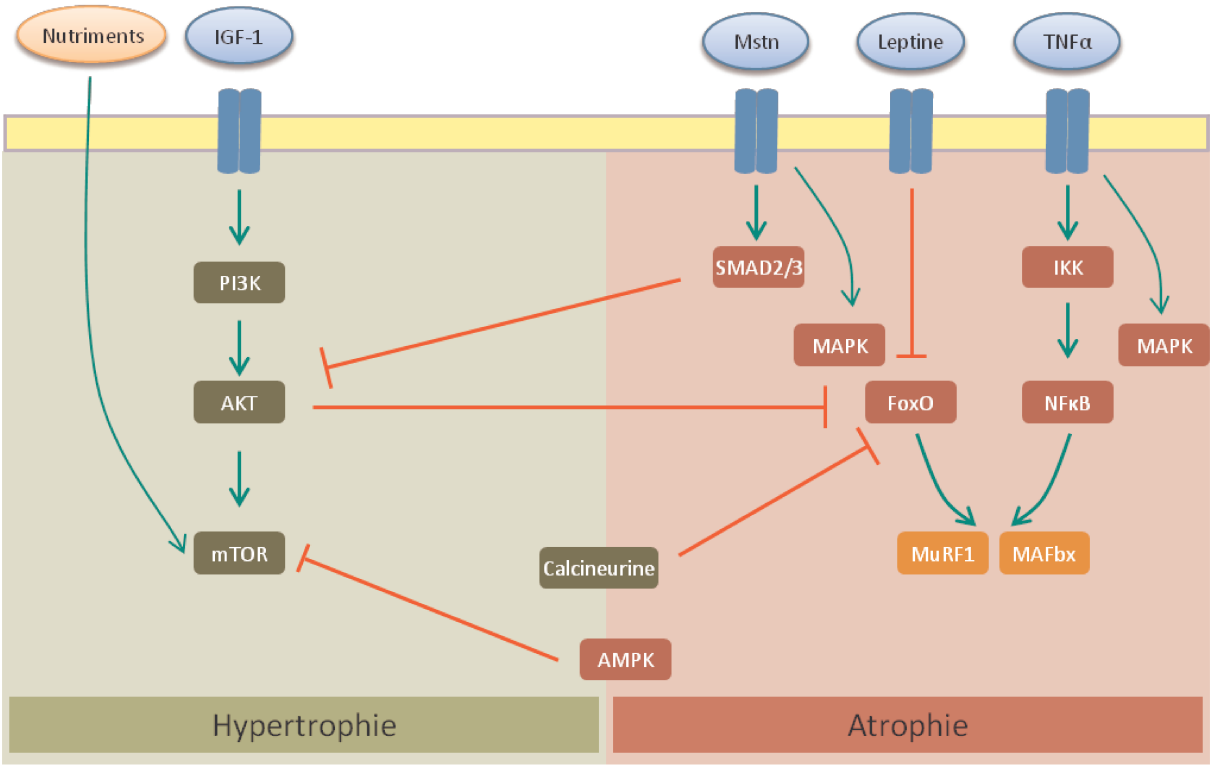

FIGURE 11. DIFFERENTS ACTEURS DE LA CROISSANCE MUSULAIRE POST-NATALE. Après la naissance, la croissance musculaire s'effectue suite à l'action de différents acteurs impliqués dans la balance entre synthèse (représenté en vert sur le schéma) et dégradation protéique (en rouge). IGF-1 et l'ingestion de nutriments (acide aminés, …) favorise l'hypertrophie musculaire en activant la voie PI3K/AKT/mTOR qui régule l'expression des acteurs impliqués dans la synthèse protéique. Une fois activée, AKT est également capable comme la leptine d'inhiber la voie FoxO impliqués dans la dégradation protéique. A l'inverse, la myostatine favorise le phénomène d'atrophie en activant sa voie canonique SMAD2/3 et la voie des MAPKs. Par sa voie canonique, la myostatine altère le processus d'hypertrophie en inhibant la voie TNFα et participe également au processus de dégradation protéique en activant les voies MAPKs et NFκB (d'après Braun et Gautel, 2011). *AKT, Protein kinase B ; AMPK, AMP-activated Protein Kinase ; FoxO, Forkhead box protein ; IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1 ; IKK, Inhibitor of Kappa B Kinase ; MAFbx, Muscle Atrophy F-box ; MAPK, Mitogen-activated protein kinase ; Mstn, Myostatine ; mTOR, mammalian Target Of Rapamycin ; MuRF1, Muscle RING-Finger Protein 1 ; NFκB, Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ; SMAD2/3, Sma Mothers Against Decapentaplegic homolog 2/3 ; TNFα, Tumor Necrosis Factor α.* (D'après Braun & Gautel 2012).

IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) et la myostatine sont les deux acteurs principaux de ce « turnover ». En agissant sur la voie PI3K/AKT, IGF-1 favorise la synthèse protéique par l'activation de la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) qui régule l'expression des acteurs impliqués dans la synthèse protéique. Une fois activé, AKT est aussi capable d'inhiber les protéines FoxO impliquées dans l'atrophie musculaire (Braun & Gautel 2011) (**(Figure 11)**. FoxO1 et FoxO3A sont des facteurs de transcription qui, une fois déphosphorylés, activent des atrogènes comme Atrogin 1 également appelé MAFbx, et des ubiquitines ligases de type MuRF à l'origine de la dégradation protéique et de l'atrophie (Nakae *et al.* 2008). A l'inverse d'IGF-1, la myostatine fait pencher la

(cc) BY-NC-ND

balance vers la dégradation protéique en agissant sur plusieurs voies de signalisation **(Figure 11)** (Braun & Gautel 2011; Rodriguez *et al.* 2014). Pour rappel, la myostatine active la voie des SMADs, en phosphorylant SMAD2/SMAD3 qui une fois liés à SMAD4 vont pouvoir bloquer le cycle cellulaire et inhiber la transcription des facteurs MRFs. La myostatine inactive également la voie AKT, levant ainsi l'inhibition des protéines FoxO et active la voie des MAP kinases qui participe à la dégradation protéique et au phénotype atrophique **(Figure 11)** (Philip *et al.* 2005).

Le statut nutritionnel influe aussi sur cette croissance musculaire. Suite à une prise alimentaire, la quantité de nutriment et d'IGF1 augmentent, permettant d'activer la voie PI3/AKT/mTOR **(Figure 11)** (Oldham & Hafen 2003; Drummond *et al.* 2009b). Au contraire, dans le cas de jeûne, deux senseurs du niveau énergétique du muscle vont intervenir, l'AMPK (AMP-activated Protein Kinase) et SIRT1 (Sirtuin 1) pour réprimer les voies anaboliques **(Figure 11)** (Mounier *et al.* 2009). Dans le cas d'une privation longue, l'AMPK peut également activer les voies cataboliques du muscle pour générer de l'énergie (Nakae *et al.* 2008).

L'exercice physique agit également sur cette balance hypertrophie/atrophie en augmentant spécifiquement la synthèse protéique, notamment via l'activation de la voie PI3K/AKT (Chen *et al.* 2002; Drummond *et al.* 2009b). D'autres études montrent que l'activité physique réprime l'activité de la myostatine favorisant ainsi l'hypertrophie musculaire (Hansen *et al.* 2011). A l'opposé de l'effort, l'inactivité physique entraîne une perte de masse musculaire essentiellement due à une diminution des voies anaboliques (Léger *et al.* 2009). Enfin, l'atrophie musculaire peut être attribuée, dans les cas de cachexie musculaire, d'insuffisance cardiaque et de sarcopénie, à la myostatine et aux cytokines proinflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor α (TNFα) **(Figure 11)**, l'Interleukine-6 (IL-6) et l'Interféron (Evans *et al.* 2008; Evans 2010; Dodson *et al.* 2011).

Les effets phénotypiques observés lors de l'invalidation de la *myostatine* sur la taille, le nombre et le type de fibres, diffèrent selon que la perte de fonction se produit avant ou après la naissance. En effet, le nombre de fibres musculaires étant déterminé dès la naissance le phénotype d'hyperplasie observé chez les souris *Mstn*$^{-/-}$ est du à son action au cours de l'embryogenèse. Lorsque que la perte de fonction de la *myostatine* se produit après la naissance, les souris présentent une augmentation de la masse musculaire d'environ 50% soit moins que les souris *Mstn*$^{-/-}$ (Whittemore *et al.* 2003; Tang *et al.* 2007; Welle *et al.* 2007; Matsakas *et al.* 2009). Aucune hyperplasie n'est observée chez les souris dont la *myostatine* a été invalidée à n'importe quel moment après la naissance. Ainsi, le phénotype hypermusclé observé est uniquement dû à une hypertrophie des

(cc) BY-NC-ND

fibres musculaires qui repose sur l'effet de la myostatine sur le « turnover protéique » (Whittemore *et al.* 2003; Tang *et al.* 2007; Welle *et al.* 2007; Matsakas *et al.* 2009). Tous les types de fibres sont touchés par l'hypertrophie et particulièrement les fibres rapides, mais aucune variation de type de fibre n'est observé lors de l'invalidation de la *myostatine* en post-natale (Girgenrath *et al.* 2005; Matsakas *et al.* 2009). A l'inverse, chez les souris qui surexpriment la *myostatine* de façon muscle spécifique, seuls les mâles développent une atrophie musculaire modérée associée à une diminution de la taille des fibres et du nombre de noyaux par fibre (Reisz-Porszasz *et al.* 2003; Heineke *et al.* 2010).

Des phénotypes musculaires assez similaires à ceux observés avec les souris *Mstn*$^{-/-}$ sont obtenus avec des modèles murins qui surexpriment différents inhibiteurs de la myostatine **(Tableau 4) (Figure 12).**

TABLEAU 4. PHENOTYPES MUSCULAIRES OBTENUS PAR UTILISATION D'INHIBITEURS DE LA MYOSTATINE.

Modèles transgéniques	Pourcentage d'augmentation de la masse musculaire et phénotypes		Références
Mstn-/-	+ 100%	Hypertrophie et Hyperplasie	(McPherron *et al.* 1997)
MLC-propeptide	+50%	Hypertrophie	(Lee & McPherron 2001)
MLC-Fst	+100%	Hypertrophie et Hyperplasie	(Lee & McPherron 2001)
MLC-Fstl3	+75%	Hypertrophie et Hyperplasie	(Lee 2007a)
CMV-Gasp-1	+50%	Hypertrophie	(Monestier *et al.* 2012a)
Mstn-/-, MLC-Fst	+350%	Hypertrophie et Hyperplasie	(Lee 2007a)
Mstn-/-;MLC-Fstl3	+100%	Hypertrophie et Hyperplasie	(Lee 2007a)
Transferts de gènes post-natal			
Mstn propeptide	+15%	Hypertrophie	(Qiao *et al.* 2008)
Ltbp-3	+28%	Hypertrophie	(Anderson *et al.* 2008)
Fst	+100%	Hypertrophie	(Haidet *et al.* 2008)
Fstl3	+20%	Hypertrophie	(Haidet *et al.* 2008)
Gasp-1	+35%	Hypertrophie	(Haidet *et al.* 2008)
Injections d'antagonistes post-natal			
Anticorps anti-myostatin JA16	+15%	Hypertrophie	(Whittemore *et al.* 2003)
Propeptide	+30%	Hypertrophie	(Bogdanovich *et al.* 2008)
sActRIIB-Fc (forme soluble d'ActRIIB)	+60%	Hypertrophie	(Lee *et al.* 2005)

ActrIIB, Activin Receptor type IIB ; AAV, Adénovirus Associé ; CMV, cytomégalovirus ; Fst, Follistatine ; Fstl3, Follistatin-like 3 ; Gasp-1, Growth and Differentiation Factor-associated serum protein-1 ; Ltbp-3, Latent TGF-β binding protein-3 ; MLC, Myosin Light heavy Chain ; Mstn, Myostatin.

Les souris qui surexpriment la *Follistatine* ou *Fstl3* de façon muscle spécifique présentent une augmentation de la masse musculaire associée à une hypertrophie et une hyperplasie (l'hyperplasie

(cc) BY-NC-ND

est néanmoins moindre chez les souris MLC-Fstl3 par rapport aux souris *Mstn*$^{-/-}$ et *MLC-Fst)* (Lee & McPherron 2001; Lee 2007a). De plus, lorsque les modèles *MLC-Fst* ou *MLC-Fstl3* sont croisés avec les souris *Mstn*$^{-/-}$, le phénotype d'hypermusculature est augmenté suggérant que la *Follistatine* et *Fstl3* agissent sur un autre acteur du développement musculaire, probablement l'activine connu pour intervenir sur la croissance du muscle squelettique **(Tableau 4)** (Lee 2007a). Cette hypothèse est confirmée chez les souris qui surexpriment de façon muscle spécifique le propeptide ou celles qui surexpriment *Gasp-1*, un inhibiteur connu pour agir sur la myostatine et non sur l'activine. Dans ces deux modèles, les souris ne développement qu'une hypertrophie des fibres musculaires **(Tableau 4)** (Lee & McPherron 2001; Monestier *et al.* 2012a). Comme pour l'invalidation de la myostatine après la naissance, l'augmentation de la masse musculaire observée lors de la surexpression de ces inhibiteurs durant la croissance post-natale n'est due qu'à l'hypertrophie des fibres musculaires **(Tableau 4)**. De plus, il semblerait qu'une injection d'inhibiteurs de myostatine par adénovirus améliore la force musculaire **(Figure 12)** (Haidet *et al.* 2008).

Les inhibiteurs de la myostatine se présentent alors comme des cibles thérapeutiques d'intérêt pour améliorer la qualité de vie de patients atteints de la myopathie de Duchenne par exemple ou de cachexies associés à un cancer. Dans ces deux pathologies, les patients sont atteints d'une diminution de la masse et de la force musculaire. La follistatine, FSTL3 ou encore GASP-1, sans pour autant soigner la pathologie, pourrait grandement améliorer la qualité de vie de ces patients.

(cc) BY-NC-ND

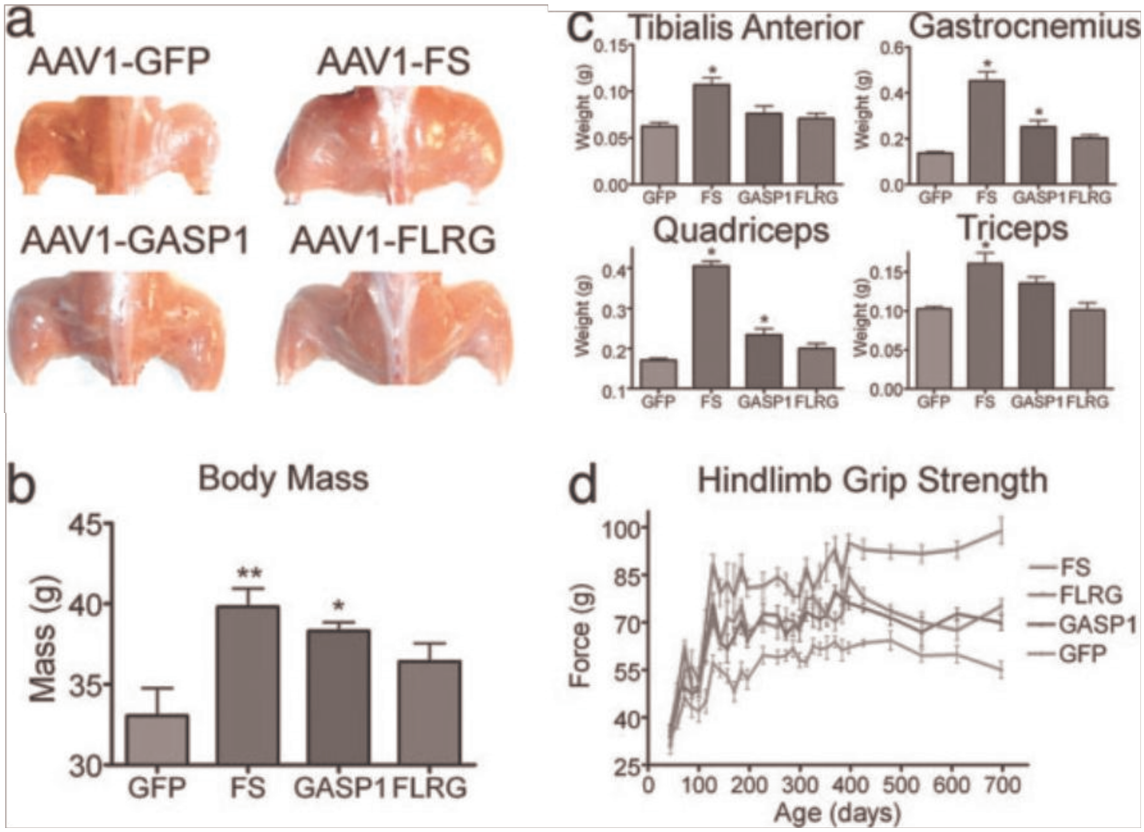

FIGURE 12. PHENOTYPES MUSCULAIRES OBETENUS PAR INJECTION D'INHIBITEURS DE LA MYOSTATINE PAR ADENOVIRUS. Les inhibiteurs de la myostatine augmentent la masse et la force musculaires dans les souris de fond génétique C57BL/6. (A) La masse musculaire des membres postérieurs est augmentée chez les souris injectées à 725 jours avec des adénovirus (AAV1) contenant des inhibiteurs de la myostatine par rapport au souris contrôles (AAV1-GFP). (B) La masse corporelle totale est significativement augmentée suite a l'injection de follistatine (AAV1-*FS*) et de *Gasp-1* (AAV1-*Gasp-1*) par rapport au souris contrôles. (C) La masse musculaire de membres postérieurs et antérieurs est augmentée chez les souris injectées avec des AAV exprimant les inhibiteurs de la myostatine. (D) La force de préhension au niveau des membres postérieurs de souris injectées avec des AAV exprimant des inhibiteurs de la myostatine est significativement améliorée par rapport aux souris témoins. *AAV, Adénovirus Associé ; FLRG Follistatin-Related Gene) ; FS, Follistatine ; GFP, Green Fluorescent Protein ; GASP-1, Growth and Differentiation Factor-Associated Serum protein-1.* (Haidet *et al.* 2008).

Tous ces résultats démontrent que la myostatine est un acteur majeur du développement musculaire régulant à la fois la mise en place du tissu musculaire durant les stades embryonnaires et fœtaux et sa croissance au cours de la vie adulte **(Figure 13)**.

(cc) BY-NC-ND

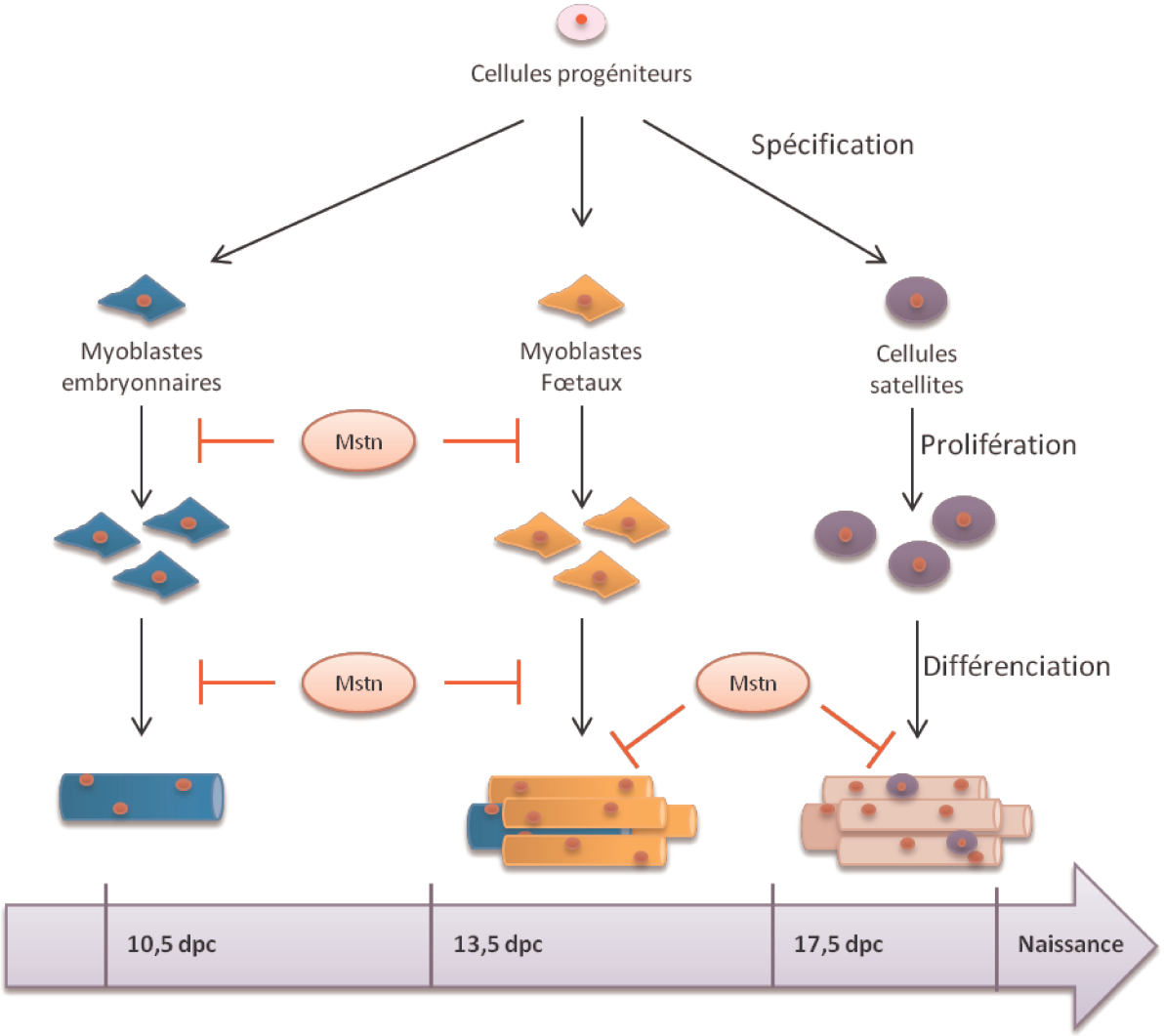

FIGURE 13. LA MYOSTATINE, REGULATEUR NEGATIF MAJEUR DU DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE. La myostatine régule le développement musculaire en agissant sur la prolifération et la différenciation des myoblastes primaires au stade embryonnaire et secondaires au stade fœtal. Durant cette étape, elle contrôle également la conversion glycolytique des fibres primaires. Enfin, au stade adulte, elle régule la croissance musculaire en agissant sur les voies impliquées dans la synthèse protéique. *Dpc, Days post-coïtum ; Mstn, Myostatine.* (D'après Biressi *et al.* 2007).

(cc) BY-NC-ND

2.4. La myostatine et Gdf-11 : Redondance de fonctions

Les souris Mstn$^{-/-}$ présentent aussi une densité osseuse plus importante que les souris Mstn$^{+/+}$ suggérant un potentiel rôle dans le développement osseux (Elkasrawy & Hamrick 2010). La myostatine partage 89% d'identité au niveau de sa partie C-terminal avec GDF-11 un autre membre de la superfamille des TGFβs impliqué dans la mise en place du squelette axial. Ces deux protéines se fixent toutes les deux préférentiellement au récepteur ActRIIB, activant la voie SMAD2/3 et sont régulées par les mêmes inhibiteurs au niveau extracellulaire comme la follistatine ou GASP-1. GDF-11 régule l'expression des gènes Hox impliqués dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur du mésoderme au cours de l'embryogénèse. (McPherron et al. 1999). Les souris Gdf-11$^{-/-}$ présentent de gros défauts squelettiques avec une antériorisation du squelette axial. En effet les vertèbres postérieures sont transformées en vertèbres antérieurs (McPherron et al. 1999). Une agénésie rénale ainsi qu'une augmentation du nombre de progéniteurs des îlots pancréatiques sont également observés chez les souris Gdf-11$^{-/-}$ (Nakashima et al. 1999; Harmon et al. 2004; Dichmann et al. 2006).

GDF-11 est également exprimé dans le muscle squelettique. Des études in vitro ont montré que des cellules musculaires C2C12 traitées avec la protéine GDF-11 présentaient un retard de différenciation des myotubes par rapport aux cellules non traitées (Souza et al. 2008). De part sa forte homologie de séquence avec la myostatine, et bien que les souris Gdf-11$^{-/-}$ ne présentent pas de phénotype musculaire, l'hypothèse d'une redondance de fonctions entre ces deux protéines a été proposée.

Un modèle murin Mstn$^{-/-}$;Gdf-11$^{-/-}$ a été créé en 2009 pour répondre à cette hypothèse (McPherron et al. 2009). Ces souris présentent une aggravation des transformations homéotiques du squelette axial observé dans les souris Gdf-11$^{-/-}$ **(Figure 14)** (McPherron et al. 2009). A l'inverse, aucune variation de la masse, de la taille ou du nombre de fibres musculaires n'a été observée entre les souris double KO et les souris Mstn$^{-/-}$ (McPherron et al. 2009). Ces travaux montrent qu'une redondance de fonction entre ces deux protéines existe bien au niveau de la mise en place du squelette axial, et semblent indiquer que GDF-11 n'interviendrait pas durant la myogenèse.

(cc) BY-NC-ND

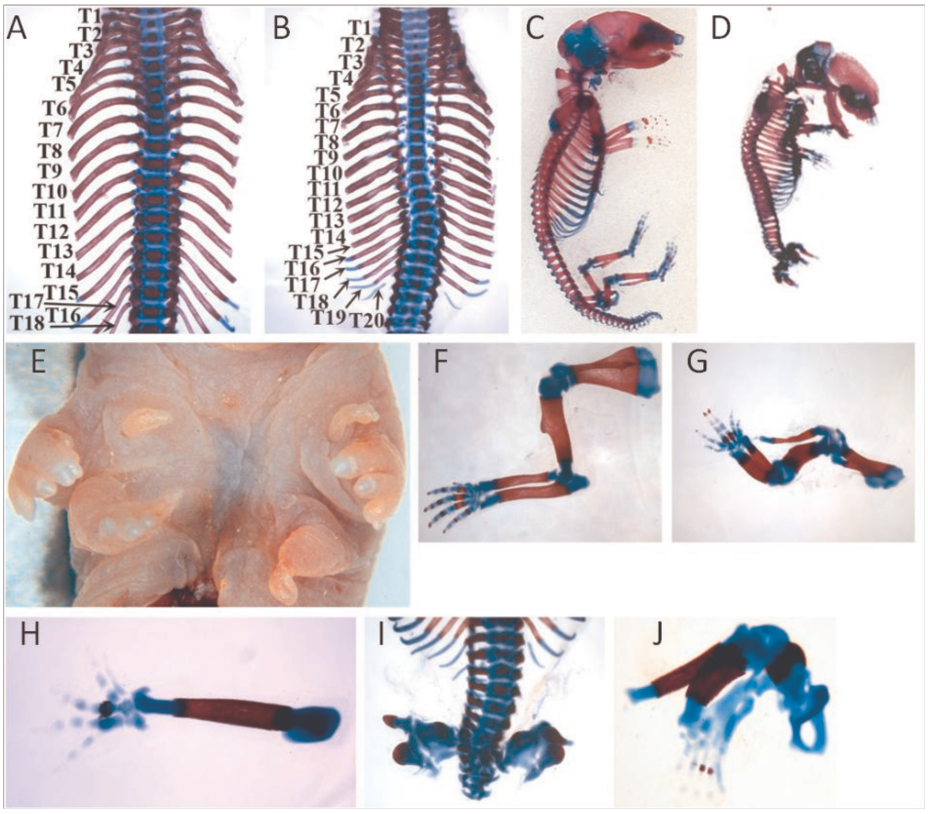

FIGURE 14. MALFORMATIONS SQUELETTETIQUES DES SOURIS *Mstn$^{-/-}$;Gdf-11$^{-/-}$*. (A-B) Régions thoraciques des mutants *Gdf-11$^{-/-}$* (A) et *Mstn$^{-/-}$;Gdf-11$^{-/-}$* (B) montrant l'augmentation du nombre de côtes. Les transformations homéotiques d'antériorisation des vertèbres thoraciques sont plus importantes chez les souris *Mstn$^{-/-}$;Gdf-11$^{-/-}$* (20 côtes) par rapport aux souris *Gdf11$^{-/-}$* (18 côtes). (C-D) Coloration du squelette entier des mutants *Gdf-11$^{-/-}$* (C) et *Mstn$^{-/-}$;Gdf-11$^{-/-}$* (D). (E) Torse ventrale du double mutant montrant de multiples projections de la peau et un membre supplémentaire (F-H) Coloration squelettique des membres inférieurs des souris *Gdf-11$^{-/-}$* (F) et *Mstn$^{-/-}$;Gdf-11$^{-/-}$* (G et H) montrant un os supplémentaire émanant de l'épaule du double mutant (G) et un membre supplémentaire (H). (I et J) Phénotypes des membres postérieurs des mutants *Mstn$^{-/-}$;Gdf-11$^{-/-}$* présentant une troncature au niveau de la colonne vertébrale (I) et une malformation de l'ilium et de tous les os de la jambe (J). *Gdf-11, Growth and Differentation Factor-11 ; Mstn, Myostatine.* (McPherron *et al.* 2009).

Cependant, de récentes études tendent à montrer que GDF-11 serait bien impliqué dans le développement musculaire prouvant la possibilité d'une redondance de fonctions avec la myostatine dans ce tissu. En effet, l'expression de Gdf-11 augmenterait avec l'âge et inhiberait la régénération musculaire et l'expansion des cellules satellites (Brun & Rudnicki 2015; Egerman et al. 2015). GDF-11 présenterait un intérêt thérapeutique comme la myostatine pour soigner des pathologies musculaires comme la sarcopénie et la cachexie (Brun & Rudnicki 2015).

(cc) BY-NC-ND

2.5. La myostatine dans un contexte metabolique

En plus de présenter une augmentation importante de leur masse musculaire, les souris *Mstn*$^{-/-}$ présentent également une diminution importante de leur masse adipeuse ainsi qu'une diminution de la taille de certains organes internes comme le foie et le rein (Lin *et al.* 2002; McPherron & Lee 2002). Ces variations ont également été observées chez les animaux présentant une mutation du gène de la *myostatine* (Grobet *et al.* 1997; Kambadur *et al.* 1997; McPherron & Lee 1997). De par son effet sur le tissu adipeux, les études sur la myostatine se sont récemment portées sur son rôle au cours du métabolisme des glucides et des lipides.

Ce métabolisme est primordial pour le bon fonctionnement de l'organisme. Pour maintenir l'homéostasie glucidique, une réelle communication se met en place entre plusieurs organes: le cerveau, le pancréas, le foie, le rein, le tissu adipeux et le muscle pour réguler le taux de glycémie. Le pancréas est l'acteur principal de ce système puisqu'il sécrète le glucagon maintenant l'homéostasie glucidique durant un jeûne par son action hyperglycémiante, et l'insuline, qui lors de la prise alimentaire va permettre le transport et le stockage du glucose dans le foie, le muscle et le tissu adipeux.

2.5.1. L'insuline

C'est au début des années 1900 que les scientifiques soupçonnent l'existence d'une substance sécrétée par le pancréas qui contrôlerait le métabolisme (Bliss 1993). En effet ils s'aperçoivent qu'après une ablation du pancréas, les animaux développent tous un diabète. Cette substance, l'insuline, sera finalement découverte et isolée en 1921. C'est une hormone peptidique sécrétée par les cellules β des îlots pancréatiques de Langherans. Elle est constituée de 2 chaînes polypeptidiques, une chaîne A et une chaîne B, reliées entre elles par 2 ponts disulfures et 1 pont disulfure intrachaîne dans la chaine A. L'insuline est stockée dans des granules au sein des cellules β du pancréas (Fu *et al.* 2013). Chez la souris, plus de 13 000 granules contenant environ 200 000 molécules d'insuline sont retrouvées au sein de ces cellules β et occupent plus de 10% de leur volume totale (Dean 1973; Howell 1984; Fu *et al.* 2013). Ces granules sont stables plusieurs jours et libèrent l'insuline en réponse à une stimulation métabolique.

La sécrétion de l'insuline est activée par deux catégories d'agents stimulants. Les stimuli primaires qui sont les nutriments retrouvés dans la nourriture (comme le glucose, les acides gras et les acides aminés) et les stimuli secondaires que constituent les hormones. Au sein de la première catégorie, le glucose est le principal stimulant de la sécrétion de l'insuline. En effet, les cellules β

(cc) BY-NC-ND

possèdent des capteurs capables d'estimer le taux de glucose sanguin comme le transporteur GLUT-2 (Glucose transporter type-2) exprimé à la surface des cellules pancréatiques et la glucokinase (Suckale & Solimena 2008). Les hormones connues pour agir sur l'insuline sont GLP-1, l'hormone de croissance GH (Growth Hormone) et la leptine. Elles agissent en général de concert avec les stimuli primaires. GLP-1 favorise la sécrétion de l'insuline après la prise de nutriments (Flint *et al.* 1998). GH en activant la production d'IGF-1 contribuerait à la diminution de la sécrétion de l'insuline (Hirschberg *et al.* 1999). La leptine, sécrétée par les adipocytes, est connue pour inhiber la sécrétion de l'insuline. En effet, des précédents travaux ont démontré qu'une stimulation par cette hormone des cellules pancréatiques se traduisait par des taux d'insuline sécrétés moins élevés (Ookuma *et al.* 1998).

Une fois l'insuline sécrétée, celle-ci peut activer sa voie de signalisation en se fixant à son récepteur : le récepteur à l'insuline ou RI. Ce dernier est exprimé de façon majoritaire sur le muscle, le foie et le tissu adipeux. Il appartient à la famille des récepteurs de facteurs de croissance et possèdent une activité tyrosine kinase dans son domaine intracellulaire. Ce récepteur possède une structure similaire à celui d'IGF-1 ou IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor), avec qui il partage plus de 50% d'identité. Le récepteur RI est exprimé en grande quantité à la surface du foie et du tissu adipeux alors que le muscle présente en quantité équivalente les deux récepteurs (Bailyes *et al.* 1997). La fixation de l'insuline sur le récepteur RI entraîne son activation par autophosphorylation. Le domaine tyrosine kinase une fois activé permet l'activation d'au moins 9 substrats communs à RI et à l'IGFR. La famille des protéines IRS (Insulin Receptor Substrate) fait partie de ces substrats. Elles comptent 4 membres dont les représentants majeurs sont IRS1 et IRS2 (White 2002). Une fois les protéines IRS phophorylées par le récepteur, elles sont reconnues par les domaines Sh2 (Src homology 2) retrouvés sur la PI3 kinase et les protéines Grb2. La PI3 kinase est une des principales voies de signalisation de l'insuline avec les MAPs Kinases **(Figure 15)**. Elle va ensuite activer la voie AKT qui à son tour pourra activer d'autres voies de signalisation impliquées dans différents voies du métabolisme du glucose et des lipides **(Figure 15)**. Les protéines Grb2 une fois phophorylées vont permettre l'activation du facteur SOS qui active la petite protéine G Ras dans la membrane plasmique. Ras active ensuite la Raf kinase qui phosphoryle la MAP kinase kinase ou MEK (Mitogen Extracellular signal-regulated Kinase) qui à son tour active les deux MAPKs, ERK1 et 2. Cette voie favorise l'expression génique, la synthèse protéique et la prolifération. Les voies PI3K/AKT et MAP kinases sont interconnectées et participent à l'activation l'une de l'autre.

(cc) BY-NC-ND

Par une autre voie de signalisation dépendante de la voie PI3K, l'insuline est capable d'induire, suite à une stimulation du glucose, la translocation à la membrane plasmique du transporteur GLUT-4 présent dans les cellules musculaires et les adipocytes **(Figure 16)**. Une fois le récepteur à l'insuline activé, la protéine CAP (c-Cbl Associated Protein) liée au récepteur va recruter la protéine c-Cbl phosphorylée. Ce complexe CAP-c-Cbl active ensuite la GTPase TC10 permettant ainsi la polymérisation de l'actine (Chiang *et al.* 2001; Bryant *et al.* 2002). GLUT-4 migre le long de ces filaments par l'intermédiaire d'une protéine moteur Myo1c (Myosin IC) (Bose *et al.* 2002). Les vésicules contenant GLUT-4 portent à leur surface des protéines VAMP2 (Vesicule-Associated Membrane Protein 2) reconnus par les protéines de la famille des SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor) permettant ainsi la translocation de GLUT-4 à la membrane (Braiman *et al.* 2001; Bryant *et al.* 2002; Leto & Saltiel 2012).

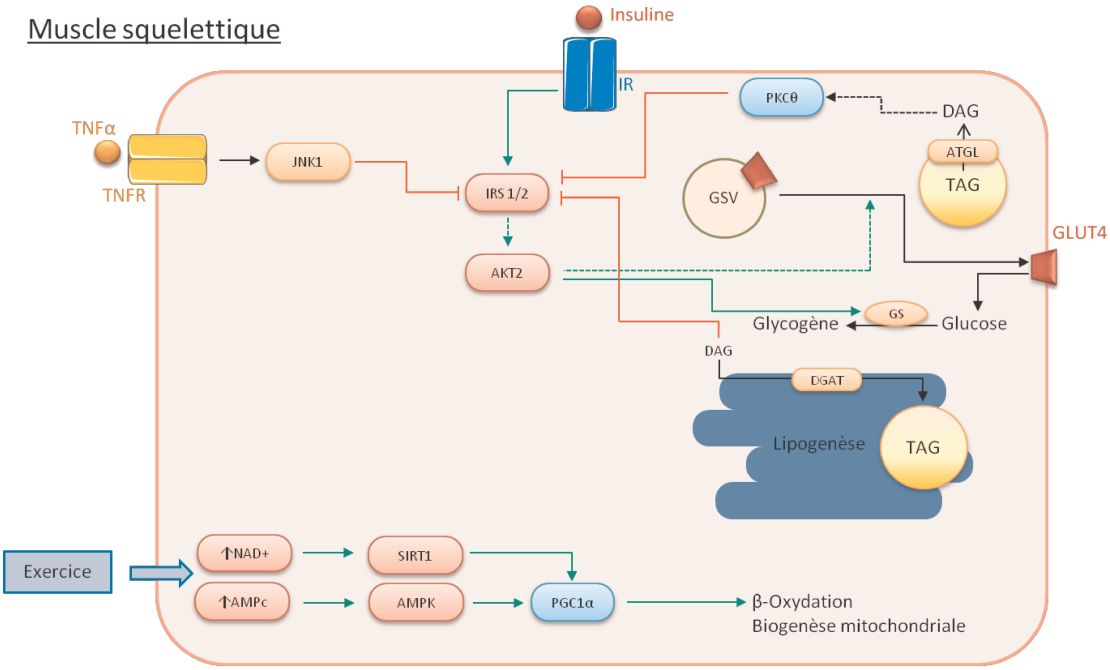

FIGURE 15. VOIES DE SIGNALISATION DE L'INSULINE AU NIVEAU DU MUSCLE SQUELETTIQUE. Au niveau du muscle squelettique, l'insuline en se fixant à son récepteur active la voie IRS/AKT et favorise le transport du glucose en permettant le transport de GLUT-4 à la membrane plasmique. Une fois le glucose entré dans la cellule musculaire, l'insuline permet sa synthèse et son stockage sous forme de glycogène. TNFα, PKCθ DAG régulent négativement ce stockage du glucose en inhibant la voie IRS1/2. L'exercice via PGC1-α favorise la β-oxydation et la biogénèse mitochondriale. *AKT, Protein kinase B ; AMPc, Adénosine Monophosphate cyclique ;AMPK, AMP protein-activated Kinase ; ATGL, Adipose Triglyceride Lipase ; DAG, Diacylglycérol ; GLUT-4, Glucose Transporter type 4 ; GS, Glycogen Synthase ; GSV, GLUT-4-containing Storage Vesicles ; IR, Insulin Receptor ; JNK1, c-Jun N-terminal Kinase 1 ; NAD, Nicotinamide Adénine Dinucléotide ; PGC1α, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1α ; PKCϑ, Protein Kinase C ϑ ; SIRT1, Sirtuin 1 ; TAG, Triacylglycerol ; TNFα, Tumor necrosis factor α ; TNFR, Tumor Necrosis Factor Receptor.* (D'après Samuel & Shulman 2012).

(cc) BY-NC-ND

2.5.2. Implication de l'insuline dans le metabolisme

Action de l'insuline sur le metabolisme du glucose

L'insuline joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie du glucose. L'augmentation de la glycémie entraîne la sécrétion de l'insuline au niveau des cellules β. Dans ce contexte, elle va agir principalement sur le foie, le muscle et le tissu adipeux **(Figure 16)**. Dans ces deux derniers organes, elle va permettre le transport du glucose grâce à la translocation de GLUT-4 à la membrane plasmidique **(Figure 16)**. Ce transporteur sensible à l'insuline va permettre l'entrée du glucose à l'intérieur des cellules (Leto & Saltiel 2012). Dans le foie et le muscle, le glucose est stocké sous forme de glycogène. L'insuline active alors la glycogène synthase via la voie PI3K/AKT. AKT va ensuite désactiver GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) en la phosphorylant, ce qui permet la phosphorylation et l'activation de la glycogène synthase **(Figure 16)** (Cross *et al.* 1995). Au niveau du foie, le transport du glucose se fait via le transporteur GLUT-2, mais ce dernier n'est pas sensible au taux d'insuline sérique comme le transporteur GLUT-4. Dans cet organe, l'insuline inhibe la production et le relargage du glucose en bloquant la gluconéogenèse et la glycogénolyse. Elle inhibe de façon directe la transcription des gènes de la gluconéogenèse *Pck* (Phosphoenolpyruvate carboxylase) et *G6pc* (Glucose-6-phosphatase) (Shulman 2000; Samuel & Shulman 2012). Par la voie PI3K/AKT, elle inhibe la voie de signalisation FoxO capable d'activer la transcription des gènes de la gluconéogenèse (Puigserver *et al.* 2003).

(cc) BY-NC-ND

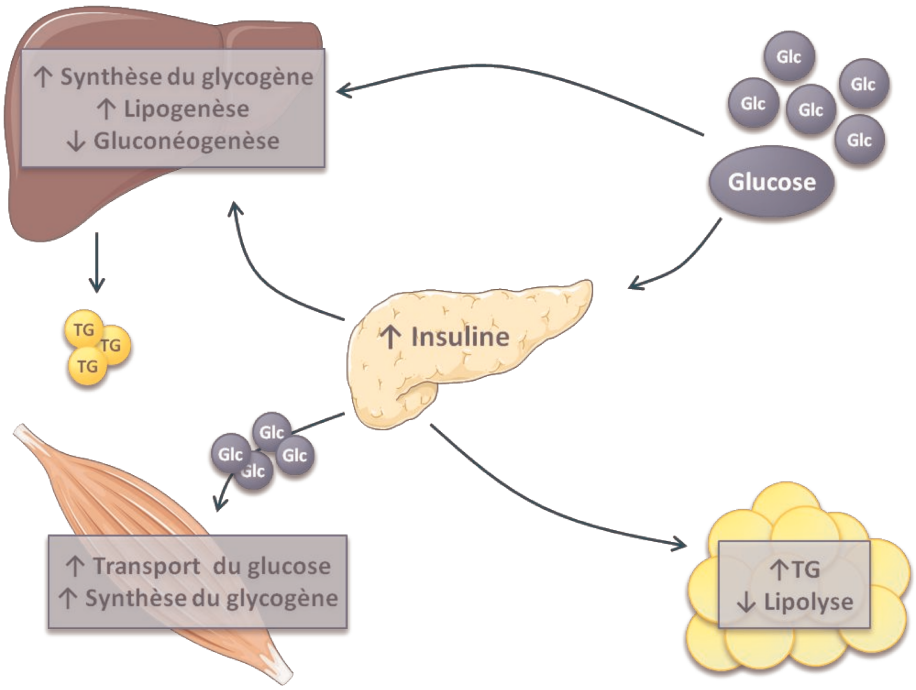

FIGURE 16. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU METABOLISME DES GLUCIDES ET DES LIPIDES. Lorsque le taux de glucose sanguin augmente (suit à une prise alimentaire par exemple) les cellules pancréatiques vont sécréter l'insuline. Celle-ci va permettre le transport du glucose au niveau du muscle squelettique via le transporteur GLUT-4 et favoriser son stockage sous forme de glycogène. Au niveau du foie, l'insuline va activer la synthèse du glycogène, la lipogenèse et inhiber la gluconéogenèse. Au niveau du tissu adipeux elle inhibe la lipolyse et favorise le stockage des triglycérides. *Glc, Glucose, TG, Triglycérides.* (D'après Samuel & Shulman 2012).

ACTION DE L'INSULINE SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE

Dans le foie, l'insuline permet également le stockage du glucose sous la forme de triglycérides en activant la lipogenèse *de novo* **(Figure 17)** et en induisant l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de gènes lipogéniques, dont le plus connu est SREBP-1 (Sterol Response Element-Binding Protein-1). Ce facteur favorise la synthèse lipidique dans le foie mais également dans le tissu adipeux (Foretz *et al.* 1999; Shimomura *et al.* 1999). Il va notamment activer l'expression du gène Fas (Fatty acid synthase) impliqué dans la synthèse des acides gras. La formation de triglycérides à partir du glucose démarre au niveau des mitochondries où le glucose va être synthétisé sous la forme de citrate. Une fois relâché dans le cytoplasme, le citrate va être métabolisé en acétyl coA puis en Malonyl coA. Ce dernier sera recruté par FAS afin de synthétiser des acides gras à longues chaînes qui seront ensuite estérifiés avec du glycérol pour former des triglycérides. Les triglycérides seront par la suite sécrétés et stockés dans le tissu adipeux (Samuel & Shulman 2012). Dans le tissu adipeux, l'insuline active également la lipogenèse et empêche la lipolyse, c'est-à-dire la dégradation des lipides en régulant l'expression d'une hormone sensitive, la

BY-NC-ND

lipase (Anthonsen *et al.* 1998). Cette enzyme conduit à la libération des acides gras par hydrolyse des triglycérides.

AUTRES ACTIONS

L'insuline est également sécrétée par certaines cellules du thymus au niveau du cerveau (Kojima et al. 2006). Elle participe ainsi au guidage des neurones en croissance. Elle est également impliquée dans la synthèse protéique via sa voie PI3K en stimulant la transcription et la traduction (Proud 2006).

2.5.3. L'INSULINO-RESISTANCE

L'insulino-résistance correspond à l'incapacité des cellules à répondre à l'insuline présente dans la circulation sanguine dans des conditions physiologiques. Ces tissus deviennent résistants à cette hormone qui ne peut donc plus agir dessus. Cela se traduit par un défaut du transport du glucose qui, à terme, entraîne une hyperglycémie et une hyperinsulémie **(Figure 17)**. L'insulino-résistance est souvent le point de départ du développement d'un syndrome métabolique qui à terme peut conduire à des pathologies plus grave comme les maladies cardiovasculaires, l'obésité ou encore le diabète de type II (Abdul-Ghani & DeFronzo 2010; Samuel & Shulman 2012). Les organes les plus souvent touchés par l'insulino-résistance sont le foie, le muscle, et le tissu adipeux.

(cc) BY-NC-ND

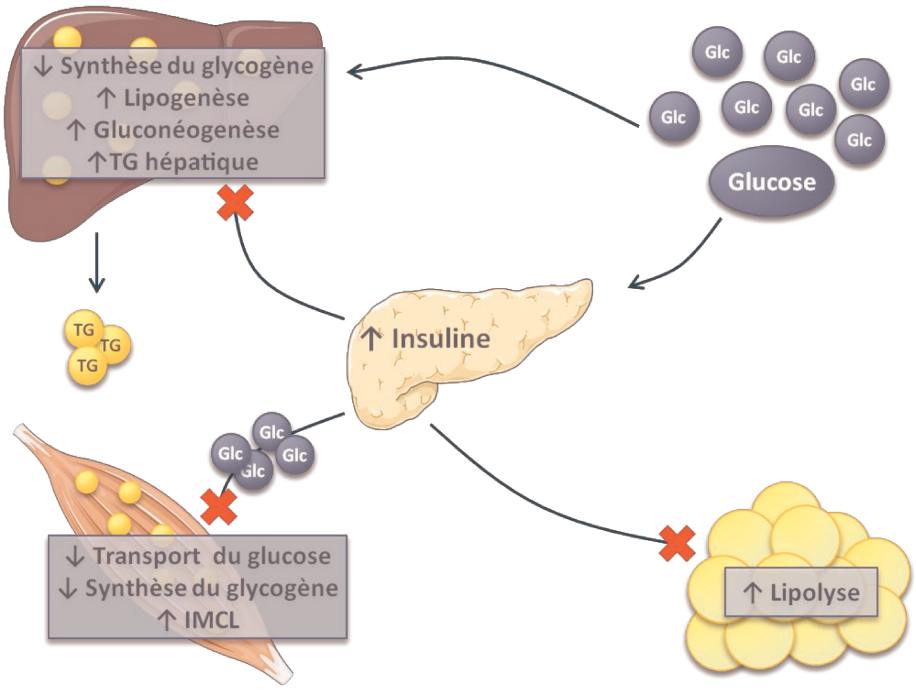

FIGURE 17. INSULINO-RESISTANCE ET DEREGULATION DE L'HOMEOSTASIE DU GLUCOSE. Dans les cas d'insulino-résistance, les tissus cibles de l'insuline deviennent insensibles à son action. Ce qui a pour conséquence l'absence d'entrée de glucose et son stockage sous forme de glycogène au niveau du muscle squelettique. Au niveau de ce tissu, une augmentation des taux d'IMCL est également observée. La gluconéogenèse hépatique ne peut plus être régulé par l'insuline ce qui augmente drastiquement les taux de glucose sanguin. Au niveau du foie, la synthèse de glycogène est également réduite, mais pas la lipogenèse ce qui entraîne une accumulation de triglycérides au niveau du tissu adipeux mais également de façon ectopique au niveau du foie. De plus pour compenser l'hyperglycémie, le pancréas sécrète encore plus d'insuline, entraînant une hyperinsulémie. *Glc, Glucose ; IMCL, Intramyocellular Lipids ; TG, Triglycérides.* (D'après Samuel et Shulman, 2012).

MECANISMES DE L'INSULINO-RESISTANCE

Plusieurs hypothèses ont été émises dans la littérature pour expliquer les défauts dans la transduction du signal dans les cas d'insulino-résistance. Une des premières hypothèses fut la baisse du nombre de récepteurs RI à la surface des cellules sans variation de l'affinité de l'insuline à ces derniers (Abdul-Ghani & DeFronzo 2010). Mais cette observation doit être interprétée avec précaution car de nombreux patients atteints d'obésité et de diabètes de type II ne présentent pas de variation dans la quantité de RI. A l'heure actuelle, les défauts caractéristiques dans la transduction du signal de l'insuline sont une diminution drastique de l'activité de la voie PI3K/AKT (Krook *et al.* 2000). En effet chez les diabétiques, la protéine IRS1 est phosphorylée sur ses domaine serines au lieu de son domaine tyrosine ce qui nuit gravement à son activité, l'empêchant ainsi d'interagir et d'activer la voie PI3K/AKT. Le responsable de cette phosphorylation anormale d'IRS1 serait la protéine kinase C (PKC). Cette protéine est retrouvée fréquemment augmentée chez des

(cc) BY-NC-ND

patients atteints de pathologies liées au métabolisme. De plus l'augmentation d'IMCL (Intramyocellular Lipids) et des métabolites lipidiques comme DAG (Diacylglycérol) sont de forts activateurs de PKC. A l'inverse, la transduction du signal via la voie des MAPKs ne semble à l'inverse pas être atteinte contrairement à la voie des PI3K dans les cas d'insulino-résistance (Samuel & Shulman 2012).

Les voies de signalisation impliquées dans les processus inflammatoires sont également activées dans les cas d'insulino-résistance. L'activation de la voie IKK (Inhibitor of Kappa B Kinase) serait impliquée dans la synthèse de céramides, où dans l'activation de la voie JNK. Celle-ci est va alors réguler négativement la voie de signalisation de l'insuline en phosphorylant IRS1 sur ses domaines sérines ou au niveau hépatique en inhibant la lipogenèse (Samuel & Shulman 2012).

Des études récentes s'intéressent également au rôle du RE (Réticulum Endoplasmique) et plus particulièrement au système UPR (Unfolded Protein Response) appelé aussi stress du RE, lors de défauts dans la signalisation de l'insuline. Le système UPR est activé lors de l'accumulation dans la lumière du RE de protéines mal conformées. Les protéines mal repliées ont leurs feuillets β exposés qui sont reconnus par la protéine chaperonne GRP78 (Glucose-Related Protein 78) également appelé BiP (immunoglobulin-binding protein). Par la suite, plusieurs voies de signalisation sont activées, notamment la voie IRE1α (Inositol-Requiring Enzyme 1α), qui vont tenter de réduire la quantité de protéines mal repliées en augmentant la biogénèse membranaire, en arrêtant la traduction et en activant la production de protéines chaperonnes (Samuel & Shulman 2012). Dans la plupart des cas, l'activation du système UPR permet aux cellules de s'adapter aux changements demandés. Cependant dans les cas d'insulino-résistance, hépatique ou adipocytaire, il semblerait que l'activation de l'UPR participe au développement de la pathologie. En effet, ce système est retrouvé activé chez les souris déficientes en leptine (*Lep*$^{ob/ob}$ ou *ob/ob*) (Ozcan *et al.* 2004). Les souris *Grp78+/-,* hétérozygotes pour Grp78, ont une réponse « adaptive » du système UPR, et semblent protégées contre l'obésité liée à l'alimentation, contre la stéatose et l'insulino-résistance hépatique (Ye *et al.* 2010).

De nombreuses voies de signalisation semblent donc être impliquées dans l'insulino-résistance, et les acteurs à l'origine de ces anomalies d'activation semblent différer selon le tissu touché.

(cc) BY-NC-ND

Le tissu adipeux fut longtemps considéré comme un réservoir d'énergie passive. Cette accumulation énergétique est sous le contrôle de deux types cellulaires: les cellules qui composent le tissu adipeux blanc ou WAT (White Adipose Tissue) et celles récemment découvertes qui constituent le tissu adipeux brun ou BAT (Brown Adipose Tissue). Le WAT permet de stocker le glucose sous forme de triglycérides. A l'inverse, le BAT métabolise les triglycérides stockés grâce au principe de thermogenèse qui dissipe de l'énergie chimique pour produire de la chaleur et de l'énergie (Braga *et al.* 2013). Ce principe repose sur l'activité des mitochondries et sur l'induction de la protéine mitochondriale UCP-1 (Uncoupling Protein-1), un transporteur de protons qui agit sur le transport d'électron durant la production d'ATP permettant ainsi de dissiper l'énergie produite par les mitochondries sous forme de chaleur (Ohno *et al.* 2012). La disruption de ce gène chez la souris entraîne une diminution de BAT et induit l'obésité (Feldmann *et al.* 2009). Dès lors, la balance WAT/BAT semble être déterminante dans l'utilisation de l'énergie stockée et durant le développement de pathologies métaboliques.

La myostatine participe à cette balance stockage/dépense énergétique au niveau du tissu adipeux (Braga *et al.* 2013). En effet les souris *Mstn*$^{-/-}$ présentent une oxydation des acides gras et une température corporelle accrues associées à une augmentation de la biogenèse mitochondriale et une transformation du WAT en BAT (Zhang *et al.* 2011b). L'oxydation des acides gras et la dépense énergétique seraient les raisons majeurs de l'adiposité réduite observée chez les souris *Mstn*$^{-/-}$ (Choi *et al.* 2011). Ces résultats ont été confirmées par des études *in vitro* sur des cellules pré-adipocytaires traitées avec de la myostatine. Une diminution de la différenciation des adipocytes bruns est observée suite à ce traitement avec une activation de la voie SMAD3 (Kim *et al.* 2012). L'invalidation de la *myostatine* favorise également l'activation de la voie AMPK/PGC-1α dans le tissu adipeux et dans le muscle squelettique (Braga *et al.* 2013; Shan *et al.* 2013). Il a été précédemment démontré que cette voie de signalisation protégés les souris contre l'obésité induite par l'alimentation en favorisant l'oxydation des acides gras et la sensibilité à l'insuline (Zhang *et al.* 2011a). A ce jour, la manière dont la myostatine régule la voie de l'AMPK est encore peu claire. Récemment, il a été rapporté que la myostatine inhiberait AMPK via la voie TAK1-MAKK6 (TGF-b-Activated Kinase 1-Mitogen-activated protein Kinase Kinase) dans des cardimyocytes (Biesemann *et al.* 2014). Ces études fournissent une justification rationnelle de l'importance du tissu adipeux dans l'étude des pathologies métaboliques.

(cc) BY-NC-ND

En plus d'être un réservoir d'énergie, le tissu adipeux sécrète également des cytokines **(Tableau 5)**. En effet, depuis la découverte récente de la leptine et l'identification ultérieure d'autres cytokines dérivées du tissu adipeux comme l'adiponectine ou la résistine, il est devenu clair que le tissu adipeux est un organe endocrine actif. Chez des patients obèses, ce tissu sécrète également diverses cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6 et TNFα. Toutes ces cytokines, appelées adipokines contrôlent diverses fonctions métaboliques et leurs dérégulations peuvent entraîner des défauts métaboliques graves. En effet, ces cytokines peuvent modifier la sensibilité à l'insuline des organes comme le foie et le muscle (Tilg & Moschen 2008; Marra & Bertolani 2009; Li *et al.* 2013).

TABLEAU 5. ACTIONS METABOLIQUES DES ADIPOKINES.

Adipokines	Actions métaboliques
Leptine	Inhibition de la prise de nourriture
	Stimulation de la dépense énergétique
	Suppression de la production de glucose hépatique
	Suppression de la biosynthèse d'acide gras
	Stimulation de l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique et le foie
	Stimulation de l'absorption de glucose dans le muscle
	Stimulation de la sécrétion d'insuline
	Stimulation de la sécrétion de l'adiponectine
	Stimulation de la sécrétion de cytokines proinflammatoires (IL-6 et TNF-α)
	Inhibition de l'expression de la résistine
Adiponectine	Suppression de la gluconéogenèse hépatique
	Suppression de la lipogenèse hépatique
	Stimulation de l'absorption de glucose dans le muscle
	Stimulation de l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique et le foie
	Stimulation de la sécrétion d'insuline
	Modulation de la prise de nourriture et de la dépense énergétique
	Inhibition de cytokines proinflammatoires (IL-6 et TNF-α)
Résistine	Réduction de la sensibilité à l'insuline périphérique
	Induction de l'insulino-résistance
	Augmentation de la néoglucogenèse hépatique
	Stimulation de la sécrétion de cytokines proinflammatoires (IL-6 et TNF-α)
TNF-α	Induction de l'insulino-résistance
IL-6	Induction de l'insulino-résistance

IL-6, Interleukin-6 ; TNFα, Tumor Necrosis Factor α.

En effet, des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que TNFα pouvait induire un phénotype d'insulino-résistance en inhibant l'activité d'IRS1 via la voie IKK et le transport du glucose **(Figure 18)** **(Tableau 5)** (Li *et al.* 2013). IL-6 est majoritairement secrétée par les adipocytes (environ 30% du taux

(cc) BY-NC-ND

d'IL-6 plasmidique). Une forte augmentation des taux d'IL-6 est retrouvée dans la majorité des cas d'insulino-résistance et de diabète (Kubaszek *et al.* 2003; Rotter *et al.* 2003). Comme TNFα, elle inhibe la voie de signalisation de l'insuline et le transport du glucose **(Figure 18)**. Néanmoins si IL-6 reste associé au phénotype d'insulino-résistance hépatique et adipocytaire son rôle est controversé dans le muscle squelettique **(Tableau 5)**.

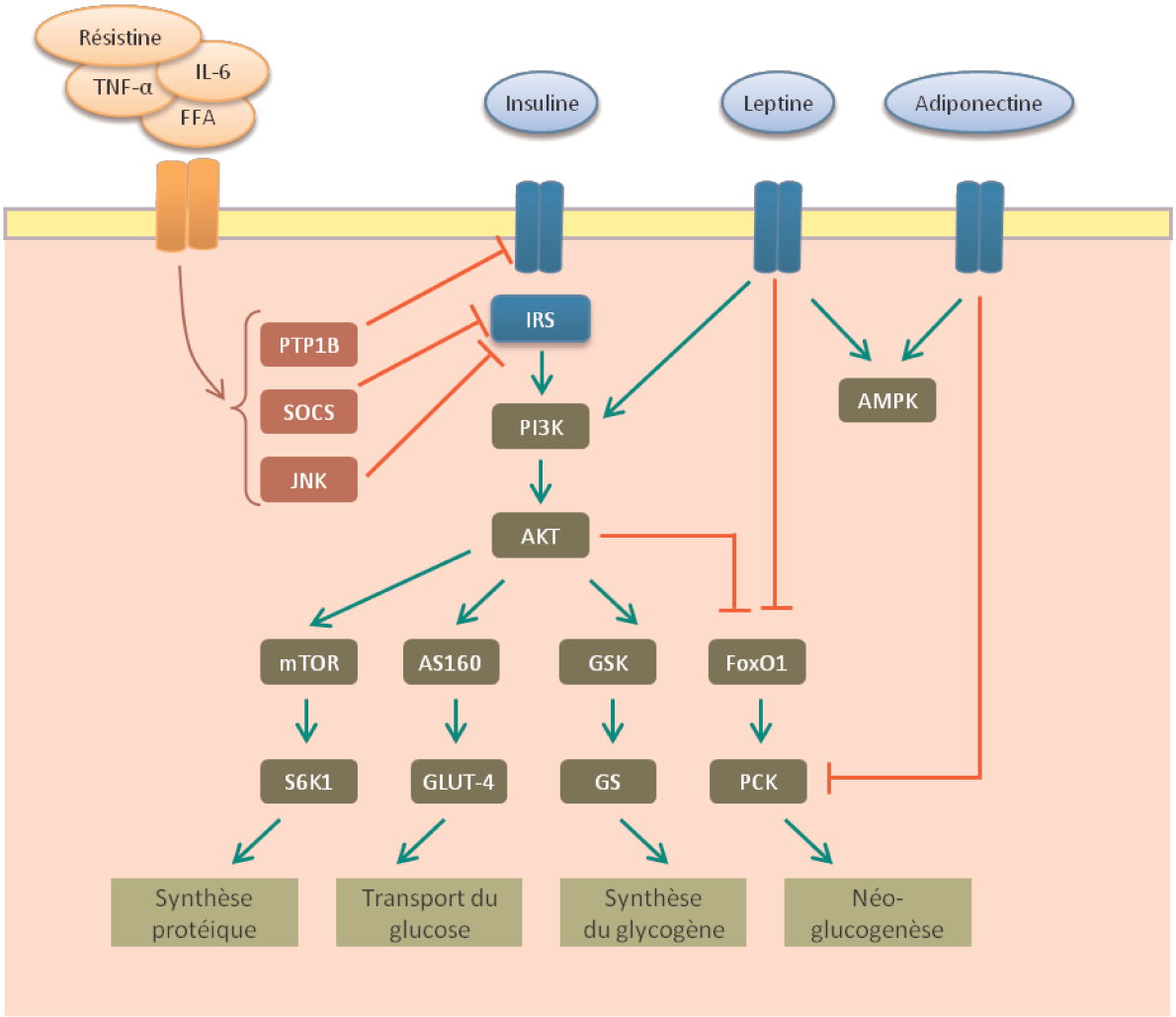

FIGURE 18. EFFETS DES ADIPOKINES SUR LE METATOBLISME. L'adiponectine et la leptine peuvent réguler négativement la gluconéogenèse. La résistine augmente la synthèse et la glycogénolyse. IL-6 et TNFα inhibent la signalisation de l'insuline. IL-6 réduit également la synthèse du glycogène et TNFα le transport du glucose (d'après Li et Ding, 2013). *IL-6, Interleukin-6 ; TNFα, Tumor Necrosis Factor α.* (D'après Li *et al.* 2013)

La perte de la masse adipeuse observée chez les souris *Mstn*$^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages est également associée à une diminution des taux sériques de la leptine, d'IL-6 et de TNFα

(cc) BY-NC-ND

(McPherron 2010). Ces souris semblent être protégées contre la prise poids liée à l'âge ou suite à un régime alimentaire riche (McPherron & Lee 2002; Zhao *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2011a; Jackson *et al.* 2012). Pour déterminer si l'effet observé sur le tissu adipeux est dû à un effet musculaire ou a un effet direct de l'absence de *myostatine* dans le tissu adipeux, des modèles de souris transgéniques surexprimant le propeptide de la myostatine sous le contrôle d'un promoteur spécifique du muscle ou du tissu adipeux ont été créés (Guo *et al.* 2009). Cette étude suggère que les effets de la myostatine sur le tissu adipeux seraient dépendants de son action sur le muscle et confirme l'existence d'un « crosstalk » inter-tissulaire entre les différents organes impliqués dans l'homéostasie glucidique (Guo *et al.* 2009; McPherron 2010).

INSULINO-RESISTANCE MUSCULAIRE

Plus de 60 à 70% des apports glucidiques au sein du muscle squelettique dépendent de l'insuline, ce qui fait de ce tissu un des consommateurs majeurs du glucose. L'insulino-résistance musculaire se traduit essentiellement par un défaut de transport de glucose, une diminution de la glycogénèse et une augmentation d'IMCL (Rask-Madsen & Kahn 2012; Samuel & Shulman 2012). GLUT-4 est le transporteur de glucose principal du muscle squelettique. Les souris *Glut-4*$^{+/-}$ hétérozygotes pour ce gène présentent de nombreux symptômes métaboliques associés à l'insulino-résistance : une augmentation sérique de leur taux de glucose et d'insuline, un défaut de transport de glucose musculaire et de l'hypertension. Ces souris deviennent également diabétiques (Stenbit *et al.* 1997). Des études plus récentes ont révélé que l'activation de la voie PI3K/AKT était fortement diminuée dans les cas d'insulino-résistance musculaire empêchant ainsi la translocation de GLUT-4 à la surface des cellules. Chez des patients atteints de diabète de type II, l'insuline ne peut également plus agir sur l'activité de la glycogène synthase (Abdul-Ghani & DeFronzo 2010).

L'accumulation d'IMCL, symptôme fréquemment retrouvé chez les individus obèses, correspond à une accumulation de gras au sein des fibres musculaires (Samuel & Shulman 2012). Chez les individus sains, les IMCL sont généralement stockés dans les fibres musculaires de type I et utilisés comme sources d'énergie. Mais en absence d'activité physique, les lipides intramusculaires peuvent entraîner des défauts de la transduction du signal de l'insuline via l'accumulation de métabolites lipidiques comme le diacylglycérol et les céramides. En effet, l'augmentation du taux d'IMCL est généralement associée à des taux d'acides gras libres libérés par le tissu adipeux dans le sérum chez les patients atteints d'obésité ou de diabète. En effet, l'insuline n'étant plus capable d'agir sur le tissu adipeux, elle ne peut plus inhiber la lipolyse. Ainsi l'absorption du glucose altérée dans le muscle est en conséquence détournée vers le foie (Samuel & Shulman 2012).

(cc) BY-NC-ND

De la même façon, des dérégulations dans l'activité mitochondriale semblent participer au développement de cette pathologie. En effet, les défauts dans la phosphorylation oxydative par les mitochondries observés au niveau du muscle des patients atteints d'un diabète de type II ou d'obésité pourraient participer à l'augmentation du taux d'IMCL. La protéine PGC1-α joue un rôle majeur sur l'activité mitochondriale et dans le muscle squelettique. Il favorise la biogénèse mitochondriale, la conversion des fibres de type II vers les fibres de type I et il joue un rôle dans l'oxydation lipidique (Luquet *et al.* 2003; Wang *et al.* 2004). Une surexpression de *Pgc1α* augmente l'activité mitochondriale et favorise l'oxydation des acides gras et le transport du glucose dans le muscle (Benton *et al.* 2008). De la même façon, les souris déficientes en *p43*, un récepteur à l'hormone T3 (Triiodothyronine) de la matrice mitochondriale présentent une augmentation de la masse musculaire associée à une hypertrophie des myofibres et à une conversion des fibres oxydatives vers les fibres glycolytiques (Pessemesse *et al.* 2012). De plus, les souris *p43*$^{-/-}$ développent en vieillissant une hyperglycémie, une intolérance au glucose et une insulino-résistance musculaire (Blanchet *et al.* 2012; Bertrand *et al.* 2013). D'autres travaux ont également révélé que des souris soumises à un régime alimentaire riches en matières grasses possédaient moins de fibres de type I (Abou Mrad *et al.* 1992).

Ces résultats, démontrent que le métabolisme des fibres musculaires varie dans les cas d'insulino-résistance. Des observations similaires ont été faites chez certains patients atteints de diabète de type 2 ou d'obésité. Le muscle squelettique de ces patients présente une capacité oxydative réduite, une augmentation de sa capacité glycolytique, et une diminution du pourcentage de fibres de type I (Lillioja *et al.* 1987).

La voie SMAD3 associée à TGFβ-1 semble être également impliquée dans les processus d'insulino-résistance. En effet, les souris traitées avec des anticorps anti TGFβ-1 semblent être protégées contre le développement du diabète de type II et de l'obésité (Yadav *et al.* 2011). Les souris déficientes en SMAD3 ou *Smad3*$^{-/-}$, présentent une sensibilité à l'insuline accrue et une tolérance au glucose plus élevée (Tan *et al.* 2012). Mais ces travaux sur les souris *Smad3*$^{-/-}$ semblent aussi indiquer que cette voie de signalisation serait plus impliquée dans la régulation de la voie insulinique dans le tissu adipeux que dans les autres tissus.

La myostatine joue aussi un rôle dans la voie de signalisation de l'insuline. Les souris *Mstn*$^{-/-}$, présentent des taux de triglycérides et de cholestérol réduits par rapport aux souris sauvages, une sensibilité à l'insuline et une tolérance au glucose accrues, et semblent être protégées contre la prise

(cc) BY-NC-ND

de poids liés à l'âge (McPherron & Lee 2002; Morissette *et al.* 2009b; Zhang *et al.* 2011b; Jackson *et al.* 2012). Les niveaux lipidiques intramusculaires et les taux de triglycérides hépatiques sont également diminués (McPherron & Lee 2002; Guo *et al.* 2009). De plus, des travaux ont montré que les symptômes spécifiques de l'insulino-résistance étaient diminués lorsque des modèles murins spécifiques de l'obésité ou du diabète étaient croisés avec des souris *Mstn*$^{-/-}$ (McPherron & Lee 2002). Les derniers de travaux de l'équipe de Kambadur tendent à montrer que la myostatine agirait sur la sensibilité à l'insuline via son action sur l'activation de l'AMPc. La perte de la myostatine dans les souris *Mstn*$^{-/-}$ permettrait l'activation de l'AMPc qui favoriserait l'oxydation des acides gras mais également la translocation de GLUT-4 à la membrane plasmique (Zhang *et al.* 2011a). Ces résultats sont en accord avec une étude récente qui a révélé que des cellules musculaires traitées avec la myostatine présentaient une diminution de l'expression de *Glut-4* et une diminution du transport de glucose (Takahashi *et al.* 2014).

INSULINO-RESISTANCE HEPATIQUE

Au niveau du foie, l'insuline régule négativement la glycogénolyse et la néoglucogenèse et augmente la synthèse de glycogène, ce qui a pour conséquence la diminution de production de glucose hépatique. En cas d'insulino-résistance, le foie devient la principale cause de l'hyperglycémie à jeun dans le syndrome métabolique (Rask-Madsen & Kahn 2012). Chez les souris, la suppression de production de glucose hépatique est complètement perdue lors de la délétion du récepteur de l'insuline au niveau des hépatocytes. Au niveau moléculaire, cela se traduit par une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la gluconéogenèse, *Pck* et *G6pc* et une diminution de l'expression d'enzymes qui régulent la synthèse de glycogène et la glycolyse comme la glucokinase et la pyruvate kinase. L'insulino-résistance hépatique et l'hyperinsulinémie affectent les niveaux de lipides circulant. En effet, les patients atteints d'obésité ou d'un diabète de type II présentent des concentrations plasmatiques élevées d'acides gras et des triglycérides et des concentrations relativement faibles de LDL (lipoprotéines de basse densité). Ceci est dû à l'inactivation de la voie PI3K/AKT dans les cas d'insulino-résistance et dans une moindre mesure par l'inhibition de SREBP-1C (Rask-Madsen & Kahn 2012). En condition normale, l'insuline via SREBP-1c augmente la synthèse des acides gras et des triglycérides et la transcription des enzymes lipogéniques, y compris l'acétyl-coenzyme A carboxylase et l'acide gras synthétase. L'insulino-résistance du foie est également souvent associée à la stéatose hépatique (Samuel & Shulman 2012). La voie des JNK et plus particulièrement JNK1 est impliqué dans le processus d'insulino-résistance hépatique. En effet, *TNF-α* va activer IKK qui à son tour phosphoryle JNK1 qui favorise la lipogenèse. Le système UPR peut également augmenter ce processus via XBP1 (X-box Binding Protein 1) et la gluconéogenèse via

(cc) BY-NC-ND

C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein). Enfin, des souris présentant une mutation perte de fonction (nommée Ln pour Lean) pour le gène de la *myostatine* ou $Mstn^{Ln/Ln}$, ont des taux sériques de TNF-α réduits et sont protégés contre l'insulino-résistance hépatique (Wilkes *et al.* 2009).

PATHOLOGIES METABOLIQUES

Le syndrome métabolique correspond à l'association de plusieurs défauts du métabolisme comme une pression sanguine élevée, une hyperglycémie et une augmentation de la masse graisseuse. De nombreuses pathologies sont associées à ce syndrome, notamment le diabète de type II et l'obésité.

Le diabète de type II se traduit par une hyperglycémie, une hyperinsulémie, une dyslipidémie et très souvent une obésité (Lebovitz 1999; Reaven 2005). Le diabète de type II représente environ 90% des cas de diabète dans le monde. Sa prévalence est en augmentation ces dix dernières années, environ 170 millions de personnes sont concernées par cette pathologie (Wild *et al.* 2004). Le diabète est une pathologie multifactorielle qui associe facteurs génétiques et environnementaux. Elle est la conséquence d'une insulino-résistance et de défauts de sécrétion d'insuline des îlots pancréatiques. Une augmentation des adipokines, résistine, leptine, TNF-α, IL-6 et MCP-1 ((Monocyte chemoattractant protein-1), est observée chez les patients atteints de diabète de type II (Samuel & Shulman 2012). Des études récentes ont également démontré que les taux de myostatine circulantes étaient corrélés avec le diabète de type II (Brandt *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012). La progression de cette pathologie a été définie en 5 phases (Weir & Bonner-Weir 2004). Durant la première phase, l'insulino-résistance est compensée par une augmentation de la sécrétion de l'insuline, qui résulte d'une augmentation de la quantité de cellules β pancréatiques et de l'activité de ces cellules. Lors de la deuxième phase, les cellules β ne sont plus capables de compenser l'insulino-résistance et une hyperglycémie apparaît. Au cours de la troisième phase, l'hyperglycémie provoque une glucotoxicité qui empêche la sécrétion normale d'insuline par les cellules β, ce qui permet l'acidocétose due à l'accumulation de corps cétoniques. Au cours de la quatrième étape, le faible taux d'insuline permet encore de limiter l'acidocétose. Celle-ci n'est plus continue au cours de la dernière étape. Le sujet devient alors dépendant d'un apport exogène d'insuline.

L'obésité correspond à une augmentation drastique de la masse corporelle due à une accumulation de la masse graisseuse et des défauts métaboliques. L'augmentation de la prévalence de l'obésité a attiré l'attention sur un vrai problème mondial. D'après l'OMS (Organisation mondiale de la santé), le nombre de cas d'obésité aurait doublé depuis 1980. En 2014, plus de 1,9 milliard

(cc) BY-NC-ND

d'adultes (personnes de plus de 18 ans) seraient en surpoids. Sur ce total, plus de 600 millions seraient obèses. Aux États-Unis, seulement un tiers des adultes auraient un poids dit «normal» et des tendances similaires sont observées dans le monde. L'obésité peut être associée à plusieurs conditions pathologiques, dont la plus dévastatrice est le diabète de type II. Comme cette dernière, l'obésité est souvent associée à l'insulino-résistance. Les patients obèses présentent des taux élevés d'adipokines et de myokines proinflammatoires comme RBP4 (Retinol-Binding Protein 4), la résistine, la leptine, TNF-α, IL-6 et MCP-1 et la myostatine (Allen *et al.* 2011). RBP4 induit une insulino-résistance en diminuant l'activation de la voie PI3K/AKT dans le muscle et en favorisant l'expression de *Pck* dans le foie. Une augmentation de TNF-α, d'IL-6 et de MCP-1 est également observé dans la circulation sanguine de patients obèses (Fain *et al.* 2004; Kahn *et al.* 2006). TNF-α et d'IL-6 agissent via la voie JNK pour activer les médiateurs potentiels de l'inflammation qui peuvent conduire à l'insulino-résistance (Kahn *et al.* 2006).

La myostatine semble donc jouer un rôle clé dans l'homéostasie du glucose **(Tableau 6)**. Comme pour le muscle, son invalidation offre de nouvelles perspectives pour soigner l'obésité ou le diabète de type II. Dans ce contexte, de nombreux travaux ont été réalisés avec les inhibiteurs de la myostatine comme le propeptide, la follistatine et FSTL3 **(Tableau 6)**. Les souris qui surexpriment *Fst* présentent un phénotype hypermusclé ainsi qu'une diminution de l'accumulation de gras (Gangopadhyay 2013). La follistatine favorise également la différenciation du tissu adipeux brun et régule positivement l'expression des marqueurs spécifiques de l'oxydation des acides gras, de la biogenèse mitochondriale et de la dépense énergétique (Braga *et al.* 2014). De la même façon des souris surexprimant *Fstl3* soumises à un régime alimentaire riche (HFD) présentent également une sensibilité à l'insuline accrue et une diminution de la masse adipeuse (Brandt *et al.* 2015). Mais de façon surprenante, les souris KO pour *Fstl3* développent plusieurs phénotypes dont une augmentation de la taille et du nombre d'ilots pancréatiques, une diminution de la masse adipeuse viscérale et une sensibilité à l'insuline accrue (Mukherjee *et al.* 2007). Ces résultats suggèrent que les rôles de la follistatine et FSTL3 sont complexes et multiples et que leurs actions sur d'autres acteurs du métabolisme comme l'activine pourraient expliquer tous ces différents phénotypes.

(cc) BY-NC-ND

TABLEAU 6. PHENOTYPES METABOLIQUES OBTENUS LORS DE L'INVALIDATION DE LA MYOSTATINE.

		REGIME STANDARD		HFD	
Modèle murins	**Muscle**	**Masse adipeuse**	**Autres**	**Masse adipeuse**	**Autres**
Mstn-/-	Hypertrophie Hyperplasie Fibre glycolytique ↑	↓	↑ TG ↑SI	↓	↑ TG ↑SI
Mstn$^{Ln/Ln}$		↓		↓	↑SI
Mstn-/-, ob/ob				↓	↓Hg
Mstn-/-, Av/a				↓	↑ TG
Fstl3-/-		↓	↑SI		
Muscle spécifique					
Mstn Propeptide	Hypertrophie Hyperplasie			↓	↑ TG ↑SI
DN Acvr2b	Hypertrophie Hyperplasie	↓	↑ TG ↑SI	↓	↑ TG ↑SI
Mstn	Atrophie	↑			
Fstl3	↑			↓	↓ TG ↑SI
Tissu adipeux spécifique					
DN Acvr2b					
Mstn			↑ TG	↓	↑ TG
Protéines injectées					
FST288	Hypertrophie ↑ Fibre glycolytique ↑	↓			

Acvr2b, Activin receptor type IIb ; *DN, Dominant Négatif ; FST288, Follistatine 288 (isoforme) ; Fstl3, Follistatin-like 3 ; HFD, HFD ; Mstn, myostatine ; TG, Tolérance au glucose ; SI, Sensibilité à l'Insuline.*

La myostatine se présente comme un acteur important impliqué à la fois dans le développement musculaire et dans l'homéostasie du glucose. Elle participe également à la communication entre les organes, comme le foie, le muscle le pancréas et le tissu adipeux, impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique. Les données de la littérature démontrent que la régulation de la myostatine est un processus complexe et régulé par de nombreux acteurs. Nous pouvons alors nous demander si modifier l'expression de ces différents partenaires conduit systématiquement au même phénotype.

(cc) BY-NC-ND

3. LES PROTEINES GASPs

GASP-1 et GASP-2 (GDF-Associated Serum Protein) sont des protéines sécrétées comprenant plusieurs domaines associées à des inhibiteurs de protéases. Elles sont aussi nommées respectivement WFIKKN2 et WFIKKN1 en référence à leurs domaines WAP (Whey Acidic Protein), Follistatine/Kazal, Immunoglobuline, Kunitz et Nétrine. C'est l'équipe de Hill qui découvre pour la première fois une fonction associée à une de ces deux protéines en recherchant de nouveaux partenaires de la myostatine à partir de sérum humain et murin. Ainsi, ils démontrent que GASP-1 est capable de se lier et d'inhiber la myostatine (Hill *et al.* 2003). Des études *in vitro* plus récentes démontrent que GASP-2 inhibe également cette protéine. (Kondas *et al.* 2008; Szláma *et al.* 2010). Bien que des études *in vitro* suggèrent d'autres fonctions associées aux protéines GASPs, c'est l'intérêt que représente GASP-1, en tant que régulateur de la myostatine au cours de la myogenèse, qui est le plus exploité (Haidet *et al.* 2008).

Le gène *Gasp-1* se situe sur le chromosome 11 chez la souris. Il est composé de deux exons de 738 et 2850 pb respectivement et d'une séquence intronique de 3236 pb **(Figure 19)**. Il code une protéine de 576 acides aminés. Ce gène est également retrouvé chez l'homme (chromosome 17) et chez le bovin (chromosome 19) avec quelques variations dans la taille des séquences exoniques et protéiques. GASP-1 possède un paralogue, GASP-2, avec qui elle partage 54% d'homologie. Le gène *Gasp-2* se situe sur le chromosome 17 chez la souris avec deux exons de 442 et 1539 bp et d'un intron de 695 bp et donne une protéine de 542 aa **(Figure 19)**. Le gène est retrouvé sur le chromosome 16 chez l'homme et le chromosome 25 chez le bovin avec également quelques variations de séquences.

GASP-1 et GASP-2 sont des protéines multidomaines **(Figure 19)** (Trexler *et al.* 2001, 2002). Elles possèdent toutes deux un domaine immunoglobuline de type IgC2 (Immunoglobulin complement 2) et plusieurs domaines retrouvés sur des inhibiteurs de protéases : un domaine WAP connu pour être un inhibiteur des sérines protéases, un domaine Follistatine/Kazal qui est capable de fixer la myostatine et plusieurs membres de la famille des TGFβs par son domaine follistatine et d'inhiber des sérines protéases par son domaine Kazal. Les protéines GASPs font en effet partie de la famille des protéines à domaine FS et sont capables d'inhiber la myostatine et GDF-11 (Hill *et al.* 2003; Kondas *et al.* 2008; Szláma *et al.* 2010).

(cc) BY-NC-ND

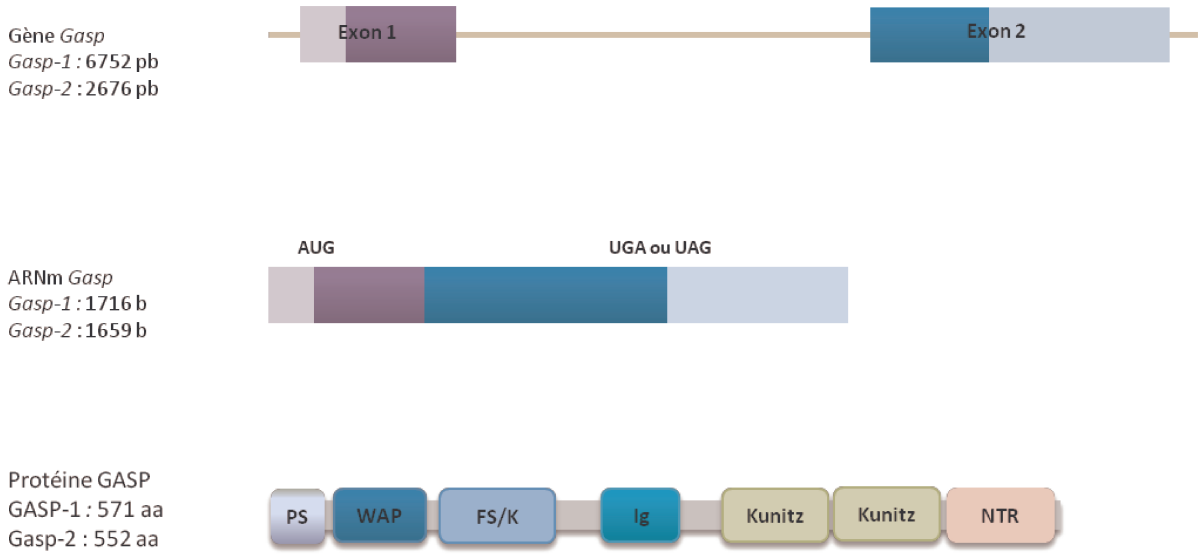

FIGURE 19. STRUCTURE DES GENES ET DES PROTEINES GASPs CHEZ LA SOURIS. Les gènes *Gasp-1* et *Gasp-2* sont constitués de trois exons. Chez la souris, le transcrit *Gasp-1* code pour une protéine de 576 acides aminés et le transcrit Gasp-2 pour une protéine de 542 acides aminés. Ces deux protéines sont composées d'un peptide signal, de plusieurs domaines : WAP, FS/K, Ig (Igc2), Kunitz et NTR. *FS/K, Follistatine/Kazal GASP, Growth and Differentiation Factor-Associated Serum Protein ; Ig, Immunoglobuline ; Igc2 (Immunoglobulin complement 2 ; NTR, Nétrine ; PS, peptide signal ; WAP, Whey Acidic Protein.*

Les protéines GASPs contiennent également deux domaines Kunitz retrouvés sur des protéines qui inactivent des sérines protéases, et un domaine nétrine retrouvé sur les protéines inhibitrices de métalloprotéases. C'est aussi par ce dernier domaine que GASP-1 se lie au propeptide de la myostatine, ce qui constitue une particularité de GASP-1 puisque c'est le seul inhibiteur de la myostatine qui se lie au propeptide (Hill *et al.* 2003).

(cc) BY-NC-ND

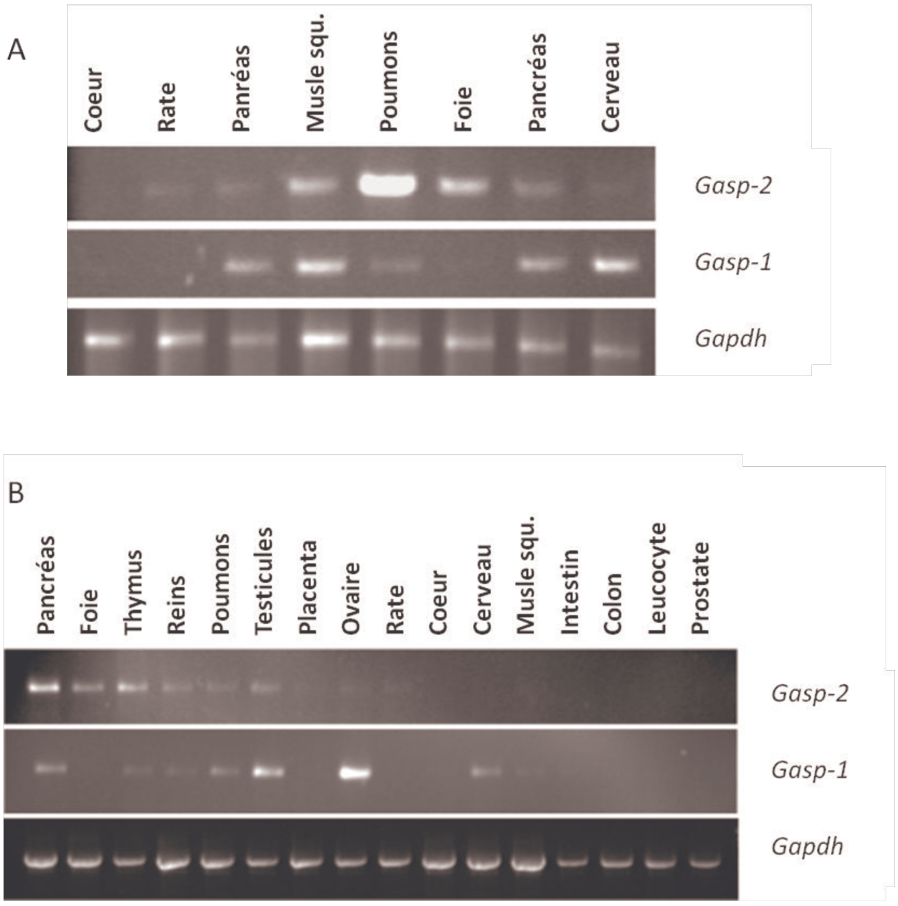

FIGURE 20. NIVEAU D'EXPRESSION TISSULAIRE DES GENES *Gasps* CHEZ L'HOMME. (A) Niveau d'expression tissulaire des gènes *Gasps* au stade fœtaux chez l'homme. (B) Niveau d'expression tissulaire des gènes *Gasps* au stade adulte chez l'homme. *Gapdh, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; Gasp, Growth and Differentiation Factor-associated serum protein.* (Trexler *et al.* 2002).

L'expression tissulaire de ces deux protéines varient entre les espèces et au cours du développement au sein d'une même espèce. Au stade fœtal chez l'homme, *Gasp-1* est exprimé dans le cerveau, les reins, le muscle squelettique, le thymus, et plus faiblement dans les poumons et est absent dans le foie, le cœur et la rate **(Figure 20A)**. A ce stade, *Gasp-2* est également exprimé dans le muscle squelettique, les reins, les poumons, le foie et plus faiblement dans le thymus, le cerveau et la rate **(Figure 20A)** (Trexler *et al.* 2002). Chez l'adulte, *Gasp-1* et *Gasp-2* sont présents dans le pancréas, le thymus, les reins, les poumons, le testicule, et l'ovaire. *Gasp-1* est également retrouvé dans le cerveau et le muscle squelettique et *Gasp-2* faiblement dans la rate **(Figure 20B)** (Trexler *et al.* 2002). Un profil d'expression tissulaire similaire est retrouvé chez la souris pour le gène *Gasp-1* (Hill *et al.* 2003).

BY-NC-ND

Le rôle de l'ancêtre commun des protéines GASPs (WFIKKN chez les chordés invertébrés) aurait été de lier MSTN/GDF-11 (protéine présente chez les amphioxus), l'ancêtre commun de la myostatine et de GDF-11 (Monestier *et al.* 2012b). Ces résultats semblent confirmer par d'autres études *in vitro* démontrant que GASP-1 aurait plus d'affinité pour la myostatine et GASP-2 pour GDF-11 (Szláma *et al.* 2010; Walker *et al.* 2015). Mais les différences dans la distribution tissulaire de ces protéines pourrait également déterminer laquelle des deux régulent l'action de la myostatine et de GDF-11 ou d'autres de leur partenaires.

3.1. Role dans le muscle strie squelettique

Les protéines GASPs présentent dans ce contexte un intérêt particulier : la présence des protéines GASPs dans le muscle squelettique au stade fœtal et dans une moindre mesure au stade adulte leur permettrait de participer à la régulation de la myostatine durant les différentes phases du développement musculaire. De plus, la particularité de GASP-1 et de GASP-2, par rapport à la follistatine, est qu'elles ne lient pas l'activine (protéine de la famille des TGFβs impliqués dans de nombreux processus physiologiques), les rendant plus spécifiques de la myostatine (Szláma *et al.* 2010). De récents travaux montrent que les protéines GASPs pourraient inhiber la myostatine sous sa forme mature mais également sous sa forme latente **(Figure 21)**. En effet, il a été montré que la protéine GASP-1 pouvait s'associer au propeptide de la myostatine par son domaine nétrine (Hill *et al.* 2003). Enfin, ces protéines contiennent également différents domaines retrouvés sur différents inhibiteurs de protéases. Ces domaines pourraient empêcher l'action de la furine (sérine protéase) et des BMP-1/Tolloid (métalloprotéases) impliqués dans la maturation de la myostatine **(Figure 21)** (Kondás *et al.* 2011).

Dans la littérature, peu de travaux utilisant des approches *in vivo* sur les protéines GASPs dans un contexte myogénique ont été décrits. Des études effectuées sur les niveaux d'expression des inhibiteurs de la myostatine au cours de la croissance musculaire longitudinale révèlent que GASP-1 pourrait réguler la myostatine au cours de cette croissance (Aoki *et al.* 2009). Dans l'optique de mettre en place des stratégies thérapeutiques, une injection directe de *Gasp-1* et d'autres inhibiteurs de la myostatine transportés par des adénovirus dans les muscles des membres inférieurs de souris a été réalisée. Cette expérience révèle qu'une surexpression de *Gasp-1* dans ces tissus augmente la masse et la force musculaire mais de façon moins importante que la follistatine (Haidet *et al.* 2008; Rodino-Klapac *et al.* 2009). Des travaux réalisés *in vitro* (Bonala *et al.* 2012) sur des myoblastes humains et murins montrent que la protéine PPARβ/δ activerait GASP-1 pour moduler négativement

(cc) BY-NC-ND

la voie de la myostatine. Une étude récente semble également associer GASP-1 et la croissance musculaire chez les mâles ovidés (Wang *et al.* 2014, 2015).

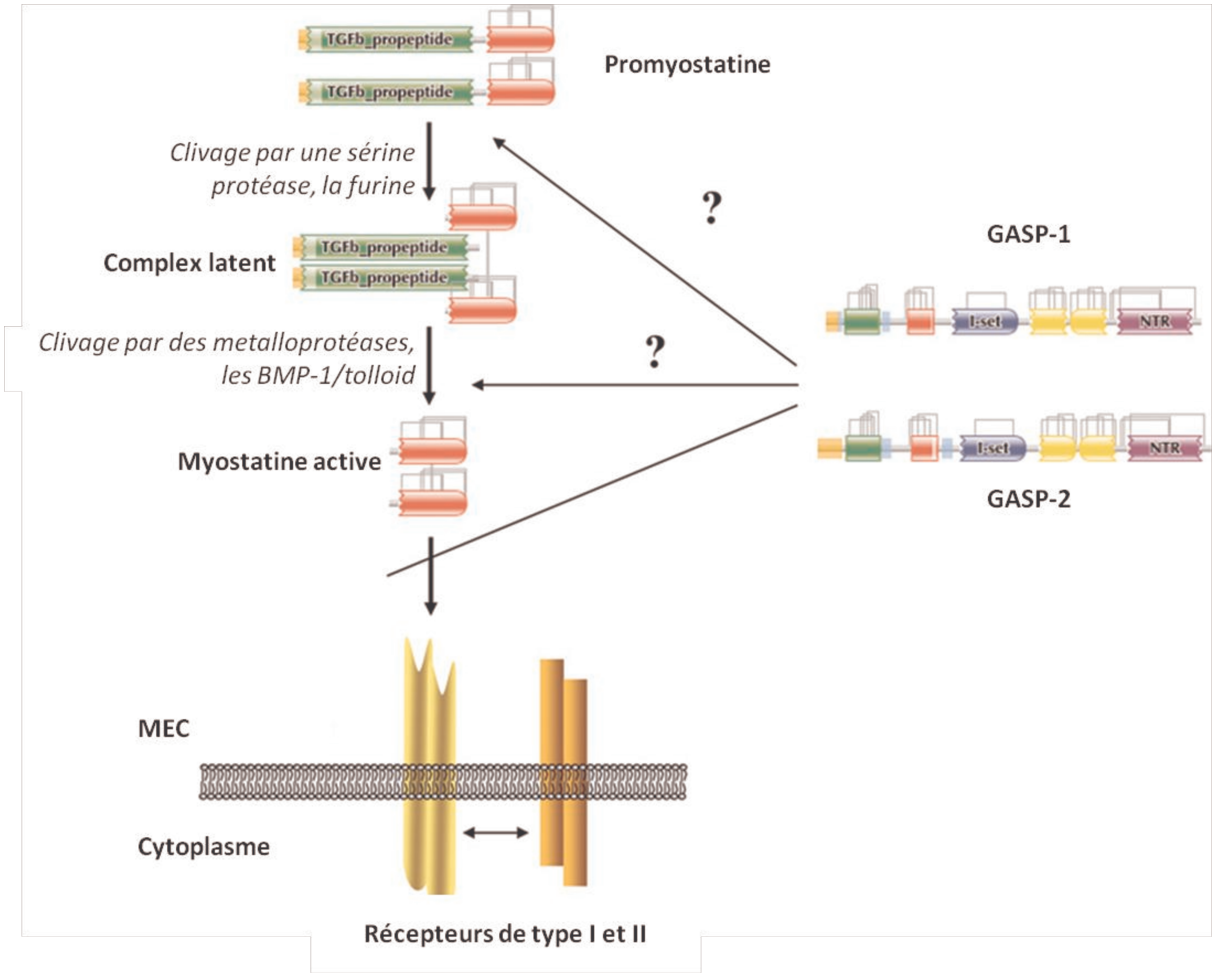

FIGURE 21. FONCTIONS BIOLOGIQUES DES PROTEINES GASPs COMME ANTAGONISTES DE LA MYOSTATINE. Les protéines GASPs bloquent l'activité de la myostatine en l'empêchant de se fixer à son récepteur. GASP-1 et GASP-2 étant des protéines contenant plusieurs domaines inhibiteurs de protéases, elles pourraient également bloquer la maturation de la myostatine en empêchant l'action de la furine et/ou des BMP-1/Tolloid. *BMP-1 Bone morphogenetic protein-1 ; GASP, Growth and Differentiation Factor-Associated Serum Protein ; MEC, Matrice Extracellulaire.* (Kondás *et al.* 2011).

Des résultats relativement similaires ont été obtenus chez des souris qui surexpriment *Gasp-1* (nommées *surGasp1-20* ou *Tg(Gasp-1)*) de façon ubiquitaire (Monestier *et al.* 2012a). Ces souris à 3 mois présentent une augmentation de la masse musculaire associée à une hypertrophie des fibres musculaires, mais sans hyperplasie et sans variation du type de fibres et du pourcentage de masse graisseuse **(Figure 22)** (Monestier *et al.* 2012a). L'absence d'hyperplasie est étonnante en comparaison avec les modèles qui surexpriment la *follistatine* ou *Fstl3*. L'action de la follistatine et FSTL3 sur la myostatine et sur l'activine pourrait expliquer cette différence de phénotype. Une autre

(cc) BY-NC-ND

hypothèse laisse suggérer que GASP-1 n'aurait pas d'effet sur le développement musculaire avant la naissance.

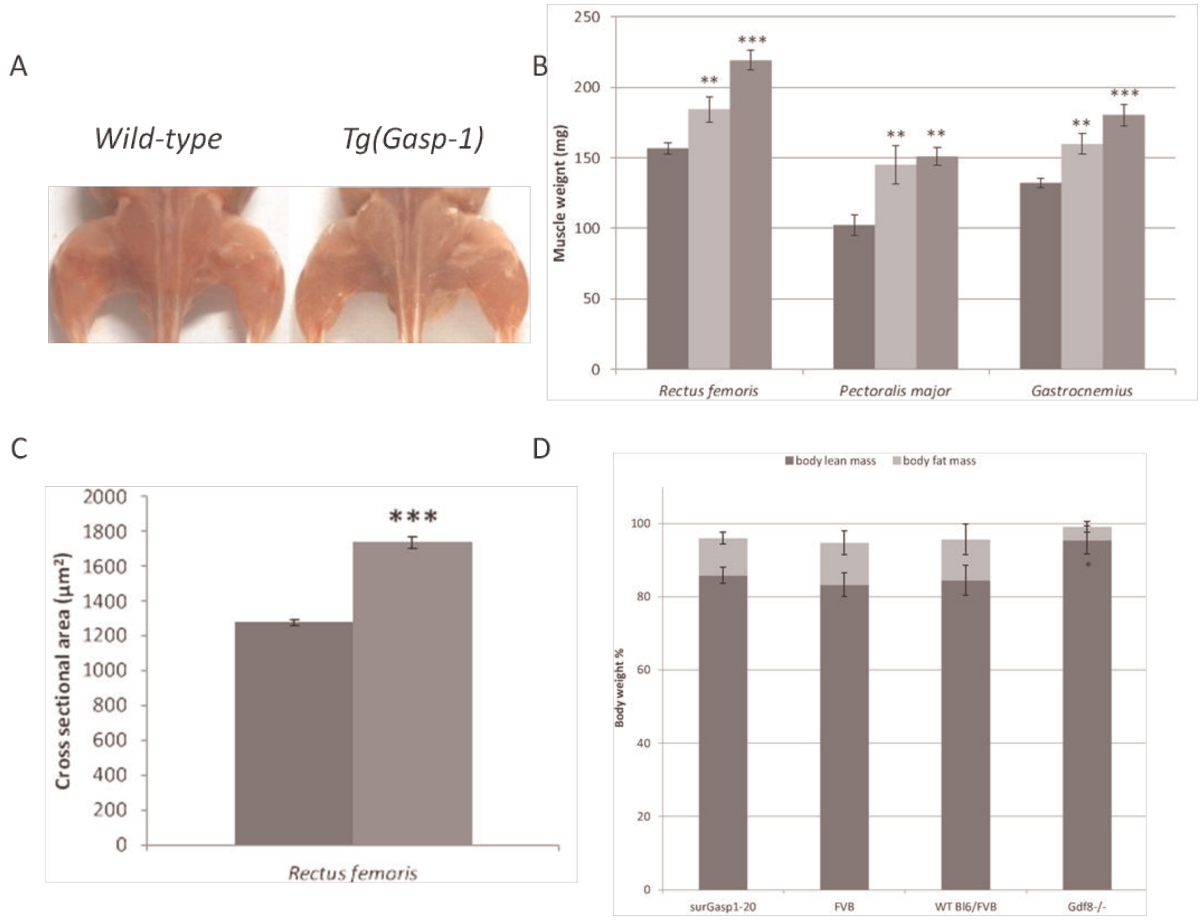

FIGURE 22. PHENOTYPE HYPERMUSCLE DES SOURIS *Tg(Gasp-1)*. Les souris *Tg(Gasp-1)* correspondent à la lignée surGasp-1 20 (représentée sur les graphes en gris clair) et surexpriment *Gasp-1* environ 800 fois et de façon ubiquitaire. La lignée surGasp-1 06 (en gris foncé) surexpriment *Gasp-1* environ 8 fois par rapport aux souris sauvages (en gris très foncé) (A) Photographie des membres postérieurs de souris âgées de 3 mois, sauvages (à gauche) et *Tg(Gasp-1)* (à droite).(B). A 3 mois, les souris *Tg(Gasp-1)* et surGasp-1 06 présentent une augmentation de leur masse musculaire comparée aux souris WT. (C) Cette augmentation est dû à une hypertrophie des fibres musculaires chez les souris qui surexpriment *Gasp-1*. (D). A la différence des souris KO pour la myostatine (*Gdf8*$^{-/-}$) les souris *Tg(Gasp-1)* ne présentent pas de variation du pourcentage de leur masse adipeuse lorsqu'elles sont âgées de 3 mois. *Gasp-1, GDF-associated serum protein-1 ; GDF-8, Growth and differentiation factor-8 ; KO, Knock-out ; WT, Wild-type.* (Monestier *et al.* 2012a).

Si *Gasp-1* a été largement étudié dans un contexte musculaire, ce n'est pas le cas pour *Gasp-2*. Présentant un fort pourcentage d'identité avec *Gasp-1* et n'ayant jamais été retrouvé associé *in vivo* avec la myostatine, peu d'études ont été réalisées sur cet antagoniste dans un contexte myogénique. De plus, différents travaux indiquent que GASP-1 est un plus puissant inhibiteur de la myostatine que GASP-2 (Szláma *et al.* 2010; Walker *et al.* 2015).

(cc) BY-NC-ND

Pourtant, de récents travaux semblent démontrer que *Gasp-2* aurait également un effet sur la croissance musculaire et sur la mise en place du squelette axial (Lee & Lee 2013). Des modèles murins knock-out pour *Gasp-1* ou pour *Gasp-2* (*Gasp-1*$^{-/-}$ et *Gasp-2*$^{-/-}$) ont été générés par l'équipe de Lee **(Figure 23)**. Ces deux modèles présentent une atrophie musculaire observable dès l'âge de 8 mois. Aucune variation n'est observée auparavant et le nombre de fibres ne varie pas chez ces deux modèles murins comparés aux souris sauvages. Ces résultats semblent renforcer l'hypothèse établie précédemment qui serait que *Gasp-1* et *Gasp-2* n'aurait pas d'effet au stade embryonnaire sur le muscle squelettique. Les souris *Gasp-1*$^{-/-}$ semblent présenter une atrophie légèrement plus prononcé (environ 10% de perte de masse musculaire) que les souris *Gasp2*$^{-/-}$ (environ 5 à 7%) suggérant comme précédemment que *Gasp-1* serait un meilleur inhibiteur de la myostatine. Les souris KO pour *Gasp-1* et *Gasp-2* présentent également des défauts de régénération musculaire (Lee & Lee 2013). Les souris *Gasp-2*$^{-/-}$ présentent aussi des défauts au niveau du squelettique et plus particulièrement une postériorisation du squelette axial. Ce résultat est en contraste avec celui observé dans les souris *Gdf-11*$^{-/-}$ *.* Le phénotype squelettique observé lors de l'invalidation de *Gasp-2* est aggravé lorsque ces souris sont croisés avec des souris KO pour la follistatine (*Fst*$^{-/-}$) ce qui suggère une redondance de fonction entre GASP-2 et la follistatine au cours du développement du squelette axial **(Figure 23)**. Les souris *Gasp1*$^{-/-}$ ne présentent pas de défauts dans la mise en place du squelette axial, seul un défaut au niveau du crâne est observé.

(cc) BY-NC-ND

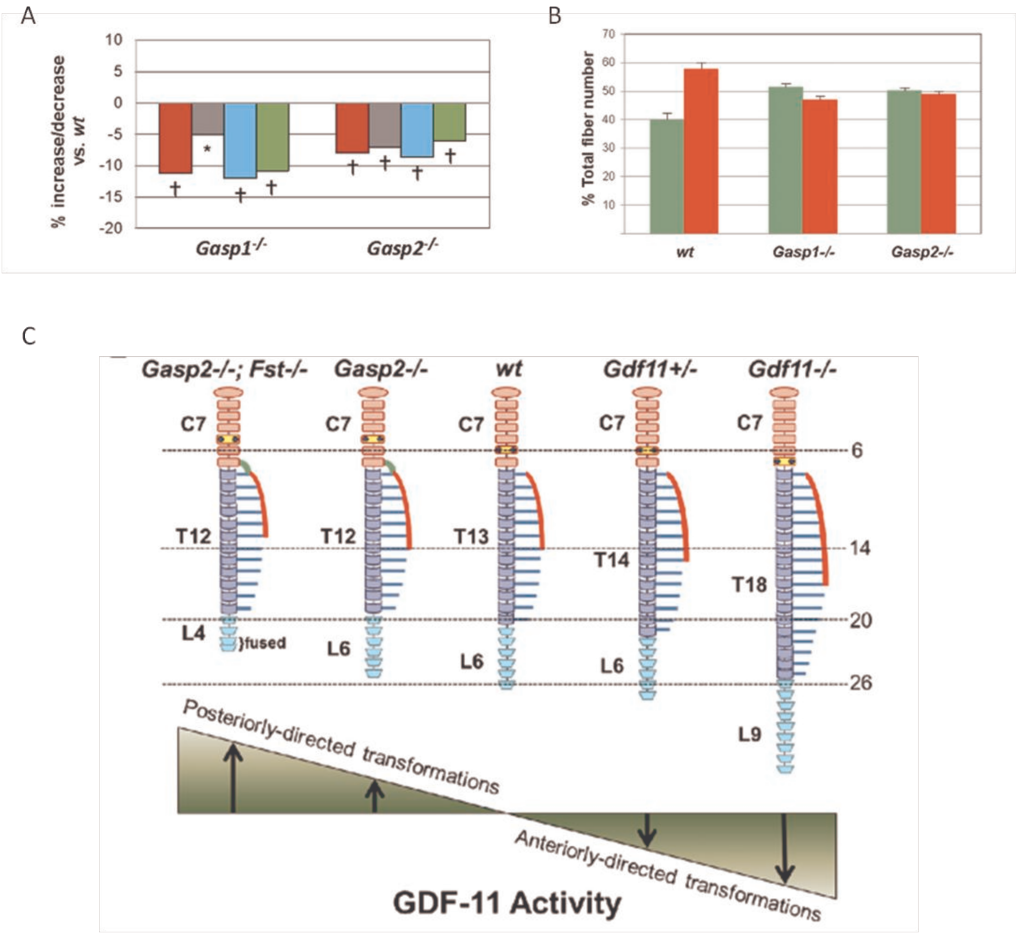

FIGURE 23. PHENOTYPE DES SOURIS *Gasp1*$^{-/-}$ ET *Gasp2*$^{-/-}$. (A) Les souris *Gasp-1*$^{-/-}$ et *Gasp-2*$^{-/-}$ présentent une diminution de leur masse musculaire à partir de l'âge de 8 mois par rapport aux souris sauvages. (B) Aucune variation du nombre de fibres n'est observée entre les souris sauvages et les souris KO pour le gène *Gasp-1* ou *Gasp-2*. (C). Les souris *Gasp-2*$^{-/-}$ présentent des transformations homéotiques de postériorisation. Ce phénotype est aggravé si les souris *Gasp-2*$^{-/-}$ sont croisées avec des souris *Fst*$^{-/-}$ et correspond au phénotype inverse à celui retrouvé chez les souris *Gdf11*$^{-/-}$. *Fst, Follistatine ; Gasp, Growth and Differentiation Factor-associated serum protein ; GDF-11, Growth and Differentiation Factor-11 ; KO, Knock-out ; Wt, Wild-type.* (Lee & Lee 2013).

L'ensemble de ces données va dans le sens d'une implication de GASP-1 et de GASP-2 dans la mise en place du système musculaire. Cependant, des études fonctionnelles et moléculaires plus approfondies restent encore à effectuer, en particulier, pour mieux appréhender les différents rôles de GASP-1 et de GASP-2 dans d'autres organes.

3.2. Autres roles connus

Des analyses *in vitro* sur l'activité inhibitrice de protéase du second domaine kunitz de GASP-2 ont été réalisées, mais aucun effet n'a été détecté sur la plupart des protéases testées (chymotrypsine, furine, BMP1…). Seul une activité contre la trypsine serait pour l'instant associé à ce

(cc) BY-NC-ND

domaine (Nagy *et al.* 2003; Liepinsh *et al.* 2006). Des résultats plus récents sur les protéines GASP-1 et GASP-2 entières confirmeraient leur capacité à inhiber la trypsine (Kondás *et al.* 2011). Les protéines GASPs interagissent également avec TGFβ-1, BMP-2, BMP-4 mais sans inhiber leur activité. GASP-1 et GASP-2 pourraient donc jouer le rôle de transporteur de TGFβs afin de localiser leurs actions (Szláma *et al.* 2010). D'autres études, réalisées chez le rat sur l'homologue de GASP-2, OC29, montrent que cette protéine participerait au développement embryonnaire de l'oreille interne (Nishida *et al.* 2004).

Enfin, leur distribution pluritissulaire suggère d'autres rôles pour GASP-1 et à GASP-2 qui ne sont actuellement pas connus (Trexler *et al.* 2002).

(cc) BY-NC-ND

OBJECTIFS DE THESE

OBJECTIFS DE THESE

L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse s'intéresse à l'étude du déterminisme génétique du développement musculaire dans deux espèces d'intérêt, la souris et le bovin. Elle étudie plus particulièrement la voie de la myostatine et ses inhibiteurs, les protéines GASP-1 et GASP-2. Ainsi, l'équipe a montré que la surexpression de *Gasp-1* se traduit par une augmentation de la prolifération et de la différenciation des cellules musculaires et par une augmentation de la masse musculaire chez la souris associée à une hypertrophie mais sans hyperplasie des fibres (Monestier *et al.* 2012a). De plus, ces souris ne présentent pas de diminution de la masse graisseuse lorsqu'elles sont âgées de 3 mois. Ces résultats *in vivo* différent de ceux observés chez les souris *Mstn*$^{-/-}$. Durant ma thèse, j'ai pu travailler sur les différents projets de l'équipe qui cherche à déterminer les raisons des différences phénotypiques observés entre ces deux modèles transgéniques :

- Comment expliquer l'absence d'hyperplasie observée chez les souris qui surexpriment *Gasp-1* ?
- Quel est le rôle de GASP-1 dans l'homéostasie des glucides et des lipides ?
- Enfin, GASP-2 étant peu étudié dans le contexte musculaire, comment agit-il sur la voie de la myostatine au cours de la myogenèse ? Joue-elle un rôle similaire à celui précédemment observé de GASP-1 ?
- Les protéines GASPs agissent-elles indépendamment de la myostatine ?

(cc) BY-NC-ND

RESULTATS

RESULTATS

CHAPITRE 1. ETUDE DU ROLE DE GASP-1 AU COURS DU DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE

L'absence d'hyperplasie musculaire dans les souris surexprimant Gasp-1 est dépendante de la dérégulation de la voie de la myostatine

Au sein du laboratoire, un modèle surexprimant *Gasp-1* de façon ubiquitaire, *Tg(Gasp-1)*, a été généré (Monestier *et al.* 2012a). Ces souris présentent une augmentation de leur poids total et de leur masse musculaire associée à une hypertrophie observable dès 3 semaines. Cependant, ces souris ne présent pas d'hyperplasie ni de variations du type de fibres musculaires (Monestier *et al.* 2012a). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénotype différent de celui observé chez les souris *Mstn*$^{-/-}$. Le nombre de fibres étant déterminé dès la naissance, l'absence d'hyperplasie pourrait s'expliquer par le fait que la surexpression de *Gasp-1* n'agit pas sur la myostatine au cours de l'embryogenèse. L'hypertrophie observée chez les souris *Tg(Gasp-1)* est due soit à une synthèse protéique accrue et/ou à une augmentation de l'activation des cellules satellites durant la croissance post-natale.

Pour répondre à ces hypothèses, une analyse moléculaire a été réalisée sur des cellules musculaires dérivées des cellules satellites de souris *Tg(Gasp-1)*, *Mstn*$^{-/-}$ et sauvages. Nous avons étudié les capacités de prolifération et de différenciation de ces cellules en les comparant aux cellules sauvages et *Mstn*$^{-/-}$. Les niveaux d'expression de la *myostatine*, de *Gasp-1*, d'autres membres de la famille des TGFβs et de facteurs myogéniques ont été analysés à différents stades embryonnaires et en post-natal.

Absence of hyperplasia in *Gasp-1* overexpressing mice is dependent on myostatin up-regulation

Caroline Brun, Luce Perié, Fabienne Baraige, Barbara Vernus, Anne Bonnieu and Véronique Blanquet. Cell Physiol Biochem, 2014

2014;34(4):1241-59. doi: 10.1159/000366335

(Les données supplémentaires de l'article sont données en **Annexe 1**.)

(cc) BY-NC-ND

Cette étude a permis de révéler chez les souris *Tg(Gasp-1)* une inhibition de la voie des SMAD2/3 ainsi qu'une activation de la voie AKT expliquant l'hypertrophie musculaire observée dès les premiers jours après la naissance (Brun *et al.* 2014). Mais de façon inattendue, nous avons observé une augmentation des taux de transcrits et de protéines de la myostatine dans les souris *Tg(Gasp-1)* dès les premiers stades embryonnaires. Cette dérégulation de l'expression de la *myostatine* serait à l'origine du phénotype hypermusclé particulier observé chez ces souris. Une telle dérégulation des taux de transcrits *Mstn* avait été rapportée par l'équipe de Kambadur, dans leur modèle de souris KO pour *Smad3* et permettait d'expliquer le phénotype musculaire d'atrophie observé (Ge *et al.* 2012). Leur hypothèse est que l'augmentation de l'expression de la *myostatine* observée dans leur modèle est probablement due à l'action d'une boucle de rétrocontrôle positive. Ces travaux démontrent également que la myostatine peut agir sur le développement musculaire indépendamment de la voie SMAD2/3 (Ge *et al.* 2012).

Nous avons également pu détecter une diminution de l'expression de l'I-SMAD, *Smad7*, renforçant ainsi les résultats que l'activation de la myostatine se fait via son autorégulation. Cette surexpression entraîne également une activation de la voie ERK1/2 à l'origine de la dérégulation de PAX7, et montre donc qu'au cours de l'embryogénèse, la myostatine agirait sur la voie ERK1/2 pour contrôler le pool de cellules progéniteurs.

De plus, l'augmentation de l'expression de *Mstn* observée chez les souris *Tg(Gasp-1)* durant les phases embryonnaires et fœtales en contrebalançant celle de *Gasp-1* peut expliquer en partie l'absence d'hyperplasie. Néanmoins, nous ne pouvons exclure l'hypothèse que *Gasp-1* n'agit pas sur les phases myogéniques prénatales.

Enfin, ces travaux ont révélé que la dérégulation de la myostatine influe sur l'expression d'autres TGFβs mettant en lumière l'existence d'un réseau génique entre les membres de cette superfamille.

(cc) BY-NC-ND

CHAPITRE 2. ROLE DE GASP-1 DANS LA PATHOGENESE DU SYNDROME METABOLIQUE

La surexpression de Gasp-1 entraîne des désordres métaboliques suite à la deregulation de la myostatine.

Une autre des particularités du phénotype des souris *Tg(Gasp-1)* est l'absence de variation de masse graisseuse lorsqu'elles sont âgées de 3 mois en comparaison des souris déficientes pour la *myostatine* (Monestier *et al.* 2012a). A ce jour, aucune étude sur l'implication de *Gasp-1* sur le tissu adipeux et de façon plus générale, sur le métabolisme des glucides et des lipides n'a été entreprise. La myostatine joue un rôle important en tant que médiateur entre les tissus impliqués dans ce métabolisme. La surexpression d'un de ses partenaires et inhibiteurs, comme Gasp-1 pourrait avoir modulé son action sur cette communication inter-organes. Nous avons donc entrepris différentes analyses moléculaires et métaboliques sur des souris sauvages et *Tg(Gasp-1)* jeunes et âgées, afin d'étudier les différents processus impliqués dans l'homéostasie glucidique et notamment ceux associés au vieillissement. En effet, les souris *Mstn*$^{-/-}$ sont protégées contre la prise de poids et des défauts métaboliques apparaissant avec l'âge (Zhao *et al.* 2005; Jackson *et al.* 2012).

Alteration of adiposity and glucose homeostasis in adult mice overexpressing *Gasp-1*.

Luce Perié, Caroline Brun, Fabienne Baraige, Laetitia Magnol and Véronique Blanquet.

Soumis dans Open Biology.

*(Les données supplémentaires sont données en **Annexes 2** et **3**.)*

.

(cc) BY-NC-ND

Alterations in adiposity and glucose homeostasis in adult overexpressing Gasp-1 mice

Luce Périè[1], Caroline Brun[2], Fabienne Baraige[1], Laetitia Magnol[1] and Véronique Blanquet[1]

1: Univ. Limoges, INRA, UMR 1061, UGMA, F- 87000 Limoges, France.

2: Present address: Sprott Centre for Stem Cell Research, Ottawa Health Research Institute, ON K1H 8L6 Ottawa, Canada

*Correspondence to: V. Blanquet - Université de Limoges, UMR 1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, Faculté des Sciences et Techniques, 123, av. A. Thomas, F- 87060 Limoges Cedex, France. Tel: +33 555 457 664. Email address: veronique.blanquet@unilim.fr

Abstract

Gasp-1 is a myostatin antagonist, known to regulate myogenesis. Recent studies have shown that myostatin can also impact on metabolism. The myostatin inactivation in Mstn-/- mice leads to an increase of insulin sensitivity, a decrease of adiposity and a resistance to obesity. Surprisingly, we found that overexpressing Gasp-1 mice gained weight with age due to an increase in fat mass associated with ectopic fat accumulation. In addition, these mice develop an alteration of glucose metabolism. This combination of phenotypes appears to arise from an increased myostatin bioactivity by a positive feedback mechanism. Our results demonstrate that Gasp-1 regulation of myostatin is critical for normal adult metabolic homeostasis. Overexpressing Gasp-1 mice develop most of the symptoms associated with metabolic syndrome and could be a model of interest for the study of disease pathogenesis, such as obesity and type 2 diabetes.

Keywords: Gasp-1, whole-body metabolism, myostatin, aging

Introduction

The Transforming Growth Factor β superfamily members are essential regulators of diverse developmental and homeostatic processes in vertebrates and invertebrates including proliferation, growth, differentiation, migration, and death, as well as physiological processes such as wound healing, muscle regeneration [1]. More than thirty closely related proteins form this superfamily which can be divided into two main functional groups, the transforming growth factor beta (TGF β)-like group that induces the receptor-regulated SMAD transcription factors 2 and 3 and the Bone Morphogenetic Proteins (BMP)-like group activating the R-Smads 1, 5 and 8 [2].

Mutations or alterations in the expression of components of these signaling pathways have been associated with a wide range of human pathologies such as cancer, cardiovascular or muscle disorders [3,4]. Therefore, several TGFβ members have frequently been assessed as diagnostic or prognostic markers and are also remarkable targets for drug development [5–7]. TGFβ superfamily signaling is not limited to Smad-mediated pathways, as they can also mediate signaling responses through non-Smad pathways, in particular the mitogen activated protein kinase (MAPK) pathways, including extracellular-signal-regulated kinase (ERK), p38, and Jun N-terminal kinase (JNK); the phosphoinositide 3-kinase (PI(3)K)/Akt pathway, and the NF-κB pathway with a crosstalk between canonical and non-canonical TGF- β pathways.

Myostatin (Mstn), also named Growth and Differentiation Factor-8 (GDF-8) signals through the TGFβ branch and acts as a powerful negative regulator of muscle growth. It plays a key role in skeletal muscle homeostasis. Loss-of-function mutations of the myostatin gene cause in different species increase of skeletal muscle mass resulting from a combination of muscle fiber hypertrophy and hyperplasia [8–11] while myostatin over-expression is associated with dramatic muscle atrophy in mice lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin [12,13].

In addition to its roles in skeletal muscle growth, many in vivo and in vitro studies have reported that Mstn also regulates metabolism by effects on muscle as well as on other metabolic sites such as adipose tissue or liver. $Mstn^{-/-}$ mice have a significant reduction in fat accumulation that becomes exacerbated with aging, an increase of insulin sensitivity on both standard chow and high fat diet

(HFD). As Guo et al. (2009) reported, Mstn$^{-/-}$ mice have increased carbohydrate utilization for energy but the overall lipid utilization per animal did not change [14]. These mice have improved glucose and insulin tolerance and reduced blood glucose and insulin levels [14]. In a hyperinsulinemic–euglycemic clamp study, myostatin deficient mice have increased whole body glucose utilization rate with increases in glucose utilization by white and brown adipose tissue. Treatment with a myostatin antagonist also increased insulin sensitivity during HFD and a resistance to obesity [14–24]. Interestingly, loss of myostatin partially attenuates the obese and diabetic phenotypes of two mouse models of obesity and diabetes, agouti lethal yellow (A^y) and obese ($Lep^{ob/ob}$). [25–29].

Myostatin activity is mostly regulated by its extracellular inhibitors such as the myostatin propeptide, follistatin, follistatin like 3 and GASP-1 [30–32]. Transgenic mice overexpressing the follistatin gene or the Fstl3 gene in skeletal muscle have increased skeletal muscle mass due to hypertrophy and hyperplasia and associated with a loss of global fat mass and adipose tissue [33,34]. Likewise, transgenic overexpression of myostatin propeptide at three months of age prevents diet-induced obesity and insulin resistance [29]. Altogether, these data would suggest that transgenic for which myostatin is inhibited or reduced present a resistance to diet induced obesity and are protected against the development of insulin resistance. But compared to these models, Tg(Gasp-1) overexpressing Gasp-1 mice present only a myofiber hypertrophy without hyperplasia and without a switch of fiber types No significant loss of fat mass was observed in Tg(Gasp-1) [32]. Using protein arrays on satellite cell derived myoblasts from Tg(Gasp-1) mice, we have shown an up-regulation of myostatin associated with an activation ERK1/2 signaling pathway and a decrease of Pax7 expression, which could explain the absence of hyperplasia in our model [35]. We also hypothesized that this myostatin up-regulation could be responsible for the absence of fat mass variation. To test this hypothesis, we better characterized the Tg(Gasp-1) phenotype, with a particular focus on age related alterations in metabolism. We show that old Tg(Gasp-1) mice present an increase of fat mass, an hyperglycemia, an hyperinsulinemia and a hepatic steatosis. At the molecular level, in addition to the up-regulation of the myostatin, we show a decrease of the muscle-specific glucose transporter Glut4 and an up-regulation of proinflammatory cytokines. Our results suggest that these myokines influence the crosstalk between

skeletal muscle and adipose tissue and liver, contributing to the development of a metabolic syndrome in Tg(Gasp-1) mice.

Materials & methods

Animals

Transgenic mice overexpressing Gasp-1 were generated in our team as described previously [32]. Briefly, the Tg(Gasp-1) present an increase of body weight associated with a hypermuscular phenotype. At 3 months of age, these mice present a hypertrophy of myofibers but no hyperplasia. All mice were bred and housed in the animal facility of University of Limoges under controlled conditions (21°C, 12-h light/12-h dark cycle) with free access to standard mouse chow (RM1 (P) 801151, Special diets services) and tap water.

Phenotypic and Metabolic analyses

To monitor body weight gain, animals were weighed once a week during 16 months. Body composition analysis to determine fat and muscle contents was performed on conscious mice at 10 weeks of age, using the EchoMRI-500™ whole body composition analyzer (Echo Medical Systems). WT and Tg(Gasp-1) mice from different ages (n = 7 per group) were fasted 16 h before blood sampling. Blood samples were collected in lithium heparin tubes under isofluorane anesthesia following the recommendations of ethical guidelines. At the collection day, blood samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes and plasmas were harvested then analyzed on a KONELAB 30 automat as previously described [36].

Muscle and adipose tissue weights were measured following dissection of 3 months and 16 months old mice. Individual muscles from both sides of the animal were taken and the average weight was used for each muscle.

Histological analysis

Tissues were collected from WT and Tg(Gasp-1) mice at different ages and fixed in formol for 3 days. Then, tissues were embedded in paraffin and sectioned with microtome in 4 µm thickness. The

sections were stained with hematoxylin and eosin. Measurements of area/size and quantification of adipocytes and pancreas islets were realized with ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

Oil Red O solution was prepared in propylene glycol (5 $g.l^{-1}$) and heated at 100°C for 10 min. Frozen liver were sectioned with a cryostat (8 µm thick) and dried for 15 min at 37°C. Sections were then fixed for 10 min in 10% formol /PBS (v/v). To detect neutral lipid accumulation, sections were stained with Oil Red O for 10 min at RT and counterstained with hematoxylin for 2 min at RT.

RNA isolation, retrotranscription and qPCR

Total RNA from tissues were isolated using RNeasy midi kit (Qiagen). Synthesis of cDNA was performed with the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) to convert 2 µg of total RNA into single-stranded cDNA. Real-time quantitative PCR was performed on an ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) in triplicate using 20 ng of cDNA. The total reaction volume of 17.5 µl was made of 8.75 µl 2×Master Mix SYBR Green (Applied Biosystems) and 300 nM of primers (Table 1). Relative mRNA expression values were calculated by the ΔΔCt method with normalization of each sample to the average change in cycle threshold value of the controls.

Western blotting

Tibialis anterior were crushed, centrifuged (12,000 × g, 4°C, 20 min) and then lysed in a RIPA buffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, and protease inhibitors). Proteins were quantified at A_{595nm} using the Bradford assay (Bio-Rad). Equal amounts of proteins (50 µg) were resolved on SDS-polyacrylamide gels (4-12% gradient, Invitrogen) and then transferred onto 0.2 µm nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked using 5% non-fat dry milk (w/v) in TBST0.1% buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.1% Tween-20) for 1 h at room temperature, followed by incubation with specific primary antibodies overnight at 4°C. Primary antibodies were respectively used at a dilution of 1:1000 for anti-GLUT-4 antibody (MAB1272, R&D Systems) and 1:2000 for anti-GAPDH (AF5718, R&D Systems). After 4 washes in TBST 0.1% (v/v), membranes were incubated for 1 h at room temperature with 1:1000

dilution of secondary antibodies: anti-goat IgG horse-radish peroxidase (HRP) conjugate (P0449, Dako) or anti-mouse IgG HRP conjugate (P0447, Dako). After 4 more washes in TBST 0.1% (v/v), immunoblots were developed by enhanced chemiluminescence. The developed films were analyzed using ImageQuant TL software (GE Healthcare).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of myostatin and insulin

Myostatin concentration for mouse plasmas were determined in a sandwich ELISA (GDF8/Myostatin ELISA kit, R&D Systems), as described previously [35]. Insulin concentrations were also determined in a sandwich ELISA (Rat/Mouse Insulin ELISA kit, Millipore). All measurements were performed in triplicate and data for the standard curve were fitted to a logistic plot with the MARS Data Analysis Software (BMG Labtech) to determine the levels of myostatin and insulin.

Cytokines antibodies array

Mouse cytokine array (Proteome Profiler Mouse Cytokine Array KitR&D Systems) were used following the manufacturer's instructions on mouse tibialis Anterior. The arrays were incubated overnight at 4°C on a rocking platform shaker. The blots were detected using an enhanced chemiluminescence (BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate (POD)) (Roche Applied Science) and exposed to a film (GE Healthcare Hyperfilm ECL, GE Healthcare). Densitometric analysis of the array image files were performed using ImageQuant TL software (GE Healthcare).

Results

Overexpression of Gasp-1 leads to an increase of body weight and fat mass with age

The myostatin knockout mice phenotype, i.e increase of muscle mass and reduced adipose tissue do not vary with age [16]. As GASP-1 acts as an inhibitor of myostatin, we checked if age-related variations in Tg(Gasp-1) phenotype occur. First, we compared the body weight of wild type and Tg(Gasp-1) mice at three and sixteen months of age. While we observed that both genotypes took weight with aging, this increase is twice more important for aged Tg(Gasp-1) mice than WT **(Fig 1A-**

B). One hypothesis is the body weight gain is related to an increase of global fat mass. Therefore, we calculate the percentages of lean and fat mass of Tg(Gasp-1) mice compared to wildtype **(Fig 1C)**. Only, an increase of fat mass is observed in old Tg(Gasp-1) mice. No significant difference was observed in young mice **(Fig 1C)**. We tested if this fat mass increase is associated with an increase of muscle mass in old Tg(Gasp-1). We measured weight of three different muscles representative of each muscular metabolism: the soleus (slow oxidative), the tibialis anterior (fast, glycolytic), and the gastrocnemius (which have both oxidative and glycolytic myofibers). As already shown in young Tg(Gasp-1) mice [32], we observed an increase about 10% (tibialis) and 18% (gastrocnemius) in Tg(Gasp-1) mice at 16 months of age . No variation was detected in soleus **(Fig 1D)**. We also showed a decrease of muscle mass associated with aging in WT mice but muscle of Tg(Gasp-1) mice seemed to be protected against this decrease **(Fig 1D)**.

Fat mass accumulation is due to both WAT mass increase and ectopic fat deposition in liver

To determine the location of the fat mass accumulation in old Tg(Gasp-1) mice, we analysed the relative proportion of epididymal and inguinal masses, two white adipose tissues, compared to body weight **(Fig 2A)**. While the increase of white adipose tissue is observed in old wildtype and mutant mice compared to young animals, the variation was more important in transgenic mice **(Fig 2A)**. Histological analyses revealed an increased adipocyte cross-sectional area (CSA) in old Tg(Gasp-1) with a distribution of more larger adipocytes compared to WT mice **(Fig 2B)**. In a lesser extent, this distribution was also slightly shifted towards larger adipocytes in young transgenic mice. Altogether, these results highlighted an adipocyte hypertrophy in Tg(Gasp-1) animals with a more pronounced effect in old mice.

As liver tissue is capable of storing fat mass, we realized an Oil red O staining on liver frozen sections of young and aged WT and Tg(Gasp-1) mice **(Fig 2C)**. We observed extensive lipidic macrovesicular and microvesicular in liver of old Tg(Gasp-1), revealing an hepatic steatosis **(Fig 2C)**.To check if the mice developed a hepatic necrosis too, the alanine aminotransferase (ALT C) and asparagine aminotransferase (AST C) enzymes activities were scored in both genotypes **(Table 2)**.

Aged transgenic mice present a significant higher level of ALT C and ATC C enzymes **(Table 2)**. These results underlined a global deregulation of fat storage with an increase of fat mass and ectopic fat deposition in aged Tg(Gasp-1) mice. Therefore, we measured their levels in liver as well in serum of young and old mice. No variation was observed in young WT and Tg(Gasp-1) mice **(Fig 2D)**. However, a significant increase of triglycerides was detected in aged Tg(Gasp-1) mice **(Fig 2D)**.

Old Tg(Gasp-1) mice develop an alteration of glucose homeostasis

We then measured glucose rates and insulin level in serum of young and old transgenic mice. The sugar level was significantly higher in aged Tg(Gasp-1) mice than aged WT **(Fig 3A)**. No variation was observed between WT and Tg(Gasp-1) young mice. An increase of the insulin level was also observed **(Fig 3B)** confirming a glucose homeostasis deregulation. If insulin cannot act on the liver, the gluconeogenesis gene expression should increase. Therefore, we analyzed the expression of two key enzymes of this metabolic pathway, Pck1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1) and G6Pase (glucose-6-phosphatase) Pck1 expression was up-regulated by 3-fold in aged Tg(Gasp-1) while a slight increase of G6Pase (1.5-fold) was observed **(Fig 3C)**. There was no significant variation of Pck1 and G6Pase expression in young mice **(Fig 3C)**. This result confirmed an elevation of hepatic gluconeogenesis which contributes to hyperglycemia. To evaluate if Tg(Gasp-1) mice develop glucose uptake defects in muscle, we analyzed the expression of the glucose transporter GLUT-4, which is regulated by insulin and found specifically in heart tissue, skeletal muscle, and adipose tissues. Western blot analysis revealed a decrease of GLUT-4 expression in tibialis anterior muscle of Tg(Gasp-1) mice compared to WT regardless of age **(Fig 3D)**.

The alteration of glucose homeostasis can lead to modifications of muscle metabolism, notably a switch of slow- to fast-type myofibers. According to their myosin heavy chain (Myh) expression profiles, myofibers can be classified in two types: slow-type myofibers or type I expressing Myh7 and fast-type myofibers or type IIa, IIx and IIb expressing Myh2, Myh1 and Myh4 respectively. Q-PCR analyses performed on tibialis anterior muscles of young Tg(Gasp-1) mice revealed a 4.5 fold up-regulation of Myh7 compared to WT **(Fig. 4A)**. Myh7 is drastically decreased in the aged Tg(Gasp-1)

mice. To confirm these data, we quantified the expression level of *Pgc1α* and FoxO1 genes which are essentially expressed in slow-type and fast-type myofibers respectively. While no variation of FoxO1 expression was observed, *Pgc1α* expression was increased by 2 fold in young Tg(Gasp-1) mice compared to WT **(Fig. 4B)**. In Tg(Gasp-1) mice, *Pgc1α* expression was decreased at 16 months of age compared to young mice. These results showed a global decrease of slow-type myofibers in Tg(Gasp-1) as well as the development of a metabolic syndrome with aging responsible for the deregulation of glucose and fat homeostasis in Tg(Gasp-1) mice.

Myostatin and myokines can be the cause of the metabolism phenotype in Tg(Gasp-1) mice

Molecular analysis performed on 3 months of age Tg(Gasp-1) mice revealed an increase of myostatin expression related to its auto-regulation and despite its inhibition, myostatin led to Pax7 deregulation through its non-canonical Erk1/2 signaling pathway [35]. We hypothesized that the up-regulation of myostatin is responsible for muscle metabolism deregulation associated with age in Tg(Gasp-1) mice. Therefore, we measured myostatin expression on tibialis anterior and found a myostatin expression increase by 5 fold in old Tg(Gasp-1) mice compared to WT mice **(Fig 5A)**. In serum, this up-regulation is also observed **(Fig 5B)**. To get a better insight into the molecular mechanism, we tested the proinflammatory myokines, the Tumor necrosis factor, chemokine C–C motif ligand 2, and plasminogen activator inhibitor-1 that are overly secreted in metabolic diseases associated with insulin resistance such as obesity and type 2 diabetes. As shown in Table 3, Tg(Gasp-1) mice present an significant increase of TNF-α and the chemokine CXCL10 and to a lesser extent the chemokines CXCL 2, 11,12, CCL17, the interleukin IL17 and TIMP-1. These data suggested that Tg(Gasp-1) mice exhibit the most common metabolic symptoms of a type 2 diabetes and obesity.

Discussion

To highlight the role of Gasp-1 in muscle development and metabolism, we have generated a mouse model overexpressing Gasp-1. Phenotypic analyses at 3 months of age revealed that these mice present muscle hypertrophy without hyperplasia and no loss of fat mass. The adipose phenotype in young Tg(Gasp-1) was unexpected compared to $Mstn^{-/-}$ mice which present a loss of fat mass at the

same age [16]. To determine whether a reduced adiposity occurs later, we carried out our phenotypic analyses on old mice. Unexpectedly, we showed that Tg(Gasp-1) animals gained weight with age due to an increase in fat mass associated with ectopic fat accumulation. In addition, Tg(Gasp-1) mice develop an adipocyte hypertrophy, and alteration of glucose homeostasis. All these symptoms showed that the Tg(Gasp-1) mice present an opposite phenotype as other models overexpressing myostatin inhibitors. It was reported that mice overexpressing follisatin have a decrease body fat mass and an increase insulin sensitivity [34]. Likewise, Fstl3 overexpressing mice subjected to a High Fat Diet exhibit this phenotype too [33]. GASP-1 is not known to inhibit activin, another TGF-β member participating in the metabolism and muscle development, unlike FST and FSTL3 which inhibit both myostatin and activin [31,37–40]. Therefore, the phenotypic differences observed in these three transgenic models might be explained by the action of Fst and Fstl3 on activin. In addition, we have recently shown that the Tg(Gasp-1) mice present an upregulation of myostatin by a feedback loop through Smad7 mechanism [35]. This dysregulated myostatin activity could lead to the metabolic defects in Tg(Gasp-1) mice as myostatin is a key mediator in metabolism [41,42]. Myostatin can act directly on the glucose transport by inhibiting GLUT4 expression, as we demonstrated in Tg(Gasp-1) mice. Furthermore, myostatin negatively regulates *Pgc1α* expression which promotes mitochondrial biogenesis, lipid oxidation and leads to a fast-to-slow switch fiber type [17,43–45]. In our model, the *Pgc1α* expression decrease and the slow-to-fast switch fiber type confirmed the action of the dysregulation of myostatin expression.

Myostatin can also act indirectly on organs or tissues involved in glucose homeostasis by modulating the muscle secretome [23,41]. For example, myostatin promotes the production of pro-inflammatory cytokine such as TNF or CXCL10. These two myokines, capable to induce an hepatic insulin resistance and pancreatic lipotoxicity, are found overexpressed in patients with metabolic disorders [23,46] as well as in Tg(Gasp-1) mice. Interestingly, other cytokines are overexpressed in Tg(Gasp-1) animals such TIMP-1 and the chemokines CXCL11, CXCL2, CXCL9, CCL12. These cytokines are also regularly found overexpressed in obese or diabetic individuals. [46–48].

Finally, we cannot exclude a direct effect of Gasp-1 on glucose homeostasis since it is ubiquitously overexpressed in our transgenic mice [32]. Its expression is ten times higher in Tg(Gasp-1) adipose tissue compared to wild type mice (data not shown). This overexpression could be responsible for the slight adipocyte hypertrophy observed in Tg(Gasp-1) and thus independently of its action of myostatin. GASP-1 is also known to antagonize GDF-11, another TGFβ which promotes proliferation and differentiation of pancreatic islets [49]. The observed overexpression of Gasp-1 in pancreas could deregulate GDF11 signaling pathway and disturb the function of this tissue. Finally, GASP-1 by its multiple protease inhibitors domains can also participates in the balance between protease and inhibitors highly regulated in pancreas to control the glucose homeostasis [50,51]. Therefore, treatment with recombinant protein Gasp-1 on pancreatic cells will present a great interest to determine if Gasp-1 can act independently of myostatin on proliferation, differentiation and insulin secretion capacity of these cells.

To conclude, our results demonstrate that Gasp-1 overexpression has significant impact on glucose homeostasis and fat distribution. Aged Tg(Gasp-1) mice present several metabolic defects which could be associated with insulin resistance. These results also demonstrate the complexity of crosstalk between tissues regulating glucose homeostasis and the difficulty to determine the primary tissue responsible from the alteration of glucose metabolism.

Ethics

All animal experiments were performed according to European directives (86/609/CEE and 2010/63/UE) and approved by the Committee on Ethics of Animal Experiments from the Author's Institution, "Comité Régional d'Ethique de l'Expérimentation Animale" of the Limousin region (n° 11-2014-11). According to the European Directive 210-63-EU, mice were observed daily for the general health status and mortality scoring.

Competing interests

We have no competing interests.

Author's contributions

Conceived and designed the experiments: LP, VB. Performed the experiments: LP, FB.

Analysed the data: LP, CB, LM, FB and VB. Wrote the paper: LP, VB

Acknowledgements

We are indebted to Dr. Brigitte Picard and Dr. Isabelle Cassar Malek for access to the EchoRMI-500TM analyzer. This project was co-financed by the European Union, the Limousin Regional Council and the French National Institute for Agricultural Research. LP was supported by a PhD fellowship from INRA/Region Limousin.

References

[1] L.M. Wakefield, C.S. Hill, Beyond TGFβ: roles of other TGFβ superfamily members in cancer, Nat. Rev. Cancer. 13 (2013) 328–341. doi:10.1038/nrc3500.
[2] Y. Shi, J. Massagué, Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus, Cell. 113 (2003) 685–700.
[3] J. Massagué, S.W. Blain, R.S. Lo, TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders, Cell. 103 (2000) 295–309.
[4] E.S. Gordon, H.A. Gordish Dressman, E.P. Hoffman, The genetics of muscle atrophy and growth: The impact and implications of polymorphisms in animals and humans, Int. J. Biochem. Cell Biol. 37 (2005) 2064–2074. doi:10.1016/j.biocel.2005.05.005.
[5] R.J. Akhurst, A. Hata, Targeting the TGFβ signalling pathway in disease, Nat. Rev. Drug Discov. 11 (2012) 790–811. doi:10.1038/nrd3810.
[6] T.N. Burks, R.D. Cohn, Role of TGF-β signaling in inherited and acquired myopathies, Skelet. Muscle. 1 (2011) 19. doi:10.1186/2044-5040-1-19.
[7] C. Neuzillet, A. Tijeras-Raballand, R. Cohen, J. Cros, S. Faivre, E. Raymond, et al., Targeting the TGFβ pathway for cancer therapy, Pharmacol. Ther. 147 (2015) 22–31. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.001.
[8] A.C. McPherron, S.J. Lee, Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene, Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997) 12457.
[9] L. Grobet, L.J. Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, et al., A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle, Nat. Genet. 17 (1997) 71–74. doi:10.1038/ng0997-71.
[10] R. Kambadur, M. Sharma, T.P.L. Smith, J.J. Bass, Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle, Genome Res. 7 (1997) 910–915.
[11] G. Szabó, G. Dallmann, G. Müller, L. Patthy, M. Soller, L. Varga, A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice, Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc. 9 (1998) 671–672.
[12] S. Reisz-Porszasz, S. Bhasin, J.N. Artaza, R. Shen, I. Sinha-Hikim, A. Hogue, et al., Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285 (2003) E876–888. doi:10.1152/ajpendo.00107.2003.
[13] T.A. Zimmers, Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin, Science. 296 (2002) 1486–1488. doi:10.1126/science.1069525.

[14] T. Guo, W. Jou, T. Chanturiya, J. Portas, O. Gavrilova, A.C. McPherron, Myostatin Inhibition in Muscle, but Not Adipose Tissue, Decreases Fat Mass and Improves Insulin Sensitivity, Plos One. 4 (2009) e4937. doi:10.1371/journal.pone.0004937.
[15] C. Zhang, C. McFarlane, S. Lokireddy, S. Bonala, X. Ge, S. Masuda, et al., Myostatin-deficient mice exhibit reduced insulin resistance through activating the AMP-activated protein kinase signalling pathway, Diabetologia. 54 (2011) 1491–1501. doi:10.1007/s00125-011-2079-7.
[16] A.C. McPherron, S.-J. Lee, Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice, J. Clin. Invest. 109 (2002) 595–601. doi:10.1172/JCI0213562.
[17] J. Lin, H.B. Arnold, M.A. Della-Fera, M.J. Azain, D.L. Hartzell, C.A. Baile, Myostatin Knockout in Mice Increases Myogenesis and Decreases Adipogenesis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 291 (2002) 701–706. doi:10.1006/bbrc.2002.6500.
[18] B. Elliott, D. Renshaw, S. Getting, R. Mackenzie, The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis, Acta Physiol. 205 (2012) 324–340. doi:10.1111/j.1748-1716.2012.02423.x.
[19] B.J. Feldman, R.S. Streeper, R.V. Farese, K.R. Yamamoto, Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 15675–15680. doi:10.1073/pnas.0607501103.
[20] H.S. Kim, L. Liang, R.G. Dean, D.B. Hausman, D.L. Hartzell, C.A. Baile, Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures, Biochem. Biophys. Res. Commun. 281 (2001) 902–906. doi:10.1006/bbrc.2001.4435.
[21] A. Rebbapragada, H. Benchabane, J.L. Wrana, A.J. Celeste, L. Attisano, Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis, Mol. Cell. Biol. 23 (2003) 7230–7242.
[22] K.A. Shahin, R.T. Berg, Growth patterns of muscle, fat and bone, and carcass composition of double muscled and normal cattle, Can. J. Anim. Sci. 65 (1985) 279–293. doi:10.4141/cjas85-035.
[23] J.J. Wilkes, D.J. Lloyd, N. Gekakis, Loss-of-function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor alpha production and protects liver against obesity-induced insulin resistance, Diabetes. 58 (2009) 1133–1143. doi:10.2337/db08-0245.
[24] M.W. Hamrick, C. Pennington, C.N. Webb, C.M. Isales, Resistance to body fat gain in "double-muscled" mice fed a high-fat diet, Int. J. Obes. 2005. 30 (2006) 868–870. doi:10.1038/sj.ijo.0803200.
[25] A.C. McPherron, Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice, J. Clin. Invest. 109 (2002) 595–601. doi:10.1172/JCI200213562.
[26] N.K. LeBrasseur, T.M. Schelhorn, B.L. Bernardo, P.G. Cosgrove, P.M. Loria, T.A. Brown, Myostatin inhibition enhances the effects of exercise on performance and metabolic outcomes in aged mice, J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 64 (2009) 940–948. doi:10.1093/gerona/glp068.
[27] M.R. Morissette, J.C. Stricker, M.A. Rosenberg, C. Buranasombati, E.B. Levitan, M.A. Mittleman, et al., Effects of myostatin deletion in aging mice, Aging Cell. 8 (2009) 573–583. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00508.x.
[28] P. Tu, S. Bhasin, P.W. Hruz, K.L. Herbst, L.W. Castellani, N. Hua, et al., Genetic disruption of myostatin reduces the development of proatherogenic dyslipidemia and atherogenic lesions in Ldlr null mice, Diabetes. 58 (2009) 1739–1748. doi:10.2337/db09-0349.
[29] B. Zhao, R.J. Wall, J. Yang, Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance, Biochem. Biophys. Res. Commun. 337 (2005) 248–255. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.044.
[30] S.J. Lee, A.C. McPherron, Regulation of myostatin activity and muscle growth, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 9306.
[31] S.-J. Lee, Quadrupling Muscle Mass in Mice by Targeting TGF-ß Signaling Pathways, Plos One. 2 (2007) e789. doi:10.1371/journal.pone.0000789.
[32] O. Monestier, C. Brun, K. Heu, B. Passet, M. Malhouroux, L. Magnol, et al., Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype, Bmc Genomics. 13 (2012) 541. doi:10.1186/1471-2164-13-541.
[33] C. Brandt, R.H. Hansen, J.B. Hansen, C.H. Olsen, P. Galle, T. Mandrup-Poulsen, et al., Over-expression of Follistatin-like 3 attenuates fat accumulation and improves insulin sensitivity in mice, Metabolism. 64 (2015) 283–295. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.007.

[34] S.S. Gangopadhyay, Systemic administration of follistatin288 increases muscle mass and reduces fat accumulation in mice, Sci. Reports. 3 (2013) 2441. doi:10.1038/srep02441.
[35] C. Brun, L. Périé, F. Baraige, B. Vernus, A. Bonnieu, V. Blanquet, Absence of Hyperplasia in Gasp-1 Overexpressing Mice is Dependent on Myostatin Up-Regulation, Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 34 (2014) 1241–1259. doi:10.1159/000366335.
[36] L. Magnol, O. Monestier, K. Vuillier-Devillers, S. Wagner, O. Cocquempot, M.C. Chevallier, et al., A sensitised mutagenesis screen in the mouse to explore the bovine genome: study of muscle characteristics, Anim. Int. J. Anim. Biosci. 5 (2011) 663–671. doi:10.1017/S1751731110002405.
[37] J.J. Hill, Regulation of Myostatin in Vivo by Growth and Differentiation Factor-Associated Serum Protein-1: A Novel Protein with Protease Inhibitor and Follistatin Domains, Mol. Endocrinol. 17 (2003) 1144–1154. doi:10.1210/me.2002-0366.
[38] J.J. Hill, The Myostatin Propeptide and the Follistatin-related Gene Are Inhibitory Binding Proteins of Myostatin in Normal Serum, J. Biol. Chem. 277 (2002) 40735–40741. doi:10.1074/jbc.M206379200.
[39] K. Kondas, G. Szlama, M. Trexler, L. Patthy, Both WFIKKN1 and WFIKKN2 Have High Affinity for Growth and Differentiation Factors 8 and 11, J. Biol. Chem. 283 (2008) 23677–23684. doi:10.1074/jbc.M803025200.
[40] G. Szláma, K. Kondás, M. Trexler, L. Patthy, WFIKKN1 and WFIKKN2 bind growth factors TGFβ1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity, Febs J. 277 (2010) 5040–5050. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07909.x.
[41] A. C. McPherron, Metabolic Functions of Myostatin and GDF11, Immunol. Endocr. Metab. Agents - Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem. - Immunol. Endocr. Metab. Agents. 10 (2010) 217–231. doi:10.2174/187152210793663810.
[42] Z. Huang, X. Chen, D. Chen, Myostatin: A novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation, Cell. Signal. 23 (2011) 1441–1446. doi:10.1016/j.cellsig.2011.05.003.
[43] T. Shan, X. Liang, P. Bi, S. Kuang, Myostatin knockout drives browning of white adipose tissue through activating the AMPK-PGC1α-Fndc5 pathway in muscle, Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 27 (2013) 1981–1989. doi:10.1096/fj.12-225755.
[44] S. Luquet, J. Lopez-Soriano, D. Holst, A. Fredenrich, J. Melki, M. Rassoulzadegan, et al., Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability, Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 17 (2003) 2299–2301. doi:10.1096/fj.03-0269fje.
[45] Y.-X. Wang, C.-L. Zhang, R.T. Yu, H.K. Cho, M.C. Nelson, C.R. Bayuga-Ocampo, et al., Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPARδ, Plos Biol. 2 (2004) e294. doi:10.1371/journal.pbio.0020294.
[46] K. Bouzakri, P. Plomgaard, T. Berney, M.Y. Donath, B.K. Pedersen, P.A. Halban, Bimodal effect on pancreatic β-cells of secretory products from normal or insulin-resistant human skeletal muscle, Diabetes. 60 (2011) 1111–1121. doi:10.2337/db10-1178.
[47] Y. Okamoto, E.J. Folco, M. Minami, A.K. Wara, M.W. Feinberg, G.K. Sukhova, et al., Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis, Circ. Res. 102 (2008) 218–225. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164988.
[48] V.T. Samuel, G.I. Shulman, Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links, Cell. 148 (2012) 852–871. doi:10.1016/j.cell.2012.02.017.
[49] E.B. Harmon, A.A. Apelqvist, N.G. Smart, X. Gu, D.H. Osborne, S.K. Kim, GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes beta-cell differentiation in pancreas development, Dev. Camb. Engl. 131 (2004) 6163–6174. doi:10.1242/dev.01535.
[50] J.C. Koster, M.S. Remedi, H. Qiu, C.G. Nichols, P.W. Hruz, HIV protease inhibitors acutely impair glucose-stimulated insulin release, Diabetes. 52 (2003) 1695–1700.
[51] R. Walli, O. Herfort, G.M. Michl, T. Demant, H. Jäger, C. Dieterle, et al., Treatment with protease inhibitors associated with peripheral insulin resistance and impaired oral glucose tolerance in HIV-1-infected patients, Aids Lond. Engl. 12 (1998) F167–173.

Table

Table 1. List of the primers used for SybrGreen analyses

Genes	Primers	Sequences	GenBank
G6pc	G6pc-Fwd	CCTCGTCTTCAAGTGGATTCTGT	NM_008061
	G6pc-Rev	AAACACCGGAATCCATACGTTGGC	
Pck1	Pck1-Fwd	GAACACAAGGGCAAGATCATC	NM_011044
	Pck1-Rev	TTGCCATCTTTGTCCTTCCG	
Myh1	Myh1-Fwd	AAGCCGATGGGCATCTTCTC	NM_030679
	Myh1-Rev	GGACTTTCCAAGATGCTGCTC	
Myh2	Myh2-Fwd	AATGCAGGGGACGCTGGAGGA	NM_001039545
	Myh2-Rev	CATTCCTCACGGTCTTGGCG	
Myh4	Myh4-Fwd	TCTGGCACCACACCTTCTA	NM_010855
	Myh4-Rev	AGGCATACAGGGACAGCAC	
Myh7	Myh7-Fwd	ACCTACTCGGGCCTCTTCTGC	NM_080728
	Myh7-Rev	AGGGGCCTCGCTCCTCTTCTT	
Pgc1-α	Pgc1-α-Fwd	AAGTGTGGAACTCTCTGGAACTG	NM_008904
	Pgc1-α-Rev	GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG	
FoxO1	FoxO1-Fwd	GCGGGCAATTCAATTCGCCACAA	NM_019739
	FoxO1-Rev	CAGCTCTTCTTCGGGGTGATTTT	
Mstn	Mstn-Fwd	CAGACCCGTCAAGACTCCTACA	NM_010834
	Mstn-Rev	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	
B2m	B2m-Fwd	CAGTGCCTGGGCTCATGTCAAG	NM_009735
	B2m-Rev	GTTCGGCTTCCCATTCTCC	
β-actin	β-actin-Fwd	TCTGGCACCACACCTTCTA	NM_007393
	β-actin-Rev	AGGCATACAGGGACAGCAC	
Gapdh	Gapdh-Fwd	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	NM_008084
	Gapdh-Rev	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	

Table 2. Comparison of metabolic parameters between 3 month old (3mo) and 16 month old (16mo) wild-type (WT) and Tg(Gasp-1) (Tg) littermates. *Stutent's test analysis when compared* with the WT. * : p value < 0.05 ; ** : p value < 0.01 ; *** : p value < 0.001.

	WT 3mo	Tg 3mo		WT 16mo	Tg 16mo	
AST C	48.12	56.75		50.33	82.00	**
LDH	302.34	479.67	**	314.67	461.00	*
Creatinine	8.97	12.25	*	8.67	11.00	*
LDL	0.42	0.44		0.52	0.63	
HDL	4.26	3.56		5.23	4.72	
Triglycerides	2.12	1.89		2.16	2.60	*
Total Proteins	50.24	51.00		49.33	43.33	
Cholesterol	3.98	4.23		4.70	3.90	
CK	102.35	398.67	*	95.67	249.00	**
Lactate	978.32	1235.67	*	886.67	1428.67	*
CK MB	85.23	138.33		87.33	85.33	
Glucose	10.32	10.17		9.27	13.27	*
ALT C	41.22	38.67		31.00	54.33	***

Table 3. Comparison of cytokines expression between 16 month old (16mo) wild-type (WT) and Tg(Gasp-1) (Tg) mice. *Stutent's test analysis when compared with the WT.* * : p value < 0.05 ; ** : p value < 0.01 ; *** : p value < 0.001

	WT 16mo	Tg 16mo	
IL-4	6,055	6,355	
IL-16	2,32	2,22	
IL-17	7,805	11,675	*
IL-23	0,645	5,71	***
IL-27	0,545	5,415	***
IP-10 (CXCL10/CRG-2)	2,765	5,485	***
I-TAC (CXCL11)	7,445	9,4	**
KC (CXCL1)	10,975	14,305	**
M-CSF	6,92	7,655	
MCP-5 (CCL12)	5,805	5,39	
MIG (CXCL9)	5,775	4,7	*
MIP-2 (CXCL2)	2,035	3,385	**
RANTES (CCL5)	0,155	3,51	***
SDF-1 (CXCL12)	0,015	2,31	**
TARC (CCL17)	0,045	0,39	
TIMP-1	5,785	8,665	*
TNF-a	6,855	12,125	***
TREM-1	5,485	6,21	

Figures

Figure 1

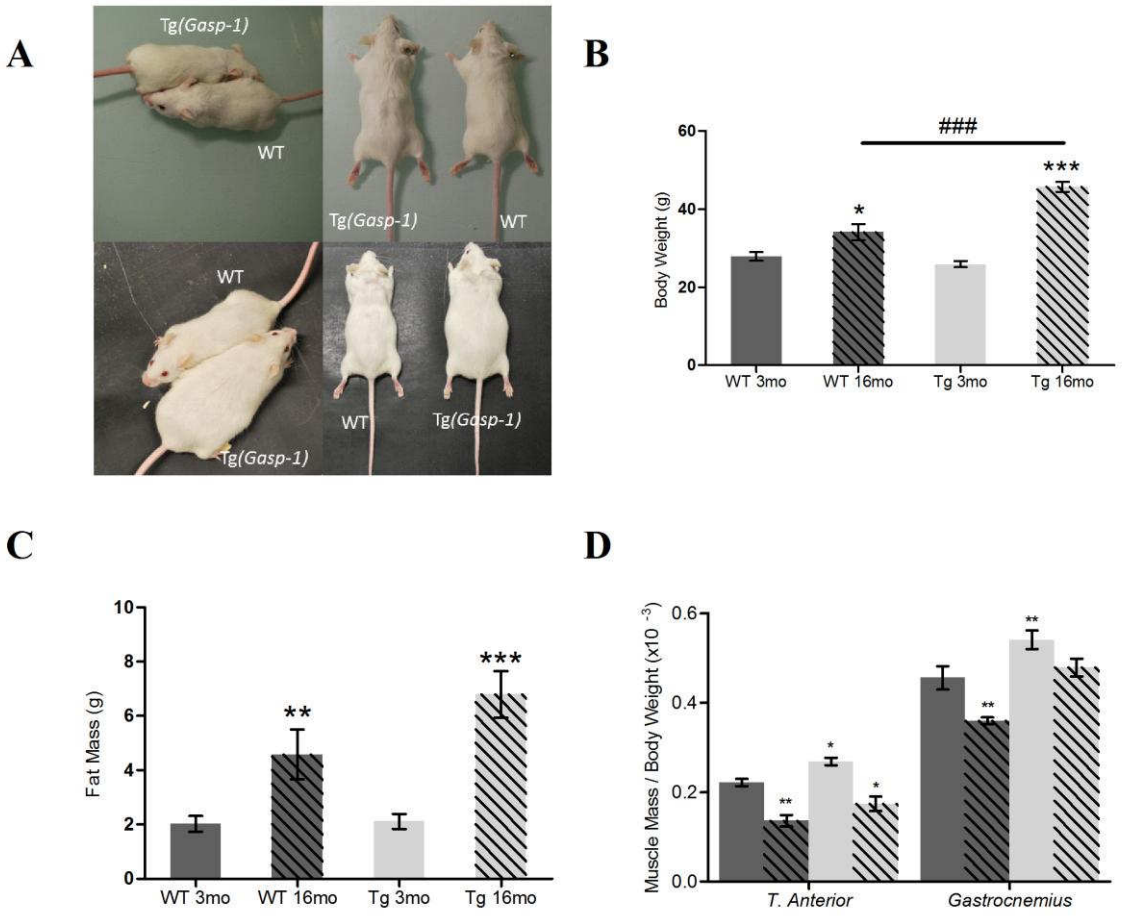

Fig. 1. Body weights, proportions of muscle and fat mass of WT and Tg(Gasp-1) mice.

A. Morphological appearance of 3 month (upper panel) and 16 month old (bottom panel) WT and Tg(Gasp-1) mice. **B.** Mean body weights of mice. **C.** Relative proportion of fat mass compared to body weight. **D.** Relative proportion of muscle mass compared to body weight. **B-D.** WT, (3 months, dark grey, n= 6, male and 16 months, hatched dark grey, n= 5, male) and Tg(Gasp-1) (3 months, light grey, n= 5, male and 16 months, Tg(Gasp-1) (hatched light grey, n= 7, male)).

Statistical significance was assessed by a Student's t test analysis by comparing each sample versus young WT (*: p value < 0.05; **: p value < 0.005 ; ***: p value < 0.001) and old Tg(Gasp-1) versus old WT mice (###: p value < 0.001).

Figure 2

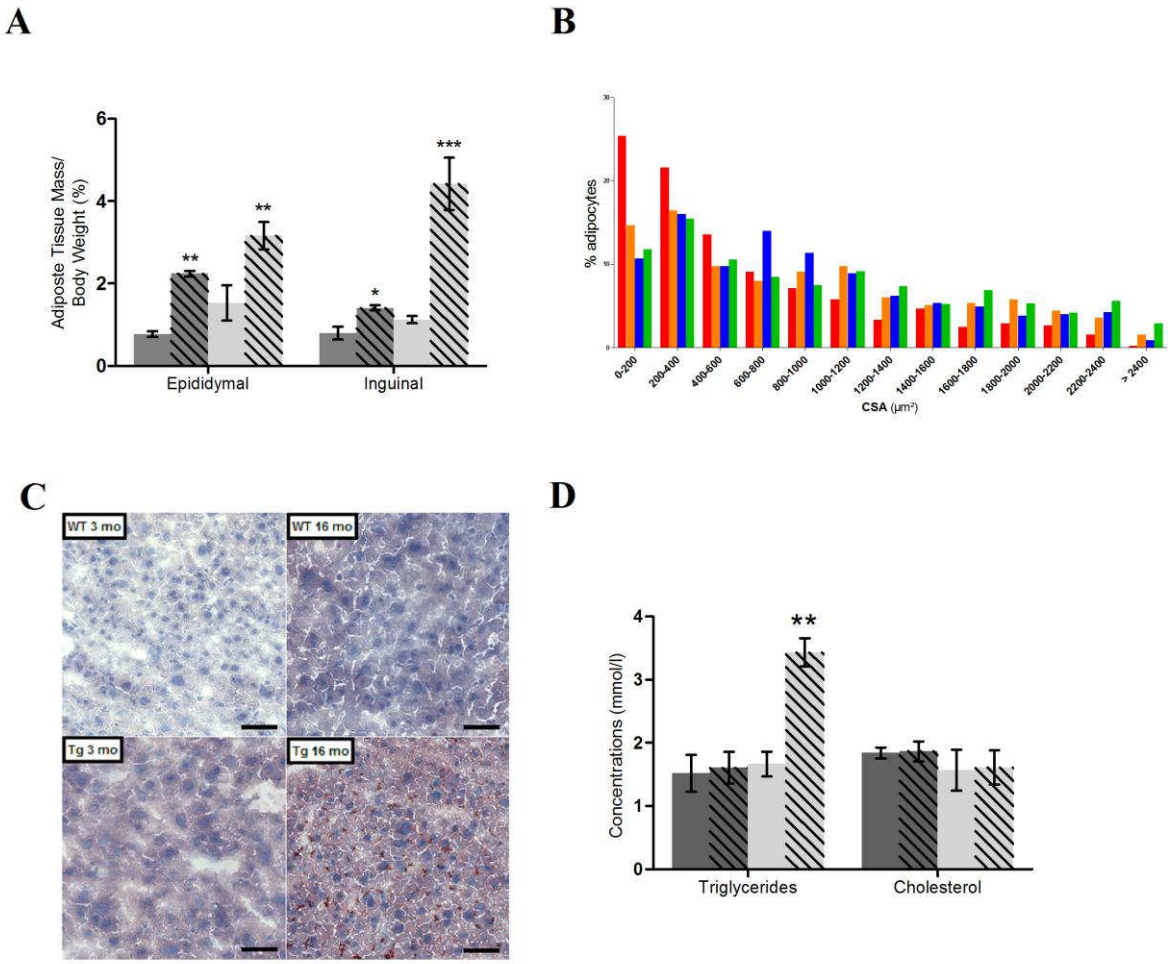

Fig. 2. . Fat distribution and composition in WT and Tg(Gasp-1) mice.

A. Relative proportion of epididymal and inguinal masses (WT (3 months, dark grey, n= 6, male and 16 months, hatched dark grey, n= 5, male) and Tg(Gasp-1) (3 months, light grey, n= 5, male and 16 months, Tg(Gasp-1) (hatched light grey, n= 7, male)). **B.** Distribution of adipocytes area in adipose tissue of 3 month (WT (red, n= 5, male), Tg(Gasp-1), (blue, n= 5, male)), 16-month old mice (WT, (orange, n= 5, male) and Tg(Gasp-1), (green, n= 5, male)). **C.** Oil Red and hematoxylin staining of frozen liver sections from 3 month and 16 month old WT and Tg(Gasp-1) mice confirm vesicular steatosis (arrows). **D.** Triglycerides and cholesterol rates in liver of 3 month (WT (dark grey, n= 3, male) and Tg(Gasp-1) (light grey, n= 3, male)) and 16 month old mice (WT (hatched dark grey hatched, n= 3, male) and Tg(Gasp-1) (hatched light grey, n= 3, male)).

Statistical significance was assessed by a Student's t test analysis when compared with the young WT mice (**: p value < 0.05; ***: p value < 0.005).

Figure 3

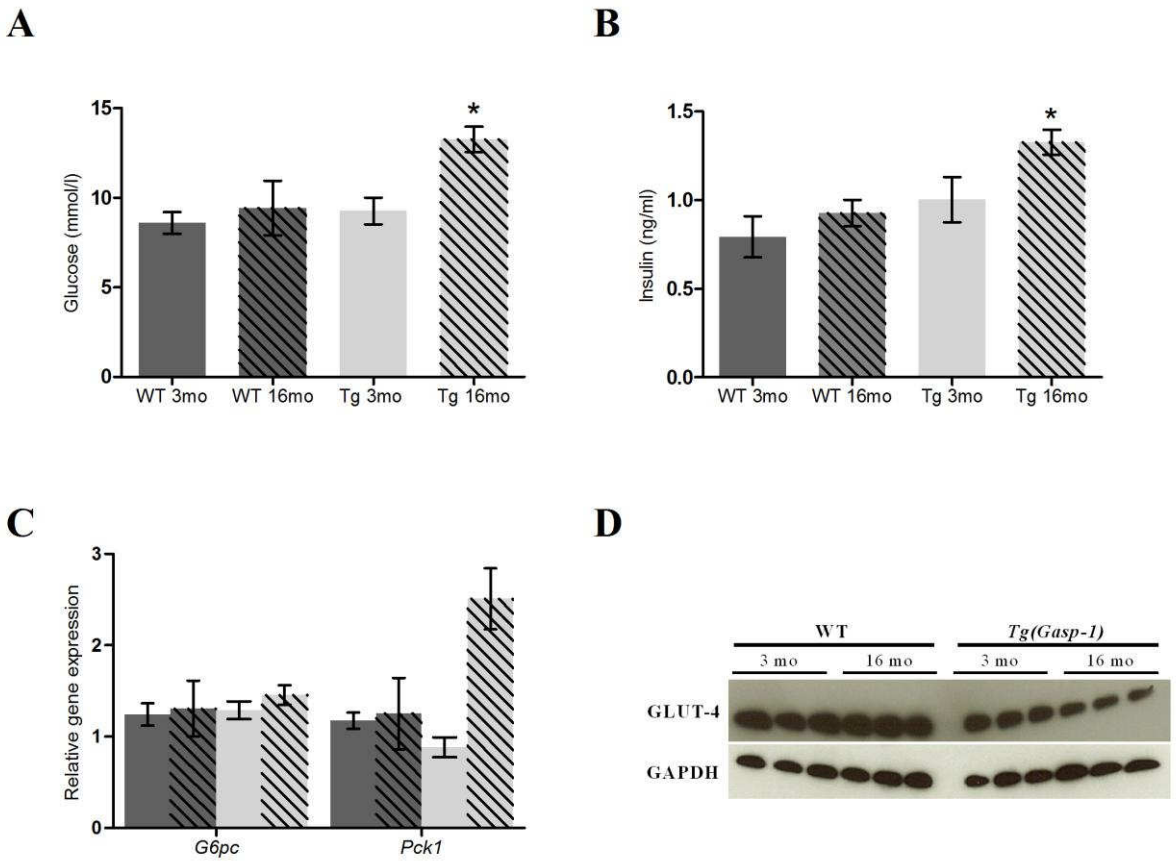

Fig. 3. Alteration of glucose metabolism in Tg(Gasp-1) mice. A. Glucose levels in serum of 3-month (WT (dark grey bar, n= 4, male) and Tg(Gasp-1) (light grey, n= 3, male)) and 16-month-old mice (WT (hatched dark grey, n= 5, male) and Tg(Gasp-1) (hatched light grey, n= 3)). **B.** Insulin levels in serum of 3 month (WT (dark grey, n= 3) and Tg(Gasp-1) (light grey, n= 3, male)) and 16-month-old mice (WT (hatched dark grey, n= 3, male) and Tg(Gasp-1) (hatched light grey, n= 3, male)). **C.** Comparison of the relative mRNA expression levels of gluconeogenic genes (Pck1 and G6Pase) between WT and Tg(Gasp-1). **D.** Western Blot analysis of GLUT-4 in 3 month and 16 month old WT and Tg(Gasp-1) mice.

Statistical significance was assessed by a Student's t test analysis when compared with the young WT mice (*: p value < 0.05; **: p value < 0.005 ; ***: p value < 0.001)

Figure 4

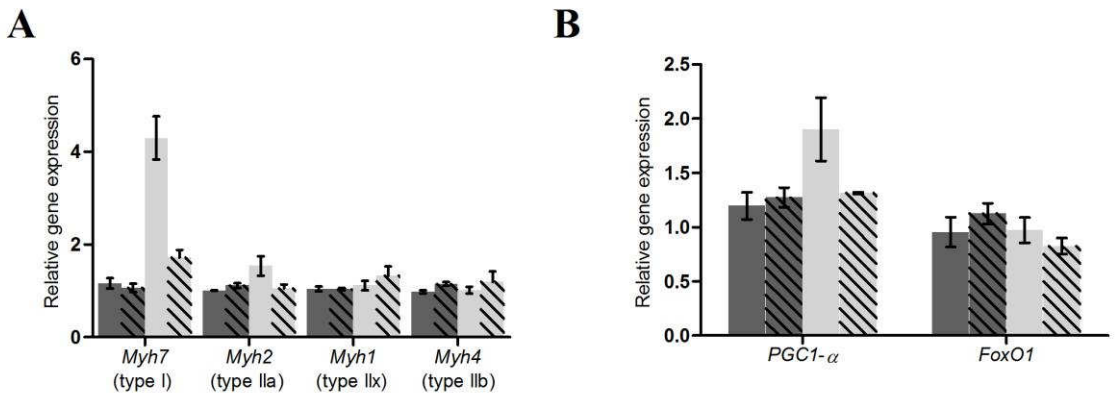

Fig. 4. Pgc1-α, FoxO1 and myosin heavy chain expression in muscles of (Tg(Gasp-1)) mice. A-B. Relative mRNA expression levels of **(A)** Myh7, Myh2, Myh4 Myh1, **(B)** Pgc1-α and FoxO1 were measured by PCR quantitative in Tibialis anterior of 3 month (WT (black bar, n=3) and Tg(Gasp-1) (grey bar n= 3)) and 16 month old mice (WT (black hatched bar, n= 3) and Tg(Gasp-1) (grey hatched bar n=3)).

Statistical significance was assessed by a Student's t test analysis when compared with the young WT mice (*: p value < 0.05; **: p value < 0.005 ; ***: p value < 0.001)

Figure 5

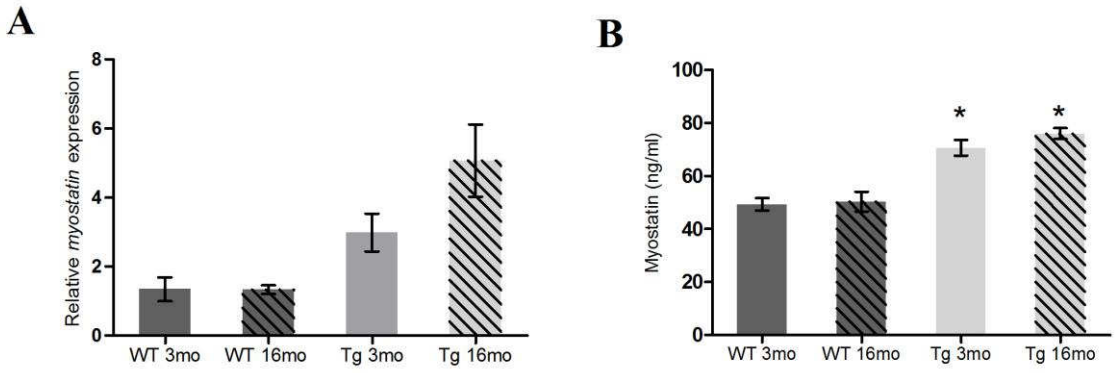

Fig. 5. Myostatin expression in muscles of (Tg(Gasp-1)) mice. A. Relative mRNA expression levels of myostatin were measured by PCR quantitative in Tibialis anterior of 3 month (WT (black bar, n=3) and Tg(Gasp-1) (grey bar n= 3)) and 16 month old mice (WT (black hatched bar, n= 3) and Tg(Gasp-1) (grey hatched bar n=3)). **B.** Quantification of myostatin proteins measured by an ELISA Test from WT and Tg(Gasp-1) serum (n = 4 mice by genotype and by age ; values are means ± SD).

Statistical significance was assessed by a Student's t test analysis when compared with the young WT mice (*: p value < 0.05; **: p value < 0.005 ; ***: p value < 0.001)

La surexpression de *Gasp-1* entraîne chez les souris âgées de nombreux défauts métaboliques dont une augmentation de la masse graisseuse, une accumulation de gras ectopique, et une dérégulation de l'homéostasie glucidique **(Figure 25)**. Ces caractères sont souvent retrouvés dans les modèles de rongeurs étudiés pour l'obésité et le diabète de type II. Ces résultats sont surprenants car la plupart des modèles murins présentant une forte augmentation de la masse musculaire souvent lié à une hypertrophie et une hyperplasie des myofibres suite à une inhibition de la myostatine ont également leur masse adipeuse nettement diminuée. C'est le cas par exemple des modèles surexprimant *Fst* ou *Fstl3* (McPherron & Lee 2002; Lee 2007a; McPherron 2010; Gangopadhyay 2013; Brandt *et al.* 2015). Néanmoins, les souris surexprimant le propeptide ne présentent pas d'hyperplasie, et seulement une très faible variation de la masse adipeuse lorsqu'elles sont soumises à un régime HFD (Zhao *et al.* 2005). L'absence d'hyperplasie dans les souris *Tg(Gasp-1)* et celles surexprimant le propeptide semble indiquer que c'est l'association hypertrophie/hyperplasie qui favoriserait une diminution de la masse graisseuse suite à l'inhibition de la myostatine.

Des variations dans le métabolisme musculaire pourrait également déréguler l'homéostasie du glucose dans notre modèle comme c'est le cas par exemple des souris déficientes pour *p43*, un gène qui code un récepteur de la matrice mitochondriale. Ces souris présentent un phénotype hypermusclé dû à une hypertrophie des myofibres et à une diminution du métabolisme oxydatif suit à une conversion des fibres oxydatives vers les fibres glycolytiques (Pessemesse *et al.* 2012). Ces souris développent alors en vieillissant une hyperglycémie, une intolérance au glucose et une insulino-résistance musculaire (Blanchet *et al.* 2012; Bertrand *et al.* 2013). Nous avons pu observer que les souris *Tg(Gasp-1)* présentent en vieillissant une diminution de l'expression de *Myh7*, myosine retrouvé dans les fibres lentes et oxydatives ainsi qu'une diminution de *Pgc1-α*. Ce dernier est connu pour favoriser le métabolisme oxydatif des myofibres et la biogenèse mitochondriale. Il serait alors intéressant d'étudier plus en détail l'activité mitochondriale des souris *Tg(Gasp-1)* jeunes et âgées afin de déterminer si cette activité est dérégulée dans notre modèle.

Nous pensons que l'augmentation de l'expression de la myostatine dans notre modèle pourrait être responsable des défauts métaboliques observés chez les souris *Tg(Gasp-1)*. En effet une étude récente a révélé que des cellules musculaires traitées avec la myostatine présentaient une diminution de l'expression de *Glut-4* et une diminution du transport de glucose (Takahashi *et al.* 2014). Or, le premier symptôme d'insulino-résistance observé chez les souris *Tg(Gasp-1)* est la diminution de l'expression de GLUT-4 dès l'âge de 3 mois. L'altération de l'activité de ce transporteur

(cc) BY-NC-ND

sensible à l'insuline est un des facteurs responsables de l'hyperinsulémie et de l'hyperglycémie retrouvés chez les souris *Tg(Gasp-1)* et est observé chez les patients atteints d'obésité ou d'un diabète de type II (Stenbit *et al.* 1997; Samuel & Shulman 2012). GLUT-4 est également responsable de la diminution d'absorption de glucose au sein du muscle entraînant une accumulation de gras chez les souris transgéniques âgées (Rask-Madsen & Kahn 2012). La myostatine peut également être responsable de la diminution de l'expression de PGC1-α et des fibres musculaires de type I chez les souris *Tg(Gasp-1)* âgées. En effet les souris *Mstn*$^{-/-}$ présentent une augmentation de l'expression de PGC1α (Shan *et al.* 2013).

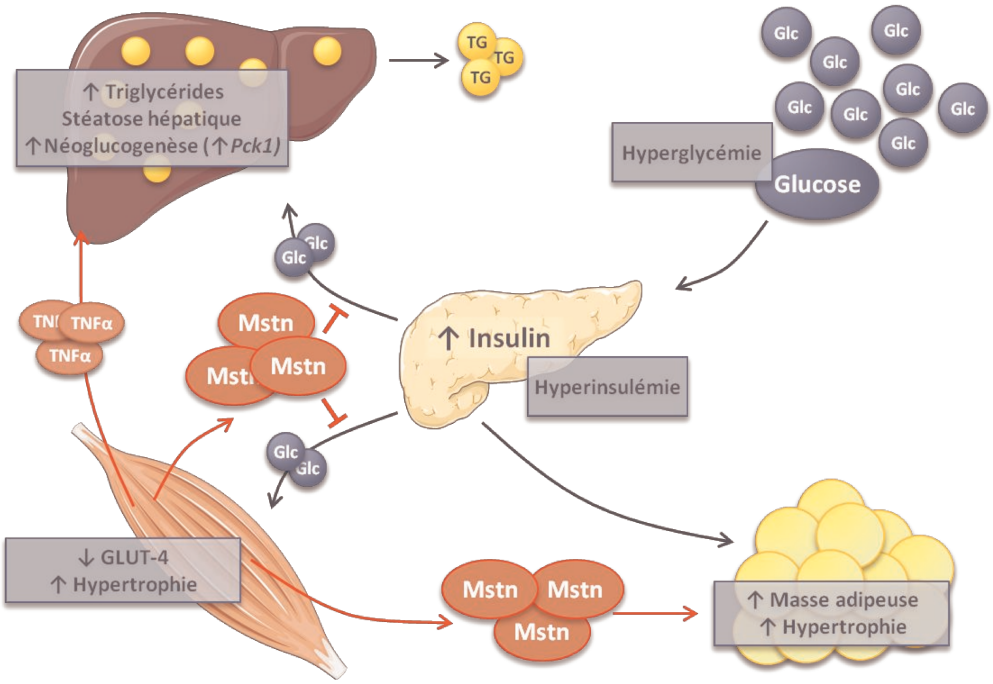

FIGURE 24. DEFAUTS METABOLIQUES OBSERVES CHEZ LES SOURIS *Tg(Gasp-1)*. Les souris *Tg(Gasp-1)* en vieillissant développent de nombreux défauts métaboliques. Notre hypothèse serait que la surexpression de la myostatine est responsable de la dérégulation de l'homéostasie glucidique chez les souris qui surexpriment *Gasp-1. Gasp-1, Growth and Differentiation Factor-associated serum protein-1 ; Glc, Glucose ; Glut-4, Glucose transporter type 4 ; Mstn, Myostatine ; Pck1, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1 ; Tg, Triglycerides.* (Modifiée à partir de Samuel & Shulman 2012).

Enfin, la myostatine interviendrait également chez les souris *Tg(Gasp-1)*, dans la communication entre les organes impliqués dans le métabolisme notamment en favorisant l'expression de myokines proinflammatoires comme TNFα capable d'agir sur tous ces tissus. **(Figure 24)**.

(cc) BY-NC-ND

La présence d'IMCL au sein du muscle squelettique, souvent retrouvés dans les cas d'obésité n'a pu être confirmée dans les souris *Tg(Gasp-1)*. Une accumulation excessive de gras dans le tissu adipeux et le foie stimule le stress du RE (Ozcan *et al.* 2004). Grp78, est un des marqueurs du stress du RE généralement élevé chez les individus obèses, est retrouvé surexprimé dans les muscles de souris *Tg(Gasp-1)* jeunes et âgées **(Figure 25)**. Ce résultat pourrait indiquer une accumulation de gras ectopique au niveau du muscle des souris.

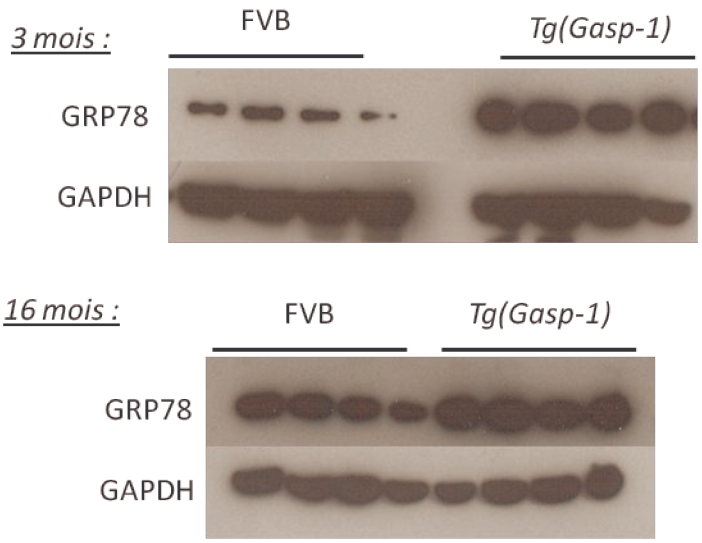

FIGURE 25. EXPRESSION DE GRP78 DANS LES SOURIS SUREXPRIMANT *Gasp-1*. Niveaux d'expression de GRP78 au niveau du *Tibialis anterior* de souris *Tg(Gasp-1)* et sauvages (FVB) âgées de 3 et 16 mois. *GAPDH, Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase ; Grp78, Glucose-Regulated Protein 78.*

Enfin, nous ne pouvons exclure un rôle du tissu adipeux dans la dérégulation de l'homéostasie du glucose et du gras dans notre modèle murin. En effet, *Gasp-1* est retrouvé augmenté plus de dix fois dans le tissu adipeux des souris transgéniques par rapport aux souris sauvages. Une expansion du tissu adipeux et plus particulièrement une hypertrophie adipocytaire est moins sensible à l'insuline et secrète un plus grand nombre de cytokines proinflammatoires (Guilherme *et al.* 2008; Rask-Madsen & Kahn 2012). Il serait alors intéressant d'étudier les adipokines sécrétées dans les souris *Tg(Gasp-1)* jeunes et âgées afin de valider ou non l'action du tissu adipeux dans la dérégulation de l'homéostasie du glucose.

(cc) BY-NC-ND

CHAPITRE 3. ETUDE DU ROLE DE GASP-2 SUR LE DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE

GASP-2 augmente la prolifération et la différenciation des cellules musculaires en inhibant la voie de la myostatine et ceci indépendamment de sa glycosylation.

Contrairement à GASP-1, GASP-2 est très peu étudié au cours du développement musculaire. Les travaux de Lee montrent pour la première fois l'implication de *Gasp-2* dans un contexte myogénique (Lee & Lee 2013). En effet, les souris KO pour ce gène développent 8 mois après la naissance une atrophie musculaire et des défauts dans la régénération des fibres suite à une blessure. Ce phénotype peut s'expliquer par la levée de l'inhibition de la myostatine dans ces souris.

Comme son paralogue, GASP-2 est une glycoprotéine. La glycosylation est une modification post-traductionnelle majeure des protéines sécrétées. Elle influe sur la stabilité, la durée de demi-vie et peut moduler l'activité d'une protéine ou son affinité envers différents substrats (Gerken *et al.* 1989; Helenius & Aebi 2004; Semenov *et al.* 2009). Il existe deux grands types majeurs de glycosylation : la *N*-glycosylation et la *O*-glycosylation. Plus de 50% des protéines sont *N*-glycosylées et pratiquement toutes les protéines sécrétées portent des *O*-glycanes de type mucine. Des travaux précédemment réalisés au sein du laboratoire ont démontré que GASP-1 possédaient 2 sites *N*-glycanes occupés et plusieurs *O*-glycanes de type mucine. Cette étude a également révélé que la *N*-glycosylation n'était pas essentiel à GASP-1 pour son activité sur des cellules myogéniques (Brun *et al.* 2012).

Dans ce papier, nous avons étudié l'effet de GASP-2 sur les cellules musculaires murines C2C12 afin d'analyser d'un point de vue moléculaire l'effet de cet antagoniste de la myostatine sur la prolifération et la différenciation myoblastiques. Nous avons aussi déterminé la présence de glycanes et leurs implications éventuelles sur l'activité de GASP-2 dans un contexte myogénique.

Gasp-2 enhances proliferation and differentiation of myoblasts by inhibiting myostatin and thus independently of its glycosylation.

Luce Perié, Alexis Parenté, Caroline Brun, Laetitia Magnol, Patrick Pélissier and Véronique Blanquet. Soumis dans BB Reports.

(cc) BY-NC-ND

Enhancement of C2C12 myoblast proliferation and differentiation by GASP-2, amyostatin inhibitor.

Luce Périé[a], Alexis Parenté[a], Caroline Brun[a1], Laetitia Magnol[a], Patrick Pélissier[a], Véronique Blanquet[a*]

a:Univ. Limoges, INRA, UMR 1061, UGMA, F- 87000 Limoges, France.

1: Present address: Sprott Centre for Stem Cell Research, Ottawa Health Research Institute, ON K1H 8L6 Ottawa, Canada

email addresses:
LP: luce.perie@etu.unilim.fr
AP: alexis.parente@etu.unilim.fr
CB: cbrun@ohri.ca
LM: laetitia.magnol@unilim.fr
PP: patrick.pelissier@unilim.fr
VB: veronique.blanquet@unilim.fr

*Correspondence to: V.BlanquetUniversité de Limoges, UMR 1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, Faculté des Sciences et Techniques, 123, av. A. Thomas, F- 87060 Limoges Cedex, France.Tel: +33 555 457 664. Email address: veronique.blanquet@unilim.fr

Abstract

Background:GASP-2 is a secreted multi-domain glycoprotein known as a specific inhibitor of myostatin and GDF-11. Here we investigate the role of GASP-2 on myogenesis and the effect of its glycosylation on its activity.

Methods:GASP-2 overexpression orknockdown by shRNAswerecarried out on C2C12 myoblasts cells.In silico analysis of GASP-2 protein was performed to identify its glycosylation sites. We produced a mouse recombinant GASP-2protein in a prokaryotic systemto obtain a fully deglycosylated protein allowing us to study the importance of this post-translational modificationon GASP-2 activity.

Results: Both mature and deglycosylated GASP-2 proteins increase C2C12 proliferation and differentiation by inhibiting the myostatin pathway.In silicoand western-blotanalyses revealed that GASP-2 presents one consensus sequence for N-glycosylation and six potential sites of mucine-type O-glycosylation.

Conclusions: GASP-2 promotes myogenesisand thus independently of its glycosylation.

General significance: This is the first report demonstrating that GASP-2 promotes proliferation and differentiation of myoblasts by inhibiting the canonical pathway of myostatin.

Keywords: GASP-2, myostatin, myogenesis, glycosylation

1. Introduction

GASPs(Growth and Differentiation Factor Associated Serum Protein)are secreted glycoproteins known to interact with myostatin (MSTN),a key regulator of muscle development[1,2]. These proteinscontainmultiple protease inhibitorsdomains[3,4]. Thus, the two members, GASP-1 and GASP-2 (also named WFIKKN2 and WFIKKN1) are made of four serine proteases inhibitor modules(WAP, Follistatin/Kazal and two Kunitz), a Netrin domain which is implicated in inhibition of metalloproteinases and an Ig domain involved in protein folding (Igc2)[3,4]. These domains are highly conserved among mammals especially the Follistatin/Kazal, the second Kunitz and the Netrin domains [5]. This conservation strongly suggests the importance of their functions[5].Since 2003 and its discovery[6], most of the studies have focused on the role of GASP-1 as a myostatin antagonist. It was shown that GASP-1 interacts with and inhibits myostatin via its Follistatin domain[6–9].The myostatin is a member of TGFβ superfamily that negatively regulates myogenesis mainly via the SMAD2/3 pathway [10]. The disruption of the MSTN gene in mice leads to a dramatic increase of skeletal muscle mass due to both hyperplasia and hypertrophy [1]. Overexpression of myostatin inhibitors, like Follistatin and FSTL3, leads to an increase of myoblasts proliferation and differentiation and an increase of muscle mass in mice [11,12]. Recently, we also described in mice overexpressing Gasp-1 a hypermuscular phenotype owing only to hypertrophy, without hyperplasia of the myofibers[13]. We demonstrated that in addition to the inhibition of its canonical pathway, myostatin is up-regulated in these mice leading to the absence of hyperplasia [14].

Unlike GASP-1, GASP-2 was never found associated with myostatin in serum although their interaction is well known [8]. As GASP-1 and GASP-2 share 54% of identity and are expressed, at few exceptions, in similar tissues including skeletal muscle [4], we asked if GASP-2 could also be involved in the regulation of myostatin during myogenesis. In this paper, we analyzed at cellular and molecular levels the consequences on myoblasts proliferation and differentiation of Gasp-2 over or knock-down gene expression. Like most of secreted proteins, GASP-2 is glycosylated. In addition to play a central role on the solubility and half-life of the protein, glycosylation is well known to

modulate its function. We also analyzed the involvement of this post-translational modification on GASP-2 activity, focusing our study on its role as an inhibitor of myostatin.

2. Materials and methods

2.1. Cell Culture

Mouse C2C12 myoblasts [15] were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). C2C12 myoblasts were grown in Growth Medium (GM) consisting in Dulbecco'sModified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen), 100 units.ml^{-1}penicillin and 100 µg.ml^{-1}streptomycin (Invitrogen). C2C12 differentiation was induced upon 70% confluence by serum withdrawal (DMEM with 2% horse serum (HS, Invitrogen)). For proliferation assay, C2C12 were grown or not with 1 µg.ml^{-1}of hGASP-2 or mGASP-2deglycosylated (deglyco-mGASP-2).

2.2. Bioinformatics analyses

GASP-2 orthologs were retrieved from databases using BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) and Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org). Alignment was performed using ClustalW program and analyzed with WebLogo. Asparagine and serine/threonine residues potentially glycosylated were identified using respectively NetNGlyc 1.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) and NetOGlyc 3.1 Server [16].

2.3. Transient transfections of C2C12 cells

Mouse C2C12 myoblasts at 70% confluence were transiently transfected using the XtremeGENE 9 Transfection Reagent (Roche Applied Science) with 5 µg of pcDNA3.1-Gasp-2 or pcDNA3.1-empty in DMEM serum-free media. After 16 h of transfection, the medium was replaced and myoblasts were allowed to proliferate and differentiate for further analyses.

2.4. Production and purification of murine GASP-2 in prokaryotic system

The mouse Gasp-2cDNA coding sequence without peptide signal were amplified and cloned into the pGEX-4-T1 plasmid (Sigma Aldrich). Production was carried out in E.coli BL21 (DE3) in LB (Luria Bertani) supplemented with 0.2% glucose and 100 µg.ml^{-1} ampicillin. Bacteria were grown to

reachOD_{600}at 0.5 and then induced with 0.025 mM IPTG at 20°C for 14 h at 250 rpm. Bacterial growth was stopped by centrifugation (6000g, 15 min; 4°C). Bacteria were lysed in 20ml of lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100, 10 µg.ml^{-1} lysozyme) and centrifuged (48,000 x g, 20 min, 4°C). Purification was carried out with the ÄKTAprime system (Amersham-Biosciences). Supernatant was loaded into a GST-Trap HP 5ml column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM sodium phosphate, pH7.3, 0.15 M NaCl. Elution was performed at a rate of 1 ml.min^{-1} with 50 mM Tris-HCl, pH8, 10 mM reduced glutathione. Cleavage of the GST Tag located at the N-terminal region of the fusion protein was performed with 10 units.mg^{-1} of recombinant thrombin protein(Sigma T68884) by incubation for 16 h at 4°C. The sample was then concentrated on an Amicon Ultra 30K filter (Millipore) by centrifugation (4000 x g, 4°C).

2.5. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Total RNA from cells and tissues was isolated using RNeasy midi kit (Qiagen). Synthesis of cDNA was performed with the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) to convert 2 µg of total RNA into single-stranded cDNA. Real-time PCR was performed in triplicate using 50 ng of cDNA. Relative amounts of transcripts were determined using Taqman probes specific for Gasp-2 (Mm01308311_m1), *β2m* (Mm00437762_m1), Dffa (Mm00507317) and MyoG (Mm00446194_m1), on an ABI PRISM© 7900 System. Relative mRNA expression values were calculated by the ΔΔCt method with normalization of each sample to the average change in cycle threshold (Ct) value of the controls. For all analyses, three independent experiments have been performed, each assay corresponding to 3 wells/condition/ probe.

2.6. Proliferation assay

Three independent experiments have been carried out. Each experiment corresponds to the analysis of 12 wells with 2000 cells/well at t=0h. The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)was used to evaluate the cell proliferation during 72 h.20 µl de MTS solution was added to the cells for 3 h and absorbance at 490 nm was then recorded with a 96-well plate reader.

2.7. Fusion Index

The fusion index corresponds to the proportion of nuclei present within myotubes that contain two or more nuclei. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 min. The fusion index was analyzed after hematoxylin and eosin (H&E) staining.

2.8. Lentiviral-mediated knock down of Gasp-2

Individual shRNA constructs specifically designed to target the Gasp-2 were purchased from Sigma Aldrich (Gasp-2_sh1: XM_128578.3-784s1c1; Gasp-2_sh2: XM_128578.3-500s1c1). Lentiviral particles, consisting of the shRNA transfer vector PLKO.1-puro (which contains the sequence of shRNA as well as the cis acting sequences necessary for RNA production and packaging) and the mission lentiviral packaging (Sigma Aldrich). Mission lentiviral particles were generated from different components. The packaging vector contains the minimal set of lentiviral genes required to generate the virion structural proteins and packaging functions. The pCMV-VSV-G envelope vector provides the envelope vector for pseudo-typing.The PLKO.1-puro Gasp-2 shRNA or empty pLKO.1 andpCMV-VSVG vectors were transfected into HEK293Tcells using a Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Briefly, HEK293T cells were grown in GM at 70-80% confluence and were transfected with 1 µg of plasmid PLKO.1-puro with the mission lentiviral packaging mix. After 16 h of transfection, the medium was replaced with freshGM and cells were incubated for a further 60 h. The supernatant was then collected as a source of viral particles. C2C12 myoblasts were infected with lentivirus-containing media for 24 h and selected with 2 µg.ml-1 puromycin.

2.9. SDS-Page and Western Blot analyses

Cells and tissues were collected in lysis buffer (50 mMTris, pH8, 150 mMNaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, and protease inhibitors) followed by centrifugation at 12,000 g, 20 min, 4°C. Protein quantification was performed with a Bradford assay. Proteins were separated under denaturing conditions into a 10% SDS-polyacrylamide gel before being transferred during 1.5 h

at 40mA to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked in TBS (Tris-Buffered Saline) with 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dry milk. Membranes were incubated overnight with a monoclonal mouse CDK2 (1:500, sc-6248, Santa Cruz), a mouse monoclonal p21 (1:400, sc-53870, Santa Cruz), a goat polyclonal SMAD2/3 (1:2000, AF3797, R&D Systems), a polyclonal rabbit phospho-SMAD3 (1:500, AB3226, R&D Systems), a polyclonal goat GASP-2 (1:1000, AF2136, R&D Systems), a polyclonal mouse MyHC (Myosin Heavy Chain, 1:4000, M4276, Sigma Aldrich) and polyclonal goat anti-mouse GAPDHantibody, (1:2000, AF5718, R&D Systems) diluted in 2% non-fat dry milk. After 4 washes in TBS-Tween 0.1% (v/v), membranes were incubated for 1 h at room temperature with 1:1000 dilution of secondary antibodies: anti-goat IgG horse-radish peroxidase (HRP) conjugate (P0449, Dako), anti-mouse IgG HRP conjugate (P0447, Dako) or anti-rabbit IgG HRP conjugate (P0399, Dako). After 4 more washes in TBS-Tween 0.1% (v/v), immunoblots were developed by enhanced chemiluminescence. The developed films were analyzed using ImageQuant TL software (GE Healthcare).

2.10. Glycosylation Analysis

N-deglycosylation: 250 ng of purified proteins were denatured at 95°C for 10 min in 10 mM potassium phosphate and 0.2% SDS. The samples were then incubated overnight at 37°C in a buffer (10mM potassium phosphate, pH8, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.2% SDS, 1% β-mercaptoethanol) containing 0.1-1U of PNGase F (Roche Applied Science).

O-deglycosylation: The O-deglycosylation was performed with the EDEGLY kit (Sigma-Aldrich).

250 ng of purified proteins were denatured at 100°C for 5 min in 2.5 µl of denaturation solution (Sigma-Aldrich) and 10 µl of reaction buffer 5X. Samples were incubated overnight at 37°C with 1µl of each enzyme (PNGase F, O-Glycosidase, α-(2→3,6,8,9)-Neuraminidase, β-N-Acetylglucosaminidase, β-(1→4)-Galactosidase).

3. Results

3.1. GASP-2 regulates myogenesis

To studythe role of GASP-2 in myogenesis, we treated C2C12 myoblasts cells with 1 µg.ml^{-1} of hGASP-2 protein. Cell proliferation assay showed that hGASP-2 treatment improves significativelymyoblast proliferation rate compared to control cells (29% at 48 h; 46% at 72 h)(Fig. 1A). We also analyzed the expression of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) that positively regulates cell-cycle progression. Western blot analyses showed an increase of CDK2 in C2C12 myoblasts treated with hGASP-2 compared to the control, consistent with an increased proliferation rate, while p21 expression, a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI), decreases in treated myoblasts (Fig. 1B-D). These results revealed that hGASP-2 treatment promotes cell-cycle progression. To determine whether the increase of C2C12 proliferation rate in presence of hGASP-2 was due to an inhibition of myostatin (MSTN), we evaluated the phospho-SMAD3 (pSMAD3) levels of C2C12 cells treated with MSTN and/or hGASP-2 (Fig. 1E-F). As expected C2C12 myoblasts treatment with MSTN leads to an increase of the pSMAD3 rate compared to the untreated myoblasts. However, hGASP-2 treatment decreases the pSMAD3 signal confirming that hGASP-2 inhibits the MSTN pathway. No change was shown in the total SMAD2/3 rates (Fig. 1E).

Then, we analyzed the effect of Gasp-2 during C2C12 myoblast differentiation.We transiently transfected the C2C12 cells with a vector containing theGasp-2cDNA sequence. Myoblast differentiation was assessed with two clones, Cl1 and Cl2 that overexpress Gasp-2 about 250 times and 80 times respectively (Fig. 2A). Cl2 presents an increase of 15% of myotube formation in 72h and 17% at 96h (Fig. 2B). Fusion index is also significantly increased in Cl1 at 96h compared to C2C12 and control cells (Fig 2B). No variation in myotubes size was observed in both clones.Consistent with theincreaseof C2C12 differentiation, myogenin expression, a MRF (muscle regulator protein) protein required for myoblast differentiation, was up-regulated 10 times at 24 h and 48 h of differentiation in the Cl2 myotubes when compared to the control cells (Fig. 2C). Myogenin expression was also slightly up-regulated in Cl1 compared to control cells (Fig. 2C). Differences in transcript levels of Gasp-2inboth clones (Fig. 2A) and the observed Gasp-2 overexpression effect on differentiation (Fig 2B-C) suggests that there is no dose-dependent consequence on cell differentiation.

In addition, we generated cell lines that underexpress Gasp-2 using two different lentivirus based-shRNA. These cell lines were named KD1 and KD2. Subsequent qPCR analyses revealed a significant

reduction ofGasp-2 expression in both cell lines, around 60% for KD1 and 65% for KD2 (Fig. 3A). Next, we assessed both proliferation and differentiation ofboth clones. KD1 and KD2 cell lines present a reduced myoblast proliferation as the number of myoblasts is significantly decreased after 48h of culture (Fig.3B). Furthermore,Gasp-2 knockdown also leads to a decreased differentiation(Fig. 3C). Indeed, the fusion index of both clones is decreased about 40% at 72h and 60% at 96h compared to the fusion index of C2C12 and control cells(Fig.3C). No variation in myotubes size was observed in both clones. Myogenin expression is also down-regulated by 50% at 72 h and 96 h of differentiation in both Gasp-2 knockdown clones (Fig. 3D). Finally, we also observed a global decrease of MyHC expression and a global decrease of p21 (a cyclin-dependent kinase inhibitor) in KD1 cell lines compared to the control cells (Fig. 4 A-C). Same results were observed in KD2 cell lines (data not shown). All these results correlated with an impairment of differentiation when Gasp-2 is down-regulated.

Taken together, these data suggest that Gasp-2 plays an important role during the normal progression of myogenesis, specifically through regulation of both myoblast proliferation and differentiation.

3.2. In silico analysis of potential glycosylation sites of murine GASP-2

In silico analysis of GASP-2 with the NetNGlyc Server revealed one consensus N-glycosylation site at asparagine N497. The NetOGlyc Server allowed us to highlight 6 serine or threonine, S170, S171, T177, T178, T182, T206 with a mucin-type O-glycosylation potential higher than the threshold. All were located between the Follistatin/Kazal and the Igc2 domains except for T206 located in the Igc2 domains(Fig.S1).

To examine the conservation of these glycosylation sites, an alignment of GASP-2 primary sequences from 30 vertebrates was performed and represented as a logo. The logo indicatedthat the potential N-glycosylation site, N497, was highly conserved, correlating with theNetNGlyc result. In addition, all the potential O-glycosylation sites seemed conserved among vertebrates (Fig.S1).

3.3. In vitrovalidation of hGASP-2 state of glycosylation

We first investigated the glycosylation state of the human recombinant protein GASP-2 by enzymatic digestions.Western analyses after N-deglycosylation by PNGase F revealed that hGASP-2 migrated

faster than the untreated protein but the observed molecular weight was still higher than the predicted one (Fig. 5). PNGase F treatment was completed by four other enzymes (O-Glycosidase, α-(2→3,6,8,9)-Neuraminidase, β-N-Acetylglucosaminidase,β-(1→4)-Galactosidase) to remove the mucin-type O-glycans. This treatment allowed hGASP-2 to migrate at approximately 55 kDa, corresponding to its predicted molecular weight without post-translational modifications. This result confirmed that GASP-2 is N- and O-glycosylated and suggested that these glycosylations are the main post-translational modifications of GASP-2.

3.4. Fully deglycosylated GASP-2 protein can inhibit myostatin

To determine whether theN- and O-glycosylation is required for GASP-2 to inhibit myostatin, we produced and purified the murine GASP-2 in a prokaryotic system to obtain a recombinant protein without glycosylation. We then tested the activity of the deglycosylated GASP-2 on C2C12 myoblasts. C2C12 proliferation is increased in the presence of 1 $\mu g.ml^{-1}$ deglyco-mGASP-2 (Fig. 6). This increase of the proliferation rate was comparable with the one observed after the treatment of the fully glycosylated commercial hGASP-2 (Fig.6).

4. Discussion

In this work, we investigated the function of GASP-2 during myogenesis and the importance of glycosylation on its proteinactivity. Although GASP-2 was shown to interact in vitro with myostatin[8,9], no data are available concerning the effect of this interaction in a muscular context. A recent study showed that knock-out Gasp-$1^{-/-}$or Gasp$2^{-/-}$mice, present a muscular atrophy from 8 months of age and defects in muscle regeneration[17], strongly suggesting an involvement of GASP-2 in myostatin regulation during muscle development. To get a better understanding on GASP-2 functions at cellular and molecular levels, we treated C2C12 cells with either GASP-2 as recombinant proteins or viral particles containing several specific shRNAs against Gasp-2. We showed here for the first time that GASP-2, like its paralogue GASP-1, promotes the proliferation and the differentiation of myoblasts by the inhibition of the myostatin canonical pathway[14,18,19]. No significant differences were observed on the development of myoblasts treated with GASP-1 or GASP-2 (data not shown).

These data are consistent with the phenotypes described in Gasp-1 and Gasp-2 knock-out mice, even if the atrophy is less pronounced in Gasp-2$^{-/-}$mice [17]. This could suggest that GASPs are equally involved in muscle development and have a functional redundancy. Therefore, it would be interesting to analyze Gasp-1 and Gasp-2 gene expression levels in Gasp2$^{-/-}$and Gasp-1$^{-/-}$mice respectively. In addition, double knock-out Gasp1$^{-/-}$;Gasp2$^{-/-}$ mice analyses would confirm the involvement of these genes duringmuscle development. In addition to redundancy between GASP-1 and GASP-2, some studies have reported around myostatin and GDF11 redundancy by characterizing double knock-out Mstn$^{-/-}$; Gdf11$^{-/-}$[20–22]. These mice present only severe axial skeletal defects but no abnormality of skeletal muscle as well as Gdf-11 single mice [20]. All these data suggested no function of GDF-11 in muscle development. Although GASP-2 can inhibit both myostatin and GDF-11,the effects on myogenesis that we observed should be the result of myostatin regulation[17].

We further investigated the structure/function relationship of GASP-2 during its interaction with myostatin. Particularly we focused our study on how GASP-2 glycosylation may influence the interaction between the two proteins and the inhibition function of GASP-2. The two main forms of glycosylation found on secreted glycoproteins are the N-glycans and the mucin-type O-glycans. Thus, we first identified by in silico analyses the potential sites where GASP-2 could be glycosylated. We determined that GASP-2 sequence present a single consensus sequence for N-glycosylation localized in the Netrin domain, that we have later found occupied, and six potential sites of O-glycosylation between the Follistatin/Kazal and the IgC2 domains. Although we are able to prove the presence of mucin-type O-glycans on GASP-2, we cannot determine their exact number and position on the protein.In the aim of providing us a tool to analyze the effect of a fully deglycosylated protein, we decided to produce mGASP-2 in a bacterial system. C2C12 cells treated with deglyco-mGASP-2 did not present any difference in their proliferation compared to cells treated with the fully glycosylated hGASP-2. Nevertheless, we cannot exclude differences in effectiveness with lower protein concentration. Like its paralogue GASP-1, our result seems to prove that glycosylation is not necessary on GASP-2 inhibitor function of myostatin actions. Furthermore, the N-glycosylation could play a role in GASP-2 secretion like it was shown for GASP-1[19].

We previously reported that the N-glycan site in the Netrin domain and the localization of the O-glycans sites are particularly well conserved among mammals and between the two GASPs [5]. This high degree of conservation tends to indicate that these glycans may play a role in other GASPs biological activities. As the Netrin domain is known to interact with myostatin propetide, the N-glycosylation could modulate this interaction and help to maintain myostatin in its latent complex form[6,10,23]. An interaction test between the propeptide and the deglycosylated form of GASP-2 will help to confirm this hypothesis. It is well known that O-glycans participate in the tridimensional structure[24]. In a muscular context, their presence near the Follistatin/Kazal domain may modulate the interaction with myostatin. Moreover, mucin-type O-glycans were shown to protect proteins against proteolysis[25]. During the interaction between GASPs and myostatin latent complex, their presence may prevent the propeptide degradation and myostatin activation by hiding the cleavage site of the propeptide from BMP-1/Tolloid family[26].

In addition to skeletal muscle, GASPs proteins present a wide tissular expression pattern including kidney, ovary, testis, lung, brain and are highly expressed in pancreas[4]. This latter organ secrets large amount of digestive enzymes, such astrypsin, elastase and chemotrypsin, known to be targets of protease inhibitors.While only an antitrypsin activity of GASPs second Kunitz domain has been described, 3D structure studies indicate that trypsin is not the prime target of this domain [8,23,27], suggesting that most relevant proteases remain to be identified. The role of GASP glycosylation in this context should be explored.

5. Conclusions

This structure-function relationship study of GASP-2 demonstrates for the first time its effect on the myostatin signaling pathway during myogenesis. We also show that the lack of any type of glycosylation does not seem toaffect its inhibitory role of myostatin actions. Nevertheless, these glycans structures could be involved in other GASP-2 biological activities and need to be investigated in the future.

Acknowledgments

This work was supported by the French National Institute of Agricultural Research (INRA) and by the Limousin Regional Council. LP was supported by a PhD fellowship from INRA/Region Limousin. We thank Pr. FabriceLalloué for his help during some of the experiments. The authors thank Dr. Benoît Laporte for his critical reading of the manuscript.

References

[1] A.C. McPherron, A.M. Lawler, S.J. Lee, Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamilymember, Nature. 387 (1997) 83–90. doi:10.1038/387083a0.

[2] S.-J. Lee, Regulation of muscle mass by Myostatin, Annu. Rev. CellDev. Biol. 20 (2004) 61–86. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.012103.135836.

[3] M. Trexler, L. Bányai, L. Patthy, A humanproteincontaining multiple types of protease-inhibitory modules, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 3705–3709. doi:10.1073/pnas.061028398.

[4] M. Trexler, L. Bányai, L. Patthy, Distinct Expression Pattern of TwoRelatedHumanProteinsContaining Multiple Types of Protease-Inhibitory Modules, Biol. Chem. 383 (2002) 223–228. doi:10.1515/BC.2002.023.

[5] O. Monestier, C. Brun, O. Cocquempot, D. Petit, V. Blanquet, GASP/WFIKKN Proteins: Evolutionary Aspects of TheirFunctions, PLoS ONE. 7 (2012) e43710. doi:10.1371/journal.pone.0043710.

[6] J.J. Hill, Regulation of Myostatin in Vivo by Growth and Differentiation Factor-AssociatedSerum Protein-1: A NovelProteinwithProteaseInhibitor and FollistatinDomains, Mol. Endocrinol. 17 (2003) 1144–1154. doi:10.1210/me.2002-0366.

[7] D.J. Phillips, D.M. de Kretser, Follistatin: a multifunctionalregulatoryprotein, Front. Neuroendocrinol. 19 (1998) 287–322. doi:10.1006/frne.1998.0169.

[8] K. Kondas, G. Szlama, M. Trexler, L. Patthy, Both WFIKKN1 and WFIKKN2 Have High Affinity for Growth and DifferentiationFactors 8 and 11, J. Biol. Chem. 283 (2008) 23677–23684. doi:10.1074/jbc.M803025200.

[9] R.G. Walker, E.B. Angerman, C. Kattamuri, Y.-S. Lee, S.-J. Lee, T.B. Thompson, Alternative Binding Modes Identified for Growth and Differentiation Factor-associatedSerumProtein (GASP) FamilyAntagonism of Myostatin, J. Biol. Chem. 290 (2015) 7506–7516. doi:10.1074/jbc.M114.624130.

[10] M. Thomas, Myostatin, a NegativeRegulator of Muscle Growth, Functions by InhibitingMyoblastProliferation, J. Biol. Chem. 275 (2000) 40235–40243. doi:10.1074/jbc.M004356200.

[11] H. Amthor, G. Nicholas, I. McKinnell, C.F. Kemp, M. Sharma, R. Kambadur, et al.,Follistatin complexes Myostatin and antagonisesMyostatin-mediated inhibition of myogenesis, Dev. Biol. 270 (2004) 19–30. doi:10.1016/j.ydbio.2004.01.046.

[12] S.J. Lee, Extracellularregulation of myostatin: A molecularrheostat for muscle mass, Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem. 10 (2010) 183.

[13] O. Monestier, C. Brun, K. Heu, B. Passet, M. Malhouroux, L. Magnol, et al.,Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscularphenotype, BMC Genomics. 13 (2012) 541. doi:10.1186/1471-2164-13-541.

[14] C. Brun, L. Périé, F. Baraige, B. Vernus, A. Bonnieu, V. Blanquet, Absence of Hyperplasia in Gasp-1 OverexpressingMiceisDependent on Myostatin Up-Regulation, Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 34 (2014) 1241–1259. doi:10.1159/000366335.

[15] D. Yaffe, O. Saxel, Serial passaging and differentiation of myogeniccellsisolatedfromdystrophic mouse muscle, Nature. 270 (1977) 725–727.

[16] K. Julenius, A. Mølgaard, R. Gupta, S. Brunak, Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalianmucin-type O-glycosylation sites, Glycobiology. 15 (2005) 153–164. doi:10.1093/glycob/cwh151.

[17] Y.-S. Lee, S.-J. Lee, Regulation of GDF-11 and myostatinactivity by GASP-1 and GASP-2, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110 (2013) E3713–3722. doi:10.1073/pnas.1309907110.

[18] S. Bonala, S. Lokireddy, H. Arigela, S. Teng, W. Wahli, M. Sharma, et al.,Peroxisomeproliferator-activatedreceptor β/δ inducesmyogenesis by modulatingmyostatinactivity, J. Biol. Chem. 287 (2012) 12935–12951. doi:10.1074/jbc.M111.319145.

[19] C. Brun, O. Monestier, S. Legardinier, A. Maftah, V. Blanquet, Murine GASP-1 N -Glycosylation is not Essential for itsActivity on C2C12 MyogenicCells but AltersitsSecretion, Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 30 (2012) 791–804. doi:10.1159/000341458.

[20] A.C. McPherron, T.V. Huynh, S.-J. Lee, Redundancy of myostatin and growth/differentiation factor 11 function, BMC Dev. Biol. 9 (2009) 24. doi:10.1186/1471-213X-9-24.

[21] C.E. Brun, M.A. Rudnicki, GDF11 and the MythicalFountain of Youth, CellMetab. 22 (2015) 54–56. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.009.

[22] M.A. Egerman, S.M. Cadena, J.A. Gilbert, A. Meyer, H.N. Nelson, S.E. Swalley, et al., GDF11 Increaseswith Age and InhibitsSkeletal Muscle Regeneration, CellMetab. 22 (2015) 164–174. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.010.

[23] K. Kondás, G. Szláma, A. Nagy, M. Trexler, L. Patthy, Biologicalfunctions of the WAP domain-containingmultidomainproteins WFIKKN1 and WFIKKN2, Biochem. Soc. Trans. 39 (2011) 1416–1420. doi:10.1042/BST0391416.

[24] T.A. Gerken, K.J. Butenhof, R. Shogren, Effects of glycosylation on the conformation and dynamics of O-linkedglycoproteins: carbon-13 NMR studies of ovine submaxillarymucin, Biochemistry (Mosc.). 28 (1989) 5536–5543.

[25] A.G. Semenov, A.B. Postnikov, N.N. Tamm, K.R. Seferian, N.S. Karpova, M.N. Bloshchitsyna, et al.,Processing of pro-brainnatriuretic peptide issuppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site, Clin. Chem. 55 (2009) 489–498. doi:10.1373/clinchem.2008.113373.

[26] N.M. Wolfman, A.C. McPherron, W.N. Pappano, M.V. Davies, K. Song, K.N. Tomkinson, et al., Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloidfamily of metalloproteinases, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 15842.

[27] E. Liepinsh, A. Nagy, M. Trexler, L. Patthy, G. Otting, Second Kunitz-type proteaseinhibitordomain of the human WFIKKN1 protein, J. Biomol. NMR. 35 (2006) 73–78. doi:10.1007/s10858-006-9013-1.

Figures

Figure 1

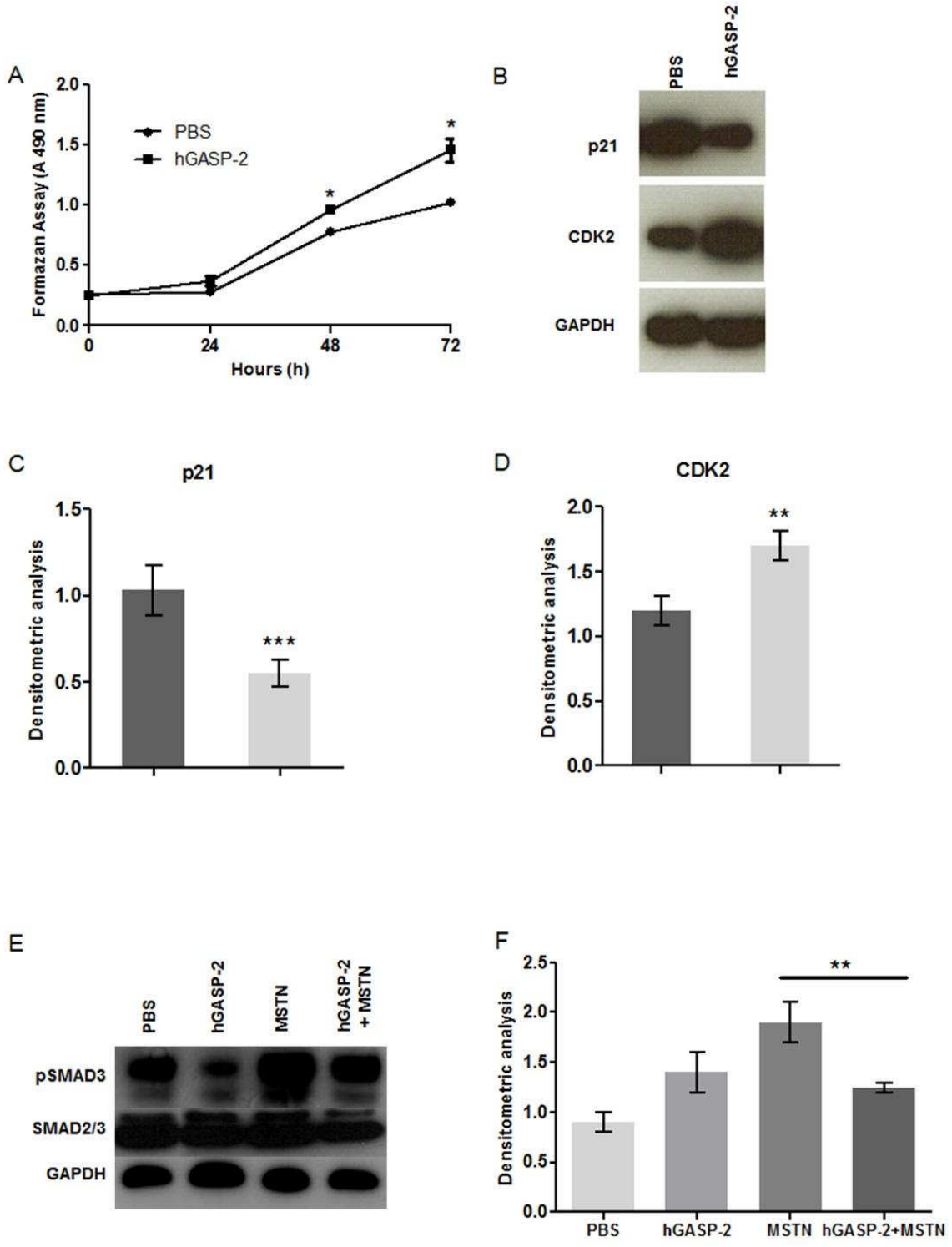

Figure 1.Enhancement of C2C12 cells proliferation and differentiation by GASP-2 overexpression

(A) Proliferation analysis of C2C12 cells cultured for 72 h and treated in the absence (PBS) or presence of 1 µg.ml^{-1} of hGASP-2 as measured by formazan assay. Each point corresponds to the mean ± S.D. of three independent experiments.

(B-D) Total proteins extracted from C2C12 treated with PBS orhGASP-2 (1 µg.ml^{-1}) were resolved by SDS-PAGE. Membranes were immunoblotted with specific anti-CDK2and anti-p21 antibodies.

(E-F) Total proteins extracted from C2C12 treated with MSTN(250 ng.ml^{-1}) and/or hGASP-2 (1 µg.ml^{-1}) were resolved by SDS-PAGE. Membranes were immunoblotted with specific anti-pSMAD3 and anti-SMAD2/3 antibodies. (B-F) Nitrocellulose membranes were also probed with anti-GAPDH antibodies to show equal loading. The graphs were obtained using Image J software to quantify CDK2, p21, pSMAD3 and SMAD2/3 signals normalized with GAPDH signals of three different experiments.

Figure 2

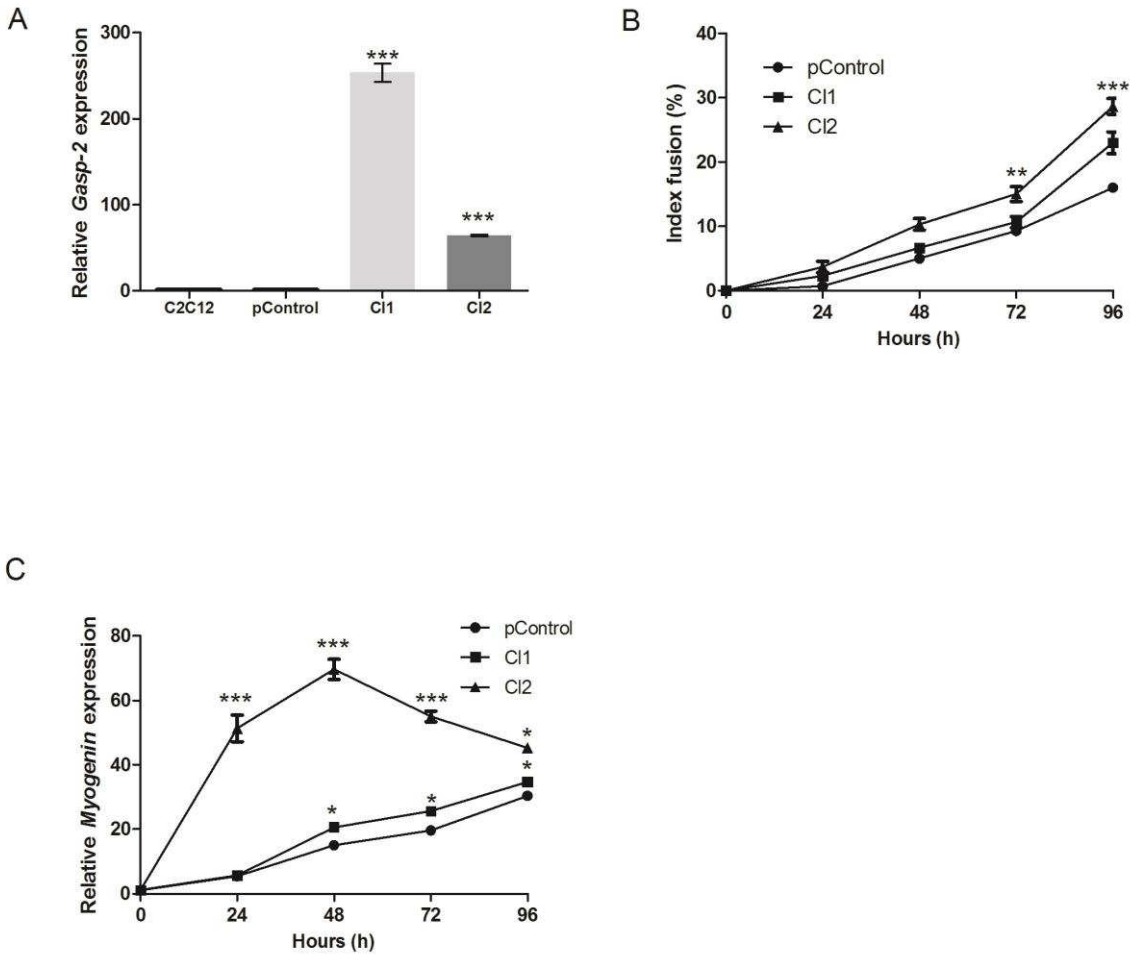

Figure 2.Enhancement of C2C12 cells differentiation by GASP-2 overexpression

(A) qPCR analysis of Gasp-2 expression in C2C12 transfected with pcDNA3.1-Gasp-2 (Cl1 and Cl2) or pcDNA3.1-empty (pControl). Each histogram corresponds to the mean ± S.D. of three independent experiments. The graph represents fold change normalized to Dffa and β2m expression.

(B) Quantification of fusion index C2C12 myotubes transfected with pcDNA3.1-Gasp-2 (Cl1 and Cl2) or pcDNA3.1-empty (pControl) and cultured for 96 h of differentiation. Each point corresponds to the mean ± S.D. of three experiments.

(C) qPCR analysis of Myogenin expression during 96 h of differentiation in C2C12 myotubes transfected with pcDNA3.1-Gasp-2 (Cl1 and Cl2) or pcDNA3.1-empty (pControl). Each point corresponds to the mean ± S.D. of three independent experiments. The graph represents fold change normalized to Dffa and β2m.

Statistical significance was determined using a t-test analysis. *: $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : p value < 0.005.

Figure 3

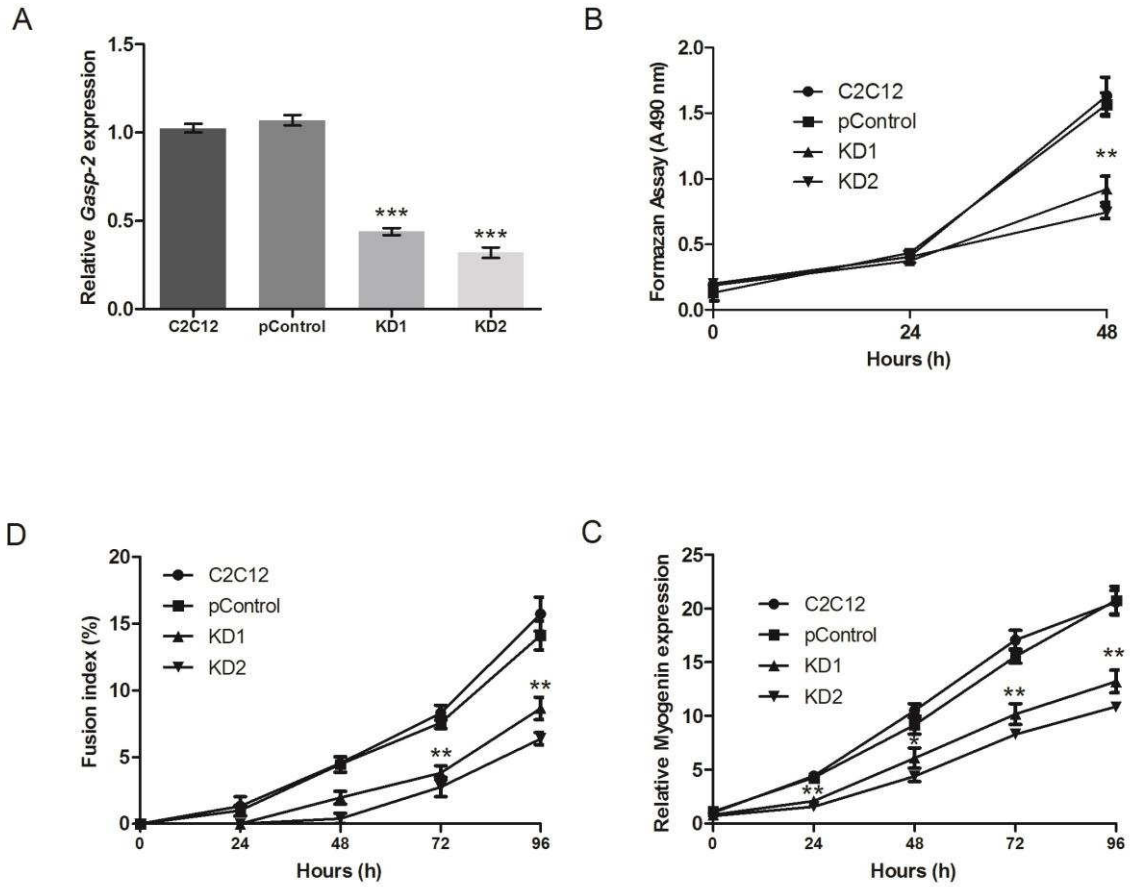

Figure 3.Inhibition of C2C12 cells proliferation and differentiation by Gasp-2 knockdown.

(A)qPCR analysis of mGasp-2 transcriptional expression in C2C12 cells infected with lentivirus containing either empty shRNA (pControl) or shRNAs (KD1 and KD2) designed to specifically target and repress mGasp-2. Each histogram corresponds to the mean ± S.D. of three independent experiments. The graph represents fold change normalized to Dffa and β2m.

(B) Proliferation analysis of C2C12 cells cultured for 48 h not infected orinfected with lentivirus containing either empty shRNA (pControl) or shRNAs (KD1 and KD2) as measured by formazan assay. Each histogram corresponds to the mean ± S.D. of three independent experiments.

(C) Quantification of fusion index C2C12 myotubes infected with lentivirus containing either empty shRNA (pControl) or shRNAs (KD1 and KD2) and cultured for 96 h of differentiation. Each point corresponds to the mean ± S.D. of three experiments.

(D) qPCR analysis of Myogenin expression during 96 h of differentiation in C2C12 myotubes infected with lentivirus containing either empty shRNA (pControl) or shRNAs (KD1 and KD2). Each pointcorresponds to the mean ± S.D. of three independent experiments. The graph represents fold change normalized to Dffa and β2m.

Statistical significance was determined using a t-test analysis.* :$p< 0.05$; ** : $p< 0.01$; *** : $p< 0.005$.

Figure 4

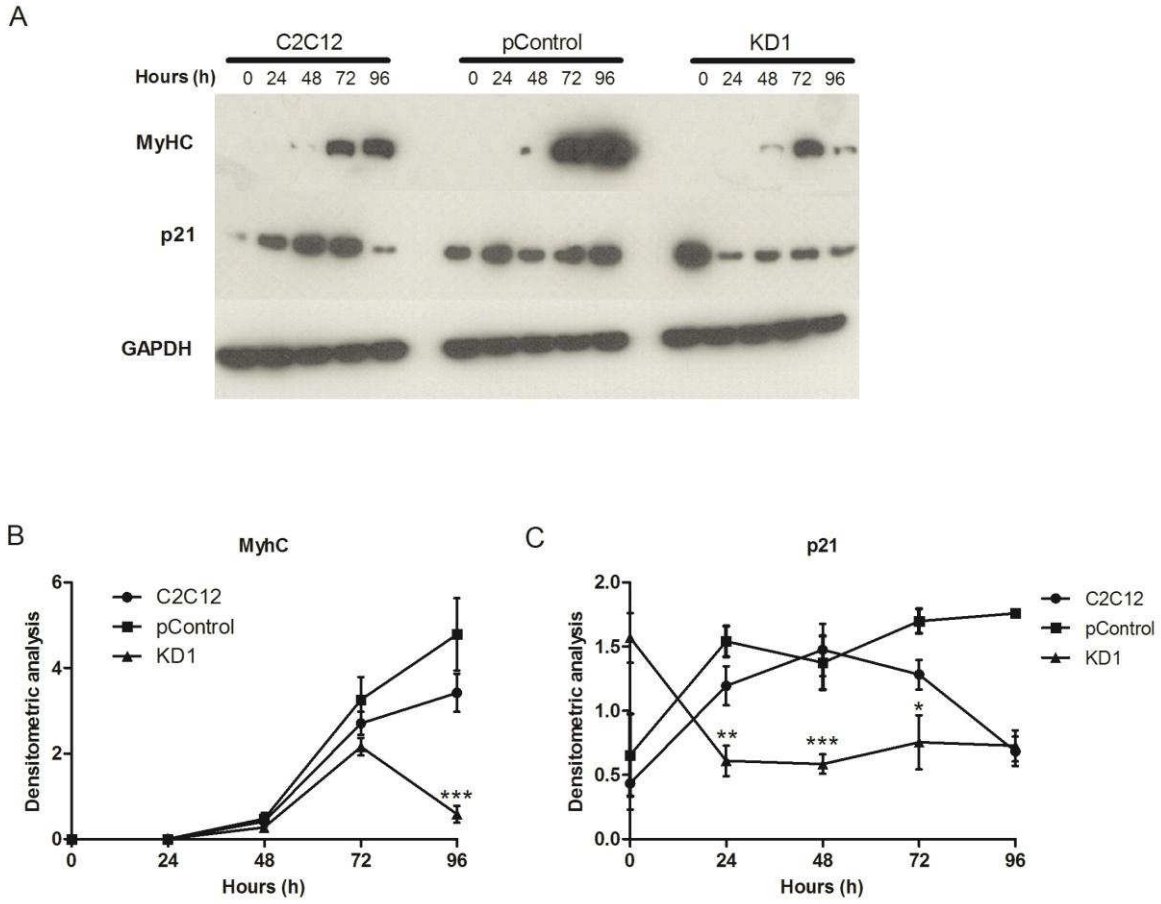

Figure 4.Expression of MyHC and p21 in Gasp-2 knockdown cells.

(A) Immunoblot analysis of MyHC and p21 from 0 h to 96 h of differentiation C2C12 myotubes infected with lentivirus containing either empty shRNA (pControl) or shRNAs(KD1).

(B-C) Nitrocellulose membranes were also probed with anti-GAPDH antibodies to show equal loading. The graphs were obtained using Image J software to quantify MyHC and p21 normalized with GAPDH signals of three different experiments.

Statistical significance was determined using a t-test analysis.* :$p< 0.05$; ** : $p< 0.01$; *** : $p< 0.005$.

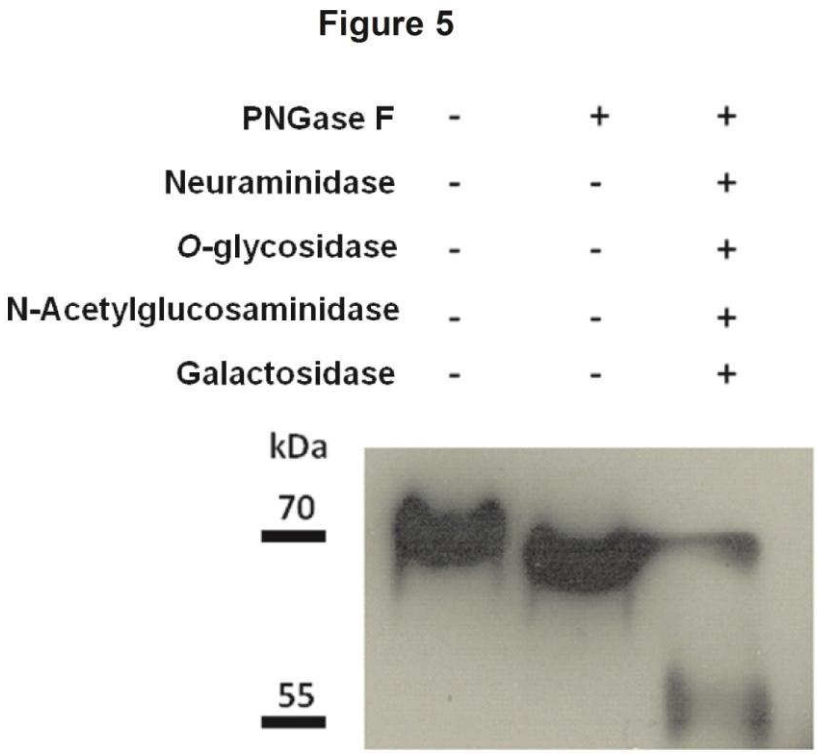

Figure 5. Characterization of the glycosylation state of hGASP-2 protein.

Glycosylated (lane 1), N-deglycosylated (lane 2); N- and O-deglycosylated (lane 3) hGASP-2 protein were detected by Western blot with specific anti-GASP-2 antibody (1:1000).

Figure 6

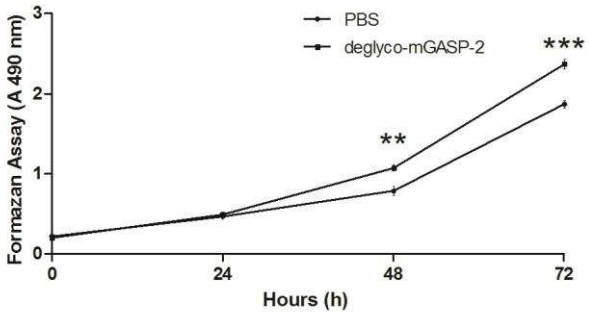

Figure 6. Effects of deglycosylated mGASP-2 on C2C12 myoblast proliferation.

Proliferation analysis of C2C12 cells in the absence (PBS) or presence of the murine deglycosylated GASP-2 protein (deglyco-mGASP-2)(produced in E.coli) cultured for 72 h as measured by formazan assay. Each point corresponds to the mean ± S.D. of three independent experiments. Statistical significance was determined using a t-test analysis. ** :$p< 0.01$; *** : $p< 0.005$.

Figure S1

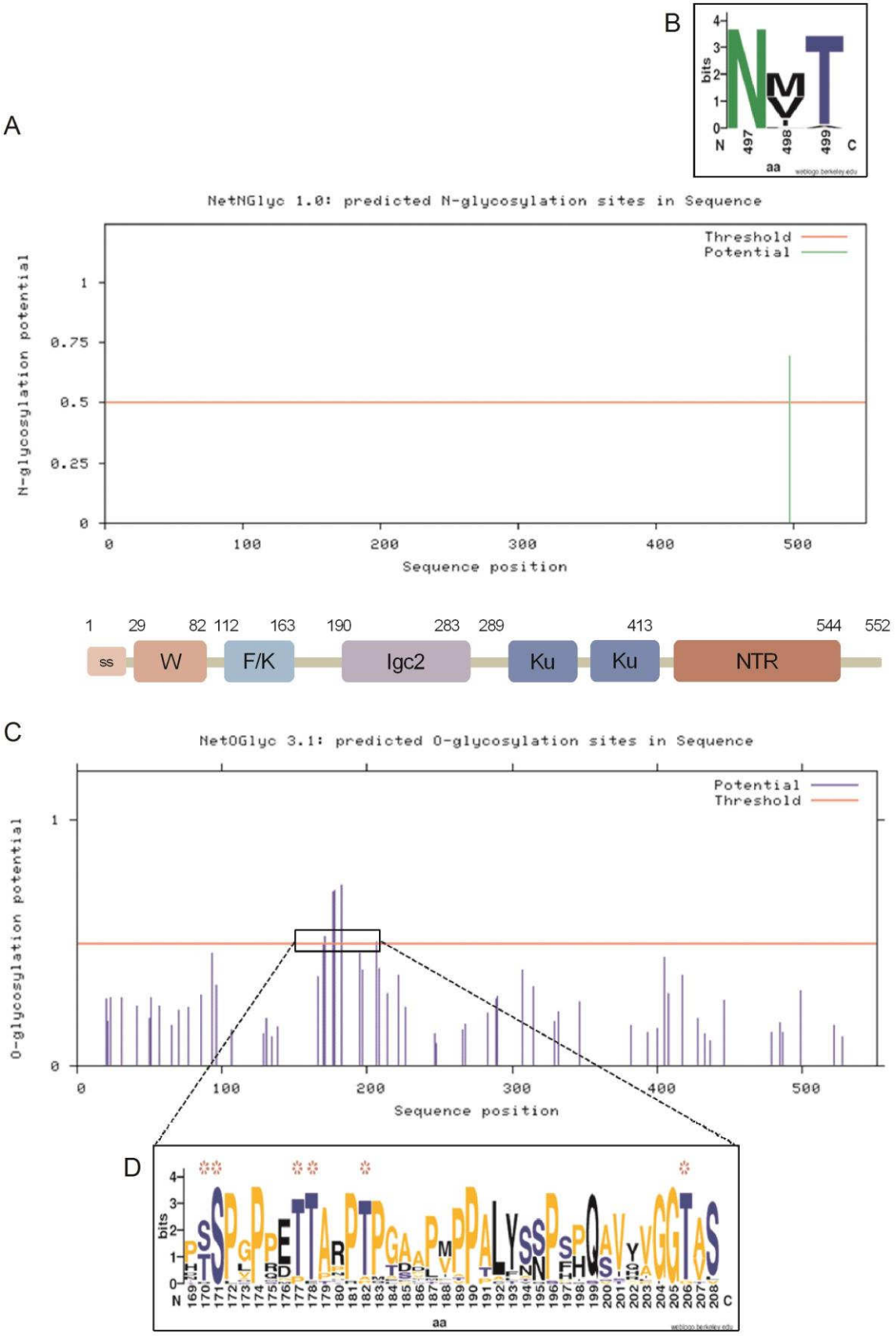
A
B
bits
N
497
498
499
C
aa
NetNGlyc 1.0: predicted N-glycosylation sites in Sequence
Threshold
Potential
N-glycosylation potential
Sequence position
1
29
82
112
163
190
283
289
413
544
552
ss
W
F/K
Igc2
Ku
Ku
NTR
C
NetOGlyc 3.1: predicted O-glycosylation sites in Sequence
Potential
Threshold
O-glycosylation potential
Sequence position
D
bits
aa

Figure S1. Identification and conservation among vertebrates of GASP-2 N- and O-glycosylation sites.

(A)mGASP-2 has one N-glycosylation consensus sequence at asparagine residue 497.

(B) Weblogos are formed through the comparison of 30 sequences of vertebrates and illustrated the conservation of each potential N-glycosylation site (Taller logo means highly conserved site).

(C) mGASP-2 has six potential mucin-type O-glycosylation sites (S170, S171, T177, T178, T182 and T206).

(D) Weblogos are formed through the comparison of 30 sequences of vertebrates and illustrated the conservation of each potential mucin-type O-glycosylation site (Taller logo means highly conserved site).

ss, peptide signal; W, WAP; F, Follistatin; K, Kazal, Ku, Kunitz; NTR, netrin.

Nous montrons ici pour la première fois, que GASP-2 augmente la prolifération et la différenciation des myoblastes en inhibant la voie canonique de la myostatine et ceci indépendamment de sa glycosylation. Néanmoins, nous ne pouvons exclure l'importance de cette modification post-traductionnelle dans un contexte *in vivo* et sur d'autres fonctions biologiques de GASP-2.

L'augmentation de la prolifération des cellules C2C12 observée suite au traitement réalisé avec la protéine GASP-2 est similaire à celle observée lors du traitement avec la protéine GASP-1. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur les souris *Gasp1*$^{-/-}$ et *Gasp2*$^{-/-}$ et suggèrent que ces deux gènes seraient impliqués de façon équivalente dans la croissance musculaire (Lee & Lee 2013). De ce fait, l'absence de phénotype musculaire plus précoce dans ces deux modèles murins pourrait s'expliquer par une redondance de fonctions entre ces deux protéines.

Actuellement au sein du laboratoire, des souris transgéniques surexprimant *Gasp-2* de façon ubiquitaire ont été récemment générées. L'analyse *in vivo* de la surexpression de *Gasp-2* nous permettra de mieux appréhender son rôle durant le développement musculaire mais également sur le métabolisme des glucides et des lipides. Les résultats pourront être comparés avec ceux obtenus chez les souris *Tg(Gasp-1)*. De plus *Gasp-1* et *Gasp-2* sont également exprimés dans de nombreux tissus, suggérant d'autres rôles pour ces deux protéines qui restent encore à déterminer.

(cc) BY-NC-ND

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux protéines GASPs et plus particulièrement à leur rôle d'inhibiteur de la myostatine en se focalisant sur leurs fonctions dans un contexte musculaire et métabolique.

La myostatine est un régulateur négatif majeur de la myogenèse. De ce fait, son invalidation à l'aide d'anticorps ou d'inhibiteurs spécifiques est à l'heure actuelle énormément étudiée. C'est dans ce contexte que l'intérêt de l'équipe du professeur Véronique Blanquet s'est porté, en 2006, sur l'étude des protéines GASPs. Si à cette époque, les phénotypes musculaires observés dans des souris qui surexpriment la *follistatine* ou *Fstl3* étaient connus et similaires à celui retrouvé dans les souris *Mstn*$^{-/-}$, le rôle *in vivo* de GASP-1 ou de GASP-2 étaient encore inconnu. Ainsi, en 2012, notre laboratoire démontre pour la première fois le rôle de GASP-1 sur le muscle grâce à des souris qui surexpriment *Gasp-1*, les *Tg(Gasp-1)*. Ces souris présentent un poids global supérieur à celui des souris sauvages due à une augmentation de la masse musculaire. Mais à la différence des souris *Mstn*$^{-/-}$ ou surexprimant *Fst* et *Fstl3*, les souris *Tg(Gasp-1)* possèdent un phénotype hypermusclé uniquement dû à l'hypertrophie des myofibres. Il n'y a pas d'hyperplasie chez les souris *Tg(Gasp-1)*. Une de nos premières hypothèses à cette absence d'hyperplasie, était que la surexpression de *Gasp-1* au stade embryonnaire n'était pas suffisante pour induire une hyperplasie.

Comment expliquer l'absence d'hyperplasie chez les souris Tg(Gasp-1) ?

Pour tester cette hypothèse, nous avons décidé de réaliser des études *in vitro* sur des cellules musculaires dérivées des cellules satellites. Cette approche nous a permis d'étudier en détail les voies de signalisation modulées suite à la surexpression de *Gasp-1* dans les cellules musculaires. Dans un premier temps, nous avons vérifié dans ces cellules primaires et chez les souris *Tg(Gasp-1)* aux stades embryonnaires et après la naissance, les niveaux d'expression de *Gasp-1*, de la *myostatine* et des protéines impliquées dans la signalisation des TGFβs. Cette étude a révélé que *Gasp-1* était surexprimé environ 20 fois aux stades embryonnaires et que ce niveau d'expression augmentait après la naissance (Brun *et al.* 2014). Il est donc possible que la surexpression de *Gasp-1* ne soit pas suffisante au stade embryonnaire pour inhiber la myostatine expliquant ainsi l'absence d'hyperplasie. Nous avons également relevé une augmentation des taux de transcrits de la *myostatine*, confirmée au stade adulte par PCR quantitative et par un test ELISA réalisé sur des sérums et des cellules primaires issus de souris *Tg(Gasp-1)* (Brun *et al.* 2014). Une surexpression de la *myostatine* avait été observée précédemment chez des souris *Smad3*$^{-/-}$, rendant inactive la voie canonique de la myostatine (Ge et al., 2011) et favorisant ainsi l'activation de la myostatine par

(cc) BY-NC-ND

autorégulation via SMAD7 (Zhu *et al.* 2004; Forbes *et al.* 2006). Nos analyses sur puces TLDA (TaqMan Low Density Array) confirment cette hypothèse démontrant que l'expression de *Smad7* est diminué dans les cellules *Tg(Gasp-1)* (Brun *et al.* 2014). Ces analyses transcriptomiques ont également révélé une diminution de l'expression de *Pax3* et *Pax7* chez les souris *Tg(Gasp-1)* qui pourraient être expliquées par la surexpression de la myostatine. En effet, de récents travaux ont montré que la myostatine inhibait l'expression de *Pax7* via la voie ERK1/2 (McFarlane *et al.* 2008). En suivant cette hypothèse, nous avons prouvé que la myostatine dans notre modèle agissait bien sur la voie ERK1/2 pour inhiber PAX7.

Dès lors, durant les premières phases de la myogenèse, la surexpression de la *myostatine* contrebalancerait l'effet de la surexpression de *Gasp-1* expliquant ainsi l'absence d'hyperplasie chez les souris surexprimant *Gasp-1*. La voie canonique SMAD3 est également inhibée chez les souris qui surexpriment *Fst* et *Fstl3*, cependant ces souris présentent une hyperplasie des fibres musculaires. La particularité de ces deux inhibiteurs est qu'ils inhibent l'activine en plus de la myostatine (Lee & McPherron 2001; Lee 2007a). L'activine est également un acteur du développement musculaire, comme en témoigne l'augmentation de 350% de la masse musculaire lorsque des souris surexprimant la follistatine sont croisées avec des souris *Mstn*$^{-/-}$ (Lee 2007a). GASP-1 n'étant pas capable d'inhiber l'activine, son action antagoniste n'est pas suffisante pour empêcher la myostatine d'intervenir au cours du développement embryonnaire. L'absence d'hyperplasie observé dans le modèle murin surexprimant le propeptide semble valider cette idée (Lee & McPherron 2001).

Enfin, une autre hypothèse pour expliquer l'absence d'hyperplasie serait que *Gasp-1* n'agisse pas au cours des phases embryonnaires et fœtales de la myogenèse. En effet l'hypertrophie musculaire chez les souris *Tg(Gasp-1)* n'est observable qu'à partir de 3 mois (Monestier *et al.* 2012a). De plus, en 2013, l'équipe de Lee a généré un modèle murin déficient pour le gène *Gasp-1* qui ne développe une atrophie musculaire qu'à partir de 8 mois, suggérant donc que *Gasp-1* n'interviendrait pas durant les phases précoces du développement musculaire (Lee & Lee 2013). Ce papier suggère également la possibilité d'une redondance de fonctions entre les autres inhibiteurs de la myostatine, la *Follistatine*, *Fstl3* et *Gasp-2* qui pourraient compenser l'absence de *Gasp-1* retardant ainsi le phénotype « atrophie » des souris *Gasp-1*$^{-/-}$. Nos résultats obtenus grâce aux analyses TLDA réalisées sur les cellules primaires et les souris *Tg(Gasp-1)*, semblent abonder dans ce sens. En effet, les niveaux d'expression de *Fst* et *Fstl3* sont réduits dans les cellules primaires ainsi que dans les embryons *Tg(Gasp-1)* au stade 9.5 dpc. A ce même stade, l'expression de *Gasp-2* est également diminuée.

(cc) BY-NC-ND

Tous ces travaux mettent en lumière la complexité de la régulation des TGFβs ainsi que l'existence d'un réseau génique entre les membres de cette superfamille. Une étude plus globale sur « l'interactome » des protéines impliquées dans la signalisation des TGFβs serait à continuer dans ce modèle pour étudier plus en détail les conséquences de la surexpression de *Gasp-1*. Au sein du laboratoire des analyses Affymétrix sur des cellules primaires *Tg(Gasp-1)* sont actuellement en cours et devraient apporter une vue plus large sur l'effet de la surexpression de *Gasp-1* sur le développement musculaire.

Quel est le rôle de Gasp-1 dans l'homéostasie du glucose ?

Récemment, la myostatine s'est révélée d'un intérêt majeur dans l'étude de pathologies comme le diabète et l'obésité. En effet, l'inactivation du gène *Mstn* chez la souris améliore grandement la sensibilité à l'insuline et le transport du glucose dans les tissus cibles (McPherron & Lee 2002; McPherron 2010). De plus, l'inhibition de la *myostatine* semble protégée les animaux contre une prise de poids liée à l'âge ou associée à une alimentation riche en lipides et en glucides (Zhao *et al.* 2005). Les souris surexprimant la *follistatine* ou *Fstl3* présentent aussi un phénotype relativement similaire à celui des souris *Mstn*$^{-/-}$ (Lee & McPherron 2001; Lee 2007a; Gangopadhyay 2013; Brandt *et al.* 2015). A ce jour, rien n'était connu sur le rôle de *Gasp-1* sur le métabolisme des lipides et des glucides. Mon intérêt s'est donc porté au cours de ma thèse sur l'effet de la surexpression de *Gasp-1* sur l'homéostasie glucidique. Nous n'avons observé aucune variation par rapport aux souris sauvages sur la glycémie ou sur le pourcentage de masse graisseuse chez les souris *Tg(Gasp-1)* lorsqu'elles sont âgées de 3 mois. Néanmoins, nous avons pu relever une légère hypertrophie adipocytaire chez les souris transgéniques à cet âge-là. Ce résultat diffère de celui obtenu avec les souris *Mstn*$^{-/-}$ où une diminution de l'adiposité avait été retrouvée. Nous avons donc décidé d'une part, d'étudier plus en détail tous les tissus impliqués dans le métabolisme du glucose et d'autre part, de déterminer si un effet « âge » peut être associé à ces variations phénotypiques. En effet, les travaux de Lee suggèrent un rôle tardif de *Gasp-1* sur le développement musculaire (Lee & Lee 2013), il pourrait en être de même sur son rôle dans le métabolisme. De façon surprenante, notre étude a révélé que les souris *Tg(Gasp-1)* présentaient à 16 mois une dérégulation de l'homéostasie glucidique. Notre modèle murin présente alors certains symptômes retrouvés dans les souris *ob/ob* ou d'autres modèles murins spécifiques de l'obésité et du diabète de type II.

Une de nos hypothèses pour expliquer ce phénotype est que la surexpression de la *myostatine* observée chez les souris *Tg(Gasp-1)* est à l'origine de la dérégulation de l'homéostasie du glucose. La question qui se pose alors : comment la myostatine peut-elle agir sur les tissus impliqués

(cc) BY-NC-ND

dans le métabolisme dans notre modèle ? L'homéostasie du glucose repose sur une communication entre différents tissus comme le foie, le pancréas, le muscle, le tissu adipeux, mais également le rein, le cerveau et les intestins (Allen *et al.* 2011; Bouzakri *et al.* 2011; Gastaldelli 2011; Samuel & Shulman 2012). Tous ces travaux ont démontré qu'une dérégulation dans un ou plusieurs de ces tissus pouvait entraîner une altération globale du métabolisme. Les travaux de Bouzakri se sont intéressés de près à cette communication inter-organes. Son équipe a soumis des myoblastes à un traitement avec la protéine TNFα afin que ces cellules musculaires développent une insulino-résistance. Par la suite, le surnageant de ces myoblastes a été ajouté au milieu de culture de cellules pancréatiques, ce qui a conduit à une diminution de la prolifération et une augmentation de la mortalité cellulaire (Bouzakri *et al.* 2011). Les cytokines présentent dans ce surnageant ont donc pu agir sur la viabilité et la fonctionnalité des cellules β du pancréas. Dans les souris *Tg(Gasp-1)*, ayant confirmé la surexpression de la myostatine par un test ELISA sur des individus jeunes et âgées, les niveaux d'expression protéiques de cytokines musculaires chez des souris sauvages et transgéniques âgées de 16 mois ont été évalués. L'expression de nombreuses cytokines proinflammatoires comme TNFα et CXCL10 (C-X-C motif Chemokine Ligand 10) est augmentée chez les souris *Tg(Gasp-1)*. Ces deux cytokines sont souvent retrouvées surexprimées dans les cas de désordres métaboliques et sont connues pour agir sur le foie et le pancréas. Des travaux ont monté que la myostatine pouvait favoriser la production de TNFα et CXCL10 (Wilkes *et al.* 2009; Bouzakri *et al.* 2011). Les autres cytokines surexprimées chez les souris mutantes âgées, comme TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1) et les chemokines CXCL11, CXCL2, CXCL9, CCL12 (Chemokine (C-C motif) Ligand 12), sont elles aussi régulièrement retrouvées surexprimées chez des individus obèses ou diabétiques. (Okamoto *et al.* 2008; Bouzakri *et al.* 2011; Samuel & Shulman 2012). Comme pour les cellules primaires *Tg(Gasp-1)*, ces résultats démontrent également que la surexpression de *Gasp-1* a dérégulé l'expression d'un grand nombre de gènes.

Une autre de nos hypothèses serait que GASP-1, de par sa surexpression, puisse agir sur le métabolisme indépendamment de la myostatine. Ainsi, dans un premier temps, nous avons décidé d'étudier le protéome musculaire de souris *Tg(Gasp-1)* à 3 et 16 mois, afin d'obtenir une vue d'ensemble sur les acteurs potentiels impliqués dans la régulation de l'homéostasie du glucose. L'électrophorèse sur gel 2D (2 Dimensions) et la spectrométrie de masse nous ont permis de détecter un grand nombre de protéines dont l'expression varie chez les animaux surexprimant *Gasp-1* par rapport aux sauvages **(Figure 26 et 27)**.

(cc) BY-NC-ND

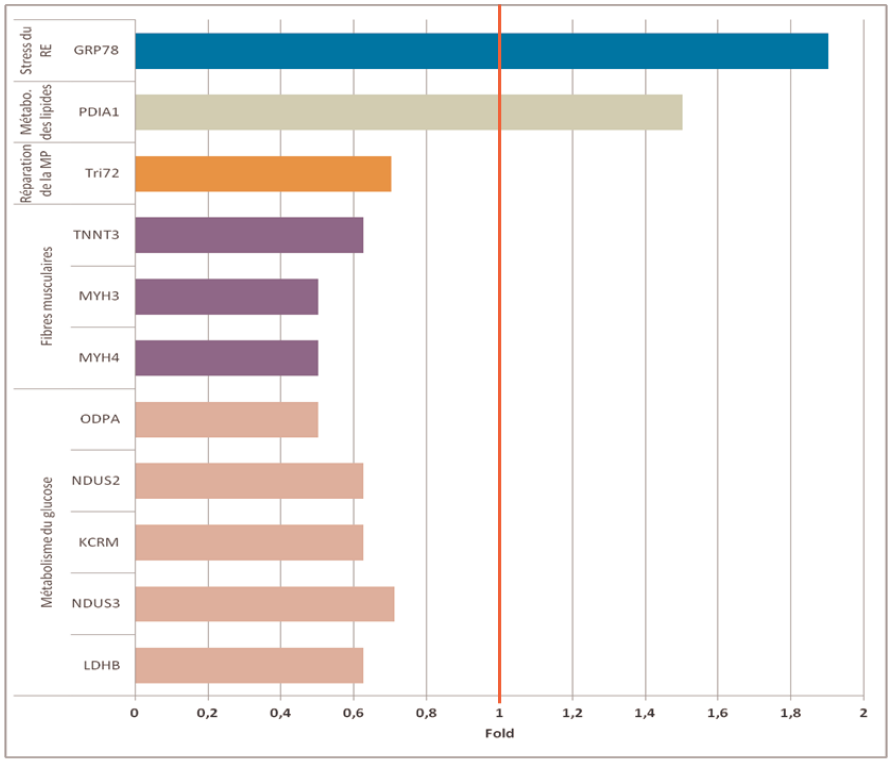

FIGURE 26. PROTEOME MUSCULAIRE DES SOURIS *Tg(Gasp-1)* A 3 MOIS. Résultats préliminaires des analyses protéomiques 2D réalisées sur le *Gastrocnemius* des souris *Tg(Gasp-1)* âgées de 3 mois. Ces résultats sont obtenus en comparant les souris *Tg(Gasp-1)* à des souris sauvages du même âge (ligne rouge). Toutes ces protéines ont une variation significative de leur expression avec une p value minimum < 0.05. *GRP78, Glucose-Related Protein 78 ; KCRM, Creatine kinase M-type ; LDHB, Lactate Dehydrogenase B ; ODPA ou PDHA1, Pyruvate Dehydrogenase (Lipoamide) Alpha 1 ; MYH, Myosine ; NDUS, NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) iron-Sulfur protein ; PDIA1, Protein Disulfide-Isomerase A1 ; PGM1, Phosphoglucomutase 1 ; TRI72, Tripartite motif-containing protein 72 ; TNNT3, Troponin T3.*

Une vérification par Western Blot pour plusieurs de ces protéines est en cours. Les premiers tests nous ont permis de mettre en évidence la surexpression de GRP78 au niveau des muscles de souris *Tg(Gasp-1)* jeunes et âgées. GRP78 est un des marqueurs du stress du RE généralement élevé chez les individus obèses (Ozcan *et al.* 2004). Ce résultat est intéressant car il pourrait indiquer la présence d'une accumulation de gras ectopique au niveau du muscle des souris qui est une autre conséquence de l'insulino-résistance (Samuel & Shulman 2012).

Même si d'autres vérifications sont encore à réaliser pour valider notre étude protéomique, les premiers résultats semblent corroborés le phénotype observé et en particulier le fait que la tissu musculaire pourrait être le premier tissu touché par l'altération de l'homéostasie glucidique observé plus tardivement. En effet, la surexpression de la myostatine, la diminution de l'expression de GLUT-4 et la dérégulation de GRP78 sont les premiers symptômes associés à des pathologies métaboliques

BY-NC-ND

observés chez les souris *Tg(Gasp-1)*. L'analyse protéomique devrait confirmer si oui ou non d'autres voies métaboliques sont dérégulées à ce même âge.

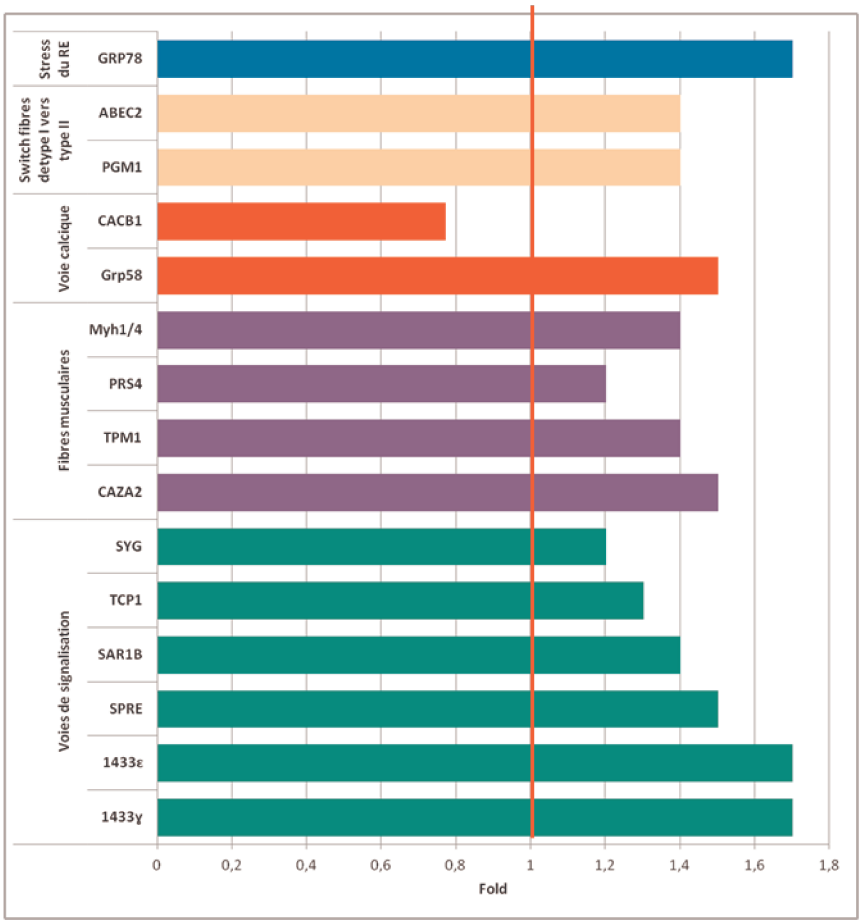

FIGURE 27. PROTEOME MUSCULAIRE DES SOURIS *Tg(Gasp-1)* A 16 MOIS. Résultats préliminaires des analyses protéomiques 2D réalisées sur le *Gastrocnemius* des souris *Tg(Gasp-1)* âgées de 16 mois. Ces résultats sont obtenus en comparant les souris *Tg(Gasp-1)* à des souris sauvages du même âge (ligne rouge). Toutes ces protéines ont une variation significative de leur expression avec une p value minimum < 0.05. *ABEC2 Apolipoprotein B MRNA editing Enzyme, Catalytic polypeptide-like 2 ; CACB1, Calcium Channel voltage-dependent subunit Beta 1 ; CAZA2, F-actin-capping protein subunit alpha-2 ; GRP, Glucose-Related Protein ; Dehydrogenase B ; ODPA ou PDHA1, Pyruvate Dehydrogenase (Lipoamide) Alpha 1 ; MYH, Myosine ; PGM1, Phosphoglucomutase 1 ; PRS4, 26S Protease Regulatory Subunit 4 ; TCP1, T-Complex Protein 1 ; TPM1, Tropomyosin alpha-1 ; SARB1, Scavenger Receptor class B member 1 ; SPRE, Sepiapterin Reductase ; SYG, Glycyl-TRNA Synthetase.*

Enfin, nous ne pouvons exclure qu'un autre tissu pourrait être responsable de l'altération du métabolisme. En effet *Gasp-1* est surexprimé de façon ubiquitaire dans notre modèle et pourrait agir directement sur d'autres tissus indépendamment ou non de la myostatine. Par exemple, *Gasp-1* est retrouvé surexprimé plus de 10 fois dans le tissu adipeux chez les souris *Tg(Gasp-1)*. Il serait alors intéressant d'étudier les adipokines sécrétées dans les souris *Tg(Gasp-1)* jeunes et âgées afin de

(cc) BY-NC-ND

valider ou non une action précoce du tissu adipeux dans la dérégulation de l'homéostasie du glucose. De la même façon GASP-1, en plus d'agir sur la myostatine, est capable d'inhiber GDF-11. Ce dernier participe à la prolifération et à la différenciation des ilots pancréatiques (Harmon *et al.* 2004). L'expression de GDF-11 augmente également avec l'âge et altère la régénération musculaire des individus âgés (Brun & Rudnicki 2015; Egerman *et al.* 2015). Il serait donc intéressant de vérifier les niveaux d'expression de GDF-11 dans les tissus pancréatiques et musculaires des souris *Tg(Gasp-1)*.

Enfin, il serait intéressant de soumettre les souris *Tg(Gasp-1)* dès l'âge de 3 mois à un régime riche en lipides et/ou en glucides. Cette étude pourrait conduire à une aggravation de l'altération du métabolisme et pourrait révéler de manière plus précise les acteurs et les tissus responsables. *Gasp-1* pourrait alors agir indépendamment de la myostatine sur le métabolisme du glucose.

En effet, de part leur capacité à interagir et à inhiber plusieurs TGFβs, le rôle des protéines à domaines FS apparaît complexe. Par exemple, les souris surexprimant *Fstl3* présentent une hypertrophie et une hyperplasie musculaire associées à une diminution de la masse graisseuse alors que les souris déficientes en *Fstl3* présentent aussi une diminution de la masse adipeuse viscérale et une sensibilité à l'insuline accrue (Mukherjee *et al.* 2007; Brandt *et al.* 2015). Le phénotype obtenu dans les souris *Fstl3*$^{-/-}$ serait dû à la levée d'inhibition de l'activine. En effet, cette dernière favorise la prolifération et la différenciation des cellules β, ce qui stimule la sécrétion d'insuline (Mukherjee et al., 2007). FSTL3 agirait donc sur le pancréas indépendamment de la myostatine.

Il serait alors intéressant d'étudier le métabolisme sur des souris *Gasp1*$^{-/-}$ générées par Lee et sur des souris *Tg(Gasp-1)* croisées avec des souris *Mstn*$^{-/-}$ afin de vérifier si *Gasp-1* agit sur l'homéostasie du glucose indépendamment de la myostatine.

Existe-t-il une redondance de fonctions entre GASP-1 et GASP-2 ?

Dans une dernière partie de ma thèse, je me suis intéressée au rôle de GASP-2 qui à l'inverse de GASP-1 reste peu étudié dans le muscle. Ce manque d'intérêt pour GASP-2 peut s'expliquer par le fait que les protéines GASPs partagent entre elles plus de 57% d'identité et que les études d'interaction ont démontré qu'elles étaient toutes deux capables d'interagir avec la myostatine. De plus, seul GASP-1 fut retrouvé associé à la myostatine dans les sérums humains et murins, et il semblerait qu'il soit un plus puissant inhibiteur de la myostatine que GASP-2 bien que ce dernier semble réguler de façon plus efficace l'activité du complexe latent (Hill *et al.* 2003; Szláma *et al.* 2010, 2013; Walker *et al.* 2015). En 2013, des analyses phénotypiques sur un modèle murin déficient

(cc) BY-NC-ND

en *Gasp-2* explorent pour la première fois le rôle de ce gène au cours de la myogenèse. Les souris *Gasp-2*$^{-/-}$ présentent une atrophie musculaire qui se développe à partir de 8 mois et des défauts dans la régénération musculaire (Lee & Lee 2013). Ce phénotype peut s'expliquer par la levée de l'inhibition de la myostatine dans ces souris.

Notre étude *in vitro* sur l'effet de la protéine GASP-2 sur la prolifération et la différenciation des cellules musculaires C2C12 ont confirmé cette hypothèse. Dans un premier temps, nous avons confirmé que *Gasp-2* favorisait bien la prolifération et la différenciation des myoblastes. Par la suite, nous avons démontré grâce à un traitement avec la protéine GASP-2 et/ou MSTN que c'est par son rôle d'inhibiteur de la myostatine que GASP-2 intervenait sur la croissance musculaire.

Les protéines de la famille GASPs semblent donc alors pouvoir agir de façon équivalente sur la myostatine. En effet, nous n'avons pas observé de différence significative sur la prolifération des myoblastes suite à un traitement avec la protéine GASP-1 ou GASP-2. Les modèles murins *Gasp1*$^{-/-}$ et *Gasp2*$^{-/-}$ présentent tous les deux une atrophie musculaire à 8 mois (Lee & Lee 2013). Il convient également de noter que ces deux protéines partagent un profil d'expression tissulaire relativement similaire à quelques exceptions près (Trexler *et al.* 2002) suggérant ainsi une potentielle redondance de fonctions entre GASP-1 et GASP-2. Cette redondance de fonctions pourrait expliquer en partie l'atrophie tardive retrouvée chez les souris *Gasp-2*$^{-/-}$ et *Gasp1*$^{-/-}$. Les analyses TLDA réalisées sur des embryons *Tg(Gasp-1)* et montrant une sous expression d'un facteur -2 de *Gasp-2* semblent conforter cette hypothèse (Brun *et al.* 2014). La génération d'un double KO *Gasp-1*/*Gasp-2* pourrait confirmer ou non de façon certaine cette hypothèse.

Ces résultats démontrent que GASP-2 serait un inhibiteur de la myostatine « aussi efficace » que GASP-1 et qu'il pourrait être étudié dans un contexte thérapeutique et agronomique comme les autres inhibiteurs. Au sein du laboratoire, nous avons généré des souris surexprimant *Gasp-2*, des analyses musculaires et métaboliques sont actuellement en cours et permettront d'analyser plus en détail son rôle *in vivo*.

Les protéines GASPs agissent t'elles indépendamment de la myostatine ?

Si *Gasp-1* et *Gasp-2* sont connus essentiellement pour leur rôle d'antagoniste de la myostatine, les données de la littérature et les travaux réalisés au laboratoire semblent suggérer plusieurs rôles indépendants de la myostatine pour ces deux protéines. Les souris *Gasp-2*$^{-/-}$ présentent des défauts dans la mise en place du squelette axial en contraste avec celui observé dans

(cc) BY-NC-ND

les souris *Gdf-11*$^{-/-}$ démontrant ainsi que GASP-2 régule l'expression de GDF-11 *in vivo* (Lee & Lee 2013). De plus, l'atrophie tardive et les défauts de régénération musculaire observés tardivement chez les souris *Gasp-1*$^{-/-}$ et *Gasp2*$^{-/-}$ pourraient être dus à l'inhibition de la myostatine combinée à celle de GDF-11 dont les niveaux d'expression augmentent avec l'âge (Brun & Rudnicki 2015; Egerman *et al.* 2015). Les analyses TLDA réalisées chez les souris *Tg(Gasp-1)* et les défauts métaboliques observés dans ce modèle laissent également suggérer un rôle indépendant de la myostatine qui pourrait être confirmé ou non par l'analyse du croisement entre des souris *Tg(Gasp-1)* et *Mstn*$^{-/-}$.

Enfin, GASP-1 et GASP-2 font partie des rares protéines à former un multiplex hétérotypique composé de plusieurs domaines inhibiteurs de protéases. Ces deux protéines contiennent pas moins de 4 domaines différents d'inhibiteurs de protéases (WAP, Kazal, Kunitz et Nétrine) (Trexler *et al.* 2001, 2002). Bien qu'à l'heure actuelle seule une activité anti-trypsine a été démontrée pour le second domaine Kunitz, de part leur expression pluritissulaire et leur grande variété de domaines, leurs rôles d'anti-protéases méritent d'être étudiés plus en détail, notamment au niveau du pancréas où les protéines GASPs sont fortement exprimés et où la balance entre protéase et anti-protéase est finement régulée (Werb *et al.* 1982; Glasbrenner & Adler 1993; Koster *et al.* 2003). Nous développons au laboratoire différentes études pour mieux appréhender ce rôle anti-protéasique de GASP-1 et de GASP-2. Actuellement, nous avons confirmé un rôle anti-trypsine pour ces deux protéines entières. Des études sur d'autres types de protéases sont en cours.

GASP-1 et GASP-2 font partie d'un réseau génique incluant la myostatine mais également toutes les protéines participant aux voies de signalisation des TGFβs. Si les protéines GASPs de par leur action antagoniste sur la myostatine présentent un intérêt thérapeutique pour soigner des pathologies musculaires comme la myopathie de Duchenne ou la cachexie, il convient d'étudier plus en détail l'action de leur surexpression sur l'interactome dans lequel elle participe. En effet, la surexpression de GASP-1 semble avoir altéré négativement l'homéostasie du glucose. Des analyses protéomiques et transcriptomiques permettraient de vérifier toutes les voies de signalisation modulées par GASP-1 et GASP-2 et comment ces deux protéines pourraient être utilisées à bon escient comme cibles thérapeutiques.

(cc) BY-NC-ND

REFERENCES

REFERENCES

Abdul-Ghani, M.A., DeFronzo, R.A., 2010. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. BioMed Research International 2010, e476279. doi:10.1155/2010/476279

Abou Mrad, J., Yakubu, F., Lin, D., Peters, J.C., Atkinson, J.B., Hill, J.O., 1992. Skeletal muscle composition in dietary obesity-susceptible and dietary obesity-resistant rats. Am. J. Physiol. 262, R684–688.

Allen, D.L., Hittel, D.S., McPherron, A.C., 2011. Expression and Function of Myostatin in Obesity, Diabetes, and Exercise Adaptation. Med Sci Sports Exerc 43, 1828–1835. doi:10.1249/MSS.0b013e3182178bb4

Allen, D.L., Loh, A.S., 2011. Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. Am. J. Physiol., Cell Physiol. 300, C124–137. doi:10.1152/ajpcell.00142.2010

Allen, D.L., Unterman, T.G., 2006. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. AJP: Cell Physiology 292, C188–C199. doi:10.1152/ajpcell.00542.2005

Amthor, H., Macharia, R., Navarrete, R., Schuelke, M., Brown, S.C., Otto, A., Voit, T., Muntoni, F., Vrbóva, G., Partridge, T., Zammit, P., Bunger, L., Patel, K., 2007. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 1835–1840. doi:10.1073/pnas.0604893104

Amthor, H., Otto, A., Vulin, A., Rochat, A., Dumonceaux, J., Garcia, L., Mouisel, E., Hourdé, C., Macharia, R., Friedrichs, M., Relaix, F., Zammit, P.S., Matsakas, A., Patel, K., Partridge, T., 2009. Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 7479–7484. doi:10.1073/pnas.0811129106

Anderson, S.B., Goldberg, A.L., Whitman, M., 2008. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. J. Biol. Chem. 283, 7027–7035. doi:10.1074/jbc.M706678200

Anthonsen, M.W., Rönnstrand, L., Wernstedt, C., Degerman, E., Holm, C., 1998. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. J. Biol. Chem. 273, 215–221.

Aoki, M.S., Soares, A.G., Miyabara, E.H., Baptista, I.L., Moriscot, A.S., 2009. Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth. Muscle & Nerve 40, 992–999. doi:10.1002/mus.21426

Bailyes, E.M., Navé, B.T., Soos, M.A., Orr, S.R., Hayward, A.C., Siddle, K., 1997. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. Biochem. J. 327 (Pt 1), 209–215.

Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B.D., Rosen, V., Tabin, C.J., 2006. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. PLoS Genet. 2, e216. doi:10.1371/journal.pgen.0020216

Bell, M.L., Buvoli, M., Leinwand, L.A., 2010. Uncoupling of Expression of an Intronic MicroRNA and Its Myosin Host Gene by Exon Skipping. Mol Cell Biol 30, 1937–1945. doi:10.1128/MCB.01370-09

Benton, C.R., Nickerson, J.G., Lally, J., Han, X.-X., Holloway, G.P., Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P., Graham, T.E., Heikkila, J.J., Bonen, A., 2008. Modest PGC-1alpha overexpression in muscle in vivo is

(cc) BY-NC-ND

sufficient to increase insulin sensitivity and palmitate oxidation in subsarcolemmal, not intermyofibrillar, mitochondria. J. Biol. Chem. 283, 4228–4240. doi:10.1074/jbc.M704332200

Bertrand, C., Blanchet, E., Pessemesse, L., Annicotte, J.S., Feillet-Coudray, C., Chabi, B., Levin, J., Fajas, L., Cabello, G., Wrutniak-Cabello, C., Casas, F., 2013. Mice lacking the p43 mitochondrial T3 receptor become glucose intolerant and insulin resistant during aging. PLoS ONE 8, e75111. doi:10.1371/journal.pone.0075111

Biesemann, N., Mendler, L., Wietelmann, A., Hermann, S., Schäfers, M., Krüger, M., Boettger, T., Borchardt, T., Braun, T., 2014. Myostatin regulates energy homeostasis in the heart and prevents heart failure. Circ. Res. 115, 296–310. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.304185

Biressi, S., Molinaro, M., Cossu, G., 2007. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. Dev. Biol. 308, 281–293. doi:10.1016/j.ydbio.2007.06.006

Blaauw, B., Schiaffino, S., Reggiani, C., 2013. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. Compr Physiol 3, 1645–1687. doi:10.1002/cphy.c130009

Blanchet, E., Bertrand, C., Annicotte, J.S., Schlernitzauer, A., Pessemesse, L., Levin, J., Fouret, G., Feillet-Coudray, C., Bonafos, B., Fajas, L., Cabello, G., Wrutniak-Cabello, C., Casas, F., 2012. Mitochondrial T3 receptor p43 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. FASEB J. 26, 40–50. doi:10.1096/fj.11-186841

Bliss, M., 1993. The history of insulin. Diabetes Care 16 Suppl 3, 4–7.

Bogdanovich, S., McNally, E.M., Khurana, T.S., 2008. Myostatin blockade improves function but not histopathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy 2C. Muscle & Nerve 37, 308–316. doi:10.1002/mus.20920

Bonala, S., Lokireddy, S., Arigela, H., Teng, S., Wahli, W., Sharma, M., McFarlane, C., Kambadur, R., 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ induces myogenesis by modulating myostatin activity. J. Biol. Chem. 287, 12935–12951. doi:10.1074/jbc.M111.319145

Bose, A., Guilherme, A., Robida, S.I., Nicoloro, S.M.C., Zhou, Q.L., Jiang, Z.Y., Pomerleau, D.P., Czech, M.P., 2002. Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. Nature 420, 821–824. doi:10.1038/nature01246

Bouzakri, K., Plomgaard, P., Berney, T., Donath, M.Y., Pedersen, B.K., Halban, P.A., 2011. Bimodal effect on pancreatic β-cells of secretory products from normal or insulin-resistant human skeletal muscle. Diabetes 60, 1111–1121. doi:10.2337/db10-1178

Braga, M., Pervin, S., Norris, K., Bhasin, S., Singh, R., 2013. Inhibition of in vitro and in vivo brown fat differentiation program by myostatin. Obesity (Silver Spring) 21, 1180–1188. doi:10.1002/oby.20117

Braga, M., Reddy, S.T., Vergnes, L., Pervin, S., Grijalva, V., Stout, D., David, J., Li, X., Tomasian, V., Reid, C.B., Norris, K.C., Devaskar, S.U., Reue, K., Singh, R., 2014. Follistatin promotes adipocyte differentiation, browning, and energy metabolism. J. Lipid Res. 55, 375–384. doi:10.1194/jlr.M039719

Braiman, L., Alt, A., Kuroki, T., Ohba, M., Bak, A., Tennenbaum, T., Sampson, S.R., 2001. Activation of protein kinase C zeta induces serine phosphorylation of VAMP2 in the GLUT4 compartment and increases glucose transport in skeletal muscle. Mol. Cell. Biol. 21, 7852–7861. doi:10.1128/MCB.21.22.7852-7861.2001

Brandt, C., Hansen, R.H., Hansen, J.B., Olsen, C.H., Galle, P., Mandrup-Poulsen, T., Gehl, J., Pedersen, B.K., Hojman, P., 2015. Over-expression of Follistatin-like 3 attenuates fat accumulation and

(cc) BY-NC-ND

improves insulin sensitivity in mice. Metab. Clin. Exp. 64, 283–295. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.007

Brandt, C., Nielsen, A.R., Fischer, C.P., Hansen, J., Pedersen, B.K., Plomgaard, P., 2012. Plasma and muscle myostatin in relation to type 2 diabetes. PLoS ONE 7, e37236. doi:10.1371/journal.pone.0037236

Braun, T., Bober, E., Buschhausen-Denker, G., Kohtz, S., Grzeschik, K.H., Arnold, H.H., Kotz, S., 1989. Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. EMBO J. 8, 3617–3625.

Braun, T., Gautel, M., 2011. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12, 349–361. doi:10.1038/nrm3118

Brun, C.E., Rudnicki, M.A., 2015. GDF11 and the Mythical Fountain of Youth. Cell Metab. 22, 54–56. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.009

Brun, C., Monestier, O., Legardinier, S., Maftah, A., Blanquet, V., 2012. Murine GASP-1 N -Glycosylation is not Essential for its Activity on C2C12 Myogenic Cells but Alters its Secretion. Cell. Physiol. Biochem. 30, 791–804. doi:10.1159/000341458

Brun, C., Périé, L., Baraige, F., Vernus, B., Bonnieu, A., Blanquet, V., 2014. Absence of Hyperplasia in Gasp-1 Overexpressing Mice is Dependent on Myostatin Up-Regulation. Cell. Physiol. Biochem. 34, 1241–1259. doi:10.1159/000366335

Bryant, N.J., Govers, R., James, D.E., 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 267–277. doi:10.1038/nrm782

Bryson-Richardson, R.J., Currie, P.D., 2008. The genetics of vertebrate myogenesis. Nat. Rev. Genet. 9, 632–646. doi:10.1038/nrg2369

Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., Relaix, F., 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. J Anat 202, 59–68. doi:10.1046/j.1469-7580.2003.00139.x

Buckingham, M., Relaix, F., 2015. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. Semin. Cell Dev. Biol. doi:10.1016/j.semcdb.2015.09.017

Callis, T.E., Pandya, K., Seok, H.Y., Tang, R.-H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.-P., Chen, J.-F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M.S., Selzman, C.H., Wang, D.-Z., 2009. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. J. Clin. Invest. 119, 2772–2786. doi:10.1172/JCI36154

Carneiro, I., Castro-Piedras, I., Muñoz, A., Labandeira-García, J.L., Devesa, J., Arce, V.M., 2008. Hypothyroidism is associated with increased myostatin expression in rats. J. Endocrinol. Invest. 31, 773–778. doi:10.1007/BF03349256

Cash, J.N., Rejon, C.A., McPherron, A.C., Bernard, D.J., Thompson, T.B., 2009. The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding. EMBO J. 28, 2662–2676. doi:10.1038/emboj.2009.205

Chelh, I., Picard, B., Hocquette, J.-F., Cassar-Malek, I., 2011. Myostatin inactivation induces a similar muscle molecular signature in double-muscled cattle as in mice. Animal 5, 278–286. doi:10.1017/S1751731110001862

Chen, Y.-W., Nader, G.A., Baar, K.R., Fedele, M.J., Hoffman, E.P., Esser, K.A., 2002. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. J. Physiol. (Lond.) 545, 27–41.

(cc) BY-NC-ND

Chiang, S.H., Baumann, C.A., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Watson, R.T., Neudauer, C.L., Macara, I.G., Pessin, J.E., Saltiel, A.R., 2001. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. Nature 410, 944–948. doi:10.1038/35073608

Choi, S.J., Yablonka-Reuveni, Z., Kaiyala, K.J., Ogimoto, K., Schwartz, M.W., Wisse, B.E., 2011. Increased energy expenditure and leptin sensitivity account for low fat mass in myostatin-deficient mice. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 300, E1031–1037. doi:10.1152/ajpendo.00656.2010

Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibé, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J.-M., Eychenne, F., Larzul, C., Laville, E., Meish, F., Milenkovic, D., Tobin, J., Charlier, C., Georges, M., 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nat. Genet. 38, 813–818. doi:10.1038/ng1810

Cornelison, D.D., Wold, B.J., 1997. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. Dev. Biol. 191, 270–283. doi:10.1006/dbio.1997.8721

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 378, 785–789. doi:10.1038/378785a0

Dean, P.M., 1973. Ultrastructural morphometry of the pancreatic -cell. Diabetologia 9, 115–119.

Derynck, R., Zhang, Y.E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature 425, 577–584. doi:10.1038/nature02006

Deveaux, V., Cassar-Malek, I., Picard, B., 2001. Comparison of contractile characteristics of muscle from Holstein and double-muscled Belgian Blue foetuses. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 131, 21–29.

Dichmann, D.S., Yassin, H., Serup, P., 2006. Analysis of pancreatic endocrine development in GDF11-deficient mice. Dev. Dyn. 235, 3016–3025. doi:10.1002/dvdy.20953

Dodson, S., Baracos, V.E., Jatoi, A., Evans, W.J., Cella, D., Dalton, J.T., Steiner, M.S., 2011. Muscle Wasting in Cancer Cachexia: Clinical Implications, Diagnosis, and Emerging Treatment Strategies. Annual Review of Medicine 62, 265–279. doi:10.1146/annurev-med-061509-131248

Drummond, M.J., Dreyer, H.C., Fry, C.S., Glynn, E.L., Rasmussen, B.B., 2009a. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. J. Appl. Physiol. 106, 1374–1384. doi:10.1152/japplphysiol.91397.2008

Drummond, M.J., Glynn, E.L., Fry, C.S., Dhanani, S., Volpi, E., Rasmussen, B.B., 2009b. Essential amino acids increase microRNA-499, -208b, and -23a and downregulate myostatin and myocyte enhancer factor 2C mRNA expression in human skeletal muscle. J. Nutr. 139, 2279–2284. doi:10.3945/jn.109.112797

Egerman, M.A., Cadena, S.M., Gilbert, J.A., Meyer, A., Nelson, H.N., Swalley, S.E., Mallozzi, C., Jacobi, C., Jennings, L.L., Clay, I., Laurent, G., Ma, S., Brachat, S., Lach-Trifilieff, E., Shavlakadze, T., Trendelenburg, A.-U., Brack, A.S., Glass, D.J., 2015. GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. Cell Metab. 22, 164–174. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.010

Elashry, M.I., Otto, A., Matsakas, A., El-Morsy, S.E., Patel, K., 2009. Morphology and myofiber composition of skeletal musculature of the forelimb in young and aged wild type and myostatin null mice. Rejuvenation Res 12, 269–281. doi:10.1089/rej.2009.0870

(cc) BY-NC-ND

Elkasrawy, M.N., Hamrick, M.W., 2010. Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and bone structure. J Musculoskelet Neuronal Interact 10, 56–63.

Evans, W.J., 2010. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. Am J Clin Nutr 91, 1123S–1127S. doi:10.3945/ajcn.2010.28608A

Evans, W.J., Morley, J.E., Argilés, J., Bales, C., Baracos, V., Guttridge, D., Jatoi, A., Kalantar-Zadeh, K., Lochs, H., Mantovani, G., Marks, D., Mitch, W.E., Muscaritoli, M., Najand, A., Ponikowski, P., Rossi Fanelli, F., Schambelan, M., Schols, A., Schuster, M., Thomas, D., Wolfe, R., Anker, S.D., 2008. Cachexia: a new definition. Clin Nutr 27, 793–799. doi:10.1016/j.clnu.2008.06.013

Fain, J.N., Bahouth, S.W., Madan, A.K., 2004. TNFalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 28, 616–622. doi:10.1038/sj.ijo.0802594

Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., Nedergaard, J., 2009. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. Cell Metab. 9, 203–209. doi:10.1016/j.cmet.2008.12.014

Flint, A., Raben, A., Astrup, A., Holst, J.J., 1998. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. J. Clin. Invest. 101, 515–520. doi:10.1172/JCI990

Forbes, D., Jackman, M., Bishop, A., Thomas, M., Kambadur, R., Sharma, M., 2006. Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. Journal of Cellular Physiology 206, 264–272. doi:10.1002/jcp.20477

Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., Foufelle, F., 1999. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 12737–12742.

Fu, Z., Gilbert, E.R., Liu, D., 2013. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. Curr Diabetes Rev 9, 25–53.

Gallione, C.J., Repetto, G.M., Legius, E., Rustgi, A.K., Schelley, S.L., Tejpar, S., Mitchell, G., Drouin, E., Westermann, C.J.J., Marchuk, D.A., 2004. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). Lancet 363, 852–859. doi:10.1016/S0140-6736(04)15732-2

Gangopadhyay, S.S., 2013. Systemic administration of follistatin288 increases muscle mass and reduces fat accumulation in mice. Sci Rep 3, 2441. doi:10.1038/srep02441

Gastaldelli, A., 2011. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Diabetes Res. Clin. Pract. 93 Suppl 1, S60–65. doi:10.1016/S0168-8227(11)70015-8

Gerken, T.A., Butenhof, K.J., Shogren, R., 1989. Effects of glycosylation on the conformation and dynamics of O-linked glycoproteins: carbon-13 NMR studies of ovine submaxillary mucin. Biochemistry 28, 5536–5543.

Ge, X., Vajjala, A., McFarlane, C., Wahli, W., Sharma, M., Kambadur, R., 2012. Lack of Smad3 signaling leads to impaired skeletal muscle regeneration. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 303, E90–102. doi:10.1152/ajpendo.00113.2012

Girgenrath, S., Song, K., Whittemore, L.-A., 2005. Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. Muscle & Nerve 31, 34–40. doi:10.1002/mus.20175

Glasbrenner, B., Adler, G., 1993. Pathophysiology of acute pancreatitis. Hepatogastroenterology 40, 517–521.

(cc) BY-NC-ND

Goodman, C.A., McNally, R.M., Hoffmann, F.M., Hornberger, T.A., 2013. Smad3 induces atrogin-1, inhibits mTOR and protein synthesis, and promotes muscle atrophy in vivo. Mol. Endocrinol. 27, 1946–1957. doi:10.1210/me.2013-1194

Grobet, L., Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Ménissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R., Georges, M., 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. Nat. Genet. 17, 71–74. doi:10.1038/ng0997-71

Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., Czech, M.P., 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 367–377. doi:10.1038/nrm2391

Guo, T., Jou, W., Chanturiya, T., Portas, J., Gavrilova, O., McPherron, A.C., 2009. Myostatin Inhibition in Muscle, but Not Adipose Tissue, Decreases Fat Mass and Improves Insulin Sensitivity. PLoS ONE 4, e4937. doi:10.1371/journal.pone.0004937

Haidet, A.M., Rizo, L., Handy, C., Umapathi, P., Eagle, A., Shilling, C., Boue, D., Martin, P.T., Sahenk, Z., Mendell, J.R., others, 2008. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 4318.

Hansen, J., Brandt, C., Nielsen, A.R., Hojman, P., Whitham, M., Febbraio, M.A., Pedersen, B.K., Plomgaard, P., 2011. Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. Endocrinology 152, 164–171. doi:10.1210/en.2010-0868

Harmon, E.B., Apelqvist, A.A., Smart, N.G., Gu, X., Osborne, D.H., Kim, S.K., 2004. GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes beta-cell differentiation in pancreas development. Development 131, 6163–6174. doi:10.1242/dev.01535

Heineke, J., Auger-Messier, M., Xu, J., Sargent, M., York, A., Welle, S., Molkentin, J.D., 2010. Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. Circulation 121, 419–425. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.882068

Heldin, C.H., Miyazono, K., ten Dijke, P., 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature 390, 465–471. doi:10.1038/37284

Helenius, A., Aebi, M., 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu. Rev. Biochem. 73, 1019–1049. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073752

Hennebry, A., Berry, C., Siriett, V., O'Callaghan, P., Chau, L., Watson, T., Sharma, M., Kambadur, R., 2009. Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. Am J Physiol Cell Physiol 296, C525–C534. doi:10.1152/ajpcell.00259.2007

Hill, J.J., 2002. The Myostatin Propeptide and the Follistatin-related Gene Are Inhibitory Binding Proteins of Myostatin in Normal Serum. Journal of Biological Chemistry 277, 40735–40741. doi:10.1074/jbc.M206379200

Hill, J.J., Qiu, Y., Hewick, R.M., Wolfman, N.M., 2003. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. Mol. Endocrinol. 17, 1144–1154. doi:10.1210/me.2002-0366

Hinck, A.P., 2012. Structural studies of the TGF-βs and their receptors - insights into evolution of the TGF-β superfamily. FEBS Lett. 586, 1860–1870. doi:10.1016/j.febslet.2012.05.028

(cc) BY-NC-ND

Hirschberg, R., Kopple, J., Lipsett, P., Benjamin, E., Minei, J., Albertson, T., Munger, M., Metzler, M., Zaloga, G., Murray, M., Lowry, S., Conger, J., Mckeown, W., O'Shea, M., Baughman, R., Wood, K., Haupt, M., Kaiser, R., Simms, H., Warnock, D., Summer, W., Hintz, R., Myers, B., Haenftling, K., Capra, W., Pike, M., Guler, H.-P., 1999. Multicenter clinical trial of recombinant human insulin-like growth factor I in patients with acute renal failure. Kidney Int 55, 2423–2432. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00463.x

Hoppeler, H., 1986. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. Int J Sports Med 7, 187–204. doi:10.1055/s-2008-1025758

Howell, S.L., 1984. The mechanism of insulin secretion. Diabetologia 26, 319–327. doi:10.1007/BF00266030

Huang, Z., Chen, D., Zhang, K., Yu, B., Chen, X., Meng, J., 2007. Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells. Cellular Signalling 19, 2286–2295. doi:10.1016/j.cellsig.2007.07.002

Hughes, S.M., Taylor, J.M., Tapscott, S.J., Gurley, C.M., Carter, W.J., Peterson, C.A., 1993. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. Development 118, 1137–1147.

Iwasaki, S., Miyake, M., Watanabe, H., Kitagawa, E., Watanabe, K., Ohwada, S., Kitazawa, H., Rose, M.T., Aso, H., 2012. Expression of Myostatin in Neural Cells of the Olfactory System. Molecular Neurobiology. doi:10.1007/s12035-012-8342-1

Jackson, M.F., Luong, D., Vang, D.D., Garikipati, D.K., Stanton, J.B., Nelson, O.L., Rodgers, B.D., 2012. The aging myostatin null phenotype: reduced adiposity, cardiac hypertrophy, enhanced cardiac stress response, and sexual dimorphism. J. Endocrinol. 213, 263–275. doi:10.1530/JOE-11-0455

Ji, S., Losinski, R.L., Cornelius, S.G., Frank, G.R., Willis, G.M., Gerrard, D.E., Depreux, F.F.S., Spurlock, M.E., 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 275, R1265–R1273.

Joulia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B., Cabello, G., 2003. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. Experimental Cell Research 286, 263–275. doi:10.1016/S0014-4827(03)00074-0

Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M., 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature 444, 840–846. doi:10.1038/nature05482

Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P.L., Bass, J.J., 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome research 7, 910–915.

Kim, W.K., Choi, H.-R., Park, S.G., Ko, Y., Bae, K.-H., Lee, S.C., 2012. Myostatin inhibits brown adipocyte differentiation via regulation of Smad3-mediated β-catenin stabilization. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44, 327–334. doi:10.1016/j.biocel.2011.11.004

Kingsley, D.M., 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. Genes Dev. 8, 133–146.

Kojima, H., Fujimiya, M., Terashima, T., Kimura, H., Chan, L., 2006. Extrapancreatic proinsulin/insulin-expressing cells in diabetes mellitus: is history repeating itself? Endocr. J. 53, 715–722.

Kondás, K., Szláma, G., Nagy, A., Trexler, M., Patthy, L., 2011. Biological functions of the WAP domain-containing multidomain proteins WFIKKN1 and WFIKKN2. Biochemical Society Transactions 39, 1416–1420. doi:10.1042/BST0391416

(cc) BY-NC-ND

Kondas, K., Szlama, G., Trexler, M., Patthy, L., 2008. Both WFIKKN1 and WFIKKN2 Have High Affinity for Growth and Differentiation Factors 8 and 11. Journal of Biological Chemistry 283, 23677–23684. doi:10.1074/jbc.M803025200

Koster, J.C., Remedi, M.S., Qiu, H., Nichols, C.G., Hruz, P.W., 2003. HIV protease inhibitors acutely impair glucose-stimulated insulin release. Diabetes 52, 1695–1700.

Krook, A., Björnholm, M., Galuska, D., Jiang, X.J., Fahlman, R., Myers, M.G., Wallberg-Henriksson, H., Zierath, J.R., 2000. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. Diabetes 49, 284–292.

Kubaszek, A., Pihlajamäki, J., Komarovski, V., Lindi, V., Lindström, J., Eriksson, J., Valle, T.T., Hämäläinen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Tuomilehto, J., Uusitupa, M., Laakso, M., Finnish Diabetes Prevention Study, 2003. Promoter polymorphisms of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. Diabetes 52, 1872–1876.

Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. J. Biol. Chem. 277, 49831–49840. doi:10.1074/jbc.M204291200

Lebovitz, H.E., 1999. Type 2 diabetes: an overview. Clin. Chem. 45, 1339–1345.

Lee, S.-J., 2007a. Quadrupling Muscle Mass in Mice by Targeting TGF-ß Signaling Pathways. PLoS ONE 2, e789. doi:10.1371/journal.pone.0000789

Lee, S.-J., 2007b. Sprinting without myostatin: a genetic determinant of athletic prowess. Trends in Genetics 23, 475–477. doi:10.1016/j.tig.2007.08.008

Lee, S.-J., 2004. REGULATION OF MUSCLE MASS BY MYOSTATIN. Annual Review of Cell and Developmental Biology 20, 61–86. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.012103.135836

Lee, S.J., McPherron, A.C., 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 9306.

Lee, S.J., Reed, L.A., Davies, M.V., Girgenrath, S., Goad, M.E.P., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Barker, C., Ehrmantraut, G., Holmstrom, J., others, 2005. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 18117.

Lee, Y.-S., Lee, S.-J., 2013. Regulation of GDF-11 and myostatin activity by GASP-1 and GASP-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, E3713–3722. doi:10.1073/pnas.1309907110

Léger, B., Senese, R., Al-Khodairy, A.W., Dériaz, O., Gobelet, C., Giacobino, J.-P., Russell, A.P., 2009. Atrogin-1, MuRF1, and FoXO, as well as phosphorylated GSK-3beta and 4E-BP1 are reduced in skeletal muscle of chronic spinal cord-injured patients. Muscle Nerve 40, 69–78. doi:10.1002/mus.21293

Leto, D., Saltiel, A.R., 2012. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13, 383–396. doi:10.1038/nrm3351

Liang, H., Ward, W.F., 2006. PGC-1α: a key regulator of energy metabolism. Advan in Physiol Edu 30, 145–151. doi:10.1152/advan.00052.2006

Liepinsh, E., Nagy, A., Trexler, M., Patthy, L., Otting, G., 2006. Second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN1 protein. Journal of Biomolecular NMR 35, 73–78. doi:10.1007/s10858-006-9013-1

(cc) BY-NC-ND

Lillioja, S., Young, A.A., Culter, C.L., Ivy, J.L., Abbott, W.G., Zawadzki, J.K., Yki-Järvinen, H., Christin, L., Secomb, T.W., Bogardus, C., 1987. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. J. Clin. Invest. 80, 415–424. doi:10.1172/JCI113088

Lin, J., Arnold, H.B., Della-Fera, M.A., Azain, M.J., Hartzell, D.L., Baile, C.A., 2002. Myostatin Knockout in Mice Increases Myogenesis and Decreases Adipogenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications 291, 701–706. doi:10.1006/bbrc.2002.6500

Li, Y., Ding, L., Hassan, W., Abdelkader, D., Shang, J., 2013. Adipokines and hepatic insulin resistance. J Diabetes Res 2013, 170532. doi:10.1155/2013/170532

Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M., Grimaldi, P.A., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. FASEB J. 17, 2299–2301. doi:10.1096/fj.03-0269fje

Ma, K., Mallidis, C., Artaza, J., Taylor, W., Gonzalez-Cadavid, N., Bhasin, S., 2001. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 281, E1128–1136.

Ma, K., Mallidis, C., Bhasin, S., Mahabadi, V., Artaza, J., Gonzalez-Cadavid, N., Arias, J., Salehian, B., 2003. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285, E363–371. doi:10.1152/ajpendo.00487.2002

Marra, F., Bertolani, C., 2009. Adipokines in liver diseases. Hepatology 50, 957–969. doi:10.1002/hep.23046

Massagué, J., 1998. TGF-beta signal transduction. Annu. Rev. Biochem. 67, 753–791. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.753

Matsakas, A., Foster, K., Otto, A., Macharia, R., Elashry, M.I., Feist, S., Graham, I., Foster, H., Yaworsky, P., Walsh, F., Dickson, G., Patel, K., 2009. Molecular, cellular and physiological investigation of myostatin propeptide-mediated muscle growth in adult mice. Neuromuscul. Disord. 19, 489–499. doi:10.1016/j.nmd.2009.06.367

Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol 9, 493–495.

McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M., Kambadur, R., 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. J Cell Biol 162, 1135–1147. doi:10.1083/jcb.200207056

McCullagh, K.J.A., Calabria, E., Pallafacchina, G., Ciciliot, S., Serrano, A.L., Argentini, C., Kalhovde, J.M., Lømo, T., Schiaffino, S., 2004. NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 10590–10595. doi:10.1073/pnas.0308035101

McFarlane, C., Hennebry, A., Thomas, M., Plummer, E., Ling, N., Sharma, M., Kambadur, R., 2008. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. Experimental Cell Research 314, 317–329. doi:10.1016/j.yexcr.2007.09.012

McPherron, A.C., 2010. METABOLIC FUNCTIONS OF MYOSTATIN AND GDF11. Immunol Endocr Metab Agents Med Chem 10, 217–231. doi:10.2174/187152210793663810

McPherron, A.C., Huynh, T.V., Lee, S.-J., 2009. Redundancy of myostatin and growth/differentiation factor 11 function. BMC Developmental Biology 9, 24. doi:10.1186/1471-213X-9-24

(cc) BY-NC-ND

McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.-J., 1999. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. Nature Genetics 22, 260–264. doi:10.1038/10320

McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature 387, 83–90. doi:10.1038/387083a0

McPherron, A.C., Lee, S.-J., 2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. J Clin Invest 109, 595–601. doi:10.1172/JCI0213562

McPherron, A.C., Lee, S.J., 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proceedings of the National Academy of Sciences 94, 12457.

Mendias, C.L., 2006. Contractile properties of EDL and soleus muscles of myostatin-deficient mice. Journal of Applied Physiology 101, 898–905. doi:10.1152/japplphysiol.00126.2006

Miura, T., Kishioka, Y., Wakamatsu, J., Hattori, A., Hennebry, A., Berry, C.J., Sharma, M., Kambadur, R., Nishimura, T., 2006. Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 340, 675–680. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.060

Monestier, O., Brun, C., Cocquempot, O., Petit, D., Blanquet, V., 2012a. GASP/WFIKKN Proteins: Evolutionary Aspects of Their Functions. PLoS ONE 7, e43710. doi:10.1371/journal.pone.0043710

Monestier, O., Brun, C., Heu, K., Passet, B., Malhouroux, M., Magnol, L., Vilotte, J.-L., Blanquet, V., 2012b. Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype. BMC Genomics 13, 541. doi:10.1186/1471-2164-13-541

Montarras, D., Chelly, J., Bober, E., Arnold, H., Ott, M.O., Gros, F., Pinset, C., 1991. Developmental patterns in the expression of Myf5, MyoD, myogenin, and MRF4 during myogenesis. New Biol. 3, 592–600.

Morissette, M.R., Cook, S.A., Buranasombati, C., Rosenberg, M.A., Rosenzweig, A., 2009a. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. Am. J. Physiol., Cell Physiol. 297, C1124–1132. doi:10.1152/ajpcell.00043.2009

Morissette, M.R., Stricker, J.C., Rosenberg, M.A., Buranasombati, C., Levitan, E.B., Mittleman, M.A., Rosenzweig, A., 2009b. Effects of myostatin deletion in aging mice. Aging Cell 8, 573–583. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00508.x

Mounier, R., Lantier, L., Leclerc, J., Sotiropoulos, A., Pende, M., Daegelen, D., Sakamoto, K., Foretz, M., Viollet, B., 2009. Important role for AMPKalpha1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. FASEB J. 23, 2264–2273. doi:10.1096/fj.08-119057

Mukherjee, A., Sidis, Y., Mahan, A., Raher, M.J., Xia, Y., Rosen, E.D., Bloch, K.D., Thomas, M.K., Schneyer, A.L., 2007. FSTL3 deletion reveals roles for TGF-β family ligands in glucose and fat homeostasis in adults. PNAS 104, 1348–1353. doi:10.1073/pnas.0607966104

Nagy, A., Trexler, M., Patthy, L., 2003. Expression, purification and characterization of the second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN protein. Eur. J. Biochem. 270, 2101–2107.

Nakae, J., Oki, M., Cao, Y., 2008. The FoxO transcription factors and metabolic regulation. FEBS Lett. 582, 54–67. doi:10.1016/j.febslet.2007.11.025

Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K., Sugino, H., 1990. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. Science 247, 836–838.

(cc) BY-NC-ND

Nakashima, M., Toyono, T., Akamine, A., Joyner, A., 1999. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. Mech. Dev. 80, 185–189.

Nicholas, G., Thomas, M., Langley, B., Somers, W., Patel, K., Kemp, C.F., Sharma, M., Kambadur, R., 2002. Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. Journal of Cellular Physiology 193, 120–131. doi:10.1002/jcp.10158

Nishida, A.T., Kobuke, K., Kojima, K., Ito, J., Honjo, T., Tashiro, K., 2004. OC29 is preferentially expressed in the presumptive sensory organ region of the otocyst. Developmental Dynamics 231, 766–774. doi:10.1002/dvdy.20180

Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B.M., Kajimura, S., 2012. PPARγ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. Cell Metab. 15, 395–404. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.019

Okamoto, Y., Folco, E.J., Minami, M., Wara, A.K., Feinberg, M.W., Sukhova, G.K., Colvin, R.A., Kihara, S., Funahashi, T., Luster, A.D., Libby, P., 2008. Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. Circ. Res. 102, 218–225. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164988

Oldham, S., Hafen, E., 2003. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. Trends Cell Biol. 13, 79–85.

Ookuma, M., Ookuma, K., York, D.A., 1998. Effects of leptin on insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. Diabetes 47, 219–223.

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., Hotamisligil, G.S., 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. Science 306, 457–461. doi:10.1126/science.1103160

Pessemesse, L., Schlernitzauer, A., Sar, C., Levin, J., Grandemange, S., Seyer, P., Favier, F.B., Kaminski, S., Cabello, G., Wrutniak-Cabello, C., Casas, F., 2012. Depletion of the p43 mitochondrial T3 receptor in mice affects skeletal muscle development and activity. FASEB J. 26, 748–756. doi:10.1096/fj.11-195933

Pette, D., Staron, R.S., 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Microsc. Res. Tech. 50, 500–509. doi:10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7

Philip, B., Lu, Z., Gao, Y., 2005. Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. Cellular Signalling 17, 365–375. doi:10.1016/j.cellsig.2004.08.003

Piek, E., Heldin, C.H., Ten Dijke, P., 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. FASEB J. 13, 2105–2124.

Proud, C.G., 2006. Regulation of protein synthesis by insulin. Biochem. Soc. Trans. 34, 213–216. doi:10.1042/BST20060213

Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., Spiegelman, B.M., 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1α interaction. Nature 423, 550–555. doi:10.1038/nature01667

Qiao, C., Li, J., Jiang, J., Zhu, X., Wang, B., Li, J., Xiao, X., 2008. Myostatin propeptide gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in mdx mice. Hum. Gene Ther. 19, 241–254. doi:10.1089/hum.2007.159

(cc) BY-NC-ND

Rask-Madsen, C., Kahn, C.R., 2012. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 32, 2052–2059. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241919

Reaven, G.M., 2005. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. Panminerva Med 47, 201–210.

Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J.L., Celeste, A.J., Attisano, L., 2003. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. Mol. Cell. Biol. 23, 7230–7242.

Reisz-Porszasz, S., Bhasin, S., Artaza, J.N., Shen, R., Sinha-Hikim, I., Hogue, A., Fielder, T.J., Gonzalez-Cadavid, N.F., 2003. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285, E876–888. doi:10.1152/ajpendo.00107.2003

Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V.M., Devesa, J., 2001. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 280, 561–566. doi:10.1006/bbrc.2000.4159

Rodino-Klapac, L.R., Haidet, A.M., Kota, J., Handy, C., Kaspar, B.K., Mendell, J.R., 2009. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. Muscle & Nerve 39, 283–296. doi:10.1002/mus.21244

Rodriguez, J., Vernus, B., Chelh, I., Cassar-Malek, I., Gabillard, J.C., Hadj Sassi, A., Seiliez, I., Picard, B., Bonnieu, A., 2014. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. Cell. Mol. Life Sci. 71, 4361–4371. doi:10.1007/s00018-014-1689-x

Rotter, V., Nagaev, I., Smith, U., 2003. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. J. Biol. Chem. 278, 45777–45784. doi:10.1074/jbc.M301977200

Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., Jaenisch, R., 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. Cell 75, 1351–1359.

Salerno, M.S., Thomas, M., Forbes, D., Watson, T., Kambadur, R., Sharma, M., 2004. Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter. Am J Physiol Cell Physiol 287, C1031–C1040. doi:10.1152/ajpcell.00492.2003

Samuel, V.T., Shulman, G.I., 2012. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. Cell 148, 852–871. doi:10.1016/j.cell.2012.02.017

Sandri, M., 2008. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. Physiology (Bethesda) 23, 160–170. doi:10.1152/physiol.00041.2007

Sanger, J.W., Wang, J., Fan, Y., White, J., Sanger, J.M., 2010. Assembly and dynamics of myofibrils. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 858606. doi:10.1155/2010/858606

Sartori, R., Schirwis, E., Blaauw, B., Bortolanza, S., Zhao, J., Enzo, E., Stantzou, A., Mouisel, E., Toniolo, L., Ferry, A., Stricker, S., Goldberg, A.L., Dupont, S., Piccolo, S., Amthor, H., Sandri, M., 2013. BMP signaling controls muscle mass. Nat. Genet. 45, 1309–1318. doi:10.1038/ng.2772

Sauka-Spengler, T., Bronner-Fraser, M., 2008. Evolution of the neural crest viewed from a gene regulatory perspective. Genesis 46, 673–682. doi:10.1002/dvg.20436

Schiaffino, S., Reggiani, C., 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. Physiol. Rev. 91, 1447–1531. doi:10.1152/physrev.00031.2010

Schmierer, B., Hill, C.S., 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 970–982. doi:10.1038/nrm2297

(cc) BY-NC-ND

Schneyer, A.L., Rzucidlo, D.A., Sluss, P.M., Crowley, W.F., 1994. Characterization of unique binding kinetics of follistatin and activin or inhibin in serum. Endocrinology 135, 667–674. doi:10.1210/endo.135.2.8033815

Schneyer, A., Tortoriello, D., Sidis, Y., Keutmann, H., Matsuzaki, T., Holmes, W., 2001. Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family. Mol. Cell. Endocrinol. 180, 33–38.

Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J.F., Lee, S.J., 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. New England Journal of Medicine 350, 2682–2688.

Semenov, A.G., Postnikov, A.B., Tamm, N.N., Seferian, K.R., Karpova, N.S., Bloshchitsyna, M.N., Koshkina, E.V., Krasnoselsky, M.I., Serebryanaya, D.V., Katrukha, A.G., 2009. Processing of pro-brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site. Clin. Chem. 55, 489–498. doi:10.1373/clinchem.2008.113373

Settle, S.H., Rountree, R.B., Sinha, A., Thacker, A., Higgins, K., Kingsley, D.M., 2003. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse Gdf6 and Gdf5 genes. Dev. Biol. 254, 116–130.

Shadrach, J.L., Wagers, A.J., 2011. Stem cells for skeletal muscle repair. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 366, 2297–2306. doi:10.1098/rstb.2011.0027

Shan, T., Liang, X., Bi, P., Kuang, S., 2013. Myostatin knockout drives browning of white adipose tissue through activating the AMPK-PGC1α-Fndc5 pathway in muscle. FASEB J. 27, 1981–1989. doi:10.1096/fj.12-225755

Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Fowke, P.J., Bass, J.J., 1999. Myostatin, a transforming growth factor-β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. Journal of Cellular Physiology 180, 1–9. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199907)180:1<1::AID-JCP1>3.0.CO;2-V

Shelton, G.D., Engvall, E., 2007. Gross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene. Neuromuscul. Disord. 17, 721–722. doi:10.1016/j.nmd.2007.06.008

Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J.D., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1999. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 13656–13661.

Shulman, G.I., 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. J. Clin. Invest. 106, 171–176. doi:10.1172/JCI10583

Sidis, Y., Schneyer, A.L., Sluss, P.M., Johnson, L.N., Keutmann, H.T., 2001. Follistatin: essential role for the N-terminal domain in activin binding and neutralization. J. Biol. Chem. 276, 17718–17726. doi:10.1074/jbc.M100736200

Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.-H., Landström, M., 2008. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. Nat. Cell Biol. 10, 1199–1207. doi:10.1038/ncb1780

Souza, T.A., Chen, X., Guo, Y., Sava, P., Zhang, J., Hill, J.J., Yaworsky, P.J., Qiu, Y., 2008. Proteomic identification and functional validation of activins and bone morphogenetic protein 11 as candidate novel muscle mass regulators. Mol. Endocrinol. 22, 2689–2702. doi:10.1210/me.2008-0290

(cc) BY-NC-ND

Spiller, M.P., Kambadur, R., Jeanplong, F., Thomas, M., Martyn, J.K., Bass, J.J., Sharma, M., 2002. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. Molecular and cellular biology 22, 7066–7082.

Stenbit, A.E., Tsao, T.S., Li, J., Burcelin, R., Geenen, D.L., Factor, S.M., Houseknecht, K., Katz, E.B., Charron, M.J., 1997. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. Nat. Med. 3, 1096–1101.

Stockdale, F.E., 1997. Mechanisms of formation of muscle fiber types. Cell Struct. Funct. 22, 37–43.

Suckale, J., Solimena, M., 2008. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. Front. Biosci. 13, 7156–7171.

Szláma, G., Kondás, K., Trexler, M., Patthy, L., 2010. WFIKKN1 and WFIKKN2 bind growth factors TGFβ1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity. FEBS Journal 277, 5040–5050. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07909.x

Szláma, G., Trexler, M., Patthy, L., 2013. Latent myostatin has significant activity and this activity is controlled more efficiently by WFIKKN1 than by WFIKKN2. FEBS Journal n/a–n/a. doi:10.1111/febs.12377

Takahashi, H., Sato, K., Yamaguchi, T., Miyake, M., Watanabe, H., Nagasawa, Y., Kitagawa, E., Terada, S., Urakawa, M., Rose, M.T., McMahon, C.D., Watanabe, K., Ohwada, S., Gotoh, T., Aso, H., 2014. Myostatin alters glucose transporter-4 (GLUT4) expression in bovine skeletal muscles and myoblasts isolated from double-muscled (DM) and normal-muscled (NM) Japanese shorthorn cattle. Domest. Anim. Endocrinol. 48, 62–68. doi:10.1016/j.domaniend.2014.01.007

Tan, C.K., Chong, H.C., Tan, E.H.P., Tan, N.S., 2012. Getting “Smad” about obesity and diabetes. Nutr Diabetes 2, e29. doi:10.1038/nutd.2012.1

Tang, L., Yan, Z., Wan, Y., Han, W., Zhang, Y., 2007. Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice. Muscle Nerve 36, 342–348. doi:10.1002/mus.20791

Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D.H., Kull, F.C., Gonzalez-Cadavid, N., 2001. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 280, E221–228.

ten Dijke, P., Arthur, H.M., 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 857–869. doi:10.1038/nrm2262

Thies, R.S., Chen, T., Davies, M.V., Tomkinson, K.N., Pearson, A.A., Shakey, Q.A., Wolfman, N.M., 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. Growth Factors 18, 251–259.

Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., Kambadur, R., 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. J. Biol. Chem. 275, 40235–40243. doi:10.1074/jbc.M004356200

Tilg, H., Moschen, A.R., 2008. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. Trends Endocrinol. Metab. 19, 371–379. doi:10.1016/j.tem.2008.08.005

Trendelenburg, A.U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S., Glass, D.J., 2009. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. Am. J. Physiol., Cell Physiol. 296, C1258–1270. doi:10.1152/ajpcell.00105.2009

Trexler, M., Bányai, L., Patthy, L., 2002. Distinct Expression Pattern of Two Related Human Proteins Containing Multiple Types of Protease-Inhibitory Modules. Biological Chemistry 383, 223–228. doi:10.1515/BC.2002.023

(cc) BY-NC-ND

Trexler, M., Bányai, L., Patthy, L., 2001. A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 3705–3709. doi:10.1073/pnas.061028398

Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S., Guillemin, R., 1987. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 8282–8286.

Walker, R.G., Angerman, E.B., Kattamuri, C., Lee, Y.-S., Lee, S.-J., Thompson, T.B., 2015. Alternative Binding Modes Identified for Growth and Differentiation Factor-associated Serum Protein (GASP) Family Antagonism of Myostatin. J. Biol. Chem. 290, 7506–7516. doi:10.1074/jbc.M114.624130

Wang, F., Liao, Y., Li, X., Ren, C., Cheng, C., Ren, Y., 2012. Increased circulating myostatin in patients with type 2 diabetes mellitus. Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences] 32, 534–539. doi:10.1007/s11596-012-0092-9

Wang, H., Zhang, Q., Zhu, D., 2003. hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 311, 877–883.

Wang, J., Zhou, H., Fang, Q., Liu, X., Luo, Y., Hickford, J.G.H., 2015. Effect of variation in ovine WFIKKN2 on growth traits appears to be gender-dependent. Sci Rep 5, 12347. doi:10.1038/srep12347

Wang, J., Zhou, H., Fang, Q., Luo, Y., Hickford, J.G.H., 2014. Variation in the ovine WFIKKN2 gene. Gene 543, 53–57. doi:10.1016/j.gene.2014.03.062

Wang, Q., McPherron, A.C., 2012. Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation. J. Physiol. (Lond.) 590, 2151–2165. doi:10.1113/jphysiol.2011.226001

Wang, Y.-X., Zhang, C.-L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., Ham, J., Kang, H., Evans, R.M., 2004. Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPARδ. PLoS Biol 2, e294. doi:10.1371/journal.pbio.0020294

Weir, G.C., Bonner-Weir, S., 2004. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. Diabetes 53 Suppl 3, S16–21.

Welle, S., Bhatt, K., Pinkert, C.A., Tawil, R., Thornton, C.A., 2007. Muscle growth after postdevelopmental myostatin gene knockout. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 292, E985–991. doi:10.1152/ajpendo.00531.2006

Werb, Z., Banda, M.J., McKerrow, J.H., Sandhaus, R.A., 1982. Elastases and elastin degradation. J. Invest. Dermatol. 79 Suppl 1, 154s–159s.

White, M.F., 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 283, E413–422. doi:10.1152/ajpendo.00514.2001

White, R.B., Biérinx, A.-S., Gnocchi, V.F., Zammit, P.S., 2010. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. BMC Dev. Biol. 10, 21. doi:10.1186/1471-213X-10-21

Whittemore, L.-A., Song, K., Li, X., Aghajanian, J., Davies, M., Girgenrath, S., Hill, J.J., Jalenak, M., Kelley, P., Knight, A., Maylor, R., O'Hara, D., Pearson, A., Quazi, A., Ryerson, S., Tan, X.Y., Tomkinson, K.N., Veldman, G.M., Widom, A., Wright, J.F., Wudyka, S., Zhao, L., Wolfman, N.M., 2003. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. Biochem. Biophys. Res. Commun. 300, 965–971.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 27, 1047–1053.

(cc) BY-NC-ND

Wilkes, J.J., Lloyd, D.J., Gekakis, N., 2009. Loss-of-function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor alpha production and protects liver against obesity-induced insulin resistance. Diabetes 58, 1133–1143. doi:10.2337/db08-0245

Wolfman, N.M., McPherron, A.C., Pappano, W.N., Davies, M.V., Song, K., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Zhao, L., Sebald, S.M., Greenspan, D.S., others, 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 15842.

Wu, H., Naya, F.J., McKinsey, T.A., Mercer, B., Shelton, J.M., Chin, E.R., Simard, A.R., Michel, R.N., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Williams, R.S., 2000. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. EMBO J. 19, 1963–1973. doi:10.1093/emboj/19.9.1963

Wu, M.Y., Hill, C.S., 2009. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. Dev. Cell 16, 329–343. doi:10.1016/j.devcel.2009.02.012

Yadav, H., Quijano, C., Kamaraju, A.K., Gavrilova, O., Malek, R., Chen, W., Zerfas, P., Zhigang, D., Wright, E.C., Stuelten, C., Sun, P., Lonning, S., Skarulis, M., Sumner, A.E., Finkel, T., Rane, S.G., 2011. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-β/Smad3 signaling. Cell Metab. 14, 67–79. doi:10.1016/j.cmet.2011.04.013

Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., Zhang, Y.E., 2008. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. Mol. Cell 31, 918–924. doi:10.1016/j.molcel.2008.09.002

Yang, W., 2006. Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Involved in Myostatin-Regulated Differentiation Repression. Cancer Research 66, 1320–1326. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3060

Yasaka, N., Suzuki, K., Kishioka, Y., Wakamatsu, J., Nishimura, T., 2013. Laminin binds to myostatin and attenuates its signaling. Anim. Sci. J. 84, 663–668. doi:10.1111/asj.12052

Ye, R., Jung, D.Y., Jun, J.Y., Li, J., Luo, S., Ko, H.J., Kim, J.K., Lee, A.S., 2010. Grp78 heterozygosity promotes adaptive unfolded protein response and attenuates diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes 59, 6–16. doi:10.2337/db09-0755

Zhang, C., McFarlane, C., Lokireddy, S., Bonala, S., Ge, X., Masuda, S., Gluckman, P.D., Sharma, M., Kambadur, R., 2011a. Myostatin-deficient mice exhibit reduced insulin resistance through activating the AMP-activated protein kinase signalling pathway. Diabetologia 54, 1491–1501. doi:10.1007/s00125-011-2079-7

Zhang, C., McFarlane, C., Lokireddy, S., Masuda, S., Ge, X., Gluckman, P.D., Sharma, M., Kambadur, R., 2011b. Inhibition of myostatin protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation and promoting a brown adipose phenotype in mice. Diabetologia 55, 183–193. doi:10.1007/s00125-011-2304-4

Zhang, C., Tan, C.K., McFarlane, C., Sharma, M., Tan, N.S., Kambadur, R., 2012. Myostatin-null mice exhibit delayed skin wound healing through the blockade of transforming growth factor-β signaling by decorin. Am J Physiol Cell Physiol 302, C1213–C1225. doi:10.1152/ajpcell.00179.2011

Zhao, B., Wall, R.J., Yang, J., 2005. Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Biochemical and Biophysical Research Communications 337, 248–255. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.044

(cc) BY-NC-ND

Zhu, X., Topouzis, S., Liang, L.-F., Stotish, R.L., 2004. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. Cytokine 26, 262–272. doi:10.1016/j.cyto.2004.03.007

Zimmers, T.A., 2002. Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin. Science 296, 1486–1488. doi:10.1126/science.1069525

(cc) BY-NC-ND

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1. Liste des 48 sondes TAQMAN sélectionnées pour la publication 1.

		Gene ID	Symbol	Assay	
Membres de la superfamille des TGF-β	***Tgf-β***	**21803**	*Tgfb1*	Mm01178819_m1	Target
		21808	*Tgfb2*	Mm00436955_m1	Target
		21809	*Tgfb3*	Mm00436960_m1	Target
	Activines/Inhibines	**16322**	*Inha*	Mm00439683_m1	Target
		16324	*Inhbb*	Mm01286587_m1	Target
		16323	*Inhba*	Mm00434339_m1	Target
		16325	*Inhbc*	Mm00439684_m1	Target
		16326	*Inhbe*	Mm00434340_g1	Target
		17700	*Mstn*	Mm01254559_m1	Target
		14561	*Gdf11*	Mm01159973_m1	Target
		110075	*Bmp3*	Mm00557790_m1	Target
		14560	*Gdf10*	Mm01220860_m1	Target
		12155	*Bmp15*	Mm00437797_m1	Target
		14566	*Gdf9*	Mm00433565_m1	Target
	BMP/GDF	**18119**	*Nodal*	Mm00443040_m1	Target
		12153	*Bmp1*	Mm00802220_m1	Target
		12156	*Bmp2*	Mm01340178_m1	Target
		12159	*Bmp4*	Mm01321704_m1	Target
		12162	*Bmp7*	Mm00432102_m1	Target
IGF	***IGF***	**16000**	*Igf1*	Mm01228180_m1	Target
		16002	*Igf2*	Mm00580426_m1	Target
Inhibiteurs de la signalisation des TGF-β	***Inhibiteurs/Régulateurs***	**215001**	*Wfikkn1*	Mm01308311_m1	Target
		278507	*Wfikkn2*	Mm00725281_m1	Target
		14313	*Fst*	Mm00514982_m1	Target
		83554	*Fstl3*	Mm00473194_m1	Target
		13179	*Dcn*	Mm00514535_m1	Target
		16998	*Ltbp3*	Mm00521855_m1	Target
		268977	*Ltbp1*	Mm00498255_m1	Target
		108075	*Ltbp4*	Mm00723631_m1	Target
		21667	*Tdgf1*	Mm03024051_g1	Target
		12111	*Bgn*	Mm01191753_m1	Target
		18121	*Nog*	Mm01297833_s1	Target
		12667	*Chrd*	Mm00438203_m1	Target
		14314	*Fstl1*	Mm00433371_m1	Target
		29817	*Fstl2*	Mm03807886_m1	Target
	Modulateurs intracellulaires	**17130**	*Smad6*	Mm00484738_m1	Target
		17131	*Smad7*	Mm00484742_m1	Target

(cc) BY-NC-ND

Facteurs musculaires	***MRF/Pax***	**17877**	*Myf5*	Mm00435125_m1	Target
		17878	*Myf6*	Mm00435126_m1	Target
		17927	*Myod1*	Mm00440387_m1	Target
		17928	*Myog*	Mm00446194_m1	Target
		18505	*Pax3*	Mm00435493_m1	Target
		18509	*Pax7*	Mm00834079_m1	Target
Gènes de références	***Contrôles***		*18S*	Hs99999901_s1	Control
			Dffa	Mm00438410_m1	Control
			Fcgrt	Mm00438887_m1	Control
			Gapdh	Mm99999915_g1	Control
			Tbp	Mm00446973_m1	Control

(cc) BY-NC-ND

Annexe 2. Analyse protéomique réalisée sur les *Gastrocnemius* des souris *Tg(Gasp-1)* à 3 mois

Spot	Access Number	Score	Matches	Cover	Rank	Fold	Anova (p)	Power
1	APOE_MOUSE	254	9	29%	14-40	-1,5	0,032	0,6072
2	CK054_MOUSE	58	2	7%	14-41	-1,5	0,029	0,6234
3	HIBCH_MOUSE	278	8	25%	14-36H	-1,6	0,041	0,5589
4	KCRM_MOUSE	348	10	29%	14-44	-1,5	0,044	0,5425
5	LDHA_MOUSE	75	2	4%	14-36H	-1,6	0,041	0,5589
6	LDHB_MOUSE	275	8	24%	14-35	-1,6	0,017	0,7178
7	MDHC_MOUSE	85	2	5%	14-41	-1,5	0,029	0,6234
8	MYH1_MOUSE	184	5	2%	14-27	-1,6	0,046	0,5364
9	MYH3_MOUSE	66	1	1%	14-17	-2	0,009	0,8109
10	MYH4_MOUSE	48	1	0%	14-16	2	0,003	0,9240
		315	7	6%	14-39	-1,5	0,015	0,7388
		407	11	7%	14-58	-1,4	0,046	0,5322
11	NDUS2_MOUSE	194	7	17%	14-48	-1,5	0,029	0,6262
12	NDUS3_MOUSE	310	8	38%	14-53	-1,4	1,99E-04	0,9978
13	ODPA_MOUSE	171	5	17%	14-17	-2	0,009	0,8109
14	PSME1_MOUSE	52	1	2%	14-26	-1,7	0,008	0,8362
15	TNNT3_MOUSE	49	2	7%	14-36B	-1,6	0,041	0,5589
16	TRI72_MOUSE	177	6	18%	14-24	-1,7	0,015	0,7379
17	GRP78_MOUSE	155	6	10%	14-19	1,9	0,012	0,7744
		71	3	4%	14-31	1,6	0,009	0,8190
		Non identifié mais reconnu dans banque de données 2D			14-34	1,6	0,003	0,9177
18	MLRV_MOUSE	128	4	27%	14-33	1,6	0,032	0,6048
19	PDIA1_MOUSE	208	7	16%	12-65	1,5	0,009	0,8275

(cc) BY-NC-ND

Annexe 3. Analyse protéomique réalisée sur les *Gastrocnemius* des souris *Tg(Gasp-1)* à 16 mois

Spot	Access Number	Score	Matches	Cover	Rank	Fold	Anova (p)	Power
1	1433G_MOUSE	798	38	40,1%	3032	1,7	0,002	0,956
2	PDIA3_MOUSE	2276	89	56,8%	4461	1,5	0,007	0,846
	TRXR1_MOUSE	740	31	22,3%				
	HYES_MOUSE	173	13	20,9%				
	CES1D_MOUSE	136	8	8,8%				
3	PGM1_MOUSE	2529	104	52,5%	1542	1,4	0,009	0,811
	PGM5_MOUSE	77	6	4,4%				
4	ABEC2_MOUSE	1083	50	74,6%	4462	1,4	0,009	0,805
5	MYBPH_MOUSE	5931	204	69,6%	4460	1,7	0,012	0,766
	EIF3D_MOUSE	624	32	38,3%				
	ACTS_MOUSE	233	20	22,3%				
6	1433E_MOUSE	3167	102	43,5%	3171	1,7	0,014	0,746
	ACTN3_MOUSE	144	6	3,1%				
7	GRP78_MOUSE	7971	294	53,0%	1335	1,7	0,015	0,741
	TPM1_MOUSE	822	40	47,9%				
	TGM2_MOUSE	688	29	23,6%				
8	SPRE_MOUSE	4968	164	69,0%	3165	1,5	0,02	0,692
	HSPB1_MOUSE	1116	58	55,5%				
	BIN1_MOUSE	636	32	22,6%				
	PDLI3_MOUSE	615	16	21,2%				
	ACTS_MOUSE	205	15	15,9%				
9	ABEC2_MOUSE	972	46	62,1%	2856	1,4	0,021	0,678
	ACTS_MOUSE	351	19	22,3%				
	MYH4_MOUSE	324	29	9,0%				
	ACTS_MOUSE	351	19	22,3%				
12	SAR1B_MOUSE	1054	51	54,5%	3355	1,4	0,029	0,625
	ABHEB_MOUSE	279	13	32,9%				
	ACTS_MOUSE	251	13	22,3%				
	PRDX3_MOUSE	249	11	24,5%				
	PARK7_MOUSE	196	13	26,5%				
	PPCT_MOUSE	147	8	25,2%				
	RHOA_MOUSE	87	4	7,3%				
13	TPM1_MOUSE	18002	633	66,2%	2534	1,7	0,031	0,609
	TPM2_MOUSE	9321	314	39,4%				
	TPM2_MOUSE	9321	314	39,4%				
	TPM3_MOUSE	7099	323	47,7%				
	TPM4_MOUSE	759	60	15,7%				
15	TCPE_MOUSE	4059	177	54,5%	1618	1,3	0,035	0,588
	MYPC2_MOUSE	630	29	14,5%				

(cc) BY-NC-ND

	TCPA_MOUSE	536	32	40,3%				
	ACTN3_MOUSE	511	26	20,4%				
	CORO6_MOUSE	177	9	10,0%				
	TRXR1_MOUSE	156	6	3,4%				
	AKT2_MOUSE	128	13	16,8%				
16	CAZA2_MOUSE	4452	161	65,4%	2447	1,5	0,036	0,583
17	TPM1_MOUSE	428	11	8,1%	1835	1,4	0,039	0,566
	TPM2_MOUSE	428	11	8,1%				
	HNRH2_MOUSE	347	8	10,0%				
18	MYH1_MOUSE	4934	166	21,8%	1582	-1,3	0,042	0,555
	MYH4_MOUSE	3845	125	19,8%				
	BIN1_MOUSE	509	34	26,5%				
	CACB1_MOUSE	452	25	20,3%				
19	SYG_MOUSE	1879	72	32,1%	1333	1,2	0,051	0,513
	MYPC2_MOUSE	173	10	8,9%				
20	PRS4_MOUSE	2718	118	64,8%	1683	1,2	0,03	0,615
	ACTN3_MOUSE	1727	69	34,3%				
	MYH4_MOUSE	780	52	15,6%				
	CACB1_MOUSE	409	21	18,9%				
	PDIA3_MOUSE	405	24	29,9%				

(cc) BY-NC-ND

RESUME

Le muscle squelettique est un tissu hétérogène et dynamique jouant un rôle important dans la mobilité et le métabolisme d'un organisme. C'est un organe actif qui sécrète de nombreuses cytokines participant au « crosstalk » entre tous les tissus impliqués dans ce métabolisme. Parmi ces myokines, la myostatine agit à la fois comme un régulateur négatif du développement musculaire et un médiateur dans l'homéostasie du glucose. En effet, les souris déficientes pour le gène de la *myostatine* (*Mstn*$^{-/-}$) présentent une augmentation de leur masse musculaire associée à une hyperplasie et une hypertrophie des myofibres. Elles présentent également une diminution de leur masse adipeuse. L'expression de la myostatine est finement régulée par des inhibiteurs comme la follistatine, FSTL3 ou les protéines GASP-1 et GASP-2. Si de nombreuses études ont déjà été réalisées sur les autres inhibiteurs, les protéines GASPs sont à l'heure actuelle encore peu étudiées. Le modèle murin surexprimant *Gasp-1* (*Tg(Gasp-1*) généré dans le laboratoire présente un phénotype hypermusclé associé à une hypertrophie mais sans hyperplasie et ne présentent pas de diminution de leur masse adipeuse. Afin de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de la surexpression de *Gasp-1*, nous avons analysé des cellules musculaires dérivées de cellules satellites de souris *Tg(Gasp-1).* Cette étude a révélé une dérégulation de l'expression de plusieurs gènes dont une surexpression de la *myostatine* qui pourrait expliquer l'absence d'hyperplasie. Nous avons voulu également expliquer l'absence de variation de masse adipeuse dans les souris *Tg(Gasp-1)* en réalisant des analyses métaboliques sur des souris jeunes et âgées. Ces travaux ont révélé une dérégulation globale de l'homéostasie du glucose dans les souris *Tg(Gasp-1)* associé à une dérégulation du sécrétome musculaire. Enfin nous avons voulu appréhender le rôle de GASP-2 dans le contexte musculaire

Mots clés : GASP-1, GASP-2, myostatine, muscle squelettique, homéostasie du glucose

ABSTRACT

Skeletal muscle is a heterogeneous and dynamic tissue which plays an important role in mobility and metabolism of organisms. It is an active organ that secretes numerous cytokines involved in "crosstalk" between all tissues implicated in metabolism. Among these myokines, myostatin acts both as a negative regulator of muscle development and a mediator in glucose homeostasis. Indeed, mice deficient for the *myostatin* gene (*Mstn*$^{-/-}$) have an increase of muscle mass associated with hyperplasia and hypertrophy of myofibers. *Mstn*$^{-/-}$ mice also exhibit a decrease of fat mass. Expression of myostatin is tightly regulated by inhibitors such follistatin, FSTL-3 or GASP-1 and GASP-2 proteins. While many studies have already been performed on the other inhibitors, GASPs proteins are still poorly studied. The mouse model overexpressing Gasp-1 (*Tg (Gasp-1)*) generated in our lab presents a hypermuscular phenotype associated with hypertrophy without hyperplasia and exhibit no decrease in fat mass. To better understand the functional consequences of *Gasp-1* overexpression, we analyzed muscle cells derived from *Tg(Gasp-1)* satellite cells This study revealed a deregulation of the expression of several genes with an upregulation of *myostatin* which could explain the absence of hyperplasia in the *Tg(Gasp-1)* mice. We then want to explain the absence of fat mass changes by performing metabolic assays in young and aged mice. These studies have revealed an overall dysregulation of glucose homeostasis and deregulation of muscle secretome in *Tg(Gasp-1)* mice. Finally we wanted to capture the role of GASP-2 in a muscular context.

Keywords : GASP-1, GASP-2, myostatin, skeletal muscle, glucose homeostasis