

THESE

délivrée par l'INSA de Lyon

et l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

présentée par

Joffrey DE LARICHAUDY

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

En

Discipline : **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE**

Domaine : **SCIENCES, MEDECINE, SANTE**

IMPLICATION DES CERAMIDES DANS
L'ATROPHIE MUSCULAIRE

SOUTENUE LE 04-04-2012

Dr. Bonnieu Anne	Rapporteur
Pr. Freyssenet Damien	Rapporteur
Dr. Cheillan David	Examineur
Dr. Vidal Hubert	Président
Dr. Georges Némoz	Directeur de Thèse



CETTE THESE A ETE PREPAREE AU LABORATOIRE CARMEN, UMR INSERM 1060/ INSA DE LYON.



FACULTE DE MEDECINE LYON-SUD
165, Chemin du grand revoyet
69600 OULLINS



Hôpitaux de Lyon

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	<u>CHIMIE DE LYON</u> http://www.edchimie-lyon.fr Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	<u>ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</u> http://edeea.ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	<u>EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION</u> http://e2m2.universite-lyon.fr Insa : H. CHARLES	Mme Gudrun BORNETTE CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43.12.94 e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr
EDISS	<u>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE</u> http://ww2.ibcp.fr/ediss Sec : Safia AIT CHALAL Insa : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Louis Pradel Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16 Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFOMATHS	<u>INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES</u> http://infomaths.univ-lyon1.fr	M. Johannes KELLENDONK Université Claude Bernard Lyon 1 INFOMATHS Bâtiment Braconnier 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44.82.94 Fax 04 72 43 16 87 infomaths@univ-lyon1.fr
Matériaux	<u>MATERIAUX DE LYON</u> Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	<u>MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE</u> Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	<u>ScSo*</u> M. OBADIA Lionel Sec : Viviane POLSINELLI Insa : J.Y. TOUSSAINT	M. OBADIA Lionel Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.69.72.76 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Docteur Hubert Vidal pour m'avoir accueilli au sein de l'unité CarMeN pendant ces 4 ans de stage puis de thèse et sur le site de Lyon-sud lors de ma fin de thèse qui a débuté à la Doua.

Je remercie le Professeur Michel Lagarde pour m'avoir accueilli au sein de l'IMBL lors de mon stage de master et de ma première année de Thèse.

Je voudrais aussi remercier tout particulièrement le Docteur Georges Némoz qui m'a encadré durant ces 3 années... et demie, pour tout ce qu'il m'a appris, sa grande disponibilité, sa gentillesse et sa patience.

Je remercie également la Ligue contre le cancer qui m'a attribué une bourse de 6 mois pour terminer ces travaux.

Je tiens aussi à remercier tous ceux qui m'ont aidé dans ce projet de recherche : Monique Piraud et David Cheillan pour leur accueil et les dosages de sphingolipides au CBE, Jocelyne Draï et Joël Rivière pour leur disponibilité et leur aide à la plateforme du CBS pour la phase d'évaporation des solvants. Je remercie également le Dr Alain Geloën pour ses conseils et ses démonstrations en chirurgie animale et pour son aide à l'animalerie. Je remercie aussi le Dr Christophe Soulage pour le prêt de son kit MTT.

J'adresse mes remerciements à tout le personnel de l'unité Carmen pour tous les bons moments passés ensemble : la convivialité des repas annuels de l'unité, les petits déjeuners offerts et les petits mots de soutien.

Et en particulier mon équipe de colocataires du 2^e étage : Roméo pour sa capacité à être présent dans tous les moments bons comme difficiles et à être une oreille attentive, à Pierre mon partenaire sport, vente-privée et plus si affinités chez qui la force est très vivace et qui vont assurer la relève.

Je remercie aussi Julien, pour ces conseils toujours avisés parfois incompréhensibles en stats sans oublier son aide décisive sur word, Alexis, notre « éxosomologue » presque célèbre pour son sens de l'amitié, Kévin pour sa bonne humeur, ses blagues parfois limites mais sa capacité intacte à détendre l'atmosphère et enfin, Clément notre « chief office » (on m'a obligé à le mettre), regretté cuisinier, expert en mayonnaise à ses heures perdues pour sa présence et ses conseils toujours avisés quelque soit le domaine. Merci aussi à Colin pour ses conseils en mode et pour tout le reste et à Nadir pour ses diagnostics précis (à nous hypochondriaques que nous sommes) et son regard toujours intéressé sur les choses.

Je voulais vraiment les remercier pour ces 3 ans de bonne humeur, d'autodérision et de soutien qui ne nous ont pas valu que des compliments mais qui nous ont permis de rester soudés.

Merci aussi à l'équipe des filles : Cécile, Maud et Emilie que j'ai découvert trop tard pour leur sens de l'humour, leur bonne humeur et leur soutien. J'espère vraiment pouvoir conserver votre amitié plus tard.

Merci à Sandra, pour ses conseils musicaux et PCR en simultané (les deux ne sont pas incompatibles), à Emmanuelle et Cyril pour leurs recommandations en PCRs, à Marie-Agnès pour les nombreux petits conseils en western-blot mais pas que : ce sera dur de se débrouiller sans elle maintenant. Merci également à Nathalie pour sa bonne humeur et sa disponibilité, à Annie pour son aide précieuse en microscopie et en histologie, à Emmanuelle pour ses recommandations en informatique au « noob » que je suis et enfin à Brigitte pour son aide dans les nombreuses démarches qui ont jalonné ces 3 ans.

Mes années INSA m'ont aussi permis de connaître et d'apprécier tout le personnel de l'INSA avec une pensée particulière pour Patrick Molière, Lilas Hadji, Jérôme Bouvier, Emilie Caillet et Romain Colas pour nos pauses café enrichissantes et bien plus encore que je ne peux résumer ici.

Je voudrais aussi remercier d'autres personnes qui me sont chères : « Alice », « Rhum 1 & 2 », « Nailou », « Mag », Réda, et Yann qui m'ont accompagné sur ce chemin semé d'embûches après m'avoir ouvert la route pour certains. Si je devais retenir quelque chose de ces années, au delà de l'obtention de cette thèse, ce serait notre rencontre et votre amitié.

Enfin, je remercie toute ma famille : de ses incompréhensions lorsque je m'évertuais à expliquer mon sujet de thèse jusqu'au fait, que non, je ne savais pas comment soigner telle ou telle douleur, que je ne serais jamais médecin et pour son soutien sans failles. Un merci tout particulier à ma maman qui a toujours cru en moi, à ma tante Agnès pour sa présence permanente, son affection et son franc parlé, à mon oncle Jérôme pour sa gentillesse, ses conseils, à mes cousins Bastien, Salomé et Anaëlle toujours là pour moi et enfin à ma grand-mère.

Résumé

Le muscle squelettique fait preuve d'une remarquable plasticité en réponse aux changements physiologiques, comme l'activité physique, et aux situations pathologiques. Il subit notamment une atrophie sévère lors de la cachexie qui accompagne diverses pathologies chroniques comme le cancer, le SIDA, etc. L'atrophie musculaire est aussi une composante de la sarcopénie qui survient lors du vieillissement normal, et se caractérise par un déclin de la force et de la masse musculaire. L'atrophie musculaire, qui entraîne une augmentation de la mortalité et diminue l'efficacité des traitements, constitue donc un problème de santé majeur.

La fonte musculaire découle d'une altération de l'équilibre entre synthèse et dégradation protéiques dans les fibres adultes. Des taux élevés de cytokines circulantes, dont le TNF α , qui affectent l'homéostasie du muscle via différentes voies de signalisation, semblent être à l'origine de l'atrophie. Les mécanismes de la réponse atrophique musculaire à ces taux circulants élevés sont cependant mal définis.

Le TNF α a des effets complexes. Il peut activer de multiples voies de signalisation, parmi lesquelles l'induction de la synthèse de sphingolipides, et plus particulièrement de céramides, par la voie *de novo* et par l'activation des sphingomyélinases. Au niveau musculaire, les céramides sont connus pour leurs effets sur la signalisation de l'insuline, sur l'apoptose et sur la différenciation myogénique. Par contre, leur implication dans le cadre de l'atrophie n'avait jamais été prise en compte.

L'objectif de ce travail a été dans un premier temps de démontrer le rôle des céramides dans l'atrophie. Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé la voie de signalisation par laquelle l'augmentation intramusculaire de céramide induite par le TNF α aboutit à une chute de la synthèse protéique, couplée à une augmentation de la protéolyse. Dans ce but, nous avons mis au point des modèles *in vitro* d'atrophie, impliquant des myotubes traités par des concentrations physiologiques de TNF α . Nous avons en parallèle étudié un modèle *in vivo* de cachexie induite chez la souris par l'implantation d'un adénocarcinome C26. L'analyse des sphingolipides nous a permis de montrer l'augmentation des taux de céramides concomitante à l'atrophie générée *in vitro* et *in vivo*. Le rôle des céramides dans l'atrophie a été démontré par l'effet protecteur des inhibiteurs de leur synthèse, dans les modèles *in vitro* et *in vivo*. Nous montrons de plus dans un modèle *in vitro* que les effets atrophiques des céramides sont dus à l'inhibition de la voie de signalisation Phospholipase D/mTOR/Akt.

Nos résultats nous ont permis de prouver le rôle des sphingolipides dans le contrôle de l'homéostasie protéique du muscle. La modulation du métabolisme des sphingolipides apparaît donc comme une nouvelle cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de la perte musculaire associée à diverses pathologies.

Avant-propos

Liste des publications :

De Larichaudy, J., A. Zufferli, F. Serra, A. M. Isidori, F. Naro, K. Dessalle, M. Desgeorges, M. Piraud, D. Cheillan, H. Vidal, E. Lefai et G. Nemoz (2012). TNF α -induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skeletal Muscle* 2 (1): 2.

Forterre, A., A. Jalabert, E. Danty, K. Chikh, E. Errazuriz, M. Baudet, Y. Coute, J. De Larichaudy, C. Vors, C. Michalski, M. Record, G. A., A. Tchernof, E. Lefai, H. Vidal et S. Rome (2012). C2C12 myoblasts and myotubes secrete specific exosomes-like vesicles involved in myogenesis. *soumis*.

De Larichaudy, J., R. Jaafar, S. Chanon, A. Durand, H. Vidal, E. Lefai et G. Nemoz Implication of phospholipase D in muscle atrophy. *en préparation*.

Communications orales :

De Larichaudy J., Zufferli A., Vidal H., Lefai E., Nemoz G (Mars 2010). Involvement of ceramides in TNF α -induced muscle atrophy. *Journée de l'EDISS (Ecole Interdisciplinaire Science Santé), Villeurbanne*.

De Larichaudy J., Zufferli A., Jaafar R., Vidal H., Lefai E., Nemoz G (Mars 2010). Involvement of ceramides in TNF α -induced muscle atrophy. *First international Congress of Translational Research in Human Nutrition, Clermont-Ferrand*.

De Larichaudy J., Zufferli A., Vidal H., Lefai E., Nemoz G (Octobre 2010). Involvement of ceramides in TNF α -induced muscle atrophy. *19^{ème} réunion des groupes de recherche en endocrinologie des Universités de la région Rhône-Alpes - Association G2L2, Lausanne ; Prix du jury poster*.

De Larichaudy J., Zufferli A., Vidal H., Lefai E., Nemoz G (Mars 2011). Involvement of ceramides in TNF α -induced muscle atrophy. *6^e congrès scientifique du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA)/Biovision Life Sciences Forum, Lyon*.

Table des matières

Introduction générale et objectifs	1
1 La régulation de la masse musculaire	5
1.1 Généralités	5
1.1.1 les diverses fonctions des muscles	5
1.1.2 La structure du muscle squelettique	6
1.1.3 La contraction musculaire	10
1.2 Plasticité musculaire : hypertrophie/atrophie	12
1.2.1 Généralités.....	12
1.2.2 Les différents types de fibres	12
1.2.3 Facteurs affectant la composition et la taille des muscles.....	13
1.2.4 Voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie musculaire	21
1.3 L'atrophie musculaire	38
1.3.1 Généralités.....	38
1.3.2 Atrophie musculaire et pathologies.....	38
1.3.3 Causes de l'atrophie musculaire	40
1.3.4 Facteurs humoraux impliqués dans l'atrophie musculaire.....	40
1.3.5 Cas de la sarcopénie	47
1.3.6 Mécanismes moléculaires mis en jeu	47
1.3.7 Les traitements de la perte musculaire	48
2 Les sphingolipides.....	52
2.1 Généralités	52
2.2 Structure.....	54
2.3 Les voies de synthèse des sphingolipides.....	56
2.3.1 Généralités.....	56
2.3.2 Voie de novo	56
2.3.3 Voie de recyclage	57
2.3.4 Compartimentation des voies de synthèse	59
2.4 Fonctions biologiques des principaux sphingolipides	61
2.4.1 Le céramide	61
2.4.2 La sphingosine.....	65
2.4.3 La Sphingosine-1-phosphate	66
2.4.4 La sphingomyéline	68
2.4.5 Les glycosphingolipides	69
2.5 Rôle physiopathologique des sphingolipides	71
2.5.1 Céramides et insulino-résistance	71
2.5.2 Sphingolipides et inflammation	72
2.5.3 Sphingolipides et cancer.....	73
3 Matériel et méthodes	75
3.1 Matériel.....	75
3.2 Produits.....	76
3.3 Méthodes	78
3.3.1 Culture cellulaire	78
3.3.2 Dosage de la Chaîne lourde de la Myosine par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	79
3.3.3 Dosage de l'activité créatine kinase.....	80
3.3.4 Analyse morphologique des myotubes : mesure de la surface après immunomarquage.....	81

3.3.5	Marquage de l'apoptose et de la nécrose cellulaires.....	82
3.3.6	Viabilité des cellules (test MTT : [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide])	83
3.3.7	Evaluation de la fragmentation de l'ADN (ELISA Cell Death Detection, Roche) 84	
3.3.8	Electrophorèse en SDS-PAGE et Western-Blot.....	85
3.3.9	Analyse des sphingolipides	87
3.3.10	Dosage du métabolisme protéique	89
3.3.11	Les ARN interférents	90
3.3.12	Les adénovirus.....	91
3.3.13	RT-PCR.....	91
4	Résultats	93
4.1	Le traitement de myotubes L6 et C2C12 par le TNF α induit une atrophie.....	93
4.1.1	Le TNF α et les céramides affectent la taille de myotubes in vitro.....	93
4.1.2	Effets atrophiques du TNF α et des céramides quantifiés sur des critères fonctionnels	95
4.2	Les céramides contribuent à l'effet atrophique du TNF α	98
4.2.1	Les inhibiteurs de la synthèse de céramides préservent l'intégrité des myotubes en présence de TNF α	98
4.2.2	Effets du TNF α et des inhibiteurs sur les taux de céramides endogènes.....	101
4.2.3	Effets des inhibiteurs sur les taux endogènes de sphingosine	105
4.3	Rôle trophique de la Sphingosine-1-Phosphate.....	106
4.4	Les céramides modifient l'équilibre entre synthèse et dégradation protéique.....	109
4.4.1	Synthèse protéique et protéolyse.....	109
4.4.2	Les céramides induisent une activation des voies de protéolyse.....	110
4.5	Recherche des voies de signalisation impliquées dans l'action atrophique des céramides.....	113
4.5.1	Rôle de la PLD dans l'atrophie.....	113
4.5.2	Impact des céramides sur la voie mTOR	117
4.5.3	Le TNF α active la voie NF κ B, mais les céramides ne sont pas impliqués	120
4.6	Etude in vivo : l'inhibition de la synthèse de céramides protège contre l'atrophie musculaire induite par un adénocarcinome C26 chez la souris.....	122
4.6.1	Le développement de la tumeur induit un syndrome cachectique	122
4.6.2	L'injection de myriocine préserve le poids et la taille des muscles chez les souris greffées	122
4.6.3	L'atrophie musculaire tumeur- induite est associée à une activation de la protéolyse	124
4.6.4	L'atrophie musculaire tumeur-induite est associée à une augmentation des taux de céramides intra-musculaires	124
4.7	Schéma récapitulatif des résultats obtenus	126
5	Discussion	127
6	Conclusion.....	138
7	Bibliographie	139

Table des illustrations

FIGURE 1 : ROLE DU MUSCLE DANS LE METABOLISME GLUCIDIQUE.	6
FIGURE 2 : STRUCTURE DU MUSCLE SQUELETTIQUE JUSQU'AU SARCOMERE : LES DIFFERENTS NIVEAUX D'ORGANISATION DU MUSCLE.	7
FIGURE 3 : STRUCTURE GENERALE DES CELLULES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES ET LISSES.	8
FIGURE 4 : LE MODELE DE LA CONTRACTION DU SARCOMERE, UNITE FONCTIONNELLE DU MUSCLE.	9
FIGURE 5 : LES VOIES DE SIGNALISATION DE L' IGF ET DE LA MYOSTATINE ONT DES EFFETS OPPOSES.	16
FIGURE 6 : ROLE DES MRF DANS LA DIFFERENCIATION DES CELLULES MUSCULAIRES.	18
FIGURE 7: STRUCTURE DE LA PROTEINE MTOR.	22
FIGURE 8 : LES VOIES DE REGULATION DU COMPLEXE MTORC1.	26
FIGURE 9 : MECANISME DE CONTROLE DE L'INITIATION DE LA TRADUCTION DES ARNM PAR LE COMPLEXE EIF4F.	27
FIGURE 10 : LA VOIE DE SIGNALISATION MTOR : UN RESEAU COMPLEXE DE PHOSPHORYLATIONS.	30
FIGURE 11 : ACTIVITE ENZYMATIQUE ET STRUCTURE DE LA PHOSPHOLIPASE D.	34
FIGURE 12 : LES DIFFERENTS MODULATEURS DE LA PLD.	35
FIGURE 13 : LES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION INITIEES PAR LE TNFA.	42
FIGURE 14 : LA SYNTHESE DE CERAMIDES INDUITE PAR LE TNFA.	43
FIGURE 15 : STRUCTURE GENERALE DE 3 TYPES DE LIPIDES MEMBRANAIRES.	53
FIGURE 16 : STRUCTURE DES PRINCIPAUX SPHINGOLIPIDES ET DES COMPOSES « SPHINGOID-LIKE ».	55
FIGURE 17 : VOIES DE SYNTHESE DES SPHINGOLIPIDES.	57
FIGURE 18 : VOIES DE CONVERSION DU CERAMIDE DANS LA CELLULE.	58
FIGURE 19 : LOCALISATION DES VOIES DE SYNTHESE DES SPHINGOLIPIDES DANS LA CELLULE.	60
FIGURE 20 : EFFETS ET FONCTIONS DES DIFFERENTS INTERMEDIAIRES DE LA VOIE DE SYNTHESE DES SPHINGOLIPIDES.	65
FIGURE 21 : DETAIL DE LA REACTION DE METABOLISATION DU MTT EN FORMAZAN.	84
FIGURE 22 : PRINCIPE DU TEST ROCHE DE DOSAGE DES OLIGONUCLEOSOMES ISSUS DE LA DEGRADATION DE L'ADN GENOMIQUE.	85
FIGURE 23 : EXEMPLE DE STANDARD DEUTERE UTILISE POUR L'ANALYSE EN LC-MS/MS : LA D7 SPHINGOSINE	88
FIGURE 24 : LE TRAITEMENT PAR LE TNFA OU UN CERAMIDE EXOGENE PROVOQUE UNE DIMINUTION DE LA SURFACE DES MYOTUBES L6.	93
FIGURE 25 : EFFETS DU TNFA ET DES CERAMIDES EXOGENES SUR LA SURFACE DE MYOTUBES C2C12.	94
FIGURE 26 : EFFETS DU TNFA ET DU C6-CERAMIDE SUR LA QUANTITE DE MHC.	95
FIGURE 27 : EFFETS DU TNFA ET DU C6-CERAMIDE EXOGENE SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CREATINE KINASE.	96
FIGURE 28 : EFFETS DU TNFA ET DE L'INHIBITION DE LA SYNTHESE DE CERAMIDES PAR LA MYRIOCINE SUR L'APOPTOSE.	97
FIGURE 29 : EFFETS PROTECTEURS DES INHIBITEURS DE LA SYNTHESE DE CERAMIDES CONTRE LA DIMINUTION DE SURFACE DES MYOTUBES L6 INDUITE PAR LETNFA.	98
FIGURE 30 : EFFETS DU TNFA ET DES INHIBITEURS DE SPHINGOMYELINASES SUR LA SURFACE DES MYOTUBES C2C12.	99
FIGURE 31 : EFFET DE LA MYRIOCINE SUR LA SURFACE DES MYOTUBES C2C12, EN PRESENCE ET ABSENCE DE TNFα.	99
FIGURE 32 : EFFET PROTECTEUR DE LA MYRIOCINE SUR LA QUANTITE DE MYOSINE DANS LES MYOTUBES L6.	100
FIGURE 33 : EFFETS DU TNFA ET DES INHIBITEURS SUR L'ACTIVITE CREATINE KINASE DE MYOTUBES L6.	101
FIGURE 34 : EFFETS DES INHIBITEURS DE LA SYNTHESE DES CERAMIDES SUR LES TAUX DE CERAMIDES ET DE SM DES MYOTUBES L6, EN PRESENCE DE TNFA.	104
FIGURE 35 : EFFETS D'INHIBITEURS DES DEUX VOIES DE SYNTHESE DE CERAMIDES, ET DU TNFA, SUR LES TAUX DE SPHINGOSINE ENDOGENE.	105
FIGURE 36 : EFFETS DE LA S1P SUR LA REPONSE DES MYOTUBES L6 AU TNFA.	106
FIGURE 37 : EFFETS DE L'INHIBITION DE LA SPHINGOSINE KINASE SUR LA SURFACE DES MYOTUBES.	107
FIGURE 38 : EFFET DU TNFA ET DES INHIBITEURS DE LA SYNTHESE DE CERAMIDES SUR LA SYNTHESE PROTEIQUE.	109
FIGURE 39 : EFFETS DU TNFA ET DES INHIBITEURS SUR LA PROTEOLYSE.	110

FIGURE 40 : EFFETS DU TNFA ET DES INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DE CERAMIDES SUR L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA PROTEOLYSE.....	111
FIGURE 41 : EFFETS DE LA SUREXPRESSION ET DE LA DOWN-REGULATION DE LA PLD SUR L'ACTIVITE CREATINE KINASE DES MYOTUBES L6.	113
FIGURE 42 : EFFET DE L'INHIBITEUR DE LA PLD, FIPI, SUR L'EXPRESSION DES ATROGENES.	114
FIGURE 43 : EFFETS DU TNFA ET DES INHIBITEURS DE SYNTHÈSE DE CERAMIDE SUR L'EXPRESSION DE PLD1.	116
FIGURE 44 : EFFETS DE L'ACIDE PHOSPHATIDIQUE EXOGENE SUR L'ACTIVITE CREATINE KINASE.	117
FIGURE 45 : EFFETS DU TNFA ET DE LA MYRIOCINE SUR L'EXPRESSION ET LA PHOSPHORYLATION DE S6K1. ...	118
FIGURE 46 : EFFETS DU TNFA ET DE LA MYRIOCINE SUR LA PHOSPHORYLATION DE 4E-BP1.	119
FIGURE 47 : EFFETS DU TNFA ET DES INHIBITEURS DE SYNTHÈSE DE CERAMIDES SUR AKT.	120
FIGURE 48 : EFFETS DU TNFA ET DE LA MYRIOCINE SUR IKKA/B.....	121
FIGURE 49 : COURBE DE POIDS DES SOURIS.	122
FIGURE 50 : DISTRIBUTION DE LA SECTION DES FIBRES DU GASTROCNEMIUS DANS LES DIFFERENTS GROUPES DE SOURIS.....	123
FIGURE 51 : EFFET DE LA TUMEUR ET DE L'INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DE CERAMIDE SUR L'EXPRESSION DES ATROGENES.	124
FIGURE 52 : SYNTHÈSE DE CERAMIDES EN PRESENCE DE TUMEUR.	125
FIGURE 53 : SCHEMA BILAN.	126
FIGURE 54 : BAISSÉ DE CERAMIDES INDUITE PAR LES INHIBITEURS DE SYNTHÈSE, EN % DU TAUX DE L'ESPECE CONSIDEREE, MESURE EN PRESENCE DE TNFA SEUL.	131

Liste des abréviations

4E-BP1 : eIF4E-binding protein 1 (inhibiteur lié à eIF4E)

A

Akt /PKB: Protéine Kinase B

ALK : Activine receptor Like Kinase

AMP : Adénosine Mono-Phosphate

AMPK : AMP-activated protein Kinase (protéine kinase activée par l'AMP)

ARF : Facteur d'ADP-ribosylation

ARNi : Acide Ribo-Nucléique interférent

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

AVP : Arginine-8-Vasopressine

B

bHLH : basic Helix-Loop-Helix factor (facteur de transcription)

BSA : Sérum Albumine Bovine

C

CAPK : Ceramide Activated Protein Kinase

CHO : Chinese Hamster Ovary Cells (cellules ovariennes de Hamster chinois)

CK : Créatine Kinase

COX : cyclo-oxygénase

CSA : Cross Sectionnal Area (surface de section)

D

DAG : Di-Acyl-Glycérol

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DD : Death Domain

DEPTOR : DEP-domain-containing mTOR interacting protein

DHA : acide docosahexaénoïque

DHS : D,L, thréo-Di-Hydro-Sphingosine

DMS : Di-Méthyl-Sphingosine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

E

EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétra-acétique

eEF2K : eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase

eIF3f : elongation Initiation Factor 3 subunit f

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

ESI MS/MS : Spectrométrie de masse (injection à electrospray)

F

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

FAN : Factor Associated with Neutral sphingomyélinase

FIPI : 5-Fluoro-2-Indolyl des-chlorohalopemide PLD Inhibitor

FKBP12 : 12-kDa FK506-Binding Protein (protéine liée à FK506)

FoxO : Forkhead box factor type O

FRB : FKBP-Rapamycin-Binding domain (domaine de fixation du complexe rapamycine-FKBP)

G

GAP : GTPase Activating Protein

GSK-3 : Glycogène Synthase Kinase 3

GSL : Glycosphingolipides

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

I

IFN γ : Interféron gamma

IGF 1 : Insulin-like Growth Factor I

I κ B : Inhibitor of nuclear factor Kappa B

IKK : I κ B Kinase

IL-6 : Interleukine-6

i.p. : intra-péritonéale

IRS : Insulin Receptor Substrate

J

JNK : Jun N-terminal Kinase

K

KO : Knock Out (gene invalidé)

L

Lass : genes Longevity assurance

M

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MHC : Myosin Heavy Chain (chaîne lourde de myosine)

mLST8 : mammalian Lethal with Sec13 protein T8

MLK : Mixed Lineage Kinase

MRF : Facteur de Régulation Myogénique

MRF 4 : Myogenic Regulatory Factor 4

mSIN 1 : mammalian Stress-activated protein kinase INteracting protein

MurF1 : Muscle-specific ring finger protein-1

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

myf-5 : Myogenic factor 5

MyoD : myoblast determination protein 1/myogenic differentiation 1

N

NFκB : Nuclear Factor Kappa B

O

OMS : 3-O-Méthyl-sphigomyéline

P

PA : Acide Phosphatidique

PBS : Phosphate buffered saline

PDCD4 : Programmed Cell Death protein 4

PDK : Phosphoinositide-dependent protein kinase 1

PGC1α : Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1α

PH : Pleckstrin Homology domain (domaine homologue de la Pleckstrine)

PKC : Protéine Kinase C

PI3K : Phosphatidyl Inositol-3-Kinase

PIKK : PI3 Kinase-related Kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate

PLD : Phospholipase D

PRAS40 : Proline-rich Akt substrate 40 kDa

Protor 1 : Protein observed with RICTOR-1

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PX : domaine Phox

R

RAPTOR : Regulatory-Associated Protein of mTOR

Rb : Retinoblastoma protein (protéine du rétinoblastome)

RE : Reticulum Endoplasmique

REDD1 : REgulated in Development and DNA damage response 1 protein

RICTOR : Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR

RSK : Ribosomal protein S6 Kinase

RT-qPCR : Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction

S

S1P : Sphingosine-1-Phosphate

S6 : ribosomal protein S6

S6K : S6 Kinase (ribosomal protein S6 Kinase)

SAPK : Stress-Activated Protein Kinase

SEM : Standard Error of the Mean

SGK1 : Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise

siRNA : small interfering RNA (ARNi)

SKAR : S6K1 Aly/REF-like target (cible de S6K1)

SM : sphingomyéline

SMase : sphingomyélinase

SMAD : Mothers Against Decapentaplegic Homolog (homologue chez l'homme du gène Mad de la drosophile)

SODD : Silencer Of Death Domain

SPT : Sérine Palmitoyl Transférase

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TACE : TNF-Alpha Converting Enzyme

TBP : Tata Box binding protein

TCA : acide tri-chloro-acétique

TGF : Transforming Growth Factor

TMB : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1

TRADD : TNF Receptor Associated Death Domain protein

TRAF: TNF-receptor associated factors

TSC1/2 : Tuberous Sclerosis Complex 1/2

Introduction générale et objectifs

Le muscle squelettique est le tissu prépondérant de l'organisme, en terme de masse. Il représente près de 40 % de son poids total, et a une importance vitale pour la locomotion. Il fait preuve d'une remarquable plasticité en réponse aux changements physiologiques, comme lors de l'activité physique, et aux situations pathologiques, où il est la cible de divers facteurs qui vont altérer sa masse et sa fonction. L'atrophie musculaire est une complication induite par de nombreuses pathologies telles que le cancer, le diabète, le SIDA, l'insuffisance cardiaque, etc. C'est aussi une composante de la sarcopénie, à l'origine de la fragilité et de la dépendance survenant chez les personnes âgées. La cachexie, syndrome multifactoriel caractérisé par une perte de poids progressive et sévère visant les tissus musculaire et adipeux, est responsable de 30% des décès liés au cancer.

L'atrophie musculaire a pour conséquences une perte de mobilité, de qualité de vie, de réponse aux traitements, et une augmentation de la mortalité. Le maintien d'un tissu musculaire suffisant et fonctionnel apparaît donc primordial dans ces pathologies. En effet, des expériences menées sur des modèles animaux (Zhou *et al.* 2010), aussi bien que des études sur des patients en unités de soins intensifs (Ali *et al.* 2008) montrent que l'état de la masse et la force musculaires sont de bons indicateurs de la survie. Les possibilités d'actions thérapeutiques restent actuellement très limitées, et la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques visant à préserver le tissu musculaire apparaît donc comme une priorité.

Les facteurs humoraux, hormones et cytokines pro-inflammatoires, perturbent l'homéostasie musculaire en agissant sur diverses voies intracellulaires de signalisation. Parmi ces facteurs, les cytokines pro-inflammatoires circulantes, et notamment le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α), dont les taux peuvent être considérablement élevés en situation cachectique, jouent un rôle crucial. L'atrophie musculaire est provoquée par une altération de l'équilibre entre synthèse et dégradation protéiques, qui engendre une fonte des fibres fonctionnelles. Dans certains cas particuliers comme la sarcopénie ou l'atrophie induite par dénervation, une baisse des capacités régénératives du tissu musculaire pourrait participer au processus atrophique. Les liens entre les taux élevés de cytokines et la réponse atrophique sont encore imparfaitement compris.

Parmi les voies initiées par le TNF α , la formation de céramide, un second messager sphingolipidique impliqué dans la réponse au stress, a reçu peu d'attention dans l'étude de l'atrophie musculaire. Les sphingolipides sont connus pour leur rôle dans l'inflammation et l'apoptose. Dans le muscle, la plupart des travaux ont porté sur le rôle du céramide dans le développement de la résistance à l'insuline induisant le diabète. Cependant, des travaux réalisés au sein de notre équipe ou dans d'autres laboratoires laissaient présager un rôle important du céramide dans la régulation de la masse et de la croissance musculaire. Ainsi, son effet inhibiteur sur la différenciation myogénique a été récemment décrit, et attribué à l'inhibition de la Phospholipase D (PLD). Cette enzyme est maintenant reconnue comme un facteur important dans la régulation de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), et mTOR joue un rôle essentiel dans le contrôle de la taille des cellules musculaires, de par sa capacité à intégrer des signaux mécaniques, endocrines et nutritionnels. En réponse à ces stimuli, mTOR régule la synthèse protéique et la protéolyse protéasome-dépendante et autophagique. On pouvait donc supposer que le céramide qui se forme en réponse aux taux élevés de cytokines pro-inflammatoires a un impact, via la voie de mTOR, sur le tissu musculaire.

L'objectif de ce travail a été de démontrer le rôle des sphingolipides dans l'atrophie, et de caractériser la voie de signalisation par laquelle l'augmentation intramusculaire de céramide induite par la fixation du TNF α sur son récepteur aboutit à une chute de la synthèse protéique et une augmentation de la protéolyse.

Pour ce faire, nous avons mis au point des modèles *in vitro* d'atrophie, utilisant des myotubes issus des lignées myogéniques L6 et C2C12 traités par des concentrations de TNF α de l'ordre de celles observées chez des patients cachectiques, et nous avons en parallèle étudié un modèle *in vivo* de cachexie induite chez la souris par l'implantation d'un adénocarcinome C26. La détermination des taux des principaux sphingolipides dans ces modèles a établi que le TNF α et la présence d'une tumeur induisent bien une accumulation de céramide dans les cellules musculaires. L'implication de la synthèse de céramide dans la réponse atrophique a été montrée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des principales voies de synthèse, la voie *de novo* et les sphingomyélinases, dans les modèles *in vitro* et *in vivo*. Nous avons par ailleurs montré l'impact du TNF α et du céramide sur les voies de signalisation PLD/mTOR/Akt (protéine kinase B), et sur le métabolisme des protéines dans un modèle *in vitro*.

L'ensemble de nos résultats nous permet d'affirmer que les sphingolipides, et en particulier l'un d'eux, le céramide, ont un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie protéique du muscle. Il nous permet ainsi de proposer le métabolisme sphingolipidique comme une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la perte musculaire qui accompagne et aggrave diverses pathologies.

La première partie de ce mémoire est consacrée aux rappels bibliographiques divisés en deux volets : d'abord l'atrophie musculaire décrite d'un point de vue physiologique et mécanistique, puis le métabolisme des sphingolipides et leurs voies de signalisation. La suite du mémoire se compose d'un chapitre décrivant le matériel et les méthodes utilisés, puis les résultats obtenus durant ces années de thèse. Il se conclut par une discussion et par les perspectives thérapeutiques entrouvertes par ce travail.

Un article paru incluant une large part des résultats de ce travail est joint en annexe: De Larichaudy, J., A. Zufferli, F. Serra, A. M. Isidori, F. Naro, K. Dessalle, M. Desgeorges, M. Piraud, D. Cheillan, H. Vidal, E. Lefai et G. Nemoz. TNFalpha- and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skeletal Muscle* (2012) **2** (1) : 2.

Introduction bibliographique

1 La régulation de la masse musculaire

1.1 Généralités

1.1.1 les diverses fonctions des muscles

Le corps humain est composé de plus de 600 muscles dont la fonction première est de générer des mouvements volontaires ou non. Ils constituent la machine contractile du corps. Les vertébrés et la plupart des invertébrés possèdent trois classes de muscles : les muscles squelettiques, les muscles lisses et le muscle cardiaque, différant par leur fonction et leur structure. Ainsi, les muscles striés squelettiques qui représentent environ 40 % de la masse corporelle d'un individu normal, effectuent des contractions rapides et volontaires dans le cas des mouvements coordonnés et de la locomotion, ou involontaires dans le cas des muscles respiratoires. Les muscles lisse et cardiaque effectuent des contractions involontaires. Les muscles lisses recouvrent les organes internes tels que l'intestin, l'utérus ou les vaisseaux sanguins. Leurs contractions lentes permettent des fonctions involontaires telles que la progression de la nourriture dans le tractus digestif ou la régulation du flux sanguin via le diamètre des vaisseaux. Le muscle cardiaque assure la circulation sanguine.

Le muscle squelettique est le principal consommateur de glucose de l'organisme et joue un rôle majeur dans le métabolisme énergétique. Le glucose est le substrat utilisé préférentiellement par le muscle pour fournir l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) nécessaire à son activité. Il est apporté directement par l'alimentation, ou par l'hydrolyse des stocks de glycogène, ou encore synthétisé à partir de substrats non glucidiques comme le lactate, le pyruvate issus de la glycolyse et certains acides aminés (alanine), au cours de la néoglucogénèse hépatique lorsque la demande est élevée. Le muscle peut utiliser directement le glucose lors de la glycolyse, ou le stocker via la glycogénogénèse et l'utiliser lorsque les besoins énergétiques sont supérieurs à l'apport (*figure 1*).

Les muscles squelettiques ont, outre leur rôle dans la locomotion, une importante fonction de régulation de la température corporelle. La thermogénèse est assurée par le

muscle de deux façons différentes : par mouvements volontaires et par frissonnement (Block 1994). En cas d'abaissement de la température ou durant la réponse à une infection, le muscle sous le contrôle du système nerveux sympathique et des hormones thyroïdiennes répond par le découplage mitochondrial engendrant une fuite d'énergie qui génère de la chaleur (Morrison *et al.* 2008; van den Berg *et al.* 2011).

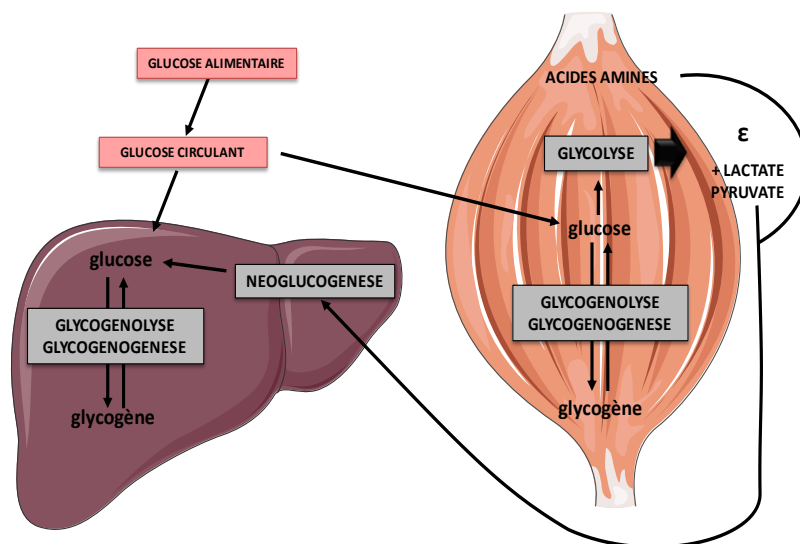


Figure 1 : Rôle du muscle dans le métabolisme glucidique.

1.1.2 La structure du muscle squelettique

L'unité cellulaire de base du muscle squelettique est la fibre musculaire ou myofibre. Un muscle squelettique se compose d'un faisceau de myofibres parallèles. La cellule musculaire typique se présente comme un cylindre d'une dizaine de millimètres de long sur 50 μm de diamètre. Elle est multinucléée, étant formée par la fusion de plusieurs centaines de cellules précurseurs appelées myoblastes, et ses noyaux sont disposés en périphérie. Elle est elle-même composée de multiples faisceaux de filaments contractiles, ou myofibrilles, présentant un aspect strié, de par l'alternance de bandes I claires et A sombres, les bandes I étant elles-mêmes partagées en leur milieu par une ligne Z très foncée. L'unité structurale de la myofibrille, comprise entre deux lignes Z, est nommée sarcomère (*figure 2*).

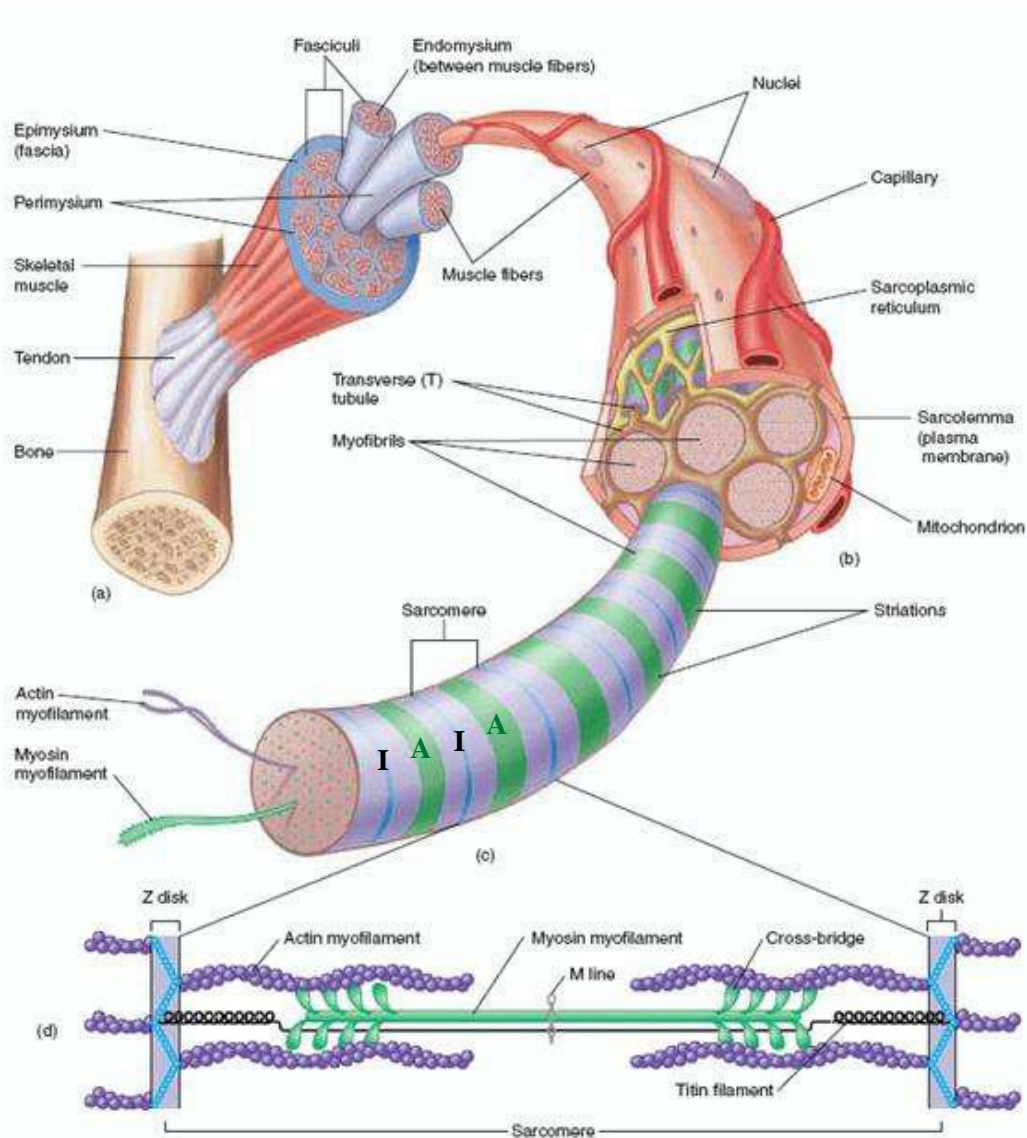


Figure 2 : Structure du muscle squelettique jusqu'au sarcomère : les différents niveaux d'organisation du muscle.

D'après Molecular Biology of the Cell, 4e édition; Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. 2002.

La microscopie électronique a montré que le sarcomère est constitué de deux types de filaments assurant la contraction : les filaments épais de myosine et les filaments fins d'actine qui se chevauchent au centre du sarcomère et glissent les uns sur les autres pour assurer la contraction (*figure 3*).

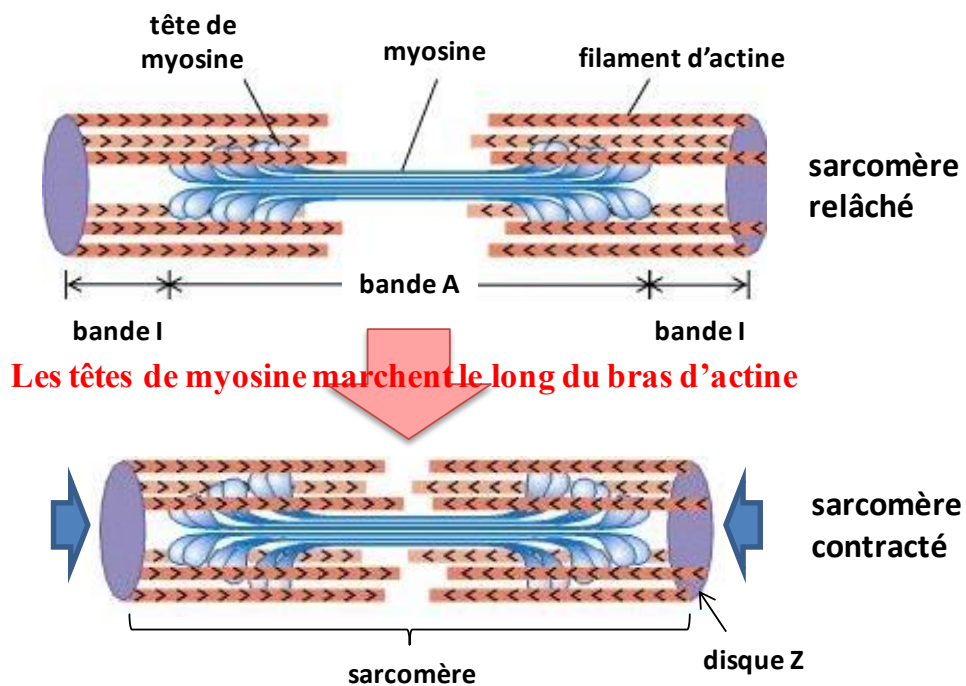


Figure 3 : Le modèle de la contraction du sarcomère, unité fonctionnelle du muscle.

1.1.2.1 Les microfilaments épais

Ils sont formés par l'assemblage de paires de chaînes lourdes de myosine, enroulées en double hélice et se terminant chacune par une tête globulaire capable d'interaction avec les filaments d'actine. Les microfilaments épais sont bipolaires, leur partie fibreuse étant placée au centre du sarcomère, les têtes globulaires aux deux extrémités étant au voisinage des disques Z (*figure 4*).

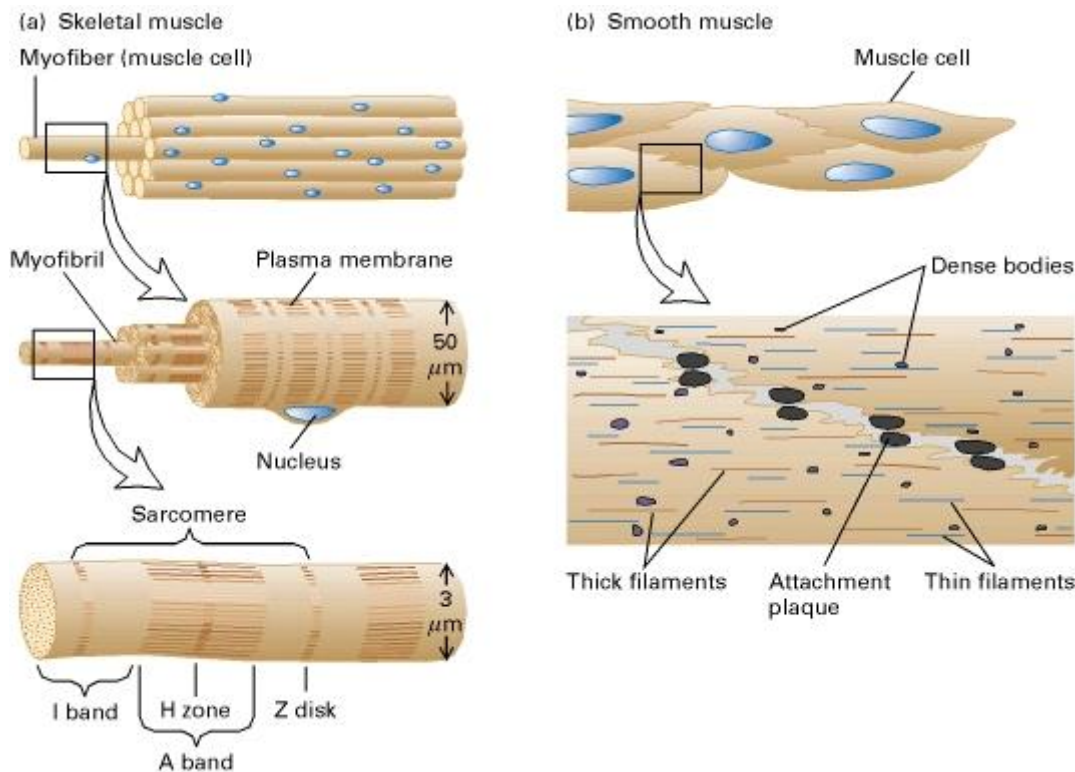


Figure 4 : Structure générale des cellules musculaires squelettiques et lisses.

L'organisation structurale des cellules striées multinucléées formées d'une chaîne de sarcomères (à gauche) tranche avec celle des cellules du muscle lisse, fusiformes et mononucléées formées d'assemblages lâches de filaments dispersés dans le cytosol (à droite). D'après Molecular Biology of the Cell, 4e édition; Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. 2002.

1.1.2.2 Les microfilaments fins

Ils sont polarisés et s'étendent du disque Z jusqu'au centre du sarcomère. Les monomères d'actine, le composant majeur du microfilament fin, possèdent un site de liaison à la myosine. Ils polymérisent pour former des chaînes linéaires d'actine F qui s'enroulent par paires en double hélice. Les microfilaments fins sont aussi composés de deux protéines modulatrices des interactions myosine-actine, la tropomyosine et la troponine. La tropomyosine forme des filaments disposés au creux du sillon de la chaîne d'actine qui masque les sites de liaison à la myosine. La troponine est composée de trois sous-unités : une qui se lie à la tropomyosine, une autre à l'actine et la troisième fixant le calcium nécessaire à la contraction. Aux extrémités des filaments fins, on trouve aussi deux protéines stabilisatrices : la coiffe Z et la tropomoduline empêchant la dépolymérisation de ceux-ci.

1.1.2.3 Le disque Z

C'est un treillis de fibres qui permet l'ancrage de l'extrémité des filaments d'actine. Il est principalement composé d' α -actinine connue pour interagir avec la protéine de coiffe Z et l'actine.

1.1.2.4 Les protéines annexes (filaments de titine et nébuline)

La fonction contractile est assurée par de nombreuses protéines de structure. (Clark *et al.* 2002). L'élasticité du muscle est garantie par la présence d'une longue protéine fibreuse, la titine, d' $1\mu\text{m}$ environ, qui maintient le filament de myosine au disque Z. La nébuline, elle, forme des filaments jumelés avec les microfilaments d'actine et stabilise leur structure. Elle contient des domaines de liaisons multiples à l'actine et sert de tuteur lors de la formation des microfilaments fins. De nombreuses autres protéines participent à l'assemblage et au maintien du sarcomère. Ainsi, les myomésines et protéines M forment des ponts transverses servant de site d'ancrage au filament épais au niveau de la ligne M au centre de la bande A. Tandis que les myosine binding protéines (MyBP) régulent la polymérisation du filament de myosine. Il existe de nombreuses autres protéines annexes qui ne sont pas détaillées ici.

1.1.3 La contraction musculaire

Ce modèle est basé sur les observations microscopiques des années 50 montrant que la taille des filaments est constante tandis que le sarcomère se raccourcit de 30 % environ lors de la contraction. Au repos, la concentration cytosolique de calcium est maintenue faible par des pompes Ca^{2+} -ATPases stockant celui-ci dans le reticulum sarcoplasmique qui forme un réseau de tubules. Ainsi, en absence de calcium lié à la troponine, la tropomyosine reste en position fermée, et masque les sites de liaison à la myosine. Elle forme une sorte de verrou. Lors d'un influx nerveux, la dépolarisation de la membrane plasmique de la cellule musculaire se propage aux tubules transverses : des invaginations de la membrane plasmique au contact du reticulum endoplasmique (RE) et induit un relargage de calcium via des canaux Ca^{2+} . Celui-ci se lie à la troponine, la forme de cette protéine est modifiée et permet à la tropomyosine de s'écartier de sa position et d'exposer les sites de liaison. Ceci provoque le glissement des

filaments fins sur les filaments épais et la contraction en quelques millisecondes. On dit que les têtes de myosine marchent le long du filament d'actine (*figure 3*).

1.2 Plasticité musculaire : hypertrophie/atrophie

1.2.1 Généralités

Les muscles squelettiques sont composés d'une population hétérogène de fibres spécialisées. Chaque muscle a une proportion propre de fibres d'un type donné (Voytik *et al.* 1993). Sa taille et sa composition en fibres ne sont pas constantes au cours de la vie d'un individu mais subissent de profonds remaniements. Son extrême plasticité lui permet de s'adapter aux conditions physiologiques et pathologiques (Harridge 2007) : par exemple à l'activité contractile lors des exercices d'endurance et de résistance, à la disponibilité en nutriments et aux stress thermique et hypoxique (Chibalin *et al.* 2000; Fluck et Hoppeler 2003). Les différents types de fibres sont caractérisés en termes de force, vitesse de contraction et résistance. La classification des fibres est basée sur l'expression des différents types de chaînes lourdes de myosine qu'elles contiennent : type 1, types 2A, 2B, et 2X (Pette et Staron 2000).

1.2.2 Les différents types de fibres

Les fibres de type 1 sont dites « lentes » ou rouges pour leur contenu important en myoglobine, mitochondries et leur forte vascularisation. Elles sont caractérisées par leur métabolisme oxydatif prédominant, leur grande résistance à la fatigue et leur faible vitesse de contraction. Elles sont sollicitées dans le maintien de la posture (muscles du cou par exemple), qui exige une activité contractile prolongée et constante. Au niveau morphologique, ce sont des fibres de petit diamètre.

Les fibres de type 2B, à l'autre extrémité de l'échelle sont dites « rapides » et ont surtout un métabolisme glycolytique d'où leur apparence blanche (moins de mitochondries, innervation plus faible et haute teneur en glycogène) ; elles se contractent rapidement et sont plus fatigables. Elles ont un grand diamètre et sont surtout présentes dans les muscles des bras. Leurs caractéristiques les destinent aux mouvements volontaires qui nécessitent force et rapidité.

Les fibres 2A et 2X ont des caractéristiques métaboliques intermédiaires entre les types 1 et 2B (Zierath et Hawley 2004).

1.2.3 Facteurs affectant la composition et la taille des muscles

1.2.3.1 Généralités

Les muscles ont un grand potentiel d'adaptation par leur capacité à moduler leurs propriétés fonctionnelles et métaboliques en réponse aux changements environnementaux. Le tissu musculaire est très gourmand en énergie puisqu'il est responsable de 80 % de la demande en glucose et de 50 % de la dépense d'énergie (lors d'une activité domestique). Il a une fonction essentielle dans les mouvements volontaires permettant la locomotion, dans le maintien de la posture et dans la ventilation pulmonaire. La régulation de sa masse et de sa composition, qui détermine sa fonctionnalité, est donc primordiale. Elle est contrôlée par de nombreux facteurs listés ici.

1.2.3.2 Effets de l'activité physique

Le muscle est extrêmement sensible à la charge mécanique à laquelle il est soumis. La suppression de l'activité quotidienne résultant d'un alitement prolongé, de l'immobilisation d'un membre, d'une lésion de la moelle épinière, ou d'une exposition à la microgravité, provoque l'atrophie et l'affaiblissement des muscles. A l'inverse, la surcharge mécanique induite par des exercices de haute résistance accroît la taille et la force des muscles. Ces effets sont tout à fait spécifiques des muscles visés par l'inactivité ou la surcharge, ce qui démontre que la régulation de la taille musculaire ne dépend pas entièrement de facteurs systémiques tels que les hormones, mais implique aussi des signaux locaux (Harridge 2007). Cependant, les mécanismes par lesquels s'effectue la mécanotransduction et l'activation des voies hypertrophiques restent très mal définis et controversés (Spangenburg 2009). Les effets trophiques de l'exercice sont aussi dépendants de l'apport alimentaire. Pendant la phase de récupération après un exercice, et après une prise alimentaire, la synthèse protéique est augmentée au niveau du muscle. L'apport alimentaire seul accroît la synthèse protéique 2-3 heures après l'ingestion d'acides-amino, mais après un exercice de résistance la synthèse protéique peut rester élevée jusqu'à 72 heures (Tipton *et al.* 1999). Les processus de régulation qui contrôlent la synthèse protéique dans le muscle sont extrêmement complexes

(l'exercice modifie l'expression de plusieurs centaines de gènes dans le muscle). Certains de ces processus seront évoqués plus en détail par la suite.

1.2.3.3 L'Insulin-like Growth Factor-1

Ce facteur a fait l'objet de très nombreuses études pour son rôle dans l'hypertrophie musculaire. L'Insulin Like Growth Factor (IGF-1) a été originellement identifié comme le facteur responsable des actions anaboliques de l'hormone de croissance, mais son action s'est par la suite avérée beaucoup plus large. Il peut être produit localement par le muscle, et la perfusion d'IGF-1 directement dans le muscle induit une hypertrophie (Adams et McCue 1998). L'IGF-1 circulant ne semble par contre pas impliqué dans l'hypertrophie induite en réponse à l'exercice (DeVol *et al.* 1990).

Les effets de l'IGF-1 ont été largement établis *in vitro*. Ainsi, il induit une hypertrophie des myotubes humains (Semsarian *et al.* 1999). Rommel *et al.* ont montré que l'IGF-1 accroît la synthèse protéique via l'activation de la voie Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase (PI3K) - Akt (Protéine Kinase B). En aval, Akt induit l'activation d'au moins deux voies responsables de l'hypertrophie : la voie de mTOR, et la voie de la GSK3 (Rommel *et al.* 2001). mTOR est une kinase qui intègre les signaux provenant des facteurs de croissance, de la disponibilité en nutriments et en énergie, de la stimulation mécanique (Laplante et Sabatini 2009). L'activité de mTOR dans le muscle est clairement corrélée aux variations de masse musculaire (Bodine *et al.* 2001). mTOR est un régulateur de la synthèse protéique, qui agit à plusieurs niveaux pour faciliter la traduction protéique, notamment via ses effecteurs S6 kinase 1 (S6K1) et 4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1). De plus, Akt phosphoryle et inhibe la GSK3 (glycogen synthase kinase 3), levant ainsi l'inhibition de la traduction protéique induite par la phosphorylation GSK3-dépendante du facteur eIF2B (Rommel *et al.* 2001). Parallèlement, l'activation d'Akt induite par IGF-1 est capable de s'opposer aux effets des facteurs activateurs de protéolyse tels que la myostatine et les corticoïdes (voir ci-dessous) (Glass 2010).

1.2.3.4 La testostérone

Cette hormone stéroïde androgène a des effets hypertrophiques dose-dépendants bien connus. Son taux et celui de ses récepteurs sont augmentés par l'exercice, et le blocage de sa production supprime la réponse hypertrophique à un exercice de force (Kvorning *et al.* 2006).

Son mécanisme d'action n'est pas clairement établi : la testostérone pourrait agir en augmentant la production d'IGF-1, et ainsi promouvoir, outre la synthèse protéique, l'activation et la différenciation des cellules satellites (Urban *et al.* 1995). Ses effets semblent impliquer la stimulation de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules satellites, la prolifération de ces dernières, et leur fusion avec les fibres existantes, ce qui résulte en l'augmentation du nombre de noyaux et de la taille de ces fibres (Herbst et Bhasin 2004). En effet, une part de la croissance du muscle est due aux cellules satellites, cellules souches quiescentes présentes au niveau de la lame basale des myofibres, qui sont activées en réponse à une lésion ou un exercice de résistance hypertrophique. Leur activation par différents facteurs de croissance tels que l'IGF induit leur prolifération, leur différenciation en cellules précurseurs des muscles exprimant les différents MRF, et leur fusion avec les fibres existantes. Il a également été montré une contribution de cellules souches myéloïdes provenant de la moelle osseuse à la régénération musculaire (Ehrhardt et Morgan 2005).

1.2.3.5 La myostatine

La myostatine (ou GDF-8) a d'abord été identifiée comme un nouveau membre de la superfamille des TGF (Transforming Growth Factors) β , exprimé spécifiquement dans le muscle, et dont l'invalidation augmente la taille corporelle et la masse musculaire chez la souris (McPherron *et al.* 1997). A la suite de cette étude, le phénotype de races bovines « supermusclées » a pu être attribué à des mutations spontanées du gène de la myostatine, et son rôle de régulateur négatif de la masse musculaire a donc été confirmé (Grobet *et al.* 1997). La myostatine est une glycoprotéine de 375 acides-aminés spécifique du muscle, qui régule négativement la masse musculaire squelettique (Ji *et al.* 1998). La myostatine sécrétée circule dans le sang sous forme libre active ou inactive (propeptide), ou complexée à des protéines inhibitrices comme la follistatine qui régulent donc sa disponibilité. La myostatine se fixe sur les récepteurs à l'Activine (ActIIa et ActIIb) où elle déclenche le recrutement et la phosphorylation des co-récepteurs ALKs 4 et 5 (Activine receptor Like Kinases), induisant l'activation des facteurs de transcription SMAD (homologue chez les mammifères du gène de la Drosophile Mad : Mothers-against-decapentaplegic gene).

Durant les stades embryonnaires, la myostatine régule la prolifération et la différenciation des myoblastes (Thomas *et al.* 2000; Langley *et al.* 2002). La myostatine a un

effet opposé à celui de l'IGF-1 sur les cellules musculaires, et inhibe la voie Akt-mTOR (Amirouche *et al.* 2009; Trendelenburg *et al.* 2009). La surexpression de la myostatine ou son administration systémique dans différents modèles induit une fonte de la masse musculaire (Zimmers *et al.* 2002; Amirouche *et al.* 2009) ; au contraire, la délétion du gène chez des souris transgéniques provoque une augmentation spectaculaire de la masse musculaire par hyperplasie et hypertrophie, le poids de certains muscles étant multiplié par trois (McPherron *et al.* 1997). La myostatine est aussi considérée comme un inhibiteur de l'activation des cellules satellites qui permettent la régénération du muscle (Siriect *et al.* 2006). L'expression de la myostatine est diminuée par un exercice de résistance (Kim *et al.* 2005), ce qui contribue à la réponse hypertrophique.

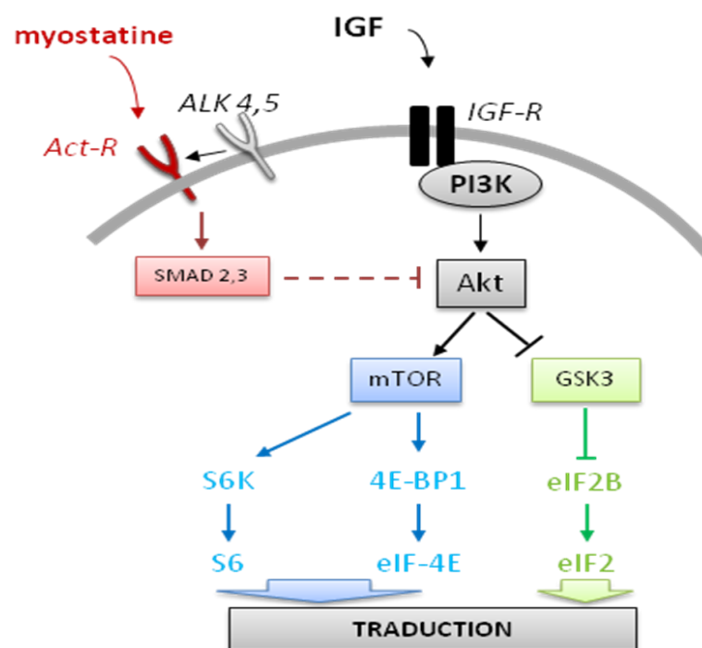


Figure 5 : Les voies de signalisation de l'IGF et de la myostatine ont des effets opposés. D'après Glass, 2010.

1.2.3.6 Les corticostéroïdes

La cortisone et son dérivé le cortisol sont les glucocorticoïdes sécrétés par les glandes surrénales, dans les conditions de stress. Les glucocorticoïdes naturels et les analogues synthétiques comme la dexaméthasone sont de puissants inducteurs de l'atrophie musculaire (Hasselgren 1999). Des taux élevés de glucocorticoïdes endogènes sont associés à diverses conditions induisant l'atrophie (Baehr *et al.*). L'atrophie musculaire est aussi un effet secondaire de l'administration de glucocorticoïdes de synthèse utilisés dans le traitement des

rhumatismes, de l'asthme, par exemple (Viguerie *et al.* 2011). L'effet atrophique des glucocorticoïdes dépend à la fois d'une augmentation de la protéolyse et d'une diminution de la protéosynthèse (Schakman *et al.* 2008). La diminution de la synthèse protéique peut être due à l'effet inhibiteur des glucocorticoïdes sur la voie Akt/mTOR (Wang *et al.* 2006). L'augmentation du catabolisme protéique dépend de l'activation du système ubiquitine-protéasome (Hasselgren 1999; Schakman *et al.* 2008). En particulier, le traitement de myotubes *in vitro* induit une activation de l'ubiquitine ligase MurF1 (Muscle-specific ring finger protein-1) et une dégradation sélective de la myosine (Clarke *et al.* 2007). Les effets atrophiques des glucocorticoïdes pourraient impliquer une augmentation de l'expression de la myostatine (Ma *et al.* 2003). De plus, une hyper-corticostéroïdémie accentue les effets atrophiques dus à une immobilisation (Fitts *et al.* 2007). Les glucocorticoïdes interagissent avec les cytokines à différents niveaux, puisque le TNF α augmente les niveaux de corticostéroïdes circulants, et qu'un antagoniste du récepteur aux glucocorticoïdes limite la protéolyse TNF α -induite au niveau du muscle (Zamir *et al.* 1992). Une partie des effets du TNF α serait donc médiée par les glucocorticoïdes (Hasselgren 1999).

1.2.3.7 Les MRF

Parmi les facteurs influant sur la composition et la taille des fibres musculaires en agissant au niveau de l'expression des gènes, les MRF (Facteurs de Régulation Myogénique) ont une importance particulière. Les MRF sont des facteurs de transcription de la famille bHLH (motif basic-Helix-loop-Helix) spécifiques du muscle. Ils sont au nombre de quatre : MyoD, Myf5, myogénine, et MRF4. Ils ont une structure caractéristique avec une région conservée « basic DNA-binding domain » de fixation au site « E-box » sur l'ADN, et un motif « Helix-Loop-Helix » nécessaire à leur hétérodimérisation impliquée dans leur mode d'action (Sabourin et Rudnicki 2000).

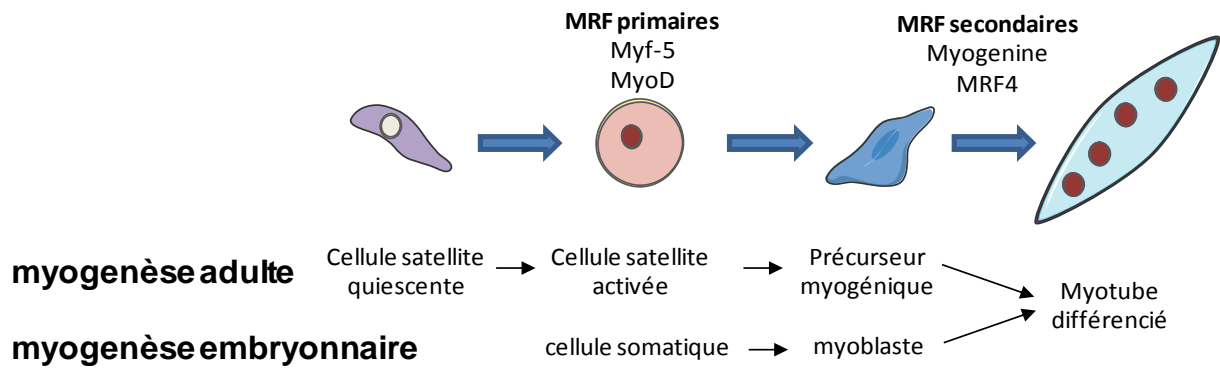


Figure 6 : Rôle des MRF dans la différenciation myogénique aux stades adulte et embryonnaire.
D'après Sabourin et Rudnicki, 2000.

Les MRF sont des acteurs cruciaux du développement du muscle squelettique. Ils contrôlent la spécification et la différenciation de la lignée musculaire aux stades embryonnaires. Ils sont aussi impliqués dans la différenciation des cellules satellites au cours de la régénération du muscle ou myogénèse adulte (*figure 6*). Ils ont d'abord été découverts pour leur capacité à convertir des fibroblastes en cellules myogéniques. On différencie les MRF primaires (MyoD et Myf-5), impliqués dans la détermination myogénique, des MRF secondaires (myogénine et MRF4) impliqués dans la différenciation myogénique. Ils sont surtout exprimés lors des stades embryonnaires (Parker *et al.* 1995). Chacun a un profil d'expression distinct dans le temps. Ils ont un rôle critique dans la formation de fibres musculaires fonctionnelles, démontré lors de nombreuses études d'inactivation génique ("Knock-Out" ou KO) (Sabourin et Rudnicki 2000). Les KO MyoD, Myf5 et MRF4 sont viables et ont des muscles normaux, du fait d'une compensation par les autres MRF (Rudnicki *et al.* 1993). Seule l'inactivation de la myogénine seule n'est pas compensée. Ainsi, les souris déficientes en myogénine meurent à la naissance par l'absence totale de fibres matures fonctionnelles, de même que les souris déficientes simultanément en MyoD et Myf-5, qui présentent une absence totale de tissu musculaire squelettique et de myoblastes. L'absence de myogénine entraîne un défaut dans la formation terminale des fibres (Gayraud-Morel *et al.* 2007). La croissance musculaire postnatale qui permet à un individu une large augmentation de masse musculaire jusqu'à l'âge adulte est contrôlée par les hormones thyroïdiennes et par l'innervation progressive des fibres musculaires qui déterminent l'apparition des formes rapides de MHC en remplacement des formes embryonnaires et néonatales. La myogénine participe aussi à la croissance générale des tissus puisque son inactivation après la naissance génère des souris 30% plus petites (Knapp *et al.* 2006). Les MRF exercent leurs rôles en régulant la transcription de gènes spécifiques du muscle (Arnold

et Braun 1996). L'expression de multiples protéines de l'appareil contractile est coordonnée par les MRF : MyoD régule, par exemple, positivement l'expression des chaînes légères de myosine 1 et 3 (Wentworth *et al.* 1991), de la troponine I (Lin *et al.* 1991), de la sous-unité α du récepteur à l'acétylcholine (Piette *et al.* 1990), de la créatine kinase (Weintraub *et al.* 1990).

A la naissance, l'expression des MRF diminue dans le muscle. A l'âge adulte, les MRF restent donc constitutivement exprimés mais à des niveaux plus faibles (Walters *et al.* 2000), sauf pour MRF4 qui reste à des niveaux élevés, suggérant un rôle fonctionnel à l'âge adulte tandis que son importance apparaît secondaire durant la myogénèse (Hughes *et al.* 1997). Même si cet aspect est encore controversé, ces facteurs pourraient continuer à jouer un rôle dans l'adaptation de la masse musculaire et de son phénotype à l'âge adulte (Hespel *et al.* 2001). Les MRF seraient régulés en réponse aux conditions environnementales et moduleraient ainsi l'expression d'une batterie de gènes spécifiques du muscle.

De nombreuses études se sont intéressées à ce second rôle des MRF : la détermination du phénotype musculaire et sa régulation à l'âge adulte. Les différents types de muscle ont un profil d'expression hétérogène des MRF. Ainsi, Myf5 et MRF4 ont une expression globalement constante dans tous les muscles, tandis que myogénine et MyoD sont fibres- et muscles- spécifiques (Voytik *et al.* 1993). Une étude de Hughes *et al.* (Hughes *et al.* 1993) fait état d'une distribution régionale des MRF selon le type de fibres : MyoD est surtout exprimé dans les fibres glycolytiques (associé aux myosines 2B et 2X) tandis que la myogénine est surtout accumulée dans les régions de fibres oxydatives. La surexpression de myogénine dans le muscle de souris transgéniques coïncide avec une activation des enzymes du métabolisme oxydatif comme la succinate synthase, tandis que les enzymes propres au métabolisme glycolytique (lactate déshydrogénase) sont relativement inhibées. MyoD et la myogénine sont donc associés à des phénotypes énergétiques opposés (Hughes *et al.* 1999). De plus, on sait qu'une stimulation électrique typique d'un muscle lent induit la phosphorylation de myoD sur son résidu T115 et que la surexpression de la forme mutée pour ce résidu induit un shift vers un phénotype rapide, même avec une stimulation électrique normale. Tous ces éléments suggèrent donc une implication dans la régulation du type de fibres à l'âge adulte mais aucune voie de signalisation n'a encore été mise en évidence.

Les MRF sont aussi impliqués dans les mécanismes trophiques (atrophie / hypertrophie). Leur expression augmente en cas d'atrophie induite par dénervation (Voytik *et al.* 1993). Au contraire, une activité électrique *per se*, même en absence d'innervation, permet de rétablir des niveaux de MRF normaux (Buonanno *et al.* 1992). En cas d'hypertrophie induite par stretching, la myogénine est augmentée provoquant un « shift » vers un phénotype lent dans les muscles rapides, tandis que MRF4 a tendance à augmenter dans les muscles lents. Au contraire, une atrophie induite par immobilisation induit une diminution de MRF4 dans les muscles rapides (Loughna et Brownson 1996). La myogénine est particulièrement impliquée dans la transition d'un phénotype rapide vers un phénotype lent relié aux conditions hypertrophiques, tandis que MyoD est augmenté en cas de dénervation (Ji *et al.* 1998; Ishido *et al.* 2004), et favorise le passage d'un phénotype lent à un phénotype rapide souvent relié à une atrophie musculaire (Sabbah *et al.* 1993).

1.2.3.8 Autres facteurs de transcription

L'implication d'autres facteurs de transcription dans la régulation de la masse musculaire a récemment été mise en évidence. Ainsi, JunB, qui fait partie des gènes précoces immédiats exprimés en réponse aux cytokines, aux facteurs de croissance, au stress, est capable de promouvoir la croissance musculaire, indépendamment de la voie Akt/mTOR. Son invalidation induit une atrophie musculaire, alors que sa surexpression induit une hypertrophie. L'action de JunB s'exerce à deux niveaux: il down-régule l'expression des ubiquitine-ligases Murf1 et atrogine-1 et diminue ainsi la protéolyse protéasome-dépendante, et il bloque l'expression de la myostatine (Raffaello *et al.* 2010).

Le facteur de transcription Srf (serum response factor) régule l'expression de gènes spécifiques du muscle, tels ceux codant pour les protéines sarcomériques. Il joue aussi un rôle dans l'hypertrophie induite par surcharge. Il a récemment été montré que le Srf produit par les myofibres lors d'une stimulation mécanique induit l'expression d'IL6 et IL4, qui sont sécrétées et, de manière paracrine provoquent respectivement la prolifération et la fusion des cellules satellites avec les myofibres. Ce processus induit, de manière Akt/mTOR indépendante, l'hypertrophie des myofibres (Guerci *et al.* 2012).

1.2.4 Voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie musculaire

1.2.4.1 mTOR

1.2.4.1.1 Généralités

TOR (Target Of Rapamycin) est une kinase qui intègre de nombreux signaux externes et internes, transmis par les facteurs de croissance, la disponibilité en nutriments, le statut énergétique et le statut redox de la cellule (Laplante et Sabatini 2009). En réponse, il phosphoryle de nombreuses cibles impliquées dans la progression du cycle cellulaire, la traduction de l'ARN, l'autophagie entre autres. TOR régule une myriade de processus comme la croissance cellulaire, la prolifération, la survie, la différenciation, et il est impliqué au niveau biologique dans la tumorigénèse, l'angiogénèse, la résistance à l'insuline, l'activation des lymphocytes T. TOR, identifié au début des années 90, est conservé des levures aux mammifères (45 % d'homologie entre les formes de mammifères et de levure) (Sabatini *et al.* 1994). Il a été d'abord défini comme la cible d'un macrolide bactérien extrait de *Streptomyces hygroscopicus*, aux propriétés antifongiques pour la levure et immunosuppressives chez les mammifères : la rapamycine (Heitman *et al.* 1991; Brown *et al.* 1994). La rapamycine fut donc un outil majeur dans l'exploration de la voie TOR.

1.2.4.1.2 Structure

mTOR (pour mammalian TOR) est une sérine-thréonine kinase de 289 kDa contenant un domaine catalytique en C-terminal caractéristique de la famille des PIKK. Juste en amont, on trouve le domaine FRB (FKBP-Rapamycin-Binding domain) dédié à la fixation du complexe que forme la rapamycine avec son récepteur intracellulaire FKBP12 (12-kDa FK506-binding protein), une prolyl-isomérase. La structure cristalline du domaine FRB a été déterminée (Choi *et al.* 1996). La mutation de l'arginine 2109 dans ce domaine bloque l'interaction avec un co-facteur, l'acide phosphatidique (Veverka *et al.* 2008).

De part et d'autre du domaine catalytique, on trouve deux domaines FAT qui interagissent entre eux et régulent les interactions protéine-protéine (Alarcon *et al.* 1999) et le domaine RD phosphorylé en réponse aux facteurs de croissance et aux acides aminés. Le domaine N-terminal est composé de motifs HEAT répétés, permettant l'interaction avec ses

partenaires privilégiés RAPTOR (Regulatory-Associated Protein of mTOR) ou RICTOR (Rapamycin Insensitive Companion of mTOR), et régulant sa localisation subcellulaire par interaction avec les membranes (Harris et Lawrence 2003).

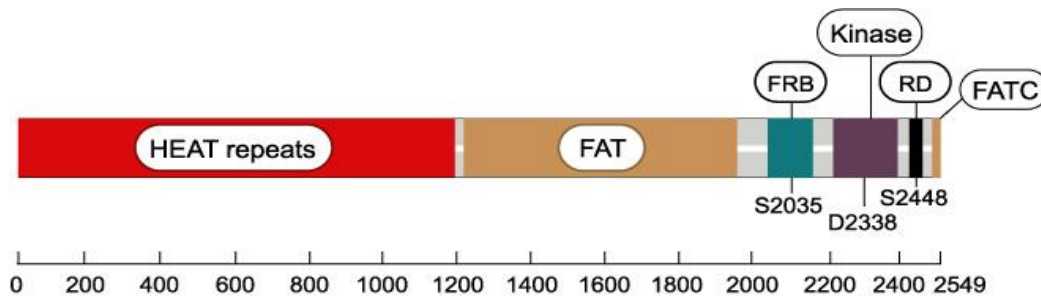


Figure 7: structure de la protéine mTOR.

1.2.4.1.3 Deux complexes distincts

Chez les mammifères, mTOR est un composant de deux complexes multiprotéiques : mTORC1 et mTORC2, de compositions différentes et agissant sur des substrats différents (Guertin et Sabatini 2007). Les deux complexes ont une localisation cytoplasmique et nucléaire, et sous l'action des acides aminés, mTORC1 se relocalise au niveau des endosomes où il interagit avec la petite protéine G Rheb (Rosner et Hengstschlager 2008; Sancak *et al.* 2008).

Ils ont en commun, en plus de la sous-unité catalytique mTOR, la protéine mLST8, à la fonction controversée (Guertin *et al.* 2006). DEPTOR est un inhibiteur des deux complexes dont la phosphorylation par mTOR et Akt induit la dégradation. Il se fixe directement sur mTOR au niveau du domaine C-terminal via son motif PDZ (Peterson *et al.* 2009). Le complexe mTORC1, découvert en 2002, est rapamycine-sensible. Il est caractérisé par la présence de la protéine RAPTOR, qui permet le recrutement spécifique de ses substrats. Il comprend aussi PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa), un autre inhibiteur qui se lie à mTOR et empêche l'accès au site catalytique selon son état de phosphorylation par Akt (Hara *et al.* 2002). Le complexe mTORC2, découvert en 2004, comprend les protéines RICTOR et mSin1 qui stabilisent le complexe et sont nécessaires pour la phosphorylation de Akt (Sarbasov *et al.* 2005; Frias *et al.* 2006), ainsi que Protor 1 (Protein observed with RICTOR-1) qui interagit avec RICTOR (Woo *et al.* 2007). Le complexe mTORC2, d'abord défini

comme « rapamycin-insensitive complex », est en fait inhibé par un traitement prolongé à la rapamycine.

Les deux complexes de mTOR sont essentiels au développement puisque l'invalidation génique de RAPTOR ou de RICTOR est létale (Murakami *et al.* 2004; Guertin *et al.* 2006). Par contre à l'âge adulte, mTORC1 a une fonction essentielle dans le maintien du muscle puisque les KO muscle-spécifiques sont dystrophiques, tandis que mTORC2 n'a pas de rôle apparent (Bentzinger *et al.* 2008). Les deux complexes sont activés en réponse aux signaux des facteurs de croissance, des mitogènes, et mTORC1 est en plus sensible à la disponibilité en acides aminés et en énergie.

1.2.4.1.4 Régulation de mTORC1

1.2.4.1.4.1 Le complexe TSC

mTORC1 est un point de contrôle central de la synthèse protéique. Il est régulé par de nombreux signaux en amont qui convergent vers les composants du complexe ou vers son inhibiteur endogène TSC (Tuberous Sclerosis Complex), un anti-oncogène (Laplante et Sabatini 2009).

Le complexe TSC est composé de deux sous-unités TSC1 et TSC2. TSC2 a une activité catalytique GAP (GTPase Activating Protein) vis-à-vis de la GTPase Rheb, qu'il convertit sous sa forme inactive GDP-liée, empêchant ainsi son effet activateur sur mTORC1 (Manning et Cantley 2003). TSC joue donc un rôle intégrateur de nombreux signaux en amont de mTOR.

1.2.4.1.4.2 Le statut énergétique

La diminution de l'ATP cytosolique augmente notablement la concentration d'Adénosine Mono-Phosphate (AMP) et induit l'activation de l'AMP-Kinase (AMPK) qui inhibe fortement la synthèse protéique (Bolster *et al.* 2002). L'AMPK sert donc de senseur

énergétique pour mTOR : l'augmentation du ratio AMP/ATP induit la phosphorylation AMPK-dépendante de TSC2 sur deux sites spécifiques, et aboutit à l'inhibition de mTOR et à la phosphorylation de son partenaire RAPTOR, induisant sa fixation à une protéine 14-3-3 (Ma et Blenis 2009). GSK3 β peut aussi inhiber mTORC1 par phosphorylation activatrice de TSC2, en partenariat avec l'AMPK, ce qui suggère que GSK3 β et AMPK coopèrent pour activer TSC de manière coordonnée (Inoki *et al.* 2006).

1.2.4.1.4.3 La disponibilité en nutriments

Le groupe de petites protéines G Rag joue un rôle de senseur de la disponibilité en nutriments : en présence d'acides aminés, le complexe Rag, sous forme GTP-liée active, interagit directement avec mTORC1 et induit sa relocalisation vers une fraction membranaire au contact de son activateur Rheb. L'expression d'un mutant constitutivement actif de RagB rend la voie résistante à l'appauvrissement en acides aminés (Sancak *et al.* 2008). La PI3K de classe 3 Vps34 joue aussi un rôle dans la détection des acides aminés, même si le mécanisme exact est encore inconnu (Byfield *et al.* 2005). Dans les deux cas, la PLD et la synthèse de PA pourraient être impliquées dans la réponse aux acides aminés (Sun et Chen 2008).

La disponibilité en nutriments et en énergie sont donc des éléments-clés limitants pour l'activation de mTORC1. En cas de pénurie, les signaux activateurs tels que Akt deviennent inopérants (Hahn-Windgassen *et al.* 2005).

1.2.4.1.4.4 Le stress hypoxique

En réponse à un manque d'oxygène, les cellules limitent le métabolisme dispendieux en énergie, ce qui inclut la synthèse protéique. Cette réponse rapide est médiée par le facteur de transcription HIF1 α (Hypoxia-Inducible transcription Factor) qui est stabilisé en condition hypoxique : il induit la synthèse de REDD1 qui active TSC2 en le libérant de son interaction avec la protéine 14-3-3, et conduit à l'inactivation de mTORC1 (DeYoung *et al.* 2008).

1.2.4.1.4.5 La voie PI3K-Akt

La kinase Akt est un activateur majeur de mTORC1, qu'elle active par deux voies : elle phosphoryle TSC2 (de manière directe ou AMPK-dépendante), créant ainsi un site de fixation pour 14-3-3 et la dissociation du complexe Rheb/TSC, et elle phosphoryle PRAS 40, l'inhibiteur de mTOR connu pour rentrer en compétition avec les substrats S6K1 et 4E-BP1, ce qui induit son départ du complexe mTORC1 (Ma et Blenis 2009) et autorise l'activité catalytique de mTORC1.

1.2.4.1.4.6 La voie ERK

La voie mitogène Ras-ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) stimule mTORC1 en inhibant le complexe TSC via la phosphorylation de TSC2 en position ser664, ce qui induit sa dissociation, ou via la phosphorylation par la kinase Ribosomal protein S6 Kinase (RSK) en position ser1798. RSK peut aussi activer mTOR en phosphorylant directement son activateur RAPTOR (Ma et Blenis 2009).

1.2.4.1.4.7 Les cytokines

Certaines cytokines comme l'interféron γ et le TNF α peuvent moduler mTORC1. Ainsi, le TNF α est impliqué dans la survie des ostéoclastes (Glantschnig *et al.* 2003), il interfère avec la voie de l'insuline dans les fibroblastes (Ozes *et al.* 2001) et active l'angiogénèse via la production de VEGF (Lee *et al.* 2007), dans tous ces cas de manière mTOR-dépendante. Les effets du TNF α sur mTOR passent par les deux isoformes d'IKK, une kinase cruciale dans le système NF κ B. IKK β induit une phosphorylation inhibitrice de TSC1, et IKK α active directement mTORC1 (Dan *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007).

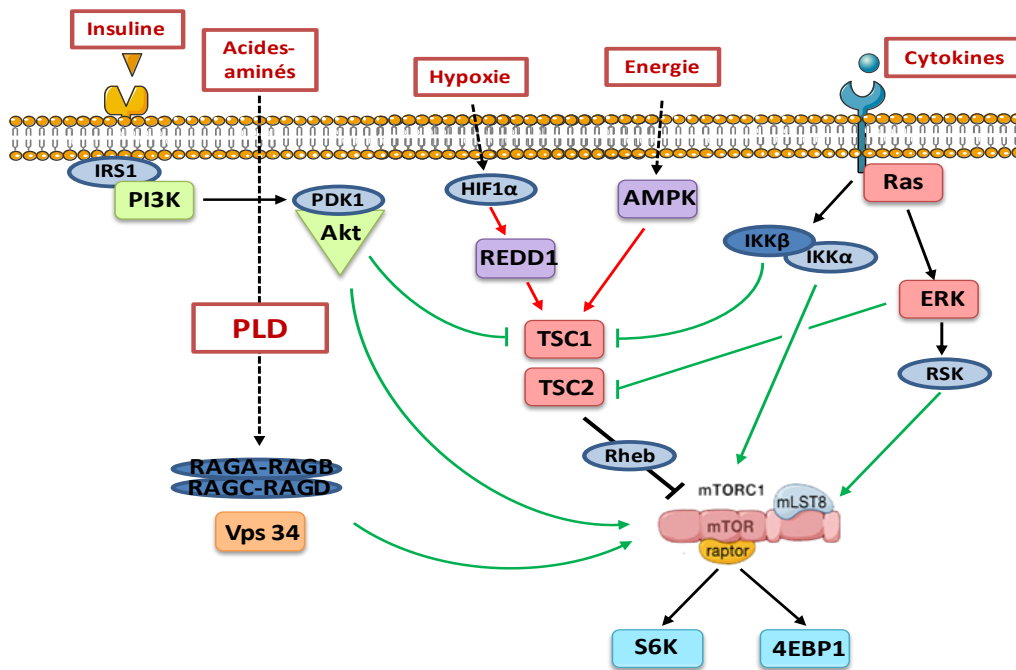


Figure 8 : Les voies de régulation du complexe mTORC1.
D'après Ma et Blénis, 2009

1.2.4.1.5 Cibles de mTORC1

mTORC1 régule positivement la synthèse protéique en stimulant la machinerie traductionnelle via deux effecteurs privilégiés : les S6K (40S ribosomal protein S6 kinases) et 4E-BP1.

1.2.4.1.5.1 4E-BP1

La prise en charge de la coiffe 5' des ARNm est l'étape limitante de la traduction : elle permet un contrôle rapide de la synthèse des protéines. Dans ce contexte, le complexe tripartite eIF4F composé de 4E, 4G, 4A, prend en charge la tête guanosine méthylée des ARNm. mTORC1 phosphoryle 4E-BP1, un inhibiteur, qui sous forme hypophosphorylée est lié à eIF4E et bloque ainsi, par compétition, la fixation de 4G et le recrutement de la petite sous-unité ribosomale 40s qui s'ensuit (Gingras *et al.* 2001). mTORC1 active également son partenaire eIF4G par phosphorylation. Le résultat de l'action de mTORC1 est une activation de l'initiation de la traduction (*figure 9*).

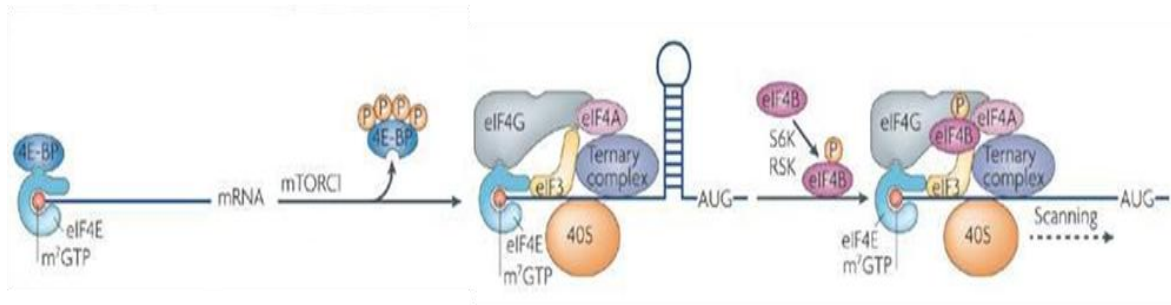


Figure 9 : Mécanisme de contrôle de l'initiation de la traduction des ARNm par le complexe eIF4F.

mTORC1 phosphoryle directement 4EBP1 ce qui a pour effet de libérer eIF4E, et de permettre la prise en charge de la coiffe 5' et le recrutement du complexe d'initiation de la traduction des ARNm composé de eIF4E, 4G, 4A, eIF3 et de la sous unité ribosomale 40s. D'après Ma et Blénis, 2009

1.2.4.1.5.2 S6K

L'autre cible privilégiée de mTORC1 est la kinase de la protéine ribosomale S6 (p70S6K) qui présente deux isoformes, S6K1 et S6K2. mTORC1 active S6K1 par phosphorylation conjointe avec PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1) (Pende *et al.* 2004). La régulation de S6K1 dépend aussi de la régulation par mTORC1 de la phosphatase PP2A: la phosphorylation de PP2A supprimerait son action inhibitrice sur S6K1, et favoriserait l'état phosphorylé de cette dernière (Peterson *et al.* 1999). S6K1 est un effecteur régulant l'activité de facteurs-clés dans l'initiation de la traduction et activant la biogénèse des ribosomes (Schalm *et al.* 2005). Elle est impliquée dans la croissance cellulaire (Ohanna *et al.* 2005). Les deux isoformes ont des fonctions redondantes mais sont primordiales dans le développement, puisque le double KO induit une forte mortalité périnatale et une diminution de la taille des cellules (Shima *et al.* 1998).

La première cible établie de S6K1 fut la protéine ribosomale S6 (RPS6) qui est impliquée dans la biogénèse des ribosomes. Mais l'étude des souris S6K1-KO a démontré plus tard l'influence limitée de S6K1 sur son niveau de phosphorylation. S6K phosphoryle aussi plusieurs éléments du complexe eIF4F qui permet la prise en charge de la coiffe 5' guanosine des ARNm et leur adressage vers le ribosome. S6K stimule l'assemblage du complexe et le recrutement de la sous-unité ribosomale 40 S. Il active directement eIF4B par phosphorylation sur la serine 422, ce qui aboutit à son recrutement au niveau du complexe eIF4F par liaison avec eIF4A (RSK peut elle aussi directement phosphoryler eIF4B) (Ma et Blénis 2009). S6K1 phosphoryle aussi PDCD4 (Programmed Cell Death protein 4), un inhibiteur de l'activité hélicase de eIF4A qui est ainsi dégradé via l'ubiquitine ligase β -TrCP (Dorrello *et al.* 2006).

S6K1 se lie à eIF3, le complexe de préinitiation, sous sa forme déphosphorylée. Sa phosphorylation par mTORC1 libère eIF3 et lui permet d'initier la traduction.

1.2.4.1.5.3 Autres cibles de mTORC1

S6K phosphoryle aussi SKAR (S6K1 Aly/REF-like target) qui permet le recrutement des ARNm nouvellement synthétisés, et CBP80 qui participe au complexe de coiffe. Le facteur SF2/ASF qui contrôle l'épissage des ARN, permet aussi le recrutement de mTORC1 sur les ARN (Ma et Blenis 2009). mTORC1 active donc la synthèse protéique requise lors de la croissance ou de la prolifération par deux voies : via la phosphorylation inhibitrice de 4E-BP1/2/3 libérant eIF4E, un facteur d'initiation de la traduction des ARNm prenant en charge la coiffe guanosine 5' (Richter et Sonenberg 2005), et la phosphorylation activatrice de S6K1 qui stimule à son tour la synthèse des ARNs via SKAR, l'élongation via eEF2K (eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase), augmente le potentiel de la machinerie traductionnelle par la phosphorylation de la protéine S6 qui active la traduction d'ARN ribosomiaux, et stimule la synthèse d'ARN ribosomiaux via le facteur de transcription TIF 1A lui-même activé par l'inhibition mTORC1-dépendante de PP2A.

Récemment, des études ont montré l'existence de fonctions de mTORC1 résistantes à la rapamycine, telles que la phosphorylation de sites spécifiques de 4E-BP1 et l'inhibition de l'autophagie, grâce à l'utilisation de l'interférence de l'ARN et d'inhibiteurs comme la torine, inhibiteur du site catalytique, compétitif pour l'ATP (Thoreen *et al.* 2009). L'autophagie est un processus catabolique important pour la dégradation des organites et le turnover des protéines, par exemple lorsque la disponibilité en nutriments est insuffisante (Codogno et Meijer 2005). mTORC1 inhibe l'autophagie en phosphorylant le complexe ULK1-ATG13-FIP200 (Ganley *et al.* 2009).

1.2.4.1.6 Régulation et Cibles de mTORC2

La régulation et les cibles de mTORC2 sont beaucoup moins connues que celles de mTORC1. mTORC2 est également activé en réponse aux facteurs de croissance et à

l'insuline, en aval de la voie PI3K/PTEN (Phosphatase and TENsin homolog). mTORC2 influe sur la survie et le cycle cellulaires en réponse aux facteurs de croissance, en modulant Akt et la kinase SGK1 (Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase) (Jacinto *et al.* 2004; Sarbassov *et al.* 2006). mTORC2 a été identifié comme la kinase PDK2 activatrice de Akt par phosphorylation du résidu sérine 473. Cependant, son importance est discutée, sur la base de l'observation que dans les muscles de souris RICTOR-KO, Akt est pleinement phosphorylé (Bentzinger *et al.* 2008). Le rôle de mTORC2 en tant que PDK2 serait variable selon les types cellulaires et l'étape de développement. Un autre substrat de mTORC2 identifié est la Protéine Kinase $C\alpha$, dont la phosphorylation conditionne l'activité et la stabilité (Huang *et al.* 2009).

La voie mTOR constitue un réseau dense : il existe des voies de rétrocontrôle, par exemple mTORC2 active directement Akt tandis que le complexe mTORC1 régule négativement Akt en inhibant, en amont les protéines Insulin Receptor Substrate 1/2 (IRS1/2) (Zhang *et al.* 2007). Ceci explique les effets limités de l'utilisation de la rapamycine pour traiter le cancer (Sabatini 2006), ou le potentiel de croissance limité de tumeurs surexprimant mTORC1 (Zhang *et al.* 2007) (*figure 10*).

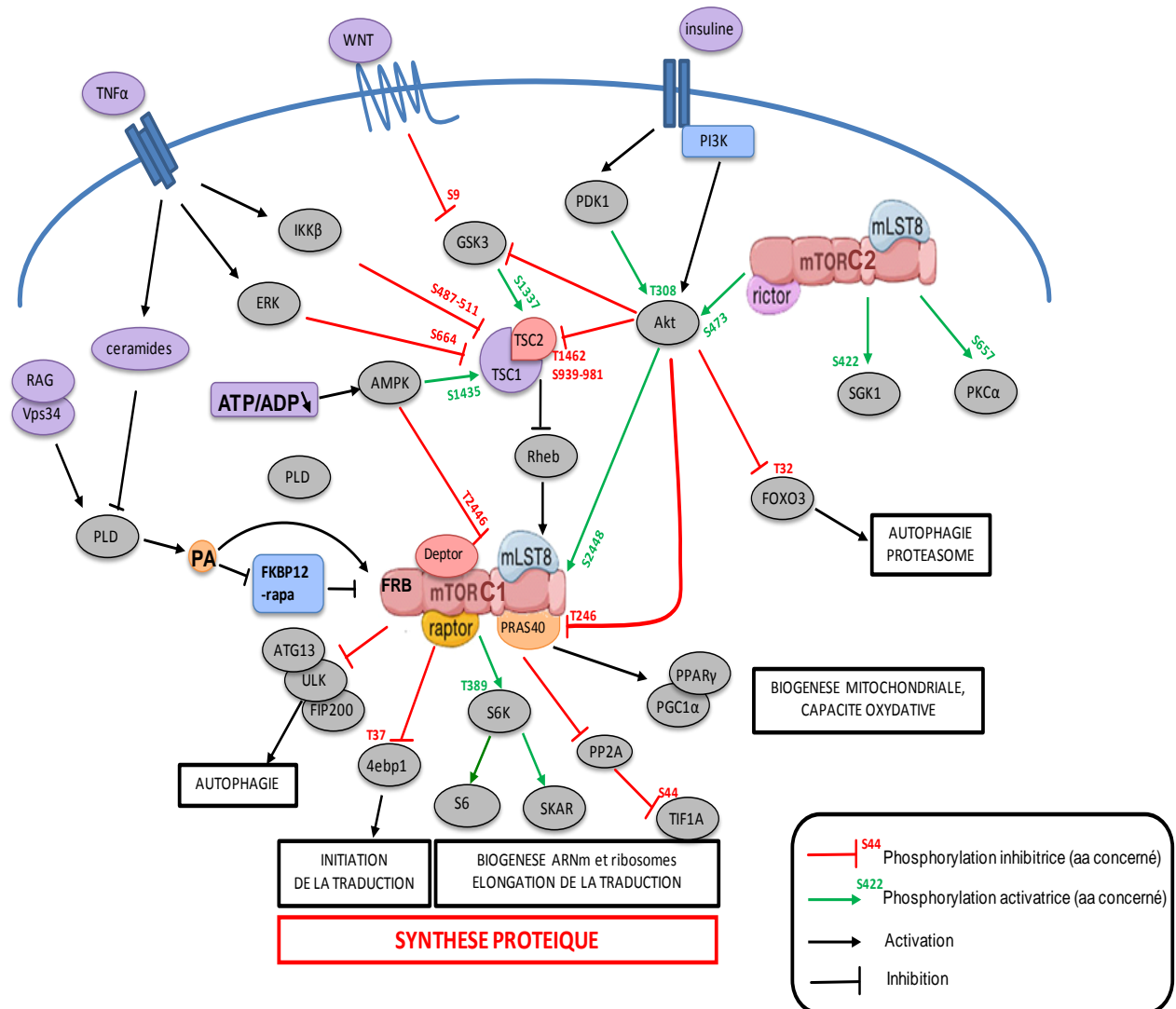


Figure 10 : La voie de signalisation mTOR : un réseau complexe de phosphorylations.

mTOR se trouve à un carrefour de signalisation : il est régulé soit directement par (dé)phosphorylation, soit par l'activité GTPase du complexe TSC, son inhibiteur naturel. Il intègre de nombreux signaux environnementaux et, en réponse, il régule diverses fonctions, surtout par son activité kinase. Dans ce schéma, les phosphorylations activatrices sont représentées par des flèches vertes avec le résidu cible concerné et les phosphorylations inhibitrices en rouge. Les autres régulations sont représentées en noir. D'après Laplante et Sabatini, 2009

1.2.4.1.7 Rôle de la voie mTOR au niveau musculaire

La voie mTOR est un régulateur majeur de l'équilibre atrophie – hypertrophie, grâce à son rôle de contrôle des voies de synthèse et dégradation protéique dans les cellules musculaires. Ainsi dans de nombreux cas (activité physique, surexpression d'Akt, stimulation électrique, étirement), on observe une activation de mTOR et de ses substrats S6K et 4E-BP1 (Laplante et Sabatini 2009).

L'effet hypertrophique d'Akt, et de mTORC1/S6K1 en aval, a d'abord été mis en évidence dans des myotubes C2C12, puis chez des souris transgéniques surexprimant un mutant constitutivement actif. A l'inverse, l'expression d'un mutant dominant-négatif de Akt et la surexpression de TSC1 induisaient une atrophie (Rommel *et al.* 2001; Lai *et al.* 2004; Wan *et al.* 2006). De la même manière, les souris KO pour S6K1, le principal substrat de mTORC1 présentent une forte diminution de la taille des fibres musculaires (Ohanna *et al.* 2005).

L'activation de mTOR, S6K et 4E-BP1 a aussi été démontrée au cours de l'activité physique chez l'homme, et chez des souris soumises à un étirement passif ou à une stimulation électrique des muscles (Baar et Esser 1999; Leger *et al.* 2006). Au contraire, une atrophie induite par désentraînement ou dénervation se caractérise par une déphosphorylation des composants de la voie mTOR et une augmentation du complexe 4E-BP1-eIF4E (Bodine *et al.* 2001; Hornberger *et al.* 2001).

Atherton *et al.* et Leger *et al.* sont allés plus loin puisqu'ils ont montré qu'un entraînement de résistance induit une hypertrophie liée à une augmentation de la synthèse protéique Akt/mTOR-dépendante (Atherton *et al.* 2005; Leger *et al.* 2006). Au contraire, un entraînement d'endurance n'induit pas d'hypertrophie mais augmente la fonction mitochondriale-oxydative du muscle (correspondant à la conversion des fibres vers le type 1 oxydatif) qui est aussi contrôlée par mTOR (Cunningham *et al.* 2007). Dans le cadre de la sarcopénie, on observe en parallèle une altération de la voie Akt-mTOR et de la réponse à l'exercice (Haddad et Adams 2006).

Les diverses voies de contrôle de mTOR sont présentes au niveau du muscle : le traitement de rats avec un activateur de l'AMPK (AICAR), simulant une diminution de la disponibilité en ATP, provoque une atrophie (Cheng *et al.* 2004), et une supplémentation en acides aminés compense les effets atrophiques d'une immobilisation (Fitts *et al.* 2007).

Le travail de Hornberger *et al.*, a permis de mettre en évidence le rôle majeur de la PLD dans la conversion du mécanisme contractile en signal anabolique dans le muscle. La PLD située au niveau de la bande Z joue ici le rôle de senseur mécanique, et active mTOR via la synthèse d'acide phosphatidique (Hornberger *et al.* 2004; Hornberger *et al.* 2006).

1.2.4.1.8 mTOR et Pathologies

mTOR est impliqué dans le diabète et le cancer, où il est considéré comme un oncogène (Guertin et Sabatini 2007). Une hyperactivation de mTOR (causée en général par une mutation de ses inhibiteurs naturels tels que PTEN et TSC) est identifiée dans de nombreux cancers (Inoki *et al.* 2005). La rapamycine, son inhibiteur historique, ou des analogues, sont utilisés au niveau clinique comme immunosupresseurs pour traiter les suites d'une transplantation d'organe, comme inhibiteurs de la prolifération en chimiothérapie anti-cancéreuse, et pour empêcher la resténose après une angioplastie (Garza *et al.* 2002; Odorico et Sollinger 2002; Huang et Houghton 2003).

Cependant mTORC1 montre aussi dans certains cas des propriétés antitumorales (Manning *et al.* 2005), puisque sa surexpression chez des patients TSC^{-/-} est associée à un phénotype bénin attribué à l'inhibition de la voie PI3K-Akt et à la limitation de la prolifération et survie des cellules tumorales qui en découle (d'où l'intérêt de rétablir une voie mTORC1 fonctionnelle dans ces cas). De plus, son inhibition grâce à l'inhibiteur endogène DEPTOR favorise un profil agressif dans certains types de myélomes (Peterson *et al.* 2009).

1.2.4.2 La Phospholipase D

Parmi les facteurs régulateurs de la voie de signalisation de mTOR récemment identifiés, l'acide phosphatidique (PA) produit par l'action de la PLD, présente un intérêt tout particulier dans le contexte de notre étude. En effet, la PLD est nécessaire à la différenciation myogénique (Komati *et al.* 2005; Mebarek *et al.* 2007; Yoon et Chen 2008) et cette fonction de la PLD dépend de l'activation de mTOR (Jaafar *et al.* 2011). Il a par ailleurs été montré que l'activation de mTOR induite dans le tissu musculaire par une stimulation mécanique implique l'activation de la PLD (O'Neil *et al.* 2009). La voie de mTOR jouant un rôle majeur dans la régulation du tissu musculaire, une influence importante de la PLD dans ce tissu est à envisager.

1.2.4.2.1 Généralités

La PLD est une phosphodiesterase qui clive la liaison phosphodiester distale des glycérophospholipides, en libérant l'acide phosphatidique d'une part, et un alcool polaire d'autre part. Clonée à la fin des années 90, elle est présente chez les plantes, les bactéries, les levures et les vertébrés (Ponting et Kerr 1996). L'observation que la PLD est rapidement activée par des stimuli extracellulaires a motivé de nombreuses études de son rôle dans la transduction du signal en réponse à des agonistes variés (Bocckino *et al.* 1987) comme les cytokines, les hormones, les facteurs de croissance (Oude Weernink *et al.* 2007). Elle est impliquée dans de nombreuses fonctions, telles que le trafic vésiculaire, la sécrétion, la réorganisation du cytosquelette, et dans les phénomènes de migration, survie et prolifération cellulaires (Jenkins et Frohman 2005).

1.2.4.2.2 *Activité catalytique et rôle du PA*

Chez les mammifères, la PLD hydrolyse préférentiellement la Phosphatidylcholine, composant majoritaire de la membrane plasmique. Son produit PA est un second messager intracellulaire important (*figure 11*). Elle peut également catalyser une réaction de transphosphatidylation, c'est à dire de transfert du groupement phosphatidyl vers un alcool accepteur : le phosphatidyl-alcool ainsi formé est stable, et peut servir de marqueur de l'activité enzymatique après addition au milieu d'un alcool primaire (éthanol ou butanol-1) (Yanase *et al.* 2010). Les effets de la PLD passent par ceux de son produit PA qui a une large gamme de cibles : des protéines kinases comme PKC ξ , des lipides kinases comme la PI4P-5 kinase (Cockcroft 2009), la Phospholipase C (Litosch 2003), les Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) (Hordijk *et al.* 1994; Wakelam *et al.* 2010), etc. Le PA peut être métabolisé en d'autres composés bioactifs (diacylglycérol, acide lysophosphatidique) auxquels on peut attribuer une partie des effets de la PLD (Jenkins et Frohman 2005).

1.2.4.2.3 *Structure*

La PLD est largement répandue dans tous les tissus des mammifères. On trouve deux isoformes, PLD1 (120 kDa) et PLD2 (102 kDa), qui partagent 51% d'homologie de séquence. PLD2 ne possède pas une région boucle de 116 acides aminés présente dans PLD1 et exerçant une régulation négative. Il existe deux variants d'épissage pour chaque isoforme (Hammond *et al.* 1997). La PLD fait partie d'une superfamille d'enzymes homologues (Exton 1997) caractérisée par la présence dans leur séquence de deux motifs HKD (HXK(X)4D) conservés

qui s'associent pour former le site catalytique (Xie *et al.* 2000). Les deux isoformes de PLD ont aussi des domaines conservés Phox (PX) et Pleckstrin Homology (PH) à leurs extrémités N-terminales (Hodgkin *et al.* 2000). Ces domaines médient la fixation des phosphoinositides et régulent ainsi la localisation des PLD (*figure 11*) (Du *et al.* 2003).

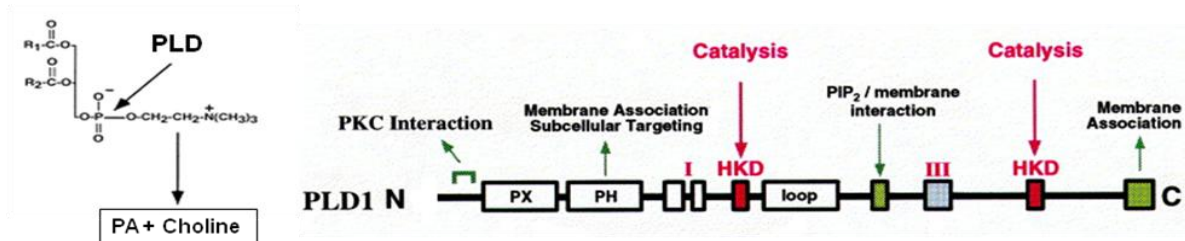


Figure 11 : Activité enzymatique et structure de la phospholipase D.

A gauche, la figure représente la réaction catalysée par la phospholipase D qui hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique + choline. A droite, la structure primaire de l'enzyme est détaillée. D'après Frohman *et al.*, 1999.

1.2.4.2.4 Localisation subcellulaire

Les deux isoformes ont une distribution subcellulaire complexe liée à leurs spécificités fonctionnelles: PLD2 est majoritairement présente dans les rafts de la membrane plasmique (Czarny *et al.* 1999) où elle participe à l'endocytose et au recyclage des récepteurs membranaires (Koch *et al.* 2006), tandis que PLD1 est périnucléaire et se répartit entre le Golgi, le RE et les endosomes tardifs (Hughes et Parker 2001). Son activation se traduit par une translocation au niveau de la membrane plasmique (Brown *et al.* 1998).

1.2.4.2.5 Régulation

L'isoforme PLD1 a une activité basale faible et est fortement activable, au contraire de PLD2 qui a une forte activité basale et montre une faible réponse aux stimuli. Les deux isoformes sont régulées par interactions directes avec de multiples protéines ou par la disponibilité du PIP2 produit par la PIP5K et hydrolysé par PTEN, et qui est leur cofacteur indispensable (Pertile *et al.* 1995; Alvarez-Breckenridge *et al.* 2007; Oude Weernink *et al.* 2007). La fixation d'agonistes sur les récepteurs membranaires de type tyrosine kinase (EGFR, PDGFR) aboutit à l'activation de la voie Ras/Ral, et en aval, de la PLD (Voss *et al.* 1999; Lucas *et al.* 2000). D'autres récepteurs mènent au recrutement de petites protéines G

des familles Rho (Bowman *et al.* 1993) ou ARF (ADP Ribosylation Factor) (Brown *et al.* 1993), et de la PKC, qui activent synergiquement PLD1 (Henage *et al.* 2006). L'isoforme 2 est moins sensible à l'activation par les petites protéines G Rho et ARF (Chen et Exton 2004), mais elle est activée par les acides gras insaturés comme l'oléate (Kim *et al.* 1999). De nombreux modulateurs naturels de l'activité PLD sont décrits dans la littérature, dont le resvératrol (Tou et Urbizo 2001). Les céramides sont une autre classe d'inhibiteurs de la PLD. Les céramides exogènes ou issus de l'action des sphingomyélinases inhibent l'activité PLD à différents niveaux : ils interagissent spécifiquement avec la PLD à son site catalytique, s'opposent à la translocation membranaire des protéines G activatrices et de la PKC (Abousalham *et al.* 1997), et inhibent l'expression de PLD1 (Venable *et al.* 1996). Au contraire, la sphingosine et la Sphingosine-1-phosphate (S1P) l'activent (Spiegel et Milstien 1996). Les céramides favorisent aussi la conversion du PA en DAG en stimulant la phosphatidate phosphohydrolase et en inhibant la DAG kinase. Le turn-over des sphingolipides régule donc les effets de la PLD à plusieurs niveaux (Brindley *et al.* 1996).

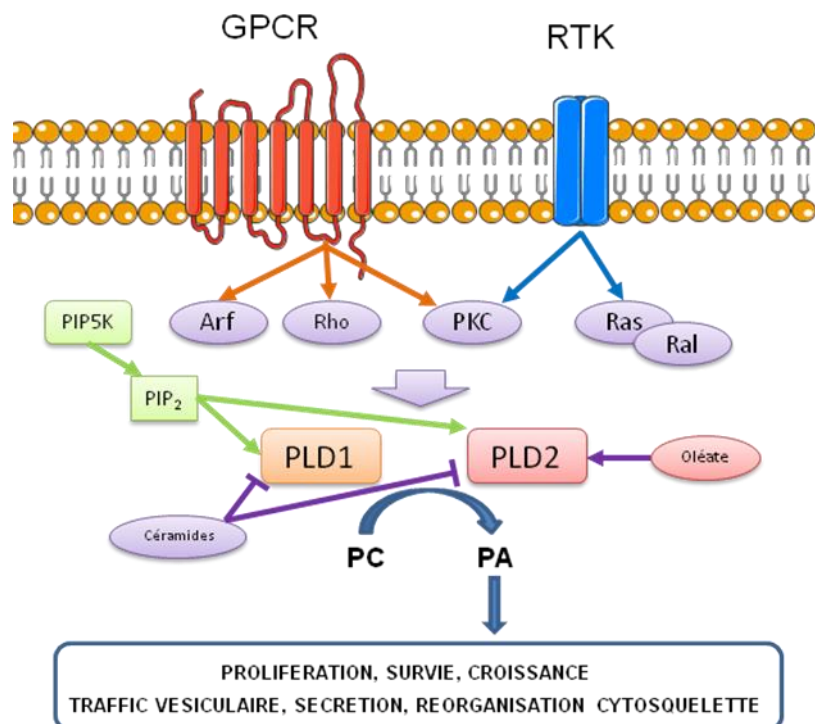


Figure 12 : Les différents modulateurs de la PLD.

La phospholipase D est activée par deux voies de signalisation privilégiées en réponse à des stimuli extracellulaires : la voie des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) activant en aval des protéines telles que Rho et Arf, et la voie des récepteurs tyrosines kinases (RTK) qui active Ras. La protéine kinase C (PKC) est activée en réponse à ces deux voies. *D'après Oude Weernink et al, 2007*

1.2.4.2.6 Rôles de la PLD

1.2.4.2.6.1 Rôle Général

La PLD participe à la réponse immune en régulant la migration, l'adhésion, la phagocytose et la synthèse des espèces réactives de l'oxygène dans les leukocytes (Iyer *et al.* 2006; Chang *et al.* 2011; Norton *et al.* 2011). Elle participe à l'activation plaquettaire (O'Lunaigh *et al.* 2002). C'est aussi un régulateur de la fonction du myocarde où elle participe au processus contractile (Park *et al.* 2000) et favorise l'hypertrophie (Dhalla *et al.* 1997). Elle joue un rôle dans l'exocytose de neurotransmetteurs au niveau des jonctions neuronales (Humeau *et al.* 2001) et dans la neurotransmission par l'angiotensine 2 (Sadoshima et Izumo 1993). La PLD est en outre un oncogène impliqué dans la migration des cellules cancéreuses et la progression tumorale (Kam et Exton 2004). Elle est augmentée dans de nombreux cancers (Foster et Xu 2003).

1.2.4.2.6.2 Au niveau musculaire

La PLD participe à divers processus au niveau musculaire. Elle est impliquée dans la régulation de la synthèse des protéines et de l'ADN dans des myoblastes C2C12 (Morrison *et al.* 1995). La PLD est nécessaire à la différenciation myogénique des cellules L6 induite par l'arginine-vasopressine ou les esters de phorbol. Son activation prolongée Rho- ou PKC-dépendante induit la formation de fibres de stress. Sa translocation au niveau de ces fibres a été mise en évidence par une sonde fluorescente liant le PA (Komati *et al.* 2004; Komati *et al.* 2005). Il a récemment été montré que l'effet pro-myogénique de la PLD implique l'activation de mTORC2 (Jaafar *et al.* 2011). De manière intéressante, les deux isoformes de PLD sont inhibées par la liaison de l'actinine et de l'actine G, et stimulées par la fixation aux microfilaments d'actine (Park *et al.* 2000; Kusner *et al.* 2002). L'état de polymérisation du cytosquelette d'actine régule donc l'activité de la PLD dans les cellules musculaires.

1.2.4.2.6.3 Activation de la voie mTOR

Le PA active directement mTORC1 et mTORC2 par fixation sur le site spécifique FRB, en compétition avec le complexe rapamycine-FKBP12 (Veverka *et al.* 2008). L'effet activateur rapamycine-sensible du PA exogène a d'abord été mis en évidence sur deux effecteurs de mTORC1, S6K et 4E-BP1 (Fang *et al.* 2001). L'idée d'une action de PA sur mTOR a été renforcée par la phosphorylation de S6K sous l'effet de la surexpression des deux isoformes de PLD dans plusieurs modèles cellulaires (Chen *et al.* 2005). Le PA est nécessaire à la stabilisation des deux complexes de mTOR et montre une plus grande affinité pour mTORC1 (Toschi *et al.* 2009). La PLD est capable de stimuler l'activité kinase des deux complexes de mTOR (Foster 2009).

Le PA conférerait à mTOR une résistance à la rapamycine. Ainsi, les cellules cancéreuses à forte activité PLD sont résistantes à la rapamycine (Chen *et al.* 2003). L'activation de mTOR par la PLD serait liée à la voie PI3K-Akt puisque l'inhibiteur de PI3K LY294002 inhibe la phosphorylation de S6K induite par la PLD (Hui *et al.* 2004). De plus, la petite protéine G Rheb, qui est activée via l'inhibition de TSC1/2 par Akt, est aussi un activateur de la PLD qui est vue comme un effecteur de Rheb dans l'activation de mTOR (Sun et Chen 2008). Récemment, il a émergé l'idée d'un système où les voies PLD et Rheb seraient entrecroisées, en opposition avec la vision ancienne de deux voies parallèles, l'une sensible aux mitogènes et l'autre aux nutriments, faisant de la PLD un senseur de l'état nutritif de la cellule pour mTOR (Sun et Chen 2008).

La PLD est aussi capable d'activer directement S6K1, un substrat préférentiel de mTOR. La voie PLD peut donc aussi constituer une voie parallèle mTOR-indépendante (Lehman *et al.* 2007).

Nous avons montré que la PLD a des effets hypertrophiques et anti-atrophiques sur des myotubes en culture, et que cette action est dépendante de mTOR, puisqu'elle est supprimée en présence de l'inhibiteur de mTORC1 et mTORC2 pp242 (manuscrit en préparation).

1.3 *L'atrophie musculaire*

1.3.1 *Généralités*

Le muscle constitue la réserve principale de protéines de l'organisme. Pour cette raison, il est « attaqué » en priorité lors de diverses situations pathologiques associées à un hypercatabolisme. La cible principale de cette « attaque », les protéines myofibrillaires constituant l'appareil contractile, représentent environ 80% du volume des myofibrilles. De nombreuses situations affectent l'équilibre entre synthèse et dégradation de ces protéines contractiles, et ont un impact fort sur la taille des fibres et, en conséquence, sur la masse musculaire d'un individu (Sandri 2008). L'atrophie musculaire se caractérise de manière physiologique par une diminution de force et une plus grande fatigabilité, expliquées au niveau moléculaire par une diminution du contenu protéique, et au niveau histologique par une diminution de la taille des fibres existantes. Dans certains cas, tels que la sarcopénie et l'atrophie induite par dénervation, un défaut de régénération du tissu musculaire, causé par une perte de fonction des cellules satellites du muscle, peut aussi jouer un rôle. Différentes causes sont avancées : une diminution des facteurs de croissance nécessaires à leur maturation, une diminution de leur activité télomérase, ou encore un défaut des mécanismes anti-oxydants. (Conboy et Rando 2005; Ehrhardt et Morgan 2005). Dans le cas de la cachexie, une diminution des capacités régénératives du tissu musculaire a parfois été évoquée, mais elle n'a pas été établie. Seules des données indirectes et obtenues *in vitro* vont dans ce sens (effet anti-myogénique des cytokines, inhibition de myoD indispensable pour la régénération musculaire) (Li et Reid 2001).

1.3.2 *Atrophie musculaire et pathologies*

L'atrophie musculaire est une conséquence aggravante courante de nombreuses pathologies chroniques. Elle est commune dans les cancers, les états d'insuffisance touchant différents organes (cœur, foie, rein, obstruction pulmonaire chronique), les septicémies et dans l'infection par le VIH (Jackman et Kandarian 2004). Toutes ces pathologies ont en commun d'être associées à l'installation et au maintien d'un état inflammatoire chronique. La perte musculaire progressive est aussi inévitable lors du vieillissement normal, associée à un

affaiblissement général ; on parle alors de sarcopénie (Doherty 2003). La perte musculaire est aussi associée à la dénervation ou l'immobilisation temporaire d'un membre, elle est alors localisée. Cette atrophie localisée est retrouvée dans divers syndromes de compression et d'atteinte du neurone moteur. L'alitement prolongé, l'exposition à la microgravité lors de voyages spatiaux, les carences alimentaires sont aussi des causes d'atrophie (Adams *et al.* 2003). Dans tous ces cas le muscle est génétiquement normal, au contraire des dystrophies où la mutation d'une protéine de structure cause la dégénérescence du tissu musculaire, à l'origine d'une inflammation prémisses d'une atrophie des fibres encore fonctionnelles.

Le terme de cachexie désigne un syndrome complexe, plus vaste que la seule perte musculaire. Elle comporte une association de facteurs tels que anorexie, état inflammatoire, asthénie (Evans *et al.* 2008). Elle se caractérise par une perte de poids progressive et générale. La fonte musculaire est prépondérante, mais elle est généralement précédée par une perte de masse grasse. De manière caractéristique, la perte de poids n'est pas réversée par un apport alimentaire accru, notamment en protéines (Glass 2010). Elle est observée chez les patients cancéreux, sidéens, tuberculeux, chez les insuffisants cardiaques, chez les patients souffrant d'emphysème, etc. La cachexie est l'une des manifestations cancéreuses les plus communes : la prévalence de la cachexie tumorale varie selon les types de cancers ; elle atteint jusqu'à 80 % environ des patients dans les stades avancés.

Que l'atrophie musculaire soit d'origine pathologique, ou qu'elle soit physiologique (comme lors de la sarcopénie accompagnant le vieillissement normal), dans tous les cas elle induit de graves conséquences : diminution de la qualité de vie du patient, dégradation de son statut clinique, perte d'autonomie du fait d'une mobilité et d'une force physique réduites, et augmentation de la mortalité notamment par diminution de la réponse aux traitements. Dans le cas de la cachexie, les conséquences sont dévastatrices. La cachexie liée à l'insuffisance cardiaque chronique est un facteur aggravant majeur, la mortalité à 18 mois des patients insuffisants cardiaques passant de 17% sans cachexie à 50% en présence de cachexie. La cachexie est responsable de plus de 20% des décès dus au cancer, principalement par insuffisance respiratoire et cardiaque (liée souvent à une défaillance des muscles respiratoires comme le diaphragme), ce qui en fait la cause principale de mortalité terminale (Glass et Roubenoff 2010). De plus, la cachexie augmente les complications dues aux traitements chirurgicaux, radiothérapeutiques, chimiothérapeutiques. Elle entraîne fatigue, faiblesse, nausées et enfin cause une détresse psychologique chez les patients et leurs

familles (Bruera 1997). On considère actuellement que c'est un problème de santé majeur. En effet, on estime à 1,9 millions le nombre de patients cachectiques sur les 3,5 millions de cas de cancers répertoriés aux Etats-Unis et dans l'Union Européenne en 2009 (Glass et Roubenoff 2010).

1.3.3 Causes de l'atrophie musculaire

La réponse de l'organisme au stress, y-compris au choc opératoire et aux maladies, consistant en une activité catabolique excessive due à la fois à un déséquilibre hormonal et à une inflammation exacerbée, peut-être considérée comme inadaptée et autodestructive. L'organisme consomme ses muscles pour fournir de l'énergie, plutôt que les stocks lipidiques, les protéines constituant en effet la source d'énergie la plus rapidement disponible de par la capacité des acides aminés à être convertis en glucose, et à être utilisés directement pour la fourniture d'énergie. La réponse au stress est caractérisée par des taux élevés et soutenus d'adrénaline, de cortisol, qui accroissent la demande énergétique au-delà du nécessaire. De plus, le stress décroît la production des hormones anaboliques: Hormone de Croissance, testostérone, IGF. Cet environnement hormonal anormal conduit à la dégradation des protéines viscérales et musculaires. L'inflammation qui accompagne les situations de stress engendre des produits comme les cytokines qui amplifient la dégradation protéique. Une fois enclenché, le processus catabolique se maintient jusqu'à disparition complète des causes initiales, même si la fourniture en énergie est suffisante (Demling 2007).

1.3.4 Facteurs humoraux impliqués dans l'atrophie musculaire

1.3.4.1 Les cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines sécrétées par différents types cellulaires, dont les cellules gliales, les cellules endothéliales et épithéliales, mais en majorité par les cellules immunitaires de l'hôte en réponse à une infection (macrophages et monocytes surtout), et, dans les cancers, par les cellules tumorales elle-même. Elles jouent un rôle majeur dans la régulation du système immunitaire (Aggarwal et Natarajan 1996). Chez l'Homme, le catabolisme musculaire est largement attribué aux cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , Interleukine-6 (IL-6), Interféron- γ (IFN- γ) dans les maladies inflammatoires telles que

le cancer, l'insuffisance cardiaque congestive, le SIDA et l'obstruction pulmonaire chronique (Evans *et al.* 1989). Les taux de TNF α circulants, notamment, sont fortement élevés dans ces maladies, atteignant des valeurs aussi élevées que 3 ng/ml dans la polyarthrite rhumatoïde et 6 ng/ml dans le cancer, des valeurs situées dans la gamme de concentrations qui induisent expérimentalement la fonte musculaire chez les animaux (Li et Reid 2000). Les niveaux sanguins de TNF α sont souvent corrélés au stade de développement tumoral et à la survie du patient dans différents cancers et le SIDA (Lahdevirta *et al.* 1988; Michalaki *et al.* 2004). Les niveaux de cytokines sont également élevés dans le cas de maladies auto-immunes comme la maladie de Bowel et la polyarthrite rhumatoïde (Mocellin *et al.* 2005). Les cytokines ne semblent par contre pas impliquées dans l'atrophie liée à l'immobilisation.

1.3.4.2 Le TNF α

Le TNF α a été découvert par hasard à la fin du 19^e siècle comme la « toxine de Coley », du nom d'un médecin américain qui observa la régression de tumeurs chez des patients en réponse à l'injection d'un filtrat bactérien (Coley 1893). C'est bien plus tard que le TNF α fut isolé dans le sérum de souris traitées par des endotoxines, identifié comme l'agent actif de Coley responsable de la nécrose hémorragique des tumeurs (Carswell *et al.* 1975), puis cloné (Shirai *et al.* 1985). L'effet de nécrose tumorale est maintenant attribué à la production en grande quantité de TNF α par les macrophages activés (5mg/l de TNF α dans le serum de lapins injectés avec des endotoxines, 1h30 plus tard, et 2% de la sécrétion de macrophages *in vitro*) (Tracey *et al.* 1986). Le TNF α est utilisé de manière locale par perfusion dans les membres dans le traitement de mélanomes ou de sarcomes inopérables, pour son effet anti-angiogénique, en association avec une chimiothérapie (Lejeune *et al.* 2006). Le TNF α est aussi appelé cachectine pour sa capacité à reproduire une cachexie chez des souris (Kawakami et Cerami 1981; Beutler *et al.* 1985; Oliff *et al.* 1987; Tracey *et al.* 1990).

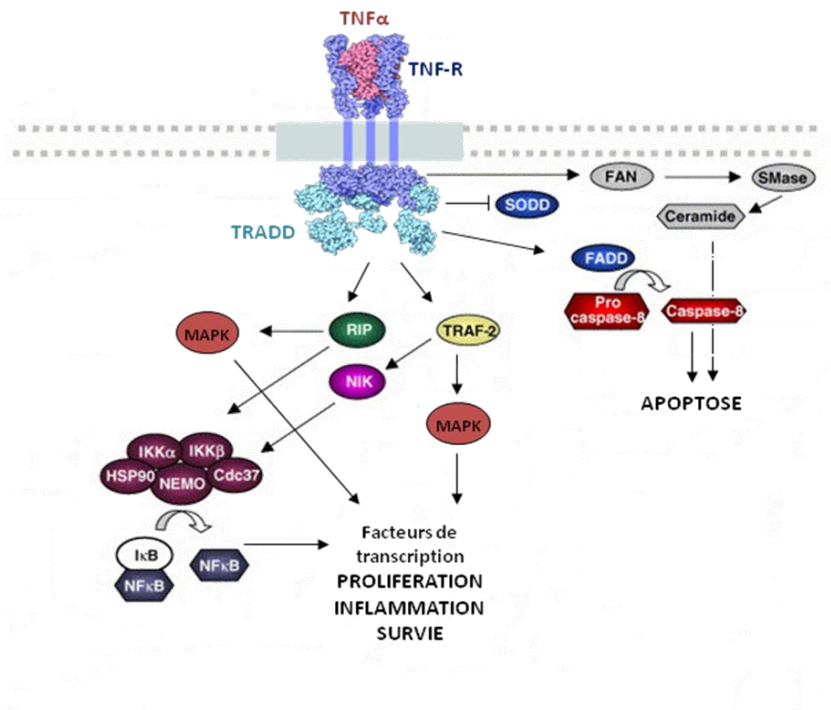
1.3.4.2.1 Biologie du $TNF\alpha$ et voies de signalisation

Figure 13 : Les différentes voies de signalisation initiées par le $TNF\alpha$.

La fixation du $TNF\alpha$ induit le recrutement de nombreuses protéines principalement par l'intermédiaire de TRADD qui se fixe sur son domaine de mort. Cela aboutit à diverses réponses dont l'induction de l'apoptose, de la prolifération et de la survie cellulaire.

Le $TNF\alpha$ est une protéine de 17 kDa (157 acides aminés), présente sous forme d'hétérotrimère soluble dans le sang. Il est synthétisé sous forme d'un pro-peptide lié à la membrane clivé par l'enzyme TACE ($TNF\alpha$ -Converting Enzyme). Ses effets sont médiés par sa fixation sur deux récepteurs membranaires : p55-TNF-R1 (ubiquitaire), et p75-TNF-R2 (présent uniquement sur les cellules endothéliales et immunitaires) (Goodsell 2006). Sa fixation induit la trimérisation du récepteur, et le départ de son inhibiteur naturel SODD (Silencer Of Death Domain), ce qui initie une cascade de signalisation intracellulaire (*figure 13*). La queue cytoplasmique du récepteur recrute, via son domaine DD (death domain), la protéine TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain protein) qui elle-même recrute d'autres protéines adaptatrices comme FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), TRAF (TNF-receptor associated factors) et RIP. Le recrutement de FADD forme le complexe DISC (Death Inducing Signalling Complex) impliqué dans l'apoptose via les caspases.

TRADD peut également recruter TRAF (TNF-R Associated Factor) aboutissant à l'activation de la voie MAPK, tandis que RIP active la voie NF κ B (Mocellin *et al.* 2005).

Une voie plus méconnue activée par le TNF α est la synthèse de céramides, via le recrutement de sphingomyélinases neutres par la protéine adaptatrice FAN (Factor for Activation of Neutral SMase), au niveau du domaine NSD adjacent au domaine DD, ou de sphingomyélinases acides via le domaine DD et la protéine TRADD. Le TNF α peut aussi activer la synthèse de novo des céramides (*figure 14*) (Mathias *et al.* 1998; Gulbins et Grassme 2002; Marchesini et Hannun 2004). Dans la réponse au stress, le TNF α peut induire l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire par l'intermédiaire de différents second messagers dont les céramides (Hannun 1996). Ceci est confirmé par le blocage de l'apoptose induit par l'inhibition pharmacologique des sphingomyélinases dans de nombreux modèles (Liu *et al.* 1998). Toutes ces notions seront développées plus en détail dans la deuxième partie.

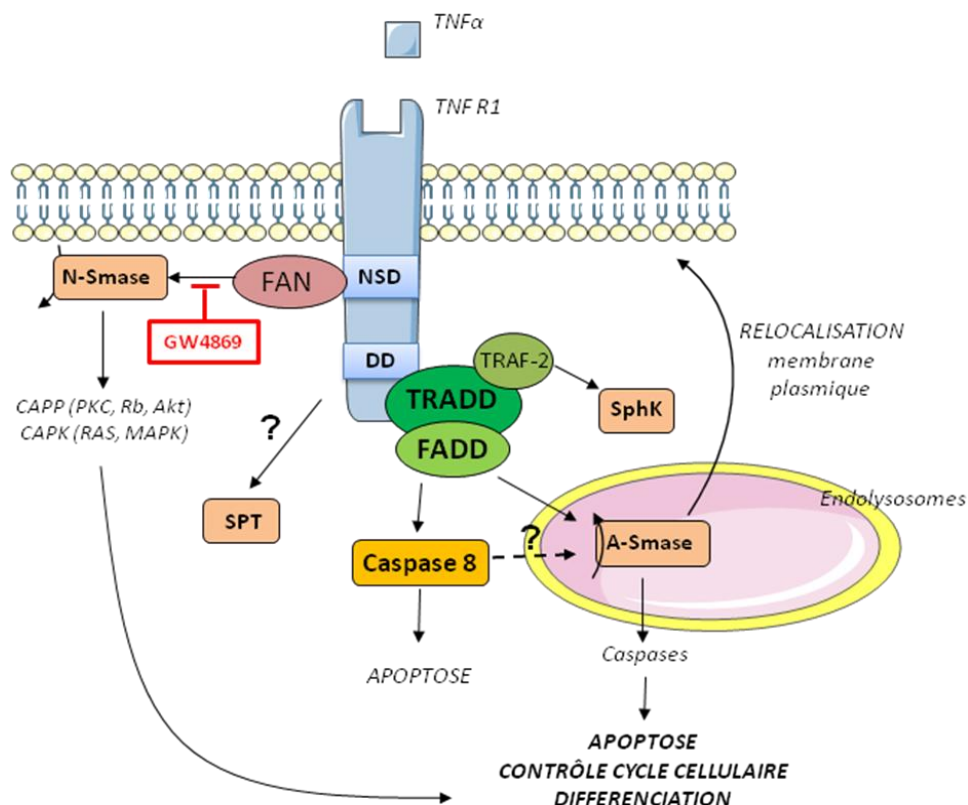


Figure 14 : La synthèse de céramides induite par le TNF α .

La fixation du TNF α sur son récepteur TNFR1 induit une synthèse de céramides par le recrutement de la Sérine Palmitoyl-Transférase (SPT) d'une part, ou par le recrutement de la sphingomyélinase neutre (N-Smase) via FAN (Factor for Activation of Neutral SMase), ou encore par l'activation de la sphingomyélinase acide (A-Smase) par l'intermédiaire de son domaine de mort (DD) et de la protéine adaptatrice TRADD. Le TNF α peut également moduler la Sphingosine kinase (SphK) via le recrutement de TRAF-2.

1.3.4.2.2 Rôles du TNF α

Le TNF α est une cytokine dite pléiotrope (du Grec « pléon » : plus, et trôpe : changement) exerçant une grande variété d'effets selon le type cellulaire (Pfeffer 2003). Ainsi, son injection à des rats induit de nombreux désordres métaboliques touchant tous les tissus: hypotension, acidose, atrophie musculaire, anorexie, fièvre, ischémie, anémie, inflammation, altérations de l'absorption et de la motilité gastrointestinales et nécrose (Tracey *et al.* 1986). Le TNF α a des effets systémiques et locaux, illustrés par le fait qu'une injection intracérébrale ou intramusculaire de cellules CHO surexprimant le TNF α entraîne dans les deux cas une élévation des taux de TNF α circulants, mais elle est accompagnée d'une forte anorexie et d'une mortalité précoce dans le premier cas, et d'une cachexie chronique dans l'autre cas. (Tracey *et al.* 1990).

In vitro, il induit l'apoptose de nombreuses lignées cancéreuses, dont les cellules L-929 utilisées pour un test de cytotoxicité (Branch *et al.* 1991). In vivo, on attribue principalement ses effets anti-tumoraux à ses propriétés anti-angiogéniques (Fajardo *et al.* 1992; van Etten *et al.* 2003). A l'opposé, de faibles doses de TNF α peuvent favoriser la survie et la prolifération métastatique de la tumeur en activant Akt (Mocellin *et al.* 2005). La reconnaissance de pathogènes par les récepteurs Toll-like induit une production de TNF α par les macrophages. Le TNF α joue ensuite un rôle majeur en tant que médiateur précoce de l'inflammation, en stimulant de manière autocrine et paracrine la prolifération, la croissance des lymphocytes, leur migration vers les sites de l'inflammation et en orchestrant la synthèse d'autres cytokines (Parameswaran et Patial 2010). Le TNF α est aussi impliqué dans la dérégulation et la dégradation du tissu adipeux observées en situation cachectique (inhibition de la lipogénèse, stimulation de la lipolyse) (Zhang *et al.* 2002). De plus, il bloque la différenciation des adipocytes in vitro (Cawthorn et Sethi 2008). L'obésité est également associée à une synthèse de TNF α due à l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux (Weisberg *et al.* 2003). Le TNF α est donc considéré comme un régulateur central de l'inflammation, impliqué dans le développement de nombreuses maladies inflammatoires chroniques (Clark 2007).

1.3.4.2.3 *TNF α et muscle*

Comme énoncé ci-dessus, le TNF α est suffisant pour induire une fonte musculaire cachectique. Il a de multiples effets au niveau du muscle. Le TNF α est un agent limitant la prolifération et la différenciation de myoblastes en culture (Ji *et al.* 1998). Son taux est élevé de manière locale dans les muscles dystrophiques, où il participe à la nécrose du tissu (Collins et Grounds 2001) et s'oppose à l'effet protecteur de l'IGF (Shavlakadze *et al.* 2004). Cependant, il est aussi produit par les fibres musculaires en cours de régénération, où il pourrait jouer un rôle bénéfique (Kuru *et al.* 2003).

Le TNF α régule aussi le métabolisme glucidique dans le muscle. Ainsi, une administration aiguë de TNF α à des rats induit un état hypoglycémique-hypercatabolique, reproduit dans des cellules L6 *in vitro*, et qui est caractéristique de nombreux cancers qui stimulent la demande en glucose (Battelino *et al.* 1999; Argiles *et al.* 2000). Le TNF α a donc une action analogue à celle du glucagon en stimulant le transport du glucose, son utilisation et en inhibant son stockage par glycogénogénèse (Ranganathan et Davidson 1996; Ciaraldi *et al.* 1998), ce qui a été proposé comme un mécanisme compensatoire à la résistance à l'insuline chez les patients diabétiques (Ciaraldi *et al.* 1998). Cependant, en présence d'insuline, un traitement prolongé de myoblastes L6 en culture par le TNF α inhibe la voie de signalisation IRS-1-PI3K et s'oppose ainsi au transport du glucose et à la synthèse de glycogène (Begum et Ragolia 1996). La perfusion de rats ou de souris par le TNF α induit une hyperglycémie et une intolérance au glucose, ainsi qu'une inhibition de la signalisation de l'insuline dans le tissu musculaire, reliée à l'état de phosphorylation de IRS-1 et d'Akt. Un effet à long terme du TNF α sur la transcription génique participe au développement de l'insulino-résistance (Lang *et al.* 1992; Benito 2011). Le TNF α est proposé comme un lien entre adiposité et développement de la résistance à l'insuline chez les diabétiques de type 2, à cause de la production élevée de la cytokine par le tissu adipeux des patients obèses.

Le TNF α interfère avec le métabolisme lipidique, puisqu'il participe à l'installation de l'état hypertriglycéridémique observé dans les cancers, en inhibant l'activité de la Lipoprotéine Lipase, une enzyme présente à la surface de l'endothélium vasculaire du tissu adipeux et du muscle, et qui est responsable de l'hydrolyse des triglycérides des VLDL plasmatiques (Beutler *et al.* 1985).

Le TNF α interfère avec le métabolisme protéique: il active fortement la protéolyse et inhibe la protéosynthèse en agissant sur le transport des acides aminés, le turn-over des acides aminés ramifiés utilisés comme source d'énergie (Argiles *et al.* 2000). Le TNF α stimule aussi la production d'énergie et bloque la régénération du muscle en inhibant l'expression des MRF (Argiles *et al.* 2000).

Le TNF α interfère donc avec les métabolismes glucidique, protéique et lipidique au niveau de la cellule musculaire, et son administration aux animaux reproduit un état hypercatabolique proche des états cachectique (Argiles *et al.* 2000). Nous avons montré que, dans des myotubes en culture, l'effet atrophique du TNF α implique l'accumulation de céramides et l'inhibition de l'expression de la PLD (De Larichaudy *et al.* 2012).

1.3.4.3 Les Glucocorticoïdes

Les taux de glucocorticoïdes endogènes sont augmentés dans diverses situations d'atrophie, dont le jeûne, l'acidose métabolique, la cachexie. De plus, des taux élevés de glucocorticoïdes peuvent exacerber la perte musculaire associée au diabète, à un choc septique, à l'inactivité (Baehr *et al.* 2011).

1.3.4.4 La myostatine

Dans certaines situations, des niveaux de myostatine endogènes augmentés sont associés à une atrophie musculaire : chez les patients sidéens cachectiques (Gonzalez-Cadavid *et al.* 1998), chez les patients insuffisants cardiaque (George *et al.* 2010), dans la cachexie expérimentale induite par la greffe de cellules tumorales de Lewis (Costelli *et al.* 2008), ou de carcinome C26 (Zhou *et al.* 2010). De plus la myostatine pourrait également être un effecteur du TNF α , puisque l'administration de pentoxyfilline (un inhibiteur de la synthèse du TNF α) fait chuter l'expression de myostatine et de SMAD3 (Costelli *et al.* 2008). Il a été suggéré que plutôt que la myostatine, d'autres membres de la famille TGF β tels que les activines sont impliqués dans l'étiologie de l'atrophie musculaire tumeur-induite (Zhou *et al.* 2010).

1.3.5 Cas de la sarcopénie

La perte musculaire qui accompagne la sarcopénie est d'origine complexe, et semble liée à de nombreux désordres métaboliques apparaissant avec le vieillissement, tels que la diminution de la sécrétion des hormones de croissance hypophysaires (accentuée en cas d'obésité), qui fait chuter les niveaux d'IGF-1 (Rudman *et al.* 1990). La baisse de la production des androgènes est aussi un facteur susceptible d'être impliqué (Basaria *et al.* 2001). Les mécanismes de la sarcopénie semblent distincts de ceux impliqués dans les autres formes d'atrophie: la protéolyse ne semble pas jouer de rôle majeur, alors que la baisse de synthèse protéique et l'incapacité du tissu musculaire à se régénérer suffisamment pour compenser la perte accrue des fibres sont des facteurs prépondérants (Edstrom *et al.* 2006).

1.3.6 Mécanismes moléculaires mis en jeu

Malgré des origines différentes, les différentes formes d'atrophie musculaire se caractérisent toutes par une perturbation de l'équilibre synthèse protéique – dégradation, et mettent en jeu un ensemble commun de gènes, qui ont été dénommés "atrogènes" (Lecker *et al.* 2004). Ainsi, dans les muscles de souris mises à la diète, ou porteuses de tumeurs, ou rendues diabétiques par la streptozotocine, ou partiellement néphrectomisées, l'atrophie s'accompagne du changement d'expression de 133 gènes communs, incluant des gènes du protéasome, et de l'autophagie. Le système ubiquitine/protéasome est un des systèmes majeurs de dégradation des protéines, fortement impliqué dans la protéolyse exacerbée rencontrée dans l'atrophie musculaire. Parmi les atrogènes surexprimés, une forte proportion concerne le protéasome : on note des polyubiquitines, des sous-unités du protéasome, et de manière très intéressante des E3-ubiquitine-ligases spécifiquement impliquées dans la dégradation des protéines musculaires : Atrogine-1 et MurF1, alors que d'autres ubiquitine-ligases sont inchangées (Lecker *et al.* 2004). La protéase lysosomale cathepsine L fait aussi partie des atrogènes, alors que les métalloprotéases de la matrice ne sont pas affectées. La cathepsine L est un des marqueurs de l'autophagie, autre système qui contribue largement à la protéolyse musculaire (Zhao *et al.* 2007).

Il est intéressant de noter que les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL1 β sont de puissants activateurs du facteur de transcription NF- κ B (Li et Reid 2000), et qu'elles activent

l'expression de l'atrogène MurF1 de manière NF- κ B-dépendante, ce qui peut expliquer leurs effets atrophiques (Cai *et al.* 2004).

IGF-1, outre ses effets stimulateurs de la synthèse protéique, agit par l'intermédiaire de l'activation d'Akt en inhibant les voies de protéolyse, et notamment l'expression des atrogènes Atrogin-1 et MurF1 induite par des conditions pro-atrophiques (dexaméthasone, diabète) (Glass 2010). Le mécanisme d'action d'Akt implique la phosphorylation des facteurs de transcription de la famille FoxO (Forkhead box protein O), qui entraîne leur séquestration dans le cytosol et les empêche d'activer l'expression des atrogènes. Une interaction complexe entre myostatine et IGF-1 a été mise en évidence, IGF-1 bloquant les effets de la myostatine sur les myoblastes et les myotubes, et la myostatine inhibant l'activation d'Akt induite par IGF-1 (Trendelenburg *et al.* 2009).

1.3.7 Les traitements de la perte musculaire

1.3.7.1 Importance de la préservation de la masse musculaire

Depuis de nombreuses années, il est apparu évident que la masse musculaire est directement corrélée à la survie en cas de malnutrition, de maladies systémiques graves, ou lors du vieillissement. De plus, une corrélation entre masse maigre, compétence immunitaire et statut fonctionnel a été mise en évidence (Roubenoff et Kehayias 1991).

Récemment, plusieurs études ont montré que la restauration de la masse musculaire chez des souris porteuses de différents types de tumeurs allongeait spectaculairement leur survie. L'injection d'une forme soluble du récepteur à l'activine ActRIIB, capable de piéger les ligands endogènes, reverse totalement la perte de masse musculaire de souris cachectiques, rétablit leur force musculaire, et induit une résistance des animaux aux tumeurs sans affecter la taille de celles-ci (Benny Klimek *et al.*; Zhou *et al.* 2010).

Ces études montrent donc clairement que le blocage de la perte musculaire per se (indépendamment de l'état de la tumeur) a un effet bénéfique sur la morbidité et la mortalité dans la situation de cachexie cancéreuse, et souligne l'importance de la recherche de nouveaux moyens thérapeutique visant à préserver le muscle.

1.3.7.2 Pistes thérapeutiques

Il n'existe pas actuellement de traitement efficace général de la perte musculaire. Des interventions adaptées aux situations particulières, de nature palliative, tentent de freiner le phénomène, sans efficacité frappante, notamment dans les cas de cachexie et de sarcopénie. Les études menées autour des nouvelles pistes thérapeutiques sont donc d'une importance cruciale.

1.3.7.2.1 Exercice

Bien qu'une activité physique adaptée (programmes d'entraînement incluant notamment des contractions excentriques) atténue les symptômes de la sarcopénie chez les personnes âgées, elle ne peut prévenir ou réverser complètement ses effets sur le long terme. De plus l'ostéoporose et la perte de mobilité qui touchent ces sujets limitent considérablement son application (Faulkner *et al.* 2007).

1.3.7.2.2 Nutrition

Dans la cachexie cancéreuse, les interventions nutritionnelles sont en général inadaptées, car elles ne surmontent pas les effets des processus cataboliques en jeu. De même, les stimulants de l'appétit ont des effets fugaces, et procurent peu de bénéfices à long terme. Sont néanmoins utilisés un progestatif comme le Mégestrol, les corticostéroïdes, mais ils tendent à augmenter la masse grasse et la rétention d'eau plutôt que la masse maigre, et leurs effets secondaires peuvent être néfastes. Dans d'autres cas, tels que l'état catabolique de patients grands brûlés, soumis à une chirurgie lourde, sarcopéniques ou infectés par VIH, la supplémentation en glutamine ou en une combinaison d'acides aminés se montre efficace (Demling 2007). L'effet d'une supplémentation en leucine pour limiter l'atrophie induite par l'inactivité n'est pas fermement établi. Par contre, chez des sujets âgés, l'apport de leucine stimule efficacement la synthèse protéique au niveau des muscles (Nicastro *et al.* 2011).

Les acides gras polyinsaturés de la série n-3 (acide docosahexaénoïque ou DHA, acide eicosapentaénoïque ou EPA) ont fait l'objet de plusieurs études cliniques, à la suite de résultats positifs obtenus chez l'animal. Un bilan de ces études ne montre pas d'effet univoque

chez les patients cachectiques (Mazzotta et Jeney 2009). Cependant, ils pourraient présenter un intérêt en association avec d'autres traitements (Mantovani *et al.*).

1.3.7.2.3 Agents anabolisants

La testostérone et ses dérivés synthétiques (notamment Oxandrolone) sont utilisés pour accroître la masse musculaire, notamment après traumatisme sévère (par exemple brûlure), chirurgie lourde, et dans diverses affections chroniques. Le risque d'effets aderses sérieux a conduit à rechercher des composés non-stéroïdiens modulateurs des récepteurs aux androgènes, actuellement en cours d'essais cliniques chez des patients cachectiques (Dodson *et al.*).

1.3.7.2.4 Agents anti-cytokines

Une stratégie de traitement intéressante vise à contrer les effets pro-atrophiques des cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, la Thalidomide est un agent anti-TNF α aux effets anti-inflammatoires. Elle a montré des effets bénéfiques pour limiter la perte et améliorer la fonction musculaire chez les patients cancéreux, malgré des effets secondaires graves limitant son utilisation. De même, un anticorps anti-IL6 est en cours d'essais cliniques chez des patients cachectique (Dodson *et al.* 2011).

1.3.7.2.5 Agents bloquant la myostatine

Des études menées chez des souris âgées sarcopéniques montrent que l'injection d'une forme tronquée de la myostatine, se comportant comme un antagoniste, stimule efficacement la régénération des muscles (Siriatt *et al.* 2007). L'expression d'une forme dominante-négative de myostatine par perfusion hépatique d'un vecteur viral (adeno-associated virus) chez un modèle de chien dystrophique permet l'inhibition systémique de la myostatine, et sur le long terme (13 mois), l'accroissement de la masse musculaire et la diminution de la fibrose. Ces études menées chez le gros animal ouvrent la voie à des études cliniques (Bish *et al.* 2011) Des effets positifs d'un anticorps anti-myostatine ont aussi été observés sur la masse et la force musculaires chez des souris âgées (Murphy *et al.* 2010), soumises à l'immobilisation d'un membre (Murphy *et al.* 2011), ou dystrophiques (souris mdx) (Bogdanovich *et al.* 2002),

suggérant une nouvelle voie d'action thérapeutique. Cependant, des essais cliniques menés par la société Wyeth portant sur l'injection d'anticorps anti-myostatine à des patients atteints de diverses myopathies ont été abandonnés en phase II, au profit du type d'approche suivant.

1.3.7.2.6 Agents bloquant le récepteur IIB à l'activine

Comme il a été mentionné ci-dessus, l'injection d'une forme soluble du récepteur IIB à l'activine permet une protection remarquable de la masse musculaire en présence de tumeurs chez la souris (Benny Klimek *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2010). Ce récepteur est commun à divers ligands de la famille du TGF β , dont l'activine et la myostatine, ce qui montre les importantes potentialités d'actions visant ces ligands ou leur voie de signalisation. Des études cliniques, menées par Acceleron Pharma, sont en cours. Les résultats sur des sujets sains ont été encourageants. Chez des sujets myopathes (myopathie de Duchenne), les études en cours ont été interrompues à cause d'effets secondaires mineurs (saignements du nez et des gencives), mais devraient reprendre.

2 Les sphingolipides

2.1 Généralités

Parmi les grandes classes de lipides présentes chez les êtres vivants, les sphingolipides ont longtemps été négligés. Des études relativement récentes les ont placés au centre de nombreux processus biologiques, en montrant, en plus de leur rôle structural, leur participation à la transduction du signal en réponse au stress, dans la formation et la régulation des radeaux lipidiques membranaires et à la formation des lipoprotéines, etc. (Futerman et Hannun 2004). Erreur ! Liaison incorrecte.

Tableau 1 : Répartition des différentes classes de lipides dans les membranes biologiques.

PE: phosphatidyléthanolamine; PS: phosphatidylsérine; PC: phosphatidylcholine; mb: membrane; RE : reticulum endoplasmique. D'après *Molecular Biology of the Cell*, 4e édition; Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. 2002.

LIPIDES	LIPIDES EN % DU POIDS TOTAL			
	mb plasmique	gaine de myéline	RE	mb bact. (E.Coli)
Cholestérol	17	22	6	0
PE	7	15	17	70
PS	4	9	5	traces
PC	24	10	40	0
Sphingolipides	19	8	5	0
GLYCO-lipides	7	28	traces	0
autres	22	8	27	30

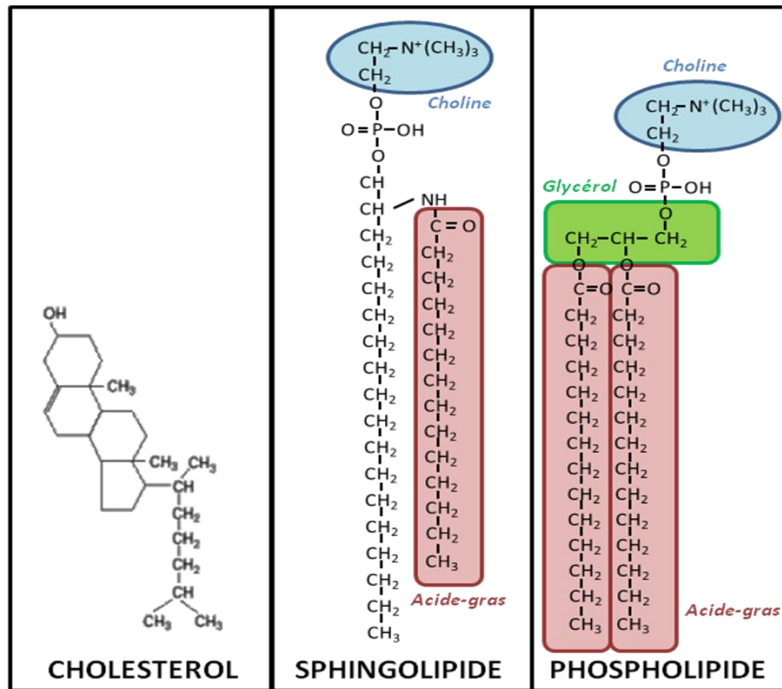


Figure 15 : Structure générale de 3 types de lipides membranaires.

2.2 Structure

Les sphingolipides tiennent leur nom du sphinx de la mythologie grecque. Ils ont été ainsi nommés lorsqu'en 1884 le biochimiste allemand J.L.W. Thudichum dans son ouvrage "*A treatise on the chemical constitution of the brain*" relevait déjà leur nature énigmatique. Ce sont des composés amphiphiles avec une queue hydrophobe et une tête polaire hydrophile, directement responsables de leurs propriétés. Les sphingolipides ont une grande diversité de structure et de fonction, mais dérivent tous de la sphingosine, un amino-alcool insaturé de 18 carbones (*en rouge dans le schéma ci-dessous*). Cette diversité trouve son origine dans l'énorme variété de combinaisons possibles (*figure 15*). Leur nomenclature repose sur le nombre de carbones, d'insaturations et le degré d'hydroxylation de l'acide gras substitué en position 2 par une liaison amide, et sur la nature de la tête polaire liée par une liaison phospho-diester sur le carbone 1 (*figure 16 en noir*). Chez les vertébrés la base sphingoïde est majoritairement la sphingosine ou la sphinganine (dihydrosphingosine), tandis que chez les plantes on trouve des composés plus variés, avec une base sphingoïde à 20 carbones (Merrill 2002).

Les bactéries et les levures synthétisent aussi des composés "sphingoid like" comme la Fumonisine ou la Myriocine, des toxines trouvées dans les micro-organismes contaminant les céréales (Sharma *et al.* 2000). Leurs effets toxiques, à hautes doses, en particulier sur le rein, le foie et l'œsophage sont liés à la perturbation de la survie et de la prolifération des cellules avec une implication avérée du TNF α (Voss *et al.* 2006). Ces composés à la structure et aux propriétés proches (Riley *et al.* 2001) ont permis de grandes avancées dans l'étude de la signalisation par les sphingolipides, en tant qu'inhibiteurs compétitifs de diverses étapes de leur biosynthèse (Merrill *et al.* 2001; Hannun et Obeid 2002). Ils agissent en se substituant aux intermédiaires auxquels ils ressemblent lors du mécanisme réactionnel (Hanada *et al.* 2003). La voie métabolique des sphingolipides est complexe et contient de nombreux intermédiaires bioactifs dont l'équilibre va dicter le devenir cellulaire, en particulier le céramide et la S1P qui sont connus pour leurs effets opposés dans de nombreux modèles (Cuvillier *et al.* 1996).

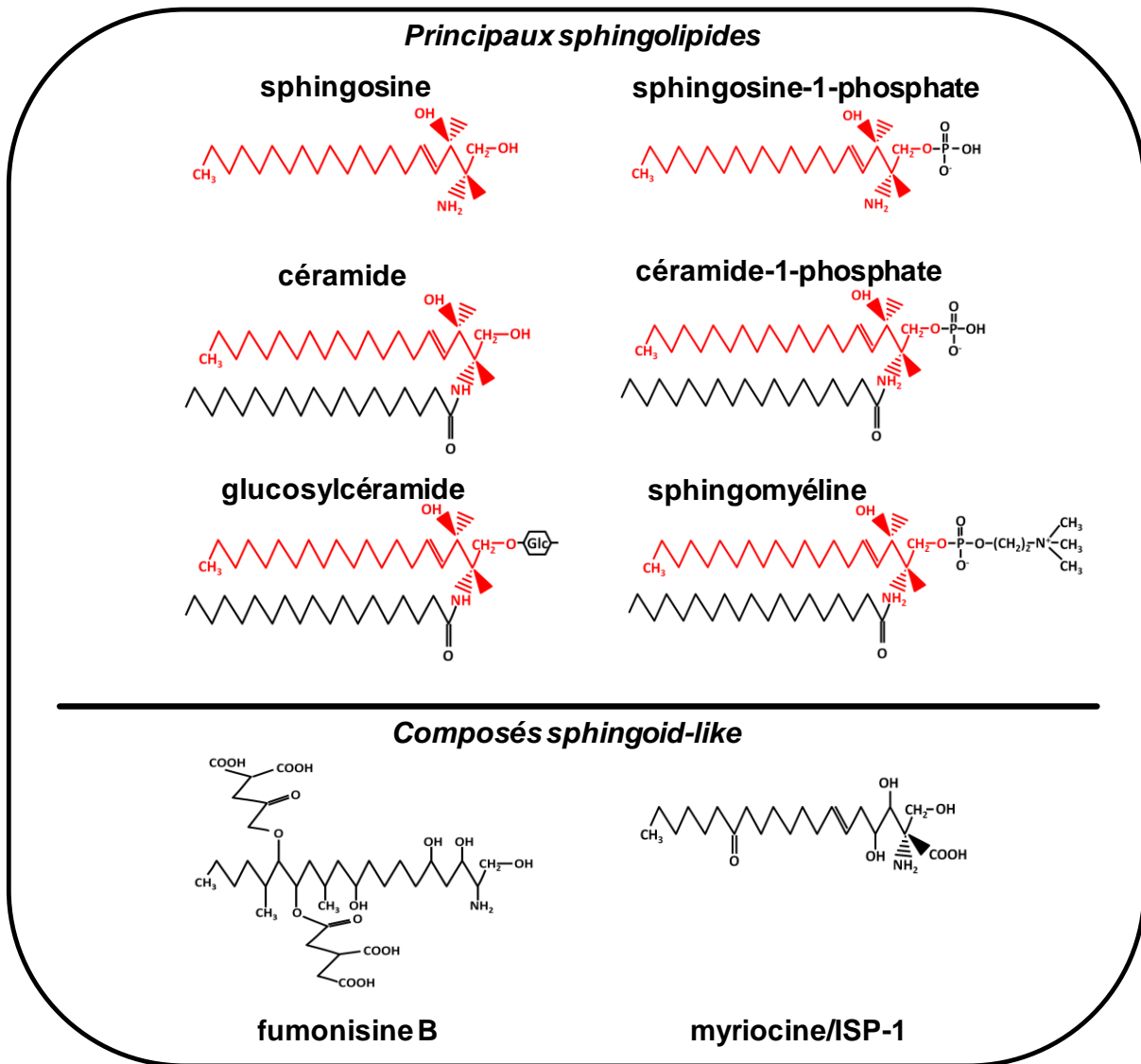


Figure 16 : Structure des principaux sphingolipides et des composés « sphingoid-like ».

2.3 Les voies de synthèse des sphingolipides

2.3.1 Généralités

La connaissance du métabolisme des sphingolipides a progressé grâce à l'identification et au clonage des différentes enzymes impliquées, dont certaines ne l'ont été que récemment (Hannun et Luberto 2004; Huitema *et al.* 2004; Marchesini et Hannun 2004). Les sphingolipides sont formés par deux voies différentes d'importances sensiblement égales : via la «voie de recyclage» où la sphingosine est formée dans les lysosomes/endosomes tardifs par hydrolyse du céramide, issu de la dégradation de sphingolipides complexes (sphingomyéline : SM, glycosphingolipides : GSL), ou bien via la voie de synthèse *de novo* initiée par la condensation de la sérine et du palmitoyl-CoA et conduisant, par une cascade de réactions enzymatiques, à la formation de céramide dans le Réticulum Endoplasmique (RE).

2.3.2 Voie *de novo*

La première étape de la voie *de novo* est catalysée par la Sérine-Palmitoyl-Transférase (SPT), décrite récemment comme un hétérotrimère composé des sous-unités LCB1, LCB2 et LCB3 ; cette dernière produit préférentiellement une base sphingoïde en C16 à partir de myristate en quantité minoritaire (Hornemann *et al.* 2009). La SPT appartient à la famille des oxoamine-synthases, qui utilise le pyridoxal-phosphate comme co-facteur (Hanada 2003). Elle est ubiquitaire mais exprimée plus fortement dans le foie et l'estomac. L'absence d'une sous-unité est létale au stade embryonnaire tandis que les individus hétérozygotes pour les mutations de ces sous-unités ont des niveaux de sphingolipides plasmatiques et cellulaires très affectés (Merrill 2002; Hojjati *et al.* 2005). La 3-cétosphinganine formée par la SPT est ensuite réduite pour former la sphinganine ou dihydrosphingosine. La troisième étape consiste en l'attachement d'un acide gras pour générer le dihydrocéramide, donnant directement le céramide après insertion d'une double liaison *cis* 4-5 par une désaturase.

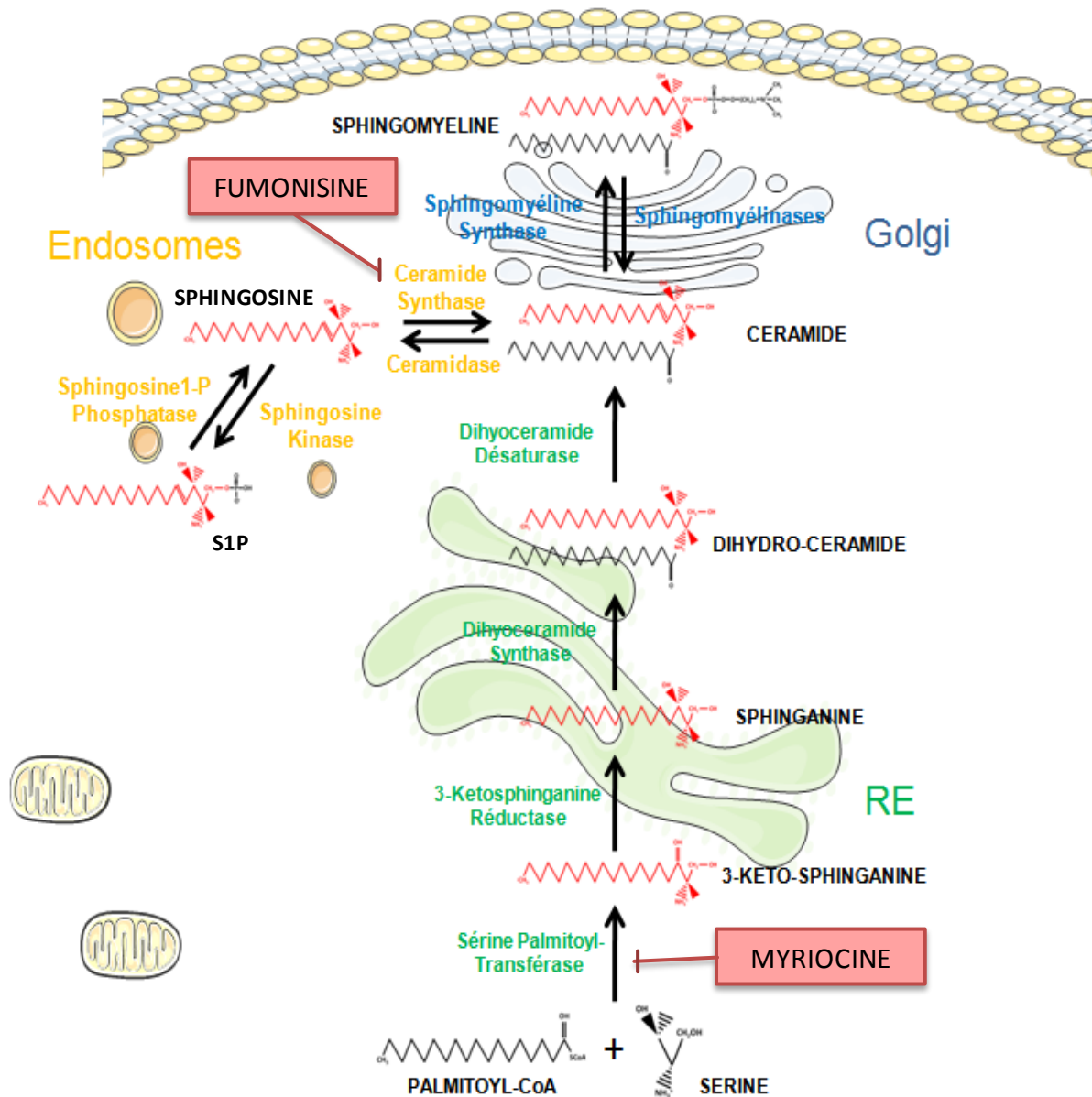


Figure 17 : Voies de synthèse des sphingolipides.

Les céramides, au centre du système, sont issus de l'hydrolyse de la SM dans la membrane plasmique (bleu), ou formés au cours de la voie de recyclage (orange), ou issus de la synthèse de novo qui a lieu dans le RE (vert). La synthèse des sphingolipides complexes prend place dans le Golgi. La dégradation du céramide en intermédiaires sphingolipidiques (orange) a lieu dans les endosomes.

2.3.3 Voie de recyclage

La dégradation de la SM en céramide par les sphingomyélinases membranaires initie la voie de recyclage. Le céramide est clivé par la céramidase pour donner la sphingosine, qui est phosphorylée par les sphingosine kinases et donne la S1P, tandis qu'un flux inverse peut redonner le céramide à partir de la sphingosine grâce à la céramide synthase, après déphosphorylation de la S1P par la S1P-phosphatase. La S1P est sécrétée et agit de manière autocrine/paracrine via une famille de récepteurs présents à la surface extracellulaire, ou elle

est recyclée, ou bien encore elle sort du cycle en étant clivée par la S1P lyase en palmitaldéhyde (ou hexadécénal sous forme insaturée) et en éthanolamine-phosphate dirigés vers d'autres voies de synthèse (Riboni *et al.* 1997). Dans les cellules traitées à la fumonisine (dans lesquelles le recyclage de la sphingosine est bloqué), l'accumulation de sphingosine induit une forte augmentation de sa dégradation : un tiers de l'éthanolamine constituant les PE dérive du catabolisme sphingolipidique, ce qui illustre l'importance de ce flux catabolique. Le céramide peut également être converti, via la céramide kinase, en céramide-1-phosphate, qui a des propriétés mitogènes et anti-apoptotiques opposées à celles du céramide. Il est en plus un médiateur de la réponse inflammatoire qui stimule la synthèse de prostaglandines via la phospholipase A2 (Arana *et al.* 2010).

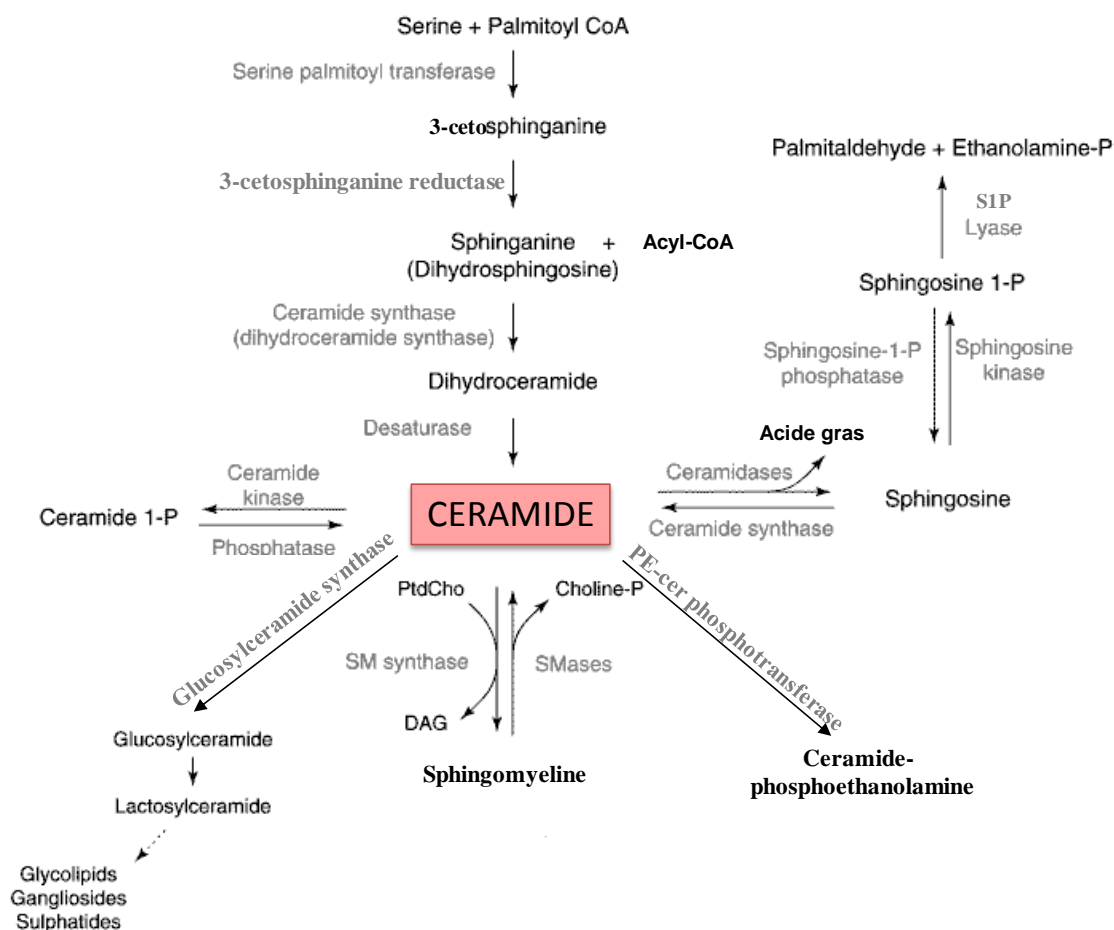


Figure 18 : Voies de conversion du céramide dans la cellule.

Le céramide joue un rôle de connecteur central vers lequel toutes les voies convergent.
D'après Hannun et Luberto, 2000.

2.3.4 Compartimentation des voies de synthèse

Le céramide, provenant de la voie *de novo*, ou de la voie de recyclage, ou directement généré par l'hydrolyse de la SM par les sphingomyélinases agoniste-dépendantes, sert de précurseur pour tous les sphingolipides complexes (SM, glucosylcéramide, gangliosides, etc.). La synthèse *de novo* de céramide est catalysée par des enzymes liées à la face cytosolique du RE (Mandon *et al.* 1992). Le céramide peut ensuite donner des sphingolipides complexes au niveau de la lumière du Golgi où il est transféré par des mécanismes vésiculaires (Fukasawa *et al.* 1999; van Meer et Holthuis 2000), ou non vésiculaires médiés par des protéines de transport spécifiques comme CERT (Hanada *et al.* 2003) (*figure 18*). Ces transporteurs extraient les céramides des membranes du RE et les adressent au Golgi grâce à leur domaine PH. La synthèse de la SM, à partir de céramide, est effectuée sur la face interne du Golgi par la SM synthase qui transfère un groupement phosphocholine de la phosphatidylcholine au céramide, libérant un diacylglycérol au cours de ce processus. Un processus analogue en présence de phosphatidyléthanolamine donne la céramide-phosphoéthanolamine (Riboni *et al.* 1997). Le glucosylcéramide est synthétisé sur la face cytosolique du Golgi ; il peut être converti en GSL complexes (lactosylcéramide par exemple) dans le *Trans*-Golgi après translocation vers la face interne par des transporteurs comme la glycoprotéine P-MDR1 (Borst *et al.* 2000), connus pour réguler la disponibilité des glycolipides dans les plates-formes de signalisation (van Meer et Holthuis 2000). L'hydrolyse de la SM, en réponse à des stimuli externes, par la sphingomyélinase neutre a lieu surtout sur le feuillet externe de la membrane plasmique où le céramide peut ensuite être transloqué d'un feuillet à l'autre (Gorski *et al.* 2002). Par contre, les céramides générés par les sphingomyélinases acides sont synthétisés dans les endosomes/lysosomes. Des études récentes suggèrent aussi l'existence d'un cycle de la SM dans le noyau, et de pools spécifiques de sphingosine mitochondriale, endosomale et lysosomale (Bionda *et al.* 2004; Watanabe *et al.* 2004).

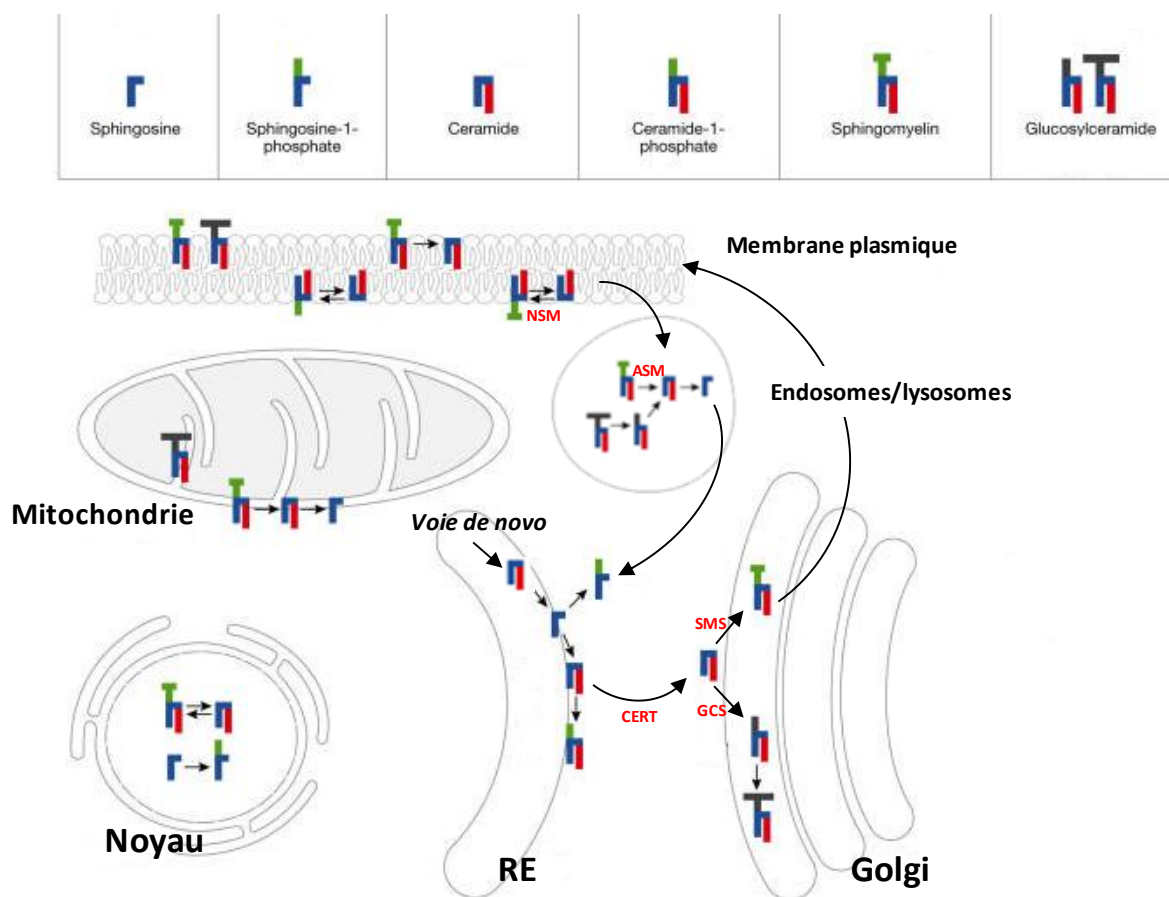


Figure 19 : Localisation des voies de synthèse des sphingolipides dans la cellule.

Illustration des différentes voies métaboliques et des sites cellulaires associés. ASM : Sphingomyelinase acide ; NSM : Sphingomyelinase neutre ; SMS : SM-synthase ; GCS : Glycosylcéramide-synthase. D'après Futerman et Hannun, 2004.

Etant donné leurs effets antagonistes et parfois délétères pour la cellule, l'équilibre entre les différents intermédiaires sphingolipidiques est vital. Le métabolisme des sphingolipides est donc étroitement contrôlé à divers niveaux : via l'expression et l'activité d'enzymes-clés comme la SPT, les Céramides synthases et la Dihydrocéramide désaturase, et via le transport et la disponibilité locale des substrats (Yasuda *et al.* 2001). La liste des agents qui stimulent ces voies métaboliques est considérable. Ainsi, les "récepteurs de mort", les radiations UV, les agents chimiothérapeutiques, activent à la fois les sphingomyélinases et la synthèse *de novo* de céramide. Le choc thermique est un activateur spécifique de la voie *de novo*. Les facteurs de croissance (PDGF, IGF, VEGF), les cytokines, l'hypoxie, les récepteurs Fc, activent aussi la sphingosine kinase et la formation de S1P (Hannun et Obeid 2008).

2.4 Fonctions biologiques des principaux sphingolipides

Les sphingolipides ont un rôle majeur dans la constitution et les propriétés des membranes cellulaires. De plus, ils sont considérés comme des médiateurs, relayant l'action de signaux extracellulaires variés. Chaque sphingolipide a un mode d'action qui lui est propre. Leur localisation subcellulaire joue un rôle majeur dans leur mode d'action, étant donné la présence de pools membranaires spécifiques.

2.4.1 Le céramide

C'est le sphingolipide le plus simple d'un point de vue structural, puisqu'il est issu de la condensation d'un acide gras et de la sphingosine. Il est synthétisé par les céramides synthases, à partir de la voie *de novo* ou du recyclage de la sphingosine, ou par l'hydrolyse de sphingolipides complexes par les sphingomyélinases et glycosidases (*figure 18*). Il a donc un rôle central au carrefour des différentes voies métaboliques, à la fois comme précurseur de sphingolipides complexes indispensables, et comme molécule clé dans la signalisation (Hannun et Obeid 2002). Au contraire des autres sphingolipides, le céramide est d'une nature relativement hydrophobe (sa région hydrophile se limitant aux deux groupements hydroxyles), limitant son transfert spontané à travers le cytosol (Venkataraman et Futerman 2000) d'où l'existence de transporteurs spécialisés comme CERT (Hanada *et al.* 2003).

Comme les propriétés et les fonctions du céramide sont influencées par la taille et le degré d'insaturation de son substituant acyle, on parle fréquemment "des céramides", considérant ceux-ci comme un ensemble de facteurs similaires mais non identiques. L'idée émerge d'une spécialisation des espèces moléculaires de céramides, leur fonction étant liée à la nature de leurs chaînes grasses : ainsi les céramides en C16 et les céramides en C24 sont séquentiellement formés, à des phases différentes de la réponse apoptotique induite par activation du récepteur des cellules B (Kroesen *et al.* 2003). La formation d'espèces particulières est liée à la spécificité de reconnaissance de certaines enzymes de synthèse. Ainsi, par exemple, chez les mammifères 6 gènes Lass (Longevity assurance) codent pour des Céramide synthases de spécificités différentes: Lass1 catalyse la condensation des chaînes en C18 ; Lass2 et 4 ont une préférence pour les chaînes longues (C22 et C24). Lass5 et 6 produisent des espèces de céramide à chaînes courtes (C14 et C16). Lass3, par contre, a peu de spécificité et sa surexpression induit l'accumulation de C18:0-, C22:0-, et C24:0-céramides

(Teufel *et al.* 2009). La spécificité de fonction des espèces moléculaires de sphingolipides est donc très probable, mais de nombreuses questions demeurent ; par exemple, lorsque plusieurs enzymes agissent sur le même substrat, comment est régulé le devenir du céramide en SM ou sphingosine ou glyco-sphingolipide? Les céramides exogènes à courte chaîne cell-perméants sont des outils intéressants pour mimer les mécanismes qui ont lieu naturellement dans la transduction du signal, même si leurs effets sont parfois différents de ceux des céramides à longues chaînes endogènes (Abe *et al.* 1992).

Outre leur rôle d'intermédiaire métabolique, les céramides sont d'importants seconds messagers impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que l'induction de l'apoptose, de la différenciation, l'inhibition de la prolifération et la régulation du processus inflammatoire (Gorski *et al.* 2002). Fonctionnellement, les céramides sont des médiateurs et coordinateurs de la réponse au stress chez les eucaryotes (Hannun 1996).

L'augmentation des céramides intracellulaires par ajout de formes exogènes à courtes chaînes (Obeid *et al.* 1993) ou par stimulation de leur synthèse par addition de sphingomyélinase bactérienne (Jarvis *et al.* 1994) induit l'apoptose chez des cellules HL-60. Les céramides sont un médiateur de l'apoptose induite par les cytokines dont le TNF α (par la voie FAS ou par le récepteur BcR des lymphocytes B) (Hannun et Obeid 2008), par les U.V. (Rotolo *et al.* 2005), ou encore par les agents anti-néoplastiques comme la daunorubicine (Bose *et al.* 1995; Ohanian et Ohanian 2001). En général, les céramides induisent l'apoptose en amont de la voie mitochondriale en inhibant la voie PI3K-Akt, en déphosphorylant Bad (un membre de la famille Bcl-2), ce qui aboutit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et au relargage de médiateurs apoptotiques (Woodcock 2006). Les céramides peuvent aussi induire l'apoptose en activant la protéase cathepsine D qui couple la sphingomyélinase lysosomale à la voie mitochondriale d'apoptose en réponse au TNF α (Heinrich *et al.* 2004).

Les céramides sont accumulés dans diverses situations de différenciation : lors de la différenciation de la lignée pro-myéloïde HL-60 provoquée par une déplétion en sérum (Jayadev *et al.* 1995) ou par la vitamine D3 (Okazaki *et al.* 1989; Kim *et al.* 1991) ; lors de différenciation myogénique en réponse à l'Arginine Vasopressine (AVP) dans les cellules L6 (Mebarek *et al.* 2007) ; et lors de la différenciation monocytaire en réponse aux cytokines comme l'interféron gamma (Kim *et al.* 1991). Une augmentation rapide et transitoire des

niveaux de céramides est observée dans tous ces cas. Les céramides ont aussi des propriétés anti-prolifératives : ils s'opposent aux effets prolifératifs des esters de phorbol sur les neutrophiles, en agissant sur les MAPK régulant les cyclines au cours du cycle cellulaire (Gomez-Munoz *et al.* 1994). Les céramides s'opposent aux effets des médiateurs pro-mitogènes céramide-phosphate, SIP, acide phosphatidique, en stimulant leur dégradation ou inhibant leur synthèse. Par ailleurs, ils s'opposent à la croissance axonale (Schwarz *et al.* 1995).

Il existe de nombreuses cibles protéiques intracellulaires directes et indirectes des céramides, notamment des kinases et phosphatases. Parmi elles, on trouve la kinase MLK (Mixed Lineage Kinase) connue pour réguler la voie Stress-Activated Protein Kinase (SAPK) en réponse au TNF α (Sathyanarayana *et al.* 2002), et KSR (Kinase Suppressor of Ras) décrite à l'origine comme l'enzyme Ceramide-Activated Protein Kinase (CAPK) qui contrôle la voie MAPK (Zhang *et al.* 1997). L'apoptose céramide-induite implique souvent l'activation de la voie Stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase (SAPK/JNK) et l'inhibition de la voie mitogénique des MAPK (Jarvis *et al.* 1997). L'activation de JNK et de SAPK par les céramides est indirecte, et aussi médiée par l'activation de la petite protéine G Rac-1, ou de la PKC atypique ξ qui, elle, est directement activée par les céramides (Ruvolo 2003). Les céramides sont des activateurs des protéines phosphatases PP2A et PP1 (Chalfant *et al.* 1999), avec comme conséquences l'inactivation des voies PKC α et Akt (Lee *et al.* 1996; Schubert *et al.* 2000), et la déphosphorylation de la protéine Rb, qui induit l'arrêt du cycle cellulaire (Dbaiho *et al.* 1995). La synthèse de céramide régule aussi la translocation d'une autre PKC, l'isoforme β 2, vers un compartiment périnucléaire. En effet, dans de nombreux types cellulaires dont les HEK293, les esters de phorbol induisent une translocation membranaire rapide de la PKC β 2, puis une translocation secondaire périnucléaire liée à l'activation de la PLD. Cette translocation est inhibée dans les MCF-7, par une accumulation de céramides inhibant la PLD (Becker et Hannun 2004; Becker et Hannun 2005).

Les céramides agissent aussi sur des effecteurs aussi divers que le facteur de transcription NF κ B, les caspases (CPP32-like), c-myc (Kroesen *et al.* 2003). Une autre cible importante des céramides est la PLD, impliquée dans de nombreuses fonctions: prolifération, survie cellulaire, remaniements du cytosquelette, trafic vésiculaire, sécrétions, etc. (Selvy *et al.* 2011). Ceux-ci pourraient agir en inhibant la translocation des activateurs de PLD: PKC α .

et β , ARF et RhoA. Cependant, d'autres mécanismes pourraient expliquer l'inhibition de la PLD par les céramides: une compétition pour le cofacteur PIP2 indispensable à l'activité PLD, ou la désorganisation des rafts induisant une délocalisation de la PLD et la rupture de ses interactions avec d'autres protéines (Exton 1997). L'inhibition de la PLD est un mécanisme clé de l'action anti-proliférative des céramides. L'effet anti-myogénique des céramides dans les cellules L6 et les cellules satellites peut aussi s'expliquer par une inhibition de la PLD (Mebarek *et al.* 2007).

Au niveau du muscle, il y a relativement peu de données sur le rôle et la synthèse des céramides. La teneur du muscle *in vivo* en céramides a été étudiée au début des années 90 par Turinsky *et al.*, qui ont montré l'élévation des taux de céramides après dénervation des muscles, et chez des rats obèses (Turinsky *et al.* 1990). De manière intéressante, cette équipe a aussi montré l'augmentation des niveaux de céramides musculaires en réponse à l'endotoxine et au jeûne (Turinsky *et al.* 1991). Le contenu en céramides (et en SM) est plus important dans les muscles lents oxydatifs (l'activité sphingomyélinase suit la même tendance), et il est fortement réduit par l'exercice (Dobrzyn *et Gorski* 2002). *In vitro*, les céramides ont des propriétés anti-myogéniques : ils limitent la différenciation de lignées myogéniques et de cellules satellites (Mebarek *et al.* 2007). Les céramides agissent sur la croissance des myotubes en bloquant la synthèse protéique, via l'inhibition du transport d'acides aminés (Hyde *et al.* 2005).

Les céramides ont aussi des fonctions structurales, puisqu'ils contribuent à l'ordonnement lipidique des membranes et affectent leur perméabilité (Ruvolo 2003). Les membranes biologiques présentent des domaines aux propriétés particulières, moins fluides, où les lipides sont organisés en phase "liquide-ordonnée", insolubles dans les détergents à froid. Ces microdomaines lipidiques ou « rafts » présents dans la bicouche lipidique sont enrichis en sphingolipides et en cholestérol. Ils servent de plateformes de signalisation régulant la disponibilité des récepteurs et protéines transmembranaires (van Meer *et Lisman* 2002). Jusqu'à 70% de la SM cellulaire peut être trouvée dans les rafts, et de nombreuses études montrent que son hydrolyse en céramide par la sphingomyélinase acide se produit dans les rafts. Cette formation de céramide altère leurs propriétés. Ainsi, dans divers types cellulaires, l'activation de la sphingomyélinase acide induite par de nombreux stimuli (FAS, CD40, U.V.) induit rapidement la formation de "patches" enrichis en céramide, qui fusionnent

pour former des domaines plus larges, nécessaires à l'oligomérisation des récepteurs et à la transmission de leur signal (Kolesnick 2002).

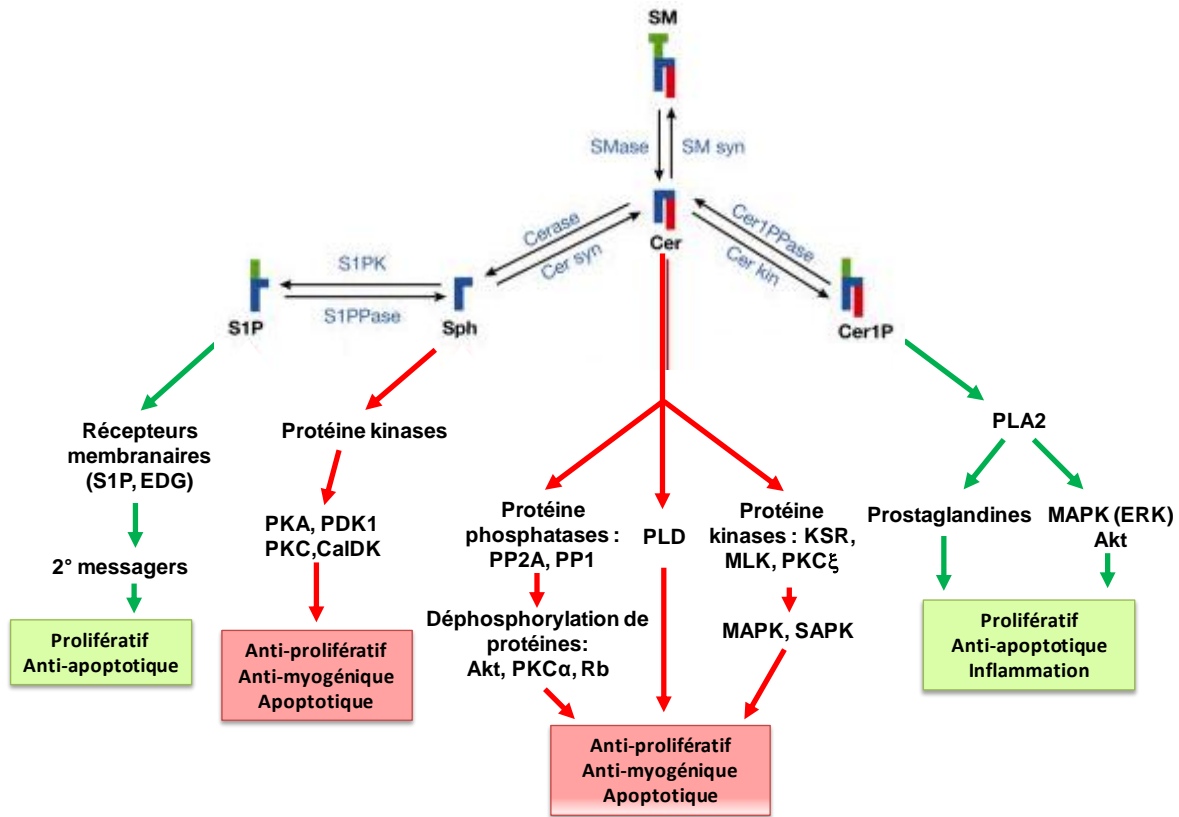


Figure 20 : Effets et fonctions des différents intermédiaires de la voie de synthèse des sphingolipides.

PLA2 : Phospholipase A2 ; PKA : Protéine kinase A ; ERK : Extracellularly Regulated Kinase ; S1PK : Sphingosine kinase ; S1Pase : S1P Phosphatase ; Cerase : Céramidase ; Cer syn : Céramide synthase ; SMase : Sphingomyélinase ; SM syn : SM synthase ; Cer1PPase : Céramide-1-phosphate phosphatase ; Cer kin : Céramide kinase.

2.4.2 La sphingosine

C'est un précurseur du céramide dans la voie de recyclage, mais c'est aussi un médiateur doté de fonctions propres. L'activation de la voie des sphingolipides en réponse à de nombreux stimuli entraîne l'accumulation d'intermédiaires métaboliques, en particulier le céramide et la sphingosine, qui ont des effets redondants. Leur interconvertibilité rend parfois difficile l'interprétation de leurs effets propres (Woodcock 2006). Chez la levure, la sphingosine joue un rôle majeur dans le processus d'endocytose et l'organisation du cytosquelette d'actine, en activant les Pkh kinases homologues de la 3-phosphoinositide-

dependent kinase-1 (PDK1) (Friant *et al.* 2001). Chez les mammifères, la sphingosine agit en inhibant des kinases comme les kinases calmoduline-dépendantes (Cuvillier 2002) et la PKC, ce qui résulte en l'inhibition de la différenciation des cellules HL60, et de l'explosion respiratoire chez les neutrophiles (Hannun *et al.* 1986). Elle active par contre d'autres kinases comme la caséine kinase II, la PKC atypique ξ (d'abord dénommée SDK1 pour Sphingosine Dependant Kinase 1), la PKA (Ma *et al.* 2005) et PDK1, jouant ainsi un rôle double dans la phosphorylation des protéines (Friant *et al.* 2001). En particulier, l'activation de la PKC ξ est liée à la régulation des protéines de type 14-3-3 qui modulent la fonction de protéines clé dans l'apoptose, en les séquestrant dans le cytoplasme (Hamaguchi *et al.* 2003). Il a été montré que la sphingosine active l'autophosphorylation de PDK1 et accroît la phosphorylation de substrats reconnus de PDK1, tels que les kinases PAK1 (p21-activated kinase 1), Akt et PKC β (King *et al.* 2000). La plupart des études attribuent par ailleurs à la sphingosine un rôle de médiateur de l'arrêt de la croissance et de l'apoptose. Des signaux tels que les cytokines, l'irradiation, des cytotoxiques, la liaison de FAS, induisent la formation de sphingosine et provoquent l'apoptose accompagnée de la fragmentation de l'ADN, de la down-régulation de c-myc, de Bcl-2, Bcl-xL, l'activation de JNK et p38, et l'inhibition de ERK, dans divers types cellulaires (Cuvillier 2002).

2.4.3 La Sphingosine-1-phosphate

L'enzyme responsable de la synthèse de S1P est la sphingosine kinase pour laquelle deux isoformes, SK1 et SK2, sont connues. Elle est activée en réponse à de nombreux stimuli, dont le PDGF, le NGF, l'IGF, les agonistes muscariniques, les cytokines comme le TNF α et IL-1 β , la vitamine D3, le cross-linking des récepteurs des immunoglobulines Fc ϵ RI et Fc γ RI, etc. En ce qui concerne la stimulation de l'isoforme SK1 par le TNF α , observée dans les cellules endothéliales, les fibroblastes, les monocytes, elle fait intervenir une phosphorylation par les kinases ERK1/2, et une interaction directe avec la protéine adaptatrice TRAF-2 liée au récepteur. La stimulation prolongée des cellules MCF-7 par le TNF α induit une down-régulation de SK1 par protéolyse, un arrêt de la synthèse de S1P et une accumulation de céramides, menant à la mort cellulaire (Snider *et al.* 2010).

La S1P agit principalement de manière autocrine ou paracrine. Après synthèse intracellulaire, le plus souvent au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique en

réponse à des agonistes, elle est exportée par des transporteurs de la famille ABC (Mitra *et al.* 2006) et peut se fixer sur ses récepteurs EDG (ou S1PR) présents à la surface cellulaire (Spiegel et Milstien 2002). Cinq récepteurs S1PR ont été identifiés à ce jour. Ces récepteurs sont diversement exprimés dans les tissus, et sont couplés à de multiples protéines G, activant des voies de signalisation diverses. La S1P active par exemple des voies de signalisation qui stimulent la prolifération et protègent contre l'apoptose, telles la voie ERK/MAPK, et inhibe la protéine kinase JNK activée par le stress (Cuvillier *et al.* 1996). La S1P active des petites protéines G en aval des protéines G hétérotrimériques, telles que Rac, impliquée dans la formation de l'actine corticale et la mobilité cellulaire, et Rho, impliquée dans la formation des fibres de stress (Spiegel et Milstien 2002). La S1P a été impliquée dans de multiples processus physiologiques et physiopathologiques : l'angiogénèse, la migration, la survie et la prolifération cellulaires, l'architecture cellulaire, l'adhésion, le développement cardiaque, la formation des vaisseaux, l'athérogénèse, les lésions pulmonaires aiguës et la détresse respiratoire, la tumorigénèse et les métastases, l'inflammation et l'immunité (Snider *et al.* 2010).

Dans le plasma humain, 65% de la S1P est associée aux lipoprotéines en particulier aux HDL, qui en sont les principaux transporteurs (Okajima 2002). Elle est véhiculée jusqu'aux cellules endothéliales dont sa liaison aux récepteurs S1PR/EDG membranaires stimule la croissance et la survie. Elle aurait, en conséquence, un effet bénéfique anti-inflammatoire dans l'athérosclérose (Kimura *et al.* 2003).

Certains effets de S1P semblent attribuables à une action sur des cibles intracellulaires. En particulier, la microinjection de S1P, ou l'apport de S1P encapsulée qui augmentent les taux intracellulaires de S1P, mobilisent le calcium et augmentent la prolifération et la survie cellulaire. Les cibles intracellulaires de S1P ne sont cependant pas identifiées (Spiegel et Milstien 2002).

La S1P, accumulée en réponse à de nombreux facteurs de croissance et de survie, est impliquée dans les voies de prolifération et de survie, à l'inverse de ses précurseurs céramide et sphingosine, produits en réponse aux facteurs de stress. Il a donc été suggéré que l'équilibre dynamique entre les taux de S1P intracellulaire d'une part, et les taux de céramide et sphingosine d'autre part, est un facteur important pour la détermination du devenir de la cellule. On a parlé à ce propos de "Sphingolipid rheostat" (Spiegel et Milstien 2002). Le rôle

de la sphingosine kinase dans ce "Sphingolipid rheostat" est crucial, car elle contrôle le ratio entre céramides et S1P (Snider *et al.* 2010). Ce concept est illustré par le puissant effet pro-apoptotique d'un inhibiteur de la sphingosine kinase, la diméthyl-sphingosine (DMS), qui empêche la formation de S1P et induit l'accumulation de sphingosine et de céramide (Ohta *et al.* 1994).

2.4.4 La sphingomyéline

La SM est le composant majeur de la membrane plasmique (20% du total de lipides) et des organites qui en dérivent (endosomes et lysosomes). Elle est presque exclusivement présente sur le feuillet externe de la membrane. Elle joue un rôle structural évident, en garantissant le maintien de l'intégrité cellulaire (Kolesnick 1987). Les rafts lipidiques sont constitués d'un assemblage dense de sphingolipides (GSL et SM) compactés avec du cholestérol dans le feuillet exoplasmique de la membrane. Ces structures insolubles dans les détergents servent de plate-formes de signalisation, de par leur capacité à recruter certaines protéines (Simons et Ikonen 1997). Les propriétés des rafts sont dues en partie à la conformation particulière de la SM (faible degré d'insaturation, structure asymétrique due à l'acide gras notablement plus long que la queue paraffinique de la sphingosine, structure interfaciale plus polaire que celle de la phosphatidylcholine), à l'origine d'une température de fusion élevée qui augmente la viscosité et la stabilité de la membrane localement (Riboni *et al.* 1997). La SM est aussi un constituant majeur des lipoprotéines. Sa synthèse dans le foie à partir du céramide formé *de novo* influe considérablement sur les taux de lipoprotéines circulantes (Li *et al.* 2009).

La synthèse de la SM est effectuée, sur la face interne du Golgi par la SM synthase, qui transfère un groupement phosphocholine de la phosphatidylcholine au céramide, en libérant un diacylglycérol (Riboni *et al.* 1997). La SM synthase module donc simultanément les taux de ces deux seconds messagers qui ont des effets biologiques antagonistes (pro-prolifératif pour le diacylglycérol, pro-apoptotique pour le céramide). Elle a donc des potentialités d'actions biologiques considérables, en constituant une passerelle entre les métabolismes des sphingolipides et des glycérophospholipides (Tafesse *et al.* 2006).

La SM joue un important rôle dans la signalisation, en étant hydrolysée par des sphingomyélinases en réponse à des agonistes, et en libérant le messenger céramide. De

nombreux stimuli de stress induisent l'activation des sphingomyélinases, l'accumulation de céramide, et des réponses d'arrêt cellulaire ou d'apoptose. Il existe trois classes de sphingomyélinases, distinguées selon leur pH optimal, neutre, acide, ou alcalin. Les sphingomyélinases neutres sont activées par le TNF α ou le stress oxydant. L'isoforme 2 est localisée sur la face interne de la membrane plasmique et du Golgi. La forme acide (pH optimal à 5), est au contraire soluble, et est présente, sous sa forme mature, dans le compartiment endosomal/lysosomal. Une déficience en sphingomyélinase acide est responsable, chez l'humain de la maladie de Niemann-Pick, maladie de stockage lysosomal, caractérisée par une accumulation de SM dans les cellules et tissus. Beaucoup de stimuli de stress, dont une bonne part stimulent aussi les sphingomyélinases neutres, activent la sphingomyélinase acide, tels que les radiations ionisantes, les agents cytotoxiques, la lumière UV, la chaleur, ainsi que certains agents infectieux comme des bactéries et des virus (Perrotta et Clementi 2010).

2.4.5 Les glycosphingolipides

Les glycosphingolipides (GSL) sont formés d'un module céramide lié à une tête hydrophile composée de résidus de sucres en nombre variable : on dénombre plus de 500 GSL distincts, tels que les cérébrosides, portant un seul groupement glucidique, les gangliosides, portant un ou plusieurs acides sialiques inclus dans une chaîne oligosaccharidique, etc. La biosynthèse des GSL est accompagnée d'un transport vésiculaire, ils sont formés dans l'appareil de Golgi puis exportés vers la membrane plasmique via les endosomes (Kolter *et al.* 2002). Ils sont surtout localisés sur le feuillet externe de la membrane plasmique où ils sont utilisés comme sites de reconnaissance et de fixation par les virus, bactéries et toxines (Karlsson 1989). Mais ils ont aussi un rôle de modulateurs de la signalisation transmembranaire, et participent à la reconnaissance cellulaire pour les interactions cellule/cellule ou cellule/substratum. Ils induisent la différenciation, par des mécanismes mal définis : ainsi, des cellules HL60 incubées avec le ganglioside GM3 différencient en monocytes, alors que l'apport de sialylparagloboside les fait différencier en granulocytes (Hakomori 1990). Ils sont abondants dans la membrane des neurones (van Echten et Sandhoff 1993), et les gangliosides, notamment, sont nécessaires à la croissance axonale, ainsi que le démontrent l'inhibition de la synthèse et l'inhibition de la dégradation de leur précurseur glucosylcéramide (Schwarz *et al.* 1995). Les gangliosides GM1 et GM3 inhibent la

prolifération des cellules 3T3 en inhibant le récepteur du PDGF. De même, la signalisation de l'insuline est inhibée par certains gangliosides (Hakomori 1990). Ils contribuent aussi aux phénomènes d'adhésion cellulaire en interagissant avec les protéines membranaires de la famille des sélectines comme ELAM-1 (Endothelial leukocyte adhesion molecule-1), permettant ainsi le recrutement des neutrophiles sur les sites de l'inflammation (Phillips *et al.* 1990). Les GSL sont fortement enrichis au niveau des rafts lipidiques, où ils rigidifient la structure par un réseau de liaisons hydrogènes avec le cholestérol. Il a été proposé que les GSL à très longue chaîne (C24) modifient fortement la structure membranaire en provoquant une interdigitation des chaînes grasses appartenant à chacun des feuilletts membranaires. Il a été montré que la présence de lactosylcéramide en C24 est nécessaire à la transduction du signal induit dans les neutrophiles par les pathogènes, et à la réponse cellulaire appropriée (chimiotaxie, génération d'anions superoxyde, etc.) (Sonnino *et al.* 2009).

2.5 Rôle physiopathologique des sphingolipides

Les sphingolipides sont impliqués dans des pathologies très diverses. Ainsi, les effets cytotoxiques des céramides interviennent dans la neurodégénérescence intervenant lors de la maladie d'Alzheimer. En effet, le peptide amyloïde β induit la production de céramides dans des neurones *in vitro*, et des céramides à longue chaîne sont accumulés dans le cerveau des patients (Cutler *et al.* 2004). Plusieurs études ont montré le potentiel carcinogène de la voie des sphingolipides : l'inhibition de la céramide synthase par injection de la toxine fumonisine B1 ou par consommation de denrées alimentaires contaminées par *Fusarium moniliforme* (le micro-organisme produisant cette toxine) induit une forte augmentation des taux de bases sphingoïdes (sphingosine, sphinganine) dans le sang, le foie, l'estomac et le rein, couplée à une forte diminution des sphingolipides complexes, et à une apoptose dans ces tissus. Il en résulte une hépatotoxicité et une néphrotoxicité, à l'origine de tumeurs dans de nombreux modèles animaux et chez l'homme, où l'incidence de la fumonisine sur les cancers du foie et de l'œsophage est démontrée (Thiel *et al.* 1991; Wang *et al.* 1992; Riley *et al.* 1993; Ueno *et al.* 1997; Tsunoda *et al.* 1998; Riley *et al.* 2001). Les premières utilisations *in vivo* des céramides datent de la fin des années 90 avec l'apparition de céramides en cosmétologie, les publicitaires vantant leur intérêt dans les shampoings et les crèmes (Kester et Kolesnick 2003). Cette idée se justifie par leur potentiel à renforcer la barrière épidermique puisque les (glycosyl)céramides sont les composants principaux de la couche cornée de l'épiderme qui garantit l'imperméabilité de la peau (Wertz 2000). Cependant, les pathologies où l'effet des sphingolipides est le mieux documenté sont la résistance à l'insuline, l'inflammation et le cancer.

2.5.1 Céramides et insulino-résistance

L'obésité prédispose les individus au développement de la résistance à l'insuline, au niveau du foie et du muscle. Divers mécanismes sont proposés pour expliquer comment l'excès d'adiposité s'oppose à l'action de l'insuline. Premièrement, quand la capacité de stockage du tissu adipeux est dépassée, les graisses s'accumulent dans des tissus non adaptés, ce qui induit la formation de métabolites inhibiteurs de la signalisation de l'insuline. Par ailleurs, l'obésité déclenche un état d'inflammation chronique, et les cytokines relarguées par

le tissu adipeux ou les macrophages qui y sont infiltrés antagonisent l'action de l'insuline. Dans les deux cas, les céramides semblent impliqués (Summers 2006). En effet, les taux de céramides et de diacylglycérol sont élevés dans le tissu musculaire de rats obèses par rapport aux rats témoins (Turinsky *et al.* 1990). De même, chez l'humain les taux de céramides ont été trouvés très augmentés dans les muscles de patients obèses, et une corrélation négative a été observée entre ces taux et la sensibilité à l'insuline (Strackowski *et al.* 2004).

De nombreuses études montrent que les céramides inhibent le transport du glucose et la synthèse du glycogène stimulés par l'insuline (Wang *et al.* 1998). Parmi les éléments de la voie de signalisation de l'insuline susceptibles d'être affectés par les céramides, IRS-1 a été évoqué par plusieurs laboratoires. IRS-1 serait phosphorylé et inactivé via l'activation par les céramides de kinases telles que ERK2, p38 MAPK, JNK, IKK (NF κ B inhibitor kinase). La PI3 kinase pourrait elle-aussi être inhibée par les céramides. Cependant, l'implication de ces deux cibles est sujette à controverse. Par contre, l'inhibition de Akt par les céramides est unanimement acceptée. Elle se produit par deux mécanismes simultanés: les céramides activent la phosphorylation PKC ξ -dépendante du résidu Thréonine34 d'Akt, ce qui inhibe la translocation de l'enzyme ; d'autre part, ils activent la phosphatase PP2A, qui enlève les phosphates en positions Sérine 473 et Thréonine 308, nécessaires à l'activité de l'enzyme (Summers 2006). De plus, il a été démontré que la formation de céramide explique l'effet inhibiteur des acides gras saturés sur la voie de l'insuline dans des myotubes en culture (Schmitz-Peiffer *et al.* 1999) et que le TNF α induit la déphosphorylation d'Akt en activant PP2A, effet qui est reproduit par un céramide exogène, dans des adipocytes en culture (Teruel *et al.* 2001).

2.5.2 Sphingolipides et inflammation

Le TNF α , une cytokine pro-inflammatoire fortement augmentée chez des patients atteints de pathologies chroniques (insuffisance rénale, cancer, SIDA, diabète, infections diverses), est un régulateur important des taux de sphingolipides intracellulaires : la fixation du TNF α sur son récepteur induit l'hydrolyse de la SM et produit une accumulation rapide de céramide. Un des effets du céramide est d'activer le facteur de transcription NF- κ B qui impliqué dans la réponse inflammatoire en induisant l'expression de cytokines, chimiokines, chimioattractants, d'enzymes pro-inflammatoires comme la cyclo-oxygénase 2 (COX2). Le TNF α induit aussi l'activation de la cPLA2 qui permet de relarguer l'acide arachidonique à la

source de dérivés pro-inflammatoires, peut-être via la conversion du céramide en céramide-1-phosphate (Nixon 2009). La fixation du TNF α induit aussi une stimulation de la sphingosine kinase SK1 et la production de S1P, qui a été reliée à l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, à l'activation de la COX2 et à la production de la prostaglandine PGE2. De plus, il a été montré que la voie SK1/S1P/S1PR régule de nombreux types de cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation: migration des monocytes, réponse des macrophages et des cellules microgliales au lipopolysaccharide, production de cytokines par les macrophages et chimiotaxie induites par le peptide C5a, dégranulation et production de cytokines par les mastocytes. La disponibilité récente de modulateurs des récepteurs S1PR a permis de montrer leur implication dans la migration des lymphocytes. Notamment, FTY720 qui down-régule les S1PR, diminue le nombre de lymphocytes circulants en inhibant leur sortie du thymus, et présente des potentialités thérapeutiques intéressantes. Divers processus impliqués dans les crises d'asthme impliquent en effet la mise en jeu de SK et S1P : la fixation de l'antigène sur les récepteurs Fc ϵ R induit la transactivation des récepteurs S1PR2, suivie de la constriction des muscles lisses bronchiques et du recrutement de cellules inflammatoires. Dans la polyarthrite rhumatoïde, la surproduction de TNF α au niveau des articulations induit la production de S1P par les synoviocytes, et son accumulation dans le liquide synovial, couplée à la prolifération et à la sécrétion de cytokines par ces mêmes cellules. Le composé FTY720 et l'inhibiteur de SK diméthylsphingosine ont tous deux montré des effets bénéfiques dans des modèles expérimentaux de ces maladies (Snider *et al.* 2010).

2.5.3 Sphingolipides et cancer

Un défaut des voies d'apoptose est un mécanisme connu de tumorigénèse qui permet aux cellules malignes d'échapper au contrôle de l'organisme, et corriger ce défaut peut sélectivement induire l'apoptose dans ces cellules. Dans ce but, le modèle le plus étudié de synthèse agoniste-induite de céramides est celui par lequel les agents utilisés en chimiothérapie (anthracyclines, alcaloïdes et rétinoïdes auxquels on peut ajouter la radiothérapie) induisent une accumulation de céramides pro-apoptotiques dans des lignées cancéreuses (Kester et Kolesnick 2003). *In vivo*, le phénotype de multi-résistance aux drogues de certaines tumeurs trouve son origine dans un défaut de l'accumulation des céramides qui constitue un mécanisme de résistance à l'apoptose qui favorise la progression tumorale (Michael *et al.* 1997; Selzner *et al.* 2001) (Woodcock 2006). Par exemple, les lignées MCF-7

résistante à l'adriamycine (une anthracycline), et KB-V-1 résistantes à la vinblastine, présentent la particularité d'avoir des taux de céramides endogènes très bas en raison d'une forte activité glucosylcéramide synthase (Lavie *et al.* 1996; Lucci *et al.* 1999), ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante (Liu *et al.* 2001). Les céramides ont également un effet anti-angiogénique en diminuant la prolifération des cellules musculaires lisses des vaisseaux via la voie ERK-Akt (Johns *et al.* 2001). Pour la même raison, les céramides sont utilisés pour limiter la resténose après une angioplastie (Charles *et al.* 2000). Actuellement, des stratégies thérapeutiques permettant un apport ciblé de céramides, ou faisant appel à des agents qui modifient les taux de céramides endogènes (inhibiteur de céramidase B13, inhibiteur de glucosylcéramide synthase PDMP) sont en cours d'étude (Kester et Kolesnick 2003; Reynolds *et al.* 2004).

Outre ces situations pathologiques où le rôle des sphingolipides est classiquement invoqué, notre travail a permis de montrer qu'ils sont aussi impliqués dans la perte de masse musculaire. En effet, les inhibiteurs de la synthèse de céramides protègent les cellules musculaires contre l'atrophie induite par le TNF α *in vitro*, et *in vivo* contre l'atrophie induite par une tumeur (De Larichaudy *et al.*, 2012).

3 Matériel et méthodes

3.1 *Matériel*

Générateur de tension et de courant pour Western-blot : BIO-RAD Powerpac 300

Appareil d'électro-transfert : BIO-RAD Mini Protean IITM

Balance de précision : BELL engineering electronic balance

Centrifugeuse de paillasse: EPPENDORF 5415 R

Centrifugeuse haute vitesse : BECKMAN COULTER Allegra X-12R

Microscope à fluorescence : ZEISS Axiovert 200

Lecteur spectrophotométrique de plaques 96 puits : THERMO Electron Corporation

Multiskan spectrum

Sonde à ultrasons : BRANSON Sonifier 250

Thermocycleur pour PCR en temps réel: Rotor-gene 6000 CORBETT RESEARCH

Appareil pour RT-PCR: Minicycler MJ RESEARCH

Laveur de plaques : ELx50 Autostrip Washer de BIO-TEK Instruments, Inc

Compteur de radioactivité : PACKARD liquid-scintillation spectrometer

Spectromètre de masse en tandem : API 3200 MS/MS triple quadrupole (Sciex Applied Biosystems, Toronto, Canada)

Broyeur de tissus : Precellys 24 homogenizer (Bertin Technologies)

3.2 Produits

Le kit d'immunodetection ECL provient de Pierce.

Le kit de dosage de proteines Bradford provient de Bio-Rad.

Le mélange acrylamide-bisacrylamide (solution 30%), le tampon de migration Tris-Glycine-Sodium Dodécyl Sulfate, le tampon de transfert TG et le standard de migration Prestained Protein Ladder proviennent de Euromedex.

Le tween 20 provient de Sigma.

Le cocktail d'inhibiteur de protease (1000x) provient de Sigma.

Les anticorps polyclonaux anti-phospho-Thr389/Thr412-S6K1, anti-S6K1, anti-phospho-Ser473-Akt, anti-Akt , anti-phospho-Ser176/180-IKK α/β , anti-phospho-Ser65-4E-BP1, anti-PLD1 proviennent de Cell Signaling.

L'anticorps monoclonal anti-PLD1 H00005337-M02 provient de chez Abnova.

L'anticorps monoclonal anti- α -Tubuline provient de Sigma.

Les anticorps anti-IgG de souris et anti-IgG de lapin fluorescents couplés à la rhodamine ou à l'Alexa-Fluor proviennent d'Invitrogen-Molecular Probes.

Les anticorps monoclonaux anti-chaînes légères de myosine F310, et anti-myosine sarcomérique MF-20, proviennent de Developmental Studies Hybridoma Bank (Université d'Iowa)

L'anticorps polyclonal anti-troponine I-SS provient de Santa-Cruz Biotechnology.

Les anticorps secondaires anti-IgG de souris et anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase de raifort proviennent de Jackson Immunoresearch Laboratories (Soham, Grande-Bretagne).

Le DAPI provient de Molecular Probes.

Le réactif 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (réactif ELISA sensible à la lumière) et la Myosine utilisée comme standard pour l'ELISA proviennent de Sigma-Aldrich.

Le milieu de culture Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) à 4.5 g/l glucose, le serum de veau foetal (qualité standard), la trypsine-EDTA , l'antibiotique/antimycotique et la glutamine (stable, 200mM) proviennent de PPA Laboratories.

Le TNF α recombinant de rat provient d'Immunotools.

La Sphingosine-1-phosphate, la DL-Threo-Dihydro-sphingosine et la 3-O-Methyl-sphingomyeline (OMS) proviennent de Enzo Life Sciences.

L'AVP, la Myriocine, l'acide phosphatidique dioctanoyl (diC8-PA) et le GW4869 proviennent de Sigma-Aldrich.

Le C6-ceramide et la N, N-Dimethylsphingosine proviennent de Biomol Research Labs.

Le FTY 720 provient de Cayman Chemical Company.

Le réactif de transfection Hi-PerFect provient de Quiagen et les ARNi ciblant l'ARNm PLD1 et PLD2 sont synthétisés par Sigma-Aldrich. L'ARNi contrôle négatif provient de Eurogentec.

Le kit de billes magnétiques Pure Proteome Protein G provient de Millipore.

Le kit de viabilité cellulaire MTT et le kit Cell Death Detection ELISA mesurant l'apoptose proviennent de Roche.

La [³H]-L-Tyrosine (1mCi/ml, 1.48-2.22TBq/mmol) et le liquide scintillant Ultima Gold AB proviennent de Perkin-Elmer.

L'acide tri-chloro-acétique provient de Sigma-Aldrich.

Le kit de dosage de l'activité créatine kinase CK-NAC LD B provient de Sobioda.

Les tubes en verre et les bouchons phénoliques avec joint en téflon utilisés pour l'extraction avec les solvants proviennent de Corning Inc..

Les standards internes deutérés D-erythro- sphingosine (D7), 16:0 D31 ceramide (N-palmitoyl(d31)-D-erythro-sphingosine) et 16:0 D31 sphingomyeline (N-palmitoyl(d31)-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine) proviennent de Avanti Polar Lipids Inc.

Le méthanol et le chloroforme proviennent de Carlo Erba.

3.3 Méthodes

3.3.1 Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂ et 95% d'air à 37°C dans un incubateur Stéricult.

3.3.1.1 Cas des cellules L6

3.3.1.1.1 Culture des cellules L6

Les cellules utilisées sont des myoblastes L6 (sous-clone C5) isolés par (Yaffe 1968). Il s'agit d'une lignée myogénique établie à partir de cellules de rats nouveaux-nés, aux propriétés de différenciation in-vitro bien connues qui a conservé sa capacité à fusionner pour former des myotubes différenciés. Les cellules L6 constituent un modèle privilégié pour l'étude de la différenciation des cellules musculaires. Elles présentent les mêmes caractéristiques biochimiques et différenciatives que des cellules embryonnaires fraîchement prélevées et mises en culture (Shainberg *et al.* 1971).

Ce sont des cellules adhérentes. On les ensemence à une concentration d'environ 2 à 3 millions de cellules par flacon de 150 cm² où elles vont former un tapis jointif à confluence. Elles sont mises en culture dans un milieu nutritif DMEM riche en glucose (4,5g/l, supplémenté en L-Glutamine (200mM), en pénicilline (100U/ml) / streptomycine (100µg/ml) donnant le milieu complet, auquel on ajoute 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté en conditions prolifératives, et 1% de SVF en conditions de différenciation. Les cellules sont passées tous les 2 à 3 jours. Pour ce faire, on aspire le milieu, on les lave 2 fois avec du PBS stérile, puis on les décolle avec un cocktail trypsine/EDTA appliqué pendant 1 minute à 37°C. Les cellules décollées sont ensuite resuspendues dans 10 ml de milieu complet et ré-ensemencées.

3.3.1.1.2 Différenciation des cellules

Pour induire leur différenciation, les cellules sontensemencées à raison de 5.10^4 cellules par cm^2 dans des boites 6 puits, en milieu DMEM 1% SVF plus AVP 10^{-7} M (L'AVP est une hormone neurohypophysaire stimulatrice de la différenciation myogénique in-vitro), (Nervi *et al.* 1995) et cultivées pendant 5 à 6 jours. Le milieu est renouvelé tous les 2 jours ; on obtient des myotubes matures stables durant quelques semaines aux caractéristiques proches de fibres musculaires matures.

Les myotubes obtenus sont traités durant 3 jours successifs en présence de $\text{TNF}\alpha$ pour induire une atrophie, avec ou sans les différents inhibiteurs de la synthèse des sphingolipides.

3.3.1.2 Cas des C2C12

3.3.1.2.1 Culture des cellules C2C12

Les C2C12 isolées par Yaffe sont aussi une lignée myogénique bien connue établie à partir de cellules satellites extraites de la patte de souris C3H après stimulation de la régénération musculaire par écrasement (Yaffe et Saxel 1977). Elles sont amplifiées dans le même milieu avec SVF 10% que les L6, puis simplement transférées dans un milieu appauvri en sérum (2% de sérum de cheval) pour leur différenciation sans ajout de facteur de croissance supplémentaire (Tollefsen *et al.* 1989). Après 3 à 4 jours, on obtient des myotubes différenciés matures utilisés pour tester l'impact du métabolisme des sphingolipides dans l'atrophie.

3.3.2 Dosage de la Chaîne lourde de la Myosine par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Après traitement adéquat, les cellules sont lavées 2 fois au PBS puis récoltées à l'aide d'un grattoir avec 500 μ L de tampon RIPA composé de 10 mM de Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,5M NaCl, 0.5% Sodium Déoxycholate et 1% NP40 additionné à un mélange d'inhibiteurs de protéases 1:4. L'échantillon est centrifugé à 10,000 tours/min pendant 10 minutes puis on conserve le surnageant protéique à -20°C .

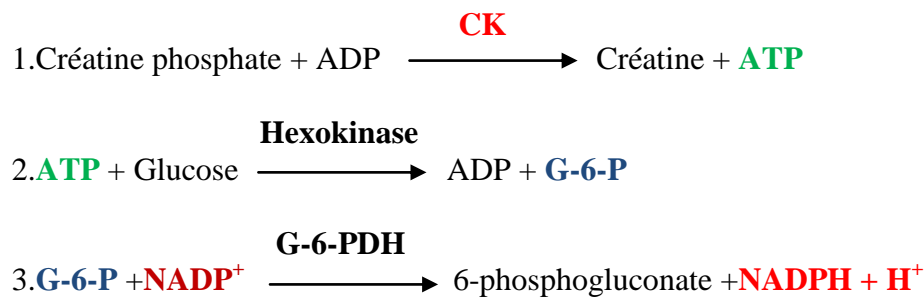
On se sert d'échantillons dilués au 1/50^e et 1/100^e dans le tampon RIPA. Ils sont "coatés" sur 1 plaque 96 puits, en triplicats de 50 µL. Les plaques sont mises à évaporer durant la nuit à 37°C. Elles sont ensuite lavées 2 fois au PBS (300µL/puit) grâce à un laveur de plaque ELx50 (Biotek Instruments). On sature les sites aspécifiques avec une solution de BSA 0,3% dans du PBS durant 30 minutes (100µL/puit). Après aspiration, les plaques sont mises à incuber 1h en présence d'une solution d'anticorps MF20 anti-myosine dilué au 1/1000^e (50µL/puit). Elles subissent ensuite 3 cycles de lavage au PBS tween 0,2% (3x300µL/puit) avant l'incubation avec les anticorps secondaires anti-souris couplés à HRP dilués au 1/3000^e (50µL/puit). On lave encore 5 fois avec le PBS Tween (5x300µL/puit). La réaction colorimétrique finale se fait en incubant 5 minutes avec du TMB (50µL/puit). On l'arrête en ajoutant 50µL/puit de H₂ SO₄ 0,5M. On lit ensuite la Densité optique à 450 nm au spectrophotomètre-lecteur de plaque (THERMO Electron Corporation). Une gamme de concentrations connues de myosine réalisée à partir de myosine de muscle de lapin purifiée (Sigma) sert d'étalon pour quantifier la myosine des échantillons.

3.3.3 Dosage de l'activité créatine kinase

La mesure de l'activité enzymatique créatine kinase (CK), un marqueur terminal de la différenciation myogénique, se fait grâce au kit CK NAC LDB fourni par Sobioda.

Les cellules sont grattées dans 500µL de tampon de lyse contenant 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM glycerophosphate, 50 mM NaF, 1.5 mM Na₃VO₄, 1% Triton et de cocktail inhibiteur de protéase (pH 7,6) à 4°C. On centrifuge 10 minutes à 12,000g, on élimine le culot et on dose l'activité du surnageant. La lecture se fait sur microplaque 96 puits. On dépose 4 µL d'échantillon pour 100 µL de réactif contenant 30 mM de créatine phosphate, 2 mM de NADP, 20 mM de N-acétyl-L-cystéine (pour activer la CK), 3000 U/L d'hexokinase de levure, 2000 U/L de glucose-6-phosphate déshydrogénase, 10 mM d'acétate de magnésium, 20 mM de D-glucose, 10µM d'ADP et 2 mM d'EDTA. Du NADPH est formé par 3 réactions en cascade, de manière proportionnelle à l'activité CK.

Les réactions enzymatiques impliquées dans le dosage sont les suivantes :



On suit la formation de NADPH par mesure de la Densité Optique à 340nm après 15 minutes d'équilibration et durant 20 minutes toutes les minutes en mode cinétique. On obtient alors une valeur de vitesse enzymatique initiale en milliDO/min que l'on retranscrit en activité enzymatique (U/L) grâce aux données du fabricant.

3.3.4 Analyse morphologique des myotubes : mesure de la surface après immunomarquage

3.3.4.1 Principe

Pour tester l'effet de différents traitements sur la taille des myotubes, on effectue un marquage par immunofluorescence de la myosine ou de la troponine, deux protéines exprimées sélectivement par les myotubes différenciés, permettant un marquage homogène de la totalité de la surface des myotubes et non des myoblastes. Les cellules sont examinées grâce à un microscope à fluorescence ZEISS Axiovert 200 muni d'un objectif LD-A plan 20x/0.30 PHI $\infty/40$ couplé à une camera axiocam MRm fonctionnant sous le logiciel Axiovision 4.1 image acquisition software (Carl Zeiss). On mesure ensuite leur surface d'après la méthode de Sultan, grâce au logiciel d'imagerie Image J. La moyenne des mesures de 10 champs pris au hasard pour chaque condition est effectuée.

3.3.4.2 Immunofluorescence de la Myosine

Les cellules sont lavées au PBS, puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 3,7% pendant 20 minutes. Les cellules sont lavées 3 fois au PBS puis perméabilisées avec une solution de triton 0,1% dans du PBS durant 10 minutes à 4°C. Après un nouveau cycle de lavages, les cellules sont mises en présence d'une solution de saturation BSA 0,1% pendant 20 minutes à

température ambiante pour bloquer le marquage aspécifique. Ensuite, on incube 1 heure avec l'anticorps primaire MF-20 anti-myosine dilué au 1/50^e à température ambiante. Après lavage avec une solution BSA 1% dans du PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'AlexaFluor 555, dilué au 1/500^e dans une solution de PBS contenant 0,1% BSA. Les noyaux sont révélés par un marquage au DAPI (4,5-diamidino-2-phenylindole) 1µg/mL pendant 3 minutes à température ambiante. Finalement, les boîtes sont lavées 2 fois au PBS puis baignées dans du glycérol pour conserver les échantillons jusqu'à l'examen par microscopie de fluorescence.

3.3.4.3 Immunofluorescence de la Troponine

Le protocole est le même que pour la myosine. L'anticorps primaire utilisé est un anticorps polyclonal anti-troponine I-SS dilué au 1/50. L'anticorps secondaire est un anti-IgG de chèvre couplé à l'AlexaFluor 555, dilué au 1/500^e dans une solution de PBS contenant 0,1% BSA.

3.3.5 Marquage de l'apoptose et de la nécrose cellulaires

Le TNF α est connu pour son effet pro-apoptotique in vitro (Mamedova *et al.* 2008). Pour évaluer les effets pro-apoptotique et pro-nécrotique du TNF α et des différents inhibiteurs, on réalise différents marquages selon la méthode de Cannavo (Cannavo *et al.* 2003). Pour cela, les cellules sont lavées au PBS, marquées au Hoechst 33342 (10µg/ml) pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées au PBS puis incubées avec de l'iodure de propidium (PI) 5µM 10 minutes à température ambiante, puis fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 3,7% pendant 20 minutes.

Le marquage différentiel est basé sur les particularités des deux types de mort cellulaire. La nécrose est un phénomène aigu et brutal : la membrane des cellules devient perméable tandis que le noyau reste en général intact, puis les cellules gonflent et finissent par éclater, tandis que l'apoptose est un phénomène lent contrôlé et programmé activement par la cellule (participant à l'homéostasie), où la membrane plasmique n'est pas altérée dans les stades précoces, mais où il y a condensation puis fragmentation de l'ADN nucléaire, et finalement formation de corps apoptotiques reconnaissables.

Le PI est un agent intercalant fluorescent (excitation à 490nm dans le vert et émission dans le rouge à 610nm) se liant à l'ADN selon une stoechiométrie d'une molécule pour 4 à 5 paires de bases, qui pénètre uniquement dans les cellules nécrotiques perméables. Par contre, le Hoechst (non-polaire et lipophile) diffuse rapidement à travers les membranes de toutes les cellules (viables ou non) et se fixe au niveau des régions d'ADN riches en paires AT. Il donne un marquage intense du noyau permettant de distinguer la condensation de la chromatine, sa fragmentation ou la rupture de la membrane nucléaire, caractéristiques de l'apoptose. Sa longueur d'onde d'excitation est à 355nm (UV) et il émet à 450 nm (bleu).

3.3.6 Viabilité des cellules (test MTT : [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide])

C'est un test quantitatif qui mesure l'activité métabolique des cellules viables en culture en micro-plaques, initialement développé par (Mosmann 1983) pour mesurer la prolifération cellulaire et tester les effets cytotoxiques de drogues anti-cancéreuses. La survie des cellules après traitement au TNF α en présence ou non des différents inhibiteurs est déterminée à l'aide d'un kit commercial (Cell Proliferation kit I MTT, Roche). Le principe du test est basé sur la transformation des sels de tetrazolium jaunâtres en formazan violet par les cellules métaboliquement actives. Cette réduction par différentes enzymes cellulaires nécessite la présence de co-facteurs (NADH et NADPH principalement) (Berridge *et al.* 2005). Les cristaux de formazan sont ensuite solubilisés avec une solution de 10% SDS dans 0.01M HCl, et l'absorbance de la solution colorée obtenue est quantifiée par spectrophotométrie. En pratique, les cellules sontensemencées dans des boîtes 96 puits à une densité de 10⁴ cellules par puits dans 100 μ l de DMEM. Les myoblastes L6 sont différenciés en myotubes plurinucléés, puis soumis aux divers traitements pendant 24h à 48h. 10 μ l de la solution commerciale de MTT (concentration finale de 0,5mg/ml) sont alors ajoutés ; on laisse incuber 4h puis on ajoute 100 μ l de solution de solubilisation. La plaque est ensuite mise à incuber à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, on mesure les densités optiques à 550 et 690nm. Le nombre de cellules vivantes est directement corrélé à la différence de densité optique (DO550nm-DO690nm). On évalue la survie cellulaire par comparaison au puits contrôle de cellules non-traitées.

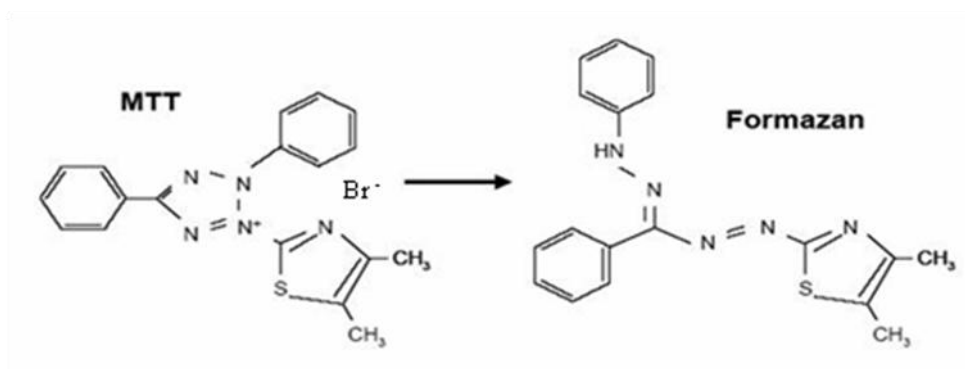


Figure 21 : Détail de la réaction de métabolisation du MTT en formazan.

3.3.7 Evaluation de la fragmentation de l'ADN (ELISA Cell Death Detection, Roche)

La détection de l'apoptose dans des myotubes traités au TNF α se fait à l'aide d'un test ELISA commercial (Cell Death detection kit, Roche) d'après (Rachek *et al.* 2007). La méthode est basée sur l'immunodétection des oligo-nucléosomes dans la fraction cytoplasmique (fragments d'ADN génomiques internucléosomiques issus de l'apoptose) via un sandwich anticorps anti-ADN – nucléosome – anticorps anti-histone. Pour cela on utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre l'ADN et les histones (H1, H2A, H2B, H3 et H4) ce qui permet la quantification spécifique des oligonucléosomes présents dans le cytoplasme des cellules apoptotiques (et non nécrotiques). Le test est réalisé en plaques 96 puits. La première étape consiste à 'coater' la streptavidine au fond des puits pour permettre l'adhésion de l'anticorps primaire anti-histone couplé à la biotine. On ajoute ensuite le lysat cellulaire ; les nucléosomes se fixent alors. Après une étape de lavages avec un tampon, on achève le sandwich avec la fixation d'anticorps anti-ADN couplés à la peroxydase de Raifort. On lave 3 fois pour enlever les complexes aspécifiques. La détection se fait grâce au substrat ABTS (2,2'-Azino-di[3-ethyl-benz-thiazolin-sulfonate]) de la peroxydase qui donne un signal à 405nm tandis que le signal à 490 nm est utilisé comme contrôle.

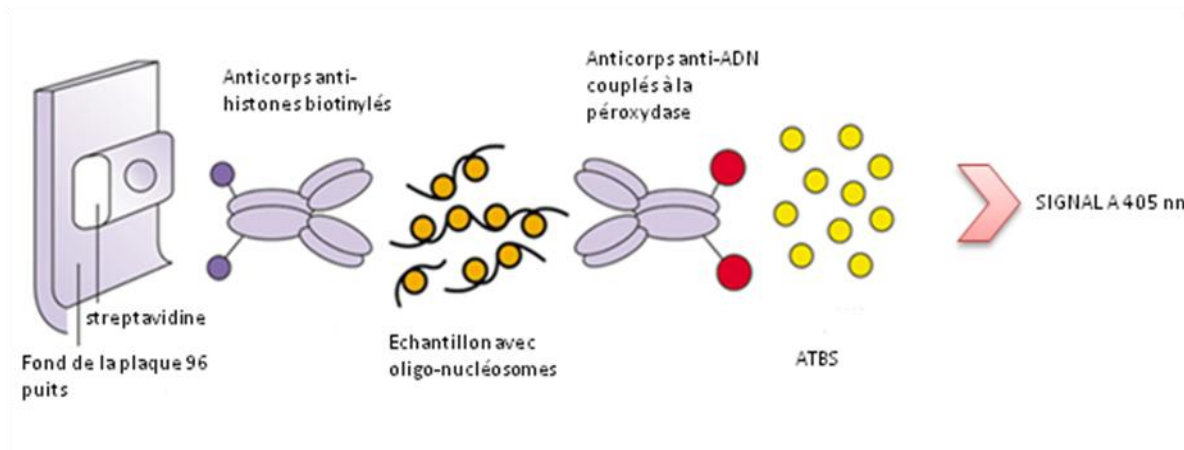


Figure 22 : Principe du test Roche de dosage des oligonucléosomes issus de la dégradation de l'ADN génomique.

3.3.8 Electrophorèse en SDS-PAGE et Western-Blot

3.3.8.1 Dosage des protéines selon Bradford

Pour réaliser ce dosage, on se sert du kit Bio-Rad protein assay. Le principe repose sur la fixation non-covalente du bleu de coomassie brillant G250 sur les protéines, déplaçant ainsi son maximum d'absorption de 465 à 595nm. Pour cela, on dilue au besoin un aliquot de l'homogénat à doser auquel on ajoute 100µl de réactif Bio-Rad. On mesure la densité optique à 595 nm, proportionnelle à la quantité de protéines et rapportée à une gamme standard d'albumine sérique bovine (0 à 50µg), grâce au lecteur spectrophotométrique adapté aux plaques 96 puits.

3.3.8.2 Généralités

Les cellules L6 sont cultivées dans des boîtes de culture 6 puits (environ $5 \cdot 10^5$ cellules pour 9.8 cm^2). Après 3 jours de traitements, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS froid puis récoltées par grattage avec un grattoir (Techno Plastic Products) dans 0,5ml de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM glycerophosphate, 50 mM NaF, 1.5 mM Na_3VO_4 , 1% Triton, en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (pH 7,6)). Les lysats sont homogénéisés au Vortex, puis gardés sur glace durant 15 minutes et centrifugés 15 minutes à 13 000g. On conserve le surnageant. Un aliquot est prélevé pour le dosage de Bradford. La fraction à déposer est d'abord diluée dans le tampon de Laemmli (6x) contenant Tris HCl 150mM, Glycérol 36%, SDS 3%, β -

mercaptoethanol 12%, Bleu de Bromophénol 0.03%, puis portée à 100°C pendant 5 minutes (excepté dans le cas de PLD1 où l'on utilise du Laemmli concentré 3x, et seulement 2 à 3 minutes de chauffage pour limiter les risques d'agrégation), puis déposée sur gel.

3.3.8.3 Electrophorèse-migration

Les électrophorèses sont réalisées sur gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS 0,1%) dont les concentrations varient en fonction de la taille de la protéine d'intérêt (résumées dans le tableau ci-dessous) grâce à un appareil pour minigels Bio-Rad. La migration se fait à 100V et ampérage constant durant 1h30 environ. La migration est contrôlée grâce au front de bleu de bromophénol et au marqueur de taille précoloré déposé dans un puit de référence permettant de déterminer les masses moléculaires des protéines étudiées.

3.3.8.4 Electrotransfert

L'électro-transfert sur membrane Whatman westran S 0,2µm est réalisé dans un appareil de transfert humide Bio-Rad mini Trans-Blot Cell 7.5 x 10 cm. Le transfert se fait grâce à un sandwich gel-membrane maintenu par une cassette et immergé dans le tampon de transfert Tris-glycine (Tris-HCl 25mM, pH=8,3, glycine 0,19M, méthanol 20%). Le transfert s'effectue à 100V pendant 1h environ. Les marqueurs de masse moléculaire précolorés sont transférés en même temps que les protéines étudiées, ce qui permet de contrôler la qualité du transfert.

3.3.8.5 Traitement des membranes

A l'issue du transfert, la membrane est rincée dans un tampon salin TBS-T (Tris-HCl 20mM, NaCl 137mM, pH=7,6, Tween 20 à 0,1%) puis saturée dans un bain de TBS-T contenant 5% de BSA pendant 1h30 environ. La membrane est ensuite incubée à 4°C toute la nuit avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T. Elle est ensuite rincée 3 fois 15 minutes avec du TBS-T puis incubée 1h30 en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort à température ambiante. Après un nouveau cycle de lavages au TBS-T, les protéines sont immunodétectées par réaction de chimioluminescence catalysée par la peroxydase en présence de luminol et d'eau oxygénée (kit ECL, Pierce).

3.3.8.6 Conditions spécifiques à chaque protéine détectée

Protéine détectée	Pourcentage du gel de polyacrylamide	Dilution anticorps primaire dans TBS-T BSA 0,1%	Dilution anticorps secondaires dans TBS-T	Poids moléculaire de la protéine
PLD1	8% + 4M Urée	1/500	Anti-souris 1/1000	120kDa
Phospho-Akt	10%	1/1000	Anti-lapin 1/1000	60kDa
Akt	10%	1/1000	Anti-lapin 1/1000	60kDa
Phospho-S6K1	10%	1/1000	Anti-lapin 1/1000	70kDa
Phospho-4E-BP1	12%	1/1000	Anti-lapin 1/1000	15-20kDa
Phospho-IKKα/β	10%	1/1000	Anti-lapin 1/2000	85-87kDa
Myosin Light Chain 1f et 3f	12%	1/50	Anti-souris 1/1000	22,7kDa et 16,7kDa
α-Tubuline	10%	1/1000	Anti-souris 1/1000	55kDa

3.3.9 *Analyse des sphingolipides*

3.3.9.1 Extraction lipidique

L'extraction des sphingolipides provenant de cultures de myotubes *in vitro* ou de muscles de souris se fait selon une méthode adaptée de (Bligh et Dyer 1959).

3.3.9.1.1 Myotubes en culture

Après 3 jours de traitements, les cellules sont lavées au PBS puis récupérées à l'aide d'un grattoir (Techno Plastic Products) dans 0,5ml de PBS/HCl 0,1N. Un aliquot est prélevé pour le dosage de Bradford. Puis on ajoute le mélange de standards marqués : D7 sphingosine (8 μ M), C16-D31 ceramide (8 μ M), D31 SM (8 μ M) provenant de Avanti Polar Lipids. On commence l'extraction proprement dite en ajoutant **2ml** de mélange chloroforme/méthanol (1/2 v/v).

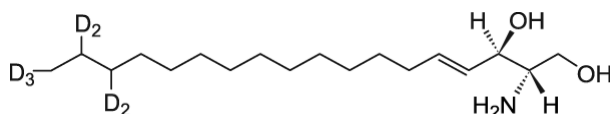


Figure 23 : Exemple de standard deutéré utilisé pour l'analyse en LC-MS/MS : la D7 sphingosine

3.3.9.1.2 Muscles de souris

Le tissu musculaire est homogénéisé dans 1 ml chloroforme-méthanol (1/2 v/v) additionné de 8 μ l d'HCl 12N, pour 10 mg de muscle, à l'aide d'un broyeur à billes de céramique Precellys 24 (Programme: 5500-2x20s). On ajuste le volume d'homogénat à 2 ml avec du mélange chloroforme/méthanol (1/2 v/v). On prélève à ce moment un aliquot pour le dosage des protéines. Le même mélange de standards deutérés utilisés pour les échantillons in vitro est alors ajouté.

3.3.9.2 Séparation de phases

Le reste du protocole est commun aux 2 types d'échantillons, et est réalisé dans des tubes en verre de 11,5 ml Corning fermés par des bouchons phénoliques avec joints en téflon. Les échantillons sont vortexés pendant 30 secondes, puis laissés 30 minutes à température ambiante. On ajoute alors un volume de PBS et un volume de chloroforme, ce qui permet d'obtenir deux phases. Les échantillons sont de nouveau vortexés durant 1 minute ; l'émulsion obtenue est centrifugée 5 minutes à 2500 rpm pour séparer les phases. La phase organique inférieure contenant les lipides est alors prélevée dans un tube propre et évaporée sous un flux d'azote, à 37°C. Les extraits lipidiques secs sont conservés sous azote à -20°C, ce qui prévient les phénomènes d'oxydation. Les échantillons sont ensuite analysés par MS/MS.

3.3.9.3 Quantification des sphingolipides par Spectrométrie de masse en tandem

Les échantillons sont repris dans 1 ml de phase mobile chloroforme : méthanol (2:1) puis injectés à une vitesse de 200 μ l/min pour un temps d'analyse de 3 minutes. Le spectromètre de masse en tandem est équipé d'une source d'ionisation TurboIon Spray chauffée à 500°C de type electrospray et couplé à un analyseur quadripolaire. Il est couplé à un automate pour l'injection des solvants et des échantillons Agilent 1200 Series (Agilent Technologies). L'acquisition des résultats se fait grâce au logiciel Analyst version 1.5 (Sciex Applied Biosystems). Les mesures des taux de SM ont été réalisées en mode d'ionisation négatif. Les paramètres spécifiques utilisés sont les suivants : voltage du spray d'ions : - 4500 V ; potentiel d'entrée : - 9.5 V; potentiel de désintégration: -120 V; énergie de collision: -100 eV. Pour les mesures des taux de céramides, le spectromètre est en mode d'ionisation positif. Les paramètres spécifiques utilisés sont les suivants : voltage du spray d'ions : + 5500 V ; potentiel d'entrée : - 10 V; potentiel de désintégration: 100 V; énergie de collision: 40 eV. L'analyse est effectuée en mode MRM (multiple reaction monitoring). Chaque sphingolipide est analysé séparément avec des modes d'acquisition et d'injection différents (20 μ l et 5 μ l respectivement, pour les céramides et les SMs). La concentration de chacune des espèces est calculée en fonction du rapport du signal (aire du pic) au standard interne correspondant.

3.3.10 Dosage du métabolisme protéique

3.3.10.1 Mesure de la synthèse protéique

La mesure du taux de synthèse protéique dans les myotubes traités avec du TNF α pendant 12h ou 24h est inspirée de la méthode de (Gulve et Dice 1989). Les cellules L6 sont différenciées, puis traitées avec le TNF α avec ou sans les inhibiteurs de la synthèse des sphingolipides. Au temps définis précédemment, on remplace le milieu de traitement par le milieu de marquage supplémenté par 2 μ Ci/ml de [3 H]-L-Tyrosine qui sera incorporée par les cellules pour la synthèse protéique, et par 2mM de tyrosine froide, ce qui optimise l'incorporation. Après 1h de marquage, les cellules sont lavées 5 fois au PBS puis grattées dans de l'acide tri-chloro-acétique (TCA) 10% sur glace. L'homogénat obtenu est vortéxé, centrifugé 10 minutes à 12 000g pour séparer le culot contenant les protéines néosynthétisées précipitées, et le surnageant, contenant la tyrosine marquée non incorporé dans les protéines. Le culot est alors resolubilisé dans du tampon de lyse et neutralisé avec 1M NaOH. Un aliquot

est prélevé à ce moment pour le dosage de protéines selon Bradford. La mesure de la radioactivité se fait dans des pots à scintillation avec 200µl d'échantillon pour 3 ml de liquide scintillant Ultima Gold AB dans un compteur à scintillation Packard. La synthèse protéique est exprimée en radioactivité intégrée (cpm) par µg de protéines.

3.3.10.2 Mesure de la dégradation protéique

Le taux de dégradation protéique est évalué, après marquage des cellules par la tyrosine tritiée, par le rapport entre la radio-activité TCA-soluble dans le milieu (tyrosine libre issue des protéines dégradées) à un temps défini, et la radioactivité incorporée initiale (regroupant la radio-activité de la fraction cellulaire, et celle des fractions TCA-soluble et insoluble du milieu). Pour cela, les cellules sont incubées avec une solution de [³H]-L-Tyrosine 2µCi/ml dans DMEM 1% SVF pendant les 2 derniers jours de leur différenciation. La radioactivité non-incorporée est ensuite rincée par 3 lavages au PBS. Les cellules sont ensuite placées en milieu de chasse (DMEM 1% SVF avec 2mM de tyrosine non-radioactive pour prévenir la réincorporation de tyrosine tritiée issue de la dégradation protéique) pendant 2 heures pour permettre la dégradation des protéines de courte durée de vie. Les cellules sont alors lavées, et après 12 h d'incubation des échantillons de 0,5 ml de milieu sont prélevés et additionnés de TCA (10%). Après 1 h à 4°C, ils sont centrifugés à 12 000g 10 minutes. Les culots sont dissous dans 0,5 ml de tampon de lyse et neutralisés avec NaOH. Les cellules sont lavées et homogénéisées dans le tampon de lyse. La radio-activité des trois fractions (homogénat cellulaire, culot TCA et surnageant TCA) est mesurée comme ci-dessus.

3.3.11 Les ARN interférents

Ce sont des petites séquences d'ARN de l'ordre d'une vingtaine de nucléotides, connues pour interagir avec les ARNm de séquence complémentaire. Les ARNi permettent d'inhiber l'expression de gènes cibles et la synthèse des protéines correspondantes. Nous avons utilisé cette approche pour inhiber de manière spécifique l'expression des gènes PLD1 et PLD2, afin d'évaluer leur importance dans l'atrophie induite par le TNFα.

Les séquences d'ARN interférents (SIGMA Genesys) utilisés sont :

Pour PLD1 : 5'-AAGTTAAGAGGAAATTCAAGC-3'

Pour PLD2 : 5'-GACACAAAGTCTTGATGAG-3'

En pratique, les cellules sont transfectées avec les ARN interférents à l'aide du réactif Hiperfect Transfection Reagent de Qiagen (un mélange de lipides neutres et cationiques). On laisse incuber la solution d'ARNi à 50 nM dans du milieu DMEM en présence de transfectant pendant 15 min pour permettre la formation de complexes. Les cellules sont placées en contact avec ces complexes puis le milieu cellulaire est changé à 24 heures.

3.3.12 *Les adénovirus*

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire sans enveloppe et à capsidie icosaédrique d'un diamètre de 70 à 90 nm. L'incorporation dans leur génôme d'une séquence d'intérêt permet, après infection d'une culture cellulaire, la surexpression de la protéine correspondante avec une haute efficacité, y-compris dans des cellules ne proliférant pas. Les adénovirus codant PLD1 et PLD2 ont été construits par l'équipe.

L'inhibition de l'expression des PLD, ou leur surexpression, sont confirmées par Western-blot ou par Rt-qPCR.

3.3.13 *RT-PCR*

3.3.13.1 Transcription inverse

L'extraction des ARN totaux à partir des cellules est réalisée à l'aide de Trizol Reagent (Invitrogen). Les ARN sont ensuite dosés à l'aide d'un appareil Nanodrop. La transcription inverse (RT) est réalisée avec 1µg d'ARN totaux, en présence de 100 U de transcriptase Superscript II (Invitrogen), en utilisant des amorces hexamères oligonucléotidiques non spécifiques, et un mélange dNTP. Les ARNm sont ensuite quantifiés par PCR en temps réel, en utilisant des amorces spécifiques des ADNc étudiés.

3.3.13.2 PCRs

La PCR quantitative est réalisée sur 5 µl du produit de RT dilué au 1/60^{ème}, mélangé avec 15 µl de milieu réactionnel ABsolute™ QPCR SYBR Green Mix (ABgene), dans un appareil Rotor-gene 6000.

Les séquences des amorces utilisées sont :

PLD1 S: GGTCAGAAAGATAACCCAGG, **PLD1 AS:** GAAGCGAGACAGCGAAATGG;
Atrogin-1 S: CTCTGCCAGTACCACTTCTC, **Atrogin-1 AS:** ATGGTCAGTGCCCCTCCAGG;
LC3b S: CTGGACAAGACCAAGTTCT, **LC3b AS:** AAGCCGTCTTCATCTCTCTC;
S6K1 S: AGAGCACCTGCGTATGAATC, **S6K1 AS:** CACTGACTCTTTGAGACTGCC;
MurF1 S: TGCATCTCCATGCTGGTGGC, **MurF1 AS:** CTTCTTCTCGTCCAGGATGG;
FoxO1a S: AGATCTACGAGTGGATGGTG, **FoxO1a AS:** GGACAGATTGTGGCGAATTG;
FoxO3a S: GAGAGCAGATTTGGCAAAGG, **FoxO3a AS:** CCTCATCTCCACACAGAACG;
TBP S: TGGTGTGCACAGGAGCCAAG, **TBP AS:** TTCACATCACAGCTCCCCAC;
Cyclophiline A S: ATGGCACTGGTGGCAAGTCC, **Cyclophiline A AS:** TTGCCATTCTGGACCCAAA.

3.3.14 Analyse statistique

Pour comparer les différences obtenues, nous avons utilisé des analyses de variance à un critère de classification (anova). Les comparaisons multiples ont été réalisées avec la correction PLSD de Fischer avec un niveau de significativité de 0,05. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Statview (v5.0, SAS institute inc., Cary NC, USA).

4 Résultats

4.1 Le traitement de myotubes L6 et C2C12 par le TNF α induit une atrophie

4.1.1 Le TNF α et les céramides affectent la taille de myotubes in vitro

Le traitement de myotubes L6 matures avec du TNF α recombinant de rat pendant 3 jours successifs, à une concentration de 15 ng/ml, induit une atrophie visible sur des critères morphologiques tels que la surface des myotubes (*figure 24*) et sur des critères fonctionnels comme la quantité de myosine et l'activité créatine kinase (*figures 26-27*). Après traitement au TNF α , on observe une diminution de la taille des myotubes qui adoptent un phénotype caractéristique plus fin et moins ramifié qui contraste avec les myotubes contrôle (*figure 24 : images 2 et 3*).

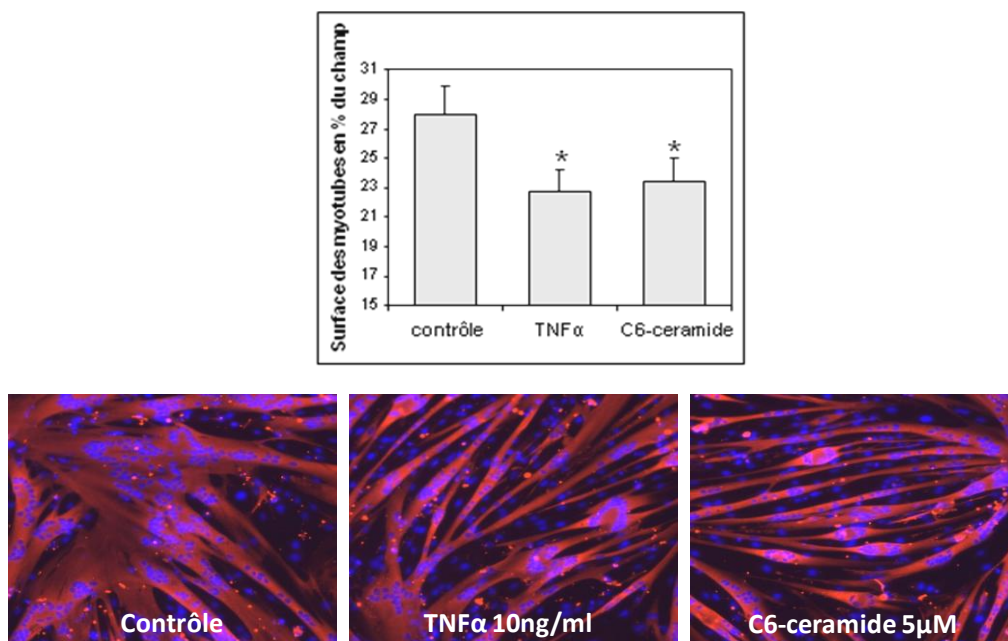


Figure 24 : Le traitement par le TNF α ou un céramide exogène provoque une diminution de la surface des myotubes L6.

Les myoblastes sont différenciés en myotubes plurinucléés après 5 jours en présence de SVF 1% et de 10^{-7} M AVP. Ces myotubes sont traités 3 jours en présence de 15 ng/ml TNF α ou 5 μ M C6-céramide. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées puis incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti-MHC et l'anticorps secondaire Alexa anti-IgG de souris, qui permet la révélation par fluorescence au microscope. La surface des myotubes est mesurée à l'aide du logiciel image J. Elle est exprimée en % de la surface du champ. Le graphe représente la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes quantifiées sur 10 champs. *: différent du contrôle, $p < 0,05$.

De la même manière, le TNF α recombinant de souris induit une atrophie visible chez des myotubes de souris C2C12 (*figure 25A*), avec une concentration optimale de 1 ng/ml bien plus faible que pour les myotubes L6, en accord avec la littérature (Ji *et al.* 1998). A plus forte dose, les effets sont diminués. Le TNF α peut en effet présenter des effets inversés à forte concentration (Li *et al.* 1998; Langen *et al.* 2001; Acharyya *et al.* 2004). La fixation du TNF α sur son récepteur peut activer de nombreuses voies de signalisation, dont la synthèse de céramides. Le traitement des myotubes avec des concentrations croissantes de divers céramides exogènes induit une diminution dose-dépendante de la taille des myotubes. Le céramide en C6 est le plus actif (*figure 25B*). De même, le C6-céramide induit une atrophie marquée des myotubes L6 (*figure 24*). Le céramide mime donc l'atrophie induite par le TNF α , ce qui en fait un bon candidat pour expliquer l'effet de la cytokine.

Les modèles *in vitro* ainsi établis nous ont permis d'aborder l'étude de l'impact du métabolisme des sphingolipides sur l'atrophie.

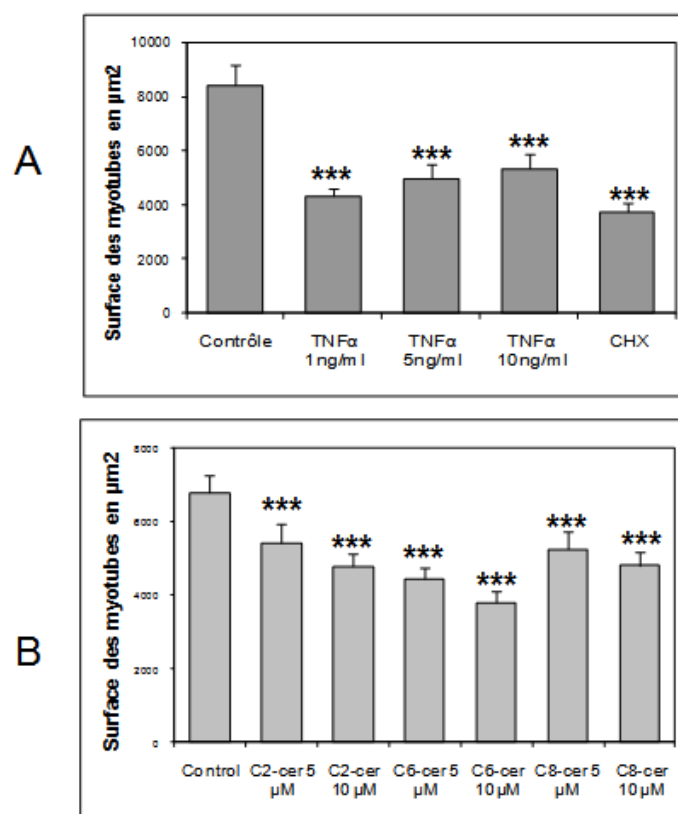


Figure 25 : Effets du TNF α et des céramides exogènes sur la surface de myotubes C2C12.

A. Les myoblastes C2C12 sont différenciés pendant 5 jours en milieu DMEM avec 2% sérum de cheval. Les myotubes ainsi formés sont traités durant 3 jours avec différentes doses de TNF α recombinant de souris, ou avec 0,3 $\mu\text{g/ml}$ de cycloheximide (CHX) (un inhibiteur de la synthèse protéique utilisé ici comme contrôle positif). Les cellules sont immunomarquées avec un anticorps anti-myosine qui permet la révélation par

fluorescence au microscope. La surface de myotube pris individuellement est mesurée à l'aide du logiciel Scion. Les résultats sont exprimés en μm^2 +/- SEM. *** différent du contrôle, $p < 0,001$. **B.** Les myotubes sont traités avec des doses croissantes de différents céramides à courtes chaînes cell-perméants durant 3 jours, et leur surface mesurée comme ci-dessus. Les résultats sont exprimés en μm^2 +/- SEM. *** : différent du contrôle, $p < 0,001$.

4.1.2 Effets atrophiques du TNF α et des céramides quantifiés sur des critères fonctionnels

4.1.2.1 Effets sur la teneur en myosine des myotubes L6, déterminée par ELISA

Le TNF α et le C6-céramide exogène induisent une diminution dose-dépendante de la quantité de chaîne lourde de myosine (MHC) (figure 26), une protéine majeure de l'appareil contractile qui est une cible préférentielle de la protéolyse protéasome-dépendante en conditions atrophiques *in vivo* (Cosper et Leinwand 2011) et *in vitro* (Li et Reid 2000).

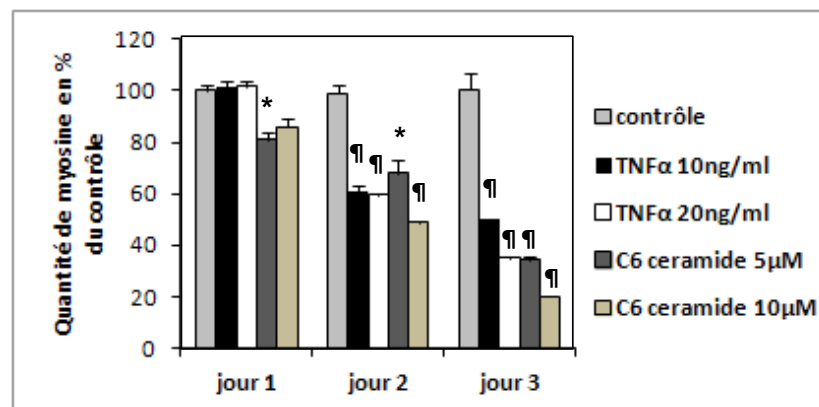


Figure 26 : Effets du TNF α et du C6-céramide sur la quantité de MHC.

Après 3 jours de traitements des myotubes L6, le C6-céramides et le TNF α utilisés aux concentrations indiquées ont des effets atrophiques comparables sur la quantité de myosine évaluée par ELISA. Le test réalisé en plaques 96 puits, permet la détection de la MHC par ELISA direct, avec un anticorps anti-myosine et un anticorps anti-IgG couplé à la Péroxydase. Le contenu en myosine est exprimé en % du contrôle (soit 75 ± 11 μg de MHC pour 120 000 cellules). Le graphe représente la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. *: different from control, $p < 0,05$; ¶: $p \leq 0,001$.

4.1.2.2 Effets sur l'activité créatine kinase des myotubes L6

Le TNF α induit en parallèle une chute de l'activité créatine kinase des myotubes (figure 27). La créatine kinase est une enzyme-clé pour l'approvisionnement énergétique du muscle. C'est un marqueur de l'intégrité des myotubes, diminué en cas d'atrophie (Trendelenburg *et*

al. 2009; Sharples *et al.* 2010). Là encore, l'effet du TNF α est reproduit par le C6-céramide exogène (figure 27).

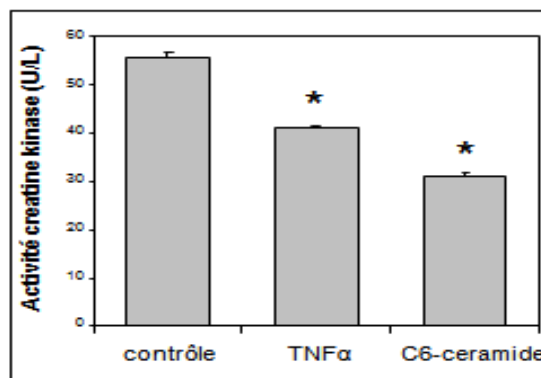


Figure 27 : Effets du TNF α et du C6-céramide exogène sur l'activité enzymatique de la créatine kinase.

Les myotubes L6 sont traités durant 3 jours avec 15 ng/ml de TNF α ou 5 μ M de C6-céramide. Les cellules sont ensuite lavées, grattées dans un tampon de lyse puis la cinétique d'activité créatine kinase est dosée grâce à un kit commercial (Sobioda) qui permet de suivre, grâce à des réactions couplées, la formation de NADPH à 340 nm proportionnelle à l'activité enzymatique. Elle est exprimée en unités enzymatiques par litre. Le graphe représente la moyenne \pm SEM de 3 séries de dosages indépendantes effectuées en triple. *: différent du contrôle, $p < 0,05$.

En résumé, le traitement des myotubes avec des céramides exogènes cell-perméants à courtes chaînes reproduit l'atrophie induite par le TNF α sur tous les marqueurs considérés (figures 24-27), ce qui fait du céramide un candidat sérieux comme second messager dans l'atrophie induite par le TNF α .

4.1.2.3 Effets apoptotiques du TNF α et des céramides dans les myotubes L6

Le TNF α est capable d'induire l'apoptose par la voie extrinsèque via le recrutement de caspases, grâce au domaine de mort de son récepteur TNFR1 (Van Herreweghe *et al.* 2010). Le céramide est aussi connu pour ses propriétés pro-apoptotiques *per se* (Oskouian et Saba 2010). Etant donné que l'apoptose est une composante de l'atrophie musculaire dans certains modèles *in vivo* (van Royen *et al.* 2000) et *in vitro* (Sishi et Engelbrecht 2011), dans lesquels la diminution du nombre de noyaux est parallèle à la chute de la quantité de protéines, nous avons voulu évaluer la viabilité cellulaire dans notre modèle d'atrophie en réponse au TNF α et aux céramides. Les résultats montrent qu'aux concentrations utilisées, le TNF α et le blocage de la synthèse de céramides par la myriocine n'affectent pas la viabilité des cellules de manière significative (figure 28). L'apoptose des cellules ne semble donc pas intervenir dans le processus d'atrophie, dans notre modèle.

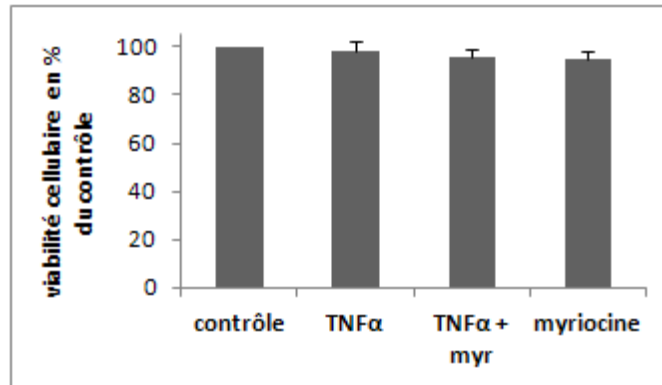


Figure 28 : Effets du TNF α et de l'inhibition de la synthèse de céramides par la myriocine sur l'apoptose. Le traitement des myotubes L6 avec du TNF α à 15 ng/ml et/ou avec 100 nM de myriocine pendant 2 jours n'a aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire mesurée par le test au MTT. Le nombre de cellules viables est proportionnel à l'activité de réduction du MTT jaune en formazan violet, qui une fois solubilisé, absorbe à 690 nm. La viabilité est exprimée en % du contrôle. Le graphe représente la moyenne \pm SEM de 2 expériences indépendantes réalisées en triple.

4.2 Les céramides contribuent à l'effet atrophique du TNF α

Pour confirmer le rôle de la formation des céramides dans l'atrophie observée en réponse au TNF α , nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de leur synthèse, ajoutés au milieu de culture. Les céramides sont synthétisés par deux voies distinctes : la synthèse de novo et l'hydrolyse de la SM par les sphingomyélinases membranaires, toutes deux stimulées par le TNF α (Pettus *et al.* 2003; Wajant *et al.* 2003). La myriocine inhibe la première étape de la voie de novo catalysée par la sérine palmitoyl-CoA transférase (Miyake *et al.* 1995). Le GW4869 (Luberto *et al.* 2002) et la 3-O-Méthyl- SM (OMS) (Lister *et al.* 1995) sont des inhibiteurs spécifiques des sphingomyélinases neutres.

4.2.1 Les inhibiteurs de la synthèse de céramides préservent l'intégrité des myotubes en présence de TNF α

4.2.1.1 Surface des myotubes

4.2.1.1.1 Myotubes L6

Les inhibiteurs des deux voies de synthèse des céramides protègent contre l'effet atrophique du TNF α sur la surface des myotubes (*figure 29*), ce qui suggère que les céramides issus des deux voies de synthèse participent à l'atrophie dans cette lignée cellulaire.

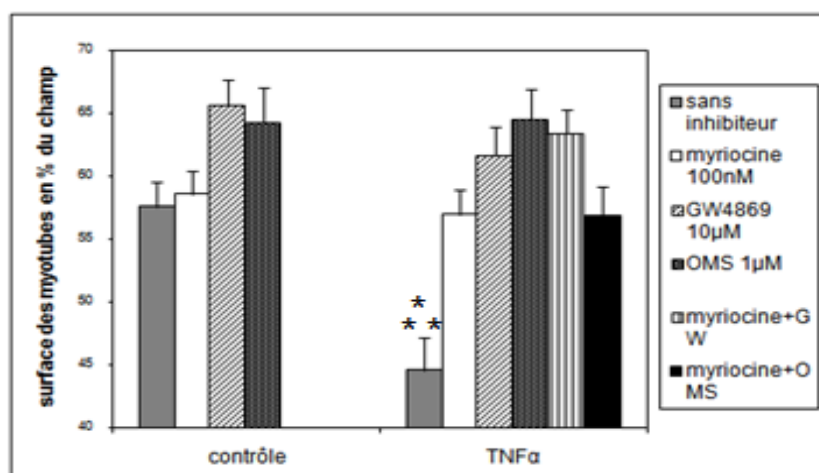


Figure 29 : Effets protecteurs des inhibiteurs de la synthèse de céramides contre la diminution de surface des myotubes L6 induite par le TNF α .

La surface des myotubes est mesurée après 3 jours de traitements au TNF α seul ou en présence des inhibiteurs suivants : 100 nM myriocine, 10 μ M GW4869, 1 μ M OMS, ou d'une combinaison de deux inhibiteurs. Après marquage avec un anticorps anti-myosine sarcomérique qui permet de marquer les myotubes de manière

homogène, la surface est mesurée à l'aide du logiciel image J. Elle est donnée en % de la surface du champ. Le graphe représente la moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes avec dix champs considérés par condition. *** : différent de toutes les autres conditions, $p < 0,001$.

4.2.1.1.2 Myotubes C2C12

Dans des myotubes C2C12 traités au TNF α , on retrouve les mêmes effets protecteurs des inhibiteurs GW4869 et OMS que dans les myotubes L6 (figure 30). Par contre, la myriocine a un effet négatif marqué par elle-même sur la surface des myotubes, et ne reverse pas l'effet du TNF α (figure 31).

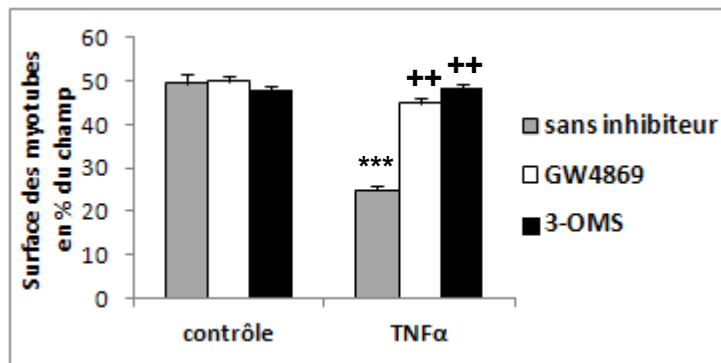


Figure 30 : Effets du TNF α et des inhibiteurs de sphingomyélinases sur la surface des myotubes C2C12.

Les myotubes sont traités avec du TNF α recombinant de souris à 1 ng/ml avec ou sans inhibiteurs (aux mêmes concentrations que dans fig.29). Après 3 jours, les cellules sont traitées comme dans la figure 29. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes sur 10 champs sont représentées. Les résultats sont exprimés en % de surface du champ. *** : différent de contrôle, $p \leq 0,001$; ++ : différent de TNF α seul, $p \leq 0,01$.

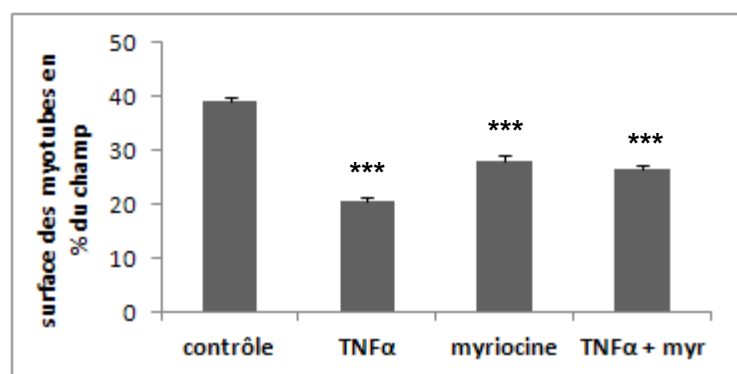


Figure 31 : Effet de la myriocine sur la surface des myotubes C2C12, en présence et absence de TNF α .

Les myotubes sont traités avec du TNF α recombinant de souris à 1 ng/ml, avec ou sans myriocine 100 nM. Après 3 jours, les cellules sont traitées comme dans la figure 29. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes sont représentées. Les résultats sont exprimés en % de surface du champ. *** : différent de contrôle, $p \leq 0,001$.

Ceci suggère que dans la lignée C2C12, les céramides issus de l'hydrolyse de la SM ont un rôle prépondérant dans l'atrophie en réponse au TNF α . Une autre interprétation est que, dans cette lignée la synthèse *de novo* serait nécessaire à l'homéostasie cellulaire, en approvisionnant la cellule en certains dérivés sphingolipidiques essentiels.

4.2.1.2 - Quantité de myosine (myotubes L6)

Chaque molécule de myosine est constituée de 2 chaînes lourdes et 4 chaînes légères : deux dites essentielles, et deux régulatrices impliquées dans le contrôle de l'activité motrice des têtes de myosine (Weiss et Leinwand 1996). Les chaînes légères de myosine sont ciblées par la protéolyse en conditions atrophiques *in vivo* (Cheema *et al.* 2000) et *in vitro*, où leur dégradation est sous le contrôle de FoxO1 et Atrogin-1 (Lokireddy *et al.* 2011; Verhees *et al.* 2011).

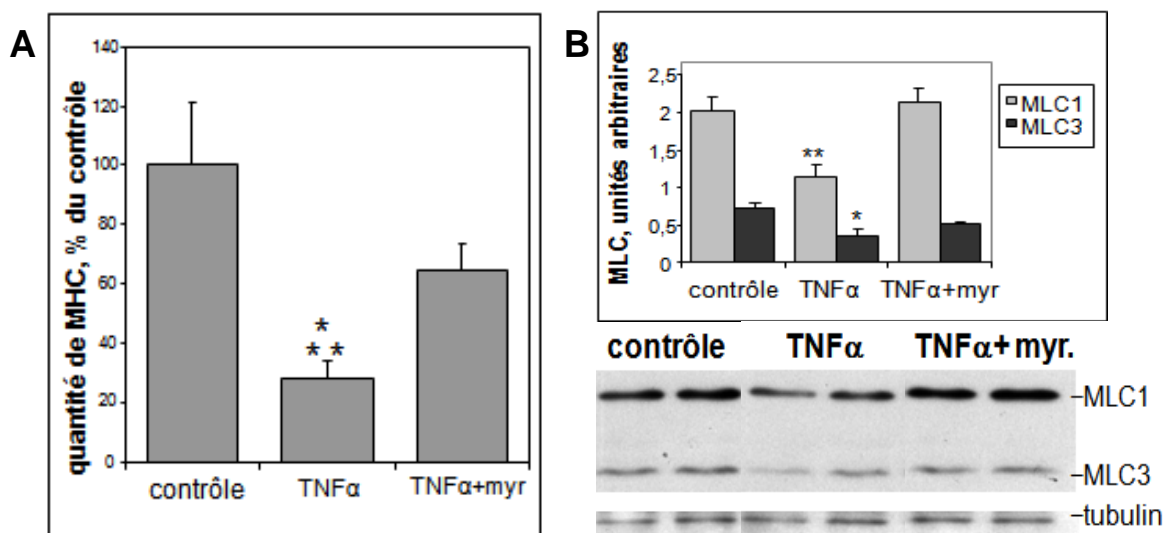


Figure 32 : Effet protecteur de la myriocine sur la quantité de myosine dans les myotubes L6.

A. Quantification par ELISA de la MHC dans des myotubes traités avec 15 ng/ml de TNF α , avec et sans 100 nM de myriocine. Les moyennes +/- SEM de 3 expériences indépendantes sont données en % du contrôle. *** : différent des deux autres conditions, $p \leq 0,005$. **B.** Les myotubes sont traités avec du TNF α en présence ou non de myriocine pendant 72h, puis les extraits cellulaires sont analysés par Western blotting avec un anticorps monoclonal anti-MLC 1 et 3. Les bandes sont quantifiées par vidéodensitométrie et normalisées par la tubuline. Les moyennes +/- SEM de 3 expériences indépendantes sont données. **: différent de contrôle et de TNF+myriocin, $p \leq 0,002$. * : différent de contrôle, $p \leq 0,05$.

La myriocine, l'inhibiteur que l'on a le plus étudié au cours de ce travail, préserve chez des myotubes L6 traités au TNF α , la quantité de chaîne lourde de myosine (figure 32A) mesurée par ELISA, et la quantité de chaînes légères (MLC 1 et 3) évaluée par Western blot (figure 32B).

4.2.1.3 - Activité créatine kinase (myotubes L6)

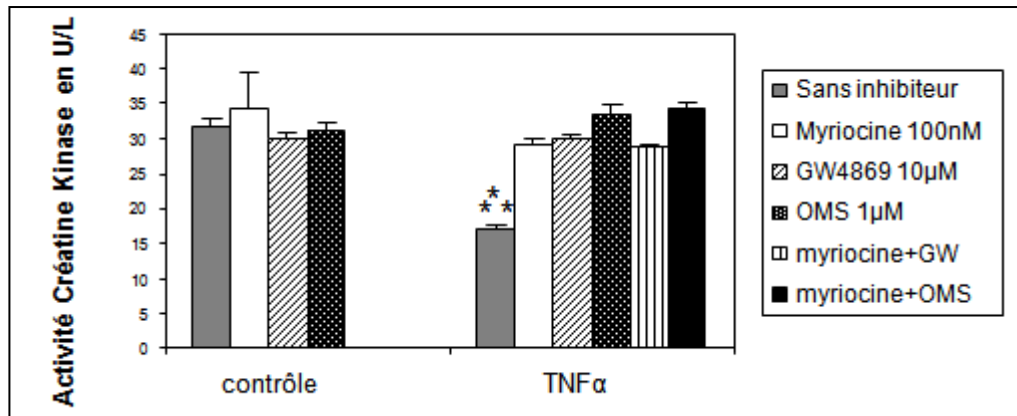


Figure 33 : Effets du TNF α et des inhibiteurs sur l'activité créatine kinase de myotubes L6.

Les cellules sont traitées comme ci-dessus, avec les concentrations données des différents agents. Les extraits cellulaires sont dosés pour l'activité créatine kinase comme dans la figure 27. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes dosées en triple sont exprimées en unités enzymatiques par litre. *** : différent de contrôle, $p \leq 0,001$.

Les inhibiteurs des deux voies de synthèse préservent l'activité créatine kinase des myotubes L6 en présence de TNF α (figure 33), confirmant que les céramides issus des deux voies participent à l'atrophie. Comme pour la taille des myotubes, ils n'ont cependant pas d'effets additifs.

4.2.2 Effets du TNF α et des inhibiteurs sur les taux de céramides endogènes

Nous avons évalué l'effet du traitement des myotubes L6 par le TNF α sur les taux endogènes des diverses espèces moléculaires de céramides et de SM, mesurés par spectrométrie de masse en tandem, au sein du Service des Maladies Héréditaires du Métabolisme des Hospices Civils de Lyon (H.C.L.) (tableaux 1 et 2).

Tableau 2 : Effet du TNF α sur les taux de céramides musculaires dans les L6. Les quantités de céramides sont données en picomoles par microgramme de protéines pour chaque espèce moléculaire principale. L'augmentation de chaque espèce est donnée en % de la somme de toutes les espèces dans le contrôle (colonne de droite).

Principales espèces de céramides	(pmol/ μ g protéine)		Augmentation induite par le TNF α , en % du contrôle
	Contrôle	TNF α	
C16-céramide	4,9 \pm 0,8	6,2 \pm 1,1	11,5 \pm 5,1
C18-céramide	1,8 \pm 1,1	2,5 \pm 0,7	6,2 \pm 2,8
C20-céramide	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	1,8 \pm 0,3
C22:1-céramide	0,5 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1	1,5 \pm 0,6
C22-céramide	0,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2	2,3 \pm 0,8
C24:1-céramide	4,8 \pm 0,9	6,3 \pm 1,2	9,2 \pm 2,3
C24-céramide	1,4 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2	1,5 \pm 0,7
total céramides	14,7 \pm 3,4	19,7 \pm 3,8	35,5 \pm 8,8

Tableau 3 : Effet du TNF α sur les taux musculaires de SM dans les L6. Les quantités de SM sont données en picomoles par microgramme de protéines pour chaque espèce moléculaire. La baisse de chaque espèce est donnée en % de la somme de toutes les espèces dans le contrôle (colonne de droite).

Principales espèces de SMs	(pmol/ μ g protéine)		Baisse induite par le TNF α , en % du contrôle
	Contrôle	TNF α	
C16- SM	69,7 \pm 10,5	47,2 \pm 7,66	20,4 \pm 2,1
C18- SM	6,3 \pm 0,9	5,35 \pm 0,82	1,1 \pm 0,1
C20- SM	1,3 \pm 0,1	1,12 \pm 0,11	0,16 \pm 0,07
C22:1- SM	3,2 \pm 0,3	2,77 \pm 0,38	0,54 \pm 0,07
C22- SM	3,2 \pm 0,6	2,62 \pm 0,46	0,55 \pm 0,14
C24:1- SM	13,7 \pm 2,4	10,00 \pm 1,81	2,72 \pm 0,22
C24- SM	5,0 \pm 1,0	4,39 \pm 0,94	0,55 \pm 0,08
total SMs	118,8 \pm 17,2	85,7 \pm 13,1	30,4 \pm 2,1

Nous avons observé une hausse de 35,5 % du taux total de céramides, sous l'effet du traitement par le TNF α , due en particulier à des hausses des espèces en C16:0, C24:1, et C18:0 (*tableau 2*). En parallèle, nous avons observé une baisse des taux de SM, ce qui reflète une activation des sphingomyélinases. Les SMs hydrolysées sont principalement les espèces en C16:0 et C24:1 (*tableau 3*).

Nous avons ensuite évalué les effets des inhibiteurs de la synthèse des céramides sur les taux de sphingolipides intracellulaires, en présence de TNF α . Les inhibiteurs des deux voies inhibent l'augmentation de céramides induite par le TNF α (*figure 34A*), ce qui traduit l'efficacité des agents aux concentrations utilisées et confirme que l'augmentation de céramides en réponse au TNF α fait bien intervenir les deux voies de synthèse. La myriocine a un effet considérable puisqu'elle divise par deux le taux de céramides intracellulaires induit en présence de TNF α (*figure 34A, barre 4 versus barre 3*), tandis que les inhibiteurs de sphingomyélinases (*figure 34, barres 5 et 6*) ont des effets plus modérés, et rétablissent des taux de céramides comparables à celui du contrôle. Ces données suggèrent un rôle prépondérant de la voie *de novo* dans le maintien du niveau basal des céramides.

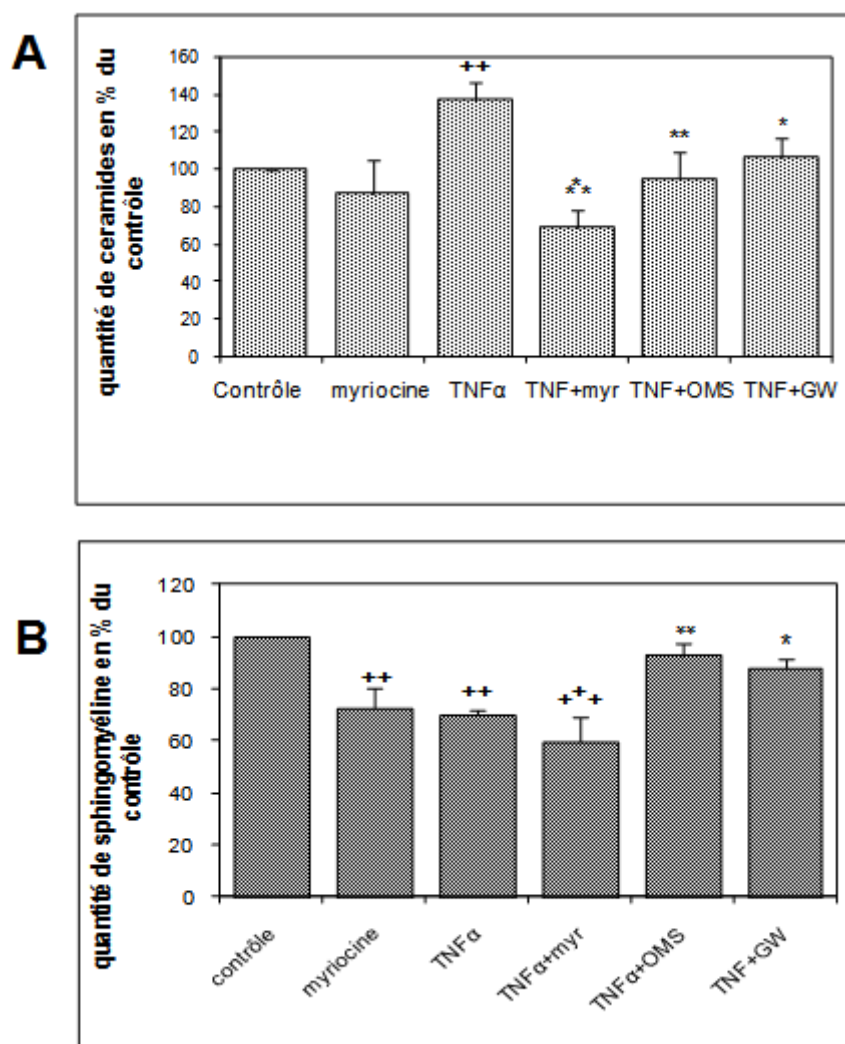


Figure 34 : Effets des inhibiteurs de la synthèse des céramides sur les taux de céramides et de SM des myotubes L6, en présence de TNF α .

A. Les taux de céramides totaux sont déterminés après 3 jours de traitement au TNF α avec ou sans 100 nM myriocine, 10 μ M GW4869, 1 μ M OMS. Les homogénats cellulaire subissent une extraction lipidique selon la méthode de Bligh et Dyer. La quantification des différentes espèces se fait par spectrométrie de masse (ESI MS/MS). Les résultats sont exprimés en % du contrôle (=14.7 \pm 3.4 pmoles de céramides/ μ g de protéine). Les moyennes \pm SEM de 3 à 5 expériences indépendantes sont représentées. ++ : différent de contrôle, $p=0,02$. * : différent de TNF α seul, $p=0,05$; ** : $p=0,02$; *** : $p<0,001$. **B.** Les taux de SM totale sont déterminés de la même manière. Les résultats sont exprimés en % du contrôle (= 118,8 \pm 17,2 pmoles de SM/ μ g de protéine). Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes sont représentées. ++ : différent de contrôle, $p=0,002$. +++ : $p<0,001$. * : différent de TNF α seul, $p=0,05$; ** : $p=0,02$.

Le TNF α induit une diminution de la SM relativement forte (-30%), qui est d'un niveau comparable à l'augmentation de céramides observée (figure 34B). Comme attendu, les inhibiteurs de sphingomyélinases GW4869 et OMS bloquent presque entièrement la chute de SM induite par le TNF α , ramenant les taux à des valeurs proches du contrôle (figure 34B, barre 5 et 6 versus barre 3). Au contraire, la myriocine induit *per se* une diminution des taux de SM, et amplifie l'effet négatif du TNF α (figure 34B, barre 4), ce qui est en accord avec

son effet connu de déplétion généralisée en intermédiaires sphingolipidiques, y-compris la SM (Hojjati *et al.* 2005).

4.2.3 Effets des inhibiteurs sur les taux endogènes de sphingosine

Les variations des taux de sphingosine endogène mesurés par spectrométrie de masse sont similaires à celles observées pour les céramides (*figure 35*) à la différence près que le TNF α n'induit pas une augmentation significative de la sphingosine ($p=0,08$). En effet, les inhibiteurs diminuent la quantité de sphingosine de l'ordre de 40% par eux-mêmes, et font de même en présence de TNF α . De manière intéressante, on retrouve un effet prépondérant de l'inhibition de la synthèse de novo par rapport au blocage des sphingomyélinases. Les variations de sphingosine sont donc parallèles à celles des céramides, ce qui s'explique par le fait que ces derniers en sont les précurseurs directs via la céramidase. L'augmentation modérée de sphingosine sous l'effet du TNF α , et la très faible teneur en sphingosine des cellules musculaires (environ 400 fois moins concentrée que les céramides) suggèrent que les céramides, plutôt que la sphingosine, sont les effecteurs primaires de l'action du TNF α .

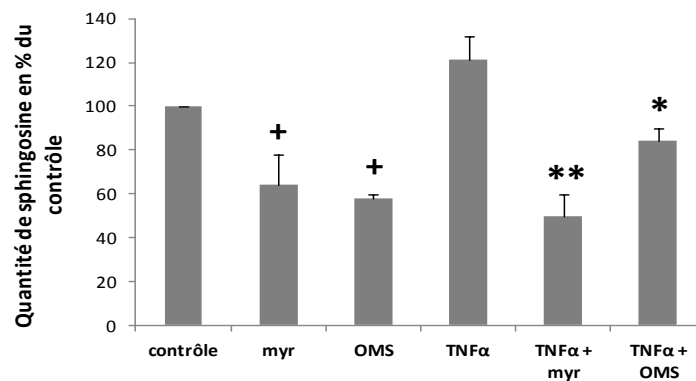


Figure 35 : Effets d'inhibiteurs des deux voies de synthèse de céramides, et du TNF α , sur les taux de sphingosine endogène.

Le taux de sphingosine est déterminé après 3 jours de traitement au TNF α avec ou sans 100 nM myriocine ou 1 μ M OMS. Les lipides des homogénats cellulaires sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer. La quantification se fait par spectrométrie de masse (ESI MS/MS). Les résultats sont exprimés en % du contrôle (= $40,4 \pm 13,3$ fmoles de sphingosine/ μ g de protéine). Les moyennes \pm SEM de 4 expériences indépendantes sont représentées. + : différent de contrôle, $p < 0,01$. * : différent de TNF α seul, $p = 0,005$; ** : $p < 0,0001$.

4.3 Rôle trophique de la Sphingosine-1-Phosphate

Dans la cellule, le céramide peut être métabolisé en de nombreux intermédiaires : en particulier, il sert de précurseur à la sphingosine et à la S1P, qui sont des composés bioactifs. Ces composés sont formés par l'action séquentielle des céramidases et de la sphingosine kinase, qui contrôlent leurs taux relatifs et ont ainsi un rôle majeur de contrôle du devenir cellulaire (Spiegel et Milstien 2003). C'est pourquoi nous avons évalué l'impact de la S1P sur la réponse des myotubes L6 au TNF α (figure 36).

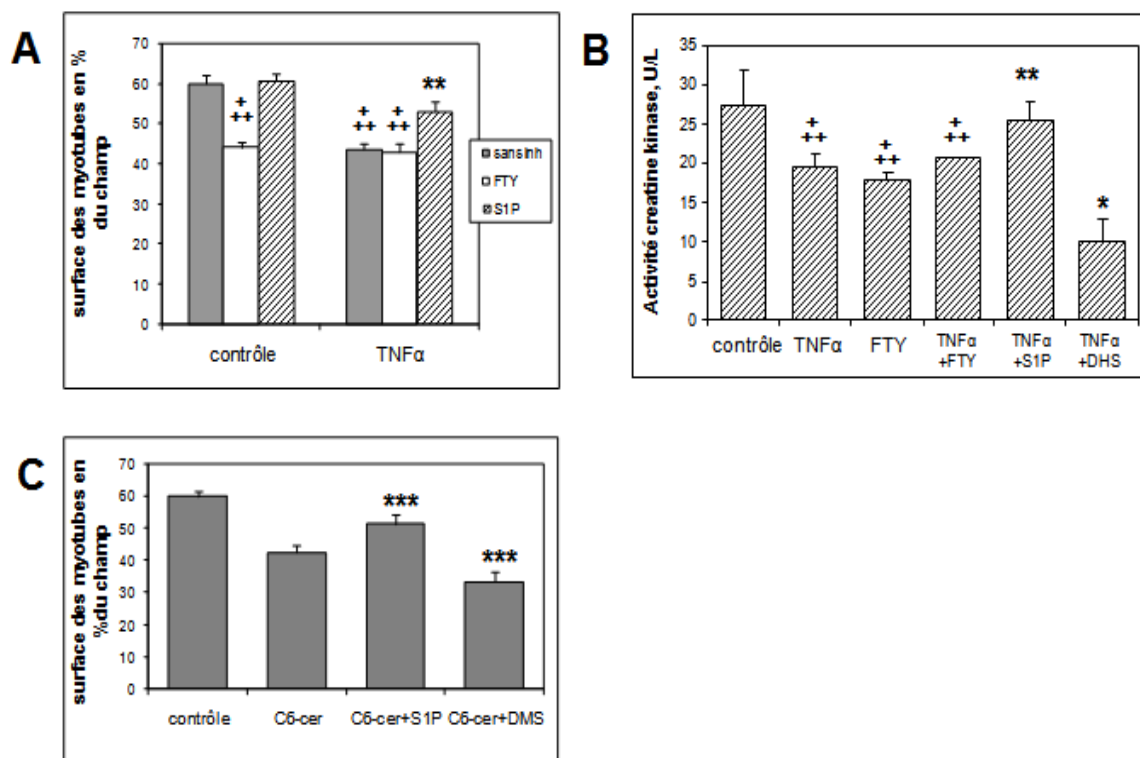


Figure 36 : Effets de la S1P sur la réponse des myotubes L6 au TNF α .

A. La surface des myotubes est mesurée après 3 jours de traitement avec ou sans TNF α 15 ng/ml, et en présence ou non de 1 μ M de S1P, ou de 1 μ M de FTY720, un inhibiteur des récepteurs à S1P. La surface des cellules est évaluée comme dans la figure 24. Les résultats sont exprimés en % de surface du champ. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes quantifiées sur 10 champs sont représentées. +++ : différent du contrôle sans inhibiteur, $p = 0,0001$. ** : différent de TNF α seul, $p = 0,004$. **B.** Les cellules sont traitées avec du TNF α durant 3 jours avec ou sans 1 μ M S1P, 1 μ M FTY720 ou 10 μ M d'inhibiteur de sphingosine kinase dihydrosphingosine (DHS). L'activité créatine kinase des myotubes est évaluée comme dans la figure 27. Les moyennes \pm SEM d'au moins 3 expériences indépendantes dosées en triple sont exprimées en unités enzymatiques par litre. +++ : différent de contrôle, $p < 0,003$. ** : différent de TNF α seul, $p < 0,01$; * : $p < 0,05$. **C.** La surface des myotubes est mesurée après 3 jours de traitement avec ou sans C6-céramide 5 μ M, et en présence ou non de 1 μ M S1P, ou 10 μ M d'inhibiteur de sphingosine kinase diméthylsphingosine (DMS). La surface des cellules est mesurée comme dans la figure 24. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes quantifiées sur 10 champs sont représentées. Les résultats sont exprimés en % de surface du champ. *** : différent de C6-céramide seul, $p < 0,005$.

L'apport de S1P exogène dans le milieu de culture a un effet positif sur la surface des cellules et sur l'activité créatine kinase, en présence de TNF α (*figure 36 A et B*). La S1P a donc un effet protecteur, ce qui suggère que la métabolisation des céramides en S1P pourrait contrebalancer leurs effets pro-atrophiques. L'action antagoniste de la S1P exogène est confirmée par son effet de réversion de l'atrophie induite par le C6-céramide (*figure 36C*).

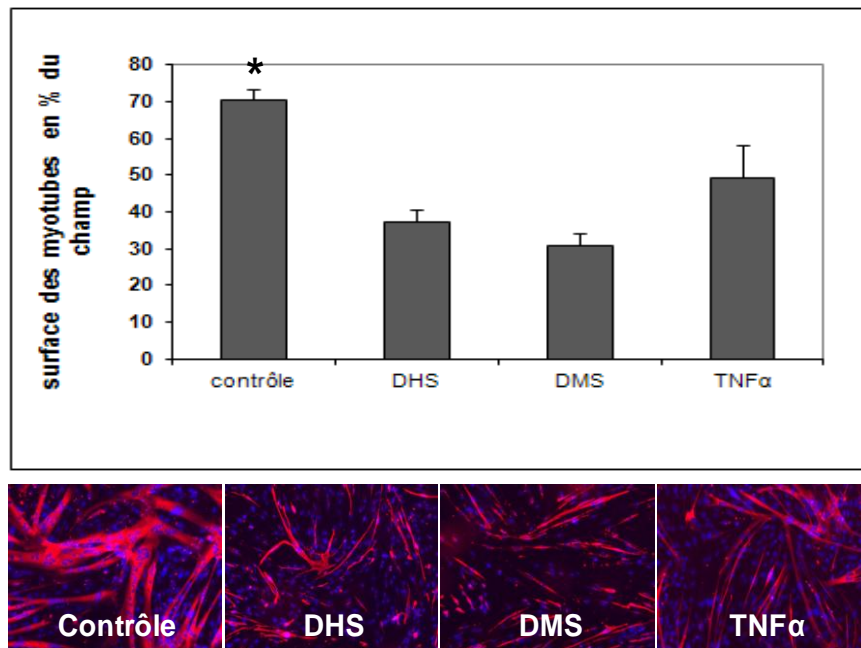


Figure 37 : Effets de l'inhibition de la sphingosine kinase sur la surface des myotubes.

La surface des myotubes est mesurée après 3 jours de traitement en présence de TNF α 15 ng/ml (utilisé comme témoin), ou de 10 μ M DHS, ou de 10 μ M DMS. La surface des cellules est mesurée comme dans la figure 24. Les moyennes \pm SEM évaluées sur 10 champs sont représentées. Les résultats sont exprimés en % de surface du champ. * : différent des autres valeurs, $p < 0,0001$.

Pour évaluer l'implication de la S1P endogène dans notre modèle, deux inhibiteurs de sphingosine kinase bloquant la biosynthèse de S1P, diméthylsphingosine (DMS) et D,L-thréo-dihydrosphingosine (DHS) (Takabe *et al.* 2008), ont été ajoutés. Ils provoquent par eux-mêmes une forte diminution de la surface des myotubes, encore plus marquée que celle induite par le TNF α (*figure 37*). Les inhibiteurs de sphingosine kinase potentialisent aussi les effets atrophiques du TNF α (*figure 36B*) et du C6-céramide (*figure 36C*). Le maintien d'un taux basal de S1P serait donc important pour maintenir la taille des myotubes. La S1P agit de manière autocrine ou paracrine : elle est sécrétée et peut se fixer sur ses récepteurs membranaires S1P1, S1P2 et S1P3 présents à la surface des cellules musculaires (Meacci *et al.* 2003). Pour confirmer ce rôle de S1P, nous avons utilisé le composé FTY720, qui se comporte, fonctionnellement, comme un antagoniste des récepteurs à S1P en provoquant leur

« down-régulation » (Graler et Goetzl 2004). Comme attendu, FTY720 a un effet négatif par lui-même sur la surface des myotubes et l'activité créatine kinase (*figure 36A-B*). Dans notre système, le céramide et la S1P ont donc des fonctions opposées. Cependant, les effets de FTY et TNF α ne sont pas additifs (*figure 36A-B*), ce qui suggère que le TNF α pourrait induire une baisse des taux de S1P endogène.

4.4 Les céramides modifient l'équilibre entre synthèse et dégradation protéique

4.4.1 Synthèse protéique et protéolyse

L'homéostasie des myotubes dépend de l'équilibre entre synthèse et dégradation protéique, qui est le reflet de l'état métabolique des cellules. Nous avons évalué l'effet du TNF α et des différents inhibiteurs sur la protéosynthèse et la protéolyse. Le taux de synthèse protéique a été mesuré par l'incorporation de tyrosine tritiée dans les protéines néosynthétisées. Le traitement des myotubes L6 par le TNF α induit une forte chute de la synthèse protéique de l'ordre de 25% après seulement 12 heures, et l'addition des inhibiteurs de synthèse de céramides limite cette baisse (figure 38).

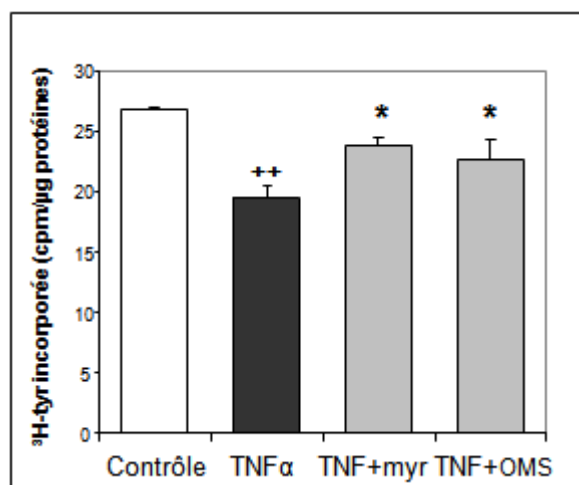


Figure 38 : Effet du TNF α et des inhibiteurs de la synthèse de céramides sur la synthèse protéique.

Les myotubes L6 sont traités pendant 12 heures avec du TNF α 15 ng/ml, avec ou sans 100 nM myriocine ou 10 μ M OMS, puis le milieu est remplacé par un milieu supplémenté en [³H]-Tyrosine pendant une heure. Les cellules sont ensuite lavées puis grattées et les protéines précipitées avec de l'acide tri-chloroacétique. Le taux de synthèse protéique est exprimé par la radioactivité du culot protéique en coups par minutes, rapportée à la quantité de protéines. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes sont présentées. ++ : différent de contrôle, $p=0,001$. * : différent de TNF α seul, $p\leq 0,05$.

La protéolyse a été évaluée d'après le relargage de la radioactivité, incorporée par les myotubes après deux jours de culture en présence de tyrosine tritiée. Le TNF α tend à augmenter la protéolyse, et les inhibiteurs diminuent significativement la protéolyse en présence de TNF α (figure 39). Ces résultats montrent que la formation de céramides induite par le TNF α perturbe l'équilibre synthèse-dégradation en activant la protéolyse et en diminuant la synthèse.

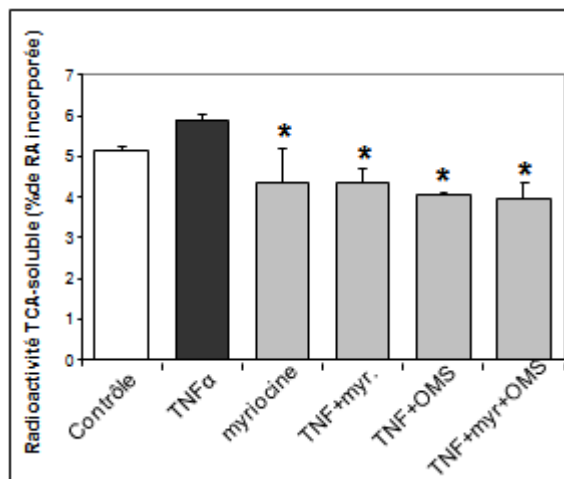


Figure 39 : Effets du TNF α et des inhibiteurs sur la protéolyse.

Les myotubes L6 sont d'abord marqués pendant 48 heures en présence de $[^3\text{H}]$ -Tyrosine, puis sont traités pendant 12 heures avec du TNF α 15 ng/ml, avec ou sans myriocine 100 nM ou OMS 10 μM , ou avec les deux. Les cellules sont ensuite lavées et grattées, et les protéines précipitées avec de l'acide tri-chloroacétique (TCA). La radioactivité TCA soluble du milieu (correspondant aux acides aminés relargués) est mesurée et rapportée à la radioactivité incorporée par les cellules. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes sont présentées. *: différent de TNF α seul, $p \leq 0,005$.

4.4.2 Les céramides induisent une activation des voies de protéolyse

La dégradation des protéines au niveau des cellules est assurée essentiellement par deux voies : le système ubiquitine-protéasome, et l'autophagie, qui participent à parts égales à l'atrophie musculaire. Nous avons évalué l'effet de l'accumulation de céramides induite par le TNF α sur ces deux voies.

Le système ubiquitine-protéasome, qui cible en particulier les protéines myofibrillaires, consiste en une suite de trois étapes assurées par les protéines E1, E2, E3, qui catalysent la poly-ubiquitinylation séquentielle des molécules-cibles, et leur adressage vers le protéasome où elles seront dégradées (Urso 2009). L'atrophie musculaire est communément associée à l'activation d'un ensemble de gènes appelé atrogènes (Lecker *et al.* 2004), incluant les E3 ubiquitine-ligases atrogène-1 et MurF1 (Bodine *et al.* 2001) qui ciblent spécifiquement les protéines myofibrillaires telles que la myosine (Haas *et al.* 1982). Une des cibles privilégiée est le facteur d'initiation de la traduction eIF3f, connu pour être spécifiquement ubiquitinylé par l'atrogène-1, puis dégradé par le système protéasome en conditions atrophiques (Lagrand-Cantaloube *et al.* 2008).

L'autre voie de protéolyse, l'autophagie, a longtemps été négligée dans le cadre de l'atrophie musculaire du fait de la difficulté à détecter une augmentation de son activité *in*

in vivo. Elle consiste en une voie compartimentée permettant la digestion lysosomale de protéines et d'organites séquestrés par un jeu de vésicules complexe (Wing *et al.* 2011). Récemment, de nombreux marqueurs de l'autophagie tels que la cathepsine L, LC3 et GabarapL ont été associés à l'atrophie musculaire (Deval *et al.* 2001; Mammucari *et al.* 2007). Nous avons donc évalué les effets du TNF α et des inhibiteurs de la synthèse de céramides sur l'expression des atrogènes et la quantité protéique de eIF3f.

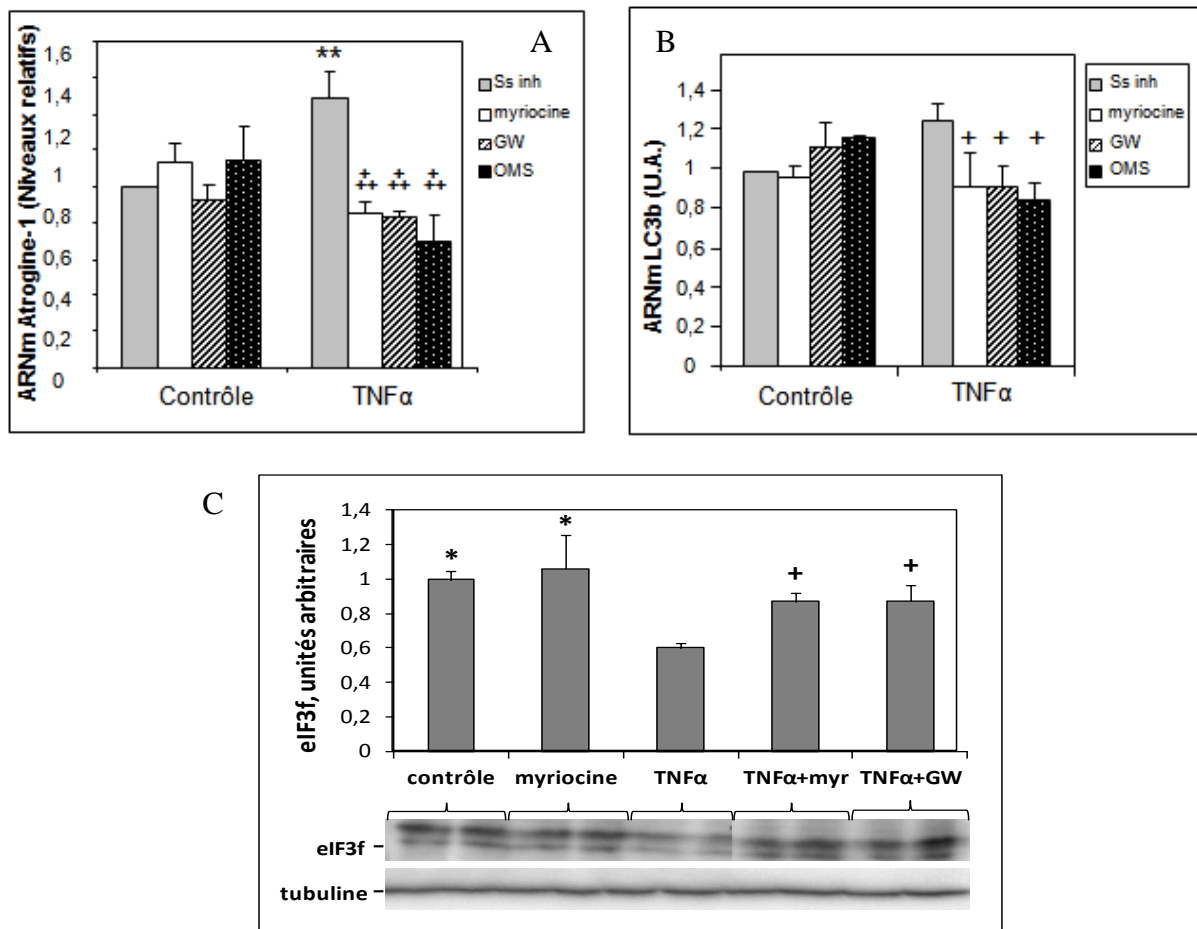


Figure 40 : Effets du TNF α et des inhibiteurs de la synthèse de céramides sur l'expression de gènes impliqués dans la protéolyse.

Les taux d'ARNm d' Atrogine-1 (A) et LC3b (B) ont été mesurés par RT-qPCR dans des myotubesL6 traités avec 15 ng/ml de TNF α , et en présence ou non de 100 nM myriocine, 10 μ M OMS ou 10 μ M GW4869. Les taux sont normalisés par l'ARNm de TBP (TATA box Binding Protein). Les moyennes +/- SEM de 3 expériences indépendantes sont présentées. **: différent de contrôle, $p=0,01$. +++ : différent de TNF α seul, $p\leq 0,001$, + : $p<0,05$. C. Les myotubes sont traités pendant 3 jours avec ou sans TNF α et en présence ou non de 100 nM myriocine ou 10 μ M GW. Les taux de eIF3f ont été mesurés par Western blot et normalisés par la tubuline. Les moyennes +/- SEM de 3 expériences indépendantes sont présentées. * : différent de TNF α seul, $p<0,005$, + : $p<0,05$.

Nous avons observé que le TNF α augmente l'expression d'atrogine-1, tandis que la myriocine, GW4869 et OMS diminuent son expression, confirmant que l'accumulation de

céramides pro-atrophiques est un inducteur de la protéolyse protéasome-dépendante (*figure 40A*). Ceci est confirmé par une diminution concomitante de la quantité de eIF3f en présence de TNF α , et par sa restauration en présence des inhibiteurs (*figure 40C*). Par contre, le TNF α et les inhibiteurs n'ont pas d'effet significatif sur l'expression de MurF1 (*non montré*).

LC3b est un constituant des autophagosomes utilisé comme marqueur de l'autophagie (Kabeya *et al.* 2000), qui est augmenté en cas d'atrophie (Zhao *et al.* 2007). Les inhibiteurs de la synthèse de céramides diminuent de manière significative l'expression de l'ARNm de LC3b en présence de TNF α (*figure 40B*), suggérant que les céramides sont également capables d'activer l'autophagie lors de l'atrophie induite par le TNF α .

4.5 Recherche des voies de signalisation impliquées dans l'action atrophique des céramides

Les céramides influent sur diverses voies de signalisation, parmi lesquelles la voie de la PLD. De plus, la PLD est régulée par le TNF α dans plusieurs systèmes (Kang *et al.* 1998; Sethu *et al.* 2008). La PLD pourrait donc être impliquée dans les réponses trophiques au TNF α et aux céramides. Nous avons, dans un premier temps, déterminé l'impact de la modulation de l'activité PLD sur la physiologie des myotubes *in vitro*.

4.5.1 Rôle de la PLD dans l'atrophie

4.5.1.1 La modulation de l'expression de l'isoforme PLD1 a des effets trophiques

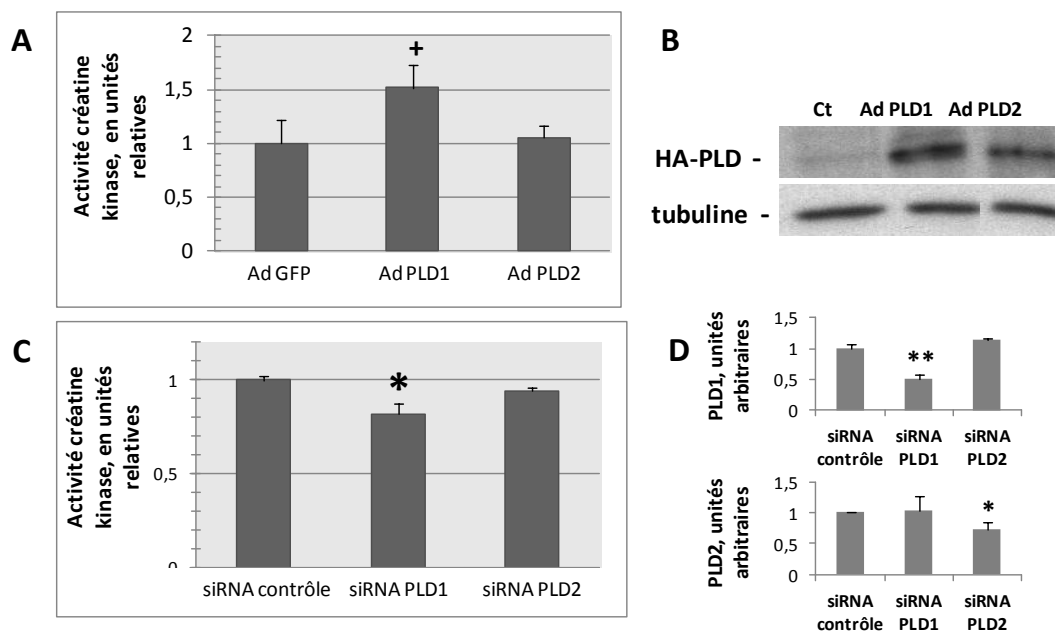


Figure 41 : Effets de la surexpression et de la down-régulation de la PLD sur l'activité créatine kinase des myotubes L6.

A. Les cellules sont infectées par des adénovirus codant pour les 2 isoformes de PLD, ou par un adénovirus codant pour la GFP (contrôle) durant 2 jours. L'activité créatine kinase est mesurée sur les homogénats cellulaire, comme dans la figure 27. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triple sont exprimées par rapport à la valeur contrôle. + : différent du contrôle, $p < 0,01$. **B.** Contrôle de surexpression des deux isoformes de PLD : Les cellules sont infectées avec les adénovirus correspondants, ou par l'adénovirus-GFP pendant 48h. Les taux de protéine sont ensuite évalués par Western blot grâce à un anticorps dirigé contre le tag HA présent sur les deux formes de PLD recombinantes. **C.** Les cellules sont transfectées pendant 48h par des ARNi anti-PLD1 ou anti-PLD2 ou ARNi contrôle, puis l'activité créatine kinase des homogénats est mesurée comme dans la figure 27. Les moyennes \pm SEM de 2 expériences indépendantes réalisées en triple sont exprimées par rapport à la valeur contrôle. * : différent du contrôle, $p < 0,01$. **D.** Contrôle d'expression des deux isoformes de PLD : les cellules sont transfectées pendant 48h avec les ARNi anti-PLD1 ou anti-PLD2 ou contrôle puis le niveau d'expression ARN des deux isoformes est mesuré par RT-

qPCR quantitative. Les moyennes +/- SEM de 2 expériences en double sont exprimées par rapport à la valeur contrôle. * : différent du contrôle, $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

Nous avons montré que la surexpression de l'isoforme 1 de PLD (PLD1), vérifiée par Western blot (*figure 41B*), induit une hypertrophie par elle-même, observée ici sur l'activité créatine kinase (*figure 41A*), tandis que la PLD2 n'a pas d'effet trophique. De manière cohérente, la down-régulation ARNi-induite de PLD1 a un effet atrophique mis en évidence par la baisse d'activité créatine kinase (*figure 41C*), alors que la down-régulation de PLD2 n'affecte pas significativement les myotubes. La régulation de l'expression de PLD1 ayant des effets trophiques dans les myotubes L6, cette enzyme constitue un bon candidat pour expliquer l'effet atrophique des céramides.

4.5.1.2 L'inhibition de PLD mime l'effet inducteur des céramides et du TNF α sur les atrogènes

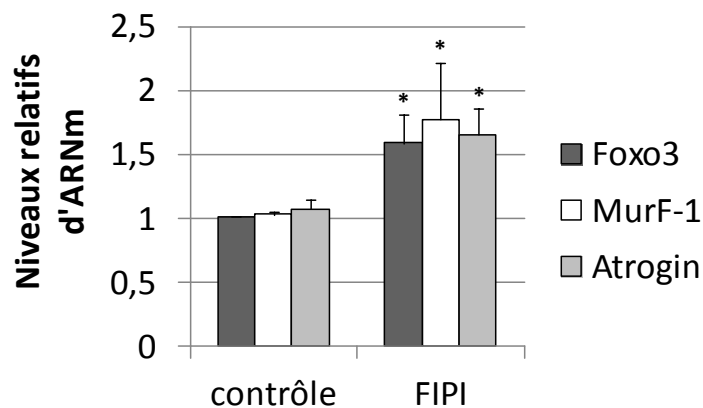


Figure 42 : Effet de l'inhibiteur de la PLD, FIPI, sur l'expression des atrogènes.

Les taux d'ARNm de FoxO3, Atrogin-1 et MurF1 ont été mesurés par RT-qPCR dans des myotubes traités ou non avec le FIPI à 0,5 μ M durant 48h. Les taux sont normalisés par l'ARNm de TBP (TATA box Binding Protein). Les moyennes +/- SEM de 4 mesures sont représentées. * : différent de contrôle, $p < 0,05$.

Nous avons déterminé les effets de l'inhibition de la PLD par un inhibiteur spécifique, le 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopémide (FIPI), actif sur les deux isoformes de PLD (Su *et al.* 2009). L'inhibition de la PLD chez des myotubes L6 induit une augmentation de l'expression des atrogènes (*figure 42*), comparable à celle induite par le TNF α (*figure 40A*), ce qui suggère qu'un même "programme atrophique" est activé par l'inhibition de PLD et par le TNF α .

4.5.1.3 L'action du TNF α passe par la down-régulation de la PLD

Le céramide est décrit comme un inhibiteur de l'expression de PLD1. La PLD est un activateur reconnu de la kinase mTOR, point de contrôle majeur de la synthèse protéique via ses effecteurs S6K1 et 4E-BP1, et régulateur de la protéolyse via son impact sur Akt et FoxO (Frost et Lang 2011). mTOR est vital dans l'homéostasie du muscle, pour l'intégration de signaux cataboliques ou anaboliques (Bentzinger *et al.* 2008). Nous avons donc recherché les effets du TNF α et des inhibiteurs de la synthèse de céramides sur cette cascade de signalisation dans les myotubes L6, en commençant par la PLD1.

Le TNF α induit une forte diminution de l'expression de l'ARNm de PLD1 (divisée par 4 par rapport au contrôle) (*figure 43A barre 4*). La myriocine n'a aucun effet par elle-même, et GW4869 augmente modérément son expression (*figure 43A*). Par contre, en présence de TNF α , la myriocine rétablit partiellement l'expression de la PLD1 et GW4869 la rétablit entièrement. Le blocage total de la synthèse de céramides par ajout simultané des deux inhibiteurs en présence de TNF α révèle un effet synergique puisqu'il augmente de manière spectaculaire le taux d'ARNm de PLD1 (3,5 x par rapport au contrôle et 14 x par rapport à TNF α seul).

Ces effets sont confirmés au niveau de la protéine, le TNF α induisant une baisse de la quantité de PLD1 qui est reversée par le traitement avec les inhibiteurs de la synthèse de céramides (*figure 43B*). Nous pouvons en déduire que le TNF α down-régule PLD1, via la formation de céramides.

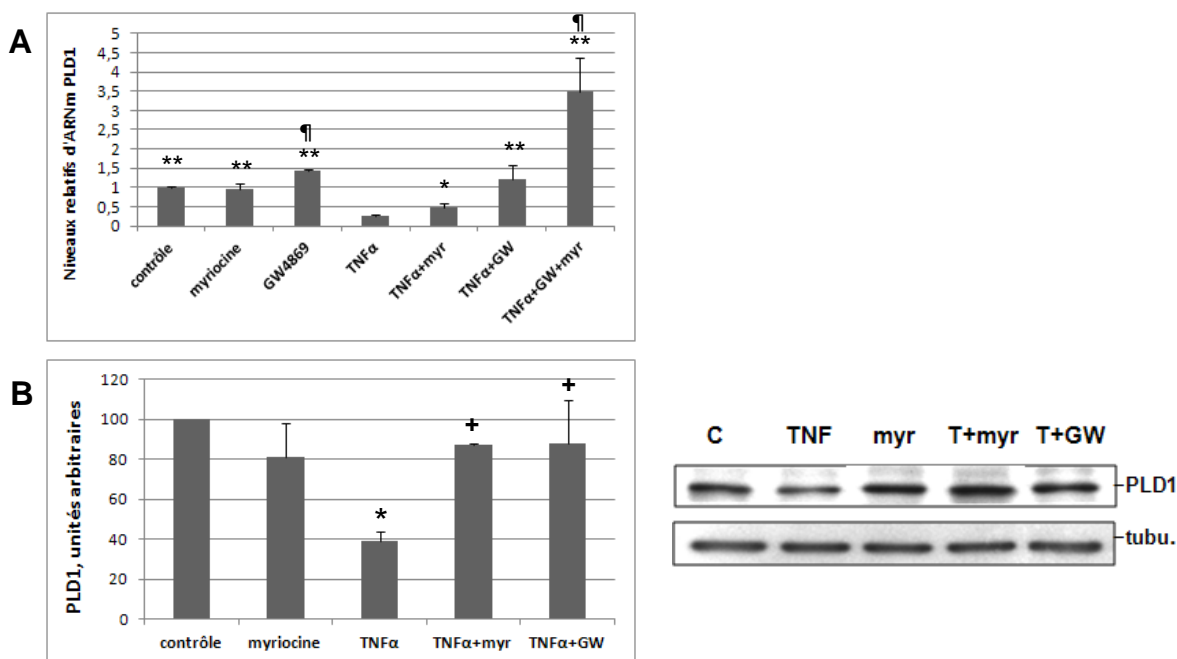


Figure 43 : Effets du TNF α et des inhibiteurs de synthèse de céramide sur l'expression de PLD1.

Les myotubes sont traités pendant 3 jours avec du TNF α en présence ou non d'inhibiteurs : myriocine 100 nM, GW 10 μ M, ou les deux. **A.** Les taux d'ARNm de PLD1 ont été mesurés par RT-qPCR et normalisés par l'ARNm de TBP (TATA box Binding Proteine). Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes en double sont représentées. * : différent de TNF α seul, $p \leq 0,05$, ** : $p < 0,001$. ¶ : différent de contrôle, $p \leq 0,05$. **B.** La protéine PLD1 est analysée par Western blot après immuno-précipitation. Les résultats sont normalisés par la tubuline. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes sont représentées. * : différent de contrôle, $p \leq 0,01$, ** : différent de TNF α , $p = 0,02$.

4.5.1.4 L'acide phosphatidique (PA), produit de la PLD, s'oppose à l'action atrophique du TNF α

Pour confirmer l'implication de la PLD dans les effets du TNF α , nous avons étudié les effets de son produit PA. L'ajout de PA exogène dans le milieu de culture, qui mime une activation de PLD, permet de s'opposer à l'effet négatif du TNF α sur l'activité créatine kinase (figure 44). Ceci confirme que le TNF α provoque une altération de la signalisation par la PLD, responsable de ses effets atrophiques.

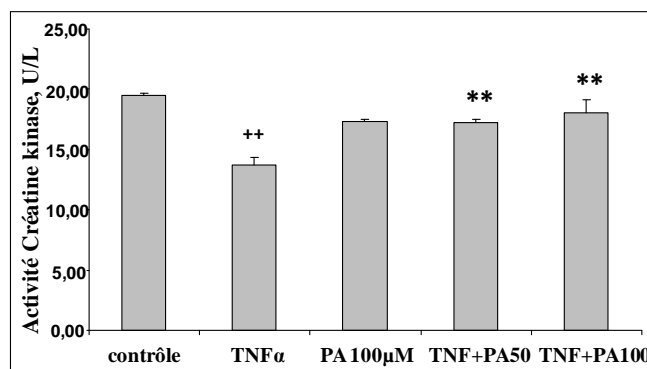


Figure 44 : Effets de l'acide phosphatidique exogène sur l'activité créatine kinase.

Les cellules sont traitées avec ou sans TNF α , en présence ou non de dioctanoyl-PA à 50 μ M ou 100 μ M. L'activité créatine kinase des homogénats cellulaires est dosée comme dans la figure 27. Les moyennes +/- SEM de 3 expériences indépendantes dosées en triples sont exprimées en unités enzymatiques par litre. **: différent de TNF α , $p \leq 0,01$.

4.5.2 Impact des céramides sur la voie mTOR

4.5.2.1 Implication des effecteurs de la voie mTORC1

Notre équipe a récemment montré que la PLD est capable d'activer les deux complexes mTORC1 et mTORC2 dans des myoblastes L6 (Jaafar *et al.* 2011). mTORC1 active la synthèse protéique, principalement en phosphorylant S6K1 et 4E-BP1.

4.5.2.1.1 Effet du TNF α et des céramides sur S6K1

S6K1 est un effecteur de mTORC1 qui régule positivement la synthèse protéique en phosphorylant la sous-unité ribosomale S6, qui en réponse enclenche la traduction de protéines ribosomales et de facteurs d'élongation (Bodine 2006; Laplante et Sabatini 2009). Nous avons évalué dans les myotubes L6, par Western blot, la phosphorylation de S6K1 sur le résidu Thréonine 389, qui rend compte de l'activation par mTORC1. Le TNF α seul affecte peu l'état de phosphorylation de S6K1 (*figure 45B*). Cependant, l'addition de myriocine induit une forte augmentation de la phosphorylation (+75%), en même temps qu'une augmentation de la protéine totale (+50%), confirmée par l'augmentation de son ARNm (*figure 45A*). Donc l'augmentation de la forme phosphorylée de S6K1 est due à la fois à une augmentation de l'expression de la protéine et à l'augmentation de son taux de phosphorylation.

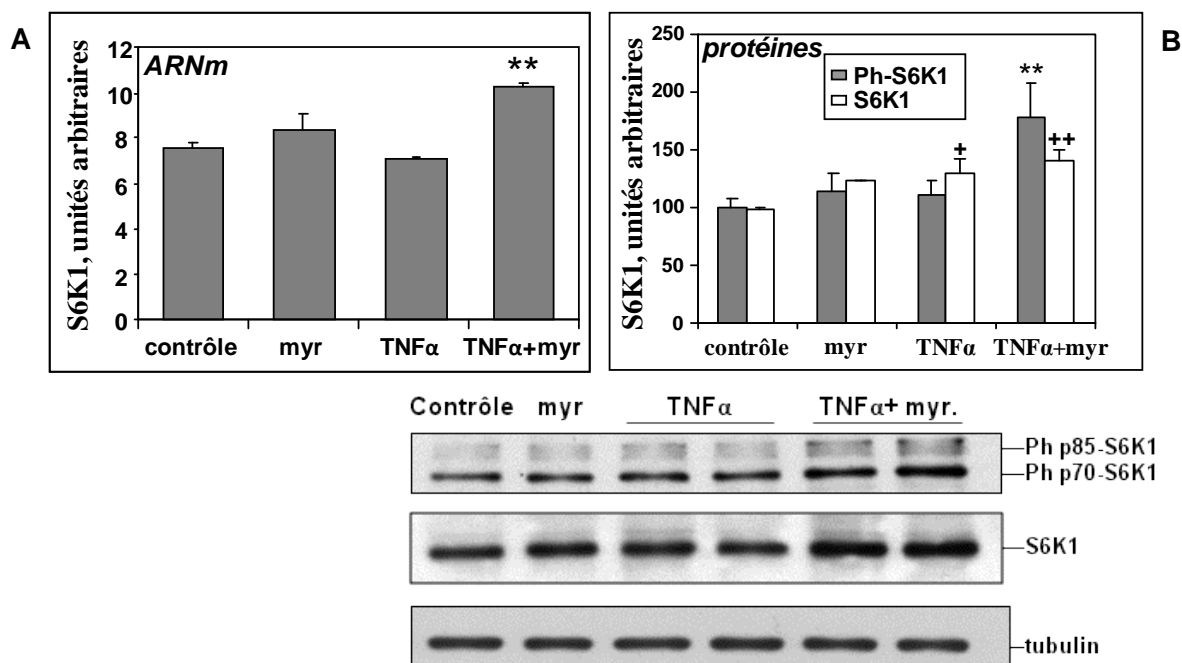


Figure 45 : Effets du $TNF\alpha$ et de la myriocine sur l'expression et la phosphorylation de S6K1.

Les myotubes sont traités pendant 3 jours avec ou sans $TNF\alpha$, et en présence ou non de myriocine 100 nM. **A.** Les taux d'ARNm de S6K1 ont été mesurés par RT-qPCR et normalisés par l'ARNm de TBP. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes dosées en double sont représentées. **: différent de contrôle et $TNF\alpha$ seul, $p < 0,01$. **B.** La protéine totale S6K1 et la forme phospho-Thr 389-S6K1 ont été analysées par Western blot dans les extraits cellulaires. Les résultats sont normalisés par la tubuline. Le graphique est représentatif de 2 expériences indépendantes.

4.5.2.1.2 Effet du $TNF\alpha$ et des céramides sur 4E-BP1

4E-BP1, un autre effecteur de mTORC1, est une protéine qui bloque l'initiation de la traduction en séquestrant eIF-4E et en empêchant sa fixation sur la coiffe en 5' de l'ARNm. Sa phosphorylation par mTORC1 bloque son action inhibitrice (Leger *et al.* 2006). Dans les myotubes L6, le $TNF\alpha$ seul affecte peu l'état de phosphorylation de 4E-BP1 et l'addition de myriocine induit une forte augmentation de la phosphorylation (x 2,5 fois) (figure 46).

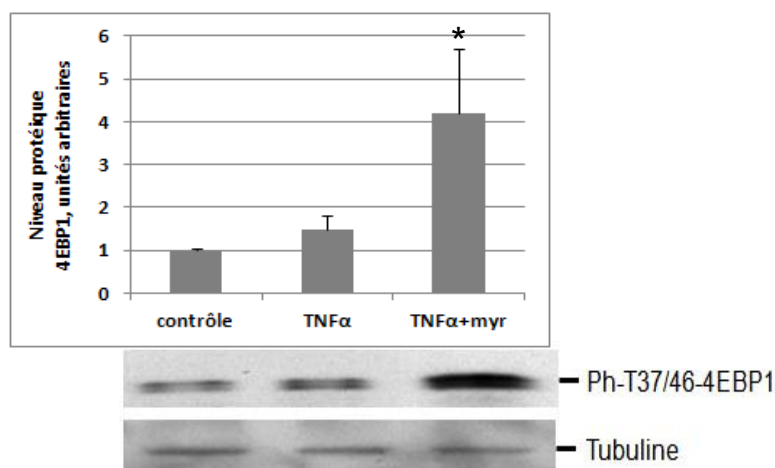


Figure 46 : Effets du TNF α et de la myriocine sur la phosphorylation de 4E-BP1.

Les myotubes sont traités pendant 3 jours avec ou sans TNF α , et en présence ou non de myriocine 100 nM. Les taux de Phospho- 4E-BP1 ont été évalués par Western blot et normalisés par la tubuline. Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes sont représentées. * : différent de contrôle et de TNF α seul, $p < 0,05$.

L'activation de 4E-BP1 et S6K1, tous deux substrats de mTORC1, est parallèle. Nous montrons donc qu'en présence de TNF α le blocage de la synthèse de céramides influe positivement sur la synthèse protéique.

4.5.2.2 Implication de la voie mTORC2

La kinase Akt est un substrat de mTORC2 qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la protéolyse (Stitt *et al.* 2004). Pour évaluer l'impact du TNF α et de l'inhibition de la synthèse de céramides, nous avons mesuré la phosphorylation de Akt sur le résidu Serine 473 qui rend compte de son état d'activation (*figure 47*). De manière inattendue, le TNF α seul n'induit pas de baisse de Phospho-Akt, mais tend plutôt à un effet positif proche de celui observé pour S6K1 (*figure 45B*). Cet effet est fortement amplifié par le blocage de la synthèse de céramides, que ce soit avec la myriocine ou avec le GW4869, ce qui montre que les céramides ont un effet inhibiteur sur Akt.

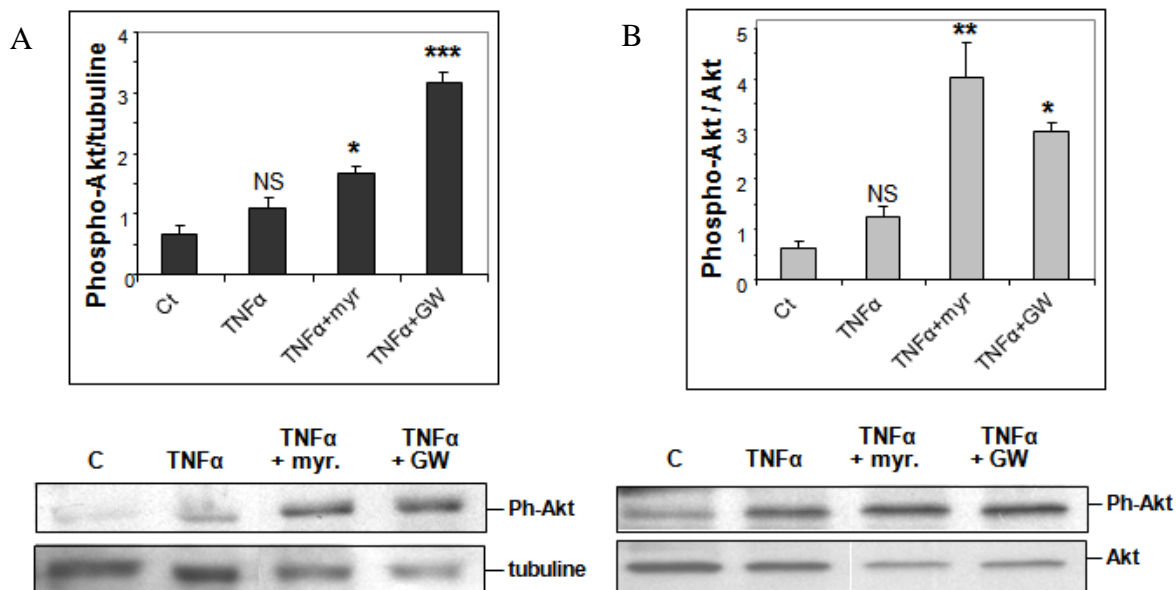


Figure 47 : Effets du TNF α et des inhibiteurs de synthèse de céramides sur Akt.

Les myotubes sont traités pendant 3 jours avec ou sans TNF α , et en présence ou non de myriocine 100 nM ou GW4869 10 μ M. Les taux de Phospho-Ser473-Akt ont été évalués par Western blot, et normalisés par la tubuline (A), ou par Akt total (B). Les moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes sont représentées. *** : différent de TNF α seul, $p < 0,001$, ** : $p < 0,01$, * : $p < 0,05$.

En présence de TNF α , l'activation de la kinase Akt par les inhibiteurs de la synthèse de céramides pourrait donc participer à l'inhibition de la protéolyse observée dans ces conditions (figure 39).

Ces résultats permettent de proposer un modèle, selon lequel l'accumulation de céramides induite par le TNF α inhibe la PLD1, ce qui a pour conséquence de réguler négativement les effecteurs de mTOR, S6K1 et 4E-BP1 impliqués dans le contrôle de la traduction, et Akt qui contrôle l'expression des atrogènes.

4.5.3 Le TNF α active la voie NF κ B, mais les céramides ne sont pas impliqués

Le TNF α exerce ses propriétés cataboliques via un grand nombre de voies de signalisation. L'une d'entre-elles induit la translocation nucléaire du facteur de transcription NF κ B (Cai *et al.* 2004). La fixation du TNF α sur son récepteur induit le recrutement de l'I κ B kinase (IKK) qui phosphoryle l'inhibiteur de NF κ B I κ B, et le dirige vers le protéasome par lequel il est dégradé. Ceci provoque l'activation de NF κ B et la transcription de protéines impliquées dans la protéolyse (Li et Reid 2000; Ladner *et al.* 2003). Nous avons donc

recherché une éventuelle implication de la voie NF κ B dans les effets cataboliques des céramides.

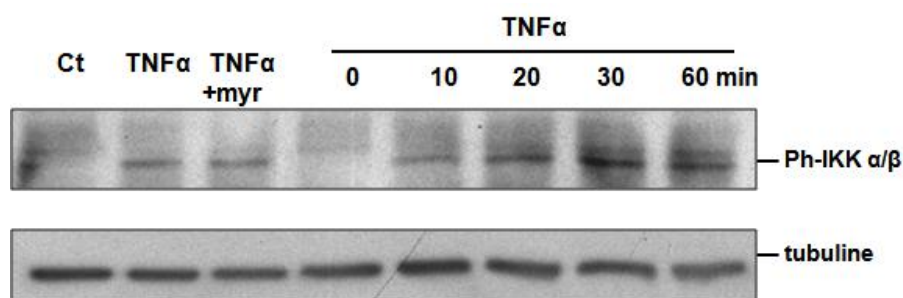


Figure 48 : Effets du TNF α et de la myriocine sur IKK α/β .

Les myotubes L6 sont traités durant les temps indiqués par 15 ng/ml de TNF α , en présence ou en absence de myriocine 100 nM. Les 3 premiers puits correspondent à un traitement de 10 minutes. La forme activée de IKK, Phospho-IKK, est analysée par Western blot. Le graphique est représentatif de 2 expériences indépendantes.

Le traitement des myotubes L6 par le TNF α induit une phosphorylation rapide de IKK α/β avec un maximum atteint à 30 minutes. Le traitement par la myriocine n'a pas d'influence sur la réponse au TNF α , ce qui montre que la voie des sphingolipides n'est pas impliquée dans l'activation de NF κ B dans ce système (*figure 48*).

4.6 Etude *in vivo* : l'inhibition de la synthèse de céramides protège contre l'atrophie musculaire induite par un adénocarcinome C26 chez la souris

L'implantation d'un carcinome du côlon C26 chez des souris BalB/c est un modèle expérimental de cachexie bien décrit, qui se caractérise par une fonte musculaire marquée chez l'hôte (Aulino *et al.* 2010), associée à des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires circulantes, dont le TNF α (Saini *et al.* 2006). Pour évaluer l'implication des céramides dans la fonte musculaire tumeur-induite, nous avons étudié les effets d'un traitement des animaux par la myriocine, connue pour diminuer les taux musculaires de céramides *in vivo* (Ussher *et al.* 2010).

4.6.1 Le développement de la tumeur induit un syndrome cachectique

L'implantation sous-cutanée d'un fragment de tumeur de 1 mm² induit une forte chute du poids corporel après 10 à 15 jours (Figure 49). Elle est accompagnée d'une fonte musculaire objectivée par la baisse du poids des muscles Gastrocnemius et Tibialis et par la diminution de taille de leurs fibres.

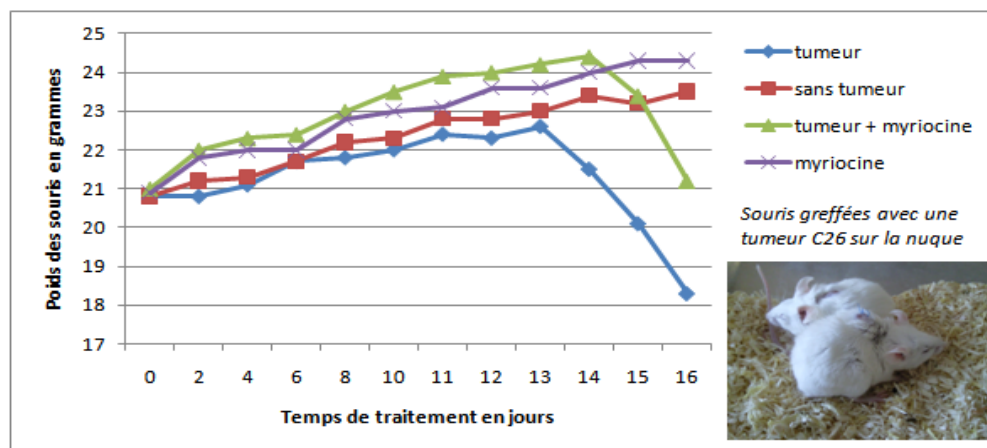


Figure 49 : Courbe de poids des souris.

Chaque courbe correspond à une souris caractéristique de chaque groupe. Chaque souris des "groupes tumeur" subit une greffe à J0. Les groupes traités par la myriocine reçoivent quotidiennement une injection i.p. de myriocine 0,1 mg/kg, à partir de J8. Les souris +tumeur sont euthanasiées après une perte de poids supérieure ou égale à 3 grammes, et un témoin est sacrifié au même moment.

4.6.2 L'injection de myriocine préserve le poids et la taille des muscles chez les souris greffées

Pour évaluer l'implication des céramides dans ce modèle, les souris ont été traitées par une injection quotidienne i.p. de 0,1mg/kg de myriocine. Le traitement par la myriocine n'a pas d'effet sensible chez les souris témoins, et n'affecte ni la taille des tumeurs, ni le délai de survenue de la cachexie chez les souris implantées. Par contre, il s'oppose à l'atrophie en restaurant partiellement le poids des muscles (significatif pour le Tibialis, tendance pour le Gastrocnemius), et la section moyenne des fibres (significatif pour les deux muscle).

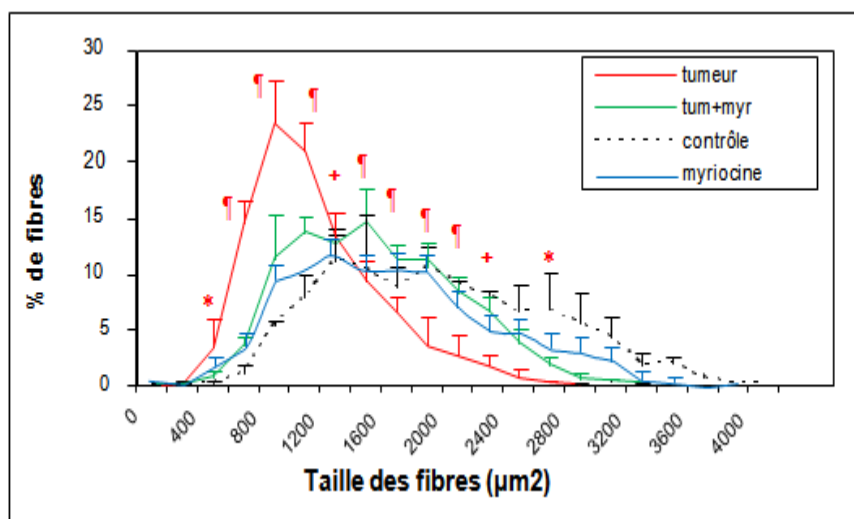


Figure 50 : Distribution de la section des fibres du Gastrocnemius dans les différents groupes de souris. Les % de fibres d'une section donnée sont représentés. $N=4$. ¶ : "tumeur" différent de "tumeur + myriocine" $p<0,002$; + : $p<0,01$; * : $p<0,05$.

Lorsqu'on observe la distribution des surfaces de sections des fibres du Gastrocnemius pour chacun des traitements, on distingue un profil atrophique caractéristique (*rouge*) avec un décalage vers les petites fibres (CSA inférieure à $2000 \mu\text{m}^2$) par rapport au profil des souris contrôles sans tumeur (*noir pointillé*): la population de grosses fibres a disparu. Le traitement par la myriocine permet de préserver cette population de grosses fibres et rétablit un profil proche de celui des souris sans tumeur (*vert*). Les souris traitées uniquement avec la myriocine ont un profil normal (*bleu*) (*figure 50*).

La myriocine a un effet *per se* qui se caractérise par une diminution faible de la surface moyenne des fibres, significative uniquement dans le Gastrocnemius (où la myriocine seule n'a par contre aucun effet sur le poids du muscle).

4.6.3 L'atrophie musculaire tumeur- induite est associée à une activation de la protéolyse

La présence de la tumeur augmente le catabolisme protéique, ce qui se traduit par une expression accrue des ARNm des E3 Ubiquitine-ligases MurF1 et Atrogine-1, qui est sous le contrôle des facteurs de transcription FoxO1 et FoxO3, dont l'expression est aussi augmentée par la tumeur (*figure 51*). L'implication des céramides dans la protéolyse tumeur-induite est démontrée par la diminution significative de l'expression de FoxO3 et d'Atrogine-1 sous l'effet de la myriocine.

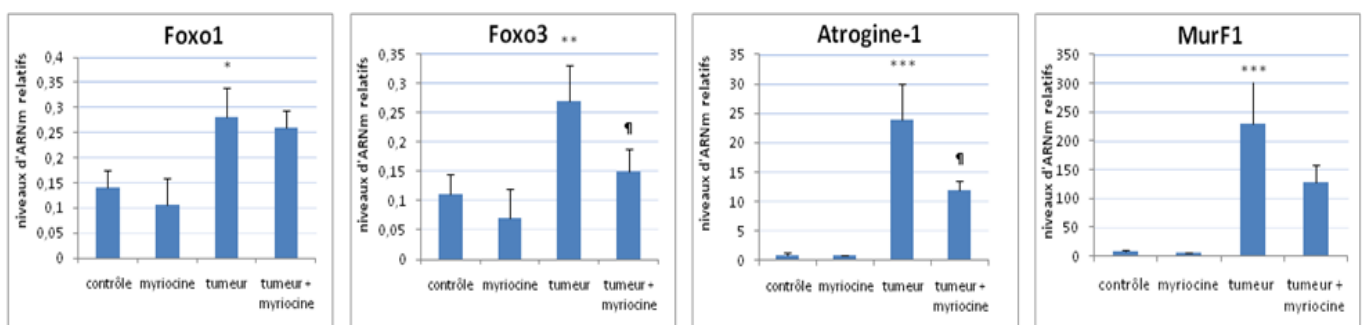


Figure 51 : Effet de la tumeur et de l'inhibition de la synthèse de céramide sur l'expression des atrogènes. L'expression des ARNm des atrogènes évaluée par RT-qPCR est normalisée par l'ARNm de la Cyclophiline A. Le graphe représente la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. *: différent du contrôle, $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. †: différent de tumeur, $p < 0.05$.

4.6.4 L'atrophie musculaire tumeur-induite est associée à une augmentation des taux de céramides intra-musculaires

Les sphingolipides ont été dosés par spectrométrie de masse en tandem, dans les muscles des souris étudiées ci-dessus. Notre étude montre, pour la première fois, que l'atrophie musculaire tumeur-induite s'accompagne d'une augmentation marquée des taux de céramide tissulaire (+53%). Ce résultat confirme la validité de notre hypothèse d'un rôle des céramides dans la perte musculaire. Le traitement par la myriocine a tendance à rétablir des taux de céramides basaux (*figure 52*).

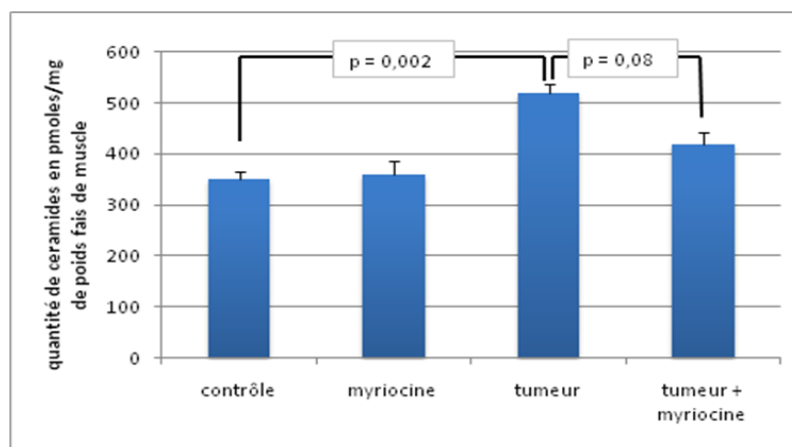
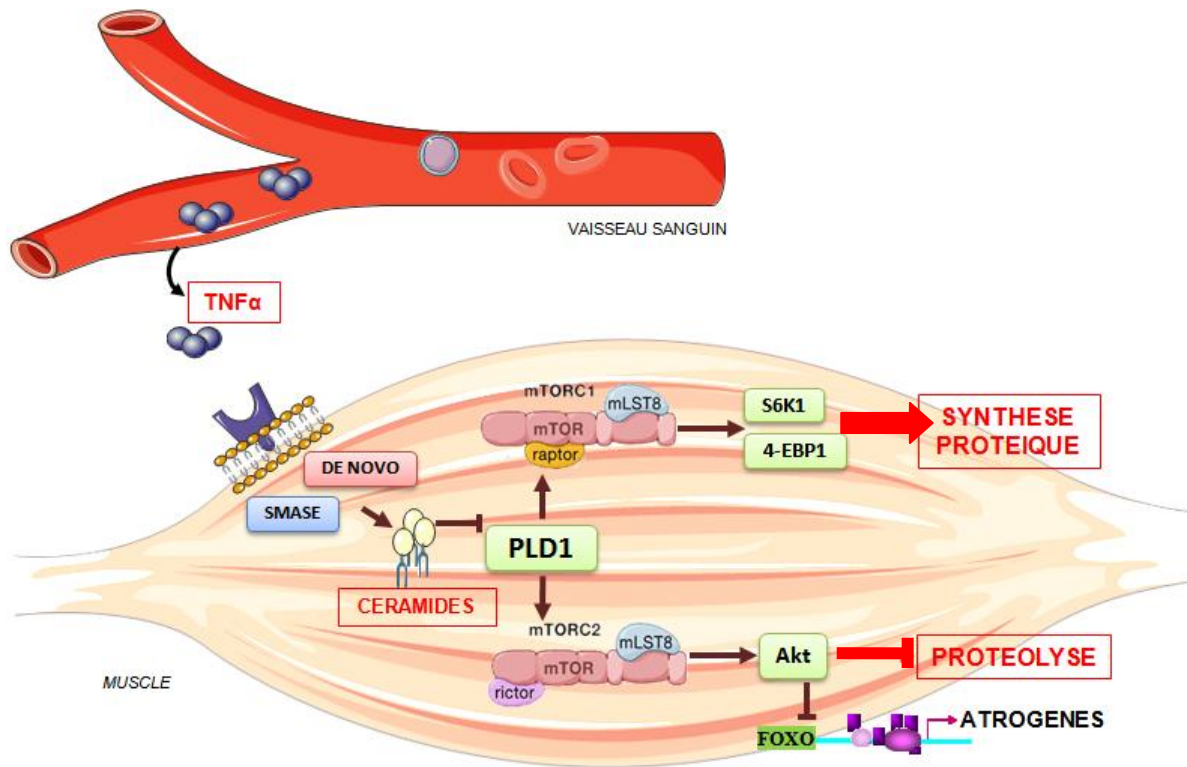


Figure 52 : Effets de la tumeur et de la myriocine sur les taux de céramides dans le Tibialis.

Chaque espèce moléculaire est mesurée selon le ratio de son signal à celui du standard interne C16 :0 D31 céramide. Les taux de céramides totaux (regroupant toutes les espèces moléculaires avec des chaînes acyles de 16 à 24 carbones, insaturées ou non, et non hydroxylées) ramenés au poids frais de tissu sont représentés ici ($n=4$ souris).

Ces études *in vivo* montrent donc que la présence d'une tumeur chez l'animal induit une atrophie musculaire et une accumulation tissulaire de céramides, ainsi qu'une induction des atrogènes. L'inhibition de la synthèse de céramides réduit l'atrophie musculaire et l'expression des atrogènes, montrant que les céramides participent au processus atrophique. Les inhibiteurs de la voie de novo, et potentiellement les inhibiteurs de sphingomyélinases, présentent donc des possibilités thérapeutiques intéressantes.

4.7 Schéma récapitulatif des résultats obtenus

**Figure 53 : Schéma bilan.**

L'augmentation des taux de cytokines circulantes induit une accumulation de céramides intra-musculaires, provoquant via leurs effets sur la voie PLD-mTOR, une chute de la synthèse protéique couplée à une augmentation de la protéolyse.

5 Discussion

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la lutte contre l'atrophie musculaire, qui n'est pas une pathologie en tant que telle, mais plutôt une conséquence dévastatrice de diverses pathologies et divers traitements. L'atrophie musculaire associée au cancer et à d'autres maladies chroniques contribue largement à l'inefficacité des traitements et à la mortalité. Il apparaît de plus en plus évident que préserver le capital musculaire des patients revient à allonger leur durée de survie (Zhou *et al.* 2010). L'atrophie musculaire touche aussi les personnes âgées atteintes de sarcopénie, entraînant une fragilité et une dépendance à l'origine de la détérioration de leur qualité de vie (Rolland *et al.* 2011).

Actuellement, les options thérapeutiques majeures sont les suppléments alimentaires, aux effets pour le moins aléatoires, et au niveau pharmacologique, l'administration de stéroïdes et d'agents progestationnels utilisés pour leurs effets anabolisants, qui ont uniquement des effets palliatifs (Elamin 2011). C'est pourquoi la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents de l'atrophie est devenue urgente.

Dans le mécanisme complexe de l'atrophie musculaire, seules certaines étapes sont connues. La première est l'augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF α est le représentant majeur (Reid et Li 2001). Cette cytokine primaire est impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation et son augmentation prolongée a de nombreux effets délétères sur l'ensemble des organes (fonte musculaire, anorexie, fonte du tissu adipeux, etc.). Le TNF α influence tout le métabolisme énergétique en favorisant le catabolisme pour fournir à la tumeur le « carburant » nécessaire à son développement au détriment de l'hôte. C'est aussi un marqueur prédictif corrélé à la sévérité de la pathologie (Bruunsgaard *et al.* 2003).

L'autre étape très étudiée est la mise en place d'un « programme hypercatabolique » au niveau du muscle, en réponse au TNF α (Lecker *et al.* 2004). Celui-ci modifie l'équilibre synthèse-protéolyse en stimulant la protéolyse via l'activation des atrogènes, tout en inhibant la synthèse, contrôlée par la voie mTOR (Wing *et al.* 2011). La méconnaissance des mécanismes moléculaires reliant ces deux étapes limite la mise en place de stratégies thérapeutiques efficaces. C'est pourquoi nous avons abordé cette question.

La première phase de notre travail était de mettre en place un modèle pratique pour l'étude de l'atrophie *in vitro*. Dans la littérature, les effets atrophiés *in vitro* du TNF α seul ne sont pas toujours mis en évidence. Selon sa concentration, le type cellulaire et la durée de traitement, on obtient des effets variables (Moldawer *et al.* 1987; Guttridge *et al.* 2000). Ainsi, le traitement de myotubes C2C12 avec du TNF α durant des temps courts ou à des concentrations élevées non physiologiques échoue à induire une atrophie (mesurée par la diminution du contenu protéique) et se limite à une action ciblée sur NF κ B et les atrogènes (Moldawer *et al.* 1987; Acharyya *et al.* 2004). Les auteurs ont parfois recours à des cocktails TNF α et interféron γ (Acharyya *et al.* 2004). Si l'interféron γ est augmenté dans certains cas de cancers (Ravasco *et al.* 2007) et peut induire une cachexie par lui-même (Matthys *et al.* 1991) en activant notamment la protéolyse protéasome dépendante (Argiles et Lopez-Soriano 1999), il est plutôt considéré comme une cytokine secondaire immunomodulatrice (Brandacher *et al.* 2006). Dans notre travail, le traitement de myotubes des lignées L6 et C2C12 durant trois jours successifs avec des concentrations de TNF α voisines de celles observées dans le sang de patients cachectiques (Michalaki *et al.* 2004), s'est avéré un modèle pertinent pour mimer les effets physiopathologiques à long terme du TNF α . Il est en effet capable d'induire une diminution de la surface des myotubes et de leur activité créatine kinase (de 20% en moyenne).

L'apoptose est observée dans l'atrophie musculaire induite *in vivo* par une tumeur, où elle suit la baisse du contenu protéique, puisque le rapport ADN/protéine reste constant (van Royen *et al.* 2000). Dans nos modèles *in vitro*, le traitement par le TNF α n'a pas d'effet significatif sur la viabilité des myotubes L6, ce qui implique que l'apoptose n'est pas un événement primaire dans l'atrophie induite par le TNF α .

Parmi les multiples voies moléculaires initiées par le TNF α , le rôle dans l'atrophie musculaire de la synthèse de céramides a jusqu'à présent été négligée, au contraire des voies NF κ B et MAPK. Pourtant la synthèse de céramides TNF α -induite est connue pour participer à l'apoptose via l'activation des caspases (Van Herreweghe *et al.* 2010). L'atrophie induite par le traitement de myotubes L6 ou C2C12 avec des céramides exogènes «cell-perméants» que nous observons n'avait pas été décrite auparavant. Cette observation nous a incités à envisager une implication des céramides dans les effets du TNF α . Nous avons pu le confirmer en montrant que les inhibiteurs des deux voies de synthèse s'opposent aux effets du TNF α .

Ainsi, les inhibiteurs de la synthèse *de novo* (myriocine) et des sphingomyélinases (GW4869 et OMS) protègent contre l'effet atrophique du TNF α en maintenant la taille, la fonction (activité créatine kinase), et le potentiel contractile (contenu en myosine) des myotubes L6. La formation de céramides, par l'une et l'autre voies, participe donc à l'atrophie provoquée par le TNF α , et les céramides peuvent être considérés comme des seconds messagers atrophiques formés en réponse à la fixation du TNF α sur son récepteur.

Comme attendu, la mesure des niveaux de céramides par spectrométrie de masse montre une nette augmentation du contenu en céramides des cellules (35%) sous l'effet du TNF α . Cette élévation s'explique partiellement par une diminution de la SM, son précurseur dans la voie des sphingomyélinases, de 30%. L'observation des variations des différentes espèces moléculaires nous fournit des détails importants. Ainsi, la synthèse de C18-céramide (6,2% du total des céramides basaux, 17,5% des céramides synthétisés) ne correspond pas à une hydrolyse parallèle de C18- SM, tandis que les augmentations des autres céramides (C16 et C24:1 surtout) sont accompagnées de baisses des SM correspondantes. Ceci suggère une synthèse de C18-céramide spécifiquement par la voie *de novo*, et constitue un premier indice que la stimulation par le TNF α induit, par les deux voies, la synthèse de pools de céramides distincts, avec potentiellement des propriétés propres. La chute importante de SM (30 pmoles/ μ g de protéines) peut paraître surprenante compte-tenu de son rôle primordial pour maintenir l'intégrité de la membrane plasmique, de son importance relative (10 fois plus en quantité que les céramides), et de l'observation faite dans les cellules MCF-7 d'un doublement des niveaux de céramides pour une chute de 15% de SM (Becker *et al.* 2005; Lafont *et al.* 2011). Dans ce dernier cas, la faible baisse de SM peut cependant s'expliquer en considérant que le niveau de SM est très régulé par la voie *de novo* (Perry 2000; Lee *et al.* 2011), et que la stimulation des sphingomyélinases avec des esters de phorbol a un effet limité et transitoire sur les niveaux de SM à cause d'un effet compensatoire de la synthèse *de novo* (Becker *et al.* 2005). De plus, il a été observé que la baisse de SM affecte peu la viabilité des cellules, même après 7 jours de traitement par la fumonisine (Merrill *et al.* 1993).

L'inhibiteur de la SPT myriocine, et les inhibiteurs de sphingomyélinases OMS et GW4869, affectent l'accumulation de céramides induite par le TNF α . En effet, l'ajout de GW4869 ou d'OMS diminue le taux de céramides d'environ 30% en présence de TNF α , et la myriocine divise par deux ce taux. Cela confirme que l'augmentation des céramides endogènes est bien due à l'activation des deux voies étudiées. Les inhibiteurs de

sphingomyélinase restaurent, comme attendu, les niveaux de SM abaissés par le TNF α . Par contre, la myriocine diminue le taux basal de SM, et a un effet encore plus marqué en présence de TNF α , où elle abaisse le taux de SM très en dessous du niveau du contrôle (-40%). Ceci peut expliquer son fort effet sur le taux de céramides. Par ailleurs, le fait que les effets des deux types d'inhibiteurs sur les paramètres d'atrophie ne soient pas additifs peut s'expliquer par la capacité de la myriocine à diminuer les taux de SM, et à ainsi bloquer, outre la synthèse *de novo*, indirectement l'activité des sphingomyélinases en limitant la disponibilité de leur substrat (Miyake *et al.* 1995; Hojjati *et al.* 2005). Ceci est en accord avec l'idée généralement admise que la synthèse de céramides par les sphingomyélinases est prépondérante dans la transduction du signal tandis que la synthèse *de novo* est décisive pour l'homéostasie globale en alimentant la cellule en lipides essentiels (Gorski *et al.* 2002).

Les effets des inhibiteurs sur les taux de sphingolipides restent modérés dans les L6, ce qui peut s'expliquer par la nécessité pour la cellule de maintenir des niveaux suffisants de certains sphingolipides vitaux, tels que les GSL qui sont impliqués dans la signalisation au niveau des microdomaines membranaire (Pontier et Schweisguth 2012), et dont on sait qu'ils sont affectés par ces inhibiteurs (Merrill *et al.* 1993), ou la S1P nécessaire pour la survie (Cuvillier *et al.* 1996). Dans le cas des C2C12, l'inhibition de la voie *de novo* par la myriocine a un effet négatif par elle-même sur la taille des myotubes, que l'on pourrait expliquer par des effets plus drastiques sur les taux globaux de sphingolipides, et notamment sur les taux de GSL ou de S1P. Une autre explication serait l'implication du facteur de transcription SREBP, qui contrôle la synthèse et le transport du cholestérol, des acides gras et des phospholipides, et dont la dépendance envers la synthèse des sphingolipides est connue, bien que le mécanisme impliqué en soit encore peu clair (Worgall 2011). Le blocage de la voie *de novo* dans les C2C12 entraînerait une absence d'activité de SREBP, et une perte de la capacité cellulaire à réguler son métabolisme lipidique.

Une question sous-jacente qui n'a pas été soulevée jusqu'ici est celle du rôle de chaque espèce de céramide, en fonction de sa provenance (Mullen *et al.* 2012). En effet, d'après la littérature, il existe une régulation spécifique de chaque espèce de céramide. Ainsi, dans les cellules MCF-7, les esters de phorbol qui stimulent les sphingomyélinases induisent une hausse spécifique des céramides en C16, C18 et C20, dont les taux sont multipliés par deux, tandis que les céramides à très longue chaîne (C24) restent constants (Becker *et al.* 2005). La myriocine spécifique de la voie *de novo*, et la fumonisine B1 qui bloque la

céramide synthase, ont des effets similaires sur les taux de céramides totaux, mais seule la deuxième bloque l'apoptose en réponse aux UV, ce qui montre que les espèces de céramides affectées dans les deux cas ne sont pas les mêmes (Mullen *et al.* 2011). Il existe d'ailleurs 6 céramides-synthases qui se caractérisent par leur spécificité : l'isoforme 1 produit du C18-céramide qui induit une apoptose, tandis que la surexpression des formes 2 et 4, produisant des espèces différentes, n'affecte pas la survie cellulaire (Henry *et al.* 2011; Mullen *et al.* 2012).

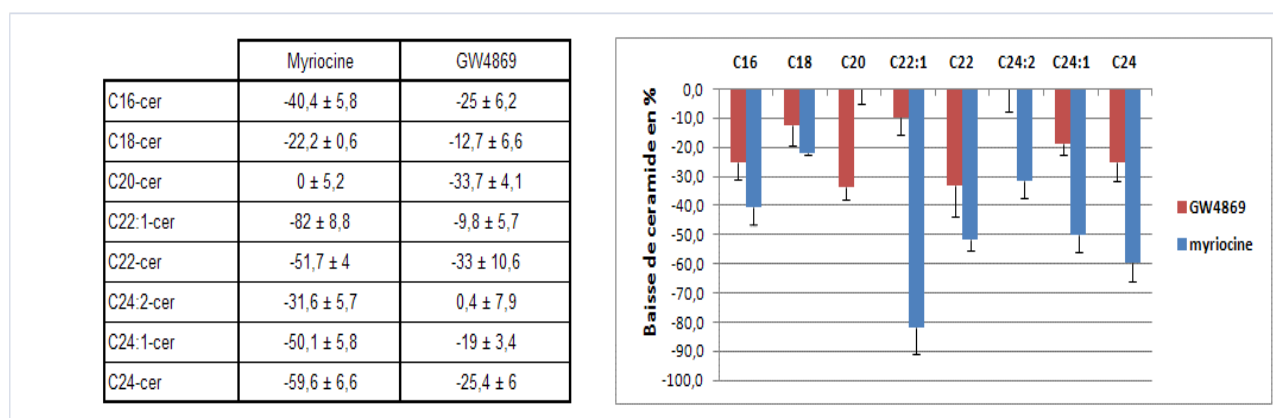


Figure 54 : Baisse de céramide induite par les inhibiteurs de synthèse, en % du taux de l'espèce considérée, mesurée en présence de TNF α .

Dans notre cas, la myriocine induit surtout une baisse des espèces à très longues chaînes (en C22 et C24), et n'a pas d'effet sur le C20-céramide. Au contraire, le GW4869 induit une baisse plus significative sur les céramides à chaîne moyennes (C20 et C22). Les effets différentiels des deux types d'inhibiteurs sur les paramètres d'atrophie, notamment dans les C2C12, pourraient provenir de cette différence.

L'étude dans notre modèle des enzymes-clés dans la détermination des taux de céramide, comme la SPT, les céramidases et les sphingomyélinases, apporterait beaucoup d'informations. On peut notamment supposer l'existence de sphingomyélinases spécifiques, vu le nombre d'enzymes clonées (Marchesini et Hannun 2004). Jung et al, font état d'au moins 6 formes de sphingomyélinases neutres, définies par leur profil chromatographique et leurs propriétés biochimiques dans des extraits de cerveau (Jung *et al.* 2000). Dans le muscle, deux isoformes ont été répertoriées aux niveaux des tubules transverses (Ghosh *et al.* 1998). Une étude par marquage au palmitate radioactif en "pulse-chase" pourrait aussi nous aider à

préciser l'importance relative des deux voies de synthèse et leurs cinétiques d'activation, en fonction des flux de lipides générés. Le marquage du pool de céramides pendant un temps court, et le traitement au TNF α simultané permettrait de caractériser l'activation rapide de la voie *de novo*. Par contre, le marquage long suivi d'un traitement au TNF α pendant la période de "chase" mettrait en évidence une hydrolyse des stocks de SM marqués. La mesure des niveaux de sphingolipides intermédiaires comme la dihydro-sphingosine représentative de la voie *de novo* et de la S1P, représentative de la voie de recyclage, seraient utiles pour établir un modèle plus précis de l'effet du TNF α dans les myotubes, et imaginer l'utilisation d'inhibiteurs plus efficaces.

Le céramide est rapidement métabolisé, dans la cellule, en sphingosine puis en S1P bioactives, par les actions successives de la céramidase et la sphingosine kinase. La S1P a généralement des propriétés contraires à celles des céramides, c'est pourquoi nous avons étudié ses éventuels effets trophiques. Dans notre système, la S1P exogène a un effet anti-atrophique puisqu'elle s'oppose aux effets négatifs du TNF α et des céramides sur la taille des myotubes. De plus, le blocage de la conversion de la sphingosine endogène en S1P par les inhibiteurs DHS et DMS a des effets drastiques (apoptose et atrophie), ce qui suggère que des niveaux de S1P suffisants sont requis pour maintenir l'intégrité des myotubes. L'effet anti-atrophique de la S1P sur le muscle a d'ailleurs été démontré *in vivo* puisqu'il s'oppose à l'atrophie par dénervation chez le rat (Zanin *et al.* 2008).

De plus, FTY720, un inhibiteur des récepteurs à S1P, mime les effets négatifs du TNF α , ce qui confirme l'action positive de la S1P, et suggère que dans nos conditions basales de la S1P endogène est présente dans le milieu, et qu'elle exerce une action positive. Comme les effets du TNF α et de FTY720 ne sont pas additifs, on peut penser que les taux de S1P sont déjà réduits de manière substantielle en présence de la cytokine, rendant l'inhibition de la voie S1P inefficace. Une partie des effets pro-atrophiques du TNF α pourrait donc provenir de sa capacité à abaisser les taux de S1P endogène. Il sera donc très important de doser les taux de S1P intra- et extra-cellulaire et d'étudier les effets du TNF α sur ces taux.

La sphingosine induit des effets proches de ceux du céramide (Woodcock 2006). Nous observons que ses variations sont parallèles à celle du céramide, son précurseur direct. Le TNF α a tendance à augmenter le contenu en sphingosine des myotubes, et l'apport des inhibiteurs des deux voies diminue son taux de manière significative. La sphingosine pourrait

donc participer aux effets atrophiques du TNF α . Cependant, elle est présente à très faible concentration par rapport aux céramides. De plus, nous avons observé que le traitement des myotubes par la fumonisine B1, qui inhibe la synthèse de céramides mais induit en plus une accumulation de sphingosine, les protège tout de même contre l'atrophie TNF α -induite (résultat non montré). Ces observations suggèrent donc que le céramide est le métabolite bioactif responsable de l'action atrophique du TNF α .

In vivo, l'atrophie est surtout causée par une augmentation de la protéolyse (Melstrom *et al.* 2007). Dans les myotubes L6 *in vitro*, les mesures de la dégradation protéique par marquage à la tyrosine tritiée montrent que l'atrophie induite par le TNF α s'accompagne d'une tendance à une protéolyse accrue. Cette augmentation correspond à une activation de la voie du protéasome mise en évidence par l'augmentation de l'expression de l'ubiquitine ligase Atrogine-1, responsable de l'ubiquitinylation spécifique de protéines musculaires (Lecker *et al.* 2004). On observe également une tendance à l'augmentation de l'autophagie mesurée par l'expression du marqueur des autophagosomes LC3b (Sandri 2010). Cependant, nous n'avons pas observé d'effets significatifs du TNF α sur l'expression d'autres marqueurs comme GabarapL, cathepsin L, bécline. L'implication de l'autophagie devra donc être confirmée au niveau post-traductionnel, par exemple par l'évaluation de la lipidation de LC3b, ou par le marquage cytofluorescent des autophagosomes. Le TNF α induit en parallèle une chute de la synthèse protéique, qui peut s'expliquer par ses effets négatifs sur la PLD, et en aval sur la voie mTOR. Elle peut aussi s'expliquer par l'effet négatif du TNF α sur la quantité de protéine eIF3f, qui est indispensable à la traduction et qui est dégradée par l'Atrogine-1 (Lagrand-Cantaloube *et al.* 2008).

Les effets du TNF α sur la protéolyse et sur l'expression des atrogènes sont réversés par les inhibiteurs de la synthèse de céramides, OMS, GW4869 et myriocine, ce qui confirme que les céramides en sont bien responsables. Les inhibiteurs de la synthèse de céramides, en particulier, diminuent l'expression d'Atrogine-1 qui était augmentée en présence de TNF α , et augmentent en conséquence la quantité du facteur d'initiation de la traduction eIF3f, montrant que les céramides activent le système du protéasome. Les inhibiteurs diminuent aussi l'expression du marqueur d'autophagie LC3b, suggérant que les céramides activent aussi l'autophagie. La capacité du céramide à activer la protéolyse autophagique est également connue dans d'autres modèles (Scarlati *et al.* 2004).

Le métabolisme protéique est pour une large part sous le contrôle de la voie Akt-mTOR, qui contrôle la croissance cellulaire. Cette voie complexe qui intègre de nombreux signaux en amont (disponibilité en énergie, en nutriments, facteurs de croissances et signaux mitogènes) répond en stimulant la synthèse protéique et en inhibant la protéolyse. Le complexe mTORC1 est activé par Akt, et à son tour active la traduction de pools d'ARNm via la phosphorylation de deux effecteurs principaux, S6K1 et 4E-BP1 (Laplante et Sabatini 2009). Le traitement de myotubes L6 par le TNF α a tendance à légèrement augmenter (de manière non significative) la phosphorylation (donc l'activité) d'Akt, et des deux substrats de mTORC1, ce qui suggère que par l'une des diverses voies de signalisation qu'il déclenche, le TNF α stimule faiblement Akt et mTORC1. En présence de TNF α , la myriocine qui abaisse le taux de céramides augmente fortement la phosphorylation d'Akt, 4E-BP1 et S6K1, ce qui montre que les céramides inhibent la voie Akt/mTORC1. Akt étant non-seulement activateur de la protéosynthèse via mTORC1, mais aussi inhibiteur de la protéolyse via son effet inhibiteur sur les facteurs de transcription FoxO, on peut en déduire que les céramides activent la protéolyse via cette inhibition d'Akt. Les effets anti-atrophiques des inhibiteurs de synthèse de céramides reposent donc vraisemblablement sur leurs effets de stimulation de la synthèse protéique et d'inhibition de la protéolyse, médiés par l'activation d'Akt, S6K1 et 4E-BP1.

Les céramides sont connus comme inhibiteurs de la PLD, agissant directement sur son site catalytique, sur le recrutement de protéines activatrices, et au niveau transcriptionnel (Venable et Obeid 1999). Ils diminuent spécifiquement l'expression de l'isoforme PLD1 dans le modèle L6, comme l'a déjà montré notre équipe (Mebarek *et al.* 2007). La PLD est un activateur de mTOR reconnu (Sun et Chen 2008). L'influence négative des céramides produits par le traitement des myotubes par le TNF α sur tous les effecteurs de la voie mTOR pourrait donc passer par une inhibition de la PLD. Pour évaluer le rôle de la PLD dans notre modèle, nous avons recherché les effets de sa modulation sur l'intégrité des myotubes. La surexpression de l'isoforme 1 (au contraire de l'isoforme 2) montre un effet hypertrophique, tandis que sa «down-régulation» par interférence de l'ARN produit une atrophie. De plus, le FIPI, un inhibiteur des deux isoformes de PLD, induit une augmentation de l'expression des atrogènes (FoxO3, Atrogine-1 et MurF1) dans des myotubes L6, proche de celle observée en présence de TNF α . Au contraire, l'apport d'acide phosphatidique exogène, qui mime une activation de PLD, supprime l'effet atrophique du TNF α . Nous avons donc confirmé que la

PLD a un effet positif sur les myotubes, que son inhibition a un effet atrophique, et que les effets des céramides peuvent donc s'expliquer par une modulation de PLD.

Le TNF α a un effet spectaculaire sur l'expression de PLD1, qui est fortement réprimée. Une contradiction entre les effets du TNF α sur la PLD et sur Akt/mTOR apparaît donc à ce niveau, ce qui suggère que l'inhibition attendue de la voie mTOR par le blocage de la PLD est compensée par une autre voie activée par le TNF α , qui masquerait ses effets négatifs. L'ajout des inhibiteurs de la synthèse de céramides rétablit l'expression de PLD1, et l'augmente même fortement dans le cas d'une inhibition simultanée des deux voies, ce qui explique probablement les effets positifs des inhibiteurs sur S6K1, 4E-BP1 et Akt en présence de TNF α .

Les effets positifs modérés du TNF α sur S6K1, 4E-BP1 et Akt suggèrent l'activation de voies parallèles contrebalançant l'influence de la PLD réprimée. Un candidat possible est la voie NF κ B qui est activée de manière précoce et transitoire par le TNF α dans les myotubes L6. Cette voie n'est pas modulée par la myriocine dans des temps courts, ce qui suggère qu'elle n'implique pas les céramides. Le TNF α induit cependant aussi une activation à long terme de la voie NF κ B (Ladner *et al.* 2003). Il n'est donc pas exclu que les céramides interviennent lors de cette seconde phase. Il faudra, pour s'en assurer, considérer d'autres étapes de la voie NF κ B que la phosphorylation de IKK que nous avons étudiée.

En résumé, l'inhibition de la synthèse de céramides induite par le TNF α a donc des effets trophiques bénéfiques qui pourraient passer par une activation de la PLD, ayant pour conséquence la stimulation de S6K1, 4E-BP1 et Akt, et finalement une hausse de la synthèse protéique et une baisse de la protéolyse.

In vivo, l'implantation d'un carcinome C26 chez la souris induit une forte cachexie (Aulino *et al.* 2010), qui se traduit par une stagnation de la courbe de poids des animaux pendant quelques jours, suivie d'une chute brutale (perte de plus d'un gramme par jour), aboutissant à la mort rapide de l'animal. Dans ce modèle, nous avons mis en évidence la perte musculaire par une diminution du poids du tibialis et du gastrocnemius, et de la taille des fibres de ces deux muscles. En parallèle, nous avons observé une forte augmentation de l'expression des atrogènes dans le tissu musculaire : les facteurs de transcription FoxO 1 et 3, et leurs cibles directes les ubiquitines ligases MurF1 et Atrogine-1 (Lecker *et al.* 2004). Nous

avons de plus observé que, outre ces caractéristiques classiques, le développement de la tumeur induit une augmentation de plus de 50% du contenu du tissu musculaire en céramides, confirmant les résultats obtenus *in vitro*, et établissant pour la première fois un lien entre la cachexie et un remaniement du métabolisme sphingolipidique dans le muscle.

La myriocine avait fait l'objet d'autres études *in vivo* chez l'animal, destinées à évaluer son effet sur l'athérosclérose ou sur la résistance à l'insuline. Ces études avaient montré une absence de toxicité en injection i.p. à long terme (Hojjati *et al.* 2005), jusqu'à une dose de 1 mg/kg à laquelle la myriocine montre des propriétés immunosuppressives en induisant une diminution de la population de lymphocytes T (Johnson *et al.* 2004), absente pour la dose modérée que nous utilisons. Par contre, son administration orale a montré une légère toxicité gastro-intestinale (Fujita *et al.* 1995).

Dans notre étude, des injections quotidiennes i.p. de myriocine à 0,1mg/kg limitent la perte musculaire en présence de tumeur, en maintenant la taille des fibres. De plus, elles diminuent l'expression des atrogènes FoxO1 et Atrogène-1, ce qui objective leur effet anti-atrophique. L'inhibition de la synthèse des céramides a donc un effet anti-atrophique significatif. Nous observons toutefois un léger effet négatif *per se* de la myriocine sur la taille des fibres, chez les animaux sans tumeur. Cet effet est sans doute imputable à une déplétion de sphingolipides vitaux, comme par exemple la S1P. Les niveaux plasmatiques de S1P sont en effet très affectés par un traitement prolongé par la myriocine (Hojjati *et al.* 2005).

La myriocine a seulement tendance à baisser le taux de céramides musculaires chez les souris porteuses de tumeurs ($p=0.08$). La baisse modérée est cependant suffisante pour avoir un effet positif sur les atrogènes. L'incapacité du traitement à reverser totalement les niveaux de céramides et la perte musculaire, ainsi qu'à prolonger la survie des animaux peut s'expliquer par le caractère particulièrement agressif de la tumeur C26, rapidement mortelle. Il pourrait être intéressant d'utiliser un autre modèle de cachexie impliquant un type de tumeur moins agressif comme le Lewis Lung Carcinoma, ou des souris transgéniques exprimant des taux importants de TNF α , qui subissent une atrophie moins brutale (van Royen *et al.* 2000). On pourrait éventuellement observer avec ces modèles un effet de la myriocine sur la survie et sur la préservation des paramètres fonctionnels musculaires.

Une étude est en prévision pour tester l'effet anti-atrophique des inhibiteurs de sphingomyélinases, et d'un cocktail myriocine-OMS. Une étude préliminaire nous a permis d'établir leur absence de toxicité chez la souris, après injection quotidienne pendant 15 jours de doses allant jusqu'à 2mg/kg. Il serait aussi intéressant de vérifier la résistance à l'atrophie musculaire de souris transgéniques invalidées pour la SPT ou pour les sphingomyélinases, qui, selon notre hypothèse, devraient être protégées contre la cachexie.

6 Conclusion

Ce travail établit les effets bénéfiques de l'inhibition de la synthèse de céramides pour lutter contre l'atrophie en conditions cachectiques. Nous avons démontré que les céramides sont impliqués dans la réponse aux cytokines, et dans l'activation du programme hypercatabolique, *in vivo* dans le muscle, et *in vitro* dans les myotubes en culture. Le TNF α est surtout connu pour exercer ses effets délétères sur le muscle via la voie NF κ B, et en interférant avec la voie protectrice de l'IGF. On peut dorénavant considérer l'implication d'une synthèse accrue de céramides, aux effets pro-apoptotiques déjà connus, mais qui apparaissent aussi pro-atrophiques et capables d'influer sur l'équilibre entre synthèse et dégradation protéiques. La voie de signalisation des sphingolipides apparaît donc comme une cible thérapeutique prometteuse pour contrer l'atrophie musculaire liée à diverses pathologies, et en particulier à la cachexie tumorale. L'exploration des potentialités des inhibiteurs de la synthèse de céramides entrevues lors de ce travail nécessitera des travaux complémentaires, en particulier *in vivo*. De plus, une approche nutritionnelle de la question semble possible: en effet, la synthèse de céramide dépend de l'apport nutritionnel en acides gras saturés, notamment en palmitate. Il apparaît donc envisageable d'influer sur la réponse atrophique musculaire en modifiant l'apport alimentaire en acides gras, et notamment en augmentant la proportion des acides gras insaturés (Deevska et Nikolova-Karakashian 2010). Cette voie de recherche reste à explorer.

7 Bibliographie

- 1 **Abe, A., D. Wu, J. A. Shayman et N. S. Radin (1992).** Metabolic effects of short-chain ceramide and glucosylceramide on sphingolipids and protein kinase C. *Eur J Biochem* **210** (3): 765-73.
- 2 **Abousalham, A., C. Liossis, L. O'Brien et D. N. Brindley (1997).** Cell-permeable ceramides prevent the activation of phospholipase D by ADP-ribosylation factor and RhoA. *J Biol Chem* **272** (2): 1069-75.
- 3 **Acharyya, S., K. J. Ladner, L. L. Nelsen, J. Damrauer, P. J. Reiser, S. Swoap et D. C. Guttridge (2004).** Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Invest* **114** (3): 370-8.
- 4 **Adams, G. R. (2006).** Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *Appl Physiol Nutr Metab* **31** (6): 782-90.
- 5 **Adams, G. R., V. J. Caiozzo et K. M. Baldwin (2003).** Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* **95** (6): 2185-201.
- 6 **Adams, G. R. et S. A. McCue (1998).** Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* **84** (5): 1716-22.
- 7 **Aggarwal, B. B. et K. Natarajan (1996).** Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* **7** (2): 93-124.
- 8 **Alarcon, C. M., J. Heitman et M. E. Cardenas (1999).** Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Mol Biol Cell* **10** (8): 2531-46.
- 9 **Ali, N. A., J. M. O'Brien, Jr., S. P. Hoffmann, G. Phillips, A. Garland, J. C. Finley, K. Almoosa, R. Hejal, K. M. Wolf, S. Lemeshow, A. F. Connors, Jr. et C. B. Marsh (2008).** Acquired weakness, handgrip strength, and mortality in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* **178** (3): 261-8.
- 10 **Alvarez-Breckenridge, C. A., K. A. Waite et C. Eng (2007).** PTEN regulates phospholipase D and phospholipase C. *Hum Mol Genet* **16** (10): 1157-63.
- 11 **Amirouche, A., A. C. Durieux, S. Banzet, N. Koulmann, R. Bonnefoy, C. Mouret, X. Bigard, A. Peinnequin et D. Freyssenet (2009).** Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology* **150** (1): 286-94.
- 12 **Arana, L., P. Gangoiti, A. Ouro, M. Trueba et A. Gomez-Munoz (2010).** Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease. *Lipids Health Dis* **9**: 15.
- 13 **Argiles, J. M., B. Alvarez, N. Carbo, S. Busquets, M. Van Royen et F. J. Lopez-Soriano (2000).** The divergent effects of tumour necrosis factor-alpha on skeletal muscle: implications in wasting. *Eur Cytokine Netw* **11** (4): 552-9.
- 14 **Argiles, J. M. et F. J. Lopez-Soriano (1999).** The role of cytokines in cancer cachexia. *Med Res Rev* **19** (3): 223-48.
- 15 **Arnold, H. H. et T. Braun (1996).** Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. *Int J Dev Biol* **40** (1): 345-53.
- 16 **Atherton, P. J., J. Babraj, K. Smith, J. Singh, M. J. Rennie et H. Wackerhage (2005).** Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *Faseb J* **19** (7): 786-8.
- 17 **Aulino, P., E. Berardi, V. M. Cardillo, E. Rizzuto, B. Perniconi, C. Ramina, F. Padula, E. P. Spugnini, A. Baldi, F. Faiola, S. Adamo et D. Coletti (2010).**

- Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse. *BMC Cancer* **10**: 363.
- 18 **Baar, K. et K. Esser (1999)**. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol* **276** (1 Pt 1): C120-7.
- 19 **Baehr, L. M., J. D. Furlow et S. C. Bodine (2011)**. Muscle Spraying in Muscle RING Finger 1 Null Mice: Response to Synthetic Glucocorticoids. *J Physiol*.
- 20 **Basaria, S., J. T. Wahlstrom et A. S. Dobs (2001)**. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* **86** (11): 5108-17.
- 21 **Battelino, T., M. Goto, C. Krzysnik et W. P. Zeller (1999)**. Tumor necrosis factor-alpha alters glucose metabolism in suckling rats. *J Lab Clin Med* **133** (6): 583-9.
- 22 **Becker, K. P. et Y. A. Hannun (2004)**. Isoenzyme-specific translocation of protein kinase C (PKC)betaII and not PKCbetaI to a juxtannuclear subset of recycling endosomes: involvement of phospholipase D. *J Biol Chem* **279** (27): 28251-6.
- 23 **Becker, K. P. et Y. A. Hannun (2005)**. Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell Mol Life Sci* **62** (13): 1448-61.
- 24 **Becker, K. P., K. Kitatani, J. Idkowiak-Baldys, J. Bielawski et Y. A. Hannun (2005)**. Selective inhibition of juxtannuclear translocation of protein kinase C betaII by a negative feedback mechanism involving ceramide formed from the salvage pathway. *J Biol Chem* **280** (4): 2606-12.
- 25 **Begum, N. et L. Ragolia (1996)**. Effect of tumor necrosis factor-alpha on insulin action in cultured rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* **137** (6): 2441-6.
- 26 **Benito, M. (2011)**. Tissue specificity on insulin action and resistance: past to recent mechanisms. *Acta Physiol (Oxf)* **201** (3): 297-312.
- 27 **Benny Klimek, M. E., T. Aydogdu, M. J. Link, M. Pons, L. G. Koniaris et T. A. Zimmers (2010)**. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun* **391** (3): 1548-54.
- 28 **Bentzinger, C. F., K. Romanino, D. Cloetta, S. Lin, J. B. Mascarenhas, F. Oliveri, J. Xia, E. Casanova, C. F. Costa, M. Brink, F. Zorzato, M. N. Hall et M. A. Ruegg (2008)**. Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab* **8** (5): 411-24.
- 29 **Berridge, M. V., P. M. Herst et A. S. Tan (2005)**. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* **11**: 127-52.
- 30 **Beutler, B., D. Greenwald, J. D. Hulmes, M. Chang, Y. C. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch et A. Cerami (1985)**. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316** (6028): 552-4.
- 31 **Bionda, C., J. Portoukalian, D. Schmitt, C. Rodriguez-Lafrasse et D. Ardail (2004)**. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J* **382** (Pt 2): 527-33.
- 32 **Bligh, E. G. et W. J. Dyer (1959)**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37** (8): 911-7.
- 33 **Block, B. A. (1994)**. Thermogenesis in muscle. *Annu Rev Physiol* **56**: 535-77.
- 34 **Bocckino, S. B., P. F. Blackmore, P. B. Wilson et J. H. Exton (1987)**. Phosphatidate accumulation in hormone-treated hepatocytes via a phospholipase D mechanism. *J Biol Chem* **262** (31): 15309-15.

- 35 **Bodine, S. C. (2006).** mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* **38** (11): 1950-7.
- 36 **Bodine, S. C., E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos et D. J. Glass (2001).** Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294** (5547): 1704-8.
- 37 **Bodine, S. C., T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass et G. D. Yancopoulos (2001).** Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* **3** (11): 1014-9.
- 38 **Bogdanovich, S., T. O. Krag, E. R. Barton, L. D. Morris, L. A. Whittmore, R. S. Ahima et T. S. Khurana (2002).** Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* **420** (6914): 418-21.
- 39 **Bolster, D. R., S. J. Crozier, S. R. Kimball et L. S. Jefferson (2002).** AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* **277** (27): 23977-80.
- 40 **Borst, P., N. Zelcer et A. van Helvoort (2000).** ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* **1486** (1): 128-44.
- 41 **Bose, R., M. Verheij, A. Haimovitz-Friedman, K. Scotto, Z. Fuks et R. Kolesnick (1995).** Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* **82** (3): 405-14.
- 42 **Bowman, E. P., D. J. Uhlinger et J. D. Lambeth (1993).** Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated Rho family small molecular weight GTP-binding protein. *J Biol Chem* **268** (29): 21509-12.
- 43 **Branch, D. R., A. Shah et L. J. Guilbert (1991).** A specific and reliable bioassay for the detection of femtomolar levels of human and murine tumor necrosis factors. *J Immunol Methods* **143** (2): 251-61.
- 44 **Brandacher, G., C. Winkler, K. Schroecksnadel, R. Margreiter et D. Fuchs (2006).** Antitumoral activity of interferon-gamma involved in impaired immune function in cancer patients. *Curr Drug Metab* **7** (6): 599-612.
- 45 **Brindley, D. N., A. Abousalham, Y. Kikuchi, C. N. Wang et D. W. Waggoner (1996).** "Cross talk" between the bioactive glycerolipids and sphingolipids in signal transduction. *Biochem Cell Biol* **74** (4): 469-76.
- 46 **Brown, E. J., M. W. Albers, T. B. Shin, K. Ichikawa, C. T. Keith, W. S. Lane et S. L. Schreiber (1994).** A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369** (6483): 756-8.
- 47 **Brown, F. D., N. Thompson, K. M. Saqib, J. M. Clark, D. Powner, N. T. Thompson, R. Solari et M. J. Wakelam (1998).** Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. *Curr Biol* **8** (14): 835-8.
- 48 **Brown, H. A., S. Gutowski, C. R. Moomaw, C. Slaughter et P. C. Sternweis (1993).** ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75** (6): 1137-44.
- 49 **Bruera, E. (1997).** ABC of palliative care. Anorexia, cachexia, and nutrition. *Bmj* **315** (7117): 1219-22.
- 50 **Brunsgaard, H., S. Ladelund, A. N. Pedersen, M. Schroll, T. Jorgensen et B. K. Pedersen (2003).** Predicting death from tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in 80-year-old people. *Clin Exp Immunol* **132** (1): 24-31.

- 51 **Buonanno, A., L. Apone, M. I. Morasso, R. Beers, H. R. Brenner et R. Eftimie (1992).** The MyoD family of myogenic factors is regulated by electrical activity: isolation and characterization of a mouse Myf-5 cDNA. *Nucleic Acids Res* **20** (3): 539-44.
- 52 **Byfield, M. P., J. T. Murray et J. M. Backer (2005).** hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem* **280** (38): 33076-82.
- 53 **Cai, D., J. D. Frantz, N. E. Tawa, Jr., P. A. Melendez, B. C. Oh, H. G. Lidov, P. O. Hasselgren, W. R. Frontera, J. Lee, D. J. Glass et S. E. Shoelson (2004).** IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* **119** (2): 285-98.
- 54 **Cannavo, A., P. Ceci, D. Coletti, M. Cortesi, F. Papa, E. Vivarelli, F. Tomei, S. Adamo et F. Naro (2003).** Toxic effects of Polychlorinated Biphenyls in myogenic cells. *journal of health science* **50**: 33-41.
- 55 **Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore et B. Williamson (1975).** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72** (9): 3666-70.
- 56 **Cawthorn, W. P. et J. K. Sethi (2008).** TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett* **582** (1): 117-31.
- 57 **Chalfant, C. E., K. Kishikawa, M. C. Mumby, C. Kamibayashi, A. Bielawska et Y. A. Hannun (1999).** Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* **274** (29): 20313-7.
- 58 **Chang, L. C., T. H. Huang, C. S. Chang, Y. R. Tsai, R. H. Lin, P. W. Lee, M. F. Hsu, L. J. Huang et J. P. Wang (2011).** Signaling mechanisms of inhibition of phospholipase D activation by CHS-111 in formyl peptide-stimulated neutrophils. *Biochem Pharmacol* **81** (2): 269-78.
- 59 **Charles, R., L. Sandirasegarane, J. Yun, N. Bourbon, R. Wilson, R. P. Rothstein, S. W. Levison et M. Kester (2000).** Ceramide-coated balloon catheters limit neointimal hyperplasia after stretch injury in carotid arteries. *Circ Res* **87** (4): 282-8.
- 60 **Cheema, I. R., C. Hermann, S. Postell et P. Barnes (2000).** Effect of chronic excess of tumour necrosis factor-alpha on contractile proteins in rat skeletal muscle. *Cytobios* **103** (404): 169-76.
- 61 **Chen, J. S. et J. H. Exton (2004).** Regulation of phospholipase D2 activity by protein kinase C alpha. *J Biol Chem* **279** (21): 22076-83.
- 62 **Chen, Y., V. Rodrik et D. A. Foster (2005).** Alternative phospholipase D/mTOR survival signal in human breast cancer cells. *Oncogene* **24** (4): 672-9.
- 63 **Chen, Y., Y. Zheng et D. A. Foster (2003).** Phospholipase D confers rapamycin resistance in human breast cancer cells. *Oncogene* **22** (25): 3937-42.
- 64 **Cheng, S. W., L. G. Fryer, D. Carling et P. R. Shepherd (2004).** Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem* **279** (16): 15719-22.
- 65 **Chibalin, A. V., M. Yu, J. W. Ryder, X. M. Song, D. Galuska, A. Krook, H. Wallberg-Henriksson et J. R. Zierath (2000).** Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (1): 38-43.

- 66 **Choi, J., J. Chen, S. L. Schreiber et J. Clardy (1996).** Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* **273** (5272): 239-42.
- 67 **Ciaraldi, T. P., L. Carter, S. Mudaliar, P. A. Kern et R. R. Henry (1998).** Effects of tumor necrosis factor-alpha on glucose metabolism in cultured human muscle cells from nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Endocrinology* **139** (12): 4793-800.
- 68 **Clark, I. A. (2007).** How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **18** (3-4): 335-43.
- 69 **Clark, K. A., A. S. McElhinny, M. C. Beckerle et C. C. Gregorio (2002).** Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 637-706.
- 70 **Clarke, B. A., D. Drujan, M. S. Willis, L. O. Murphy, R. A. Corpina, E. Burova, S. V. Rakhilin, T. N. Stitt, C. Patterson, E. Latres et D. J. Glass (2007).** The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* **6** (5): 376-85.
- 71 **Cockcroft, S. (2009).** Phosphatidic acid regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases. *Biochim Biophys Acta* **1791** (9): 905-12.
- 72 **Codogno, P. et A. J. Meijer (2005).** Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1509-18.
- 73 **Coley, F. C. (1893).** The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Am J Med Sci* **105**: 487-510.
- 74 **Collins, R. A. et M. D. Grounds (2001).** The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF-alpha(-/-) and TNF-alpha(-/-)/LT-alpha(-/-) mice. *J Histochem Cytochem* **49** (8): 989-1001.
- 75 **Cosper, P. F. et L. A. Leinwand (2011).** Myosin heavy chain is not selectively decreased in murine cancer cachexia. *Int J Cancer*.
- 76 **Costelli, P., M. Muscaritoli, A. Bonetto, F. Penna, P. Reffo, M. Bossola, G. Bonelli, G. B. Doglietto, F. M. Baccino et F. Rossi Fanelli (2008).** Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest* **38** (7): 531-8.
- 77 **Cunningham, J. T., J. T. Rodgers, D. H. Arlow, F. Vazquez, V. K. Mootha et P. Puigserver (2007).** mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* **450** (7170): 736-40.
- 78 **Cutler, R. G., J. Kelly, K. Storie, W. A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J. C. Troncoso et M. P. Mattson (2004).** Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (7): 2070-5.
- 79 **Cuvillier, O. (2002).** Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim Biophys Acta* **1585** (2-3): 153-62.
- 80 **Cuvillier, O., G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, S. Gutkind et S. Spiegel (1996).** Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381** (6585): 800-3.
- 81 **Czarny, M., Y. Lavie, G. Fiucci et M. Liscovitch (1999).** Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-182-101. *J Biol Chem* **274** (5): 2717-24.
- 82 **Dan, H. C., M. Adli et A. S. Baldwin (2007).** Regulation of mammalian target of rapamycin activity in PTEN-inactive prostate cancer cells by I kappa B kinase alpha. *Cancer Res* **67** (13): 6263-9.

- 83 **Dbaiibo, G. S., M. Y. Pushkareva, S. Jayadev, J. K. Schwarz, J. M. Horowitz, L. M. Obeid et Y. A. Hannun (1995).** Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (5): 1347-51.
- 84 **Deevska, G. M. et M. N. Nikolova-Karakashian (2010).** The twists and turns of sphingolipid pathway in glucose regulation. *Biochimie* **93** (1): 32-8.
- 85 **Demling, R. (2007).** The use of anabolic agents in catabolic states. *J Burns Wounds* **6**: e2.
- 86 **Deval, C., S. Mordier, C. Obled, D. Bechet, L. Combaret, D. Attaix et M. Ferrara (2001).** Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. *Biochem J* **360** (Pt 1): 143-50.
- 87 **DeVol, D. L., P. Rotwein, J. L. Sadow, J. Novakofski et P. J. Bechtel (1990).** Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am J Physiol* **259** (1 Pt 1): E89-95.
- 88 **DeYoung, M. P., P. Horak, A. Sofer, D. Sgroi et L. W. Ellisen (2008).** Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* **22** (2): 239-51.
- 89 **Dhalla, N. S., Y. J. Xu, S. S. Sheu, P. S. Tappia et V. Panagia (1997).** Phosphatidic acid: a potential signal transducer for cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **29** (11): 2865-71.
- 90 **Dobrzyn, A. et J. Gorski (2002).** Ceramides and sphingomyelins in skeletal muscles of the rat: content and composition. Effect of prolonged exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282** (2): E277-85.
- 91 **Dodson, S., V. E. Baracos, A. Jatoi, W. J. Evans, D. Cella, J. T. Dalton et M. S. Steiner (2011).** Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. *Annu Rev Med* **62**: 265-79.
- 92 **Doherty, T. J. (2003).** Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* **95** (4): 1717-27.
- 93 **Dorrello, N. V., A. Peschiaroli, D. Guardavaccaro, N. H. Colburn, N. E. Sherman et M. Pagano (2006).** S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* **314** (5798): 467-71.
- 94 **Du, G., Y. M. Altshuller, N. Vitale, P. Huang, S. Chasserot-Golaz, A. J. Morris, M. F. Bader et M. A. Frohman (2003).** Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol* **162** (2): 305-15.
- 95 **Edstrom, E., M. Altun, M. Hagglund et B. Ulfhake (2006).** Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61** (7): 663-74.
- 96 **Elamin, E. (2011).** Dietary and pharmacological management of severe catabolic conditions. *Am J Med Sci* **342** (6): 513-8.
- 97 **Evans, R. D., J. M. Argiles et D. H. Williamson (1989).** Metabolic effects of tumour necrosis factor-alpha (cachectin) and interleukin-1. *Clin Sci (Lond)* **77** (4): 357-64.
- 98 **Evans, W. J., J. E. Morley, J. Argiles, C. Bales, V. Baracos, D. Guttridge, A. Jatoi, K. Kalantar-Zadeh, H. Lochs, G. Mantovani, D. Marks, W. E. Mitch, M. Muscaritoli, A. Najand, P. Ponikowski, F. Rossi Fanelli, M. Schambelan, A. Schols, M. Schuster, D. Thomas, R. Wolfe et S. D. Anker (2008).** Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* **27** (6): 793-9.
- 99 **Exton, J. H. (1997).** New developments in phospholipase D. *J Biol Chem* **272** (25): 15579-82.

- 100 **Fajardo, L. F., H. H. Kwan, J. Kowalski, S. D. Prionas et A. C. Allison (1992).** Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol* **140** (3): 539-44.
- 101 **Fang, Y., M. Vilella-Bach, R. Bachmann, A. Flanigan et J. Chen (2001).** Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* **294** (5548): 1942-5.
- 102 **Faulkner, J. A., L. M. Larkin, D. R. Claflin et S. V. Brooks (2007).** Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34** (11): 1091-6.
- 103 **Fitts, R. H., J. G. Romatowski, J. R. Peters, D. Paddon-Jones, R. R. Wolfe et A. A. Ferrando (2007).** The deleterious effects of bed rest on human skeletal muscle fibers are exacerbated by hypercortisolemia and ameliorated by dietary supplementation. *Am J Physiol Cell Physiol* **293** (1): C313-20.
- 104 **Fluck, M. et H. Hoppeler (2003).** Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **146**: 159-216.
- 105 **Foster, D. A. (2009).** Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1791** (9): 949-55.
- 106 **Foster, D. A. et L. Xu (2003).** Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol Cancer Res* **1** (11): 789-800.
- 107 **Friant, S., R. Lombardi, T. Schmelzle, M. N. Hall et H. Riezman (2001).** Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *Embo J* **20** (23): 6783-92.
- 108 **Frias, M. A., C. C. Thoreen, J. D. Jaffe, W. Schroder, T. Sculley, S. A. Carr et D. M. Sabatini (2006).** mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* **16** (18): 1865-70.
- 109 **Frost, R. A. et C. H. Lang (2011).** mTor signaling in skeletal muscle during sepsis and inflammation: where does it all go wrong? *Physiology (Bethesda)* **26** (2): 83-96.
- 110 **Fujita, T., M. Yoneta, R. Hirose, S. Sasaki, K. Inoue et K. Chiba (1995).** Simple compounds, 2-Alkyl-2-Amino-1,3-Propanediols have potent immunosuppressive activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **5** (8): 847-852.
- 111 **Fukasawa, M., M. Nishijima et K. Hanada (1999).** Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* **144** (4): 673-85.
- 112 **Futerman, A. H. et Y. A. Hannun (2004).** The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* **5** (8): 777-82.
- 113 **Ganley, I. G., H. Lam du, J. Wang, X. Ding, S. Chen et X. Jiang (2009).** ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* **284** (18): 12297-305.
- 114 **Garza, L., Y. W. Aude et J. F. Saucedo (2002).** Can we prevent in-stent restenosis? *Curr Opin Cardiol* **17** (5): 518-25.
- 115 **George, I., L. T. Bish, G. Kamalakkannan, C. M. Petrilli, M. C. Oz, Y. Naka, H. L. Sweeney et S. Maybaum (2010).** Myostatin activation in patients with advanced heart failure and after mechanical unloading. *Eur J Heart Fail* **12** (5): 444-53.
- 116 **Ghosh, N., R. Sabbadini et S. Chatterjee (1998).** Identification, partial purification, and localization of a neutral sphingomyelinase in rabbit skeletal muscle: neutral sphingomyelinase in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* **189** (1-2): 161-8.
- 117 **Gingras, A. C., B. Raught et N. Sonenberg (2001).** Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* **15** (7): 807-26.

- 118 **Glantschnig, H., J. E. Fisher, G. Wesolowski, G. A. Rodan et A. A. Reszka (2003).** M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ* **10** (10): 1165-77.
- 119 **Glass, D. et R. Roubenoff (2010).** Recent advances in the biology and therapy of muscle wasting. *Ann N Y Acad Sci* **1211**: 25-36.
- 120 **Glass, D. J. (2010).** Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13** (3): 225-9.
- 121 **Gomez-Munoz, A., A. Martin, L. O'Brien et D. N. Brindley (1994).** Cell-permeable ceramides inhibit the stimulation of DNA synthesis and phospholipase D activity by phosphatidate and lysophosphatidate in rat fibroblasts. *J Biol Chem* **269** (12): 8937-43.
- 122 **Gonzalez-Cadavid, N. F., W. E. Taylor, K. Yarasheski, I. Sinha-Hikim, K. Ma, S. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa, M. Mamita, G. Nair, S. Arver et S. Bhasin (1998).** Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (25): 14938-43.
- 123 **Goodsell, D. S. (2006).** The molecular perspective: tumor necrosis factor. *Oncologist* **11** (1): 83-4.
- 124 **Gorski, J., A. Dobrzyn et M. Zendzian-Piotrowska (2002).** The sphingomyelin-signaling pathway in skeletal muscles and its role in regulation of glucose uptake. *Ann N Y Acad Sci* **967**: 236-48.
- 125 **Graler, M. H. et E. J. Goetzl (2004).** The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J* **18** (3): 551-3.
- 126 **Grobet, L., L. J. Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Menissier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset et M. Georges (1997).** A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* **17** (1): 71-4.
- 127 **Guertin, D. A. et D. M. Sabatini (2007).** Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12** (1): 9-22.
- 128 **Guertin, D. A., D. M. Stevens, C. C. Thoreen, A. A. Burds, N. Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K. J. Fitzgerald et D. M. Sabatini (2006).** Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev Cell* **11** (6): 859-71.
- 129 **Gulbins, E. et H. Grassme (2002).** Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim Biophys Acta* **1585** (2-3): 139-45.
- 130 **Gulve, E. A. et J. F. Dice (1989).** Regulation of protein synthesis and degradation in L8 myotubes. Effects of serum, insulin and insulin-like growth factors. *Biochem J* **260** (2): 377-87.
- 131 **Guttridge, D. C., M. W. Mayo, L. V. Madrid, C. Y. Wang et A. S. Baldwin, Jr. (2000).** NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* **289** (5488): 2363-6.
- 132 **Haas, A. L., J. V. Warms, A. Hershko et I. A. Rose (1982).** Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* **257** (5): 2543-8.
- 133 **Haddad, F. et G. R. Adams (2006).** Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* **100** (4): 1188-203.

- 134 **Hahn-Windgassen, A., V. Nogueira, C. C. Chen, J. E. Skeen, N. Sonenberg et N. Hay (2005).** Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* **280** (37): 32081-9.
- 135 **Hakomori, S. (1990).** Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* **265** (31): 18713-6.
- 136 **Hamaguchi, A., E. Suzuki, K. Murayama, T. Fujimura, T. Hikita, K. Iwabuchi, K. Handa, D. A. Withers, S. C. Masters, H. Fu et S. Hakomori (2003).** Sphingosine-dependent protein kinase-1, directed to 14-3-3, is identified as the kinase domain of protein kinase C delta. *J Biol Chem* **278** (42): 41557-65.
- 137 **Hammond, S. M., J. M. Jenco, S. Nakashima, K. Cadwallader, Q. Gu, S. Cook, Y. Nozawa, G. D. Prestwich, M. A. Frohman et A. J. Morris (1997).** Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-alpha. *J Biol Chem* **272** (6): 3860-8.
- 138 **Hanada, K. (2003).** Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1632** (1-3): 16-30.
- 139 **Hanada, K., K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa et M. Nishijima (2003).** Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426** (6968): 803-9.
- 140 **Hannun, Y. A. (1996).** Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274** (5294): 1855-9.
- 141 **Hannun, Y. A., C. R. Loomis, A. H. Merrill, Jr. et R. M. Bell (1986).** Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem* **261** (27): 12604-9.
- 142 **Hannun, Y. A. et C. Luberto (2004).** Lipid metabolism: ceramide transfer protein adds a new dimension. *Curr Biol* **14** (4): R163-5.
- 143 **Hannun, Y. A. et L. M. Obeid (2002).** The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* **277** (29): 25847-50.
- 144 **Hannun, Y. A. et L. M. Obeid (2008).** Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9** (2): 139-50.
- 145 **Hara, K., Y. Maruki, X. Long, K. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch et K. Yonezawa (2002).** Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110** (2): 177-89.
- 146 **Harridge, S. D. (2007).** Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp Physiol* **92** (5): 783-97.
- 147 **Harris, T. E. et J. C. Lawrence, Jr. (2003).** TOR signaling. *Sci STKE* **2003** (212): re15.
- 148 **Hasselgren, P. O. (1999).** Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2** (3): 201-5.
- 149 **Heinrich, M., J. Neumeyer, M. Jakob, C. Hallas, V. Tchikov, S. Winoto-Morbach, M. Wickel, W. Schneider-Brachert, A. Trauzold, A. Hethke et S. Schutze (2004).** Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ* **11** (5): 550-63.
- 150 **Heitman, J., N. R. Movva et M. N. Hall (1991).** Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253** (5022): 905-9.

- 151 **Henage, L. G., J. H. Exton et H. A. Brown (2006).** Kinetic analysis of a mammalian phospholipase D: allosteric modulation by monomeric GTPases, protein kinase C, and polyphosphoinositides. *J Biol Chem* **281** (6): 3408-17.
- 152 **Henry, B., C. Moller, M. T. Dimanche-Boitrel, E. Gulbins et K. A. Becker (2011).** Targeting the ceramide system in cancer. *Cancer Lett.*
- 153 **Hespel, P., B. Op't Eijnde, M. Van Leemputte, B. Urso, P. L. Greenhaff, V. Labarque, S. Dymarkowski, P. Van Hecke et E. A. Richter (2001).** Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *J Physiol* **536** (Pt 2): 625-33.
- 154 **Hodgkin, M. N., M. R. Masson, D. Powner, K. M. Saqib, C. P. Ponting et M. J. Wakelam (2000).** Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-biphosphate-specific PH domain. *Curr Biol* **10** (1): 43-6.
- 155 **Hojjati, M. R., Z. Li et X. C. Jiang (2005).** Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim Biophys Acta* **1737** (1): 44-51.
- 156 **Hojjati, M. R., Z. Li, H. Zhou, S. Tang, C. Huan, E. Ooi, S. Lu et X. C. Jiang (2005).** Effect of myriocin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Biol Chem* **280** (11): 10284-9.
- 157 **Hordijk, P. L., I. Verlaan, E. J. van Corven et W. H. Moolenaar (1994).** Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of map kinase is mediated by the Gi-p21ras pathway. *J Biol Chem* **269** (1): 645-51.
- 158 **Hornberger, T. A., W. K. Chu, Y. W. Mak, J. W. Hsiung, S. A. Huang et S. Chien (2006).** The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (12): 4741-6.
- 159 **Hornberger, T. A., R. B. Hunter, S. C. Kandarian et K. A. Esser (2001).** Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am J Physiol Cell Physiol* **281** (1): C179-87.
- 160 **Hornberger, T. A., R. Stuppard, K. E. Conley, M. J. Fedele, M. L. Fiorotto, E. R. Chin et K. A. Esser (2004).** Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *Biochem J* **380** (Pt 3): 795-804.
- 161 **Hornemann, T., A. Penno, M. F. Rutti, D. Ernst, F. Kivrak-Pfiffner, L. Rohrer et A. von Eckardstein (2009).** The SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase generates short chain sphingoid bases. *J Biol Chem* **284** (39): 26322-30.
- 162 **Huang, J., S. Wu, C. L. Wu et B. D. Manning (2009).** Signaling events downstream of mammalian target of rapamycin complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors. *Cancer Res* **69** (15): 6107-14.
- 163 **Huang, S. et P. J. Houghton (2003).** Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* **3** (4): 371-7.
- 164 **Hughes, S. M., M. M. Chi, O. H. Lowry et K. Gundersen (1999).** Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J Cell Biol* **145** (3): 633-42.
- 165 **Hughes, S. M., K. Koishi, M. Rudnicki et A. M. Maggs (1997).** MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mech Dev* **61** (1-2): 151-63.
- 166 **Hughes, S. M., J. M. Taylor, S. J. Tapscott, C. M. Gurley, W. J. Carter et C. A. Peterson (1993).** Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast

- and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* **118** (4): 1137-47.
- 167 **Hughes, W. E. et P. J. Parker (2001)**. Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the C-termini of the proteins, and is independent of activity. *Biochem J* **356** (Pt 3): 727-36.
- 168 **Hui, L., T. Abbas, R. M. Pielak, T. Joseph, J. Bargonetti et D. A. Foster (2004)**. Phospholipase D elevates the level of MDM2 and suppresses DNA damage-induced increases in p53. *Mol Cell Biol* **24** (13): 5677-86.
- 169 **Huitema, K., J. van den Dikkenberg, J. F. Brouwers et J. C. Holthuis (2004)**. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *Embo J* **23** (1): 33-44.
- 170 **Humeau, Y., N. Vitale, S. Chasserot-Golaz, J. L. Dupont, G. Du, M. A. Frohman, M. F. Bader et B. Poulain (2001)**. A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (26): 15300-5.
- 171 **Hyde, R., E. Hajduch, D. J. Powell, P. M. Taylor et H. S. Hundal (2005)**. Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells. *Faseb J* **19** (3): 461-3.
- 172 **Inoki, K., M. N. Corradetti et K. L. Guan (2005)**. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* **37** (1): 19-24.
- 173 **Inoki, K., H. Ouyang, T. Zhu, C. Lindvall, Y. Wang, X. Zhang, Q. Yang, C. Bennett, Y. Harada, K. Stankunas, C. Y. Wang, X. He, O. A. MacDougald, M. You, B. O. Williams et K. L. Guan (2006)**. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* **126** (5): 955-68.
- 174 **Ishido, M., K. Kami et M. Masuhara (2004)**. In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **287** (2): C484-93.
- 175 **Iyer, S. S., R. S. Agrawal, C. R. Thompson, S. Thompson, J. A. Barton et D. J. Kusner (2006)**. Phospholipase D1 regulates phagocyte adhesion. *J Immunol* **176** (6): 3686-96.
- 176 **Jaafar, R., C. Zeiller, L. Pirola, A. Di Grazia, F. Naro, H. Vidal, E. Lefai et G. Nemoz (2011)**. Phospholipase D regulates myogenic differentiation through the activation of both mTORC1 and mTORC2 complexes. *J Biol Chem* **286** (25): 22609-21.
- 177 **Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall et M. N. Hall (2004)**. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* **6** (11): 1122-8.
- 178 **Jackman, R. W. et S. C. Kandarian (2004)**. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **287** (4): C834-43.
- 179 **Jarvis, W. D., F. A. Fornari, Jr., K. L. Auer, A. J. Freerman, E. Szabo, M. J. Birrer, C. R. Johnson, S. E. Barbour, P. Dent et S. Grant (1997)**. Coordinate regulation of stress- and mitogen-activated protein kinases in the apoptotic actions of ceramide and sphingosine. *Mol Pharmacol* **52** (6): 935-47.
- 180 **Jarvis, W. D., F. A. Fornari, Jr., J. L. Browning, D. A. Gewirtz, R. N. Kolesnick et S. Grant (1994)**. Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **269** (50): 31685-92.
- 181 **Jayadev, S., B. Liu, A. E. Bielawska, J. Y. Lee, F. Nazaire, M. Pushkareva, L. M. Obeid et Y. A. Hannun (1995)**. Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem* **270** (5): 2047-52.

- 182 **Jenkins, G. M. et M. A. Frohman (2005).** Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* **62** (19-20): 2305-16.
- 183 **Ji, S., R. L. Losinski, S. G. Cornelius, G. R. Frank, G. M. Willis, D. E. Gerrard, F. F. Depreux et M. E. Spurlock (1998).** Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am J Physiol* **275** (4 Pt 2): R1265-73.
- 184 **Ji, S. Q., S. Neustrom, G. M. Willis et M. E. Spurlock (1998).** Proinflammatory cytokines regulate myogenic cell proliferation and fusion but have no impact on myotube protein metabolism or stress protein expression. *J Interferon Cytokine Res* **18** (10): 879-88.
- 185 **Johns, D. G., R. C. Webb et J. R. Charpie (2001).** Impaired ceramide signalling in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle: a possible mechanism for augmented cell proliferation. *J Hypertens* **19** (1): 63-70.
- 186 **Johnson, V. J., Q. He, M. F. Osuchowski et R. P. Sharma (2004).** Disruption of sphingolipid homeostasis by myriocin, a mycotoxin, reduces thymic and splenic T-lymphocyte populations. *Toxicology* **201** (1-3): 67-75.
- 187 **Jung, S. Y., J. H. Suh, H. J. Park, K. M. Jung, M. Y. Kim, D. S. Na et D. K. Kim (2000).** Identification of multiple forms of membrane-associated neutral sphingomyelinase in bovine brain. *J Neurochem* **75** (3): 1004-14.
- 188 **Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi et T. Yoshimori (2000).** LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* **19** (21): 5720-8.
- 189 **Kam, Y. et J. H. Exton (2004).** Role of phospholipase D1 in the regulation of mTOR activity by lysophosphatidic acid. *Faseb J* **18** (2): 311-9.
- 190 **Kang, J. H., I. Shin et J. S. Han (1998).** Changes of phospholipase D activity in TNF-alpha and anti-Fas/Apo1 monoclonal antibody induced apoptosis in HL-60 and A20 cells. *Exp Mol Med* **30** (1): 21-7.
- 191 **Karlsson, K. A. (1989).** Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem* **58**: 309-50.
- 192 **Kawakami, M. et A. Cerami (1981).** Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *J Exp Med* **154** (3): 631-9.
- 193 **Kester, M. et R. Kolesnick (2003).** Sphingolipids as therapeutics. *Pharmacol Res* **47** (5): 365-71.
- 194 **Kim, J. H., Y. Kim, S. D. Lee, I. Lopez, R. S. Arnold, J. D. Lambeth, P. G. Suh et S. H. Ryu (1999).** Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid. *FEBS Lett* **454** (1-2): 42-6.
- 195 **Kim, J. S., J. M. Cross et M. M. Bamman (2005).** Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288** (6): E1110-9.
- 196 **Kim, M. Y., C. Linardic, L. Obeid et Y. Hannun (1991).** Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* **266** (1): 484-9.
- 197 **Kimura, T., K. Sato, E. Malchinkhuu, H. Tomura, K. Tamama, A. Kuwabara, M. Murakami et F. Okajima (2003).** High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23** (7): 1283-8.

- 198 **King, C. C., F. T. Zenke, P. E. Dawson, E. M. Dutil, A. C. Newton, B. A. Hemmings et G. M. Bokoch (2000)**. Sphingosine is a novel activator of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1. *J Biol Chem* **275** (24): 18108-13.
- 199 **Koch, T., D. F. Wu, L. Q. Yang, L. O. Brandenburg et V. Holtt (2006)**. Role of phospholipase D2 in the agonist-induced and constitutive endocytosis of G-protein coupled receptors. *J Neurochem* **97** (2): 365-72.
- 200 **Kolesnick, R. (2002)**. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* **110** (1): 3-8.
- 201 **Kolesnick, R. N. (1987)**. 1,2-Diacylglycerols but not phorbol esters stimulate sphingomyelin hydrolysis in GH3 pituitary cells. *J Biol Chem* **262** (35): 16759-62.
- 202 **Kolter, T., R. L. Proia et K. Sandhoff (2002)**. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem* **277** (29): 25859-62.
- 203 **Komati, H., A. Minasi, F. Naro, M. Lagarde, A. F. Prigent, S. Adamo et G. Nemoz (2004)**. Phorbol ester-induced differentiation of L6 myogenic cells involves phospholipase D activation. *FEBS Lett* **577** (3): 409-14.
- 204 **Komati, H., F. Naro, S. Mebarek, V. De Arcangelis, S. Adamo, M. Lagarde, A. F. Prigent et G. Nemoz (2005)**. Phospholipase D is involved in myogenic differentiation through remodeling of actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **16** (3): 1232-44.
- 205 **Kroesen, B. J., S. Jacobs, B. J. Pettus, H. Sietsma, J. W. Kok, Y. A. Hannun et L. F. de Leij (2003)**. BcR-induced apoptosis involves differential regulation of C16 and C24-ceramide formation and sphingolipid-dependent activation of the proteasome. *J Biol Chem* **278** (17): 14723-31.
- 206 **Kuru, S., A. Inukai, T. Kato, Y. Liang, S. Kimura et G. Sobue (2003)**. Expression of tumor necrosis factor-alpha in regenerating muscle fibers in inflammatory and non-inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* **105** (3): 217-24.
- 207 **Kusner, D. J., J. A. Barton, K. K. Wen, X. Wang, P. A. Rubenstein et S. S. Iyer (2002)**. Regulation of phospholipase D activity by actin. Actin exerts bidirectional modulation of Mammalian phospholipase D activity in a polymerization-dependent, isoform-specific manner. *J Biol Chem* **277** (52): 50683-92.
- 208 **Kvorning, T., M. Andersen, K. Brixen et K. Madsen (2006)**. Suppression of endogenous testosterone production attenuates the response to strength training: a randomized, placebo-controlled, and blinded intervention study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291** (6): E1325-32.
- 209 **Ladner, K. J., M. A. Caligiuri et D. C. Guttridge (2003)**. Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF-kappa B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. *J Biol Chem* **278** (4): 2294-303.
- 210 **Lafont, E., K. Kitatani, T. Okazaki et B. Segui (2011)**. Regulation of death and growth signals at the plasma membrane by sphingomyelin synthesis: implications for hematological malignancies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **6** (3): 324-33.
- 211 **Lagirand-Cantaloube, J., N. Offner, A. Csibi, M. P. Leibovitch, S. Batonnet-Pichon, L. A. Tintignac, C. T. Segura et S. A. Leibovitch (2008)**. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *Embo J* **27** (8): 1266-76.
- 212 **Lahdevirta, J., C. P. Maury, A. M. Teppo et H. Repo (1988)**. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* **85** (3): 289-91.
- 213 **Lai, K. M., M. Gonzalez, W. T. Poueymirou, W. O. Kline, E. Na, E. Zlotchenko, T. N. Stitt, A. N. Economides, G. D. Yancopoulos et D. J. Glass (2004)**.

- Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol* **24** (21): 9295-304.
- 214 **Lang, C. H., C. Dobrescu et G. J. Bagby (1992)**. Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* **130** (1): 43-52.
- 215 **Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters et Y. M. Janssen-Heininger (2001)**. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *Faseb J* **15** (7): 1169-80.
- 216 **Langley, B., M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma, S. Gilmour et R. Kambadur (2002)**. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* **277** (51): 49831-40.
- 217 **Laplane, M. et D. M. Sabatini (2009)**. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* **122** (Pt 20): 3589-94.
- 218 **Lavie, Y., H. Cao, S. L. Bursten, A. E. Giuliano et M. C. Cabot (1996)**. Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* **271** (32): 19530-6.
- 219 **Lecker, S. H., R. T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, V. Baracos, J. Bailey, S. R. Price, W. E. Mitch et A. L. Goldberg (2004)**. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J* **18** (1): 39-51.
- 220 **Lee, D. F., H. P. Kuo, C. T. Chen, J. M. Hsu, C. K. Chou, Y. Wei, H. L. Sun, L. Y. Li, B. Ping, W. C. Huang, X. He, J. Y. Hung, C. C. Lai, Q. Ding, J. L. Su, J. Y. Yang, A. A. Sahin, G. N. Hortobagyi, F. J. Tsai, C. H. Tsai et M. C. Hung (2007)**. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* **130** (3): 440-55.
- 221 **Lee, J. Y., Y. A. Hannun et L. M. Obeid (1996)**. Ceramide inactivates cellular protein kinase Calpha. *J Biol Chem* **271** (22): 13169-74.
- 222 **Lee, Y. S., K. M. Choi, M. H. Choi, S. Y. Ji, S. Lee, D. M. Sin, K. W. Oh, Y. M. Lee, J. T. Hong, Y. P. Yun et H. S. Yoo (2011)**. Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces growth inhibition of B16F10 melanoma cells through G(2)/M phase arrest. *Cell Prolif* **44** (4): 320-9.
- 223 **Leger, B., R. Cartoni, M. Praz, S. Lamon, O. Deriaz, A. Crettenand, C. Gobelet, P. Rohmer, M. Konzelmann, F. Luthi et A. P. Russell (2006)**. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol* **576** (Pt 3): 923-33.
- 224 **Lehman, N., B. Ledford, M. Di Fulvio, K. Frondorf, L. C. McPhail et J. Gomez-Cambrero (2007)**. Phospholipase D2-derived phosphatidic acid binds to and activates ribosomal p70 S6 kinase independently of mTOR. *Faseb J* **21** (4): 1075-87.
- 225 **Lejeune, F. J., D. Lienard, M. Matter et C. Ruedg (2006)**. Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun* **6**: 6.
- 226 **Li, Y. P. et M. B. Reid (2000)**. NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279** (4): R1165-70.
- 227 **Li, Y. P., R. J. Schwartz, I. D. Waddell, B. R. Holloway et M. B. Reid (1998)**. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *Faseb J* **12** (10): 871-80.

- 228 **Li, Z., T. S. Park, Y. Li, X. Pan, J. Iqbal, D. Lu, W. Tang, L. Yu, I. J. Goldberg, M. M. Hussain et X. C. Jiang (2009).** Serine palmitoyltransferase (SPT) deficient mice absorb less cholesterol. *Biochim Biophys Acta* **1791** (4): 297-306.
- 229 **Lin, H., K. E. Yutzey et S. F. Konieczny (1991).** Muscle-specific expression of the troponin I gene requires interactions between helix-loop-helix muscle regulatory factors and ubiquitous transcription factors. *Mol Cell Biol* **11** (1): 267-80.
- 230 **Lister, M. D., Z. S. Ruan et R. Bittman (1995).** Interaction of sphingomyelinase with sphingomyelin analogs modified at the C-1 and C-3 positions of the sphingosine backbone. *Biochim Biophys Acta* **1256** (1): 25-30.
- 231 **Litosch, I. (2003).** Regulation of phospholipase C-beta activity by phosphatidic acid: isoform dependence, role of protein kinase C, and G protein subunits. *Biochemistry* **42** (6): 1618-23.
- 232 **Liu, B., N. Andrieu-Abadie, T. Levade, P. Zhang, L. M. Obeid et Y. A. Hannun (1998).** Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *J Biol Chem* **273** (18): 11313-20.
- 233 **Liu, Y. Y., T. Y. Han, A. E. Giuliano et M. C. Cabot (2001).** Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *Faseb J* **15** (3): 719-30.
- 234 **Lokireddy, S., V. Mouly, G. Butler-Browne, P. D. Gluckman, M. Sharma, R. Kambadur et C. McFarlane (2011).** Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* **301** (6): C1316-24.
- 235 **Loughna, P. T. et C. Brownson (1996).** Two myogenic regulatory factor transcripts exhibit muscle-specific responses to disuse and passive stretch in adult rats. *FEBS Lett* **390** (3): 304-6.
- 236 **Luberto, C., D. F. Hassler, P. Signorelli, Y. Okamoto, H. Sawai, E. Boros, D. J. Hazen-Martin, L. M. Obeid, Y. A. Hannun et G. K. Smith (2002).** Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* **277** (43): 41128-39.
- 237 **Lucas, L., L. del Peso, P. Rodriguez, V. Penalva et J. C. Lacal (2000).** Ras protein is involved in the physiological regulation of phospholipase D by platelet derived growth factor. *Oncogene* **19** (3): 431-7.
- 238 **Lucci, A., T. Y. Han, Y. Y. Liu, A. E. Giuliano et M. C. Cabot (1999).** Modification of ceramide metabolism increases cancer cell sensitivity to cytotoxics. *Int J Oncol* **15** (3): 541-6.
- 239 **Ma, K., C. Mallidis, S. Bhasin, V. Mahabadi, J. Artaza, N. Gonzalez-Cadavid, J. Arias et B. Salehian (2003).** Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285** (2): E363-71.
- 240 **Ma, X. M. et J. Blenis (2009).** Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10** (5): 307-18.
- 241 **Ma, Y., S. Pitson, T. Hercus, J. Murphy, A. Lopez et J. Woodcock (2005).** Sphingosine activates protein kinase A type II by a novel cAMP-independent mechanism. *J Biol Chem* **280** (28): 26011-7.
- 242 **Mamedova, L. K., R. Wang, P. Besada, B. T. Liang et K. A. Jacobson (2008).** Attenuation of apoptosis in vitro and ischemia/reperfusion injury in vivo in mouse skeletal muscle by P2Y6 receptor activation. *Pharmacol Res* **58** (3-4): 232-9.
- 243 **Mammucari, C., G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, R. Rudolf, P. Del Piccolo, S. J. Burden, R. Di Lisi, C. Sandri, J. Zhao, A. L. Goldberg, S. Schiaffino et M. Sandri (2007).** FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* **6** (6): 458-71.

- 244 **Mandon, E. C., I. Ehses, J. Rother, G. van Echten et K. Sandhoff (1992).** Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem* **267** (16): 11144-8.
- 245 **Manning, B. D. et L. C. Cantley (2003).** Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* **28** (11): 573-6.
- 246 **Manning, B. D., M. N. Logsdon, A. I. Lipovsky, D. Abbott, D. J. Kwiatkowski et L. C. Cantley (2005).** Feedback inhibition of Akt signaling limits the growth of tumors lacking Tsc2. *Genes Dev* **19** (15): 1773-8.
- 247 **Mantovani, G., A. Maccio, C. Madeddu, R. Serpe, E. Massa, M. Dessi, F. Panzone et P. Contu (2010).** Randomized phase III clinical trial of five different arms of treatment in 332 patients with cancer cachexia. *Oncologist* **15** (2): 200-11.
- 248 **Marchesini, N. et Y. A. Hannun (2004).** Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol* **82** (1): 27-44.
- 249 **Mathias, S., L. A. Pena et R. N. Kolesnick (1998).** Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* **335** (Pt 3): 465-80.
- 250 **Matthys, P., R. Dijkmans, P. Proost, J. Van Damme, H. Heremans, H. Sobis et A. Billiau (1991).** Severe cachexia in mice inoculated with interferon-gamma-producing tumor cells. *Int J Cancer* **49** (1): 77-82.
- 251 **Mazzotta, P. et C. M. Jeney (2009).** Anorexia-cachexia syndrome: a systematic review of the role of dietary polyunsaturated Fatty acids in the management of symptoms, survival, and quality of life. *J Pain Symptom Manage* **37** (6): 1069-77.
- 252 **McPherron, A. C., A. M. Lawler et S. J. Lee (1997).** Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387** (6628): 83-90.
- 253 **Meacci, E., F. Cencetti, C. Donati, F. Nuti, M. Farnararo, T. Kohno, Y. Igarashi et P. Bruni (2003).** Down-regulation of EDG5/S1P2 during myogenic differentiation results in the specific uncoupling of sphingosine 1-phosphate signalling to phospholipase D. *Biochim Biophys Acta* **1633** (3): 133-42.
- 254 **Mebarek, S., H. Komati, F. Naro, C. Zeiller, M. Alvisi, M. Lagarde, A. F. Prigent et G. Nemoz (2007).** Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation. *J Cell Sci* **120** (Pt 3): 407-16.
- 255 **Melstrom, L. G., K. A. Melstrom, Jr., X. Z. Ding et T. E. Adrian (2007).** Mechanisms of skeletal muscle degradation and its therapy in cancer cachexia. *Histol Histopathol* **22** (7): 805-14.
- 256 **Merrill, A. H., Jr. (2002).** De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem* **277** (29): 25843-6.
- 257 **Merrill, A. H., Jr., M. C. Sullards, E. Wang, K. A. Voss et R. T. Riley (2001).** Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ Health Perspect* **109** Suppl 2: 283-9.
- 258 **Merrill, A. H., Jr., G. van Echten, E. Wang et K. Sandhoff (1993).** Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *J Biol Chem* **268** (36): 27299-306.
- 259 **Michael, J. M., M. F. Lavin et D. J. Watters (1997).** Resistance to radiation-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells is associated with defective ceramide signaling. *Cancer Res* **57** (16): 3600-5.
- 260 **Michalaki, V., K. Syrigos, P. Charles et J. Waxman (2004).** Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* **90** (12): 2312-6.

- 261 **Mitra, P., C. A. Oskeritzian, S. G. Payne, M. A. Beaven, S. Milstien et S. Spiegel (2006).** Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (44): 16394-9.
- 262 **Miyake, Y., Y. Kozutsumi, S. Nakamura, T. Fujita et T. Kawasaki (1995).** Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem Biophys Res Commun* **211** (2): 396-403.
- 263 **Mocellin, S., C. R. Rossi, P. Pilati et D. Nitti (2005).** Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* **16** (1): 35-53.
- 264 **Moldawer, L. L., G. Svaninger, J. Gelin et K. G. Lundholm (1987).** Interleukin 1 and tumor necrosis factor do not regulate protein balance in skeletal muscle. *Am J Physiol* **253** (6 Pt 1): C766-73.
- 265 **Morrison, K. S., S. C. Mackie, R. M. Palmer et M. G. Thompson (1995).** Stimulation of protein and DNA synthesis in mouse C2C12 satellite cells: evidence for phospholipase D-dependent and -independent pathways. *J Cell Physiol* **165** (2): 273-83.
- 266 **Morrison, S. F., K. Nakamura et C. J. Madden (2008).** Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* **93** (7): 773-97.
- 267 **Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65** (1-2): 55-63.
- 268 **Mullen, T. D., Y. A. Hannun et L. M. Obeid (2012).** Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem J* **441** (3): 789-802.
- 269 **Mullen, T. D., R. W. Jenkins, C. J. Clarke, J. Bielawski, Y. A. Hannun et L. M. Obeid (2011).** Ceramide synthase-dependent ceramide generation and programmed cell death: involvement of salvage pathway in regulating postmitochondrial events. *J Biol Chem* **286** (18): 15929-42.
- 270 **Murakami, M., T. Ichisaka, M. Maeda, N. Oshiro, K. Hara, F. Edenhofer, H. Kiyama, K. Yonezawa et S. Yamanaka (2004).** mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **24** (15): 6710-8.
- 271 **Murphy, K. T., V. Cobani, J. G. Ryall, C. Ibebunjo et G. S. Lynch (2011).** Acute antibody-directed myostatin inhibition attenuates disuse muscle atrophy and weakness in mice. *J Appl Physiol* **110** (4): 1065-72.
- 272 **Murphy, K. T., R. Koopman, T. Naim, B. Leger, J. Trieu, C. Ibebunjo et G. S. Lynch (2010).** Antibody-directed myostatin inhibition in 21-mo-old mice reveals novel roles for myostatin signaling in skeletal muscle structure and function. *Faseb J* **24** (11): 4433-42.
- 273 **Nervi, C., L. Benedetti, A. Minasi, M. Molinaro et S. Adamo (1995).** Arginine-vasopressin induces differentiation of skeletal myogenic cells and up-regulation of myogenin and Myf-5. *Cell Growth Differ* **6** (1): 81-9.
- 274 **Nicastro, H., G. G. Artioli, S. Costa Ados, M. Y. Solis, C. R. da Luz, F. Blachier et A. H. Lancha, Jr. (2011).** An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions. *Amino Acids* **40** (2): 287-300.
- 275 **Nixon, G. F. (2009).** Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *Br J Pharmacol* **158** (4): 982-93.
- 276 **Norton, L. J., Q. Zhang, K. M. Saqib, H. Schrewe, K. Macura, K. E. Anderson, C. W. Lindsley, H. A. Brown, S. A. Rudge et M. J. Wakelam (2011).** PLD1 rather than PLD2 regulates phorbol-ester-, adhesion-dependent and Fc{gamma}-receptor-stimulated ROS production in neutrophils. *J Cell Sci* **124** (Pt 12): 1973-83.

- 277 **O'Lunaigh, N., R. Pardo, A. Fensome, V. Allen-Baume, D. Jones, M. R. Holt et S. Cockcroft (2002).** Continual production of phosphatidic acid by phospholipase D is essential for antigen-stimulated membrane ruffling in cultured mast cells. *Mol Biol Cell* **13** (10): 3730-46.
- 278 **O'Neil, T. K., L. R. Duffy, J. W. Frey et T. A. Hornberger (2009).** The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions. *J Physiol* **587** (Pt 14): 3691-701.
- 279 **Obeid, L. M., C. M. Linardic, L. A. Karolak et Y. A. Hannun (1993).** Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259** (5102): 1769-71.
- 280 **Odorico, J. S. et H. W. Sollinger (2002).** Technical and immunosuppressive advances in transplantation for insulin-dependent diabetes mellitus. *World J Surg* **26** (2): 194-211.
- 281 **Ohanian, J. et V. Ohanian (2001).** Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci* **58** (14): 2053-68.
- 282 **Ohanna, M., A. K. Sobering, T. Lapointe, L. Lorenzo, C. Praud, E. Petroulakis, N. Sonenberg, P. A. Kelly, A. Sotiropoulos et M. Pende (2005).** Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol* **7** (3): 286-94.
- 283 **Ohta, H., Y. Yatomi, E. A. Sweeney, S. Hakomori et Y. Igarashi (1994).** A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils. *FEBS Lett* **355** (3): 267-70.
- 284 **Okajima, F. (2002).** Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim Biophys Acta* **1582** (1-3): 132-7.
- 285 **Okazaki, T., R. M. Bell et Y. A. Hannun (1989).** Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J Biol Chem* **264** (32): 19076-80.
- 286 **Oliff, A., D. Defeo-Jones, M. Boyer, D. Martinez, D. Kiefer, G. Vuocolo, A. Wolfe et S. H. Socher (1987).** Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell* **50** (4): 555-63.
- 287 **Oskouian, B. et J. D. Saba (2010).** Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. *Adv Exp Med Biol* **688**: 185-205.
- 288 **Oude Weernink, P. A., M. Lopez de Jesus et M. Schmidt (2007).** Phospholipase D signaling: orchestration by PIP2 and small GTPases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **374** (5-6): 399-411.
- 289 **Ozes, O. N., H. Akca, L. D. Mayo, J. A. Gustin, T. Maehama, J. E. Dixon et D. B. Donner (2001).** A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (8): 4640-5.
- 290 **Parameswaran, N. et S. Patial (2010).** Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **20** (2): 87-103.
- 291 **Park, J. B., J. H. Kim, Y. Kim, S. H. Ha, J. S. Yoo, G. Du, M. A. Frohman, P. G. Suh et S. H. Ryu (2000).** Cardiac phospholipase D2 localizes to sarcolemmal membranes and is inhibited by alpha-actinin in an ADP-ribosylation factor-reversible manner. *J Biol Chem* **275** (28): 21295-301.
- 292 **Parker, S. B., G. Eichele, P. Zhang, A. Rawls, A. T. Sands, A. Bradley, E. N. Olson, J. W. Harper et S. J. Elledge (1995).** p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* **267** (5200): 1024-7.

- 293 **Pende, M., S. H. Um, V. Mieulet, M. Sticker, V. L. Goss, J. Mestan, M. Mueller, S. Fumagalli, S. C. Kozma et G. Thomas (2004).** S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol* **24** (8): 3112-24.
- 294 **Perrotta, C. et E. Clementi (2010).** Biological roles of Acid and neutral sphingomyelinases and their regulation by nitric oxide. *Physiology (Bethesda)* **25** (2): 64-71.
- 295 **Perry, D. K. (2000).** The role of de novo ceramide synthesis in chemotherapy-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **905**: 91-6.
- 296 **Pertile, P., M. Liscovitch, V. Chalifa et L. C. Cantley (1995).** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis is required for activation of phospholipase D in U937 cells. *J Biol Chem* **270** (10): 5130-5.
- 297 **Peterson, R. T., B. N. Desai, J. S. Hardwick et S. L. Schreiber (1999).** Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (8): 4438-42.
- 298 **Peterson, T. R., M. Laplante, C. C. Thoreen, Y. Sancak, S. A. Kang, W. M. Kuehl, N. S. Gray et D. M. Sabatini (2009).** DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* **137** (5): 873-86.
- 299 **Pette, D. et R. S. Staron (2000).** Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* **50** (6): 500-9.
- 300 **Pettus, B. J., J. Bielawski, A. M. Porcelli, D. L. Reames, K. R. Johnson, J. Morrow, C. E. Chalfant, L. M. Obeid et Y. A. Hannun (2003).** The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. *Faseb J* **17** (11): 1411-21.
- 301 **Pfeffer, K. (2003).** Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **14** (3-4): 185-91.
- 302 **Phillips, M. L., E. Nudelman, F. C. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. Hakomori et J. C. Paulson (1990).** ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* **250** (4984): 1130-2.
- 303 **Piette, J., J. L. Bessereau, M. Huchet et J. P. Changeux (1990).** Two adjacent MyoD1-binding sites regulate expression of the acetylcholine receptor alpha-subunit gene. *Nature* **345** (6273): 353-5.
- 304 **Pontier, S. M. et F. Schweisguth (2012).** Glycosphingolipids in signaling and development: From liposomes to model organisms. *Dev Dyn* **241** (1): 92-106.
- 305 **Ponting, C. P. et I. D. Kerr (1996).** A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci* **5** (5): 914-22.
- 306 **Rachek, L. I., S. I. Musiyenko, S. P. LeDoux et G. L. Wilson (2007).** Palmitate induced mitochondrial deoxyribonucleic acid damage and apoptosis in l6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* **148** (1): 293-9.
- 307 **Ranganathan, S. et M. B. Davidson (1996).** Effect of tumor necrosis factor-alpha on basal and insulin-stimulated glucose transport in cultured muscle and fat cells. *Metabolism* **45** (9): 1089-94.
- 308 **Ravasco, P., I. Monteiro-Grillo et M. Camilo (2007).** How relevant are cytokines in colorectal cancer wasting? *Cancer J* **13** (6): 392-8.
- 309 **Reid, M. B. et Y. P. Li (2001).** Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res* **2** (5): 269-72.

- 310 **Reynolds, C. P., B. J. Maurer et R. N. Kolesnick (2004).** Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett* **206** (2): 169-80.
- 311 **Riboni, L., P. Viani, R. Bassi, A. Prinetti et G. Tettamanti (1997).** The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res* **36** (2-3): 153-95.
- 312 **Richter, J. D. et N. Sonenberg (2005).** Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433** (7025): 477-80.
- 313 **Riley, R. T., N. H. An, J. L. Showker, H. S. Yoo, W. P. Norred, W. J. Chamberlain, E. Wang, A. H. Merrill, Jr., G. Motelin, V. R. Beasley et al. (1993).** Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* **118** (1): 105-12.
- 314 **Riley, R. T., E. Enongene, K. A. Voss, W. P. Norred, F. I. Meredith, R. P. Sharma, J. Spitsbergen, D. E. Williams, D. B. Carlson et A. H. Merrill, Jr. (2001).** Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ Health Perspect* **109 Suppl 2**: 301-8.
- 315 **Rolland, Y., G. Onder, J. E. Morley, S. Gillette-Guyonet, G. Abellan van Kan et B. Vellas (2011).** Current and future pharmacologic treatment of sarcopenia. *Clin Geriatr Med* **27** (3): 423-47.
- 316 **Rommel, C., S. C. Bodine, B. A. Clarke, R. Rossman, L. Nunez, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos et D. J. Glass (2001).** Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* **3** (11): 1009-13.
- 317 **Rosner, M. et M. Hengstschlager (2008).** Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Hum Mol Genet* **17** (19): 2934-48.
- 318 **Rotolo, J. A., J. Zhang, M. Donepudi, H. Lee, Z. Fuks et R. Kolesnick (2005).** Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem* **280** (28): 26425-34.
- 319 **Roubenoff, R. et J. J. Kehayias (1991).** The meaning and measurement of lean body mass. *Nutr Rev* **49** (6): 163-75.
- 320 **Roy, R. R., S. R. Monke, D. L. Allen et V. R. Edgerton (1999).** Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *J Appl Physiol* **87** (2): 634-42.
- 321 **Rudman, D., A. G. Feller, H. S. Nagraj, G. A. Gergans, P. Y. Lalitha, A. F. Goldberg, R. A. Schlenker, L. Cohn, I. W. Rudman et D. E. Mattson (1990).** Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* **323** (1): 1-6.
- 322 **Rudnicki, M. A., P. N. Schlegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H. H. Arnold et R. Jaenisch (1993).** MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75** (7): 1351-9.
- 323 **Ruvolo, P. P. (2003).** Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* **47** (5): 383-92.
- 324 **Sabatini, D. M. (2006).** mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* **6** (9): 729-34.
- 325 **Sabatini, D. M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst et S. H. Snyder (1994).** RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78** (1): 35-43.

- 326 **Sabbah, H. N., F. Hansen-Smith, V. G. Sharov, T. Kono, M. Lesch, P. J. Gengo, R. P. Steffen, T. B. Levine et S. Goldstein (1993).** Decreased proportion of type I myofibers in skeletal muscle of dogs with chronic heart failure. *Circulation* **87** (5): 1729-37.
- 327 **Sabourin, L. A. et M. A. Rudnicki (2000).** The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* **57** (1): 16-25.
- 328 **Sadoshima, J. et S. Izumo (1993).** Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ Res* **73** (3): 424-38.
- 329 **Saini, A., N. Al-Shanti et C. E. Stewart (2006).** Waste management - cytokines, growth factors and cachexia. *Cytokine Growth Factor Rev* **17** (6): 475-86.
- 330 **Sancak, Y., T. R. Peterson, Y. D. Shaul, R. A. Lindquist, C. C. Thoreen, L. Bar-Peled et D. M. Sabatini (2008).** The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320** (5882): 1496-501.
- 331 **Sandri, M. (2008).** Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)* **23**: 160-70.
- 332 **Sandri, M. (2010).** Autophagy in health and disease. 3. Involvement of autophagy in muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **298** (6): C1291-7.
- 333 **Sarbasov, D. D., S. M. Ali, S. Sengupta, J. H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard et D. M. Sabatini (2006).** Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* **22** (2): 159-68.
- 334 **Sarbasov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali et D. M. Sabatini (2005).** Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307** (5712): 1098-101.
- 335 **Sathyanarayana, P., M. K. Barthwal, C. N. Kundu, M. E. Lane, A. Bergmann, G. Tzivion et A. Rana (2002).** Activation of the Drosophila MLK by ceramide reveals TNF-alpha and ceramide as agonists of mammalian MLK3. *Mol Cell* **10** (6): 1527-33.
- 336 **Scarlatti, F., C. Bauvy, A. Ventruti, G. Sala, F. Cluzeaud, A. Vandewalle, R. Ghidoni et P. Codogno (2004).** Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* **279** (18): 18384-91.
- 337 **Schakman, O., H. Gilson et J. P. Thissen (2008).** Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* **197** (1): 1-10.
- 338 **Schalm, S. S., A. R. Tee et J. Blenis (2005).** Characterization of a conserved C-terminal motif (RSPRR) in ribosomal protein S6 kinase 1 required for its mammalian target of rapamycin-dependent regulation. *J Biol Chem* **280** (12): 11101-6.
- 339 **Schmitz-Peiffer, C., D. L. Craig et T. J. Biden (1999).** Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* **274** (34): 24202-10.
- 340 **Schubert, K. M., M. P. Scheid et V. Duronio (2000).** Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J Biol Chem* **275** (18): 13330-5.
- 341 **Schwarz, A., E. Rapaport, K. Hirschberg et A. H. Futerman (1995).** A regulatory role for sphingolipids in neuronal growth. Inhibition of sphingolipid synthesis and degradation have opposite effects on axonal branching. *J Biol Chem* **270** (18): 10990-8.

- 342 **Selvy, P. E., R. R. Lavieri, C. W. Lindsley et H. A. Brown (2011).** Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev* **111** (10): 6064-119.
- 343 **Selzner, M., A. Bielawska, M. A. Morse, H. A. Rudiger, D. Sindram, Y. A. Hannun et P. A. Clavien (2001).** Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Res* **61** (3): 1233-40.
- 344 **Semsarian, C., P. Suttrave, D. R. Richmond et R. M. Graham (1999).** Insulin-like growth factor (IGF-I) induces myotube hypertrophy associated with an increase in anaerobic glycolysis in a clonal skeletal-muscle cell model. *Biochem J* **339** (Pt 2): 443-51.
- 345 **Sethu, S., G. Mendez-Corao et A. J. Melendez (2008).** Phospholipase D1 plays a key role in TNF-alpha signaling. *J Immunol* **180** (9): 6027-34.
- 346 **Shainberg, A., G. Yagil et D. Yaffe (1971).** Alterations of enzymatic activities during muscle differentiation in vitro. *Dev Biol* **25** (1): 1-29.
- 347 **Sharma, R. P., N. Bhandari, R. T. Riley, K. A. Voss et F. I. Meredith (2000).** Tolerance to fumonisin toxicity in a mouse strain lacking the P75 tumor necrosis factor receptor. *Toxicology* **143** (2): 183-94.
- 348 **Sharples, A. P., N. Al-Shanti et C. E. Stewart (2010).** C2 and C2C12 murine skeletal myoblast models of atrophic and hypertrophic potential: relevance to disease and ageing? *J Cell Physiol* **225** (1): 240-50.
- 349 **Shavlakadze, T., J. White, J. F. Hoh, N. Rosenthal et M. D. Grounds (2004).** Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. *Mol Ther* **10** (5): 829-43.
- 350 **Shima, H., M. Pende, Y. Chen, S. Fumagalli, G. Thomas et S. C. Kozma (1998).** Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *Embo J* **17** (22): 6649-59.
- 351 **Shirai, T., H. Yamaguchi, H. Ito, C. W. Todd et R. B. Wallace (1985).** Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* **313** (6005): 803-6.
- 352 **Simons, K. et E. Ikonen (1997).** Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387** (6633): 569-72.
- 353 **Siriett, V., L. Platt, M. S. Salerno, N. Ling, R. Kambadur et M. Sharma (2006).** Prolonged absence of myostatin reduces sarcopenia. *J Cell Physiol* **209** (3): 866-73.
- 354 **Siriett, V., M. S. Salerno, C. Berry, G. Nicholas, R. Bower, R. Kambadur et M. Sharma (2007).** Antagonism of myostatin enhances muscle regeneration during sarcopenia. *Mol Ther* **15** (8): 1463-70.
- 355 **Sishi, B. J. et A. M. Engelbrecht (2011).** Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces atrophy and apoptosis in L6 myotubes. *Cytokine* **54** (2): 173-84.
- 356 **Snider, A. J., K. A. Orr Gandy et L. M. Obeid (2010).** Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation. *Biochimie* **92** (6): 707-15.
- 357 **Sonnino, S., A. Prinetti, H. Nakayama, M. Yangida, H. Ogawa et K. Iwabuchi (2009).** Role of very long fatty acid-containing glycosphingolipids in membrane organization and cell signaling: the model of lactosylceramide in neutrophils. *Glycoconj J* **26** (6): 615-21.
- 358 **Spangenburg, E. E. (2009).** Changes in muscle mass with mechanical load: possible cellular mechanisms. *Appl Physiol Nutr Metab* **34** (3): 328-35.

- 359 **Spiegel, S. et S. Milstien (1996)**. Sphingoid bases and phospholipase D activation. *Chem Phys Lipids* **80** (1-2): 27-36.
- 360 **Spiegel, S. et S. Milstien (2002)**. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem* **277** (29): 25851-4.
- 361 **Spiegel, S. et S. Milstien (2003)**. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (5): 397-407.
- 362 **Stitt, T. N., D. Drujan, B. A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyva, W. O. Kline, M. Gonzalez, G. D. Yancopoulos et D. J. Glass (2004)**. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* **14** (3): 395-403.
- 363 **Straczkowski, M., I. Kowalska, A. Nikolajuk, S. Dzienis-Straczowska, I. Kinalska, M. Baranowski, M. Zendzian-Piotrowska, Z. Brzezinska et J. Gorski (2004)**. Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes* **53** (5): 1215-21.
- 364 **Su, W., O. Yeku, S. Olepu, A. Genna, J. S. Park, H. Ren, G. Du, M. H. Gelb, A. J. Morris et M. A. Frohman (2009)**. 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), a phospholipase D pharmacological inhibitor that alters cell spreading and inhibits chemotaxis. *Mol Pharmacol* **75** (3): 437-46.
- 365 **Summers, S. A. (2006)**. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* **45** (1): 42-72.
- 366 **Sun, Y. et J. Chen (2008)**. mTOR signaling: PLD takes center stage. *Cell Cycle* **7** (20): 3118-23.
- 367 **Tafesse, F. G., P. Ternes et J. C. Holthuis (2006)**. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J Biol Chem* **281** (40): 29421-5.
- 368 **Takabe, K., S. W. Paugh, S. Milstien et S. Spiegel (2008)**. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* **60** (2): 181-95.
- 369 **Teruel, T., R. Hernandez et M. Lorenzo (2001)**. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes* **50** (11): 2563-71.
- 370 **Teufel, A., T. Maass, P. R. Galle et N. Malik (2009)**. The longevity assurance homologue of yeast lag1 (Lass) gene family (review). *Int J Mol Med* **23** (2): 135-40.
- 371 **Thiel, P. G., W. F. Marasas, E. W. Sydenham, G. S. Shephard, W. C. Gelderblom et J. J. Nieuwenhuis (1991)**. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* **57** (4): 1089-93.
- 372 **Thomas, M., B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk, J. Bass et R. Kambadur (2000)**. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* **275** (51): 40235-43.
- 373 **Thoreen, C. C., S. A. Kang, J. W. Chang, Q. Liu, J. Zhang, Y. Gao, L. J. Reichling, T. Sim, D. M. Sabatini et N. S. Gray (2009)**. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* **284** (12): 8023-32.
- 374 **Tipton, K. D., A. A. Ferrando, S. M. Phillips, D. Doyle, Jr. et R. R. Wolfe (1999)**. Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *Am J Physiol* **276** (4 Pt 1): E628-34.
- 375 **Tollefsen, S. E., J. L. Sadow et P. Rotwein (1989)**. Coordinate expression of insulin-like growth factor II and its receptor during muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** (5): 1543-7.

- 376 **Toschi, A., E. Lee, L. Xu, A. Garcia, N. Gadir et D. A. Foster (2009).** Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol* **29** (6): 1411-20.
- 377 **Tou, J. et C. Urbizo (2001).** Resveratrol inhibits the formation of phosphatidic acid and diglyceride in chemotactic peptide- or phorbol ester-stimulated human neutrophils. *Cell Signal* **13** (3): 191-7.
- 378 **Tracey, K. J., B. Beutler, S. F. Lowry, J. Merryweather, S. Wolpe, I. W. Milsark, R. J. Hariri, T. J. Fahey, 3rd, A. Zentella, J. D. Albert et et al. (1986).** Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* **234** (4775): 470-4.
- 379 **Tracey, K. J., S. Morgello, B. Koplin, T. J. Fahey, 3rd, J. Fox, A. Aledo, K. R. Manogue et A. Cerami (1990).** Metabolic effects of cachectin/tumor necrosis factor are modified by site of production. Cachectin/tumor necrosis factor-secreting tumor in skeletal muscle induces chronic cachexia, while implantation in brain induces predominantly acute anorexia. *J Clin Invest* **86** (6): 2014-24.
- 380 **Trendelenburg, A. U., A. Meyer, D. Rohner, J. Boyle, S. Hatakeyama et D. J. Glass (2009).** Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol* **296** (6): C1258-70.
- 381 **Tsunoda, M., R. P. Sharma et R. T. Riley (1998).** Early fumonisin B1 toxicity in relation to disrupted sphingolipid metabolism in male BALB/c mice. *J Biochem Mol Toxicol* **12** (5): 281-9.
- 382 **Turinsky, J., B. P. Bayly et D. M. O'Sullivan (1991).** 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in rat liver and skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* **261** (5 Pt 1): E620-7.
- 383 **Turinsky, J., D. M. O'Sullivan et B. P. Bayly (1990).** 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* **265** (28): 16880-5.
- 384 **Ueno, Y., K. Iijima, S. D. Wang, Y. Sugiura, M. Sekijima, T. Tanaka, C. Chen et S. Z. Yu (1997).** Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food Chem Toxicol* **35** (12): 1143-50.
- 385 **Urban, R. J., Y. H. Bodenbun, C. Gilkison, J. Foxworth, A. R. Coggan, R. R. Wolfe et A. Ferrando (1995).** Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *Am J Physiol* **269** (5 Pt 1): E820-6.
- 386 **Urso, M. L. (2009).** Disuse atrophy of human skeletal muscle: cell signaling and potential interventions. *Med Sci Sports Exerc* **41** (10): 1860-8.
- 387 **Ussher, J. R., T. R. Koves, V. J. Cadete, L. Zhang, J. S. Jaswal, S. J. Swyrd, D. G. Lopaschuk, S. D. Proctor, W. Keung, D. M. Muoio et G. D. Lopaschuk (2010).** Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* **59** (10): 2453-64.
- 388 **van den Berg, S. A., W. van Marken Lichtenbelt, K. Willems van Dijk et P. Schrauwen (2011).** Skeletal muscle mitochondrial uncoupling, adaptive thermogenesis and energy expenditure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14** (3): 243-9.
- 389 **van Echten, G. et K. Sandhoff (1993).** Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. *J Biol Chem* **268** (8): 5341-4.
- 390 **van Etten, B., M. R. de Vries, I. M. G. van, T. E. Lans, G. Guetens, G. Ambagtsheer, S. T. van Tiel, G. de Boeck, E. A. de Bruijn, A. M. Eggermont et T. L. ten Hagen (2003).** Degree of tumour vascularity correlates with drug

- accumulation and tumour response upon TNF-alpha-based isolated hepatic perfusion. *Br J Cancer* **88** (2): 314-9.
- 391 **Van Herreweghe, F., N. Festjens, W. Declercq et P. Vandenabeele (2010)**. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci* **67** (10): 1567-79.
- 392 **van Meer, G. et J. C. Holthuis (2000)**. Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* **1486** (1): 145-70.
- 393 **van Meer, G. et Q. Lisman (2002)**. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem* **277** (29): 25855-8.
- 394 **van Royen, M., N. Carbo, S. Busquets, B. Alvarez, L. S. Quinn, F. J. Lopez-Soriano et J. M. Argiles (2000)**. DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun* **270** (2): 533-7.
- 395 **Venable, M. E., A. Bielawska et L. M. Obeid (1996)**. Ceramide inhibits phospholipase D in a cell-free system. *J Biol Chem* **271** (40): 24800-5.
- 396 **Venable, M. E. et L. M. Obeid (1999)**. Phospholipase D in cellular senescence. *Biochim Biophys Acta* **1439** (2): 291-8.
- 397 **Venkataraman, K. et A. H. Futerman (2000)**. Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol* **10** (10): 408-12.
- 398 **Verhees, K. J., A. M. Schols, M. C. Kelders, C. M. Op den Kamp, J. L. van der Velden et R. C. Langen (2011)**. Glycogen synthase kinase-3beta is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **301** (5): C995-C1007.
- 399 **Veverka, V., T. Crabbe, I. Bird, G. Lennie, F. W. Muskett, R. J. Taylor et M. D. Carr (2008)**. Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. *Oncogene* **27** (5): 585-95.
- 400 **Viguerie, N., F. Picard, G. Hul, B. Roussel, P. Barbe, J. S. Iacovoni, C. Valle, D. Langin et W. H. Saris (2011)**. Multiple effects of a short term dexamethasone treatment in human skeletal muscle and adipose tissue. *Physiol Genomics*.
- 401 **Voss, K. A., R. Riley, C. Dunn et J. Christopher Corton (2006)**. The role of tumor necrosis factor alpha and the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in modulating the effects of fumonisin in mouse liver. *Toxicology* **222** (3): 165-74.
- 402 **Voss, M., P. A. Weernink, S. Hauptenthal, U. Moller, R. H. Cool, B. Bauer, J. H. Camonis, K. H. Jakobs et M. Schmidt (1999)**. Phospholipase D stimulation by receptor tyrosine kinases mediated by protein kinase C and a Ras/Ral signaling cascade. *J Biol Chem* **274** (49): 34691-8.
- 403 **Voytik, S. L., M. Przyborski, S. F. Badylak et S. F. Konieczny (1993)**. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. *Dev Dyn* **198** (3): 214-24.
- 404 **Wajant, H., K. Pfizenmaier et P. Scheurich (2003)**. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10** (1): 45-65.
- 405 **Wakelam, M. J., G. S. McNee et S. A. Rudge (2010)**. Cross-talk between phospholipase D and MAP kinases activities. *Adv Enzyme Regul* **50** (1): 57-61.
- 406 **Walters, E. H., N. C. Stickland et P. T. Loughna (2000)**. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil* **21** (7): 647-53.

- 407 **Walters, E. H., N. C. Stickland et P. T. Loughna (2000).** MRF-4 exhibits fiber type- and muscle-specific pattern of expression in postnatal rat muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278** (5): R1381-4.
- 408 **Wan, M., X. Wu, K. L. Guan, M. Han, Y. Zhuang et T. Xu (2006).** Muscle atrophy in transgenic mice expressing a human TSC1 transgene. *FEBS Lett* **580** (24): 5621-7.
- 409 **Wang, C. N., L. O'Brien et D. N. Brindley (1998).** Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor-alpha on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **47** (1): 24-31.
- 410 **Wang, E., P. F. Ross, T. M. Wilson, R. T. Riley et A. H. Merrill, Jr. (1992).** Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J Nutr* **122** (8): 1706-16.
- 411 **Wang, H., N. Kubica, L. W. Ellisen, L. S. Jefferson et S. R. Kimball (2006).** Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J Biol Chem* **281** (51): 39128-34.
- 412 **Watanabe, M., T. Kitano, T. Kondo, T. Yabu, Y. Taguchi, M. Tashima, H. Umehara, N. Domae, T. Uchiyama et T. Okazaki (2004).** Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the "sphingomyelin cycle" in Fas-induced apoptosis. *Cancer Res* **64** (3): 1000-7.
- 413 **Weintraub, H., R. Davis, D. Lockshon et A. Lassar (1990).** MyoD binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence: occupancy of two sites is required for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (15): 5623-7.
- 414 **Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel et A. W. Ferrante, Jr. (2003).** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112** (12): 1796-808.
- 415 **Weiss, A. et L. A. Leinwand (1996).** The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 417-39.
- 416 **Wentworth, B. M., M. Donoghue, J. C. Engert, E. B. Berglund et N. Rosenthal (1991).** Paired MyoD-binding sites regulate myosin light chain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (4): 1242-6.
- 417 **Wertz, P. W. (2000).** Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **208**: 7-11.
- 418 **Wing, S. S., S. H. Lecker et R. T. Jagoe (2011).** Proteolysis in illness-associated skeletal muscle atrophy: from pathways to networks. *Crit Rev Clin Lab Sci* **48** (2): 49-70.
- 419 **Woo, S. Y., D. H. Kim, C. B. Jun, Y. M. Kim, E. V. Haar, S. I. Lee, J. W. Hegg, S. Bandhakavi, T. J. Griffin et D. H. Kim (2007).** PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem* **282** (35): 25604-12.
- 420 **Woodcock, J. (2006).** Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB Life* **58** (8): 462-6.
- 421 **Worgall, T. S. (2011).** Sphingolipid synthetic pathways are major regulators of lipid homeostasis. *Adv Exp Med Biol* **721**: 139-48.
- 422 **Xie, Z., W. T. Ho et J. H. Exton (2000).** Conserved amino acids at the C-terminus of rat phospholipase D1 are essential for enzymatic activity. *Eur J Biochem* **267** (24): 7138-46.
- 423 **Yaffe, D. (1968).** Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61** (2): 477-83.

- 424 **Yaffe, D. et O. Saxel (1977)**. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270** (5639): 725-7.
- 425 **Yanase, Y., N. Carvou, M. A. Frohman et S. Cockcroft (2010)**. Reversible bleb formation in mast cells stimulated with antigen is Ca²⁺/calmodulin-dependent and bleb size is regulated by ARF6. *Biochem J* **425** (1): 179-93.
- 426 **Yasuda, S., H. Kitagawa, M. Ueno, H. Ishitani, M. Fukasawa, M. Nishijima, S. Kobayashi et K. Hanada (2001)**. A novel inhibitor of ceramide trafficking from the endoplasmic reticulum to the site of sphingomyelin synthesis. *J Biol Chem* **276** (47): 43994-4002.
- 427 **Yoon, M. S. et J. Chen (2008)**. PLD regulates myoblast differentiation through the mTOR-IGF2 pathway. *J Cell Sci* **121** (Pt 3): 282-9.
- 428 **Zamir, O., P. O. Hasselgren, T. Higashiguchi, J. A. Frederick et J. E. Fischer (1992)**. Tumour necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) induce muscle proteolysis through different mechanisms. *Mediators Inflamm* **1** (4): 247-50.
- 429 **Zanin, M., E. Germinario, L. Dalla Libera, D. Sandona, R. A. Sabbadini, R. Betto et D. Danieli-Betto (2008)**. Trophic action of sphingosine 1-phosphate in denervated rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **294** (1): C36-46.
- 430 **Zhang, H., N. Bajraszewski, E. Wu, H. Wang, A. P. Moseman, S. L. Dabora, J. D. Griffin et D. J. Kwiatkowski (2007)**. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J Clin Invest* **117** (3): 730-8.
- 431 **Zhang, H. H., M. Halbleib, F. Ahmad, V. C. Manganiello et A. S. Greenberg (2002)**. Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* **51** (10): 2929-35.
- 432 **Zhang, Y., B. Yao, S. Delikat, S. Bayoumy, X. H. Lin, S. Basu, M. McGinley, P. Y. Chan-Hui, H. Lichenstein et R. Kolesnick (1997)**. Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* **89** (1): 63-72.
- 433 **Zhao, J., J. J. Brault, A. Schild, P. Cao, M. Sandri, S. Schiaffino, S. H. Lecker et A. L. Goldberg (2007)**. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **6** (6): 472-83.
- 434 **Zhou, X., J. L. Wang, J. Lu, Y. Song, K. S. Kwak, Q. Jiao, R. Rosenfeld, Q. Chen, T. Boone, W. S. Simonet, D. L. Lacey, A. L. Goldberg et H. Q. Han (2010)**. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* **142** (4): 531-43.
- 435 **Zierath, J. R. et J. A. Hawley (2004)**. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biol* **2** (10): e348.
- 436 **Zimmers, T. A., M. V. Davies, L. G. Koniaris, P. Haynes, A. F. Esquela, K. N. Tomkinson, A. C. McPherron, N. M. Wolfman et S. J. Lee (2002)**. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* **296** (5572): 1486-8.

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

TNFalpha- and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism

Skeletal Muscle 2012, 2:2 doi:10.1186/2044-5040-2-2

Joffrey De Larichaudy (joffrey.de-larichaudy@univ-lyon1.fr)
Alessandra Zufferli (alessandra.zufferli@uniroma1.it)
Filippo Serra (filippo.serra@uniroma1.it)
Andrea M Isidori (andrea.isidori@uniroma1.it)
Fabio Naro (fabio.naro@uniroma1.it)
Kevin Dessalle (kevin.dessalle@etu.univ-lyon1.fr)
Marine Desgeorges (marine.desgeorges@gmail.com)
Monique Piraud (monique.piraud@chu-lyon.fr)
David Cheillan (david.cheillan@chu.lyon.fr)
Hubert Vidal (hubert.vidal@inserm.fr)
Etienne Lefai (etienne.lefai@univ-lyon1.fr)
Georges Nemoz (georges.nemoz@insa-lyon.fr)

ISSN 2044-5040

Article type Research

Submission date 11 August 2011

Acceptance date 18 January 2012

Publication date 18 January 2012

Article URL <http://www.skeletalmusclejournal.com/content/2/1/2>

This peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in *Skeletal Muscle* are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in *Skeletal Muscle* or any BioMed Central journal, go to

<http://www.skeletalmusclejournal.com/authors/instructions/>

TNF α - and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism

Joffrey De Larichaudy^{1,*}, Alessandra Zufferli^{1,2,*}, Filippo Serra², Andrea M. Isidori³, Fabio Naro², Kevin Dessalle¹, Marine Desgeorges⁴, Monique Piraud^{1,5}, David Cheillan^{1,5}, Hubert Vidal¹, Etienne Lefai¹, Georges Némoz^{1,¶}.

¹ Lyon University, INSERM U1060, CarMeN Laboratory, University Lyon-1, Institut National de la Recherche Agronomique UMR1235, INSA-Lyon, F-69600 Oullins, France; ² Istituto Interuniversitario di Miologia and Dipartimento di Istologia ed Embriologia Medica, ³ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Roma-La Sapienza, 00161 Roma, Italy; ⁴ Lyon University, Laboratoire de Physiologie de l'Exercice EA 4338, University Jean Monnet, F-42000 Saint Etienne; ⁵ Hospices Civils de Lyon, Service Maladies Héréditaires du Métabolisme et Dépistage Néonatal, F-69677 Bron, France

* these authors contributed equally to this work.

¶ Corresponding author; georges.nemoz@insa-lyon.fr; tel +33 -426 23 59 48; fax +33- 426 23 59 16

Abstract

Background

Muscle atrophy associated with various pathophysiological conditions represents a major health problem, due to its contribution to the deterioration of patient status and its impact on mortality. Although the involvement of pro-inflammatory cytokines in this process is well-recognized, the role of sphingolipid metabolism alterations induced by the cytokines has received little attention.

Results

We addressed this question both in vitro, using differentiated myotubes treated by TNF α , and in vivo, in a murine model of tumor-induced cachexia. Myotube atrophy induced by TNF α was accompanied by a substantial increase in cell ceramide levels, and could be mimicked by the addition of exogenous ceramides. It could be prevented by the addition of ceramide synthesis inhibitors that targeted either the de novo pathway (myriocin), or sphingomyelinases (GW4869 and 3-O-methylsphingomyelin). In the presence of TNF α , ceramide synthesis inhibitors significantly increased protein synthesis and decreased proteolysis. In parallel, they lowered the expression of both Atrogin-1 and LC3b genes, respectively involved in muscle

protein degradation by proteasome and autophagic proteolysis, and increased the proportion of inactive, phosphorylated Foxo3 transcription factor. Furthermore, these inhibitors increased the expression and/or phosphorylation levels of key factors regulating protein metabolism, including phospholipase D, an activator of mTOR, and the mTOR substrates S6K1 and Akt. In vivo, C26 carcinoma implantation induced a substantial increase of muscle ceramide, together with drastic muscle atrophy. Treatment of the animals by myriocin reduced the expression of atrogenes Foxo3 and Atrogin-1, and partially protected muscle tissue from atrophy.

Conclusions

These results indicate that ceramide accumulation induced by TNF α or tumor development participates in the mechanism of muscle cell atrophy, and that sphingolipid metabolism can be a relevant target for pharmacological or nutritional interventions aiming at preserving muscle mass in pathological situations.

Background

A major complication arising from a variety of pathological states such as cancer, renal insufficiency, diabetes, sepsis, etc., is a loss of skeletal muscle tissue that leads to reduced mobility and quality of life, lowered response to treatments, and decreased life expectancy. The causes of muscle wasting that occurs during chronic diseases are complex, but among them the elevation of pro-inflammatory cytokine levels, in particular TNF α , likely plays a prominent role [1]. TNF α triggers multiple cell responses, including ceramide formation, through stimulation of both de novo synthesis pathway consisting in the condensation of palmitoyl-CoA with serine, and sphingomyelinase-mediated hydrolysis of membrane sphingomyelin [2,3]. Ceramide is a bioactive mediator involved in cell responses to stress [4]. It is also the central compound of sphingolipid metabolism that gives rise to more complex structural sphingolipids, and also to other bioactive mediators such as sphingosine or sphingosine-1-phosphate (S1P) [5]. Whereas the involvement of ceramide in the development of insulin resistance in muscle and of type 2 diabetes has been largely documented [6-8], very little is known about its role in muscle mass regulation, and in particular in muscle atrophy. However, in view of the recognized impact of ceramide on a number of pathways able to affect this tissue, its involvement could be expected. Ceramide has indeed been shown to

inhibit myogenic differentiation [9], amino-acid transport, mTOR activity, and protein synthesis in myotubes [10]. It can also enhance pathways involved in proteolysis, such as NF κ B pathway [11] and autophagy [12,13].

We therefore hypothesized that the biosynthesis of sphingolipid mediators, in particular ceramide, participates in the mechanisms leading to muscle loss associated to pathological states. To test this assumption we used differentiated L6 and C2C12 myotubes treated by TNF α as in vitro models of muscle atrophy, and an in vivo mouse model of tumor-induced cachexia [14]. Our results indicate that sphingolipids markedly influence the size and protein metabolism of differentiated myotubes. In parallel, they affect the Akt/mTOR signaling pathway that is tightly involved in the regulation of protein synthesis and degradation [15,16], and phospholipase D (PLD), an activator of this pathway [17,18]. The protective action of the inhibitor of de novo sphingolipid synthesis myriocin [19], that we observed both in vitro and in vivo during tumor-induced cachexia, suggests that preventing ceramide accumulation could represent a promising strategy to preserve muscle mass against atrophy associated with a number of chronic diseases.

Results

Both TNF α and ceramide induce an in vitro atrophy of cultured myotubes

In differentiated myotubes of the L6 cell line submitted to 15 ng/ml recombinant TNF α treatment for 3 days, cell atrophy was evidenced by a significant decrease in cell surface, as already reported [20] (Fig. 1a). Other parameters reflecting the functional status of the differentiated muscle cells were also significantly lowered by TNF α treatment, such as the content in myosin heavy chain (MHC), as evaluated by ELISA (Fig. 1b), and creatine kinase activity (Fig. 1c). Similarly, TNF α treatment induced a decrease in cell surface in myotubes derived from the C2C12 line (Additional file 1). We verified that in these conditions TNF α induced no change in cell viability (not shown). The effects of TNF α on cellular levels of sphingolipids were assessed in L6 myotubes by using tandem mass spectrometry. As expected, TNF α treatment was able to increase by 35% the levels of ceramide. The bulk of the increase mainly concerned a subset of ceramide molecular species: C16:0-, C24:1-, and C18:0-ceramides (Table 1). TNF α action also resulted in a 30% decrease in sphingomyelin, especially C16:0 and C24:1 molecular species, reflecting an activation of sphingomyelinases (Table 1). To assess whether ceramide accumulation could explain the atrophic effects of

TNF α , we investigated the effects of myotube treatment by exogenous ceramide.

Interestingly, in both L6 and C2C12 cell lines, the atrophic effects of TNF α were mimicked by the addition to culture medium of cell-permeant short-chain ceramides, in particular C6-ceramide (Fig. 1a,b,c, Additional file 1). This suggested that myotube atrophy could result from TNF α -induced ceramide accumulation

Inhibitors of ceramide synthesis prevent TNF α -induced myotube atrophy

To confirm the role of ceramide formation in the atrophic response to TNF α , inhibitors of ceramide synthesis were added to culture medium simultaneously with TNF α . Ceramide can be formed by two different pathways, under the action of sphingomyelinases, or through de novo synthesis, and TNF α is known to activate both pathways [2,3]. Thus, two types of agents were used: myriocin, an inhibitor targeting de novo synthesis by selectively inhibiting the first step of the pathway catalyzed by serine-palmitoyl-CoA transferase [21], and inhibitors of sphingomyelinases GW4869 [22] and 3-O-methylsphingomyelin (OMS) [23]. Myriocin was able to protect L6 myotubes from TNF α -induced decrease in surface. GW4869 and OMS were also able to counteract TNF α atrophic effect in L6 myotubes, suggesting that ceramide formed by either of the pathways mediates the atrophic effect of TNF α (Fig. 2a). The inhibitors had little influence on myotube surface in the absence of TNF, except a weak positive effect for GW4869 and OMS. No additive effects of the inhibitors of the two different ceramide synthesis pathways was noticed (Fig. 2a).

The effects of ceramide synthesis inhibition in L6 myotubes were also evaluated on other markers of muscle cell integrity. Myriocin significantly decreased the TNF α -induced loss of MHC content evaluated by ELISA (Fig. 2b), and prevented the loss of myosin light chains 1 and 3, evaluated by Western blotting (Fig. 2c). Moreover, all of the studied inhibitors of ceramide synthesis had a protective effect against TNF α -induced creatine kinase activity alteration. Again their actions were not additive (Fig. 2d).

In C2C12 myotubes, whereas GW4869 and OMS also showed protective effects against TNF α -induced atrophy, myriocin was devoid of protective effects and even showed by itself a negative effect on myotube size, contrary to what observed in L6 myotubes (Additional file 2). This suggested that, in C2C12 cells, ceramide formed by sphingomyelinase activation is predominant in the induction of atrophy by TNF α , and/or that de novo sphingolipid synthesis is necessary for these cells to maintain their homeostasis, by supplying cells with an essential component.

The effects of ceramide synthesis inhibitors on the changes in cellular levels of sphingolipids induced by TNF α were assessed in L6 myotubes. Both the de novo synthesis inhibitor myriocin and the sphingomyelinase inhibitors GW4869 and OMS significantly inhibited the TNF α -induced increase in ceramide levels (Fig. 3a), confirming that the drugs were active at the concentrations used, and suggesting that ceramide accumulation resulted from the activation of both pathways under the action of TNF α . As expected, treatments by sphingomyelinase inhibitors GW4869 and OMS alleviated the TNF α -induced loss of sphingomyelin (Fig. 3b). By contrast, myriocin decreased by itself sphingomyelin levels, and amplified TNF α lowering effect, in agreement with its reported ability to induce a general depletion of sphingolipids, including sphingomyelin [19].

Are changes in S1P levels also involved in myotube size regulation ?

Because ceramide can be rapidly metabolized in the cell, and potentially converted into the bioactive mediator S1P through the sequential action of ceramidases and sphingosine kinases [5], we evaluated the effects of S1P on myotubes. In L6 myotubes, exogenous S1P had a positive effect in the presence of TNF α , on myotube surface and on creatine kinase activity (Fig. 4a,b), suggesting that ceramide metabolization into S1P could induce effects opposite to that of ceramide itself. This antagonistic action was also supported by the observation that S1P also decreased the atrophic effects of ceramide (Fig. 4c). Conversely, inhibition of S1P biosynthesis by the addition of the sphingosine kinase inhibitors DL-Threo-Dihydro-sphingosine (DHS) and N, N-Dimethylsphingosine (DMS) [24] increased TNF α and ceramide effects on myotube surface or creatine kinase activity, supporting the assumption that S1P antagonized in part ceramide effects (Fig. 4b,c). S1P can be secreted and is known to activate a set of specific membrane surface receptors, of which the S1P1, S1P2, S1P3 types are expressed in muscle cells [25]. The effects of FTY720, a compound functionally acting as an inhibitor of S1P receptors [26], were thus evaluated. FTY720 had negative effects on myotubes by itself, consistent with a positive influence of S1P. However, FTY720 did not amplify the negative effects of TNF α (Fig. 4a,b).

Protein metabolism is altered by ceramide production

Protein synthesis rate was evaluated in L6 myotubes by measuring the incorporation of [³H]-tyrosine into neo-synthesized proteins. The marked decrease in protein synthesis induced by a 12 h TNF α treatment was significantly counteracted by the addition of either myriocin or

OMS (Fig. 5a). Proteolysis was also quantified in [³H]-tyrosine labelled L6 myotubes, by measuring the release of trichloroacetic acid-soluble radioactivity. In the presence of TNF α for 12 h, both myriocin and OMS were able to significantly decrease proteolysis (Fig. 5b). These results strongly suggested that ceramide formation negatively influences protein synthesis, whereas it activates proteolysis.

Part of cell proteolysis is insured by the ubiquitin-proteasome system, and ubiquitin ligases are important components of this system. In muscle, atrophy has been shown to be frequently associated with up-regulation of a set of genes called atrogenes, including ubiquitin ligases Atrogin-1 and Murf1 which target muscle-specific proteins [27]. We thus evaluated the effect of ceramide synthesis inhibitors on their mRNA expression, and observed that TNF α increased Atrogin-1 expression, whereas myriocin, GW4869 and OMS markedly decreased its expression, confirming that ceramide formation is able to enhance proteolysis (Fig. 5c). By contrast, no significant effect of ceramide inhibition on Murf1 expression could be evidenced (not shown). Because a well-identified target of Atrogin-1 in muscle tissue is the translation initiation factor subunit eIF3f, the degradation of which plays a major role in atrophy [28], we assessed its amount in our experimental conditions. We observed a significant lowering in eIF3f protein in TNF α -treated myotubes, and a partial reversion by myriocin addition (Additional file 3), suggesting that TNF α -induced, ceramide-dependent, Atrogin-1 upregulation could negatively impact on protein synthesis and myotube size through the degradation of eIF3f, and conversely, that the preservation of eIF3f could participate in the protective effects of ceramide synthesis inhibition on muscle cells. Another proteolytic system that is known to contribute to muscle atrophy is autophagy [29], a typical marker of which is LC3b, a protein constituent of autophagosomes [30]. We observed that ceramide synthesis inhibitors significantly decreased the expression of LC3b in the presence of TNF α , suggesting that ceramide also participated in enhancing proteolysis in myotubes through the autophagic system (Fig. 5c). However, ceramide synthesis inhibitors did not induce significant down-regulation of other autophagy marker genes such as Beclin-1, Gabarapl1 and CathepsinL (not shown). It has been reported that both proteasomal and autophagic protein degradation pathways are under the control of Foxo3 transcription factor which insures the expression of atrogenes, including Atrogin-1, and autophagy-related genes such as LC3b [29]. Foxo transcription factors are negatively regulated by Akt-mediated phosphorylation, which induces their exclusion from the nucleus and thereby inhibits their transcriptional activity [16]. We evaluated the phosphorylation status of Foxo3 in myotubes,

and consistent with the induced changes in atrogene expression, TNF α -treatment caused a significant dephosphorylation, i.e. an activation of this factor. This effect was raised by myriocin addition, confirming a role of ceramide in TNF α -induced proteolysis enhancement (Fig.5d).

Molecular mechanism of ceramide effects on muscle cells

Ceramide is known as a down-regulator of the expression of PLD, particularly the PLD1 isoform [9,31]. PLD is in turn an activator of mTOR kinase, a major regulator of protein synthesis and degradation [15] tightly involved in muscle tissue homeostasis [32]. We therefore considered the influence of TNF α and ceramide synthesis inhibitors on the expression of PLD1 in L6 myotubes. Myriocin had no influence by itself on PLD1 mRNA, whereas GW4868 alone moderately increased its level. TNF α strongly repressed the expression of PLD1 mRNA, and ceramide synthesis inhibitors rescued its expression, partially for myriocin, and totally for GW4869. A potentiation of the effects of the two inhibitors on PLD1 mRNA levels was even noticed (Fig. 6a). These effects were confirmed at the protein level, TNF α inducing a marked decrease in PLD1 protein, which was rescued by either myriocin or GW4869 (Fig. 6a). These results thus showed that TNF α lowers PLD1 expression in myotubes through the production of ceramide by both the de novo pathway and sphingomyelinase activation.

It could be expected that the observed changes in PLD1 expression induced by TNF α , and their reversion by ceramide synthesis inhibitors, directly influenced the activity of mTOR kinase, an important regulator of protein metabolism. Indeed, we recently showed that phospholipase D is able to activate both protein complexes involving mTOR kinase, mTORC1 and mTORC2, in L6 myoblasts [17]. A well-identified effector of mTORC1 that positively regulates protein translation is S6 kinase 1 (S6K1) [15]. We evaluated by Western blotting the phosphorylation of S6K1 on Thr389 residue, which reflects its activation state. Contrary to what expected, we observed that S6K1 phosphorylation was barely affected by TNF α alone. However, it was markedly increased by myriocin addition in the presence of TNF α (+80%). In the same conditions, total S6K1 protein was also elevated by 40% (Fig. 6b; right panel). This increase was paralleled by a 36% increase in S6K1 mRNA, as evaluated by RT-qPCR (Fig. 6b; left panel). It can thus be inferred that, in the presence of TNF α , ceramide synthesis inhibition affected protein synthesis by increasing both the expression and the phosphorylation of the mTORC1 effector S6K1. Akt kinase is a mTORC2 substrate that

plays a major role in the control of proteolysis [16]. We thus evaluated the phosphorylation of Akt on Ser473 residue, a readout of its activation state. Here again we unexpectedly observed that TNF α alone tended to have a positive effect (although not significant), rather than a negative one, on Akt phosphorylation. This positive effect was markedly amplified in the presence of either myriocin or GW4869, Akt activation being observed when phosphorylated Akt was related to tubulin amounts in the samples, as well as to total Akt protein (Fig. 6c). Thus, in the presence of TNF α , the activation of the mTORC2 substrate Akt is likely to participate in the decrease in proteolysis induced by ceramide synthesis inhibition. Altogether, these data indicated that in L6 myotubes PLD1 upregulation induced by ceramide synthesis inhibition in the presence of TNF α was correlated with the upregulation and activation of the well-known anabolic factors S6K1 and Akt.

Because TNF α is well known as an activator of the NF κ B pathway [2] that can activate protein catabolism [33], we further investigated the effect of ceramide synthesis inhibition by myriocin on the phosphorylation of IKK α/β , an essential step of NF κ B activation cascade [33]. We observed that TNF α treatment of L6 myotubes was able to rapidly induce IKK α/β phosphorylation, a maximum being reached in 30 min. Notably, myriocin treatment had no influence on this response, suggesting that sphingolipid metabolism was not involved in the activation of NF κ B pathway in our setting (Additional file 4).

In vivo inhibition of ceramide synthesis protects mice against tumor-induced muscle atrophy

The development of C26 tumors in the mice is known to induce a strong cachexia, characterized by a rapid loss of muscle mass [14]. Cancer-induced muscle wasting is thought to be related to strongly elevated circulating levels of pro-inflammatory cytokines, in particular TNF α [34]. To evaluate the protective potentialities of ceramide synthesis inhibition against muscle wasting, we treated C26-bearing mice with myriocin, that has been shown to be able to decrease muscle ceramide levels in vivo [8]. The development of C26 tumor induced after 10-15 days a rapid fall of animal weight, revealing the occurrence of cachexia. Tumor-induced muscle atrophy was assessed by measuring gastrocnemius and tibialis anterior weights, and the cross sectional area (CSA) of myofibers in these muscles. Under the effect of tumor growth, gastrocnemius and tibialis weights were decreased by 22% and 26%, respectively (Fig. 7a), and the mean CSA in these muscles were reduced by 45%

and 31%, respectively (Fig. 7b). Myriocin treatment neither had effects on the delay of cachexia onset, nor on tumor size (not shown). However, it tended to increase the weight of hindlimb skeletal muscles in the presence of tumor (+11%, significant for tibialis; Fig. 7a). In control mice, myriocin treatment had a small negative effect by itself on mean CSA in both muscles (-16%, significant in gastrocnemius, -10% non significant in tibialis), but in the presence of tumor myriocin treatment significantly counteracted CSA decrease (Fig. 7b). Considering the size distribution of myofibers in gastrocnemius, the presence of the tumor was clearly associated with the disappearance of the biggest fiber population, and myriocin restored the presence of large fibers at the expense of the small fiber population (Fig. 7c).

The atrophic effect of the tumor was also illustrated by a strong increase in the expression of Atrogin-1 and MurF1 atrogènes, and a significant increase in the expression of Foxo1 and 3 transcription factors, that are positive regulators of atrogène expression [16]. The treatment of tumor-bearing mice with myriocin significantly decreased the expression of Atrogin-1 and Foxo3 (Fig. 7d).

To evaluate whether ceramide levels were altered in muscle tissue in the different conditions, ceramide was quantified in tibialis of the same mice. In agreement with our assumption that ceramide is involved in atrophy, the tumor induced a marked increase in muscle ceramide level (+53%). Myriocin treatment of tumor-bearing mice lowered ceramide levels, although the difference did not reach statistical significance (Fig. 7e). In contrast, no significant variations of sphingomyelin levels were detected (not shown).

Altogether, these observations show that blocking de novo ceramide synthesis has an anti-atrophic effect in vivo in tumor-bearing mice.

Discussion

We observed that in vitro TNF α treatment was able to significantly decrease the surface of myotubes deriving from either the L6 or the C2C12 lines, this effect being reproduced by addition of cell-permeant ceramides. Furthermore, both TNF α and ceramide decreased creatine kinase activity and myosin heavy chain content of L6 myotubes. These observations suggested that the atrophic effects of TNF α on muscle cells might rely on the production of ceramide triggered by the cytokine. To verify this hypothesis, we used different ceramide synthesis inhibitors together with TNF α . Both a de novo pathway inhibitor (myriocin) and

sphingomyelinase inhibitors (GW4869 and OMS) were able to suppress the effects of TNF α on L6 myotube size, myosin heavy and light chain content, and creatine kinase activity, suggesting that ceramide formed by either of the pathways mediated the atrophic effects of TNF α . The effects of inhibitors of the two different ceramide synthesis pathways were not additive, suggesting that a mere reduction in ceramide formation, without a complete suppression, is enough to prevent cell atrophy. Alternatively, this could result from the overall depletion of sphingolipids induced by the blockade of de novo synthesis by myriocin [19], that potentially also reduced sphingomyelinase-mediated ceramide synthesis.

Sphingomyelinase inhibitors GW4869 and OMS also showed protective effects against TNF α -induced atrophy in C2C12 myotubes, thereby confirming the involvement of ceramide formed by sphingomyelinase activation. However, in this cell line, myriocin was devoid of protective effects and even showed by itself a negative effect on myotube size, contrary to what observed in L6 myotubes. An explanation could be that in the C2C12 line de novo sphingolipid synthesis has to be maintained above a certain threshold, so as to supply cells with a compound that can be either a structural component such as sphingomyelin or a glycosyl-ceramide, or a mediator such as S1P, and that would be essential to maintain cell homeostasis.

The quantification of sphingolipids established that TNF α markedly increased the ceramide content of L6 myotubes, in agreement with a role of this sphingolipid mediator in the atrophic response. Ceramide accumulation was accompanied by a substantial decrease in sphingomyelin cell content, showing that ceramide resulted, at least in part, from sphingomyelin hydrolysis. However, among the molecular species of ceramide formed under TNF α stimulation, the C18:0 species was rather important (its increase representing 6.2% of the sum of ceramide species in the control), whereas there was no parallel hydrolysis of C18:0-sphingomyelin (Table 1). It can thus be hypothesized that TNF α was able to induce de novo synthesis of C18:0-ceramide, and to produce other species, mainly C16:0- and C24:1-ceramides, via sphingomyelinase activation. Myriocin totally prevented the TNF α -induced rise in ceramide, and in parallel decreased sphingomyelin, supporting the above proposal that it was able to inhibit both de novo and sphingomyelinase pathways of ceramide synthesis. Similar to myriocin, the sphingomyelinase inhibitors were able to diminish TNF α -induced ceramide rise, although to a lesser extent. As expected, they significantly restored the sphingomyelin cellular content. On the whole, these data are compatible with the

interpretation that myotube atrophy induced by TNF α involved ceramide accumulation, and that the inhibitors counteracted TNF α effects by preventing ceramide synthesis.

Because ceramide can be rapidly metabolized and give rise to other mediators, among which S1P takes on a particular importance in cell physiology [5], we considered the possibility that this ceramide metabolite could interfere in the response of L6 myotubes to TNF α stimulation. We observed that S1P displayed a positive influence on myotube integrity, opposite to that of exogenous ceramide or TNF α . A lowering of S1P availability might thus participate in the negative effects of TNF α . Accordingly, these effects were not amplified by S1P receptor inhibition, suggesting that S1P levels were already lowered below effective concentrations by TNF α treatment. These observations are in agreement with the reported attenuation of denervation-induced soleus atrophy by S1P perfusion in the rat [35].

It is well known that muscle atrophy results from both decreased protein synthesis and accelerated proteolysis. In agreement with a pro-atrophic role of TNF α , we observed that the cytokine lowered protein synthesis and tended to increase proteolysis in L6 myotubes. These effects were reversed by ceramide synthesis inhibitors myriocin and OMS, indicating that ceramide is involved in the effects of TNF α on protein metabolism. Concerning the elements of the proteolytic machinery that are regulated by ceramide, we could observe that ceramide synthesis inhibition markedly lowered the expression of Atrogin-1 ubiquitin ligase that was elevated by TNF α . This atrogene playing a recognized role in the catabolism of muscle-specific proteins, at least part of TNF α /ceramide atrophic effects can be related to the modulation of this factor, and to the resulting decrease in eIF3f translation initiation factor levels. In addition, we observed that ceramide synthesis inhibitors significantly lowered the expression of LC3b, an essential component of the autophagic proteolytic system. The activation of autophagy by ceramide has already been described in other cell systems [13]. It is thus suggested that ceramide positively regulates both proteasome- and autophagy-dependent protein degradation in differentiated myotubes, possibly through coordinate changes in Foxo3 transcription factor phosphorylation. However, the transcriptional regulation of autophagy by ceramide in L6 myotubes remains speculative in view of the absence of effect of ceramide synthesis inhibitors on the expression of several other autophagy-related genes.

Protein homeostasis is, for a large part, under the control of signaling pathways the central elements of which are the kinases Akt and mTOR. These interconnected regulators integrate inputs from growth factors, nutrient availability, energy levels, so as to adapt protein

synthesis and degradation to the physiological status of the cell. Akt is a major inhibitor of proteolysis through the control of Foxo transcription factors, that in turn regulate the expression of ubiquitin ligases involved in the specific degradation of muscle proteins by proteasome [16]. mTOR kinase, in complex with the protein Raptor (mTORC1 complex) is indirectly activated by Akt, through phosphorylation of its inhibitor tuberous sclerosis complex (TSC) [15]. Activated mTORC1 is known to enhance protein translation, in particular through the activation of its substrate S6K1, and has been shown to be required for muscle hypertrophy [36]. mTORC1 is also a major negative regulator of autophagy [15]. Furthermore, mTOR also exists in complex with the protein Rictor to form mTORC2 complex, able to phosphorylate and activate Akt. Both mTOR complexes are stimulated by the phospholipid messenger phosphatidic acid [17,18], the product of the action of the signaling enzyme of cell membranes PLD. Moreover, the involvement of PLD in mTOR activation in response to exercise has been demonstrated, suggesting its role in muscle tissue hypertrophy [37].

Ceramide is considered a general inhibitor of PLD, acting at the catalytic site, on the recruitment of activator proteins, and also at the transcriptional level [38]. We previously showed that ceramide selectively inhibits the expression of the PLD1 isoform of the enzyme in L6 myoblasts [9]. In the present study, we observed that TNF α markedly decreased the expression of PLD1, and that ceramide synthesis inhibitors rescued its expression, suggesting that PLD1 is one major target of ceramide in the considered signaling network. Because PLD is an activator of both mTOR complexes, we then considered the influence of these inhibitors on the mTORC1 substrate S6K1, and the mTORC2 substrate Akt. Ceramide inhibition in the presence of TNF α increased the amounts of both S6K1 and Akt under the phosphorylated/activated state, possibly as a consequence of PLD1 upregulation. A discrepancy between PLD1 expression and S6K1 / Akt phosphorylation state was however apparent under the effect of TNF α alone, that down-regulated PLD1 without affecting, or even slightly enhancing, S6K1 and Akt phosphorylation. A possible explanation is that the pleiotropic cytokine TNF α may trigger other signaling pathways able to positively influence Akt and mTORC1, and thereby mask negative effects of ceramide on S6K1 and Akt. By raising these negative effects, ceramide synthesis inhibition would allow further activation of these mTOR effectors. Inhibition of TNF α -induced ceramide accumulation could thus have positive trophic effects on muscle cells through, at least in part, the up-regulation of PLD1 and the resulting activation of S6K1 and Akt, that respectively enhance protein synthesis and

reduce proteolysis. It remains that TNF α by itself altered protein synthesis without having significant effects on S6K1 and Akt, which requires to hypothesize that the cytokine triggered other undefined mTOR-independent pathways, that negatively influenced proteosynthesis. Another mechanism by which ceramide synthesis inhibition might result in Akt stimulation and positive effects on myocyte size is related to the recognized ability of ceramide to hamper insulin/IGF signaling in muscle tissue [6,39]. Myriocin has thus been shown to decrease muscle ceramide levels and insulin resistance in mice placed on high fat diet [7,8]. Because IGFs are involved in trophic effects on muscle tissue [40], it could be suspected that in our study myriocin acted on myocyte size, both in vitro and in vivo, through the enhancement of signaling by endogenously produced IGF, and downstream Akt activation. However, we observed no changes in IRS-1 tyrosine phosphorylation under TNF α and myriocin treatments of L6 myotubes (not shown), which makes a role for IGF signaling in the effects of myriocin very unlikely. In addition, our in vitro results suggest that myriocin does not modulate proteolysis by targeting the NF κ B pathway, and thus that this pathway is not regulated by ceramide in muscle cells.

Finally, our study addressed the in vivo role of ceramide in a model of tumor-induced cachexia. The development of C26 adenocarcinoma induced a marked increase in mouse muscle ceramide levels, together with a severe atrophy. At a low dose of 0.1 mg/kg, myriocin significantly limited muscle loss, expression of some atrogenes, and reduction of myocyte size, confirming that ceramide accumulation participated in enhanced proteolysis and muscle atrophy. As for the small negative effect of myriocin alone on myocyte size, similarly to what hypothesized for C2C12 cells, it might be attributed to a lowered supply in sphingolipid(s) involved in the maintenance of muscle tissue homeostasis.

Conclusions

This study establishes that inhibition of ceramide synthesis has beneficial effects on myocyte size in conditions inducing muscle atrophy. The sphingolipid pathway thus appears as a possible target of interventions aiming at protecting muscle tissue against wasting that occurs in various pathological situations, in particular during cancer-induced cachexia. The therapeutic potentialities of inhibitors of de novo ceramide synthesis and sphingomyelinases thus deserve further investigations. In addition, because ceramide synthesis depends on cell availability in palmitic acid, and can be altered by the composition of fatty acid dietary intake

[41,42], it can be of interest to consider nutritional interventions targeting the sphingolipid pathway in the treatment of muscle atrophy.

Methods

Materials

ECL immunodetection reagent was from Pierce. Bradford protein assay was from Bio-Rad (Marnes-La-Coquette, France). TMB substrate, Arginine-vasopressin (AVP), Myriocin, GW4869 and myosin heavy chain were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle-d'abeau, France). Sphingosine-1-phosphate, DL-Threo-Dihydro-sphingosine, 3-O-Methyl-sphingomyelin (OMS) were obtained from Enzo Life Sciences (Paris, France). Recombinant rat TNF α was from Immunotools (Friesoythe, Germany). C6-ceramide and N, N-Dimethylsphingosine were from Biomol Research Labs. FTY 720 was from Cayman Chemical Company. Anti-phospho-Thr389/Thr412-S6K1 antibody, anti-S6K1 antibody, anti-phospho-Ser473-Akt antibody, anti-Akt antibody, anti-phospho-Ser176/180-IKK α/β and anti-PLD1 polyclonal antibody were from Cell Signaling Technology. Anti-eIF3f antibody was from Rockland (Gilbertsville, PA, USA). Anti-Foxo3 and anti-phospho-Ser253-Foxo3 antibodies were from Millipore. Anti- α -Tubulin monoclonal antibody was supplied by Sigma. Anti-PLD1 monoclonal antibody H00005337-M02 was from Abnova. Anti-myosin light chain 1 and 3 monoclonal F310 antibody and anti-sarcomeric myosin heavy chain MF-20 antibody were from Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa (Iowa City, US). PureProteome Protein G Magnetic Beads kit was from Millipore. [3 H]-L-Tyrosine was purchased from Perkin-Elmer. HRP-conjugated anti-mouse- and anti-rabbit-IgG antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Soham, UK). Creatine kinase CK – NAC LD B kinetic assay was purchased from Sobioda (Montbonnot-St Martin, France).

Cell culture

L6 myoblasts of the C5 subclone were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4.5 g/l glucose, supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum at 37°C and 5% CO $_2$. To induce differentiation, cells were seeded at a density of 5.10 5 cells per well in 6-well plates, in DMEM supplemented with 1% fetal bovine serum and 10 $^{-7}$ M AVP, and cultured for 5 days. Myotubes obtained were then treated with 15 ng/mL recombinant rat TNF α for 3 days to induce atrophy, in the presence or absence of sphingolipid synthesis

inhibitors. The effect of TNF α on cell viability was determined by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay (Roche Diagnostics, Meylan, France) in 96-well plates. At the end of TNF α treatment of differentiated myotubes, they were supplemented with 0.5 mg/mL MTT for 4 h at 37°C. After this incubation period, purple formazan salt crystals formed were dissolved in solubilization solution overnight. Optical density was measured at 550 and 690 nm, using an ELISA plate reader (PowerWave X, Biotek Instruments, Winooski, USA). The number of viable cells was directly correlated to the difference between 550 and 690 nm absorbances.

Electrophoresis and Western blotting

Cells were lysed in ice-cold buffer containing 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM glycerophosphate, 50 mM NaF, 1.5 mM Na₃VO₄, 1% Triton and protease inhibitor cocktail (pH 7.6). Lysates were kept on ice during 15 minutes and cleared by centrifugation at 13,000g for 15 minutes. Bradford protein assay was performed on an aliquote. Cell lysates were analyzed by SDS-PAGE, and proteins were transferred onto PVDF membranes blocked with 5% BSA in Tris-buffered saline/0.1% Tween 20, and incubated with various antibodies following manufacturers' recommendations. Immunoblots were revealed with ECL detection system (Pierce) and quantified with Image J software. SDS-PAGE was performed using 10% polyacrylamide gels for S6K1, Akt and IKK α/β , and 12% polyacrylamide gels for myosin light chains. In the case of PLD1, the protein was immunoprecipitated prior to electrophoresis. The cell lysate was incubated with capture polyclonal anti-PLD1 antibody (Cell Signaling Technology) overnight at 4°C with continuous mixing. 50 μ L of Protein G magnetic beads (Millipore) pre-washed with PBS containing 0.1% Tween 20 were added to the preformed antibody-antigen complex, and the suspension was incubated for 30 min at 4°C. The beads were collected with a magnet, washed in PBS 0.1% Tween, and the elution was performed with Laemmli buffer 1:3 in lysis buffer. The eluate was heated at 70-90°C for precisely 2 min (to prevent PLD1 aggregation known to occur in overheating conditions). Samples were subjected to SDS-PAGE on 8% acrylamide gels, in the presence of 4 M urea. Following transfer to PVDF membrane, Western blotting was performed with monoclonal anti-PLD1 antibody (Abnova) diluted 1:500 in TBS/0.1% tween 20.

Measurement of sphingolipid levels

Sphingolipids were extracted by the Bligh and Dyer method [43]. Muscle tissue was homogenized in chloroform/methanol (1:2, v/v) using 1 mL of solvent for 10 mg of wet tissue, in a Precellys 24 homogenizer (Bertin Technologies). Myotubes were scraped in 500 µL 0.1N HCl in phosphate-buffered saline (PBS), and 2 mL chloroform/methanol (1:2, v/v) were added. An aliquote of the mixture was kept for Bradford protein assay. Internal deuterium-labelled standards were added at this step: C16:0 D31 ceramide (N-palmitoyl(d31)-D-erythro-sphingosine), and C16:0 D31 sphingomyelin (N-palmitoyl(d31)-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine) (Avanti Polar Lipids). The samples were vortexed for 30 sec, sonicated, and let to stand for 30 min at room temperature. One volume of water and one volume of chloroform were added to perform phase separation. The samples were then vortexed again for 1 min prior to centrifugation at 2500 rpm for 5 min. The lower organic phase was transferred to a clean collection tube and was evaporated under a nitrogen stream at 37°C. Dry extracts were kept at -20°C until analysis by tandem mass spectrometry. Electrospray tandem mass spectrometry (ESI MS/MS) was carried out on an API 3200 MS/MS triple quadrupole mass spectrometer (Sciex Applied Biosystems, Toronto, Canada) equipped with a TurboIonSpray source heated at 500°C. Two binary pumps, a vacuum degasser and a high performance autosampler controlled by an Instant Pilot, used for solvent delivery and automated sample introduction, were of the Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Massy, France). All results were acquired with the Analyst version 1.5 software (Sciex Applied Biosystems). For the measurement of sphingomyelin, the MS/MS was performed in negative ionization mode. Specific parameters used were as follows: ion spray voltage: - 4500 V ; entrance potential: - 9.5 V; declustering potential: -120 V; collision energy: -100 eV. For the measurement of ceramide, the MS/MS was performed in positive ionization mode. Specific parameters used were as follows (in arbitrary units): ion spray voltage: + 5500 V ; entrance potential: - 10 V; declustering potential: 100 V; collision energy: 40 eV. Sample analysis for quantification was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode by flow injection analysis. Specific MRMs corresponding to each ceramide or sphingomyelin species and to the corresponding internal standard are listed in Additional file 5. The dwell time was fixed to 30 ms for each species. Sphingomyelin and ceramide were measured separately, with two different acquisition methods and two different injections (20 µl and 5 µl, respectively), with a flow rate of 200 µl/min chloroform:methanol (2:1) (analysis time of 3 min). The concentration of each molecular species was calculated from the ratio of its signal versus that of the corresponding internal standard. Total ceramide and sphingomyelin concentrations were the sum of the concentrations of the various species.

Measurement of the area of immunofluorescence-labelled myotubes

The differentiated myotubes were fixed with 3.7% formaldehyde for 20 minutes at room temperature, permeabilized with 0.1% Triton for 10 minutes at room temperature, and aspecific labeling was blocked with 1% BSA for 20 minutes. Anti-Myosin MF-20 antibody was added diluted 1:50 and incubated 1 h at room temperature. After washing by 1% BSA in PBS, rhodamine-conjugated anti-mouse IgG antibody was added diluted 1:500 in 1% BSA for 1 hour at room temperature. Nuclei were stained with 1 $\mu\text{g/mL}$ 4,5-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 3 minutes. The cells were examined by immunofluorescence microscopy with an Axiovert 200 microscope, an objective LD-A plan 20x/0.30 PHI $\infty/40$, an axiocam MRm camera and Axiovision 4.1 image acquisition software (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Differentiated myotubes, but not myoblasts, were evenly labelled on their entire surface. Their area was measured by the method of Sultan et al [44], using Image J software.

Assay of Creatine kinase activity

Cells were seeded at a density of $5 \cdot 10^5$ cells per well in 6 well-plates and scraped with 500 μL of ice-cold lysis buffer. The assay was performed by using Creatine kinase CK – NAC LD B kit from Sobioda, which allows to monitor at 340 nm the kinetics of formation of NADPH, produced by an enzymatic cascade initiated by creatine kinase. The assay was performed in 96-well plates, with 4 μL of sample per well, for 20 minutes at 30°C .

ELISA of Myosin Heavy Chain

The cells were grown in 12 well-plates at a density of $3 \cdot 10^4$ cells per cm^2 . After completion of differentiation and 3 days of treatment with $\text{TNF}\alpha$ and various sphingolipid synthesis inhibitors, they were scraped in 300 μL ice-cold RIPA buffer, vortexed and centrifuged at 10,000g for 10 minutes. The assay was carried out in 96-well plates. 50 μL of sample were evaporated to dryness overnight at 37°C. The wells were washed twice with cold PBS. All washing steps were performed using an automatic plate washer (ELx50 Autostrip Washer from Bio-Tek Instruments, Inc.). Aspecific binding sites were saturated with 100 μL of 0.1% BSA in PBS for 30 minutes at 37°C. Samples were then incubated with 50 μL MF-20 antibody diluted 1:100 in PBS, for 1 hour at 37°C. After a new washing step, incubation with 50 μL of secondary HRP-conjugated anti-mouse antibody diluted 1:3000 was performed for 1 hour at 37°C. Plates were washed 5 times, 50 μL of TMB substrate were added in each well,

and 0.5 N H₂SO₄ was added after 5min to stop color reaction. Optical Density was read at 450 nm. A standard curve was obtained with purified myosin heavy chain.

Measurement of protein synthesis

Protein synthesis rates were assayed according to Gulve and Dice [45], with some modifications. Myotubes were treated for 12 h by TNF α and various inhibitors. Culture medium was then replaced by experimental medium containing 2 μ Ci/mL of [³H]-L-Tyrosine and non-radioactive tyrosine up to 2 mM, for 1 hour. Culture monolayer was washed five times with ice-cold PBS. Cells were scraped in 10% trichloroacetic acid (TCA) on ice, vortexed and centrifuged at 12,000g for 10 min to separate pellet containing labelled neosynthesized proteins from supernatant, containing the pool of non-incorporated [³H]-L-Tyrosine. Pellet was then dissolved in cell lysis buffer and neutralized by 1M NaOH. An aliquote was taken for Bradford protein analysis. Determination of radioactivity was performed in a Packard liquid-scintillation spectrometer.

Measurement of protein degradation

Rates of protein degradation were determined by monitoring the release of TCA-soluble radioactivity in the culture medium at defined time, after radiolabelling proteins with [³H]-L-Tyrosine. Long-lived proteins were radiolabelled by incubating the cells with 2 μ Ci/mL of [³H]-L-Tyrosine in differentiating conditions for 2 days, until completion of differentiation. Cells were rinsed 3 times with PBS and shifted for 2 h in chase medium (DMEM 1% fetal bovine serum and non-radioactive tyrosine to prevent reincorporation of [³H]-L-Tyrosine) to allow degradation of short-lived proteins. Cells were washed again, and the medium replaced. At 12 h, samples (0.5mL) of the culture medium were taken and supplemented with 10% (w/v) TCA. After standing at 4°C for 1 h, samples were spun at 12,000g for 10 min, which allowed to separate the pellet of precipitated proteins from the free amino-acids resulting from protein degradation. The pellet was dissolved with 0.5mL lysis buffer and neutralized with 1M NaOH. The monolayer was washed 3 times with PBS and scraped with lysis buffer to determine cell-associated radioactivity. Proteolysis was evaluated as the percentage of TCA-soluble radioactivity released in the medium reported to total incorporated radioactivity.

Reverse transcription and real-time PCR

Total RNA was isolated from L6 myotubes using Trizol Reagent (Invitrogen). 1 μ g of total RNA was used for reverse transcription, in the presence of 100 U Superscript II, random

hexamers and oligo dT. Real-time PCR was performed with Fast Start DNA Master Sybr green kit using Rotor-Gene 6000 (Corbett research, Mortlake, Australia). Data were analyzed with LightCycler software (Roche Diagnostics) and normalized either to TATA box binding protein (TBP), or to Cyclophilin A housekeeping gene transcripts. Specific sense and antisense primers used for amplification were:

PLD1 sense: GGTCAGAAAGATAACCCAGG, PLD1 anti-sense:

GAAGCGAGACAGCGAAATGG; Atrogin-1 sense: CTCTGCCAGTACCACTTCTC,

Atrogin-1 anti-sense: ATGGTCAGTGCCCTCCAGG; LC3b sense:

CTGGACAAGACCAAGTTCCT, LC3b anti-sense: AAGCCGTCTTCATCTCTCTC; S6K1

sense: AGAGCACCTGCGTATGAATC, S6K1 anti-sense:

CACTGACTCTTTGAGACTGCC; Murf1 sense: TGCATCTCCATGCTGGTGGC, Murf1

anti-sense: CTTCTTCTCGTCCAGGATGG; Foxo1a sense:

AGATCTACGAGTGGATGGTG, Foxo1a anti-sense:

GGACAGATTGTGGCGAATTG; Foxo3a sense: GAGAGCAGATTTGGCAAAGG, Foxo3a

anti-sense: CCTCATCTCCACACAGAACG; TBP sense: TGGTGTGCACAGGAGCCAAG,

TBP anti-sense: TTCACATCACAGCTCCCCAC; Cyclophilin A sense:

ATGGCACTGGTGGCAAGTCC, Cyclophilin A anti-sense:

TTGCCATTCCTGGACCCAAA

In vivo experiments

6 week-old male BALB/c mice were obtained from Charles River Italia. Animals were housed in the animal facility under conventional conditions with constant temperature and humidity, and fed a standard diet. Tumor implantation was performed using cubic pieces of approx. 1 mm³ of solid C26 tumor kept in liquid nitrogen. Tumor pieces were injected, with a trocar needle, under the dorsal skin of mice anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg). Control mice were injected only with saline. The animals were weighted every day. Starting from day 8, mice displayed a palpable tumor. Half of control mice, and half of mice with tumors were injected intraperitoneally with a 2 mg/ml Myriocin solution in 0.5% methanol, at 0.1 mg/kg. Control mice received 0.5% methanol in saline. Myriocin was injected until the day of sacrifice. When the tumor-injected mice had lost 3g of weight, they were sacrificed by cervical dislocation. At the same time, a matched control was sacrificed (tumor-uninjected, same dose of Myriocin). The tumor-injected mice and matched controls were sacrificed between days 13 and 17. The tibialis and gastrocnemius muscles were dissected from both hind-limbs, weighted and frozen in liquid N₂-cooled isopentane and

stored at -80°C for either histological or molecular analyses. Muscle sections (10 µm) were cut in a cryostat microtome, and stained with Hematoxylin-Eosin. Fiber cross sectional areas (500 fibers per muscle) were measured by using NIH ImageJ software.

Mice were treated in strict accordance to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee and to relevant national and European legislation, throughout the experiments.

Statistical analyses

The statistical significance of data was assessed by ANOVA and Fisher test, using StatView software.

List of abbreviations

CSA, cross sectional area ; IGF, insulin-like growth factor ; MHC, myosin heavy chain ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; OMS, 3-O-methylsphingomyelin ; PLD, phospholipase D ; S1P, sphingosine-1-phosphate ; TNF α , tumor necrosis factor alpha.

Author's contributions

JDL and AZ performed most of the experiments, and analyzed the data. FS and AMI contributed to the *in vivo* experiments. KD contributed to the studies of protein metabolism. MD contributed to the study of autophagy regulation. MP and DC supervised the analyses of sphingolipids. GN designed the research, analyzed the data, and wrote the article. FN, HV and EL participated in the coordination of the study and critically revised the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Aknowleldgements

This work was supported by a grant from the Association Française contre les Myopathies (MNM2 2007), and by a grant from the Cancéropôle Lyon Rhône-Alpes (Procan Axe III 2010). JDL and KD are recipients of PhD fellowships from the French Ministry of Higher Education. AZ is a PhD student involved in a cotutelle program between INSA-Lyon and Rome-La Sapienza University.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Reid MB, Li YP. **Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective.** *Respiratory Res* 2001, **2**:269-272
2. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. **Tumor necrosis factor signaling.** *Cell Death Differ* 2003, **10**:45-65
3. Pettus BJ, Bielawski J, Porcelli AM, Reames DL, Johnson KR, Morrow J, Chalfant CE, Obeid LM, Hannun YA. **The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha.** *Faseb J* 2003, **17**:1411-1421
4. Hannun YA, Luberto C. **Ceramide in the eukaryotic stress response.** *Trends Cell Biol* 2000, **10**:73-80
5. Spiegel S, Milstien S. **Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid.** *Nature RevMol Cell Biol* 2003, **4**:397-407
6. Summers SA. **Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity.** *Progress Lipid Res* 2006, **45**:42-72
7. Frangioudakis G, Garrard J, Raddatz K, Nadler JL, Mitchell TW, Schmitz-Peiffer C. **Saturated- and n-6 polyunsaturated-fat diets each induce ceramide accumulation in mouse skeletal muscle: reversal and improvement of glucose tolerance by lipid metabolism inhibitors.** *Endocrinol* 2010, **151**:4187-4196
8. Ussher JR, Koves TR, Cadete VJ, Zhang L, Jaswal JS, Swyrd SJ, Lopaschuk DG, Proctor SD, Keung W, Muoio DM, Lopaschuk GD. **Inhibition of de novo ceramide**

- synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption.** *Diabetes* 2010, **59**:2453-2464
9. Mebarek S, Komati H, Naro F, Zeiller C, Alvisi M, Lagarde M, Prigent AF, Nemoz G. **Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation.** *J Cell Sci* 2007, **120**:407-416
 10. Hyde R, Hajdуч E, Powell DJ, Taylor PM, Hundal HS. **Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells.** *FASEB J* 2005, **19**:461-463
 11. Wu D, Ren Z, Pae M, Guo W, Cui X, Merrill AH, Meydani SN. **Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue.** *J Immunol* 2007, **179**:4829-4839
 12. Guenther GG, Edinger AL. **A new take on ceramide: starving cells by cutting off the nutrient supply.** *Cell Cycle* 2009, **8**:1122-1126
 13. Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, Ghidoni R, Codogno P. **Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1.** *J Biol Chem* 2004, **279**:18384-18391
 14. Aulino P, Berardi E, Cardillo VM, Rizzuto E, Perniconi B, Ramina C, Padula F, Spugnini EP, Baldi A, Faiola F, Adamo S, Coletti D. **Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse.** *BMC Cancer* 2010, **10**:363
 15. Laplante M, Sabatini DM. **mTOR signaling at a glance.** *J Cell Sci* 2009, **122**:3589-3594
 16. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ. **The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors.** *Mol Cell* 2004, **14**:395-403
 17. Jaafar R, Zeiller C, Pirola L, Di Grazia A, Naro F, Vidal H, Lefai E, Nemoz G. **Phospholipase D regulates myogenic differentiation through the activation of both mtorc1 and mTORC2 complexes.** *J Biol Chem* 2011, **286**: 22609-22621
 18. Toschi A, Lee E, Xu L, Garcia A, Gadir N, Foster DA. **Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin.** *Mol Cell Biol* 2009, **29**:1411-1420

19. Hojjati MR, Li Z, Zhou H, Tang S, Huan C, Ooi E, Lu S, Jiang XC. **Effect of myriocin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in apoE-deficient mice.** *J Biol Chem* 2005, **280**:10284-10289
20. Dehoux M, Gobier C, Lause P, Bertrand L, Ketelslegers JM, Thissen JP. **IGF-I does not prevent myotube atrophy caused by proinflammatory cytokines despite activation of Akt/Foxo and GSK-3beta pathways and inhibition of atrogenin-1 mRNA.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, **292**:E145-150
21. Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, Kawasaki T. **Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **211**:396-403
22. Luberto C, Hassler DF, Signorelli P, Okamoto Y, Sawai H, Boros E, Hazen-Martin DJ, Obeid LM, Hannun YA, Smith GK. **Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase.** *J Biol Chem* 2002, **277**:41128-41139
23. Lister MD, Ruan ZS, Bittman R. **Interaction of sphingomyelinase with sphingomyelin analogs modified at the C-1 and C-3 positions of the sphingosine backbone.** *Biochim Biophys Acta* 1995, **1256**:25-30
24. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. **"Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets.** *Pharmacol Rev* 2008, **60**:181-195
25. Meacci E, Cencetti F, Donati C, Nuti F, Farnararo M, Kohno T, Igarashi Y, Bruni P. **Down-regulation of EDG5/S1P2 during myogenic differentiation results in the specific uncoupling of sphingosine 1-phosphate signalling to phospholipase D.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1633**:133-142
26. Graler MH, Goetzl EJ. **The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors.** *FASEB J* 2004, **18**:551-553
27. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. **Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy.** *Science* 2001, **294**:1704-1708
28. Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT, Leibovitch SA. **The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogenin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy.** *EMBO J* 2008, **27**:1266-1276

29. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. **FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells.** *Cell Metab* 2007, **6**:472-483
30. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. **LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.** *EMBO J* 2000, **19**:5720-5728
31. Nakashima S, Nozawa Y. **Possible role of phospholipase D in cellular differentiation and apoptosis.** *Chem Phys Lipids* 1999, **98**:153-164
32. Bentzinger CF, Romanino K, Cloetta D, Lin S, Mascarenhas JB, Oliveri F, Xia J, Casanova E, Costa CF, Brink M, Zorzato F, Hall MN, Ruedg MA. **Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy.** *Cell Metab* 2008, **8**:411-424
33. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE. **IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice.** *Cell* 2004, **119**:285-298
34. Saini A, Al-Shanti N, Stewart CE. **Waste management - cytokines, growth factors and cachexia.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, **17**:475-486
35. Zanin M, Germinario E, Dalla Libera L, Sandona D, Sabbadini RA, Betto R, Danieli-Betto D. **Trophic action of sphingosine 1-phosphate in denervated rat soleus muscle.** *Am J Physiol* 2008, **294**:C36-46
36. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. **Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo.** *Nature Cell Biol* 2001, **3**:1014-1019
37. O'Neil TK, Duffy LR, Frey JW, Hornberger TA. **The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions.** *J Physiol* 2009, **587**:3691-3701
38. Venable ME, Obeid LM. **Phospholipase D in cellular senescence.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1439**:291-298
39. Strle K, Broussard SR, McCusker RH, Shen WH, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. **Proinflammatory cytokine impairment of insulin-like growth factor I-induced protein synthesis in skeletal muscle myoblasts requires ceramide.** *Endocrinol* 2004, **145**:4592-4602

40. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. **Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways.** *Nature Cell Biol* 2001, **3**:1009-1013
41. Blachnio-Zabielska A, Baranowski M, Zabielski P, Gorski J. **Effect of high fat diet enriched with unsaturated and diet rich in saturated fatty acids on sphingolipid metabolism in rat skeletal muscle.** *J Cell Physiol* 2010, **225**:786-791
42. Deevska GM, Nikolova-Karakashian MN. **The twists and turns of sphingolipid pathway in glucose regulation.** *Biochimie* 2010, **93**:32-38
43. Bligh EG, Dyer WJ. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can J Biochem Physiol* 1959, **37**:911-917
44. Sultan KR, Henkel B, Terlou M, Haagsman HP. **Quantification of hormone-induced atrophy of large myotubes from C2C12 and L6 cells: atrophy-inducible and atrophy-resistant C2C12 myotubes.** *Am J Physiol* 2006, **290**:C650-659
45. Gulve EA, Dice JF. **Regulation of protein synthesis and degradation in L8 myotubes. Effects of serum, insulin and insulin-like growth factors.** *Biochem J* 1989, **260**:377-387

Legends of the figures

Figure 1 - Effects of TNF α and exogenous ceramide on L6 myotube characteristics.

A, Differentiated myotubes treated for 3 days by 15 ng/ml TNF α or 5 μ M C6-ceramide were immunostained for sarcomeric myosin heavy chain (MHC), and their surface was evaluated by using Image J software. The graph shows the mean myotube area \pm SE, expressed in percent of the field surface, as determined in 10 fields, and is representative of at least 3 experiments. **: different from control, $p=0.01$; ***: $p=0.001$.

B, The MHC content of myotubes treated for 3 consecutive days by TNF α or C6-ceramide at the indicated concentrations, was evaluated by ELISA. The means \pm SE of 3 measurements expressed as percent of control values are shown. The mean control value was: 75 ± 11 μ g of MHC per 120,000 cells. *: different from control, $p<0.05$; ¶: $p\leq 0.001$.

C, Creatine kinase activity of myotubes treated for 3 days by 15 ng/ml TNF α or 5 μ M C6-ceramide was assayed in triplicate (means \pm SE). *: different from control, $p<0.05$.

Figure 2 - The negative effects of TNF α on L6 myotubes are counteracted by ceramide synthesis inhibition.

A, Myotube area was measured after 3 days in the presence or absence of 15 ng/ml TNF α , with the addition of 100 nM myriocin, or 10 μ M GW4869, or 1 μ M 3-0-methylsphingomyelin (OMS), or both myriocin and GW4869 or OMS. Shown are the means \pm SE of 5 to 9 experiments with 10 fields considered in each condition. ***: different from all the other conditions, $p\leq 0.001$.

B, ELISA quantification of the MHC content of myotubes treated for 3 days by 15 ng/ml TNF α , with or without 100 nM myriocin. The means \pm SE of 3 measurements expressed as percent of control values are shown. ***: different from the other conditions, $p\leq 0.005$.

C, Western blot analysis of myosin light chains 1 and 3 (MLC1, MLC3) from myotubes treated for 3 days by 15 ng/ml TNF α , with or without 100 nM myriocin. The diagram shows the quantification of MLC1 and MLC3 levels, after normalization by tubulin levels. Shown are the means \pm SE of 3 determinations. **: different from control and from TNF α , $p\leq 0.002$; *: different from control, $p\leq 0.05$.

D, Creatine kinase activity of myotubes treated or not by TNF α , in the presence of 100 nM myriocin, or 10 μ M GW4869, or 1 μ M OMS, or both myriocin and GW4869 or OMS. Shown are the means \pm SE of 3 determinations made in triplicate. ***: different from all the other conditions, $p\leq 0.001$.

Figure 3 - Inhibitors of ceramide synthesis modulate TNF α effects on myotube sphingolipid content.

A, Total ceramide levels were determined in myotubes treated for 3 days by TNF α , without or with 100 nM myriocin, or 10 μ M GW4869, or 1 μ M OMS. Results are expressed in percent of control value. They are the means \pm SE of 3 to 5 determinations. ++: different from control, $p=0.02$. *: different from TNF α alone, $p=0.05$; **: $p=0.02$; ***: $p< 0.001$. Mean \pm SE control value is 14.7 ± 3.4 pmoles ceramide/ μ g proteins.

B, Total sphingomyelin levels were determined in myotubes treated for 3 days by TNF α , without or with 100 nM myriocin, or 10 μ M GW4869, or 1 μ M OMS. Results are expressed in percent of control value. They are the means \pm SE of 3 to 5 determinations. ++: different from control, $p=0.002$; +++: $p<0.001$. *: different from TNF α alone, $p=0.05$; **: $p=0.02$. Mean \pm SE control value is 118.8 ± 17.2 pmoles sphingomyelin/ μ g proteins.

Figure 4 - S1P interferes with trophic effects of TNF α in L6 myotubes.

A, Myotube area was measured after 3 days of treatment with or without 15 ng/ml TNF α , in the presence of 1 μ M exogenous S1P, or 1 μ M inhibitor of S1P receptors FTY720. Shown are the means \pm SE of 10 fields. +++: different from control without drug, $p < 0.0001$. **: different from TNF α alone, $p = 0.004$.

B, Creatine kinase activity of myotubes treated for 3 days by TNF α , without or with 1 μ M exogenous S1P, or 1 μ M FTY720, or 10 μ M sphingosine kinase inhibitor dihydrosphingosine (DHS). Shown are the means \pm SE of 3 to 7 experiments performed in triplicate. +++: different from control, $p < 0.003$. **: different from TNF α alone, $p < 0.01$; *: $p < 0.05$.

C, Myotube area was measured after 3 days of treatment by 5 μ M C6-ceramide, without or with 1 μ M S1P or 10 μ M sphingosine kinase inhibitor dimethylsphingosine (DMS). Shown are the means \pm SE of 10 fields. ***: different from C6-ceramide alone, $p < 0.005$.

Figure 5 - TNF α effects on protein metabolism in L6 myotubes are prevented by ceramide synthesis inhibition.

A, Myotubes were treated for 12 h by TNF α , in the presence or absence of 100 nM myriocin, or 1 μ M OMS. The rate of protein synthesis was measured by adding [3 H]-tyrosine to culture medium, and counting the radio-activity present in trichloroacetic acid (TCA) precipitates of the cells, reported to the total protein content. The results are the means \pm SE of 3 determinations. ++: different from control, $p = 0.001$. *: different from TNF α alone, $p \leq 0.05$.

B, Proteolysis was measured in L6 myotubes labelled with [3 H]-tyrosine for 48 h, and treated for 12 h by TNF α in the presence or absence of 100 nM myriocin, or 1 μ M OMS, or both. TCA-soluble radio-activity released in the medium was measured and reported to the total incorporated radio-activity. The results are the means \pm SE of 3 determinations. *: different from TNF α alone, $p < 0.05$.

C, The mRNA levels of Atrogin-1 and LC3b were measured by RT-qPCR in myotubes treated or not by TNF α , in the presence of 100 nM myriocin, or 10 μ M GW4869, or 1 μ M OMS, and normalized by TATA box binding protein mRNA. Results are the means \pm SE of 3 to 5 measurements in duplicate. **: different from control without drug, $p = 0.01$. +++: different from TNF α alone, $p \leq 0.001$, +: $p < 0.05$.

D, Myotubes were treated for 3 days with or without TNF α , in the presence of 100 nM myriocin. Phospho- Ser253 Foxo3 in cell extracts was analyzed by Western blotting. Results were normalized by total Foxo3 protein amounts. *: different from all other values, $p < 0.02$.

Figure 6 - Inhibitors of ceramide synthesis up-regulate anti-atrophic signaling pathways.

A, Myotubes were treated for 3 days with or without TNF α , in the presence of 100 nM myriocin, or 10 μ M GW4869, or both. Left panel: PLD1 mRNA levels were measured by RT-qPCR, and normalized by TATA box binding protein mRNA. Results are the means \pm SE of 3 to 6 measurements in duplicate. *: different from TNF α alone, $p = 0.05$; ** $p < 0.001$. ¶: different from control, $p \leq 0.05$. Right panel: PLD1 protein in cell extracts was analyzed by Western blotting. Results were normalized by tubulin amounts. They are the means \pm SE of 3 experiments. **: different from control, $p < 0.01$. +: different from TNF alone, $p = 0.02$.

B, Myotubes were treated for 3 days with or without TNF α , in the presence of 100 nM myriocin. Left panel: S6K1 mRNA levels were measured by RT-qPCR, and normalized by TATA box binding protein mRNA. Results are the means \pm SE of 3 measurements in duplicate. **: different from both control and TNF α alone, $p < 0.01$. Right panel: total S6K1 protein, and Phospho- Thr389 S6K1 in cell extracts were analyzed by Western blotting. Results were normalized by tubulin amounts. They are the means \pm SE of $n \geq 3$ determinations.

+: different from control, $p < 0.05$; ++: $p < 0.02$. **: different from both control and TNF alone, $p < 0.02$.

C, Myotubes were treated for 3 days with or without TNF α , in the presence of 100 nM myriocin, or 10 μ M GW4869. Ph-Ser473 Akt was analyzed by Western blotting. Left panel: results were normalized by tubulin amounts. Right panel: results were normalized by total Akt amounts. They are the means \pm SE of 3 to 5 determinations. NS: not significantly different from control. ***: different from TNF α , $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$.

Figure 7 - Myriocin protects muscle tissue from tumor-induced atrophy.

A, Mice were or not inoculated with C26 adenocarcinoma, and were or not injected daily with 0.1 mg/kg myriocin. Gastrocnemius and tibialis muscles were dissected and weighted (means \pm SE of $n=5$ to 7 for gastrocnemius; 7 to 10 for tibialis). +++: different from control, $p < 0.0001$. *: different from "tumor", $p=0.05$.

B, Mean cross sectional area (CSA) of myofibers was evaluated on transverse sections of gastrocnemius and tibialis muscles (means \pm SE of $n=4$ for gastrocnemius, 7 for tibialis). +++: different from control, $p < 0.0001$; ++: $p < 0.01$. ***: different from "tumor", $p=0.0002$; *: $p=0.05$.

C, Frequency distribution of myofiber CSA in gastrocnemius (means \pm SE of $n=4$). ¶: "tumor" different from "tumor+myriocin", $p < 0.002$; +: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$.

D, mRNA expression of atrophy-related genes in gastrocnemius was evaluated by RT-qPCR, and normalized by Cyclophilin A mRNA. Results are the means \pm SE of 4 determinations in duplicate. *: different from control, $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. ¶: different from "tumor", $p < 0.05$.

E, total ceramide levels were measured in the tibialis of the differently treated mice (means \pm SE, $n=4$).

Tables

Table 1 - Effect of TNF α treatment on ceramide and sphingomyelin content of L6 myotubes.

Means \pm SE of 5 measurements. The TNF α -induced change in one particular molecular species, expressed in percent of the sum of all molecular species in the control is given in the right column.

Additional files

Additional file 1 - Both TNF α and ceramide induce the atrophy of C2C12 myotubes.

C2C12 myoblasts were differentiated in 2% horse serum-containing medium. The obtained myotubes were then treated by the various agents for 3 days. They were fixed and stained by the Periodic Acid-Schiff technique (21), and the surface of randomly chosen 100 individual myotubes was measured by using the Scion Image Beta 4.02 (Scion) software.

A, C2C12 myotubes were treated by various concentrations of mouse recombinant TNF α , or by 0.3 μ g/ml cycloheximide used as a positive control. ***: different from control, $p < 0.001$. Representative of 4 experiments.

B, C2C12 myotubes were treated by various concentrations of cell-permeant C2-ceramide, or C6-ceramide, or C8-ceramide. ***: different from control, $p < 0.001$. Representative of 4 experiments.

Additional file 2 - GW4869 and 3-O-methylsphingomyelin, but not myriocin, prevent TNF α -induced atrophy of C2C12 myotubes.

C2C12 myotubes obtained as above were treated for 3 days by 1 ng/ml TNF α , in the presence of various ceramide synthesis inhibitors. They were fixed and immunolabelled for sarcomeric myosin heavy chain. Their surface was measured in 10 fields in each condition, by the method of Sultan et al. (21), using Image J software.

A, Effect of 100 nM myriocin. ***: different from control, $p < 0.001$. Representative of 4 experiments.

B, Effect of 10 μ M GW4869, or 1 μ M 3-O-methylsphingomyelin (3-OMS). ***: different from control, $p < 0.001$. ++: different from TNF α alone, $p < 0.01$. Representative of 4 experiments.

Additional file 3 - TNF α and myriocin affect the amount of the Atrogin-1 target eIF3f.

L6 myotubes were treated for 3 days with or without TNF α , in the presence of 100 nM myriocin. eIF3f protein in cell extracts was analyzed by Western blotting. Results were normalized by tubulin amounts. They are the means \pm SE of 4 measurements. +++: different from control, $p < 0.0001$. *: different from TNF alone, $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Additional file 4 – Lack of effect of ceramide synthesis inhibition on the NF κ B pathway.

L6 myotubes were treated for 10 min, or for the indicated time, by TNF α in the absence or presence of 100 nM myriocin. Phospho-IKK was analyzed by Western blotting. The experiment shown is representative of 2 performed.

Additional file 5 –Parameters of tandem mass spectrometry sphingolipid analyses.

A, Physiological ceramide isoforms: m/z mass of the $[M+H-H_2O]^+$ ion for measurement in MRM mode. Product ion was m/z 264.3. C16:0-D₃₁ ceramide is used as internal standard.

B, Physiological sphingomyelin isoforms: m/z mass of the $[M-H]^+$ ion for measurement in MRM mode. Product ion was m/z 79. C16:0-D₃₁ sphingomyelin is used as internal standard.

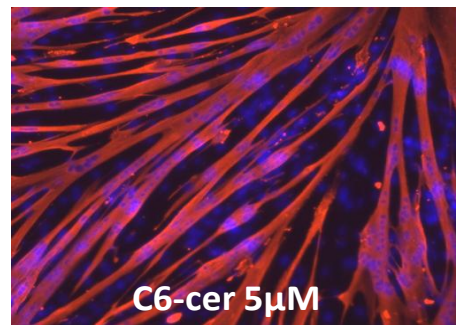
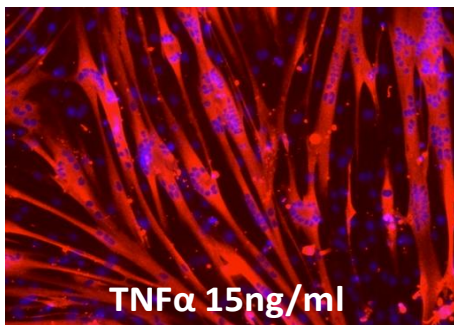
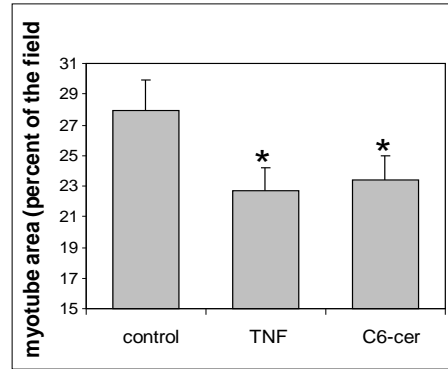
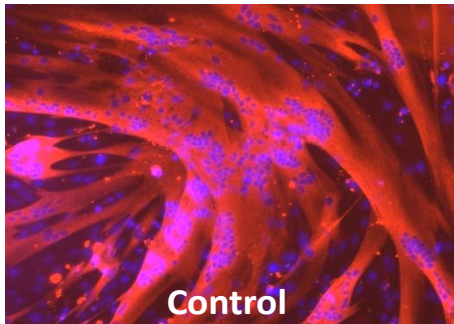
Table 1.

<i>principal ceramide molecular species</i>	<i>(pmol/μg protein)</i>		TNFα-induced increase, % of total control cer.
	Control	TNFα	
C16:0-ceramide	4.87 ± 0.82	6.21 ± 1.06	11.5 ± 5.1
C18:0-ceramide	1.76 ± 1.11	2.48 ± 0.74	6.2 ± 2.8
C20:0-ceramide	0.07 ± 0.07	0.38 ± 0.09	1.8 ± 0.3
C22:1-ceramide	0.51 ± 0.15	0.72 ± 0.14	1.5 ± 0.6
C22:0-ceramide	0.65 ± 0.18	1.05 ± 0.19	2.3 ± 0.8
C24:1-ceramide	4.77 ± 0.91	6.32 ± 1.16	9.2 ± 2.3
C24:0-ceramide	1.35 ± 0.33	1.44 ± 0.21	1.5 ± 0.7
total ceramides	14.70 ± 3.40	19.70 ± 3.85	35.5 ± 8.8

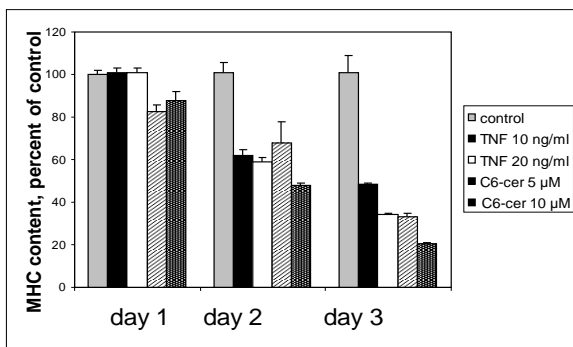
<i>principal sphingomyelin molecular species</i>	<i>(pmol/μg protein)</i>		TNFα-induced decrease, % of total control SM
	Control	TNFα	
C16:0-sphingomyelin	69.7 ± 10.54	47.2 ± 7.66	20.4 ± 2.1
C18:0-sphingomyelin	6.28 ± 0.94	5.35 ± 0.82	1.1 ± 0.1
C20:0-sphingomyelin	1.29 ± 0.13	1.12 ± 0.11	0.16 ± 0.07
C22:1-sphingomyelin	3.17 ± 0.32	2.77 ± 0.38	0.54 ± 0.07
C22:0-sphingomyelin	3.15 ± 0.6	2.62 ± 0.46	0.55 ± 0.14
C24:1-sphingomyelin	13.7 ± 2.44	10.00 ± 1.81	2.72 ± 0.22
C24:0-sphingomyelin	5.01 ± 1.03	4.39 ± 0.94	0.55 ± 0.08
total sphingomyelins	118.8 ± 17.2	85.7 ± 13.1	30.4 ± 2.1

figure 1

A



B



C

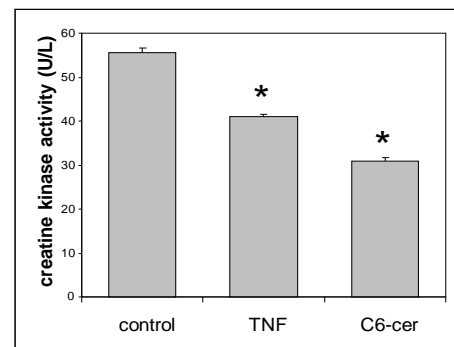


figure 2

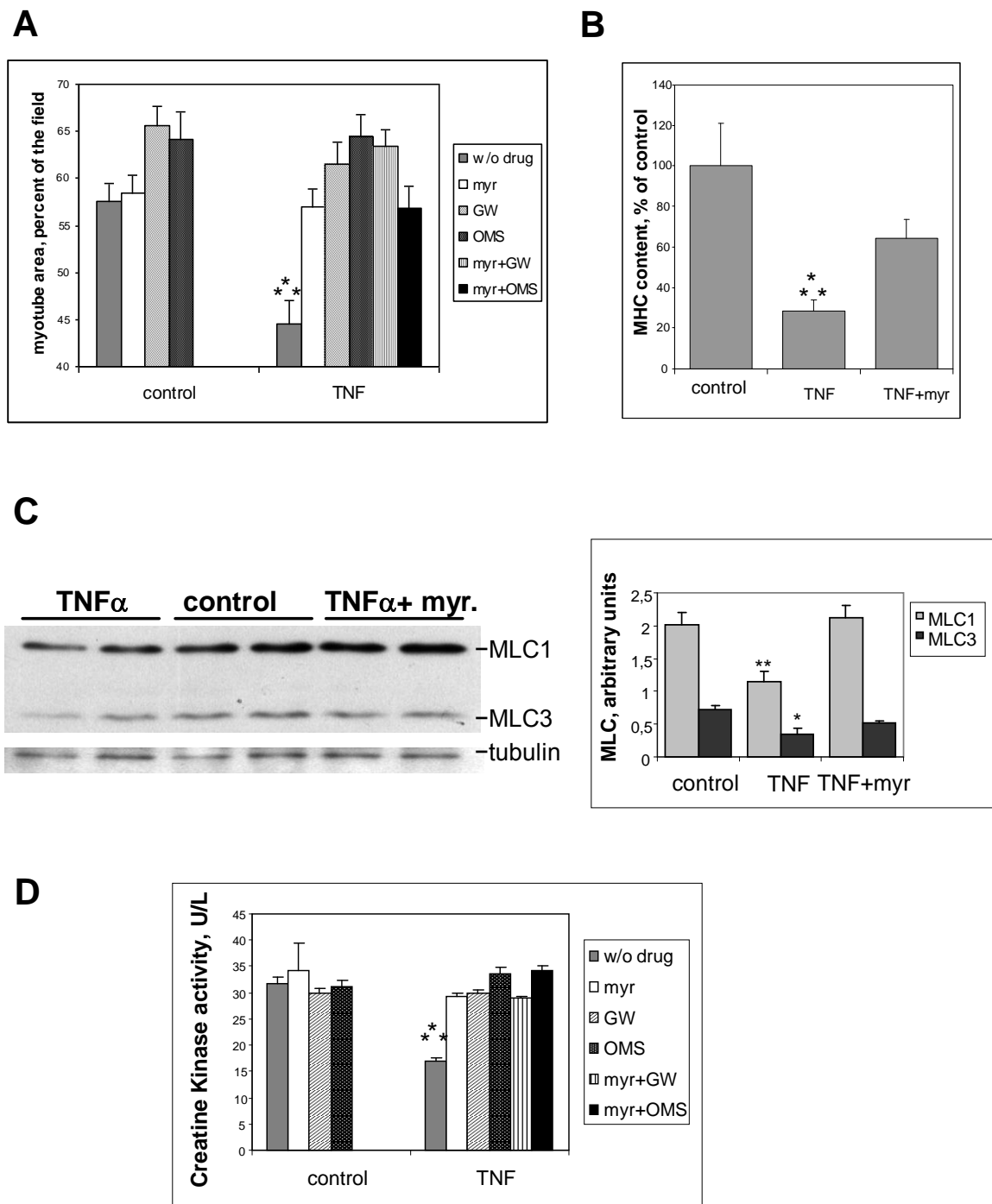
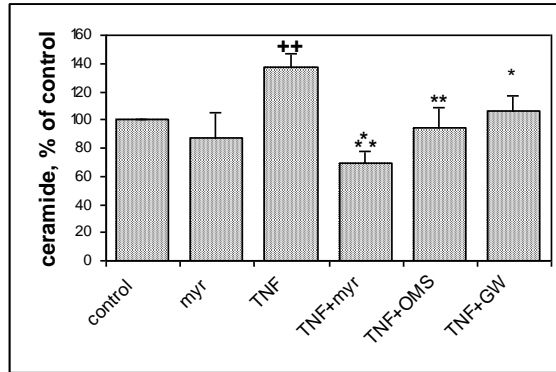


figure 3

A



B

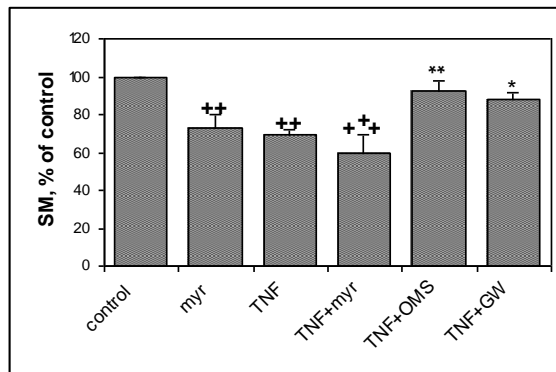


figure 4

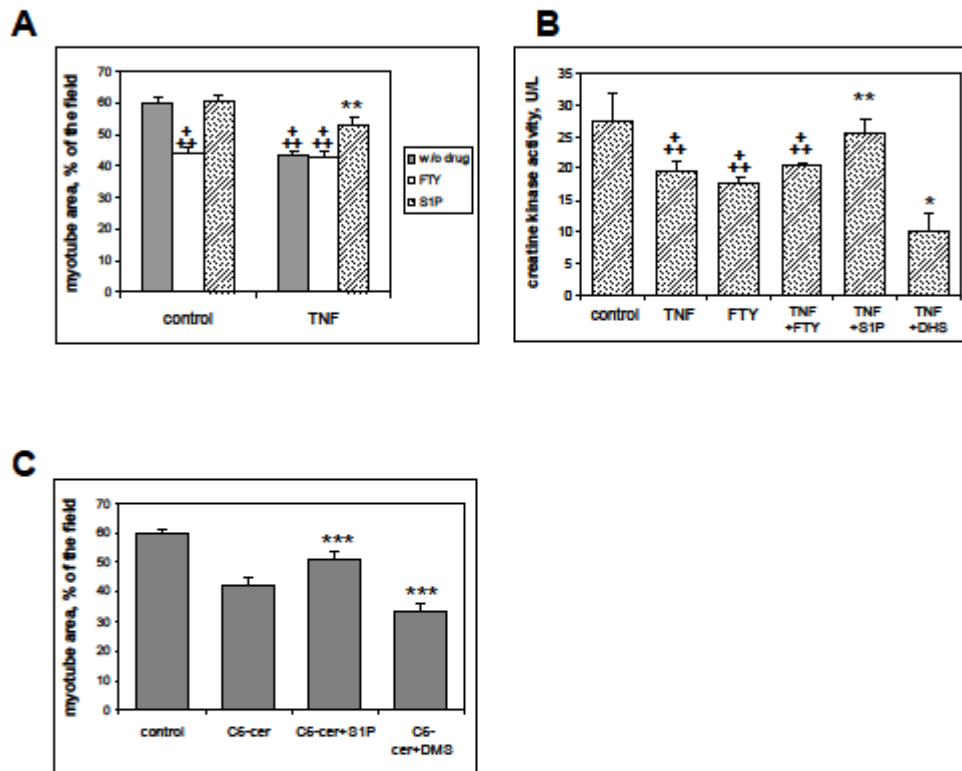


figure 5

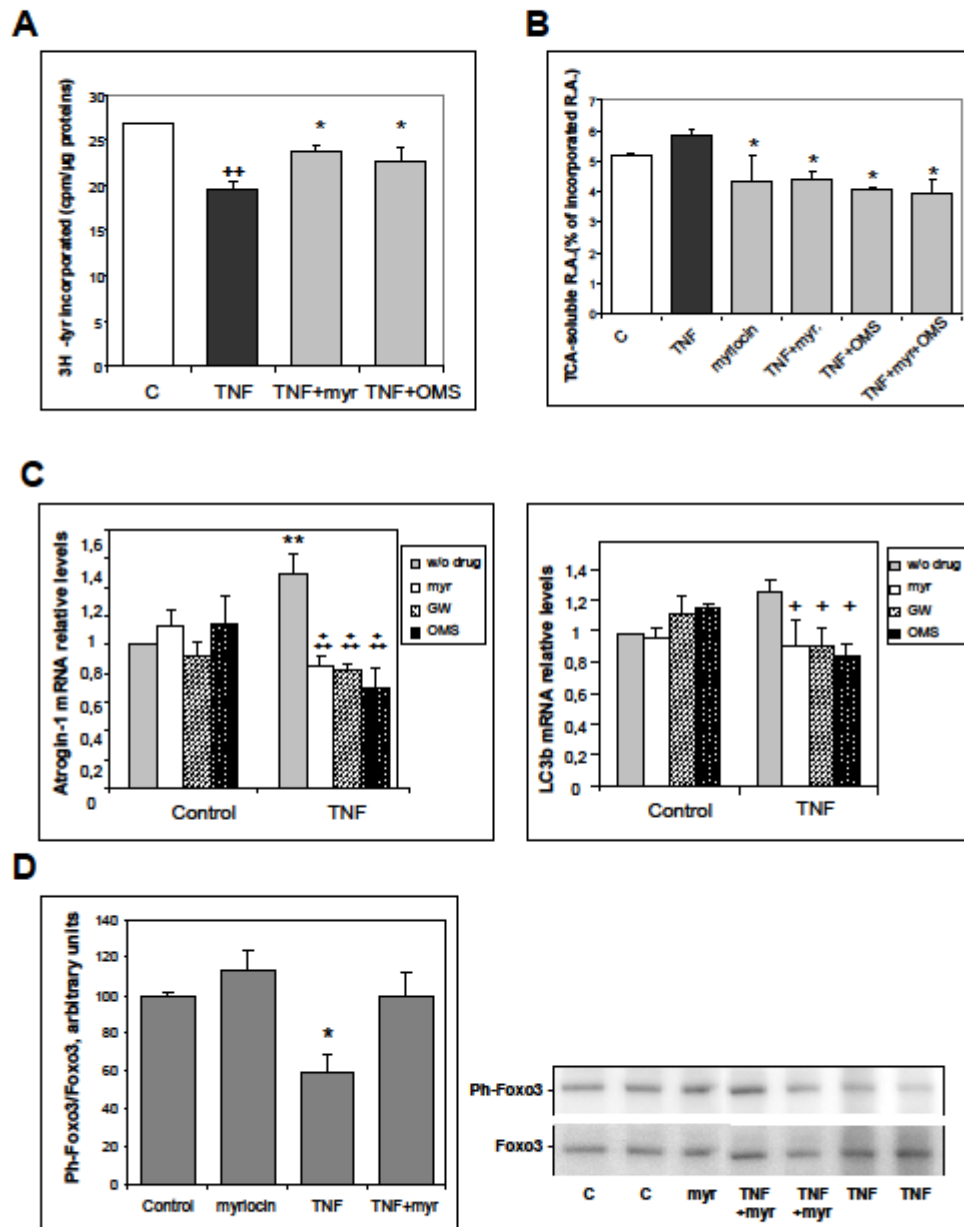


figure 6

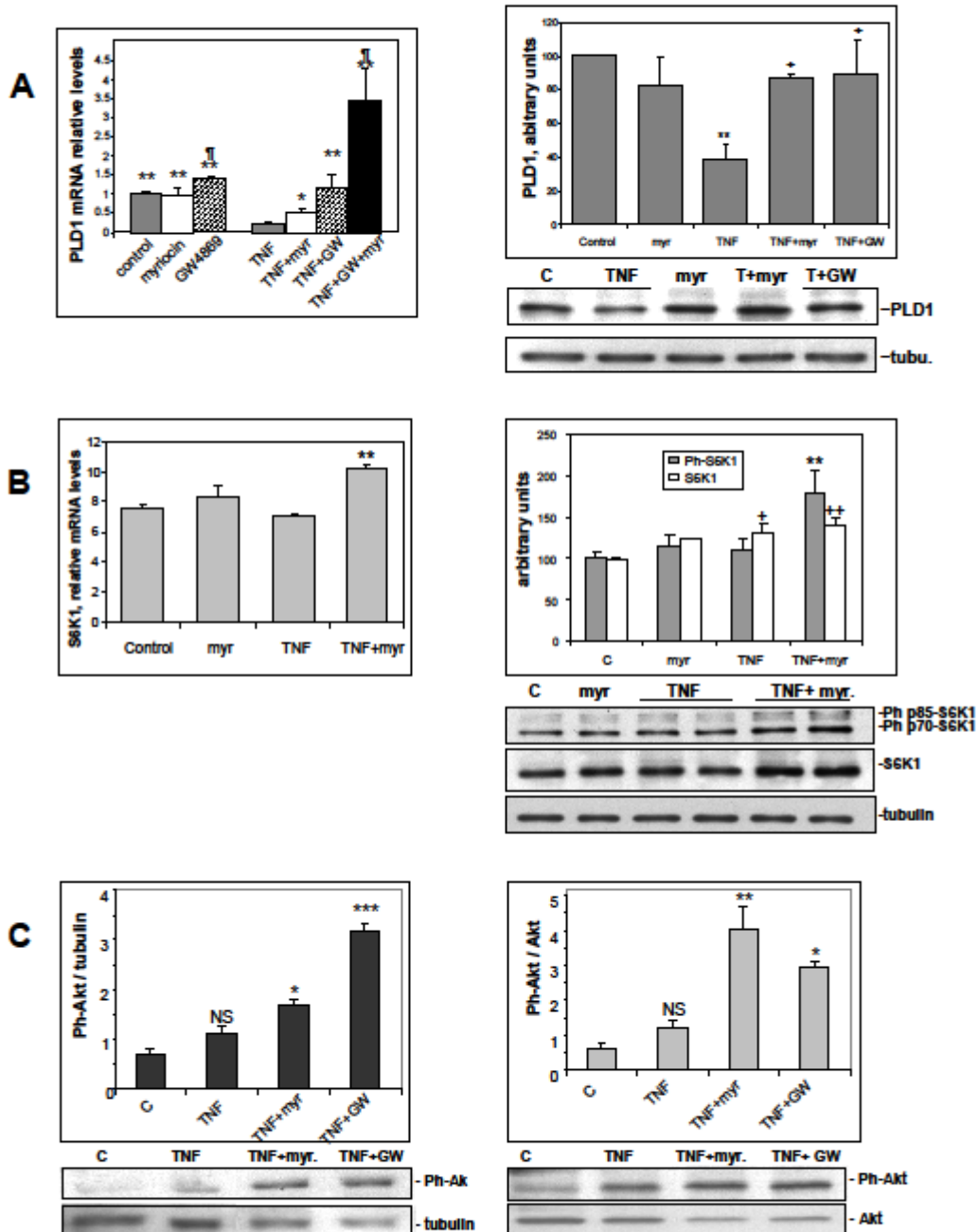
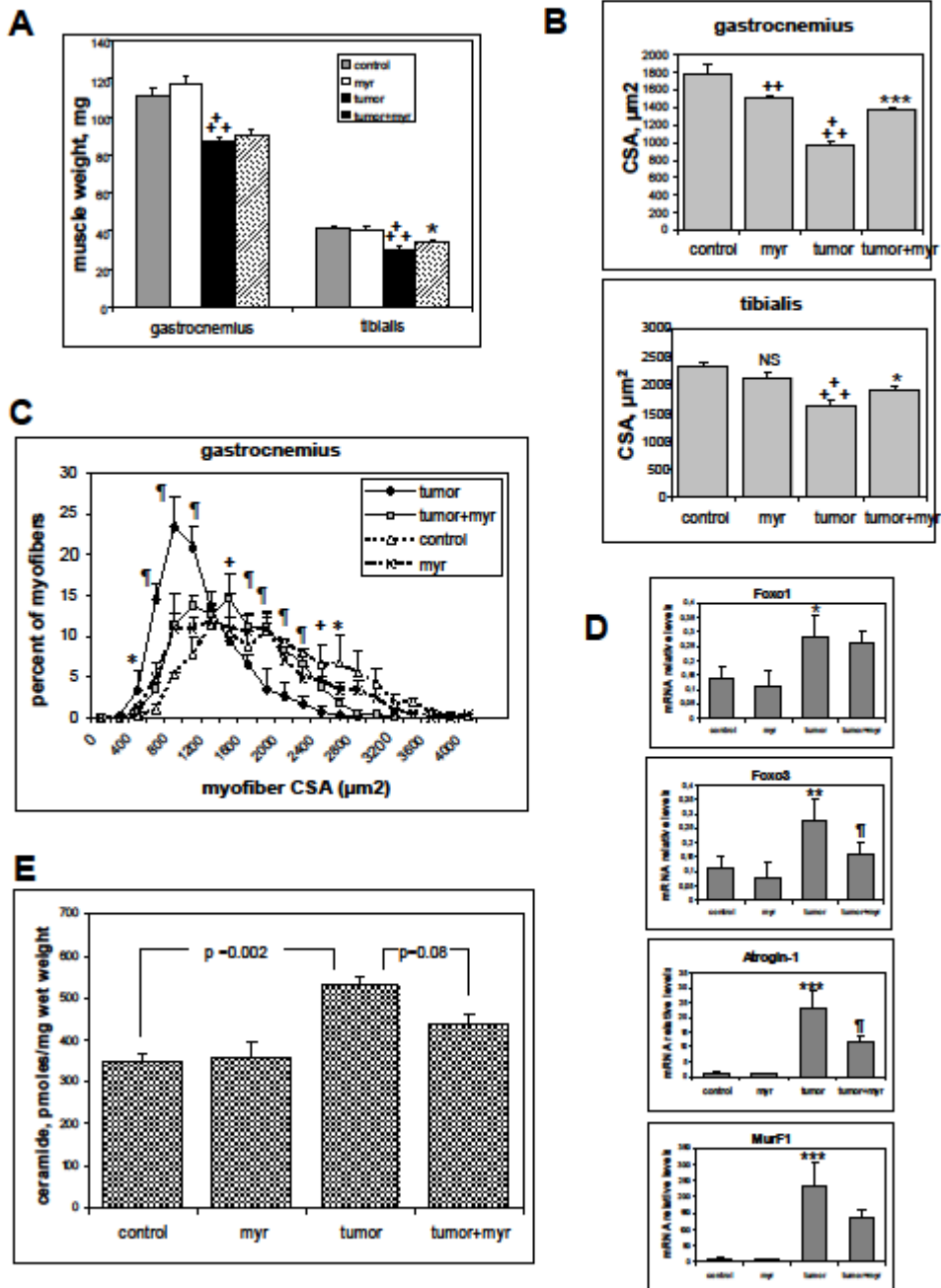
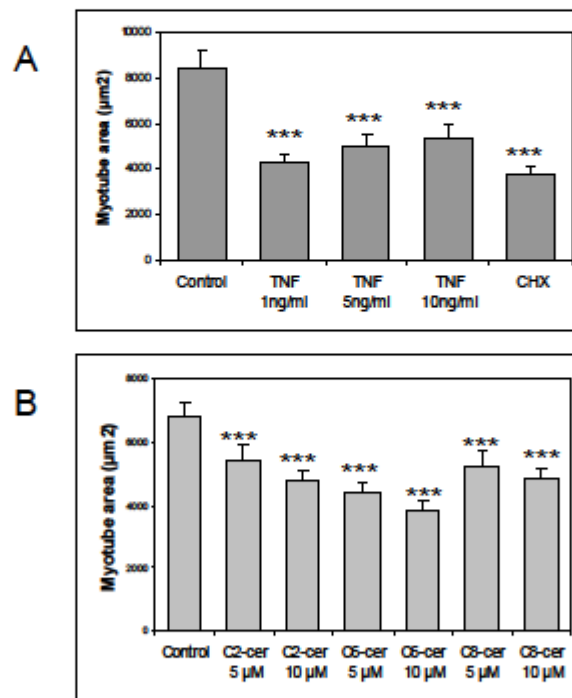


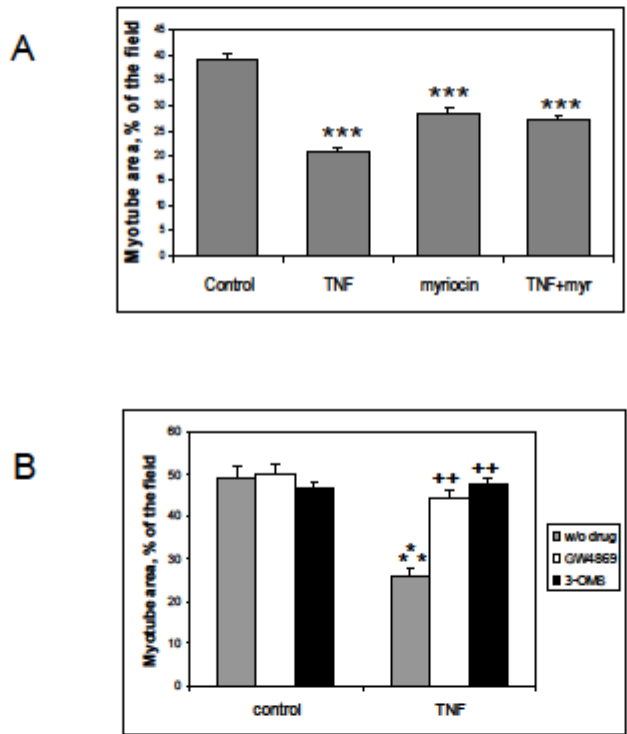
figure 7



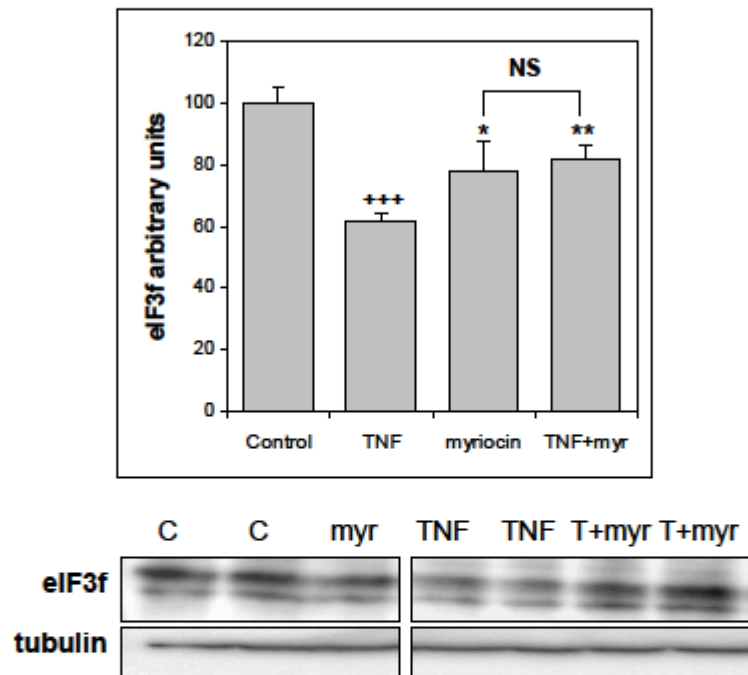
Additional file 1.



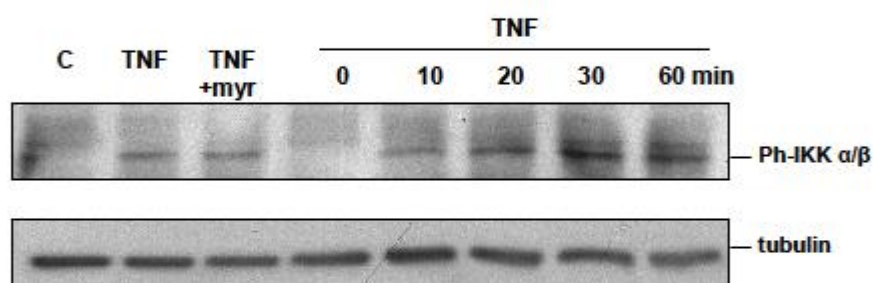
Additional file 2 -



Additional file 3.



Additional file 4 -



FOLIO ADMINISTRATIF
THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES
DE LYON

NOM : DE LARICHAUDY

DATE de SOUTENANCE : 04/04/2012

Prénoms : Joffrey André Georges

TITRE : IMPLICATION DES CERAMIDES DANS L'ATROPHIE MUSCULAIRE

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre :

Ecole doctorale : EDISS

Spécialité : BIOCHIMIE

RESUME :

Le muscle squelettique fait preuve d'une remarquable plasticité en réponse aux changements physiologiques, comme l'activité physique, et aux situations pathologiques. Il subit notamment une atrophie sévère lors de la cachexie qui accompagne diverses pathologies chroniques comme le cancer, le SIDA, etc. L'atrophie musculaire est aussi une composante de la sarcopénie qui survient lors du vieillissement normal, et se caractérise par un déclin de la force et de la masse musculaire. L'atrophie musculaire, qui entraîne une augmentation de la mortalité et diminue l'efficacité des traitements, constitue donc un problème de santé majeur.

La fonte musculaire se caractérise par une perte des capacités régénératives et une altération de l'équilibre entre synthèse et dégradation protéiques dans les fibres adultes. Des taux particulièrement élevés de cytokines circulantes, dont le $TNF\alpha$, qui affectent l'homéostasie du muscle via différentes voies de signalisation, semblent être à l'origine de l'atrophie. Les mécanismes de la réponse atrophique musculaire à ces taux circulants élevés sont cependant mal définis.

Le $TNF\alpha$ a des effets complexes. Il peut activer de multiples voies de signalisation, parmi lesquelles l'induction de la synthèse de sphingolipides, et plus particulièrement de céramides, par la voie de novo et par l'activation des sphingomyélinases. Au niveau musculaire, les céramides sont connus pour leurs effets sur la signalisation de l'insuline, sur l'apoptose et sur la différenciation myogénique. Par contre, leur implication dans le cadre de l'atrophie n'avait jamais été prise en compte.

L'objectif de ce travail a été dans un premier temps de démontrer le rôle des céramides dans l'atrophie. Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé la voie de signalisation par laquelle l'augmentation intramusculaire de céramide induite par le $TNF\alpha$ aboutit à une chute de la synthèse protéique, couplée à une augmentation de la protéolyse. Dans ce but, nous avons mis au point des modèles in vitro d'atrophie, impliquant des myotubes traités par des concentrations physiologiques de $TNF\alpha$. Nous avons en parallèle étudié un modèle in vivo de cachexie induite chez la souris par l'implantation d'un adénocarcinome C26. L'analyse des sphingolipides nous a permis de montrer l'augmentation des taux de céramides concomitante à l'atrophie générée in vitro et in vivo. Le rôle des céramides dans l'atrophie a été démontré par l'effet protecteur des inhibiteurs de leur synthèse, dans les modèles in vitro et in vivo. Nous montrons en plus que les effets atrophiques des céramides dans un modèle in vitro sont dus à l'inhibition de la voie de signalisation Phospholipase D/mTOR/Akt.

Nos résultats nous ont permis de prouver le rôle des sphingolipides dans le contrôle de l'homéostasie protéique du muscle. La modulation du métabolisme des sphingolipides apparaît donc comme une nouvelle cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de la perte musculaire associée à diverses pathologies.

MOTS-CLES : cachexie, muscle squelettique, sphingolipides, protéolyse, $TNF\alpha$, mTOR

Laboratoire (s) de recherche : Unité CARMEN U1060

Directeur de thèse: Dr Georges Némoz

Président de jury : Dr Hubert Vidal

Composition du jury :

Dr Anne Bonnieu (rapporteur)

Pr Damien Freyssenet (rapporteur)

Dr David Cheillan (examinateur)

Dr Hubert Vidal

Dr Georges Nemoz